



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

MICHELE SANTIAGO DOS SANTOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA NA MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania* spp.**

SALVADOR – BA

2019

MICHELE SANTIAGO DOS SANTOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA NA MIGRAÇÃO DE
MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania* spp.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Juliana Perrone Bezerra de
Menezes Fullam

SALVADOR – BA

2019

MICHELE SANTIAGO DOS SANTOS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA NA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS
INFECTADOS POR *Leishmania* spp.**

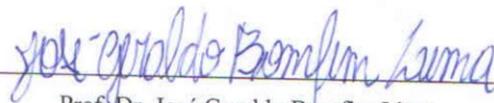
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovado em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 05 de novembro de 2019.



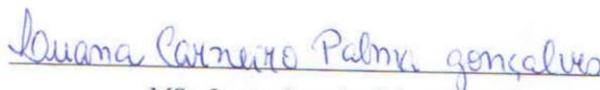
Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

IGM/FIOCRUZ



Prof. Dr. José Geraldo Bomfim Lima

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



MSc. Luana Carneiro Palma Gonçalves

IGM/FIOCRUZ

Aos meus pais que me deram o suporte necessário e essencial para que eu conseguisse cumprir essa etapa da minha vida. Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Agradecer aos meus pais que me deram o suporte, tanto emocional quanto financeiro, para que eu conseguisse chegar onde eu estou. Obrigada por contribuírem para formação do meu caráter e da pessoa que eu sou agora.

Aos meus amigos por terem feito da faculdade uma experiência incrível de muito aprendizado e por terem deixado tudo mais leve.

Aos meus professores por me auxiliarem tanto no meu crescimento profissional quanto pessoal.
A toda equipe do LAIPHE e da Fiocruz, sem vocês nada disso teria sido possível.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO	7
2	PROPOSTA DE SUBMISSÃO	21
2.1	REVISTA: REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS	21
2.1.1	<i>Regras para Submissão</i>	21
3	ANEXO	24

1 ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA NA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania* spp.

EVALUATION OF THE EFFECT AUTOPHAGY ON MACROPHAGE MIGRATION AFTER *Leishmania* spp. INFECTION

Michele Santiago dos Santos Ferreira¹; Gustavo Lima Nery²; Beatriz Rocha Simões Dias²; Edgar Marcelino de Carvalho Filho²; Paulo Roberto Lima Machado³; Nicolaus Albert Borges Schriefer³; Patrícia Sampaio Tavares Veras²; Juliana Perrone Bezerra de Menezes²

¹ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador/BA, Brasil

² Instituto Gonçalo Moniz – Fundação Oswaldo Cruz (IGM/FIOCRUZ)

³ Universidade Federal da Bahia (UFBA)

RESUMO:

A autofagia é um processo celular que gera energia, a partir de organelas e componentes celulares, quando a célula se encontra em estado de inanição. A via autofágica se comunica com a via endocítica, podendo regular a disposição de diversas moléculas, inclusive aquelas que participam da adesão celular, como integrinas. A forma com que a autofagia interage com os processos de adesão e migração celular ainda é pouco compreendida. Entretanto, já foi mostrado que a autofagia é um fator importante nesses processos celulares, principalmente na formação dos complexos de adesão. Estes complexos são formados por diversas proteínas, como paxilina, talina e FAK, constituindo estruturas responsáveis pela importante interação e adesão da célula com a matriz extracelular. Esta interação é fundamental para o processo de adesão celular propriamente dito, mas também para o processo de migração. Estudos sugerem que a indução de autofagia favorece a sobrevivência intracelular de *Leishmania* e que este patógeno é capaz de inibir a migração de macrófagos infectados. Entretanto, não se conhece a contribuição do processo autofágico na redução da migração de células infectadas por *Leishmania*. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito da autofagia na migração de macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*. Observamos que a indução da autofagia aumenta a migração de macrófagos infectados tanto por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e isolados, *Leishmania infantum*. Entretanto, ao inibirmos o processo autofágico, a migração das células infectadas é reduzida. Este estudo permitirá uma melhor compreensão do papel da autofagia na migração de macrófagos infectados por *Leishmania*, contribuindo assim para o entendimento dos mecanismos envolvidos na disseminação da doença.

Palavras chaves: *Leishmania*, autofagia, migração celular.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, da família *Trypanosomatidae*, que, atualmente, acomete cerca de 350 milhões de indivíduos em 98 países ao redor do mundo (OMS, 2018). São relatados 1,3 milhão de novos casos da doença por ano, dos quais cerca de 30.000 são fatais. Esta doença é considerada a terceira doença parasitária mais comum no mundo, ficando atrás apenas da esquistossomose e malária (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

A leishmaniose pode apresentar manifestações clínicas bastante distintas, se dividindo em dois grandes grupos: leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral. Dentro das leishmanioses cutâneas existe a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que atinge a pele do hospedeiro e é caracterizada por pápulas que evoluem para nódulos e ulceram no centro; a leishmaniose disseminada (LD) que é caracterizada por várias lesões que se encontram por todo o corpo do paciente; e a muco-cutânea, que se estende até as mucosas. A leishmaniose visceral que é a forma mais grave da doença e atinge os órgãos internos, principalmente baço e fígado, podendo ser fatal (DESJEUX, 2004).

Em todas as formas clínicas da doença, a transmissão do protozoário para o hospedeiro mamífero ocorre após a inoculação de formas promastigotas do parasito na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo de diferentes espécies de flebotomíneos (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Devido a proliferação do parasito no interior dos fagócitos primários, pode ocorrer a lise da célula infectada, permitindo, assim, a infecção de outras células pelo parasito e disseminação deste para diferentes tecidos do hospedeiro. Entretanto, o processo de disseminação da doença e *homing* de células infectadas ainda é pouco conhecido (STEVERDING, 2017).

O movimento e migração de macrófagos podem ser divididos em diferentes etapas: protusão do lamelipódio ou filopódio na parte anterior da célula, adesão da área de protusão ao substrato por complexos focais, contração da actomiosina citoplasmática e liberação dos complexos focais na parte posterior da célula. Esse processo envolve diversos eventos moleculares integrados, sendo mediado principalmente por filamentos de actina presentes no citoplasma, a partir da ação das moléculas Rho GTPases, como Rho, Rac, Cdc42 e arp 2/3 (ALLEN et al., 1998; KENIFIC; WITTMANN; DEBNATH, 2016; SIT; MANSER, 2011; WIESNER et al., 2014).

A adesão da célula ao substrato ocorre por estruturas conhecidas como contatos focais ou adesões focais (JONES; BRUNTON; FRAME, 2000). Em macrófagos, essas estruturas de contato podem ser de duas formas: complexos focais, que são estruturas semelhantes a contatos focais, mas sem fibras de estresse (ALLEN et al., 1997) ou podossomos, que são estruturas circulares restritas à linhagem mielóide (CORREIA et al., 1999; DEFIFE et al., 1999). Os complexos focais são formados por proteína quinase de adesão focal (FAK), cinases, ativadores e efetores de pequenas GTPases e a paxilina que é uma proteína que se associa à diversas proteínas de sinalização (BROWN; TURNER, 2004; TACHIBANA et al., 1995; TURNER; GLENNEY; BURRIDGE, 1990). Estudos anteriores mostram que a infecção por *Leishmania* altera a função de moléculas envolvidas em adesão, como VLA-4, uma das moléculas relevantes para a migração macrofágica nos tecidos e que compõem sinapses imunológicas (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Além da migração, outro importante mecanismo celular bastante estudado na interação parasito-hospedeiro é a autofagia.

A autofagia é um processo celular constitutivo e conservado evolutivamente, que em condição de privação de nutrientes, ou estresse celular, degrada grandes componentes celulares como: organelas e agregados proteicos, que podem ser reutilizados no metabolismo celular (LAMB; YOSHIMORI; TOOZE, 2013; RABINOWITZ; WHITE, 2010). Além de ter a função basal de *housekeeping* que mantém a homeostase celular, degrada estruturas em processo de envelhecimento e prejudiciais para a célula (RABINOWITZ; WHITE, 2010). A autofagia se divide em processos distintos que são controlados por um conjunto de genes relacionados a autofagia (Atg) (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2005).

A primeira etapa da autofagia é a indução, onde ocorre a formação de uma membrana dupla lipídica, denominada fagóforo e diversas proteínas estão envolvidas na formação dessa estrutura, incluindo a P13K III (fosfatidilinositol-3-cinase de classe 3), VPS34, mAtg6, mAtg14L, dentre outras (YAN; BACKER, 2007). O segundo processo é o alongamento da membrana autofágica que é mediada pela interação de diversas Atgs, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg 16, e o Atg 10 é muito importante para o recrutamento da LC3 (Atg8) auxiliando, assim, a expansão do fagóforo, sendo fundamentais nessa etapa (LYSTAD; SIMONSEN, 2019). A LC3 é uma proteína que se apresenta de duas formas: LC3-I encontrada no citosol e a LC3-II que fica localizada na membrana do fagóforo, sendo essa, utilizada como marcador de autofagossomo (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Por fim, os autofagossomos se fundem com os lisossomos dando origem ao autolisossoma para degradar produtos do citoplasma (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013).

A via autofágica está conectada com a via endocítica de forma que a autofagia regula a disposição de proteínas transmembranas, denominadas integrinas, que tem papel importante na adesão e migração das células (MITRA; HANSON; SCHLAEPFER, 2005; TULOUP-MINGUEZ et al., 2013). Um estudo recente demonstrou que a autofagia facilita a montagem e desmontagem de aderências focais da matriz extracelular, favorecendo a migração celular (KENIFIC et al., 2016). Adicionalmente, outros trabalhos também demonstraram que a inibição da autofagia reduz a motilidade de células tumorais (SHARIFI et al., 2017).

Estudos avaliando o papel da autofagia na infecção por *Leishmania* mostram que este parasito induz a autofagia de macrófagos (DIAS et al., 2018) e apontam que a autofagia teria um efeito pró-patógeno, sendo benéfico à sobrevivência intracelular desse parasito (CYRINO et al., 2012). Entretanto, pouco se sabe sobre a relação da autofagia com o processo de migração celular. Deste modo, estudos relacionando a autofagia com a migração de células infectadas por *Leishmania* ainda é pouco explorada.

O entendimento de como a autofagia interfere no processo de migração de células infectadas e disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de prevenção da leishmaniose. Com isso, o presente estudo busca analisar o papel da autofagia na migração de macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Os animais utilizados foram camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas ou machos com faixa etária entre 6 e 8 semanas, obtidos e mantidos no Biotério do Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IGM-Fiocruz), protocolo 010/2018.

Obtenção de macrófagos derivados da medula óssea

Células precursoras de medula óssea foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia dos camundongos Balb/c, seguindo os protocolos do laboratório. Em seguida, as células foram cultivadas em placas de Petri contendo meio RPMI suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) inativado, 30% de sobrenadante de células L929, L-Glutamina (200 mM) e ciprofloxacina (10 µg/mL). Essa cultura foi incubada na estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por sete dias para que ocorresse a diferenciação das células precursoras em

macrófagos (BMMΦ). Depois deste período, os macrófagos aderidos foram recuperados da placa utilizando solução de PBS contendo 1 mM de EDTA, centrifugados a 1.200 rpm, 4 °C durante 10 minutos, ressuspensos e plaqueados para a utilização no experimento.

Cultivo de *Leishmania*

A *L. amazonensis* foi isolada de linfonodo da pata de camundongos resistentes C57BL/6, a *L. braziliensis* foi isolada de linfonodo da pata de camundongos Balb/c e a *L. infantum* foi isolada do baço de hamsters *Golden Syrian*. Adicionalmente isolados da espécie leishmania *braziliensis*, de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose disseminada (LD) foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Albert Schriefer do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), de pacientes do posto de saúde de Corte de Pedra, Bahia.

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125), *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) e *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262), derivadas de amastigotas foram mantidas em meio ágar-sangue NNN (*Novy-Nicolle-MacNeal*) suplementado com 3 mL de meio Schneider completo [*Schneider's Insect Medium* (Sigma) suplementado com gentamicina (Sigma) (50 µg/mL), 10% de SBF inativado (Gibco) para *L. amazonensis*, 20% para *L. braziliensis* e 11% meio HOMEM para *L. infantum*, em garrafa de cultura de 25 cm² em estufa B.O.D. a 24 °C.

Posteriormente, as formas promastigotas dos parasitos foram cultivadas em 5 mL dos seus respectivos meios. Para acompanhamento do crescimento das culturas, foi quantificado o número de parasitos diariamente, utilizando câmara de Neubauer. Após a cultura atingir a fase estacionária de crescimento, os parasitos foram utilizados para realização dos experimentos.

Modulação do processo autofágico

Para a modulação da autofagia, as células foram tratadas com indutores ou inibidores farmacológicos. Para a indução da autofagia foi utilizada a rapamicina (SIGMA - 10 µg/mL) e para a inibição do processo autofágico, os macrófagos foram tratados com VPS34-IN1 (SHN - 1 µM). Essa modulação ocorreu após os macrófagos serem plaqueados na concentração de 5x10⁴ e infectados.

Avaliação da migração de macrófagos infectados por *Leishmania*

BMMΦ foram plaqueados na concentração de 5x10⁴ em câmaras *Transwell*. As células foram infectadas por *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (50:1) ou *L. infantum* (20:1) por um

período de 4 horas. Foram utilizados grupos controles, nos quais as células não estavam infectadas, mas foi induzido e inibido a autofagia, e o grupo infectado que seguiu o mesmo padrão do grupo controle e essas células foram tratadas durante 2 horas. Posteriormente, foi avaliada a migração de macrófagos na presença de um quimioatrator (MCP-1) durante 5 horas. Por fim, as membranas dos insertos foram montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, para posterior visualização do núcleo das células. A análise da migração dos macrófagos foi realizada através de microscopia de fluorescência convencional, sendo feita a contagem das células, 10 campos, que atravessaram a membrana da câmara *Transwell*.

Análise estatística

Os experimentos foram realizados apenas uma vez. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism® 5.02 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. Para os dados não paramétricos, foi utilizado teste de Mann-Whitney (teste U) considerando as diferenças como significantes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Avaliação da migração de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum* após modulação do processo autofágico

Para avaliar o efeito da indução e inibição da autofagia na migração da célula hospedeira durante a infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, macrófagos foram infectados e plaqueados em câmaras *Transwell* na presença de um quimioatrator (MCP-1) e analisados no microscópio de fluorescência convencional. Os resultados mostram que a infecção tanto por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum*, modula a migração celular. Observa-se que no grupo controle não infectado há uma maior migração do que as células do grupo controle infectado. Após a indução da autofagia, há uma redução na migração das células no grupo não infectado, e a inibição a célula tem o seu processo migratório aumentado. Interessantemente, no grupo de macrófagos infectados, observamos um aumento da migração após a indução da autofagia e a inibição diminui o processo autofágico (Figuras 1, 2 e 3).

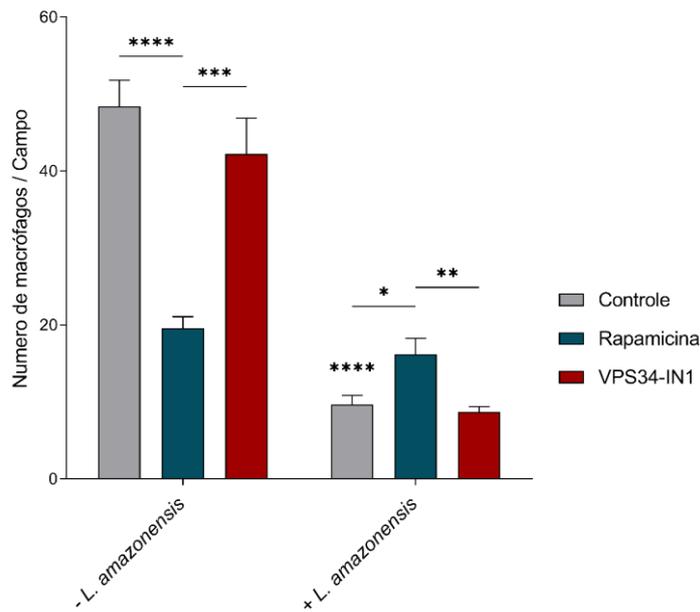


Figura 1. Migração direcional de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis* na indução e inibição da autofagia. Macrófagos foram infectados por *Leishmania amazonensis* na proporção de dez parasitos por célula (10:1) por um período de 4 horas e tratados com rapamicina (10 µg/mL) para indução do processo autofágico ou VPS34-IN1 (1 µM/mL) para inibição desse processo. As membranas dos insertos foram montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, e a visualização foi feita em um microscópio de fluorescência. **** p <0,0001; * p <0,0150; ** p <0,0068 (teste t de Student).

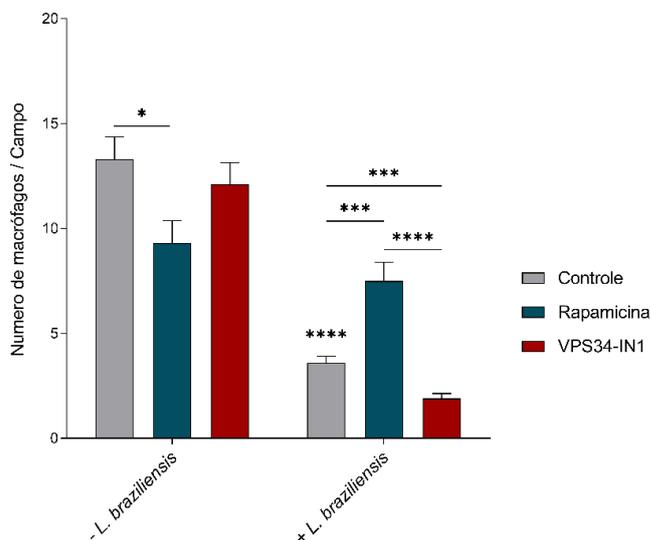


Figura 2. Migração direcional de macrófagos infectados por *Leishmania braziliensis* na indução e inibição da autofagia. Macrófagos foram infectados por *Leishmania braziliensis* na proporção de cinquenta parasitos por célula (50:1) por um período de 4 horas e tratados com rapamicina (10 µg/mL) para indução do processo autofágico ou VPS34-IN1 (1 µM/mL) para inibição desse processo. As membranas dos insertos foram montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, e a visualização foi feita em um microscópio de fluorescência. **** p <0,0001, * p <0,0161, *** p <0,0006 (teste t de Student).

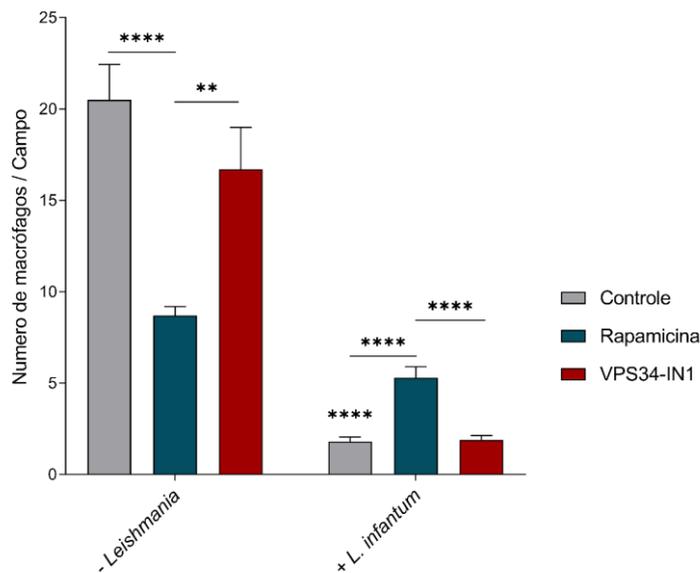


Figura 3. Migração direcional de macrófagos infectados por *Leishmania infantum* na indução e inibição da autofagia. Macrófagos foram infectados por isolados de *Leishmania infantum* na proporção de vinte parasitos por célula (20:1) por um período de 4 horas e tratados com rapamicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para indução do processo autofágico ou VPS34-IN1 (1 $\mu\text{M}/\text{mL}$) para inibição desse processo. As membranas dos insertos foram montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, e a visualização foi feita em um microscópio de fluorescência. **** $p < 0,05$; ** $p < 0,0031$ (teste t de Student).

Avaliação da migração de macrófagos infectados por LCL e LD

Com o objetivo de estudar o papel da autofagia na disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado, macrófagos foram infectados com isolados de *L. braziliensis* que causam a forma cutânea localizada (LCL) e disseminada (LD). Inicialmente, para analisar a migração de macrófagos infectados por esses isolados, foram realizados ensaios de migração direcional na presença do quimioatratante (MCP-1), utilizando câmaras *Transwell*. Posteriormente a migração destas células foi analisada em microscópio de fluorescência convencional, sem modulação autofágica. Os resultados mostram que ocorre uma redução da migração em células infectadas por ambos os isolados de *L. braziliensis*. Entretanto, os macrófagos infectados por LD apresentaram uma migração celular maior quando comparados ao grupo infectado por LCL (Figura 4). Em seguida, avaliamos a modulação da autofagia nesses isolados e observamos que houve uma redução da migração em macrófagos infectados tanto por LCL quanto por LD. Entretanto, diferente do que havia sido observado anteriormente (Figura 4), não foi observada uma maior migração nas células infectadas por LD. Adicionalmente, observou-se que a indução da autofagia levou a uma redução da migração em

células controle não infectadas, enquanto um aumento foi observado em macrófagos infectados por LCL ou LD (Figura 5).

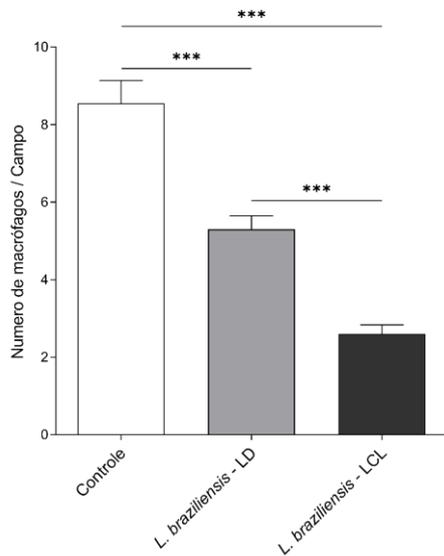


Figura 4. Migração direcional de macrófagos infectados por isolados de *Leishmania braziliensis*.

Macrófagos foram infectados por isolados *Leishmania braziliensis* causadores da leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea disseminada (LD), na proporção de cinquenta parasitos por célula (50:1) por um período de 4 horas. As membranas dos insertos foram montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, e a visualização foi feita em um microscópio de fluorescência. *** $p < 0,0001$ (teste *t* de Student).

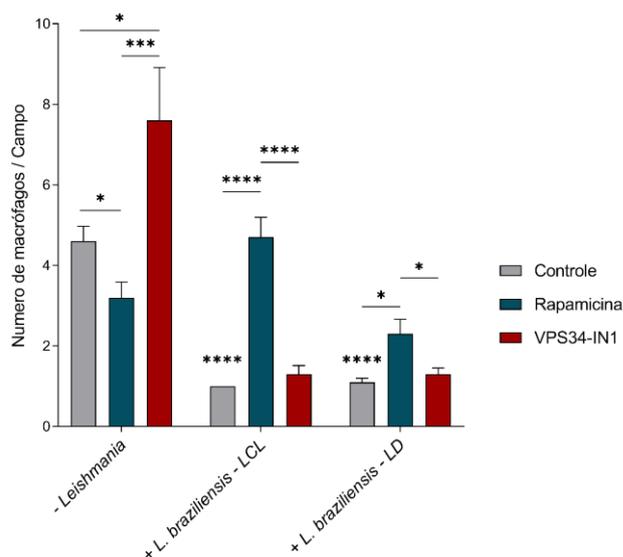


Figura 5. Migração direcional de macrófagos infectados por isolados de *Leishmania braziliensis* na indução e inibição da autofagia. Macrófagos foram infectados por isolados de *Leishmania braziliensis* na proporção de cinquenta parasitos por célula (50:1) por um período de 4 horas e tratados com rapamicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para indução do processo autofágico ou VPS34-IN1 (1 $\mu\text{M}/\text{mL}$) para inibição desse processo. As membranas dos insertos foram

montadas em lâminas de vidro com *ProLong Gold antifade* contendo DAPI, e a visualização foi feita em um microscópio de fluorescência. * p <0,0120; * p <0,0216; *** p <0,0003; **** p <0,0001 (Mann-Whitney).

DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença que possui diferentes manifestações clínicas, podendo ser causada por espécies distintas do parasito do gênero *Leishmania*. O ciclo da *Leishmania* no hospedeiro vertebrado já foi bastante estudado, porém ainda se conhece pouco sobre o processo de disseminação da doença nestes hospedeiros. Deste modo, o estudo da migração de células hospedeiras e os mecanismos envolvidos neste processo são de fundamental importância para o entendimento da disseminação da doença.

A migração de células infectadas vem sendo estudada pelo nosso grupo. De Menezes e colaboradores (2016) mostraram uma redução da migração de macrófagos após a infecção por *L. amazonensis*. No nosso laboratório, foi mostrado ainda que a infecção por *Leishmania* leva a indução da via autofágica em macrófagos, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito (DIAS et al., 2018). Entretanto, apesar da relação entre autofagia e adesão e migração já ter sido demonstrada (MITRA; HANSON; SCHLAEPFER, 2005; TULOUP-MINGUEZ et al., 2013) não se sabe se a autofagia tem algum papel na modulação do processo de migração de células infectadas por *Leishmania*. Diante da necessidade de esclarecimento sobre a possível interação entre estes processos, o objetivo deste trabalho foi analisar o papel da autofagia na migração de macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*.

O presente estudo demonstrou que a indução da autofagia aumenta a migração de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (Figuras 1, 2 e 3), sugerindo que a autofagia estaria relacionada com o processo de migração celular. Em um estudo conduzido por Dias e colaboradores (2018), foi descrito que a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* leva à indução da autofagia em macrófagos. Adicionalmente, já foi demonstrado que a autofagia participa do processo de degradação de proteínas do complexo de adesão, como paxilina e FAK, degradação de reguladores de tensão, como RhoA e filamina A, e reciclagem de integrinas, que são elementos fundamentais no processo de migração celular (KENIFIC; WITTMANN; DEBNATH, 2016). Recentemente, foi demonstrado ainda que macrófagos infectados por *L. amazonensis*, tiveram a sua capacidade de migração reduzida e que essa redução independe da carga parasitária, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, mas envolve a modulação da expressão de moléculas sinalizadoras envolvidas em adesão celular, tais como paxilina e sua fosforilação, além da fosforilação de FAK (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016).

Deste modo, é possível que a indução do processo autofágico module a adesão pela degradação de moléculas envolvidas na adesão ou expressão de integrinas, levando ao aumento da migração da célula hospedeira. Experimentos adicionais para avaliar esses mecanismos e o indução do fluxo autofágico antes e após a infecção devem ser realizados para esclarecer essa interação entre a via autofágica e o processo de migração celular.

Com o objetivo de melhor entender o papel da autofagia no processo de migração de células hospedeiras e a disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado, avaliamos ainda a migração de macrófagos infectados por diferentes isolado de *L. braziliensis*: LCL e LD. Inicialmente, avaliamos apenas o efeito da infecção por esses isolados de *L. braziliensis* na migração de macrófagos. Os nossos resultados mostraram que macrófagos infectados pelo isolado causador da leishmaniose disseminada (LD) apresenta maior migração quando comparada às células infectadas pelo isolado causador da leishmaniose cutânea localizada (LCL) (Figura 4), sugerindo um papel de macrófagos na disseminação do parasito no hospedeiro. Posteriormente, partimos para avaliar o papel da autofagia neste processo. Surpreendentemente, neste experimento, não observamos uma maior migração nas células infectadas com LD (Figura 5), como observado anteriormente. Deste modo, como esses experimentos foram realizados apenas uma vez, faz-se necessário que sejam repetidos para avaliar melhor o efeito da migração de macrófagos infectados por estes isolados.

Os resultados obtidos neste trabalho até o momento sugerem que a indução da autofagia favorece a migração de macrófagos infectados por *Leishmania*. Entretanto, devido aos resultados serem apenas de um único ensaio, faz-se necessário a repetição dos experimentos para confirmar os dados observados e os mecanismos envolvidos na possível modulação da migração induzida pela autofagia em células infectadas. Adicionalmente, o entendimento do papel da autofagia na disseminação da doença, utilizando os isolados como ferramenta, podem contribuir no futuro para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose.

CONCLUSÃO

A indução da autofagia leva ao aumento da migração de macrófagos infectados por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. E. et al. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. **Journal of cell science**, v. 110 (Pt 6, p. 707–20, 1997.
- ALLEN, W. E. et al. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 5, p. 1147–1157, 1998.
- BRAVO-CORDERO, J. J.; HODGSON, L.; CONDEELIS, J. Directed cell invasion and migration during metastasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 2, p. 277–283, 2012.
- BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Paxillin: adapting to change. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1315–1339, 2004.
- CARVALHAL, D. G. F. et al. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: Application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3–4, p. 189–199, 2004.
- CORREIA, I. et al. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons: Adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. **Journal of Cell Biology**, v. 146, n. 4, p. 831–842, 1999.
- CYRINO, L. T. et al. In vivo and in vitro Leishmania amazonensis infection induces autophagy in macrophages. **Tissue and Cell**, v. 44, n. 6, p. 401–408, 2012.
- DEFIFE, K. M. et al. Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 47, n. 1, p. 65–74, 1999.
- DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 10, p. 722–737, 2013.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis : current situation and new perspectives. v. 27, p. 305–318, 2004.
- DIAS, B. R. S. et al. Autophagic induction Greatly Enhances Leishmania major intracellular survival compared to Leishmania amazonensis in CBA/j-infected macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–15, 2018.
- GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. **Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.
- JONES, R. J.; BRUNTON, V. G.; FRAME, M. C. Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 13, p. 1595–1606, 1 ago. 2000.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature**

- Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KENIFIC, C. M. et al. NBR 1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. **Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 5, p. 577–590, 2016.
- KENIFIC, C. M.; WITTMANN, T.; DEBNATH, J. Autophagy in adhesion and migration. p. 3685–3693, 2016.
- LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome : origins unknown , biogenesis complex. 2013.
- LYSTAD; SIMONSEN. Mechanisms and Pathophysiological Roles of the ATG8 Conjugation Machinery. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 973, 2019.
- MACHADO PR, ROSA ME, COSTA D, M. M. Leishmaniasis : in Situ and Systemic Immune Response. v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.
- MITRA, S. K.; HANSON, D. A; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 56–68, jan. 2005.
- PINHEIRO, N. F. et al. Leishmania infection impairs β 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3912–3921, 2006.
- PITALE, D. M. et al. Leishmania donovani Induces Autophagy in Human Blood-Derived Neutrophils . **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 4, p. 1163–1175, 2019.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- RABINOWITZ, J. D.; WHITE, E. Autophagy and Metabolism. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1344–1348, 3 dez. 2010.
- SHARIFI, M. N. et al. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. **Cell Reports**, v. 15, n. 8, p. 1660–1672, 9 out. 2017.
- SIT, S.; MANSER, E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. 2011.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. p. 1–10, 2017.
- TACHIBANA, K. et al. Direct association of pp125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of pp125FAK. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 4, p. 1089–99, 1995.
- TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Another way to die: Autophagic programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1528–1534, 2005.
- TULOUP-MINGUEZ, V. et al. Autophagy modulates cell migration and beta 1 integrin

membrane recycling. **Cell Cycle**, v. 12, n. 20, p. 3317–3328, 2013.

TURNER, C. E.; GLENNEY, J. R.; BURRIDGE, K. Paxillin: A new vinculin-binding protein present in focal adhesions. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 3, p. 1059–1068, 1990.

WIESNER, C. et al. Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. **Cell Adhesion and Migration**, v. 8, n. 3, p. 179–191, 2014.

YAN, Y.; BACKER, J. M. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 2, p. 239–241, 2007.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

2 PROPOSTA DE SUBMISSÃO

2.1 REVISTA: REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS

2.1.1 Regras para Submissão:

1 NORMAS EDITORIAIS

1.1 Os trabalhos científicos submetidos à publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, e versarão sobre temas das áreas médica, biológica e correlatas, enquadrados na seguinte classificação:

Editorial – cuja autoria deve ser decidida pelo editor científico, podendo ser redigido por terceiros em atendimento à solicitação do Conselho Editorial.

Artigos originais – resultados novos e consolidados de pesquisa experimental ou teórica, apresentados de maneira abrangente e discutidos em suas aplicações, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de divulgação – resultados novos de pesquisa experimental ou teórica em forma de nota prévia, apresentando e discutindo experimentos, observações e resultados, compreendendo de 15 a 25 páginas.

Artigos de revisão – textos que reúnam os principais fatos e ideias em determinado domínio de pesquisa, estabelecendo relações entre eles e evidenciando estrutura e conceitual própria do domínio, abrangendo de 8 a 12 páginas.

Casos clínicos – descrição de casos clínicos com revisão da literatura e discussão, apresentados em 8 a 15 páginas.

Resenhas – Análises críticas de livros, monografias e periódicos recém-publicados, contendo de uma a 4 páginas.

Conferências e relatos de experiências inovadoras – apresentação, contendo de 8 a 15 páginas, sobre temas específicos do periódico ou relacionados aos interesses científicos do mesmo.

Carta ao editor – comunicação de acontecimentos e pesquisas científicas de relevância.

1.2 Os trabalhos enviados para publicação devem ser inéditos, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico. A **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** reserva-se todos os direitos autorais dos trabalhos publicados, inclusive de tradução, permitindo, entretanto, a sua posterior reprodução como transcrição, com a devida citação de fonte.

1.3 A Revista reserva-se ainda o direito de submeter todos os originais à apreciação da Comissão de Publicação, do Conselho Editorial e da Comissão de Ética, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência de sua aceitação, podendo, inclusive, reapresentá-los aos autores, com sugestões para que sejam feitas alterações necessárias no texto e/ou para que os adaptem às normas da Revista. Nesse caso, o trabalho será reavaliado pelos assessores e pelo Conselho Editorial. Os trabalhos não aceitos serão devolvidos aos autores. Os nomes dos relatores permanecerão em sigilo, omitindo-se, também, perante os relatores, os nomes dos autores.

1.4 Todos os trabalhos que envolvam estudos com seres humanos, incluindo-se órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e seus complementos e ter sido aprovados por um Comitê de Ética e Pesquisa a serem consignados pela Comissão de Ética da Revista. Nos relatos sobre experimentos com animais, deve-se indicar se foram seguidas as recomendações de alguma instituição sobre o cuidado e a utilização de animais de laboratório.

1.5 Os textos dos trabalhos ficam sob inteira responsabilidade dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião da Comissão de Publicação e do Conselho Editorial.

1.6 A Revista poderá introduzir alterações nos originais visando a manter a padronização e a qualidade da publicação, respeitados o estilo e a opinião dos autores. As provas tipográficas não serão enviadas aos autores, mas estes receberão um exemplar do número da Revista em que o trabalho for publicado.

1.7 Fotos coloridas serão custeadas pelos autores interessados na sua publicação.

1.8 A assinatura da declaração de responsabilidade é obrigatória. Sugere-se o seguinte texto a ser incorporado aos anexos:

“Certifico(amos) que o artigo enviado à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico”.

Data e assinatura

Os co-autores, quando for o caso, devem assinar juntamente com o autor principal a supracitada declaração, que também se configurará como a concordância com a publicação do trabalho enviado, se este vier a ser aceito pela Revista.

1.9 Submissão de artigos online

Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do site da revista de Ciências Médicas e biológicas disponível em: <http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio>

2.2 OUTRAS FORMAS DE SUBMISSÃO NÃO SERÃO ACEITAS.

2 APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na NBR 6022/2003 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT):

- 2.1 Os textos deverão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado e com número máximo de 20 laudas.
- 2.2 As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics, JPEG ou outro, inseridas no texto do arquivo submetido ou separadamente no formato digital. As figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte inferior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (ex: Figura 1-, Quadro 5) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, na fonte Times New Roman 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.
- 2.3 As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 – Título; Tabela 2 – Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).
- 2.4 Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.
- 2.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.
- 2.6 Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.
- 2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1 a 2.7.3, na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.7.1 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS

a) Cabeçalho, em que deve figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) apenas da sua titulação mais importante e a instituição na qual está vinculado. Deverá ser inserido em nota de rodapé o nome do autor para correspondência, juntamente com o endereço profissional, telefone e email.

b) Resumo – apresentação concisa dos pontos relevantes do texto, salientando: introdução, objetivo, metodologia, resultados e conclusão, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR – 6028 da ABNT e não exceder as 250 palavras recomendadas.

c) Palavras-chave – Palavras ou expressos que identificam o conteúdo do texto. Deverão ser utilizados descritores da Área de Saúde a partir da consulta ao DeCs ou MeSH

2.7.2 TEXTO

a) Introdução – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando

possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

- b) **Materiais e métodos** – A descrição dos métodos usados devem ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).
- c) **Resultados** – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.
- d) **Discussão** – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.
- e) **Conclusões** – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS

- a) **Título do artigo** (e subtítulo, se houver) em língua estrangeira, precedendo o resumo: para textos em português essa língua será o inglês; para aqueles em outros idiomas (v.1.3), a língua será o português.
- b) **Resumo** em língua estrangeira – inglês (*Abstract*) ou português (**Resumo**), conforme a alínea a.
- c) **Keywords** ou **Palavras-chave**, conforme o caso.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da apresentação do Resumo em português, bem como do título do artigo e das palavras-chave neste idioma.

- d) **Referências** – Devem ser elaboradas de acordo com a NBR 6023/2002 da ABNT. As referências podem ser **ordenadas alfabeticamente**, caso seja utilizado o **sistema autor-data** para as citações no texto, ou podem ser organizadas em **ordem numérica** crescente (algarismos arábicos), se for adotado o **sistema numérico** de citação (v. NBR 10520/2002, da ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com a NBR 6032/1989 da ABNT e/ou com os índices especializados. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, não devem ultrapassar o número máximo de 20. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

Obs.: Os autores estrangeiros estão dispensados da aplicação das normas da ABNT, mas deverão indicar os

elementos essenciais das referências, a saber:

- Para **artigos de periódicos**: autor(es), título do artigo (e subtítulo, se houver), título do periódico, cidade em que o periódico é publicado, numeração correspondente ao volume e/ou ano, número do fascículo, paginação inicial e final do artigo, data do fascículo (exs.: jan. 2001; jul./set. 2000; Summer 1998, etc.); quando o fascículo citado for um Suplemento, Edição especial, etc., isso também deverá ser mencionado no final da referência;
- Para **livros**: autor(es), título (e subtítulo, se houver), edição (quando não for a primeira), cidade em que foi publicado, editora e ano de publicação;
- Para **trabalhos apresentados em eventos**: autor(es) e título do trabalho, seguidos da palavra In:; nome do evento e respectivo número (se houver), ano e cidade onde foi realizado; título do documento onde o trabalho foi publicado (Anais, Atas, etc.), cidade de publicação, editora, ano de publicação; página inicial e final do trabalho citado.

e) **Agradecimentos** (quando houver).

f) **Data de entrega dos originais** à redação da Revista.

g) **DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE (V. 1.8).**

3 ANEXO

ANEXO A – Declaração de responsabilidade

Certificamos que o artigo enviado à Revista de Ciências Médicas e Biológicas é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico.

Salvador, 05 de novembro de 2019

Michele Santiago dos Santos Ferreira

Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam