



MEDICINA

THAÍLLA SOUZA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR
LEISHMANIA EM AMBIENTE BIDIMENSIONAL**

SALVADOR – BA

2022

Thaílla Souza da Silva

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS POR
LEISHMANIA EM AMBIENTE BIDIMENSIONAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para aprovação parcial no 4º ano de Medicina.

Orientadora: Dr. Juliana P. B. M. Fullam
Coorientadora: Msc. Amanda R. Paixão

Salvador – BA

2022

RESUMO

Introdução: *Leishmania* é um parasito intracelular capaz de causar lesão na pele, mucosa e órgãos internos. A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência do parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Em trabalho publicado anteriormente por Menezes e colaboradores em 2016, utilizando macrófagos murinos, foi mostrado uma redução da motilidade e migração de macrófagos infectados por *Leishmania* em ambiente bidimensional, associada à redução da expressão de proteínas envolvidas em formação de complexos de adesão, assim como sua fosforilação. As autoras mostraram ainda um aumento da polimerização de filamentos de actina nessas células. Entretanto, pouco se conhece sobre a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania* e os mecanismos envolvidos nesse processo. **Objetivo:** Avaliar a migração de células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* em contexto bidimensional. **Metodologia:** Foram avaliadas a migração celular, expressão de proteínas do complexo de adesão, polimerização da actina e expressão do CCR7. **Resultados:** Houve um aumento na taxa de células migrantes, uma maior expressão de FAK e paxilina fosforilada, direcionamento dos feixes de actina polimerizada para a borda celular e aumento da expressão de CCR7 nos grupos infectados por *L. infantum*. **Conclusão:** Observou-se que a infecção por *L. infantum* leva a um aumento na migração de células dendríticas, sugerindo uma associação destas células com o processo de visceralização da doença.

Palavras-chave: células dendríticas, *Leishmania*, Migração.

ABSTRACT

Introduction: *Leishmania* is an intracellular parasite capable of causing damage to the skin, mucosa and internal organs. The dissemination and homing of infected cells containing *Leishmania* antigens are essential for the survival of the parasite in the host and for the establishment of the lesion. In a study previously published by Menezes et al in 2016, using murine macrophages, a reduction in the motility and migration of *Leishmania*-infected macrophages in a two-dimensional environment was shown, associated with reduced expression of proteins involved in the formation of adhesion complexes, as well as their phosphorylation. The authors also showed an increase in the polymerization of actin filaments in these cells. However, little is known about the migration of dendritic cells infected by *Leishmania* and the mechanisms involved in this process. **Objective:** To evaluate the migration of dendritic cells infected by different species of *Leishmania* in a two-dimensional context. **Methodology:** Cell migration, adhesion complex protein expression, actin polymerization and CCR7 expression were evaluated. **Results:** There was an increase in the rate of migrating cells, a higher expression of FAK and phosphorylated paxillin, directing polymerized actin bundles to the cell edge and increased expression of CCR7 in the groups infected by *L. infantum*. **Conclusion:** It was observed that infection by *L. infantum* leads to an increase in the migration of dendritic cells, suggesting an association of these cells with the process of visceralization of the disease.

Keywords: dendritic cells, *Leishmania*, Migration.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	9
Objetivo Geral	9
Objetivos Específicos.....	9
3. REVISÃO DE LITERATURA	10
3.1 Leishmaniose	10
3.2 Células Dendríticas	10
3.3 Migração Celular	11
3.4 Migração de Células Dendríticas na Infecção por <i>Leishmania</i>	11
4. METODOLOGIA	13
4.1 Separação de PBMC e Cultivo de Células Dendríticas (DCs).....	13
4.2 Cultivo de Parasitos <i>Leishmania</i>	13
4.3 Infecção de Células Dendríticas e Determinação da Taxa de Infecção	13
4.4 Avaliação da Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i>	14
4.5 Avaliação da Formação de Complexos de Adesão em Células Dendríticas Infectadas por <i>Leishmania</i>	15
4.6 Avaliação da Dinâmica do Citoesqueleto de Actina em Células Dendríticas Infectadas por <i>Leishmania</i>	15
4.7 Avaliação da Expressão de CCR7 em Células Dendríticas Infectadas por <i>Leishmania</i>	16
4.8 Análise Estatística.....	16
5 RESULTADOS	17
5.1 Avaliação do Percentual de Infecção de Células Dendríticas Infectadas por <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. braziliensis</i> ou <i>L. infantum</i>	17

5.2 Avaliação da Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i>	18
5.3 Avaliação da Formação de Complexos de Adesão em Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i>	19
5.4 Avaliação da Polimerização dos Filamentos de Actina Durante o Processo de Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de <i>Leishmania</i>	21
5.5 Avaliação da Expressão de CCR7 em Células Dendríticas Infectadas por <i>Leishmania</i>	22
6 DISCUSSÃO	24
7. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose cutânea é endêmica, sendo registrados cerca de 12.690 mil novos casos por ano, além da forma visceral da doença, que apresenta 3.200 mil novos casos por ano (1). Ambas as formas, são causadas por um parasito intracelular, a *Leishmania*, que infecta diversos hospedeiros vertebrados, incluindo o homem (2). A permanência das células infectadas no local da inflamação ou a sua disseminação tem relação tanto com a sobrevivência do parasito como com o estabelecimento da lesão, as quais podem apresentar diferentes manifestações clínicas, desde lesões localizadas, mucocutâneas até a forma visceral, forma mais grave da doença (3). Mecanismos associados a migração de células hospedeiras infectadas por este parasito são fundamentais para entender o processo de disseminação da doença e formular estratégias terapêuticas contra a leishmaniose.

A migração celular é um evento complexo e formado por uma série de processos que envolvem: protrusão e adesão da borda anterior da célula, desmontagem da adesão na parte traseira da célula e contração do citoesqueleto de actina no sentido do movimento (4,5). A formação de adesões focais compreende a adesão celular à matriz extracelular e envolve a ativação da integrina e a ativação de diversas proteínas intracelulares, como FAK e paxilina (6,7). Somando-se a todos esses processos, existe também a ação das proteínas Rac, Rho e Cdc42, membros da superfamília Ras, importantes para a dinâmica da actina e fundamentais para o movimento celular (8,9).

Sabe-se que diferentes patógenos podem ser capazes de modificar a maturação, a migração e a ativação dos linfócitos T pelas células dendríticas (10–12). Estudos recentes demonstraram que a infecção por *Toxoplasma gondii* e *Burkholderia pseudomallei* podem modular a migração dessa célula, resultando na potencialização da disseminação sistêmica (13,14). Entretanto, pouco se conhece sobre a migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania*.

Na leishmaniose essa disseminação também tem um papel importante, visto que em algumas formas da leishmaniose tegumentar as lesões permanecem restritas à pele e em outras há disseminação do parasito para múltiplos focos da pele ou para mucosa. Nos casos de leishmaniose visceral, a disseminação parece ser ainda mais complexa (10). Provavelmente há um deslocamento pele-linfonodo-sangue e um

estabelecimento sequencial de células parasitadas em diferentes tecidos. Porém, pouco se compreende sobre o papel das células dendríticas nesse processo de disseminação. O entendimento da relação da migração de células dendríticas com a infecção por *Leishmania* e com o processo de disseminação da doença, poderá corroborar para o surgimento de novas estratégias terapêuticas e de prevenção, contribuindo para uma redução de casos graves da doença.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar a migração de células dendríticas infectadas por *Leishmania sp* em ambiente bidimensional e os mecanismos envolvidos neste processo.

Objetivos Específicos

- Avaliar a migração direcional de células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania* utilizando quimiotrator, em ambiente bidimensional;
- Avaliar a formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, em ambiente bidimensional;
- Avaliar a dinâmica do citoesqueleto de actina em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, em ambiente bidimensional;
- Avaliar a expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose

A leishmaniose é considerada como uma das doenças mais negligenciadas do mundo e dados epidemiológicos da OMS revelaram que 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença e que 2 milhões de casos ocorrem a cada ano (2). De acordo com informações do Ministério da Saúde, a América Latina apresenta 12 países nos quais a doença já foi descrita e dentro desse panorama o Brasil abrigou 90% desses casos, com destaque principal para a região nordeste (15). A infecção por este parasito resulta em manifestações clínicas de amplo espectro que vão desde lesões cutâneas autolimitadas até o acometimento de vísceras, como baço e fígado (16). A forma cutânea ainda pode ser classificada de acordo com apresentação clínica em: cutânea localizada, cutânea disseminada, cutânea difusa e muco-cutânea (17). Em relação a forma visceral, essa forma clínica acomete primariamente crianças abaixo de 10 anos de idade e isso se deve a condições como imaturidade imunológica, desnutrição e maior exposição ao vetor no peridomicílio (18–20). Se trata de uma condição extremamente negligenciada e que apresenta taxas de letalidade de 10-19%, sendo que a principal estratégia para controle desses resultados é a identificação precoce dos sintomas (18,19,21).

A *Leishmania* possui dois estágios no ciclo de vida: um estágio extracelular em um hospedeiro invertebrado (flebotômíneo) e um estágio intracelular em um hospedeiro vertebrado (22). O parasita é transmitido para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo de flebotômíneos do gênero *Lutzomyia* (novo mundo) e *Phlebotomus* (velho mundo). No hospedeiro vertebrado, o parasita evolui para a forma amastigota (22). Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, os parasitos interagem com uma diversidade de tipos celulares, entre elas temos os macrófagos e as células dendríticas (23).

3.2 Células Dendríticas

As células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) são uma das principais células apresentadoras de antígeno do sistema imunológico e possuem funções relacionadas diretamente com a imunogenicidade como a identificação, regulação e ativação de células T (24,25). Esse grupo celular é descrito como células imaturas,

que, após contato com antígenos, amadurecem e migram para linfonodos drenantes (26). Durante esse processo de amadurecimento e migração, ocorre um aumento da expressão de CCR7 nessas células, que fundamental para o processo de migração da mesma (27). Entretanto, a presença da *Leishmania* prejudica a migração e isso pode ser associado a permanência da inflamação no local da infecção (28).

3.3 Migração Celular

O processo de migração envolve diversos eventos moleculares integrados, sendo mediada principalmente por filamentos de actina no citoplasma e formação de complexos de adesão (5). Os rearranjos do citoesqueleto de actina que permitem o movimento celular são induzidos pela ativação de uma ampla variedade de proteínas de ligação ao GTP, denominada família de proteína Rho (29).

Estudos recentes demonstraram que a infecção por *Leishmania* reduz a migração de macrófagos, associado a uma redução da formação de complexos de adesão nestas células. Os autores mostraram que este efeito independe da carga parasitária no interior da célula hospedeira, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a modulação da expressão de paxilina e sua fosforilação, além da fosforilação e atividade de FAK. Os autores mostraram ainda que existe um aumento na frequência de polimerização e turnover de filamentos de actina da célula hospedeira após a infecção por *Leishmania amazonensis* (30).

3.4 Migração de Células Dendríticas na Infecção por *Leishmania*

Para a funcionalidade do sistema imunológico deve ocorrer a apresentação de antígenos pelas células dendríticas que são apresentadoras profissionais de antígenos. Essas podem ser encontradas na fase madura ou imatura, sendo que as células imaturas são fortemente aderentes e as células maduras altamente móveis(31). Durante o processo de maturação celular, temos a presença de elementos como remodelação do seu citoesqueleto de actina e regulação de CCR7 e CXCR4 (32). Quanto a relação da migração da célula dendrítica durante a infecção por *Leishmania*, ambos os estágios infecciosos da *Leishmania* (promastigotas metacíclicas e amastigotas) podem ser fagocitados por DCs, sendo ou não opsonizadas(33). E embora exista a necessidade de mais estudos que fornecem

mecanismos detalhados, já se sabe que a infecção por *Leishmania* é capaz de minimizar a ativação DC, modular a capacidade de resposta a outros estímulos inflamatórios no local da infecção e modificar o potencial de migração de DCs (34–36). Isso pode favorecer o estabelecimento do patógeno no hospedeiro humano, visto que estudos atuais demonstram que a capacidade da célula dendrítica para estabelecer uma resposta imune adequada se correlaciona com sua capacidade de migrar (31).

4. METODOLOGIA

O projeto foi desenvolvido na FIOCRUZ - Instituto Gonçalo Muniz e contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Trata-se de um estudo experimental *in vitro*, no qual a população do estudo serão células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*. As variáveis estudadas foram migração celular, expressão de proteínas do complexo de adesão, polimerização da actina e expressão do CCR7. Todas eram variáveis numéricas contínuas, com exceção da migração celular que é uma variável numérica discreta.

4.1 Separação de PBMC e Cultivo de Células Dendríticas (DCs)

Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando células dendríticas humanas. As DCs foram obtidas através das amostras de sangue de doadores saudáveis que foram coletados em tubos de 10mL com EDTA. As amostras foram transferidas e em seguida diluídas (1:1) em salina. Após a diluição, o sangue foi sobreposto em Ficoll-Histopaque. As amostras foram então centrifugadas três vezes, as nuvens de PBMC (células polimorfonucleares de sangue periférico) foram coletadas, as células contadas em Neubauer, passadas em coluna magnética para isolamento de células CD14+ ressuspendidas e plaqueadas com RPMI suplementado com GM-CSF [50ng/ml] + IL4 [100UI/ml] por 7 dias para diferenciação em células dendríticas.

4.2 Cultivo de Parasitos *Leishmania*

Parasitos de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125), *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) derivados de amastigotas isoladas de linfonodo da pata direita de camundongos C57BL/6 foram mantidos em meio ágar-sangue NNN em estufa B.O.D. a 24°C. Para acompanhamento do crescimento das culturas, o número de parasitos foi quantificado diariamente. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos até a 7ª passagem.

4.3 Infecção de Células Dendríticas e Determinação da Taxa de Infecção

Para realização de determinação da taxa de infecção e carga parasitária, as células dendríticas foram obtidas e plaqueadas em quadruplicata em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^5 /poço, e infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* na

proporção de 10:1 ou *L. infantum* na proporção de 20:1 por 4 horas. Em seguida, as células dendríticas foram expostas aos parasitos por 0, 6, 24 e 48 horas a fim de obter a taxa de infecção e carga parasitária e, posteriormente, fixadas com PFA 4%, citocentrifugadas e coradas com DAPI (Invitrogen) para marcação nuclear das células e dos parasitos. Um total de 400 células foram contadas por grupo de forma randomizada por microscopia de fluorescência convencional (Microscópio Olympus). Para realização dos ensaios de migração e imunofluorescência, um total de 2×10^5 de células dendríticas foi plaqueado em placas de 24 poços e infectadas por *L. amazonensis* na proporção 10:1, *L. braziliensis* 10:1, *L. infantum* 20:1 por 4 horas. Adicionalmente, para os ensaios de migração, um grupo de células foi incubado com zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma Aldrich) como controle, na proporção 10:1 ou 20:1 por 4 horas a 37°C e 5% CO₂. As células foram então lavadas e reincubadas por adicionais 6, 12, 24 ou 48 horas para os ensaios de migração e 48 horas para os ensaios de imunofluorescência.

4.4 Avaliação da Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de *Leishmania*

A avaliação da migração direcional de células dendríticas infectadas ou não por diferentes espécies de *Leishmania* ou incubadas com zymosan foi avaliada na presença de CCL3, utilizando câmaras Transwell com membranas de policarbonato (24 poços, 5µm Corning® Transwell® *polycarbonate membrane cell culture inserts*). Células infectadas ou não, na concentração de 5×10^4 células foram plaqueadas nos insertos por 4 horas, lavadas com PBS e fixadas com PFA 4%. A parte superior da membrana foi raspada com *swab*, a fim de remover as células que não migraram. Em seguida, as membranas foram removidas do inserto com auxílio de um bisturi. As membranas removidas foram então montadas em lâminas e posteriormente, coradas com DAPI (Invitrogen) para marcação nuclear. Após randomização das lâminas, a análise da migração das células dendríticas foi realizada pela contagem do núcleo de células que atravessaram a membrana do inserto da *transwell* (10 campos randômicos por grupo), com auxílio de microscopia de fluorescência (Olympus).

4.5 Avaliação da Formação de Complexos de Adesão em Células Dendríticas Infectadas por *Leishmania*

Células dendríticas infectadas ou não por diferentes espécies de *Leishmania* foram lavadas com PBS 1x, fixadas com PFA 4% por 15 minutos e submetidas a citospin. As células foram incubadas com NH_4Cl_2 [15 mM] por 20 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 1x, incubadas com solução de bloqueio (3% bovine serum albumin [BSA] em PBS 1x por 1 hora, lavadas 3 vezes com PBS 1x, permeabilizada com PBS-Saponina 0.15% por 15 min e incubadas com anti-p-paxilina 1:100 ou anti-p-FAK 1:500 (pY¹¹⁸)) (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3x com PBS 1x, e incubadas com anti-rabbit Alexa Fluor 552 Molecular Probes) por 45 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal (Leica SP8) e a intensidade de fluorescência das imagens foi quantificada por software FIJI, em um total de 30 células por grupo.

4.6 Avaliação da Dinâmica do Citoesqueleto de Actina em Células Dendríticas Infectadas por *Leishmania*

Células dendríticas infectadas ou não por *Leishmania* foram lavadas com PBS, fixadas com PFA 4% por 15 minutos e submetidas a citospin. As células foram incubadas com NH_4Cl_2 [15 mM] por 20 minutos, lavadas 3 vezes com PBS 1x, incubadas com solução de bloqueio (3% BSA em PBS por 1 hora, lavadas 3 vezes com PBS 1x, permeabilizada com PBS-Saponina 0.15% por 15 minutos e incubadas com anti-Rac-1, anti-RhoA, anti-Cdc42 (Invitrogen) por 1 hora. Posteriormente, as células foram lavadas 3x com PBS 1x, e incubadas com anti-rabbit Alexa Fluor 552 ou anti-mouse Alexa Fluor 552 (ambos da Molecular Probes) e Faloidina (Invitrogen) por 45 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) [10 mg/mL] para marcação nuclear. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x e incubadas com DAPI Prolong Gold Antifade (Invitrogen) (10 mg/mL) para marcação nuclear. As imagens foram adquiridas através do microscópio confocal (Leica SP8) e um total de 30 células foram quantificadas por software FIJI.

4.7 Avaliação da Expressão de CCR7 em Células Dendríticas Infectadas por *Leishmania*

Células dendríticas humanas foram obtidas como descrito anteriormente. As células infectadas ou não, na concentração de 5×10^5 , foram distribuídas em tubos de citometria e submetidas a marcação com mix de anticorpos para CD11c (Violet Brilliant Biolegend) e anti-CCR7 (FITC Biolegend), incubadas no gelo por 30 minutos sob proteção da luz. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 1mL de *stain buffer* gelado (2% SBF em PBS 1X) e centrifugadas a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado, o pellet ressuspendido em 200uL de *stain buffer* gelado, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACS DIVA) e as análises foram feitas com auxílio do software FlowJo v7.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® e submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. A comparação dos parâmetros entre dois grupos com distribuição normal foi realizada pelo teste *t* de Student, considerando as diferenças como significantes quando $p < 0,05$. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney (teste U).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do Percentual de Infecção de Células Dendríticas Infectadas por *L. amazonensis*; *L. braziliensis* ou *L. infantum*

Para realização dos experimentos com diferentes espécies de *Leishmania*, realizamos a padronização das infecções através de uma cinética de infecção. As células foram cultivadas, plaqueadas em placas de 24 poços [2×10^5 / poço] e submetidas a infecção por *L. amazonensis* [10:1]; *L. braziliensis* [10:1] e *L. infantum* [20:1] por 4 horas. Seis, 24 e 48 horas após a infecção, as células foram fixadas, marcadas com DAPI e contados o número de células infectadas e o número de parasito por célula para avaliação do percentual de infecção. O resultado indica um percentual de 60% para infecção por *L. amazonensis*, 50-55% para *L. braziliensis* ou *L. infantum*, com uma média de 5-6 parasitos por célula (Figura 1).

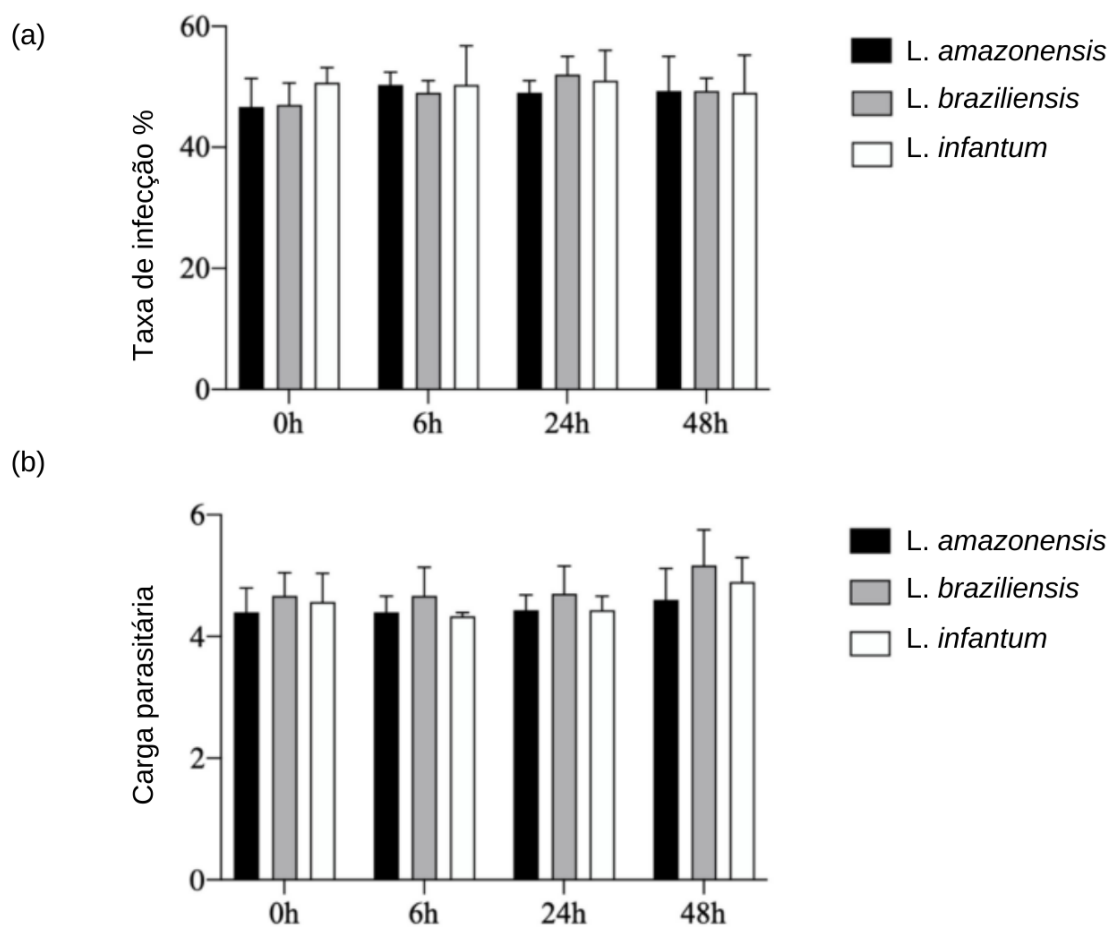


Figura 1. Taxa de infecção de DCs infectadas com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum*. Células dendríticas foram infectadas por *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis*

(10:1) ou *L. infantum* (20:1) por 4 horas, lavadas com PBS 1x para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por adicionais 6,24 e 48h a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, as células foram coletadas, fixadas com PFA 4%, submetidas a citospin e coradas com DAPI para marcação nuclear. Foram contadas 400 células por grupo e a quantificação foi realizada utilizando o *software* Graphad. (a) Percentual de DCs infectadas após 6, 24 e 48 horas. (b) Carga parasitária de DCs infectadas após 6, 24 e 48 horas. Resultado representativo de 3 experimentos.

5.2 Avaliação da Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de *Leishmania*

Para avaliar a migração de células dendríticas infectadas ou não por *Leishmania*, foram realizados ensaios de migração direcional com quimioatratante específico (CCL3) utilizando câmaras Transwell (Figura 2). Os resultados demonstraram que nos tempos de 6, 12, 24 ou 48 horas após a infecção há um aumento na taxa de células migrantes nos grupos infectados por *L. infantum*. Entretanto, foi observada apenas um aumento transitório na migração de células infectadas por *L. amazonensis*, nos tempos de 6 e 12 horas após a infecção e uma redução na migração das células infectadas por *L. braziliensis*, quando comparados com o grupo controle. Adicionalmente, não foi observado alteração entre a taxa de migração dos grupos não infectados e expostos à fagocitose por zymosan (Figura 3).

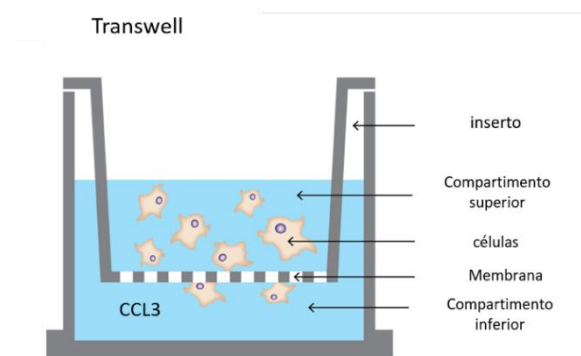


Figura 2. Sistema Transwell. Imagem representativa do inserto do sistema, as células são adicionadas na parte superior da membrana e, após incubação, as células que migraram para parte inferior são observadas por microscopia.

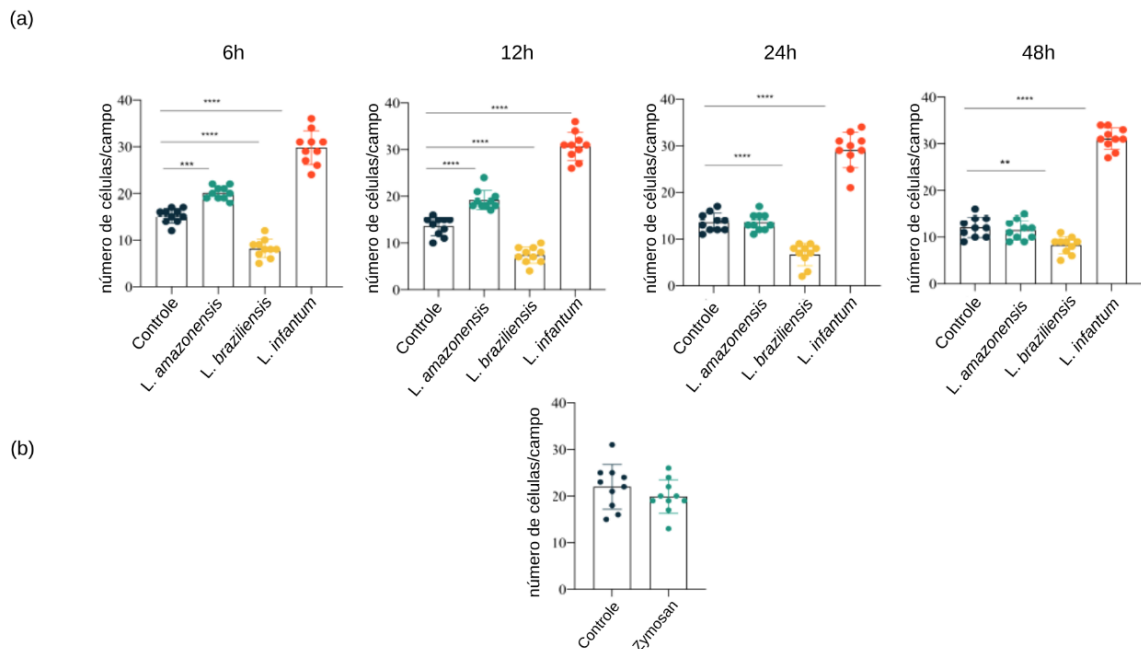


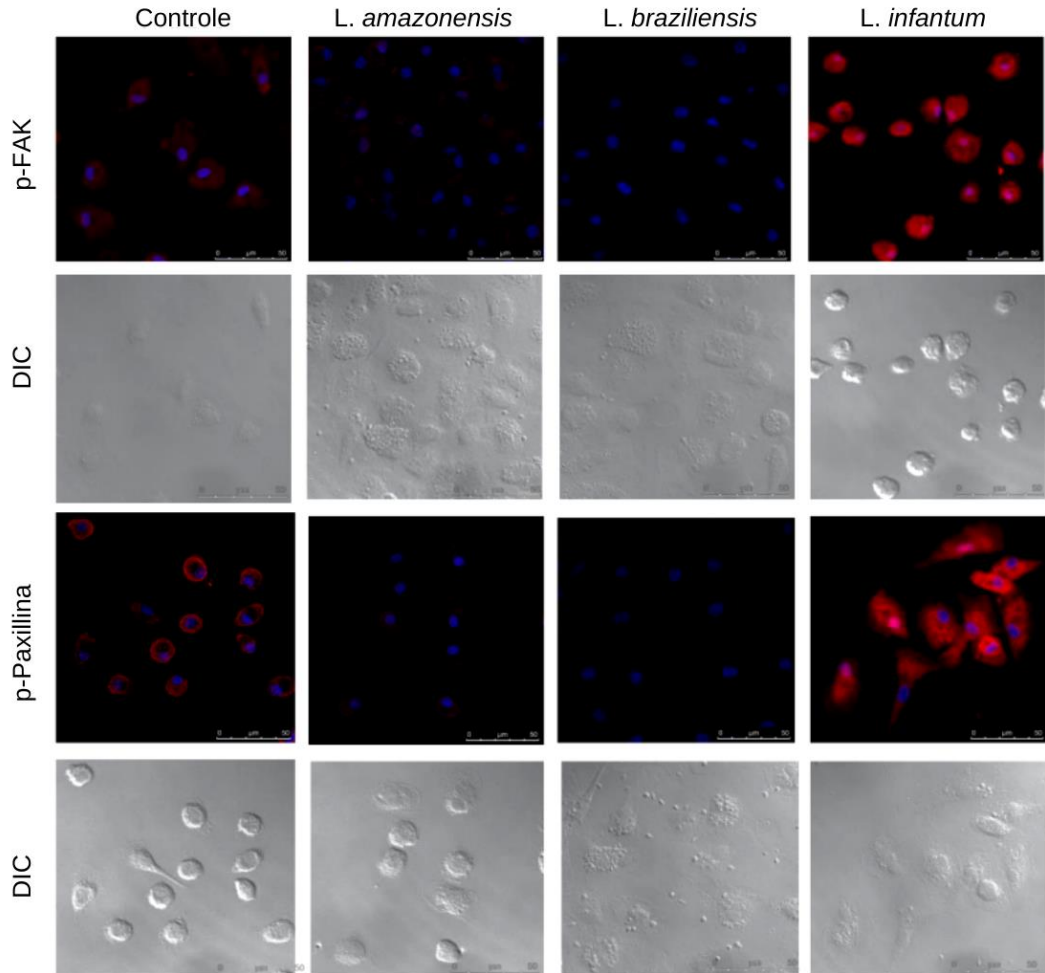
Figura 3. Avaliação da migração de células dendríticas na infecção por *Leishmania*. Células dendríticas foram infectadas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* por 4 horas e outro grupo foi exposto a fagocitose por partículas de zymosan FITC (Zy) por 4 horas. Após 6, 12, 24 ou 48h a infecção, as células foram submetidas a migração com CCL3 em sistema *Transwell* por adicionais 4 horas. Os insertos foram lavados e fixados, retirados e corados com DAPI para marcação nuclear. As células migrantes foram contadas (10 campos) aleatoriamente por microscopia de fluorescência. (a) Número de células migrantes 6, 12, 24 ou 48h após infecção (b) Número de células migrantes após exposição ao zymosan. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, **** $P < 0,001$ (teste de *t* student). Resultado representativo de 3 experimentos.

5.3 Avaliação da Formação de Complexos de Adesão em Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de *Leishmania*

Para avaliar a expressão de FAK e paxilina em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizada técnica de imunofluorescência e posteriormente quantificação da intensidade de fluorescência com o auxílio do software Fiji. A análise da fluorescência mostra uma maior expressão de FAK e paxilina fosforilada em células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* e *L. infantum* após 24h a infecção. O resultado mostra ainda uma redução na expressão de FAK e

paxilina fosforilada após a infecção por *L. braziliensis* (Figura 4). Nossos resultados indicam que a infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum* altera a formação de complexos de adesão, o que não foi observado após a infecção por *L. braziliensis*.

(a)



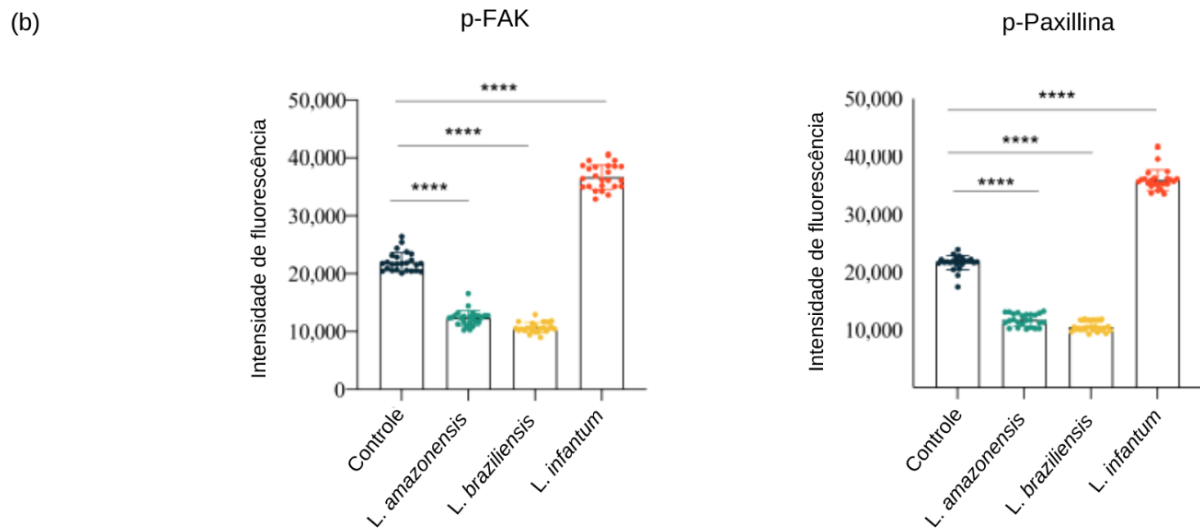


Figura 4. Avaliação da formação de complexos de adesão em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas infectadas ou não por *L. amazonensis* (na proporção de 10:1), *L. braziliensis* (na proporção de 10:1) ou *L. infantum* (na proporção de 20:1) foram marcadas com anticorpo anti-FAK e paxilina fosforilada. (a) Expressão da intensidade de fluorescência de FAK e paxilina após a infecção. (b) Quantificação da intensidade de fluorescência de FAK e paxilina após a infecção. A intensidade de fluorescência foi quantificada em 25 a 30 células para cada grupo, utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-FAK ou paxilina fosforilada; azul, DAPI, núcleo da célula; NI, não-infectado. ***, $p < 0,001$ (teste t de Student) comparado com o controle não infectado. Resultado representativo de 3 experimentos.

5.4 Avaliação da Polimerização dos Filamentos de Actina Durante o Processo de Migração de Células Dendríticas Infectadas por Diferentes Espécies de *Leishmania*.

Para analisar a organização dos filamentos de actina em células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, foi realizada a marcação de actina com faloidina fluorescente e, posteriormente, quantificação da intensidade de fluorescência com o auxílio de um software FIJI. A análise da fluorescência demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos infectados ao comparar com o controle. No entanto, observamos um direcionamento dos feixes de actina polimerizada para a borda celular nos grupos controle e infectado por *L. infantum*, o que não foi observado para as células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 5).

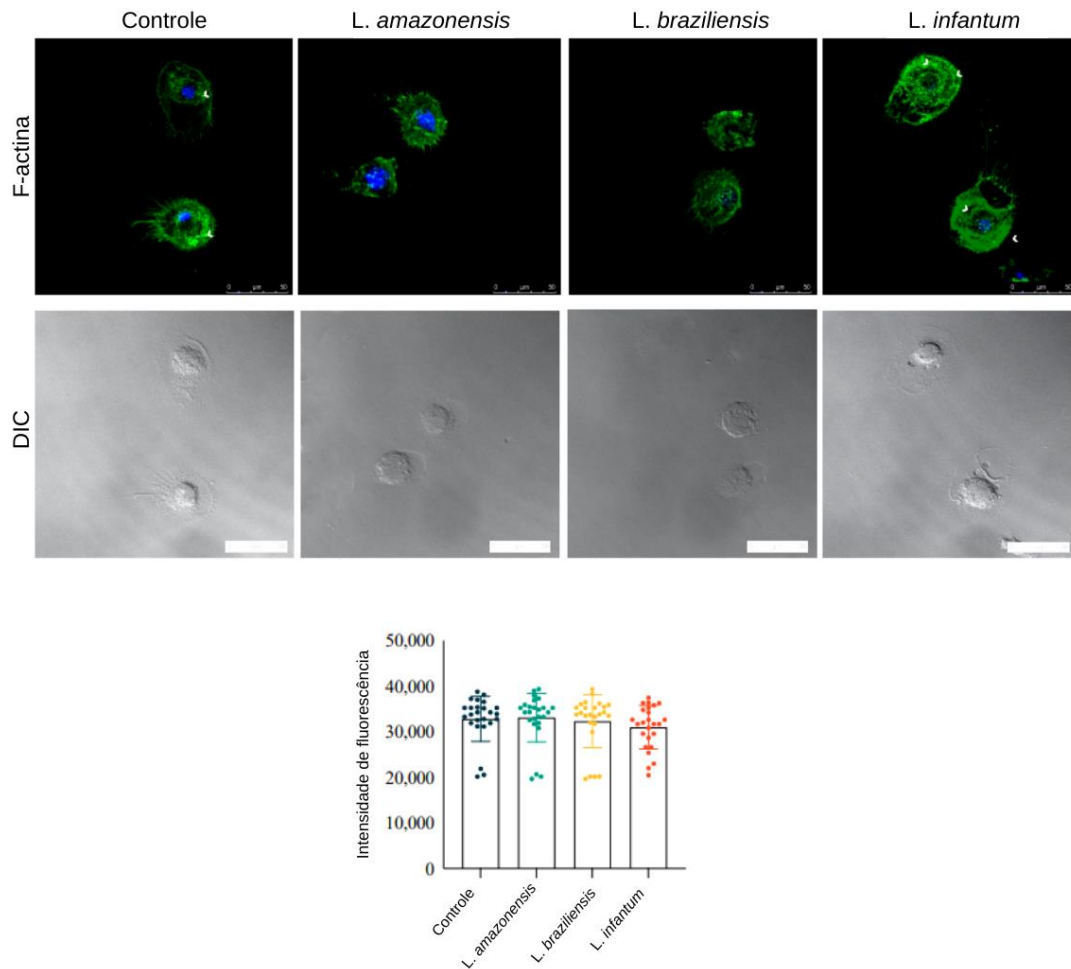


Figura 5. Avaliação da polimerização de actina em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. Células dendríticas infectadas ou não por *L. amazonensis* (na proporção de 10:1), *L. braziliensis* (na proporção de 10:1) ou *L. infantum* (na proporção de 20:1) foram marcadas com faloidina fluorescente. A intensidade de fluorescência das marcações foi quantificada através da média de 25 a 30 células para cada grupo utilizando o software FIJI. Verde, faloidina; azul, DAPI, núcleo da célula; NI, não-infectado. ****, $p < 0,001$ (teste t de Student). Resultado representativo de 3 experimentos.

5.5 Avaliação da Expressão de CCR7 em Células Dendríticas Infectadas por *Leishmania*

As células dendríticas, ao serem ativadas, expressam em sua superfície CCR7, aumentando seu potencial migratório para linfonodos drenantes por vasos linfáticos aferentes em resposta a quimiocinas como CCL19 e CCL21 (Feijó et al., 2017). Com o objetivo de avaliar a expressão de CCR7 em células infectadas por *Leishmania*, realizamos a imunomarcagem para esta molécula por citometria de fluxo. Nossos

resultados mostram um aumento da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *L. infantum*, em comparação com aquelas infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis* (Figura 6).

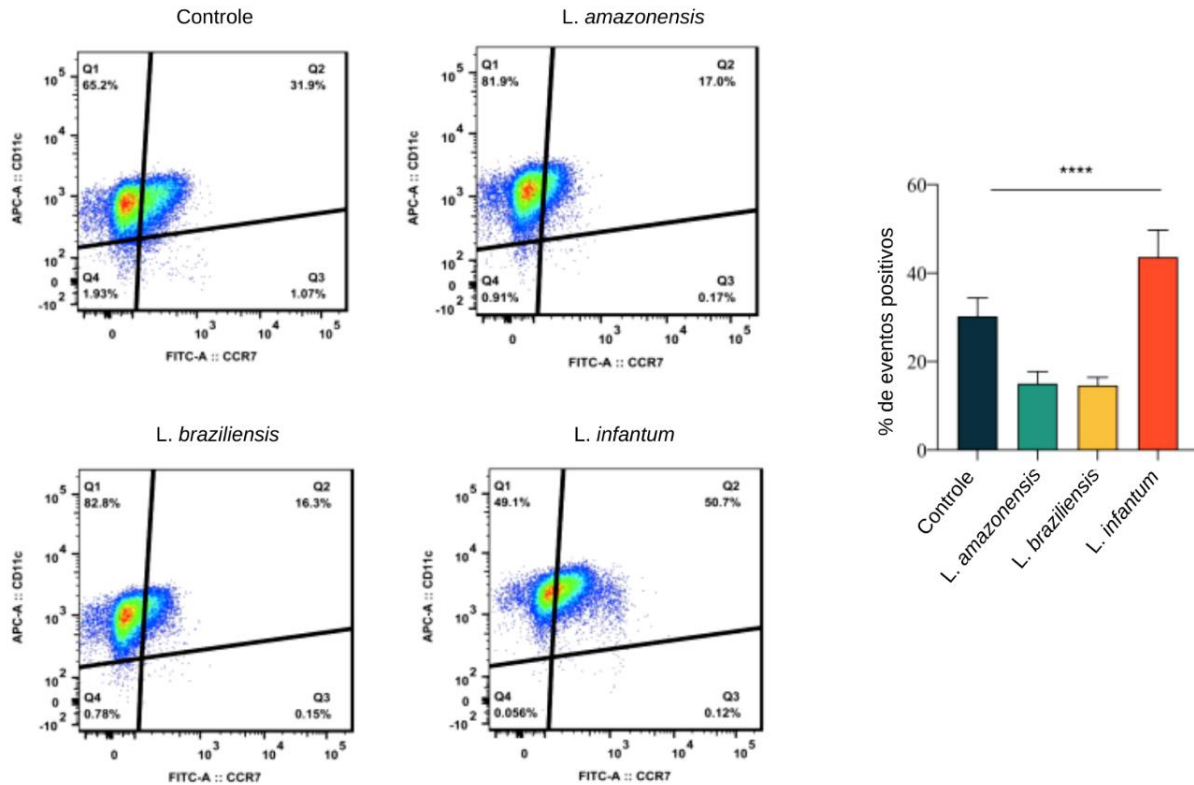


Figura 6. Avaliação da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *Leishmania*. A Expressão de CCR7, 6 horas após a infecção, foi avaliada por citometria de fluxo (FACS DIVA). A porcentagem de eventos positivos para CCR7 foi analisada por FlowJo e a montagem dos gráficos feita com auxílio do Graphpad Prism. Mann-Whitney ****, $p < 0,001$. Resultado representativo de 3 experimentos.

6 DISCUSSÃO

A OMS classifica a leishmaniose como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas (1). *Leishmania spp.* infecta variados hospedeiros vertebrados, entre eles o homem (1,22). As doenças causadas por este protozoário, podem apresentar diferentes tipos de manifestações clínicas, desde lesões localizadas na pele que cicatrizam espontaneamente, lesões de pele, que se espalham de forma disseminada, a forma mucocutânea da doença, além da leishmaniose visceral, forma mais grave que pode levar à morte se não tratada (3,37). A disseminação e *homing* de células infectadas contendo antígenos de *Leishmania* são fundamentais para a sobrevivência deste parasito no hospedeiro e para o estabelecimento da lesão. Atualmente, ainda carece de muitos esclarecimentos sobre os mecanismos envolvidos na migração e na infecção por este protozoário. E sua interação com as células dendríticas é vista como algo complexo e que envolve diversos processos moleculares (38). Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo ajudar a compreender a respeito do papel das células dendríticas na disseminação da leishmaniose

Inicialmente desejávamos compreender o comportamento das células dendríticas na infecção e para isso foi realizada a avaliação da migração celular. Nossos achados demonstraram um aumento na migração celular na infecção por *L. infantum*, uma redução na infecção por *L. braziliensis* e um aumento transitório na migração de células infectadas por *L. amazonensis*. Em concordância com nossos resultados, estudo realizado por Hermida e colaboradores (2014) identificou a *Leishmania* como causadora de uma alteração no padrão migratório das células dendríticas (28). Ademais, outro trabalho demonstrou que a redução da motilidade que a *L. major* causa na DC pode interferir no papel protetor dessa célula (39). Porém, existe a necessidade de mais trabalhos focados na forma visceral da doença, para que se possa ter uma melhor compreensão não só da disseminação, mas também da visceralização da leishmaniose.

O processo de migração envolve diversos eventos moleculares integrados, sendo mediada principalmente por filamentos de actina no citoplasma e formação de complexos de adesão (5). Buscamos compreender a atividade desses fatores na DC durante a infecção por *Leishmania*. Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de FAK e paxilina fosforilada em células infectadas por *L. amazonensis* e

L. infantum. Já em relação a *L. braziliensis*, foi percebida uma redução na expressão de FAK e paxilina fosforilada. Podemos perceber então, que a infecção por *L. amazonensis* e *L. infantum* alteram a formação de complexo de adesão. Estudos anteriores, já demonstram sobre a capacidade da *Leishmania* em prejudicar a expressão de proteínas do complexo de adesão e dessa forma interferir na motilidade de macrófagos infectados (30). Resultados semelhantes também foram notados na infecção por patógenos como *T. gondii*, *Porphyromonas gingivalis* e *T. cruzi*. (41–43). Dessa forma, este poderia ser um método utilizado por alguns patógeno para favorecer a infecção no hospedeiro humano. Adicionalmente, avaliamos a dinâmica da actina polimerizada e percebemos que não houve diferença entre os grupos infectados. Entretanto, foi encontrado um direcionamento dos feixes de actina polimerizada para a borda celular somente nos grupos controle e infectado por *L. infantum*. A alteração na dinâmica da actina resulta em consequências diretas para os processos que dependem de actina em células fagocíticas, resultando em uma interferência nas funções dessas células, incluindo a defesa do hospedeiro (44). Essa interferência é uma das estratégias utilizadas pela Salmonella, que interage com o citoesqueleto de actina, fazendo alterações que favorecem a sua disseminação no organismo (45,46).

Por fim, avaliamos a expressão de CCR7 em células dendríticas. Visto que, o mesmo já foi associado como um receptor de quimiocinas de extrema importância para a migração de células como neutrófilos e células dendríticas(47,48). Já sabemos que diversos patógenos podem modular a expressão do CCR7 e leva a diferentes padrões migratórios na célula dendrítica (49–51). Nossos resultados mostram um aumento da expressão de CCR7 em células dendríticas infectadas por *L. infantum*. Resultado etse que vai de acordo com outro trabalho encontrado na literatura que aponta o CCR7 como um regulador chave para o desenvolvimento da leishmaniose visceral, entretanto, nesse estudo foi utilizada *L. donovani* (52).

Esse estudo destaca uma nova relação entre migração da célula dendrítica e a infecção pelo parasita da *Leishmania*. Os resultados apresentados nesse trabalho são de grande relevância para a compreensão dos processos envolvidos na visceralização da doença. Entretanto, estudos futuros se fazem necessários com a utilização de um

ambiente tridimensional que demonstrará resultados que mais se aproximam do que acontece no corpo humano.

7. CONCLUSÃO

A infecção por *L. infantum* leva a um aumento na migração de células dendríticas sugerindo uma associação destas células com o processo de visceralização da doença.

REFERÊNCIAS

1. OPAS. Leishmaniasis. {Epidemiological} {Report} of the {Americas}, {February} 2018. PAHO/WHO Institutional Repository [Internet]. 2018; Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34856>
2. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2010;(949):22–6.
3. Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004;27(5):305–18.
4. Ananthakrishnan R, Ehlicher A. The Forces Behind Cell Movement. *International Journal of Biological Sciences*. 2007;3.
5. Vérollet C, Charrière GM, Labrousse A, Cougoule C, le Cabec V, Maridonneau-Parini I. Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. *European Journal of Immunology*. 2011;41(10):2805–13.
6. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *Journal of Cell Science*. 2008;121(15):2435–44.
7. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(11):793–805.
8. Nobes CD, Hall A. Rho , rac and cdc42 GTPases : regulators of actin structures , cell adhesion and motility Rac stimulates actin polymerization to form lamellipodia Addition of other growth factors to serum-starved Rho induces the assembly of actin stress fibres and focal. *Biochemical society Transactions*. 1994;23(1986):456–9.
9. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53–62.
10. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathogens*. 2013;9(1).
11. McGuirk P, McCann C, Mills KHG. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: A novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *Journal of Experimental Medicine*. 2002;195(2):221–31.
12. Urban BC, Roberts DJ. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: Sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Current Opinion in Immunology*. 2002;14(4):458–65.

13. Williams NL, Morris JL, Rush CM, Ketheesan N. Migration of dendritic cells facilitates systemic dissemination of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity*. 2014;82(10):4233–40.
14. Kanatani S, Fuks JM, Olafsson EB, Westermark L, Chambers B, Varas-Godoy M, et al. Voltage-dependent calcium channel signaling mediates GABA_A receptor-induced migratory activation of dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*. 2017;13(12):1–29.
15. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Leishmaniose Visceral*. 1°. Brasília - DF; 2014. 122 p.
16. Ministério da Saúde do Brasil. *Guia de vigilância em saúde 3ª edição* [Internet]. BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 2019. 741 p. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+3+-+Critérios+Diagnósticos+de+Infecção+Associada+à+Assistência+à+Saúde+N+eonatologia/9fa7d9be-6d35-42ea-ab48-bb1e068e5a7d>
17. Brasil. Ministério da Saúde. *Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar*. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. 2017. 189 p.
18. Brazil. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Editora MS; 2003. 120 p.
19. Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. *Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica* *Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area* ARTIGO ORIGINAL. 2004.
20. Gontijo CMF, Melo MN. *Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas*. *Rev Bras Epidemiol* . 2004;7(3):338–49.
21. Michelle De Oliveira J, Fernandes AC, Elizabeth M, Dorval C, Alves TP, Dias Fernandes T, et al. *Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais* *Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics*. Vol. 43, *INTRODUÇÃO Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.
22. Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans*. *Advances in Parasitology*. 2007;64.
23. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: A signaling point of view*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(2):293–305.
24. Steinman RM. *the Dendritic Cell System*. *Annual Review of Immunology*. 1991;9:271–96.

25. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, et al. Immunobiology of. Annual Review of Immunology [Internet]. 2000;18(Figure 1):767–811. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>
26. Rossi M, Young JW. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology*. 2005;175(3):1373–81.
27. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, et al. CCR7 Is Critically Important for Migration of Dendritic Cells in Intestinal Lamina Propria to Mesenteric Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*. 2006;176(2):803–10.
28. Hermida MDR, Doria PG, Taguchi AMP, Mengel JO, dos-Santos WLC. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infectious Diseases*. 2014;14(1):1–8.
29. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Biologia molecular da célula*. *Biologia Molecular da Célula*. 2017.
30. de Menezes JPB, Koushik A, Das S, Guven C, Siegel A, Laranjeira-Silva MF, et al. *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. *Cellular Microbiology*. 2017;19(3):1–9.
31. Oncology M. Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State. Vol. 63, *CANCER RESEARCH*. 2003.
32. Dumitriu IE, Bianchi ME, Bacci M, Manfredi AA, Rovere-Querini P. The secretion of HMGB1 is required for the migration of maturing dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007 Jan;81(1):84–91.
33. Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: The role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *Journal of Cell Science*. 2004 Jan 15;117(2):315–25.
34. Xin L, Li K, Soong L. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molecular Immunology*. 2008 Jul;45(12):3371–82.
35. Contreras I, Estrada JA, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, et al. Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014 Sep 1;8(9).
36. Favali C, Tavares N, Clarencio J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007 Jul 25;82(6):1401–6.

37. Tsirigotakis N, Pavlou C, Christodoulou V, Dokianakis E, Kourouniotis C, Alten B, et al. Chapter 7 – Reduviid Predators. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2018;3(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1261-z>
38. Tibúrcio R, Nunes S, Nunes I, Ampuero MR, Silva IB, Lima R, et al. Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(FEB).
39. Jebbari H, Stagg AJ, Davidson RN, Knight SC. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility in vitro. *Infection and Immunity*. 2002;70(2):1023–6.
40. Cook JH, Ueno N, Lodoen MB. *Toxoplasma gondii* disrupts β 1 integrin signaling and focal adhesion formation during monocyte hypermotility. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(9):3374–85.
41. Nakagawa I, Inaba H, Yamamura T, Kato T, Kawai S, Ooshima T, et al. Invasion of epithelial cells and proteolysis of cellular focal adhesion components by distinct types of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Infection and Immunity*. 2006;74(7):3773–82.
42. Melo TG, Adesse D, Meirelles M de N, Pereira MCS. *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2019;114:1–9.
43. Clements MK, Siemsen DW, Swain SD, Hanson AJ, Nelson-Overton LK, Rohn TT, et al. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(3):344–55.
44. Hahn M, Covarrubias-Pinto A, Herhaus L, Satpathy S, Klann K, Boyle KB, et al. SIK2 orchestrates actin-dependent host response upon *Salmonella* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(19):1–10.
45. Guiney DG, Lesnick M. Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella* strains. *Clinical Immunology*. 2005;114(3 SPEC. ISS.):248–55.
46. Beauvillain C, Cunin P, Doni A, Scotet M, Jaillon S, Loiry ML, et al. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1196–204.
47. Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z, Rg Zwirner J, et al. CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions naive T cells as well as other DC through the interaction with CCR7 (Luther et al., 2000; Sallusto et al., 1998). In contrast to the widely accepted model for lymphocyte. Vol. 21, *Immunity*. 2004.
48. Hartiala P, Hytonen J, Pelkonen J, Kimppa K, West A, Penttinen MA, et al. Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*--defective CD38 and CCR7 expression detected. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007 Apr 23;82(1):33–43.

49. Gafa V, Lande R, Gagliardi MC, Severa M, Giacomini E, Remoli ME, et al. Human dendritic cells following *Aspergillus fumigatus* infection express the CCR7 receptor and a differential pattern of interleukin-12 (IL-12), IL-23, and IL-27 cytokines, which lead to a Th1 response. *Infection and Immunity*. 2006 Mar;74(3):1480–9.
50. le Nouën C, Hillyer P, Winter CC, McCarty T, Rabin RL, Collins PL, et al. Low CCR7-mediated migration of human monocyte derived dendritic cells in response to human respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *PLoS Pathogens*. 2011 Jun;7(6).
51. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nature Immunology*. 2002 Dec 1;3(12):1185–91.