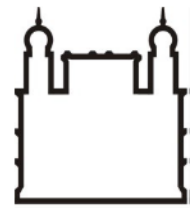




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

TESE DE DOUTORADO

**MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS
POR *LEISHMANIA*: ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES EM
AMBIENTE TRIDIMENSIONAL E NO CONTEXTO DA INFECÇÃO *IN VIVO***

YASMIN DA SILVA LUZ

Salvador - Bahia

2025

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental

**MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS
POR *LEISHMANIA*: ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES EM
AMBIENTE TRIDIMENSIONAL E NO CONTEXTO DA INFECÇÃO *IN VIVO***

YASMIN DA SILVA LUZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental para obtenção do grau de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Salvador - Bahia

2025

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

L979m Luz, Yasmin da Silva

Modulação da migração de macrófagos e células dendríticas por leishmania: alterações funcionais e moleculares em ambiente tridimensional e no contexto da infecção in vivo. Yasmin da Silva Luz. _ Salvador, 2025.

197f.: il.: 30 cm

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

1. Macrófagos. 2. Migração Celular. 3. Leishmania. 4. Medula óssea. I. Título.


CDU 616.993.161

**MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS POR
LEISHMANIA: ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MOLECULARES EM AMBIENTE
TRIDIMENSIONAL E NO CONTEXTO DA INFECÇÃO *IN VIVO***

YASMIN DA SILVA LUZ


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 6 de junho de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **KARINE ARAUJO DAMASCENO**
Data: 07/06/2025 09:03:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Karine Araújo Damasceno

Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
 **VALERIA DE MATOS BORGES**
Data: 08/06/2025 08:37:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Valéria de Matos Borges

Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
 **ANTONIO RICARDO KHOURI CUNHA**
Data: 06/06/2025 16:53:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha

Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO SOLANO DE FREITAS SOUZA**
Data: 07/06/2025 09:34:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Bruno Solano de Freitas Souza

Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES FULL**
Data: 07/06/2025 09:54:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes

Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil CAPES – Código de Financiamento 001”
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Ao absurdo, que nos encontra e tira o sentido da
existência. Precisamos imaginar Sísifo feliz,
precisamos ter consciência e responsabilidade com a
vida e o tempo que nos resta, aprendendo a amá-lo
em sua finitude.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam, pelo aprendizado e dedicação a minha formação científica.

À Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, pelas brilhantes ideias que colaboraram ao projeto.

À estudante Ms. Carla Polyana Oliveira Silva Bernardes que me ajudou e durante o desenvolvimento dos experimentos.

Ao grupo de pesquisa JP pelos momentos de aprendizados e discussões enriquecedoras, além dos momentos de companheirismo e união.

Aos amigos do LaPHE pelos momentos de ajuda e aprendizado, mas também pelos momentos de descontração que tornaram a rotina menos monótona.

À banca examinadora pelas colaborações e enriquecimento do trabalho.

À Plataforma de Microscopia do IGM pelos ensinamentos em microscopia e auxílio no uso dos equipamentos.

À Plataforma de espectrometria de massa do ICC, em especial à Michel Batista, Fabricio Klerynton Marchini, Genikelly Cavalcanti Machado e Hulyana Brum, pela recepção e conhecimentos sobre o uso do equipamento.

Aos professores e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Patologia Humana, pelos ensinamentos e oportunidade para desenvolver meu projeto.

À CAPES e a FAPESB pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana

À biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pelas colaborações na correção e diagramação da tese.

Aos professores que contribuíram para minha formação, pela paciência e compreensão para me ensinar.

À minha mãe pelo amor que me deu durante toda minha vida além do apoio e suporte estrutural e emocional que permite que hoje eu tenha maturidade e compreensão para trilhar meu próprio caminho.

Aos meus amigos, pelo apoio emocional durante toda minha jornada e por todos os momentos alegres que me proporcionaram.

Aos meus animais sempre estavam presentes e me prestaram conforto quando eu precise

Por que Existem o Mal e o Sofrimento Humano?

Leandro Gomes de Barros

Se eu conversasse com Deus

Iria lhe perguntar:

Por que é que sofremos tanto

Quando se chega pra cá?

Perguntaria também

Como é que ele é feito

Que não dorme, que não come

E assim vive satisfeito.

Por que é que ele não fez

A gente do mesmo jeito?

Por que existem uns felizes

E outros que sofrem tanto?

Nascemos do mesmo jeito,

Vivemos no mesmo canto.

Quem foi temperar o choro

E acabou salgando o pranto

LUZ, Yasmin da Silva. **Modulação da migração de macrófagos e células dendríticas por *Leishmania***: Alterações funcionais e moleculares em ambiente tridimensional e no contexto da infecção *in vivo*. 2025. 197f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

RESUMO

As leishmanioses podem apresentar diferentes manifestações clínicas, desde lesões localizadas na pele, até a leishmaniose visceral. A disseminação de células infectadas é essencial para o estabelecimento da doença, mas os mecanismos que impulsionam a migração celular pós-infecção ainda são pouco explorados. Estudos com macrófagos infectados por *L. amazonensis*, demonstraram uma redução na migração 2D após infecção, contudo, o processo de migração transendotelial de macrófagos envolve sinais regulatórios de um ambiente 3D. Adicionalmente, a infecção por *L. braziliensis* induz mediadores inflamatórios que aumentam o recrutamento celular no hospedeiro, porém os efeitos *in vivo* sobre a ativação de células da medula óssea e sua influência na migração e resposta dos macrófagos ainda são pouco compreendidos. Neste estudo investigamos a migração de macrófagos e células dendríticas (CDs) em ambiente tridimensional, bem como as alterações causadas na medula óssea de camundongos infectados por *L. braziliensis* e seu possível papel na modulação da migração de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ). BMMΦ de camundongos infectados por *L. braziliensis* foram isolados após 2, 5 e 10 semanas de infecção. Esses macrófagos, assim como CDs, foram submetidos a ensaios de migração 2D e 3D em sistemas transwell, e a formação de complexos de adesão foi avaliada por imunomarcagem de pFAK e pPaxilina. A dinâmica do citoesqueleto de actina foi analisada utilizando Faloidina, Rac1, Cdc42, RhoA e gelsolina, enquanto a formação de podossomos foi investigada por marcação de talina e vinculina. As análises foram realizadas por microscopia confocal, e a expressão de metaloproteinases (MMPs) foi avaliada por ensaio tipo Luminex. Para identificar proteínas diferencialmente expressas, as amostras foram caracterizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Foi observado que macrófagos humanos e murinos apresentam redução na capacidade migratória em ambiente 3D, associada à diminuição da formação de complexos de adesão e alterações na dinâmica de actina após a infecção por *Leishmania* spp. Em contraste, células dendríticas exibiram aumento da migração em ambiente 3D após infecção por *L. infantum*, acompanhado de maior formação de complexos de adesão e aumento da dinâmica de actina. Além disso, foi observada redução significativa da migração 2D e 3D de BMMΦ após infecção *in vivo* por *L. braziliensis*, juntamente com diminuição da expressão de pFAK e pPaxilina em todas as semanas avaliadas. A expressão de Rac1 e Cdc42 aumentou nas semanas 2 e 5, mas foi reduzida após 10 semanas, enquanto RhoA apresentou redução ao longo de todo o período. Quanto à vinculina, foi observado aumento na semana 2 e redução na semana 5. As MMPs mostraram aumento de expressão na semana 2 e diminuição na semana 5. A análise proteômica identificou 26 proteínas diferencialmente expressas após 2 semanas de infecção, 11 proteínas após 5 semanas e 6 proteínas após 10 semanas. Compreender como a infecção por *Leishmania* afeta a disseminação do parasita e o recrutamento de células da medula óssea *in vivo* é essencial para elucidar a patogênese da leishmaniose.

Palavras-chave: Macrófagos; Migração célula; *Leishmania*; Medula óssea.

LUZ, Yasmin da Silva. **Modulation of macrophage and dendritic cell migration by *Leishmania***: Functional and molecular changes in a three-dimensional environment and in the context of *in vivo* infection. 2025. 197f. il. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2025.

ABSTRACT

Leishmaniasis can present with different clinical manifestations, ranging from localized skin lesions to visceral disease. The dissemination of infected cells is essential for disease establishment, but the mechanisms driving cell migration after infection remain poorly understood. Studies with macrophages infected by *L. amazonensis* have shown reduced 2D migration following infection; however, the process of transendothelial migration of macrophages involves regulatory signals within a 3D environment. Additionally, infection with *L. braziliensis* induces inflammatory mediators that enhance host cell recruitment, but the *in vivo* effects on bone marrow cell activation and their influence on the migration and response of macrophages remain unclear. In this study, we investigated the migration of macrophages and dendritic cells (DCs) in a three-dimensional environment, as well as the alterations induced in the bone marrow of mice infected with *L. braziliensis* and their potential role in modulating the migration of bone marrow-derived macrophages (BMM Φ). BMM Φ from mice infected with *L. braziliensis* were isolated after 2, 5, and 10 weeks of infection. These macrophages, along with DCs, were subjected to 2D and 3D migration assays in transwell systems, and adhesion complex formation was evaluated by immunostaining for pFAK and pPaxillin. Actin cytoskeleton dynamics were analyzed using Phalloidin, Rac1, Cdc42, RhoA, and gelsolin, while podosome formation was assessed by talin and vinculin staining. Analyses were performed by confocal microscopy, and the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) was measured by a Luminex-based assay. To identify differentially expressed proteins, samples were characterized by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS). It was observed that human and murine macrophages exhibit reduced migratory capacity in 3D environments, associated with decreased adhesion complex formation and alterations in actin dynamics after infection with *Leishmania* spp. In contrast, DCs showed increased migration in 3D environments following *L. infantum* infection, accompanied by enhanced adhesion complex formation and increased actin dynamics. Furthermore, a significant reduction in both 2D and 3D migration of BMM Φ was observed after *in vivo* infection with *L. braziliensis*, together with decreased expression of pFAK and pPaxillin at all evaluated time points. Rac1 and Cdc42 expression increased at weeks 2 and 5 but decreased after 10 weeks, while RhoA expression was consistently reduced throughout the study period. Vinculin expression increased at week 2 and decreased at week 5. MMP expression was elevated at week 2 and reduced at week 5. Proteomic analysis identified 26 differentially expressed proteins after 2 weeks of infection, 11 proteins after 5 weeks, and 6 proteins after 10 weeks. Understanding how *Leishmania* infection affects parasite dissemination and the recruitment of bone marrow cells *in vivo* is essential for elucidating the pathogenesis of leishmaniasis.

Keyword: Macrophages; Cell migration; *Leishmania*; Bone marrow

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	20
Figura 2	Esquema do modelo clássico de migração celular	32
Figura 3	Representação do complexo de adesão e das proteínas da família Rho-GTPases	34
Figura 4	Migração em ambiente 2D e 3D	35
Figura 5	Organização dos podossomos em ambiente 2D e 3D	37
Figura 6	Desenho experimental e pontos de eutanásia	61
Figura 7	Esquema dos grupos experimentais	64
Figura 8	Avaliação do percentual de infecção de BMM Φ infectados por <i>L. braziliensis</i>	70
Figura 9	Cinética de migração de BMM Φ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	71
Figura 10	Formação do complexo de adesão em BMM Φ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	73
Figura 11	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	75
Figura 12	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	77
Figura 13	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	79
Figura 14	Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	81
Figura 15	Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	83

Figura 16	Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente bidimensional	85
Figura 17	Cinética de migração de BMM Φ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente tridimensional	87
Figura 18	Formação do complexo de adesão em BMM Φ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente tridimensional	89
Figura 19	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente tridimensional	91
Figura 20	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente tridimensional	93
Figura 21	Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> em ambiente tridimensional	95
Figura 22	O papel de proteases na migração de BMM Φ de camundongos infectados com <i>L. braziliensis</i>	97
Figura 23	Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMM Φ de camundongos após 2 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i>	103
Figura 24	Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMM Φ de camundongos após 5 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i>	107
Figura 25	Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMM Φ de camundongos após 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i>	110
Figura 26	Enriquecimento em vias canônicas das amostras de BMM Φ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> .	112
Figura 27	Enriquecimento em Ontologia genética das amostras de BMM Φ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> .	113
Figura 28	Enriquecimento em Genes característicos mapeados por ortologia das amostras de BMM Φ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i> .	114
Figura 29	Diagrama esquemático dos resultados	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados nos experimentos	67
Tabela 2	Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMM Φ no ponto de 2 semanas após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	101
Tabela 3	Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMM Φ no ponto de 5 semanas após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	106
Tabela 4	Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMM Φ no ponto de 10 semanas após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	109
Tabela 5	Lista de vias identificadas no GSEA como alteradas nas amostras de BMM Φ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por <i>L. braziliensis</i>	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AGO1	<i>Protein argonaute-1</i>
BMMΦ	<i>Bone marrow macrophages</i>
B.O.D.	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCL19	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 21</i>
CCL21	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 19</i>
CCR1	<i>C-C Chemokine Receptor 1</i>
CCR2	<i>C-C Chemokine Receptor 2</i>
CCR5	<i>C-C Chemokine Receptor 5</i>
CCR6	<i>C-C Chemokine Receptor 6</i>
CCR7	<i>C-C Chemokine Receptor 7</i>
CD11c	Clusters de diferenciação 11c
CD80	Clusters de diferenciação 80
CD86	Clusters de diferenciação 86
CDs	Células dendríticas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLRs	<i>C-type lectin receptors</i>
CO₂	Dióxido de carbono
COX6B	<i>Cytochrome c oxidase 6B1</i>
CR	<i>Complement receptor</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DTT	Dithiothreitol
ddH₂O	Água bidestilada
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
F-actina	Actina filamentosa
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAS	antígeno apoptótico 1
FcγR	<i>Fc-gamma receptors</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
G-actina	Monômero de actina ou actina globular

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gp63	Glicoproteína de 63 KDa
GPI	Glicosil Fosfatidil Inusitol
H⁺	Próton de Hidrogênio
HCl	Cloreto de Hidrogênio
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1
HSCs	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
HSPC	<i>Hematopoietic Stem and Progenitor Cells</i>
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanossulfônico
HNRPF	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F</i>
IE	Ionização por Eletrospray
IFN-γ	Interferon tipo γ
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-12	Interleucina-12
LAMP-1	<i>Lysosomal membrane glycoprotein 1</i>
LAMP-7	<i>Lysosomal membrane glycoprotein 7</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
LFQ	<i>Label-Free Quantification</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Muco-cutânea
LD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTM	Leishmaniose tegumentar mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
m/z	Razão massa carga
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MEC	Matriz extracelular
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Mili-Q	Água ultrapura tipo 1
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>

MoCDs	Células Dendríticas originadas de Monócitos
MPK2	<i>Mitogen-activated protein kinase 2</i>
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NH₄Cl	Cloreto de Amônia
NNN	<i>Novy-Nicolle-MacNeall</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
OSTF1	<i>Osteoclast-stimulating factor-1</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDCD5	<i>Programmed cell death protein 5</i>
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico
PP2	Protein Phosphatase 2
PYCARD	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
Rab-1	<i>Ras-related protein 7</i>
Rab-7	<i>Ras-related protein 7</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RPS2	<i>Ribosomal Protein S2</i>
SA-PE	Streptavidin-PE
SDS	Dodecil- Sulfato de Sódio
SBS	Soro Bovino Fetal
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TNF-α	<i>Tumor necrosis fator alfa</i>
TRAIL	<i>Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TLR1	<i>Toll-like receptors 1</i>
TLR2	<i>Toll-like receptors 2</i>
TLR4	<i>Toll-like receptors 4</i>
TLR9	<i>Toll-like receptors 9</i>

uPA	<i>Urokinase plasmin activator</i>
VP	Vacúolo Parasitóforo
YY1	Fator de transcrição Yin-Yang 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Aspectos gerais da leishmaniose	24
1.2	O parasito, o vetor e o ciclo de vida	25
1.3	Aspectos patológicos da leishmaniose tegumentar	26
1.4	Interação entre macrófago e <i>leishmania</i>	27
1.5	Interação entre células dendríticas e <i>leishmania</i>	28
1.6	Caracterização da medula óssea na infecção por <i>leishmania</i>	29
1.7	Migração celular	31
1.7.1	Etapas da migração celular	31
1.7.2	Formação do complexo de adesão	32
1.7.3	Família Rho GTPases e a organização do citoesqueleto de actina	33
1.7.4	Tipos de migração em ambiente 2D e 3D	34
1.7.5	Podossomos em ambiente 2D e 3D	35
1.8	Migração de células hospedeiras na infecção por <i>leishmania</i>	37
1.9	Estudos de proteômica na interação <i>leishmania</i>-célula hospedeira	39
2	JUSTIFICATIVA	43
3	HIPÓTESE DO CAPÍTULO 1	45
3.1	Objetivos do capítulo 1	45
3.1.1	Objetivo do capítulo 1	45
3.1.2	Objetivos específicos	45
4	MANUSCRITO 1	46
5	HIPÓTESE DO CAPÍTULO 2	60
5.1	Objetivo do capítulo 2	60
5.1.1	Objetivo geral do capítulo 2	60
5.1.2	Objetivos específicos do capítulo 2	60
6	MATERIAIS E MÉTODOS DO CAPÍTULO 2	61
6.1	Animais	61
6.2	Cultivo de células L929	61
6.3	Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ)	62
6.4	Cultivo de parasitos de <i>leishmania</i>	63
6.5	Infecção dos macrófagos	63

6.6	Percentual de infecção	64
6.7	Confecção das matrizes tridimensionais	65
6.8	Avaliação de migração de BMMΦ em ambiente bidimensional e tridimensional	65
6.9	Imunomarcção para proteínas do complexo de adesão, organização de actina e formação de podossomos	65
6.10	Avaliação da secreção de proteases por BMMΦ	67
6.11	Análise de proteômica	68
6.12	Análise estatística	69
7	RESULTADOS DO MANUSCRITO 2	70
7.1	Percentual de infecção de BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i>	70
7.2	Avaliação da migração de BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente bidimensional	71
7.3	Avaliação da formação do complexo de adesão em BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente bidimensional	72
7.4	Avaliação da organização dos filamentos de actina em BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente bidimensional	74
7.5	Avaliação da formação de podossomos em BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente bidimensional	80
7.6	Avaliação da migração de BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente tridimensional	86
7.7	Avaliação da formação do complexo de adesão em BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente tridimensional	87
7.8	Avaliação da organização dos filamentos de actina em BMMΦ infectados por <i>L. Braziliensis</i> em ambiente tridimensional	90
7.9	Avaliação da expressão de proteases em BMMΦ de camundongos infectados com <i>L. Braziliensis</i>	96
7.10	Avaliação de proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMMΦ de camundongos infectados com <i>L. Braziliensis</i>	98
8	DISCUSSÃO DO MANUSCRITO 2	117
9	CONCLUSÃO DO MANUSCRITO 2	134
	REFERÊNCIAS	136
	ANEXOS	155

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

Mais de 20 espécies do protozoário do gênero *Leishmania* são capazes de causar a leishmaniose, uma doença de determinação social, endêmica em 98 países, incluindo o Brasil. Estima-se que ocorram de 700.000 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose por ano no mundo (WHO, 2023). Nesse contexto, mais de 90% dos casos novos tem ocorrência em apenas 13 países: Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão e Síria (Steverding, 2017).

O agente causador da leishmaniose, a *Leishmania*, é um protozoário intracelular que pode causar um largo espectro de doenças. As principais formas clínicas da leishmaniose são Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) (Desjeux, 2004; Kaye; Scott, 2011; Podinovskaia; Descoteaux, 2015). Clinicamente, a LT é dividida em Cutânea Localizada (LCL), Cutânea Disseminada (LCD), Cutânea Difusa (LD) e Muco-cutânea (LCM) (Desjeux, 2004). Na LCL podem aparecer uma ou mais lesões na pele que costumam cicatrizar espontaneamente. Essas lesões geralmente se apresentam como úlceras arredondadas, de bordas bem definidas, indolores, com base avermelhada e centro necrótico. No Brasil, essa forma da doença é causada principalmente por parasitas das espécies *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania panamensis*. (Steverding, 2017).

A LCD se manifesta por diversas lesões cutâneas, geralmente papulares e de aparência variada, e frequentemente compromete a mucosa nasal. No Brasil, essa forma da doença é causada principalmente pela *Leishmania braziliensis* (Machado *et al.*, 2019). Na LMC as lesões se apresentam em regiões de mucosa, geralmente em vias aéreas superiores, como boca, nariz e garganta, sendo causada primariamente por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis*. Já a LD (forma anérgica), causada no Brasil por *L. amazonensis*, provoca nódulos com ausência de úlceras ou envolvimento de mucosas (Machado *et al.*, 2019; Salgado *et al.*, 2016). A LV, manifestação clínica mais grave da enfermidade e causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, afeta órgãos internos como fígado, baço e medula óssea e pode levar a morte se não tratada (OPAS, 2022). A prevalência da LT em regiões endêmicas está aumentando por causa das mudanças ambientais agravadas por influências como aquecimento global, desmatamento, conflitos regionais e migração em massa (Bahrami; Harandi; Rafati, 2018; Du *et al.*, 2016; González *et al.*, 2010). Aproximadamente 75% dos casos globais de LT são encontrados em 10 países:

Afganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Síria e Sudão do Norte (Alvar *et al.*, 2012). No Brasil, a LT possui ampla distribuição, com cerca de 21.000 casos ao ano. A região Norte do país é a que apresenta a maior incidência desta forma clínica (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida da região Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes) (Ministério da saúde, 2022). Já a LV apresenta cerca de 3.500 casos por ano, com o coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes. A letalidade da LV vem aumentando gradativamente nos últimos anos no Brasil, passando de 3,1 % em 2000 para 7,1 em 2012 (Brasil, 2022).

1.2 O parasito, o vetor e o ciclo de vida

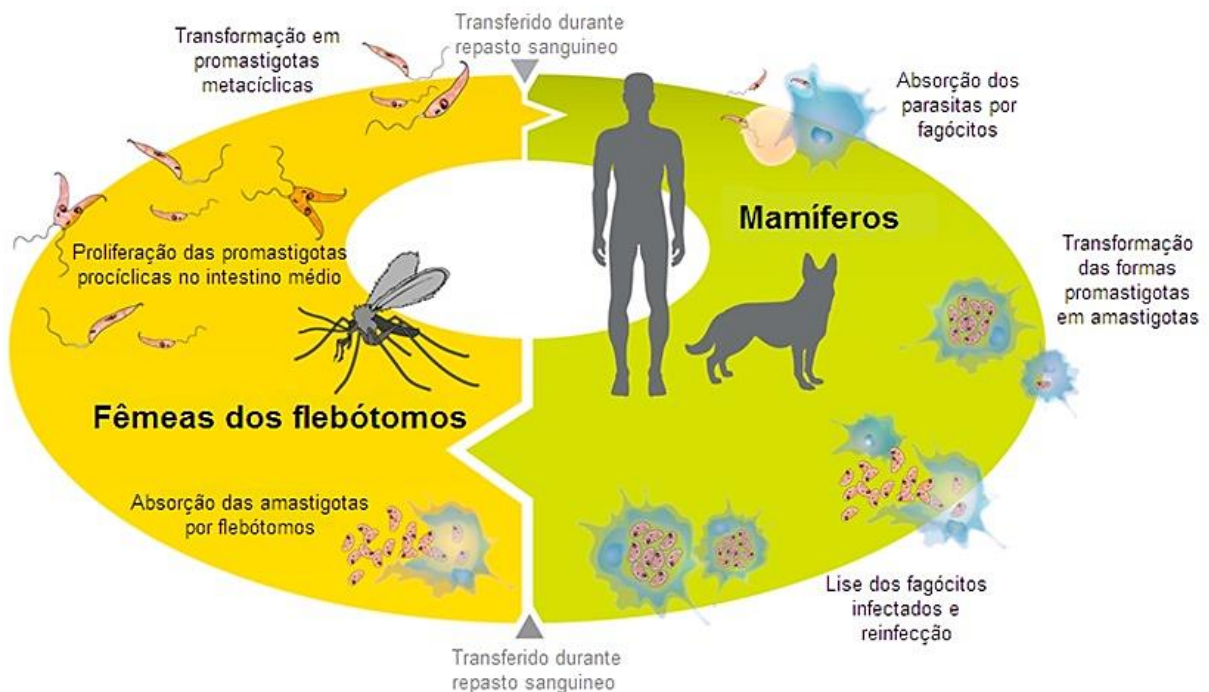
O parasito *Leishmania* pertence a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Grimaldi; Tesh, 1993). Assim como outros protozoários, a *Leishmania* tem um ciclo de vida digênico, apresentando um hospedeiro mamífero e um vetor flebotômico (Sunter; Gull, 2017). Os vetores, capazes de carrear a *Leishmania*, os flebotomos, pertencem à ordem Diptera, sub-ordem Nematocera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Akhoundi *et al.*, 2016). Existem mais de 800 espécies de flebotômicos e, destas, 464 espécies são encontradas no Novo Mundo e 375 no Velho Mundo. Contudo, apenas 30 espécies, tem a capacidade vetorial para *Leishmania* (Bates, 2007; Lane, 1993).

O ciclo biológico desse parasito é dividido em dois principais estágios: um flagelado, que permite ao parasito alta motilidade, e um estágio aflagelado, onde a *Leishmania* precisa obrigatoriamente estar no interior de uma célula hospedeira (Kaye; Scott, 2011). A infecção no hospedeiro vertebrado se inicia com a inoculação de formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele, durante o repasto sanguíneo por fêmeas flebotômicas. Em seguida, essas formas são reconhecidas por fagócitos locais, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, e são internalizadas. Uma vez dentro da célula hospedeira, as formas promastigotas sofrem alterações estruturais e moleculares, transformando-se em amastigotas, obrigatoriamente intracelulares. Nesse estágio de desenvolvimento, a *Leishmania* consegue sobreviver e se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos (VP), que são compartimentos fagolisossomais (Alexander; Russell, 1992). No interior das células hospedeiras, o parasito pode disseminar pelos diferentes tecidos do hospedeiro causando lesões (León; López-bravo; Ardavín, 2007; Moll *et al.*, 1993).

O ciclo de vida no vetor inicia-se com a infecção por *Leishmania* durante o repasto sanguíneo de fêmeas flebotômicas no hospedeiro vertebrado infectado. O inseto vetor ingere

as formas amastigotas, que chegam ao intestino médio, transformando-se em promastigotas procíclicas. Essas formas são capazes de se multiplicar por divisão binária e, durante a metacicligenese, se transformam em promastigotas metacíclicas. Nesse estágio, o parasito não é capaz de se multiplicar e é altamente infectivo. As promastigotas metacíclicas são altamente móveis e migram para o intestino anterior, que possibilita a sua transmissão para um novo hospedeiro vertebrado durante uma nova refeição do flebótomo fêmea infectado, iniciando novamente o ciclo no hospedeiro vertebrado (Figura 1) (Bates, 2007; Gupta; Nishi, 2011).

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*. Fêmeas de flebôtomos infectadas irão transmitir a forma promastigota metacíclica do parasito para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Esses parasitos serão reconhecidos e internalizados por fagócitos presentes no local da inoculação, dentro das células hospedeiras as promastigotas metacíclicas transformam-se em amastigotas, que são capazes de sobreviver e se replicar dentro dos vacúolos parasitóforos. A replicação da amastigota pode causar uma ruptura da célula hospedeira, permitindo a infecção de outras células. Quando o fagócito infectado é capturado por um flebótomo durante o repasto sanguíneo, as amastigotas irão transformar-se em promastigotas procíclicas no intestino do flebótomo. As promastigotas procíclicas, irão se diferenciar em metacíclica, que é a forma infectante, mantendo o ciclo de infecção.



Fonte: Adaptado de Veras e De Menezes (2016).

1.3 Aspectos patológicos da leishmaniose tegumentar

A LCL é caracterizada por úlcera bem delimitada, arredondada e com bordas elevadas, podendo ser observada a partir de 2 a 4 semanas após a inoculação por *L. braziliensis*. A primeira manifestação observada é uma pequena lesão papulosa não ulcerada, associada a linfadenopatia satélite, conhecida como LT precoce (Carvalho; Bacellar; Carvalho, 2022). Nas

lesões cutâneas precoces, o infiltrado dérmico é constituído principalmente por macrófagos infectados com amastigotas, com poucos linfócitos e células plasmáticas. Conforme a lesão se desenvolve, mais linfócitos e células plasmáticas migram para o local da lesão, e a derme superficial torna-se edematosa. A epiderme sobrejacente torna-se hiperqueratótica e decompõe-se para formar uma úlcera coberta por um coágulo de detritos hiperqueratóticos, exsudato seco, células mortas e uma mistura de organismos vivos e mortos. Nos meses seguintes, há uma diminuição gradual do número de amastigotas e macrófagos, deixando um infiltrado granulomatoso composto por linfócitos, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. A maioria dos pacientes apresentam 1 ou 2 lesões, geralmente em locais expostos, variando em tamanho de 0,5 a 3 cm de diâmetro (Kevric; Cappel; Keeling, 2015). A infecção por *L. braziliensis* é capaz de migrar para a mucosa orofaríngea, onde pode permanecer dormente por muitos anos antes de se reativar para causar a forma mucocutânea (Carvalho; Bacellar; Carvalho, 2022).

1.4 Interação entre macrófago e *leishmania*

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania* e no interior destas células, os parasitos são capazes de sobreviver por longo período e se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos (Afrin; Khan; Hemeg, 2019). Estes compartimentos possuem pH ácido, enzimas lisossomais, e suas membranas apresentam marcadores de endossomo tardio e lisossomo, incluindo microsialina, Rab 7, LAMP-1, LAMP-2, ATPase vacuolar e moléculas de MHC classe I e II (Antoine *et al.*, 1991; Lang *et al.*, 1994; Antoine *et al.*, 1998). Contudo, a interação entre *Leishmania* e macrófagos é complexa. Os parasitos expressam diferentes ligantes que podem interagir com diversos receptores da célula hospedeira (Mosser; Rosenthal, 1993; Mosser; Miles, 2007). A interação da *Leishmania* com o macrófago envolve receptores do complemento (CRs), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores de Fc γ (Fc γ Rs) que reconhecem proteínas presentes na superfície dos parasitos como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 KDa (gp63) (Podinovskaia; Descoteaux, 2015). Estas etapas de reconhecimento do patógeno e o tipo de receptor envolvido no momento da interação são de suma importância para o curso da infecção.

Um dos principais mecanismos de defesa contra a *Leishmania* é ativação de macrófagos por IFN- γ , levando a uma resposta mediada por óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que provoca uma explosão oxidativa em resposta à fagocitose dos parasitos (Brüne *et al.*, 2013; Van Assche *et al.*, 2011). Na LT causada por *L. braziliensis*, a produção de

ROS e NO contribui para morte do parasito. Entretanto, as células hospedeiras ainda permanecem infectadas, havendo assim a manutenção da infecção e progressão da doença (Carvalho; Bacellar, 2022).

1.5 Interação entre células dendríticas e *leishmania*

As CDs constituem um grupo de células apresentadoras de antígenos altamente especializadas, derivadas da medula óssea. Elas desempenham papel central na imunidade, sendo capazes de reconhecer, internalizar e processar antígenos, além de migrar para os linfonodos, onde promovem a ativação de linfócitos T naïve. Essas células são classificadas em distintos subtipos com base em sua ontogenia, expressão de marcadores de superfície específicos e distribuição tecidual (Tibúrcio *et al.*, 2019). Após reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), as células dendríticas iniciam seu processo de maturação, que envolve o aumento da expressão de moléculas apresentadoras de antígenos, como MHC classe I e II, além de marcadores coestimulatórios como CD11c, CD80 e CD86 (Caux *et al.*, 1994). Durante sua migração para os órgãos linfóides secundários, essas células passam a expressar altos níveis do receptor de quimiocina CCR7, elemento essencial para seu direcionamento aos linfonodos e para a adequada interação com linfócitos T na apresentação do antígeno (Ohl *et al.*, 2004).

A migração das CDs para os linfonodos desempenha um papel crucial na resposta imunológica à *Leishmania*, visto que essas células são as principais responsáveis pela apresentação de antígenos (Gorak; Engwerda; Kaye, 1998; Von Stebut *et al.*, 1998). Esse processo é altamente dependente do perfil de receptores de quimiocinas expresso pelas CDs, que permite seu recrutamento seletivo para locais de inflamação. Em condições inflamatórias, as quimiocinas que ativam os receptores CCR1, CCR2, CCR5 e CCR6 atraem as CDs imaturas para as áreas afetadas. Dentre os receptores que medeiam a interação célula dendrítica-*Leishmania* estão os receptores tipo toll (TLRs: TLR2, TLR4, TLR9) além de receptores de lectina (CLRs). Adicionalmente, foi demonstrado que TLR1 e TLR2 participam do reconhecimento do lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* (Tibúrcio *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2017). Após a captura de antígenos, durante sua maturação, ocorre uma alteração na expressão dos receptores de quimiocinas: CCR1, CCR2 e CCR5 têm sua expressão diminuída, sendo substituídos pelos receptores CCR7 e CXCR4. Essa mudança facilita a migração das CDs para os linfonodos de drenagem, em resposta às quimiocinas específicas, onde elas apresentam os antígenos derivados do parasita aos linfócitos T (Geissmann *et al.*, 2010; Merad *et al.*, 2013).

O papel das CDs na resposta imune à infecção por *Leishmania* evidencia sua importância na organização da resposta imunológica. Estudos sugerem que o desfecho da infecção por esse parasita em camundongos resistentes e suscetíveis pode estar relacionado a diferenças funcionais nas CDs, especialmente durante o processo de diferenciação das células T auxiliares CD4⁺ em células T efetoras (Suzue *et al.*, 2008; Gorak *et al.*, 1998; Von Stebut *et al.*, 1998). Pesquisas anteriores indicam que, durante a infecção por *L. major*, ocorre o recrutamento de células dendríticas derivadas de monócitos (MoDCs) para a pele e para os linfonodos de drenagem. Essas células desempenham um papel essencial na indução de uma resposta imune eficaz contra a *Leishmania*, devido à sua capacidade de produzir IL-12 e NO, ambos fundamentais para a defesa contra a infecção (de Trez *et al.*, 2009; Leon *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2010). O aumento no recrutamento de CDs para os linfonodos de drenagem resulta na hipertrofia desses órgãos, o que é considerado um indicativo de uma resposta imune protetora contra *L. major* (Carvalho *et al.*, 2012). Com relação à LV, Ato e colaboradores (2002) observaram que CDs de camundongos infectados com *L. donovani* apresentaram migração comprometida da zona marginal para a região periarteriolar do baço, na qual estão localizados os linfócitos T, ocorrendo as sinapses imunológicas. A diminuição dessa migração foi associada à perda da expressão de CCL21 e CCL19, além da inibição de CCR7, sugerindo que a falta de uma resposta imune protetora pode estar relacionada à migração alterada das CDs para o baço. Por outro lado, camundongos BALB/c, desnutridos, infectados por *L. donovani* mostraram um aumento na expressão de CCR7 nas CDs infectadas, bem como nos seus ligantes (CCL19 e CCL21) nos linfonodos (Ibrahim *et al.*, 2014).

1.6 Caracterização da medula óssea na infecção por *leishmania*

A leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, incluindo as formas LT e LV (Akuffo *et al.*, 2018). A forma visceral é causada principalmente por *L. donovani* no Velho Mundo e *L. infantum* no Novo Mundo, e pode levar a morte se não tratada (Pigott *et al.*, 2014). Pacientes com LV assintomática apresentam uma resposta imune Th1-polarizada que ativa os macrófagos para um fenótipo M1, capaz de eliminar os parasitos de forma eficiente (Engwerda; Ato; Kaye, 2004; Stäger; Bankoti, 2012). Esse fenômeno está associado à produção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , IL-12 e TNF- α (Kaye *et al.*, 2004). Embora diferentes espécies de *Leishmania* modulem o sistema imunológico, as espécies visceralizantes são capazes de infectar órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (Lypaczewski *et al.*, 2018). O aspirado de medula óssea de pacientes com LV tem como característica expansão da linhagem

eritróide e mielóide monocítica, além da supressão da linhagem megacariocítica e infiltração plasmocítica difusa. Essas alterações constituem eritropoiese ineficaz, o que significa o aumento da morte prematura por apoptose de células precursoras na própria medula óssea (Poulaki; Piperaki; Voulgarelis, 2021). Com relação à estrutura da medula óssea, estudos em camundongos mostram aumento de TCD4⁺ efetoras, produtoras de TNF- α /IFN- γ , que induzem a perda de células estromais. A ativação e mobilização de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) são comuns em muitos estados inflamatórios crônicos (Preham *et al.*, 2018).

O microambiente pró-inflamatório na LV é capaz de interromper a função dos eritroblastos, devido a um acúmulo de hemicromos. Esse acúmulo é gerado através da ação do INF- γ , que é capaz de silenciar genes de diferenciação eritróide, através da regulação positiva de FAS (antígeno apoptótico 1) em macrófagos, TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado a TNF) e outros mediadores apoptóticos (Lafuse *et al.*, 2013). Com relação à linhagem mielóide, há uma mobilização de células em diferenciação pelo microambiente pró-inflamatório da medula e monócitos diferenciados induzidos a um fenótipo regulador M2, devido às condições de hipóxia no baço causada pela LV (Abidin *et al.*, 2017). Essa combinação de um ambiente pró-inflamatório do parasito na medula e a desorganização do parênquima esplênico envolve o hospedeiro em um ciclo de produção de células mielóides reguladoras que são ineficazes contra o parasito e podem favorecer a replicação da *Leishmania* (Poulaki; Piperaki; Voulgarelis, 2021).

Na LT, as alterações na medula ainda precisam ser mais bem exploradas e caracterizadas. Anteriormente, foi descrita uma alteração nas células-tronco hematopoiéticas/progenitoras (HSPC). Durante o processo inflamatório, essas células são ativadas, desencadeando uma mielopoiese aumentada, a fim de repor células como neutrófilos, que são recrutados para os tecidos inflamados (Boettcher *et al.*, 2014; Boettcher; Manz, 2017). Contudo, em formas persistentes de LT, causada por *L. major*, essas alterações nas HSPC podem ocorrer mesmo na ausência do parasito na medula óssea, sendo induzidas por um ambiente rico em citocinas e quimocinas. O microambiente da medula óssea de camundongos infectados com a cepa de *L. major* persistente, em comparação com a cepa de *L. major* de autocura, apresentou uma resposta atenuada dos interferons tipo I e tipo II. Apesar disso, ambas as cepas induziram uma rápida regulação positiva de citocinas mielopoéticas, como IL-1 β e GM-CSF. Adicionalmente, a infecção por cepas persistentes de *L. major* resultou na expansão de células progenitoras multipotentes na medula óssea e no baço, associada ao aumento do número de células mielóides tanto na lesão cutânea quanto no baço (Ferreira *et al.*, 2022). Em

relação à presença de parasitos na medula óssea em casos de LT, ainda não foi relatado a presença do parasito em órgão visceralizantes como baço, fígado e medula óssea em pacientes com LT. Entretanto, já foi relatada a detecção do parasito na medula óssea de camundongos infectados por *L. braziliensis* (Floro e Silva, *et al.*, 2022). Adicionalmente, em pacientes imunocomprometidos com HIV, foi observada a presença de *L. major* em amostra de punção esternal da medula óssea, embora exames de ultrassonografia não evidenciassem alterações no baço e no fígado (Barro-Traoré *et al.*, 2008).

1.7 Migração celular

O processo de migração celular é realizado por vários tipos de células nucleadas, desempenhando importantes papéis fisiológicos como tráfego de leucócitos durante as respostas imunológicas, mecanismos de regeneração e reparo e durante a morfogênese embrionária (Friedl; Wolf, 2010; Gardel *et al.*, 2010; Huttenlocher; Horwitz, 2011; Ridley *et al.*, 2003).

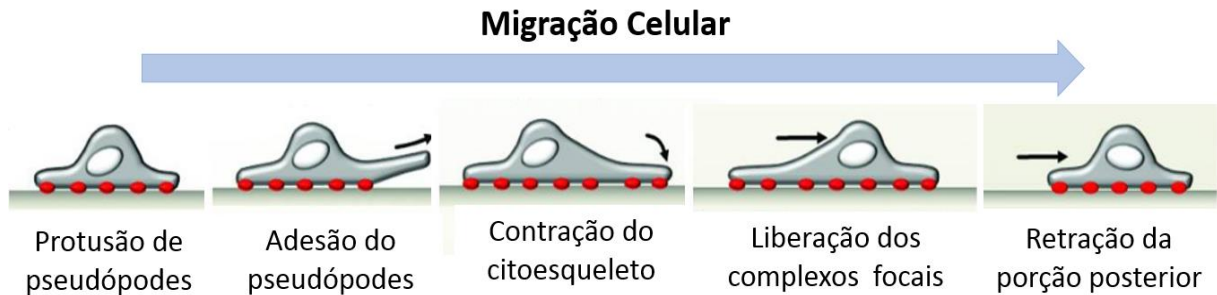
1.7.1 Etapas da migração celular

A migração celular é constituída por vários processos celulares integrados que envolvem a protusão do lamelipódio e filopódio na borda anterior da célula, adesão da região de protusão ao substrato extracelular através de complexos focais, contração das fibras de estresse formado por actomiosina citoplasmática, que gera uma força responsável por liberar os complexos focais da região posterior da célula e provoca uma retração dessa região. Dessa forma, ocorre a movimentação do corpo celular em uma determinada direção (Figura 2). Esse mecanismo é mediado principalmente por filamentos de actina citoplasmática e formação de complexos de adesão (Sheetz *et al.*, 1999; Wiesner *et al.*, 2014).

Uma etapa crucial para a migração é o ancoramento da membrana plasmática ao substrato, esse processo é mediado por proteínas transmembrana relacionadas com a adesão das células à matriz extracelular (MEC), conhecidas como integrinas. (Ridley *et al.*, 2003). Durante a migração, a célula, através da polimerização de actina, forma estruturas conhecidas como lamelipódios e filopódios na região anterior da célula no sentido da migração, projetando o corpo celular. Nestas estruturas de projeção da membrana, são encontrados feixes densos de actina filamentosa. A principal diferença é que os filopódios são estruturas unidimensionais,

longas e finas, semelhante a microvilosidades, ao passo que lamelipódios são bidimensionais e contém uma rede de actina filamentosa (Tang; Gerlach, 2017).

Figura 2 - Esquema do modelo clássico de migração celular. O movimento celular é dividido em diversas etapas integradas.



Fonte: Adaptado de Wiesner *et al.* (2014).

1.7.2 Formação do complexo de adesão

As adesões focais ou contatos focais são estruturas que irão conectar as células ao substrato extracelular (Jones, 2000). Esse mecanismo de migração envolve mais de 150 componentes que se associam ao complexo de adesão focal (Hynes, 2002; Romer; Birukov; Garcia, 2006; Wozniak *et al.*, 2004; Zamir; Geiger, 2001), que incluem proteínas de membrana (integrinas), proteínas que se conectam a actina (talina, vinculina e α -actinina e proteínas adaptadoras como paxilina e Src) (Turner, 2000; Zamir; Geiger, 2001). Outras proteínas podem se associar de forma transitória ao complexo de adesão, regulando a migração, à exemplo de proteínas da família Rho de pequenas GTPases (Huttenlocher; Horwitz, 2011; Ridley; Hall, 1992).

As integrinas são proteínas chaves no processo de adesão. Estas proteínas apresentam estrutura transmembranar e heterodímeras com subunidades α e β (Ginsberg, 2014) e sua ativação está relacionada com o recrutamento de proteínas fosforiladas de adesão e migração (Huveneers; Danen, 2009; Mitra; Schlaepfer, 2006). A FAK é uma proteína precursora na regulação da adesão focal durante o movimento celular, no entanto, os mecanismos de regulação ainda são pouco compreendidos (Zaidel-bar *et al.*, 2004). As moléculas de FAK ao se agregarem são capazes de realizar fosforilação cruzada, criando um sítio de encaixe para os membros da família tirosinas-cinase citoplasmáticas Src (Mitra; Schlaepfer, 2006; Toutant *et al.*, 2002). O complexo formado por FAK e Src autofosforilam FAK em tirosinas adicionais, criando sítios de encaixe para diferentes proteínas sinalizadoras intracelulares, principalmente com proteínas adaptadoras como paxilina e p130Cas (Figura 3) (Mitra; Schlaepfer, 2006; Playford; Schaller, 2004).

Outra proteína importante do complexo de adesão focal é a paxilina, que contribui para o recrutamento de cinases e fosfatases responsáveis pela organização do citoesqueleto de actina e formação dos complexos de adesão (Deakin; Turner, 2008). A regulação da paxilina é ocorre através de sua fosforilação, que é realizada pela interação da integrina com a MEC, iniciando assim a montagem dos complexos de adesão através do recrutamento de outras cinases como Src, FAK, actopaxina, vinculina e talina (Figura 3) (Brown; Turner, 2002; López-colomé *et al.*, 2017; Turner, 2000). A interação de paxilina com FAK intensifica sua fosforilação em outros resíduos de tirosina, regulando a dinâmica de formação dos complexos de adesão (Bellis *et al.*, 1997; López-colomé *et al.*, 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado que a inibição da interação FAK-paxilina diminui a capacidade de adesão, invasão e migração em fibroblastos (Deramaudt *et al.*, 2014).

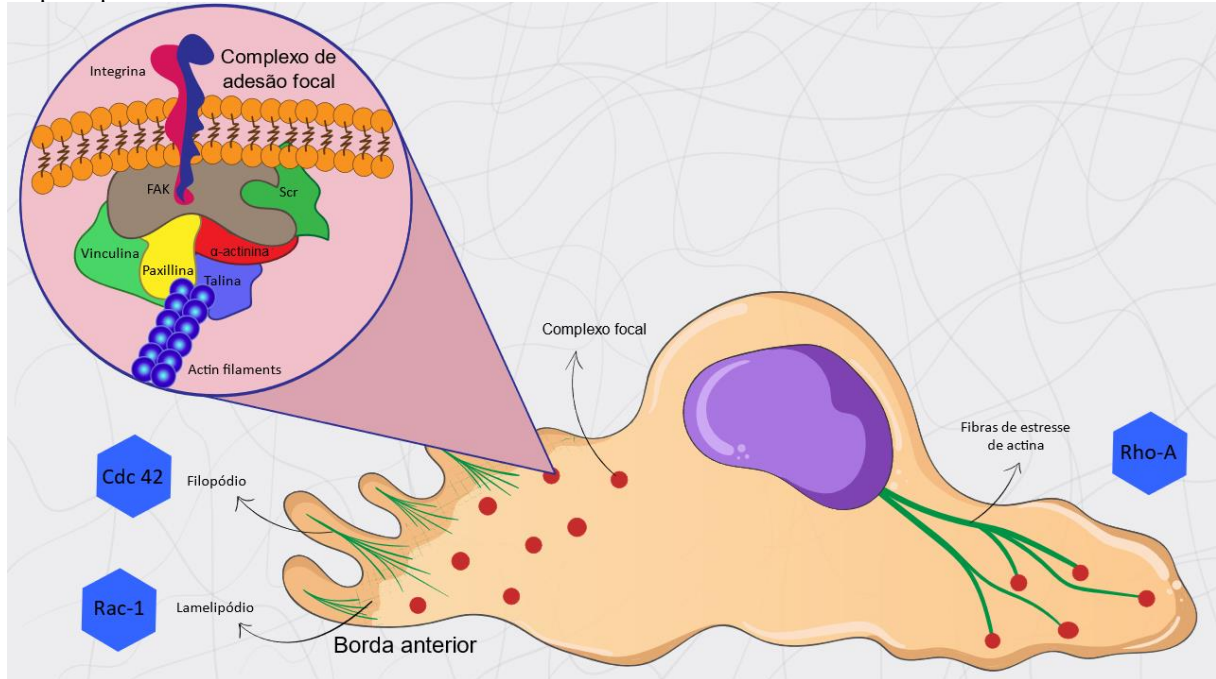
1.7.3 Família Rho GTPases e a organização do citoesqueleto de actina

Além da adesão ao substrato, que confere suporte e estabilidade a célula, um outro mecanismo importante na migração celular é a organização do citoesqueleto de actina. A actina na célula é extremamente dinâmica e sua polimerização ocorre em 3 etapas: nucleação, a qual é o início da formação do filamento onde ocorre a junção das primeiras subunidades de G-actina; alongamento, nessa etapa há adição de outros polímeros de G-actina na extremidade positiva do filamento; e por fim, há equilíbrio entre o crescimento do filamento de actina na extremidade positiva e dissociação dos monômeros na extremidade negativa. Esse processo de formação e estabelecimento dos filamentos de actina são regulados por proteínas da família Rho-GTPases (Figura 3) (Egelman, 1985; Holmes *et al.*, 1990).

A família Rho-GTPases é constituída por proteínas G fundamentais na dinâmica de actina, uma vez que regulam os processos de polimerização e despolimerização dos filamentos. Os principais membros dessa família são Rac1, Cdc42 e RhoA. Rac1 e Cdc42 são responsáveis por controlar a extensão de lamelipódios na região anterior da célula, enquanto Cdc42 controla a extensão de filopódios (Figura 3) (Demali; Burridge, 2003; Huveneers; Danen, 2009; López-colomé *et al.*, 2017). RhoA por sua vez, controla a retração da parte posterior da célula e a formação de fibras de stress no corpo celular e porção posterior da célula (Figura 3) (Ridley; Hall, 1992). A atividade desta proteína é inicialmente diminuída após a interação com integrina $\beta 1$ (Arthur; Petch; Burridge, 2000), visto que a alta atividade de RhoA pode ativar ROCK (do inglês, *Rho-associated protein kinase*), inibindo a formação da protrusão celular (Nobes; Hall, 1999; Rottner; Hall; Small, 1999). A atividade de ROCK estimula a contratilidade da miosina,

além de estimular a fosforilação de LIM quinase, capaz de inibir a cofilina (Maekawa *et al.*, 1999), bloqueando assim a polimerização da actina (Zebda *et al.*, 2000).

Figura 3 - Representação do complexo de adesão e das proteínas da família Rho-GTPases. A integrina conecta a matriz extracelular aos filamentos de actina, através de um complexo de adesão focal, formado a partir de FAK, paxilina e outras proteínas. A regulação da polimerização e despolimerização do citoesqueleto de actina é coordenada por proteínas da família Rho GTPase. Rac1 e Cdc42 na porção anterior da célula regulando a formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente, enquanto RhoA regula a formação de fibras de estresse na parte posterior da célula



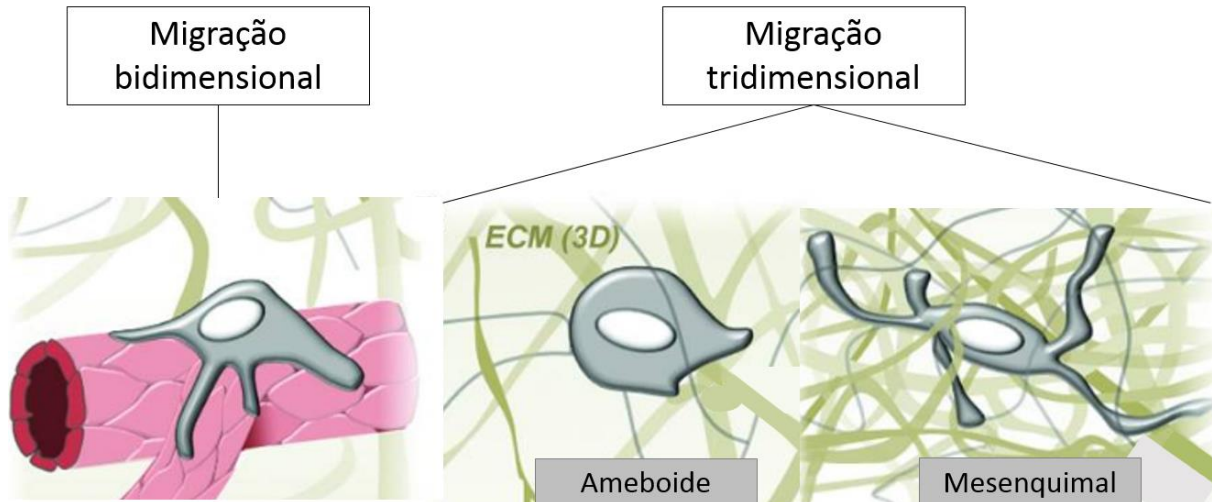
Fonte: Autora

1.7.4 Tipos de migração em ambiente 2D e 3D

A migração celular pode ocorrer em ambiente bidimensional ou tridimensional. A célula migra em ambiente 2D quando se encontra sobre uma superfície como, por exemplo, sobre um vaso sanguíneo. Nos tecidos, a célula migra principalmente em modo 3D, interagindo com os componentes da MEC que está a sua volta. Nesse ambiente, a célula pode migrar de formas distintas, variando entre migração ameboide ou mesenquimal, dependendo da densidade e dos componentes da MEC (Figura 4) (Friedl; Wolf, 2010; Huttenlocher; Horwitz, 2011a; Wiesner *et al.*, 2014). Esses modos de migração são determinados pelas propriedades mecânicas, estruturais e bioquímicas da MEC. Em um ambiente com matriz mais frouxa, como a de Colágeno I, os macrófagos assumem um modo de migração ameboide, como o que ocorre no tecido conjuntivo. Na migração ameboide, a célula apresenta morfologia mais esférica, com poucas protrusões, e migram em uma velocidade mais alta ($\sim 0,7 \mu\text{m} / \text{min}$) e depende da via

Rho/ROCK (Wiesner *et al.*, 2014). Já em matrizes mais densas, como na membrana basal, o macrófago assume a migração mesenquimal. Nesse modo de migração, as células apresentam morfologia mais alongada e baixa velocidade de migração ($\sim 0,2 \mu\text{m}/\text{min}$), uma vez que dependem da degradação da MEC por proteases (Wiesner *et al.*, 2014).

Figura 4 - Migração em ambiente 2D e 3D. A migração pode ocorrer em ambientes bidimensionais, como em superfícies de vasos sanguíneos, ou tridimensionais. Em um ambiente 3D, a célula pode migrar de forma ameboide, quando se encontra em uma matriz de baixa densidade, ou mesenquimal, quando se encontra em uma matriz densa.



Fonte: Adaptado de Wiesner *et al.* (2014).

1.7.5 Podossomos em ambiente 2D e 3D

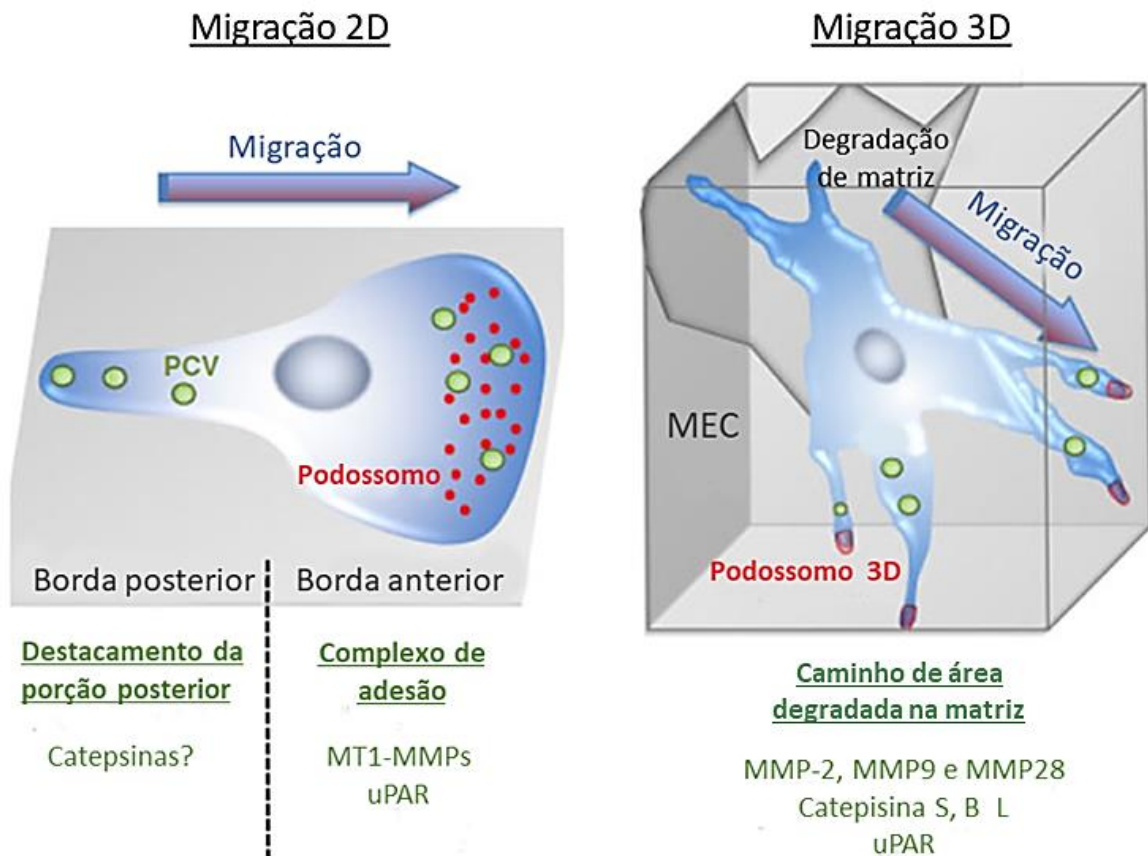
Células como macrófagos, células dendríticas e osteoclastos possuem estrutura de podossomos que estão envolvidas nos processos de adesão, degradação da matriz, migração, junção célula-célula e fagocitose (Santiago-Medina *et al.*, 2015; Van Den Dries *et al.*, 2019). No ambiente 2D, os podossomos se formam com uma estrutura bem definida (Figura 5) (Wiesner *et al.*, 2014), com um núcleo rico em F-actina com proteínas associadas como Arp2/3, cortactina e gelsolina, e, ao redor desse núcleo, há uma estrutura de anel, que contém proteínas de adesão, como vinculina e talina (Figura 5) (Van Den Dries *et al.*, 2019; Wiesner *et al.*, 2014). Já em ambiente 3D, os podossomos não possuem uma arquitetura bem definida como no 2D, mas apresentam um acúmulo de F-actina e marcadores clássicos como vinculina, talina, gelsolina e cortactina (Figura 5) (Wiesner *et al.*, 2014). No ambiente 2D, os podossomos estão associados a adesão e são amplamente distribuídos nos locais onde existem contato da célula com o ambiente externo. Adicionalmente, em ambiente 3D, são formados apenas na migração mesenquimal e se localizam nas regiões de protusão da célula, são maiores e estão presentes em menor número quando comparados ao 2D (Van Goethem *et al.*, 2010).

Os podossomos estão relacionados com a capacidade invasiva da célula, pois possibilitam a degradação da matriz extracelular através de secreção de proteases. Já foram identificados diversos tipos de proteases associadas aos podossomos, incluindo metaloproteases de matriz (MMPs), catepsinas e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) (Figura 5) (Vérollet *et al.*, 2011; Wiesner *et al.*, 2014). As MMPs são endopeptidases dependentes de zinco que pertencem à família das metzincinas, estando associadas ao remodelamento tecidual em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a infiltração de células em diferentes tecidos (Vérollet *et al.*, 2011). As catepsinas pertencem à família da cisteína protease, são armazenadas dentro da célula em lisossomos e sua função é clivar diversos substratos quando liberadas em ambiente extracelular. Além disso, participam da cicatrização e no remodelamento da MEC (Vérollet *et al.*, 2011; Wiesner *et al.*, 2014). Contudo, a atividade das catepsinas nos macrófagos é descrita na porção posterior da célula, em contraste com a localização dos podossomos que estão na região de protusão (Evans *et al.*, 2003). Adicionalmente, já foi demonstrado que inibidores de protease lisossomais não são capazes de inibir a degradação da gelatina por podossomos, enquanto o inibidor geral de MMP leva à inibição da matriz (Van Goethem *et al.*, 2010). O uPA é uma protease extracelular que ao se conecta ao seu receptor uPAR e regula a proteólise de MEC, participando do remodelamento da matriz pericelular (Vérollet *et al.*, 2011; Wiesner *et al.*, 2014).

A MMP2, é uma gelatinase, que atua sobre diversos componentes da matriz extracelular, tendo como principais substratos os colágenos tipos I, IV, V, VII e X, além de laminina, agrecano, fibronectina e tenascina. Essa enzima está envolvida na facilitação da migração celular para os tecidos, desempenhando papel importante em processos regenerativos (Caley *et al.*, 2015). Sua presença na periferia de lesões agudas está associada à expressão de laminina-332 e ao aumento da mobilidade de queratinócitos (Moses *et al.*, 1996). Já a MMP3, usa colágenos IV, V, IX e X, fibronectina, elastina, gelatina, agrecan, nidogênio, fibrilina, E-caderina como substrato, sendo expressa em queratinócitos na região da lesão (Caley *et al.*, 2015). A MMP8, por sua vez, tem como alvos os colágenos tipos I, II e III, além de agrecano, serpinas e α 2-macroglobulina. Essa collagenase está majoritariamente envolvida na cicatrização de feridas (Caley *et al.*, 2015). Contudo, sua superexpressão em feridas crônicas pode comprometer o reparo tecidual, favorecendo a degradação excessiva do colágeno tipo I (Danielsen *et al.*, 2011). A MMP9 (gelatinase B) atua sobre colágenos I, III, IV, V e VII, bem como sobre agrecano, elastina e fibrilina. É expressa principalmente por queratinócitos na margem das feridas, onde contribui para a migração celular e o processo de reepitelização. No entanto, sua liberação desregulada tem sido implicada em condições patológicas (Caley *et al.*,

2015). Já a MMP12, também conhecida como metaloelastase, é expressa exclusivamente por macrófagos e possui ampla especificidade de substrato, atuando sobre colágeno tipo IV, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina, elastina, fibrilina, inibidor de 1-proteinase e apolipoproteína A (Caley *et al.*, 2015).

Figura 5 - Organização dos podossomos em ambiente 2D e 3D. Podossomos são estruturas relacionadas à capacidade invasiva da célula, através da secreção de proteases. Podem ser formados em ambiente 2D, onde estão presentes em toda a célula e têm uma estrutura bem definida, com núcleo rico em F-actina associada a proteínas reguladoras, cercado por um anel com proteínas relacionadas à adesão como vinculina e talina. No ambiente 3D, são formados apenas na forma mesenquimal e se concentram nas regiões de protusão. Neste ambiente, apresentam estrutura pouco definida, mas têm um acúmulo de F-actina e marcadores clássicos como vinculina, talina, gelsolina e cortactina.



Fonte: Adaptado de Vérollet *et al.* (2011).

1.8 Migração de células hospedeiras na infecção por *leishmania*

Já foi demonstrado em estudos anteriores que patógenos são capazes de modular a adesão e migração de fagocitos (Da Gama *et al.*, 2004; Vérollet; Le cabec; Maridonneau-Parini, 2015). Com relação à *Leishmania*, estudos anteriores demonstraram que a infecção por *Leishmania*

reduz a adesão de macrófagos (Pinheiro *et al.*, 2006) e altera a função de moléculas envolvidas em adesão, como VLA-4, uma molécula essencial na migração macrofágica (Figueira *et al.*, 2015). Adicionalmente, foi demonstrado redução da migração de macrófagos após a infecção por *Leishmania* em ambiente bidimensional (Blewett; Kadivar; Soulsby, 1971; Bray *et al.*, 1983). Além disso, trabalho publicado por Menezes e colaboradores (2016) mostrou que a infecção por *L. amazonensis* reduz a migração de macrófagos em ambiente bidimensional, associado a redução da formação de complexos de adesão. Esses fenômenos independem da carga parasitária no interior da célula hospedeira, da expansão do vacúolo parasitóforo e de fatores solúveis liberados pelas células infectadas, contudo mostrara ter relação com a modulação da expressão de paxilina e 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 *L. amazonensis* (Menezes *et al.*, 2016). Contudo, estudos publicados utilizando *L. infantum* mostraram um aumento da migração de macrófagos após a infecção, através da via dependente de PI3Ks (Rocha *et al.*, 2020). Entretanto, o processo de migração transendotelial de macrófagos envolve sinais regulatórios de um ambiente tridimensional. Em estudo realizado em nosso laboratório, mostramos que a infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. infantum* leva à redução da migração de macrófagos em ambiente tridimensional, pela alteração da dinâmica de actina e redução da expressão de proteínas envolvidas na interação com a MEC (Luz *et al.*, 2023).

Com relação às CDs, apresentadoras profissionais de antígenos, estudos prévios da literatura mostraram uma alteração do recrutamento após a infecção por *Leishmania*. Estudos anteriores que investigaram os mecanismos associados à LC demonstraram que durante a infecção por *L. major*, ocorre um recrutamento de MoCDs para a pele e para os linfonodos de drenagem (Moll *et al.*, 1993; Ritter *et al.*, 2004). Em contrapartida, estudo utilizando modelo murino demonstrou uma diminuição na população de células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* recrutadas para o local da infecção, em comparação com aquelas não infectadas, sugerindo que o parasita é capaz de interferir no comportamento migratório dessas células *in vivo* (Hermida *et al.*, 2014). Adicionalmente, CDs infectadas por *L. mexicana* apresentam uma migração reduzida para os linfonodos drenantes (Hsu; Scott, 2007; Petritus *et al.*, 2012).

Com relação as espécies de *Leishmania* responsáveis pela LV, dados na literatura indicam que as CDs de camundongos infectados com *L. donovani* apresentaram migração comprometida da zona marginal para a região periarteriolar do baço, onde estão localizados os linfócitos T, onde ocorrem as sinapses imunológicas (Ato, *et al.*, 2002). No caso da infecção por *L. infantum*, foi observada uma maior migração das CDs após a infecção, o que se correlacionou com um

aumento na formação de complexos de adesão, na dinâmica da actina e na expressão de CCR7 nessas células. Esse aumento da migração não foi observado em CDs infectadas por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, o que sugere um possível papel das CDs na visceralização da LV (Rebouças *et al.*, 2021). Contudo, o processo de migração das células hospedeiras durante a infecção por *Leishmania* e o papel que essas células desempenham no estabelecimento da infecção e na disseminação do parasita ainda é pouco compreendido.

1.9 Estudos de proteômica na interação *leishmania*-célula hospedeira

O aprimoramento de metodologias ômicas, como a genômica e a proteômica de alta resolução, tem sido fundamental para a elucidação de mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da leishmaniose, tanto do ponto de vista do parasita quanto do hospedeiro. Essas tecnologias, que permitem a análise global de perfis de expressão gênica e proteica em células, tecidos ou organismos inteiros, fornecem uma abordagem sistêmica capaz de revelar redes biológicas complexas e interações funcionais essenciais para a compreensão da resposta à infecção (Wang *et al.*, 2009 ; Veras; De Menezes, 2016). A proteômica possibilita a detecção e quantificação de um grande número de proteínas simultaneamente em uma única amostra biológica. Com os avanços recentes nas metodologias analíticas, especialmente nas técnicas baseadas em espectrometria de massas, tornou-se possível alcançar maior sensibilidade e resolução na análise proteica, mesmo a partir de quantidades reduzidas de material. Tais inovações superaram limitações associadas a abordagens tradicionais, como a eletroforese bidimensional em gel oferecendo maior abrangência e precisão na caracterização do proteoma (Veras; Ramos; De Menezes, 2018; Anand *et al.*, 2017).

As células fagocíticas, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, estão entre os principais elementos do sistema imune inato mobilizados para o foco da infecção por *Leishmania*. No local infectado, essas células reconhecem o patógeno e o internalizam, permitindo que os parasitos se sobrevivam e se multipliquem no interior dos fagolisossomos. Além de atuarem como hospedeiras, essas células exercem funções imunorregulatórias ao secretarem quimiocinas e citocinas que orquestram o recrutamento de linfócitos, evento determinante para o direcionamento da resposta imune e o desfecho clínico da infecção (Liu; Uzonna, 2012). Dentre essas populações, os macrófagos se destacam não apenas por sustentarem a infecção intracelular, mas também por influenciarem diretamente o perfil da resposta imune adaptativa, por meio da produção de mediadores inflamatórios (Podinovskaia; Descoteaux, 2015). Estudos prévios evidenciam que o resultado da infecção pode ser

amplamente condicionado pelas interações precoces entre os macrófagos e os parasitas, sugerindo um papel crítico dessas células nos estágios iniciais da leishmaniose (Laskay *et al.*, 1995; Scharton-Kersten; Scott, 1995).

Utilizando análise proteômica em larga escala por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), Menezes e colaboradores (2013) investigaram proteínas expressas por macrófagos em resposta à infecção por *Leishmania*, com o objetivo de identificar possíveis biomarcadores associados à suscetibilidade ou resistência. O estudo foi conduzido em camundongos da linhagem CBA, resistentes à *L. major* e suscetíveis à *L. amazonensis*. Foram identificadas 62 proteínas predominantemente expressas em macrófagos infectados, das quais 15 apresentaram expressão diferencial entre os dois parasitas. A maioria (13) teve expressão reduzida frente à infecção por *L. amazonensis* e aumentada na infecção por *L. major*, enquanto apenas duas proteínas foram induzidas pela infecção com *L. amazonensis*, sugerindo a existência de perfis moleculares distintos associados ao comportamento do parasita e à resposta imune do hospedeiro. Entre as proteínas mais expressas em macrófagos infectados por *L. major* destacam-se PDCD5, coronina 1B, HIF-1 α , COX6B, OSTF1, PP2, HNRPF, PYCARD, RAB1, serpina, RPS2 e cadeia leve de miosina. A análise em rede funcional, baseada na plataforma IPA, demonstrou que essas proteínas estão associadas a vias ligadas ao desenvolvimento e metabolismo celular, reforçando a hipótese de que diferentes padrões de modulação proteica em macrófagos possam influenciar diretamente a resistência ou a suscetibilidade à infecção (Menezes *et al.*, 2013)

Estudo utilizando abordagem proteômica quantitativa avaliou a resposta de macrófagos da linhagem THP-1 à infecção por *Leishmania donovani*, empregando a técnica de marcação isobárica (iTRAQ) associada à LC-MS/MS. Os autores observaram que proteínas envolvidas em importantes vias metabólicas, como glicólise e oxidação de ácidos graxos, foram reguladas positivamente após a infecção por *L. donovani*, sugerindo que esse parasito modula o metabolismo da célula hospedeira. Também foi identificada a indução de proteínas relacionadas à transcrição gênica, splicing de RNA, histonas e processos de reparo e replicação do DNA, indicando uma reorganização funcional da maquinaria celular do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2015).

Estudo prévio utilizando uma abordagem proteômica para melhor entender a resposta da célula hospedeira à infecção por *Leishmania* aplicou essa tecnologia para investigar as vias de sinalização envolvidas na regulação positiva da expressão e atividade de diferentes transportadores, como o transportador de arginina de *Leishmania* (LdAAP3), em resposta à redução do pool de arginina na célula hospedeira. Para estudar as fosfoproteínas envolvidas na

via de sinalização implicada nessa resposta, os autores usaram uma técnica de marcação por dimetilação para investigar mudanças no perfil de fosforilação de promastigotas de *Leishmania* após 5 e 15 minutos de privação de arginina. A análise fosfoproteômica revelou um aumento da fosforilação da proteína quinase 2 ativada por mitógeno (MPK2), indicando que essa quinase pode estar envolvida na resposta de privação de arginina durante a infecção por *Leishmania* (Goldman-Pinkovich *et al.*, 2016). Embora este trabalho não tenha investigado uma resposta mais global da célula hospedeira à infecção por *Leishmania*, a abordagem utilizada pode ser de grande importância para identificar marcadores potenciais que podem ser usados para o desenvolvimento de novos tratamentos medicamentosos e para entender o resultado da doença.

Ainda utilizando abordagem proteômica, estudo recente investigou o papel da proteína Argonauta 1 (Ago1) de macrófago na infecção por *Leishmania donovani*, com o objetivo de compreender a influência da via de interferência de RNA (RNAi) do hospedeiro na patogênese do parasita. A análise identificou 1.778 proteínas, das quais 331 apresentaram expressão significativamente modulada em resposta à infecção. Dentre essas, 212 proteínas foram reguladas negativamente, enquanto 119 foram positivamente reguladas. As vias funcionais mais afetadas estavam associadas à cadeia pesada da ferritina (FTH1), cistatina-A, PYCARD (proteína associada à inflamação e apoptose), antígeno CD44 e ribonucleoproteína nuclear heterogênea U (HNRNPU). Em conjunto, os resultados demonstram que *L. donovani* modula seletivamente a maquinaria de RNAi, utilizando Ago1 como um fator de virulência indireto essencial para sua permanência e replicação intracelular (Moradimotlagh, *et al.*, 2023).

A análise proteômica quantitativa foi utilizada também para investigar como *Leishmania donovani* modula a composição dos autofagossomos de macrófagos durante a infecção. Para isso, células monocíticas humanas da linhagem THP-1 foram infectadas com *L. donovani* e comparadas a células submetidas a indução de autofagia por rapamicina (autofagia seletiva) ou por privação de aminoácidos (autofagia não seletiva). Os autofagossomos foram isolados e analisados por espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS), utilizando marcação por isótopos estáveis por aminoácidos em cultura celular (SILAC). Os resultados revelaram que a infecção por *L. donovani* induz um tipo de autofagia não clássica, independente da via canônica mediada pelo mTORC1, e altera significativamente o conteúdo proteico dos autofagossomos. Das 1.787 proteínas identificadas nos autofagossomos induzidos por *Leishmania*, 146 foram diferencialmente expressas em comparação aos autofagossomos induzidos por rapamicina, enquanto 57 diferiram daqueles induzidos por privação de aminoácidos. Interessantemente, 23 proteínas do próprio parasita foram detectadas nos

autofagossomos infectados, sugerindo uma possível manipulação direta do conteúdo autofágico (Nandan, *et al.*, 2023).

Um outro estudo recente, utilizando uma abordagem de proteômica quantitativa sem marcação, investigou o papel do fator de transcrição Yin-Yang 1 (YY1) na resposta de macrófagos à infecção por *Leishmania*. Os resultados demonstraram que a inibição de YY1 reduz significativamente a sobrevivência da *Leishmania* em macrófagos infectados. A análise proteômica revelou que a expressão de diversas proteínas do macrófago é dependente dos níveis de YY1, muitas das quais são moduladas durante a infecção, indicando uma resposta do hospedeiro mediada por YY1 que favorece a persistência do parasita. Foram 537 proteínas dependentes de YY1, dessas 54 foram relatadas anteriormente em infecções e 50 em estudos relacionados à imunidade. Curiosamente, as proteínas que são reguladas positivamente pela inibição de YY1 estão envolvidas em processos de infecção e imunidade. Esses achados identificam YY1 como um potencial fator de virulência envolvido na patogênese da leishmaniose (Brar, *et al.*, 2025).

Em conjunto, os dados disponíveis indicam que parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de modular o perfil proteômico da célula hospedeira, destacando o potencial da proteômica como ferramenta estratégica para a compreensão da patogênese da leishmaniose.

2 JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por mais de 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania*, caracterizando-se como uma doença de determinação social endêmica em 98 países. Estima-se que ocorram cerca de 1 milhão de novos casos por ano (Organização Mundial Da Saúde, 2023). A leishmanioses, 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 LV, forma mais grave que pode levar à morte se não tratada (Ashford, 2000; Desjeux, 2004). No Brasil, *Leishmania braziliensis* é responsável pelo maior número de casos de LT, sendo capaz de causar uma variedade de formas clínicas, incluindo lesões típicas, atípicas e mucocutâneas (Da Silva Vieira *et al.*, 2019).

Na leishmaniose, a relação entre disseminação do parasito e enfermidade é particularmente estreita. Um dos mecanismos envolvidos na sobrevivência de *Leishmania spp.* no interior de células do hospedeiro vertebrado e no estabelecimento de lesões teciduais está relacionado à disseminação e *homing* de células contendo o parasito e antígenos do parasito em tecidos do hospedeiro. As áreas de lesões são relacionadas à presença do parasito no interior de células macrofágicas. Na forma localizada da doença cutânea, as lesões permanecem restritas à área focal da pele, por vezes com evidente linfadenopatia regional. Entretanto, na forma disseminada ou mucocutânea, há disseminação do parasito para múltiplos focos da pele ou para mucosa. O quadro de disseminação da *Leishmania* nos casos de LV parece ainda mais complexo: provavelmente há um trânsito pele-lymfonodo-sangue e, em seguida, um estabelecimento sequencial de células parasitadas em diferentes tecidos, como demonstrado em camundongos e sugerido em estudos com cães naturalmente infectados (Dos-santos *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2006).

Poucos estudos avaliaram a migração de células hospedeiras infectadas por *Leishmania*, bem como os mecanismos envolvidos neste processo. Menezes e colaboradores (2016) mostraram que, em ambiente bidimensional, a migração de macrófagos é reduzida após a infecção por *L. amazonensis*. Adicionalmente, Rebouças e colaboradores (2021) mostraram um aumento da migração de células dendríticas infectadas por *L. infantum* ou isolados associados às formas disseminadas e difusa de LT. Contudo, o processo de migração transendotelial de células hospedeiras envolve sinais regulatórios de um ambiente tridimensional. Adicionalmente, foi demonstrado que a infecção por *L. braziliensis* estimula o hospedeiro a produzir mediadores inflamatórios que contribuem para o aumento do recrutamento celular

(Follador *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2015). Entretanto, o efeito da infecção *in vivo* do hospedeiro na ativação e recrutamento de células da medula óssea e como isto influencia na capacidade de migração de células hospedeiras e sua capacidade de responder a infecção permanece pouco explorado. Assim, neste estudo investigamos a migração de macrófagos e células dendríticas em ambiente tridimensional, bem como, as alterações causadas na medula óssea de camundongos infectados por *L. braziliensis* e seu possível papel na modulação da migração de BMM Φ . Estudos para melhor entender o processo de adesão e migração celular e sua relação com a sobrevivência intracelular do parasito e disseminação da doença são fundamentais para a concepção de novas estratégias terapêuticas e prevenção do desenvolvimento de formas graves da leishmaniose.

3 HIPÓTESE DO CAPÍTULO 1

A infecção por *Leishmania* altera a migração de células hospedeiras em ambiente tridimensional, levando à redução de macrófagos e aumento da migração de células dendríticas.

3.1 Objetivo do capítulo 1

3.1.1 Objetivo Geral do capítulo 1

Avaliar a migração de macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania* spp. em um ambiente tridimensional.

3.1.2 Objetivos específicos do capítulo 1

- Avaliar cinética da infecção de macrófagos e células dendríticas por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Avaliar a migração de macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania* spp. em matrizes tridimensionais;
- Avaliar a formação de complexos de adesão em macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional;
- Avaliar a organização dos filamentos de actina na migração de macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania* spp. em ambiente tridimensional.



OPEN ACCESS

EDITED BY
 Claudia Tanja Mierke,
 Leipzig University, Germany

REVIEWED BY
 Despina Smirlis,
 Pasteur Hellenic Institute, Greece
 Luca Galluzzi,
 University of Urbino Carlo Bo, Italy

*CORRESPONDENCE
 Juliana P. B. de Menezes,
 ✉ juliana.fullam@fiocruz.br

†These authors have contributed equally
 to this work and share first authorship

RECEIVED 14 April 2023
 ACCEPTED 18 July 2023
 PUBLISHED 28 July 2023

CITATION
 Luz Y, Rebouças A, Bernardes CPOS,
 Rossi EA, Machado TS, Souza BSF,
 Brodskyn CI, Veras PST, dos Santos WLC
 and de Menezes JPB (2023), *Leishmania*
 infection alters macrophage and
 dendritic cell migration in a three-
 dimensional environment.
Front. Cell Dev. Biol. 11:1206049.
 doi: 10.3389/fcell.2023.1206049

COPYRIGHT
 © 2023 Luz, Rebouças, Bernardes, Rossi,
 Machado, Souza, Brodskyn, Veras, dos
 Santos and de Menezes. This is an open-
 access article distributed under the terms
 of the [Creative Commons Attribution
 License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
 reproduction in other forums is
 permitted, provided the original author(s)
 and the copyright owner(s) are credited
 and that the original publication in this
 journal is cited, in accordance with
 accepted academic practice. No use,
 distribution or reproduction is permitted
 which does not comply with these terms.

Leishmania infection alters macrophage and dendritic cell migration in a three-dimensional environment

Yasmin Luz^{1†}, Amanda Rebouças^{1†}, Carla Polyana O. S. Bernardes¹, Erik A. Rossi², Taise S. Machado¹, Bruno S. F. Souza^{2,3,4}, Claudia Ida Brodskyn¹, Patricia S. T. Veras¹, Washington L. C. dos Santos⁵ and Juliana P. B. de Menezes^{1*}

¹Laboratory of Host–Parasite Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ²Center for Biotechnology and Cell Therapy, São Rafael Hospital, Salvador, Brazil, ³D'Or Institute for Research and Education, Salvador, Brazil, ⁴Laboratory of Tissue Engineering and Immunopharmacology, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ⁵Laboratory of Structural and Molecular Pathology, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil

Background: Leishmaniasis results in a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from skin lesions at the site of infection to disseminated lesions in internal organs, such as the spleen and liver. While the ability of *Leishmania*-infected host cells to migrate may be important to lesion distribution and parasite dissemination, the underlying mechanisms and the accompanying role of host cells remain poorly understood. Previously published work has shown that *Leishmania* infection inhibits macrophage migration in a 2-dimensional (2D) environment by altering actin dynamics and impairing the expression of proteins involved in plasma membrane–extracellular matrix interactions. Although it was shown that *L. infantum* induces the 2D migration of dendritic cells, *in vivo* cell migration primarily occurs in 3-dimensional (3D) environments. The present study aimed to investigate the migration of macrophages and dendritic cells infected by *Leishmania* using a 3-dimensional environment, as well as shed light on the mechanisms involved in this process.

Methods: Following the infection of murine bone marrow-derived macrophages (BMDM), human macrophages and human dendritic cells by *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, or *L. infantum*, cellular migration, the formation of adhesion complexes and actin polymerization were evaluated.

Results: Our results indicate that *Leishmania* infection inhibited 3D migration in both BMDM and human macrophages. Reduced expression of proteins involved in adhesion complex formation and alterations in actin dynamics were also observed in *Leishmania*-infected macrophages. By contrast, increased human dendritic cell migration in a 3D environment was found to be associated with enhanced adhesion complex formation and increased actin dynamics.

Conclusion: Taken together, our results show that *Leishmania* infection inhibits macrophage 3D migration, while enhancing dendritic 3D migration by altering actin dynamics and the expression of proteins involved in plasma membrane extracellular matrix interactions, suggesting a potential association between dendritic cells and disease visceralization.

KEYWORDS

macrophages, dendritic cells, 3D migration, *Leishmania*, dissemination

1 Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical disease endemic in 98 countries. Every year, it is estimated that between 700,000 and 1 million new cases occur, leading to approximately 30,000 deaths (Alvar et al., 2012). Cutaneous leishmaniasis (CL) in the New World, typically caused by *L. amazonensis* or *L. braziliensis*, results in ulcerative skin lesions. By contrast, visceral leishmaniasis (VL), which is caused by *L. infantum*, can affect the internal organs, such as the liver, spleen, and bone marrow, and may lead to more severe clinical manifestations, even death, if left untreated (Ashford, 2000; Desjeux, 2004; Kaye and Scott, 2011; Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

Infection in the vertebrate host occurs through the inoculation of metacyclic promastigotes in the host's skin by female sandflies during bloodfeeding (Veras and Bezerra de Menezes, 2016). Once inside the mammalian host, *Leishmania* parasites can survive and multiply inside acidic parasitophorous vacuoles within macrophages (Afrin et al., 2019). Subsequently, parasites may either persist at the local inoculation site or become disseminated to other tissues. The detection of *Leishmania*-infected mononuclear phagocytes in the bloodstream suggests that migration by infected macrophages may potentially contribute to the spread of disease (Liarte et al., 2001). Additionally, previous studies have shown that dendritic cells carrying *Leishmania* parasites can migrate, consequently transporting parasite antigens to lymph nodes (Ato et al., 2002). However, the mechanisms involved in the dissemination of *Leishmania* to different host tissues, as well as the homing and persistence of infected cells *in vivo*, remain poorly understood.

The cell migration carried out by a wide variety of cells plays an essential role in many physiological processes, such as leukocyte trafficking and immune response (Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 2003; Friedl and Wolf, 2010; Gardel et al., 2010). Integrated molecular events mediated primarily by actin filaments in the cytoplasm, in addition to the formation of adhesion complexes, are the main aspects involved in cell migration (Sheetz et al., 1999; Wiesner et al., 2014). Initially, a process mediated by integrins (Ridley et al., 2003), actin-binding proteins (talin, vinculin, and α -actinin) and adapter proteins (Paxillin, FAK, and Src) results in the formation of adhesion complexes (Turner, 2000; Zamir and Geiger, 2001), allowing the plasma membrane to anchor itself to the substrate. FAK protein functions as a focal adhesion regulatory factor during cell movement (Zaidel-Bar et al., 2004), leading to the phosphorylation of members of the Src family of tyrosine kinases, Paxillin, and p130Cas, thus creating binding sites for the formation of adhesion complexes (Toutant et al., 2002; Playford and Schaller, 2004; Mitra and Schlaepfer, 2006; López-Colomé et al., 2017). Additionally, proteins from the Rho family of small GTPases (Rac1, Cdc42, and RhoA) (Ridley and Hall, 1992; DeMali and Burridge, 2003; Huvneers and Danen, 2009; Huttenlocher and Horwitz, 2011; López-Colomé et al., 2017) are responsible for the regulation of actin dynamics within cells. Rac-1 controls the extension of lamellipodia in the anterior region of the cell, while

the extension of filopodia is regulated by Cdc-42 (DeMali and Burridge, 2003; Huvneers and Danen, 2009; López-Colomé et al., 2017). RhoA controls retraction of the rear end of the cell, in addition to the formation of stress fibers throughout the cell structure (Ridley and Hall, 1992).

Previous studies have evidenced that *Leishmania* infection reduces macrophage adhesion by altering the function of molecules involved in adhesion (Carvalho et al., 2004; Pinheiro et al., 2006). In addition, decreased macrophage migration has been observed following *Leishmania* infection in a two-dimensional environment (Blewett et al., 1971; Bray et al., 1983). A report published by de Menezes et al. (2017) also demonstrated a reduction in macrophage migration due to *L. amazonensis* infection in a two-dimensional environment, which was further associated with diminished adhesion complex formation and a greater frequency of polymerization and actin filament turnover (de Menezes et al., 2017). In contrast, a recent study published by our group identified increased human dendritic cell migration following infection with *L. infantum*, but not *L. braziliensis* and *L. amazonensis*, the latter two being localized forms of CL. Additionally, we found increased expression of proteins involved in adhesion complex formation and actin polymerization, as well as higher CCR7 expression in the human dendritic cells infected with all three isolates (Rebouças et al., 2021).

While most studies investigating cell migration are performed in a two-dimensional environment, the study of cellular infiltration into tissue requires the use of a three-dimensional environment. Within a 3D environment, leukocytes can migrate via amoeboid or mesenchymal modes (Friedl and Wolf, 2010; Huttenlocher and Horwitz, 2011; Wiesner et al., 2014). Each mode of migration is determined by the mechanical, structural, and biochemical properties of a given extracellular matrix. Amoeboid migration is dependent on the Rho/ROCK pathway, which is responsible for the regulation of actomyosin. In denser environments, the cell assumes a mode of mesenchymal migration dependent on the secretion of proteases and the formation of podosomes (Wiesner et al., 2014). In an attempt to better understand the mechanisms involved in the spread of *Leishmania* within the host, the present study aimed to evaluate the migration of *Leishmania* spp.-infected macrophages and dendritic cells through the use of a 3D environment.

2 Materials and methods

2.1 Ethics statement

The isogenic mice (*Mus musculus*) of the Balb/c strain used in the present study were provided by the animal care facility of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ/BA), following approval by the Institutional Animal Experimentation Review Board (CEUA) under protocol number 014/2019.

Whole blood monocytes were isolated from healthy blood donors following approval by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (CEP/IGM-FIOCRUZ) (protocol No. 5.138.962).

2.2 *Leishmania* culturing

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/Br88/BA125), *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788), and *L. infantum* (MCAN/BR/89/BA262) were maintained for up to six successive passages in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States), or modified essential minimum medium hemoflagellate (MEM Medium), both supplemented with 50 µg/mL gentamicin (Gibco, Waltham, MA, United States) and 10%–20% (v/v) FBS (Gibco, Waltham, MA, United States). Promastigotes were grown in an incubator at 24°C and monitored daily by counting in a Neubauer chamber. Upon reaching stationary phase, promastigotes were then used in the experiments.

2.3 Mouse bone marrow-derived macrophage cultures

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) obtained from Balb/c mice were cultured for 7 days in RPMI medium containing 10% FBS (Gibco, Waltham, MA, United States), 30% L929 cell supernatant containing macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), 200 mM glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States) and 10 µg/mL ciprofloxacin (Isofarma, Eusébio, CE, BR). Mature, adherent BMDM were detached using 0.05% EDTA/PBS (Gibco, Waltham, MA, United States). Cell viability was determined via trypan blue exclusion.

2.4 Human monocyte-derived macrophage and dendritic cell cultures

Human monocyte-derived macrophages were obtained from freshly isolated healthy peripheral blood monocytes using Ficoll-Histopaque density gradient separation (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were washed three times and then plated at 2×10^6 in 500 mL of Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplemented with 25 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane sulfonic acid] (HEPES), 2 g/L sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 20 g/mL ciprofloxacin and 10% inactivated FBS (complete RPMI medium) for 7 days at 37°C under 5% CO₂, on 24-well plates to allow monocytes to differentiate into macrophages. For human dendritic cells, peripheral blood monocytes were collected by positive selection using a magnetic cell sorter to isolate CD14⁺ subtypes. Positive cells were then plated in RPMI with granulocyte-macrophage colony-stimulating (GM-CSF) [50 ng/mL] and interleukin-4 (IL-4) [100 UI/mL] for 7 days to allow dendritic cell differentiation.

2.5 Preparation of 3D collagen matrix

Cells were embedded in a collagen type I matrix derived from rat tail collagen (Gibco), as described (Van Goethem et al., 2010). Cells (5×10^4) were added to a solution containing collagen I [2 mg/mL], PBS 1X, and NaOH [2.6 mM] before polymerization at 37°C for 24 h.

To investigate the surface and shape of the 3D collagen matrix with embedded macrophages, scanning electron microscopy (SEM) was employed, following a previously published protocol (Cruz et al., 2021).

2.6 Bone marrow-derived macrophages, human macrophages and dendritic cell infection

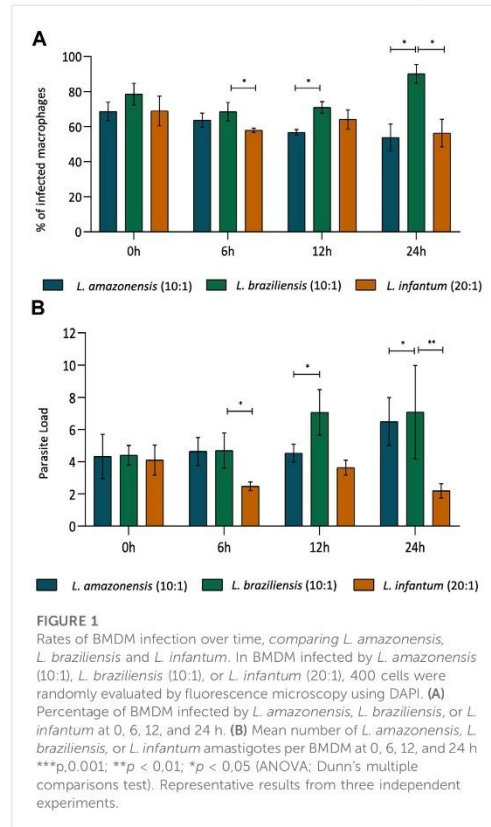
BMDM and human macrophages were plated on 24-well plates for immunofluorescence (2×10^5) and migration assays (5×10^4) 24 h prior to experimentation. *L. braziliensis* (10:1) or *L. infantum* (20:1) promastigotes were added to both macrophage cultures and incubated for 24 h at 37°C, while cultures with added *L. amazonensis* (10:1) promastigotes were incubated for 6 h at 37°C. BMDM and human macrophages were then washed in PBS to remove any non-internalized parasites, and then re-incubated for 24 or 48 h for cell migration assays, or 24 h for immunofluorescence. For dendritic cells, *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1) and *L. infantum* (20:1) promastigotes were added to dendritic cell cultures and incubated for 4 h at 37°C. Cells were then washed in PBS to remove non-internalized parasites, then re-incubated in RPMI for 6, 12, 24, and 48 h (for BMDM and human macrophages) and for 6, 24, and 48 h (for dendritic cells) at 37°C.

2.7 Parasite burden

BMDM, human macrophages and dendritic cells were infected as described earlier. Subsequently, the cells were washed with PBS to remove non-internalized parasites and then either fixed (0 h) or re-incubated in RPMI at 37°C for 6, 12, 24, and 48 h (for BMDM and human macrophages) and for 6, 24, and 48 h (for dendritic cells). After the specified incubation period, coverslips were fixed using 4% paraformaldehyde, washed, and mounted using the ProLong Gold Antifade kit with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Life Technologies). The number of intracellular parasites was determined by counting the total macrophages and the total intracellular parasites per microscopic field using a fluorescence microscope. At least 400 host cells, in triplicate, were analyzed for each time point.

2.8 Migration assay

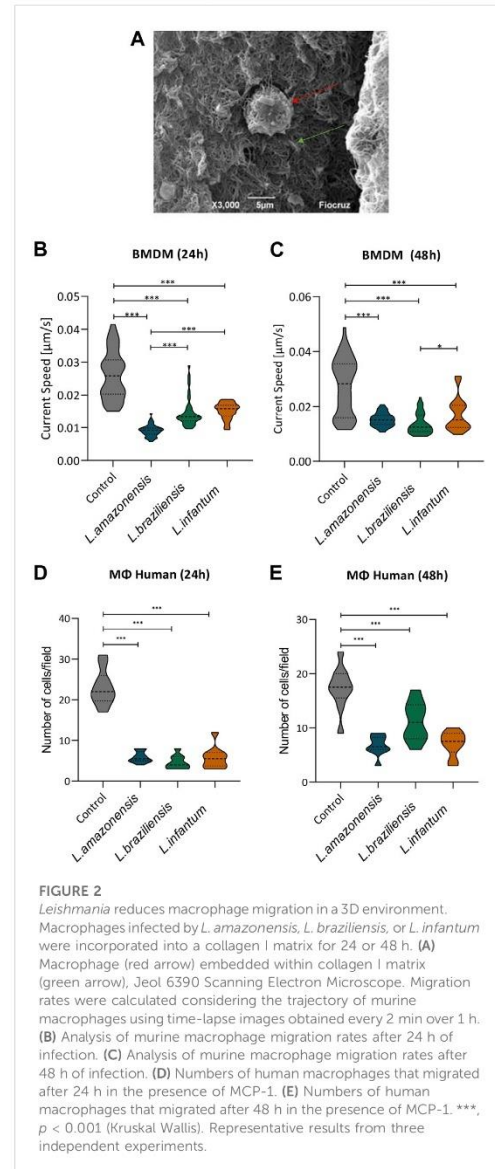
BMDM, human macrophages, and dendritic cells were infected as previously described and then washed to remove non-internalized parasites. Following the infection period, BMDM (5×10^4 /well) were incorporated into a collagen I matrix (Gibco) and plated on 96-well plates for matrix polymerization. The matrices were then incubated for 24 or 48 h at 37°C. Time-lapse evaluations were then performed using an Operetta High-Content Analysis System (PerkinElmer, Waltham, MA, United States) at this timepoints, with image acquisition performed every 2 min for a period of 1 h to analyze cell migration rates. For human macrophages and human dendritic cells (5×10^4), a chemotaxis assay was performed in Boyden chambers containing polycarbonate membranes (24-well, 5 µm pores, Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts). Each 3D collagen I matrix containing human macrophages or dendritic cells



was incubated for 24 or 48 h. After this incubation period, the matrices were then placed within a Transwell insert, and allowed to migrate for an additional 4 h toward RPMI containing 100 ng/mL MCP1 (Monocyte chemoattractant protein-1) for macrophages and 300 ng/mL CCL3 (C-C motif ligand 3) for dendritic cells. Next, the matrix was removed, and membranes were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, washed again with PBS and incubated with 10 mg/mL DAPI for nuclear staining. The upper side of the filter was scraped to remove any residual non-migrating cells. Cells in 10 random fields from each membrane were counted using a fluorescence microscope.

2.9 Immunofluorescence assay

Following migration, 3D collagen I matrices containing BMDM, human macrophages or human dendritic cells infected or not with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, or *L. infantum*, were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde for 15 min and washed five times in PBS. The matrices were then quenched for 20 min with 15 mM NH_4Cl and washed five times with PBS, incubated in a pre-blocking solution (2% (v/v) bovine



serum albumin (BSA) in 1% glycine) for 1 h, washed five times with PBS, permeabilized with 0.15% (v/v) Triton X-100/PBS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States) for 15 min, incubated in a blocking solution (1% BSA in PBS) for 45 min, and then incubated for 1 h with 1:500 rabbit anti-pFAK (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, catalog number RC222574), 1:100 rabbit anti-pPaxillin (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, catalog number QF221230), 1:200 rabbit anti-Rac1 (2.5 ng/mL) (BD Biosciences,

catalog number 610650), 1:100 mouse anti-Cdc42 (1 ng/mL) (Invitrogen, catalog number PA1-092X), 1:100 rabbit anti-RhoA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, catalog number 0SR00266W), mouse anti-Geosolin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma, catalog number G4896) or 1:1200 phalloidin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Invitrogen, catalog number A12379). All antibodies were diluted in 1% (v/v) PBS +1% (v/v) BSA. Subsequently, anti-mouse Alexa fluor 594 (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Molecular Probes, catalog number A1011) or anti-rabbit Alexa fluor 488 (0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Molecular Probes, catalog number A32732) was added and reincubated for 1 h. Cells were mounted using Prolong Gold antifade reagent with DAPI for nuclear staining (Invitrogen). Images were acquired using a Leica TCS SP8 confocal microscope with a 63x/1.4 objective. The Z-stack tool was employed with 0.3 μm intervals. Fiji software was used for digital fluorescence quantification. Maximal projection images were utilized, and the quantification considered the cell area. Several parameters, including Area, Min and Max gray value, integrated density, and mean gray value, were quantified for individual cells. To calculate the corrected total cellular fluorescence (CTCF), the following formula was applied: $\text{CTCF} = \text{integrated density} - (\text{selected cell area} \times \text{mean fluorescence of background readings})$.

2.10 Statistical analysis

All experiments were repeated three times. After verifying data normality using D'Agostino, Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests, the use of parametric or non-parametric tests for data analysis was determined. Parametric data were submitted to ANOVA testing (unpaired), while the Kruskal-Wallis test (unpaired) was used for non-parametric data. All analysis was performed using GraphPad Prism software. Results were considered significant when $p < 0.05$.

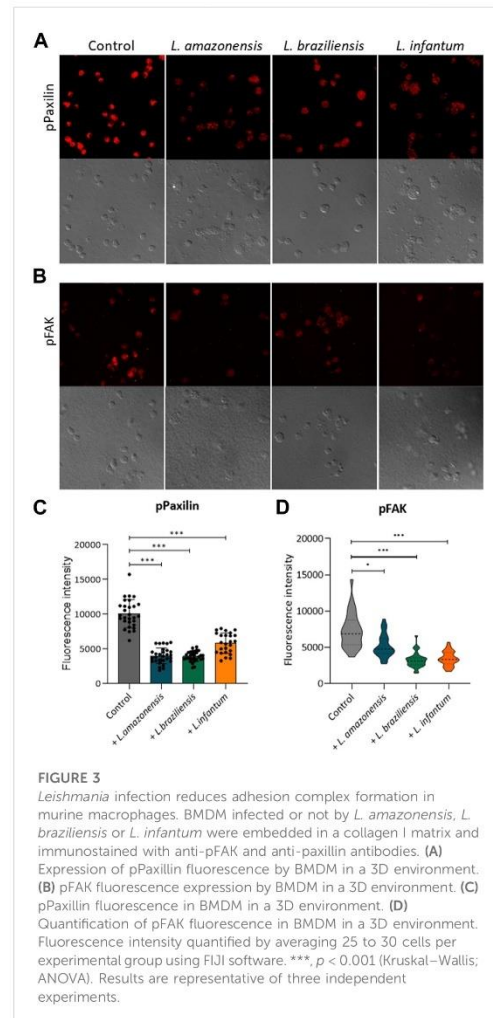
3 Results

3.1 Rates of macrophage infection over time, comparing *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum*

The rates of BMDM infection were compared, considering *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1), and *L. infantum* (20:1), in an attempt to standardize the percentage of macrophages infection between species. Our results indicate that similar rates of infection (70%–80%) were achieved between macrophages infected by *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1), or *L. infantum* (20:1) at 0 h (Figure 1A). Accordingly, the number of *Leishmania* per macrophage was similar, with an average of 4 *Leishmania* per cell (Figure 1B). Similar results were found for human macrophages (Supplementary Figure S1).

3.2 *Leishmania* infection reduces macrophage migration in a 3D environment

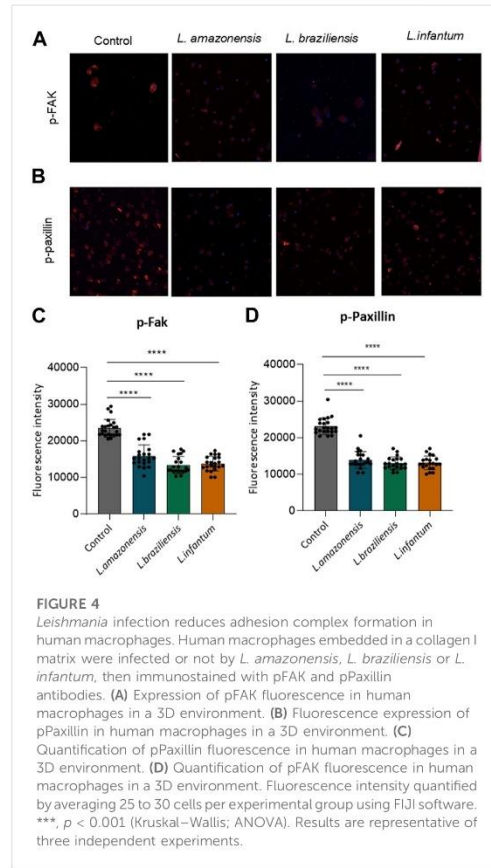
To assess macrophage migration in a 3D environment, we incorporated BMDM into a collagen I matrix (Figure 2A) and allowed cells to migrate for 24 or 48 h. Our results revealed significantly reduced BMDM migration following infection with all *Leishmania* spp. Evaluated compared to uninfected controls at



both 24 (Figure 2B) and 48 h (Figure 2C). To further confirm these findings, we then evaluated human macrophages in migration assays using a transwell system with MCP-1 chemoattractant. These results again indicated a significant reduction in macrophage migration following infection with all three *Leishmania* spp. at both 24 (Figure 2D) and 48 h post-infection (Figure 2E).

3.3 *Leishmania* infection reduces adhesion complex formation within macrophages in a 3D environment

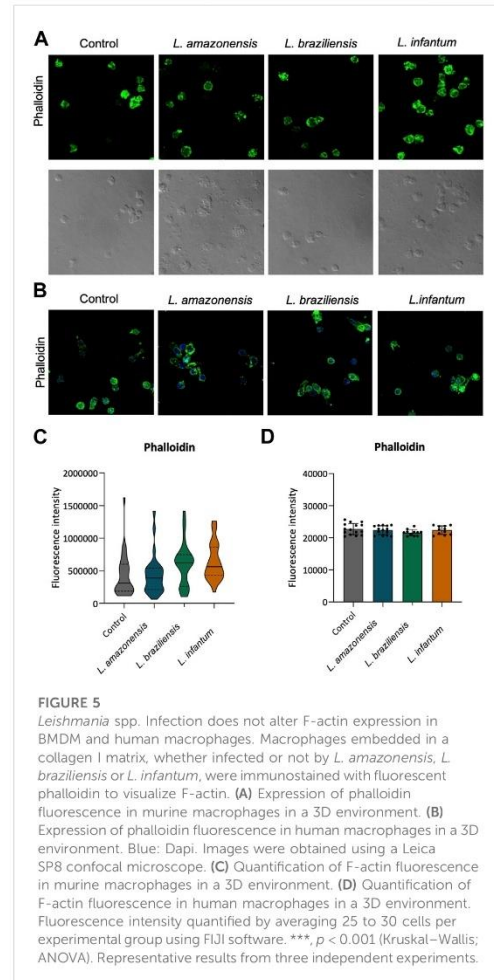
To investigate the mechanisms underlying migration, we analyzed adhesion complex formation using phosphorylated FAK



and paxillin fluorescence expression in murine and human macrophages infected with *Leishmania* in a 3D environment. Our results revealed significant reductions in both phosphorylated FAK and paxillin expression in murine (Figure 3) and human macrophages (Figure 4) infected with all *Leishmania* spp. Evaluated.

3.4 *Leishmania* infection alters actin dynamics in macrophages in a 3D environment

To investigate the role of actin cytoskeleton dynamics with respect to macrophage migration, we evaluated F-actin expression, as well as the expression of Rac1, Cdc42, RhoA, and gelsolin, in a 3D environment. Our findings indicated no differences in F-actin expression in BMDM (Figures 5A,C) or human macrophages (Figures 5B,D) infected with any of the three *Leishmania* spp. Evaluated. By contrast, murine macrophages exhibited increased Rac-1 expression after infection with *L. braziliensis* and



L. infantum (Figures 6A,E), while *L. amazonensis* infection was found to increase Cdc42 expression (Figures 6B,F). Additionally, infection with *L. amazonensis* or *L. braziliensis* led to reduced RhoA and gelsolin expression in BMDM (Figures 6C,D,G,H). Similarly, in human macrophages, infection with *L. amazonensis*, *L. braziliensis* or *L. infantum* resulted in reduced Rac1, Cdc42, and RhoA expression in a 3D environment compared to uninfected controls (Figure 7).

3.5 Rates of dendritic cell infection over time, comparing *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. infantum*

Human dendritic cell infection rates were compared following infection by *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1) or *L.*

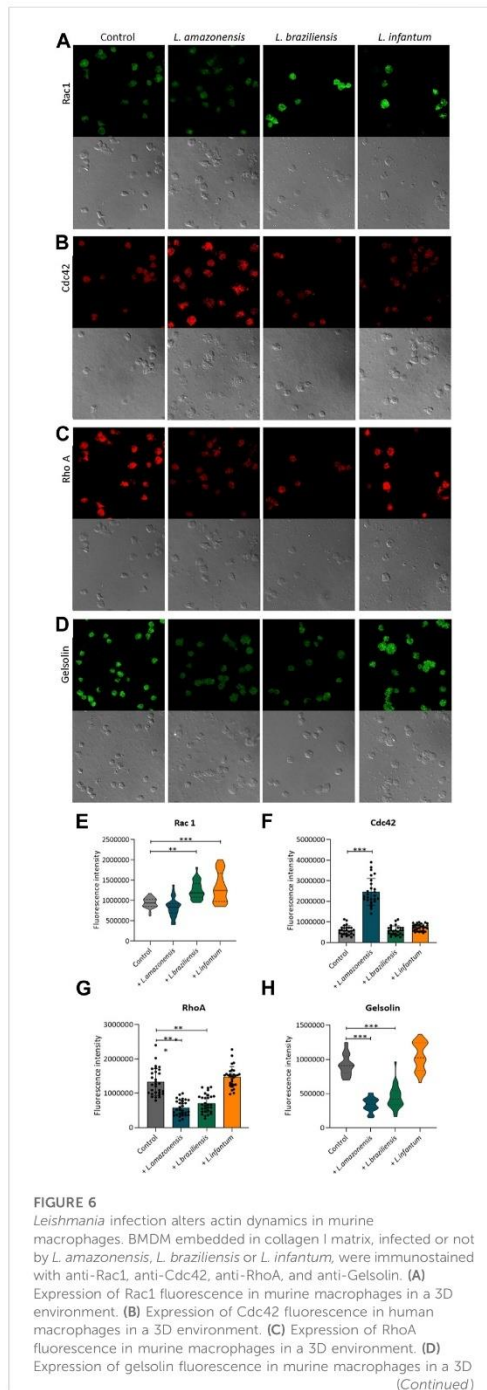


FIGURE 6 (Continued)

environment. Images obtained using a Leica SP8 confocal microscope. (E) Quantification of Rac1 (E), Cdc42 (F), RhoA (G) and Gelsolin (H) fluorescence in murine macrophages in a 3D environment. Fluorescence intensity quantified by averaging 25 to 30 cells per experimental group using Fiji software. ***, $p < 0.001$ (Kruskal–Wallis; ANOVA). Representative results from three independent experiments.

infantum (20:1). Our results indicate that similar rates of infection (60%) were achieved between human dendritic cells infected by *L. amazonensis* (10:1), *L. braziliensis* (10:1) or *L. infantum* (20:1) at 0 h (Figure 8A). Furthermore, the number of *Leishmania* per cell was similar, on average 2 parasites per cell (Figure 8B).

3.6 *Leishmania infantum* induces dendritic cell migration in a 3D environment

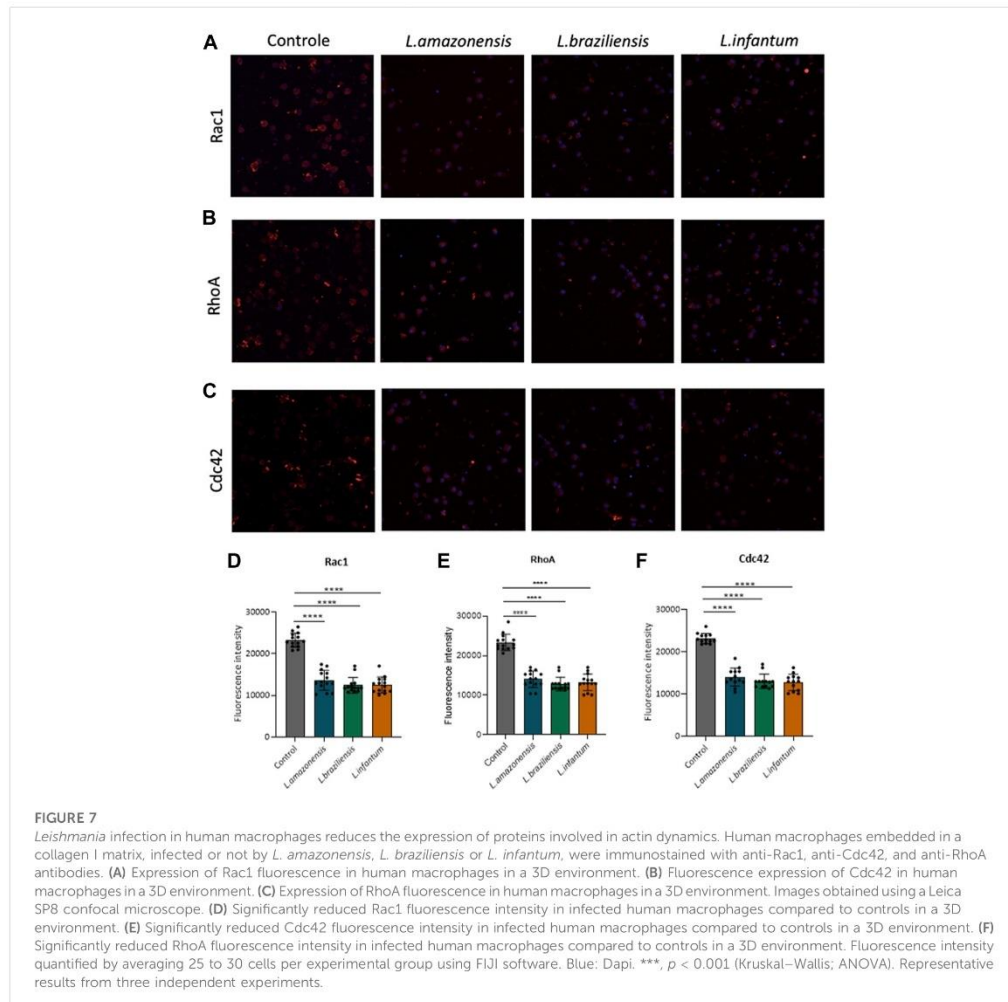
To assess dendritic cell migration in a 3D environment, these cells were incorporated into a collagen I matrix and allowed to migrate for 24 or 48 h in migration assays using a transwell system. Our results revealed significantly enhanced dendritic cell migration following infection with *L. infantum* compared to *L. amazonensis* and *L. braziliensis*-infected cells, as well as uninfected controls, at both 24 (Figure 9A) and 48 h (Figure 9B). Additionally, infection with *L. braziliensis* led to reduced dendritic cell migration at both 24 (Figure 9A) and 48 h (Figure 9B).

3.7 *Leishmania infantum* induces adhesion complex formation within dendritic cells in a 3D environment

To investigate the mechanisms underlying dendritic cell migration, we evaluated adhesion complex formation in human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* in a 3D environment by analyzing the expression of FAK and paxillin. Our fluorescence data analysis revealed significant increases in both FAK and paxillin in *L. infantum*-infected dendritic cells compared to uninfected controls. Additionally, a significant decrease in the expression of these proteins was noted in dendritic cells infected by either *L. braziliensis* or *L. amazonensis* compared to controls (Figures 10A–D).

3.8 *Leishmania infantum* alters actin dynamics in dendritic cells in a 3D environment

We assessed the expression of F-actin, Rac1, Cdc42, RhoA, and gelsolin in a 3D environment to study the participation of actin cytoskeleton dynamics in dendritic cell migration. Our results showed no differences in F-actin expression between human dendritic cells infected with either of the three *Leishmania* spp. Evaluated (Figures 11A,B). However, infection with *L.*



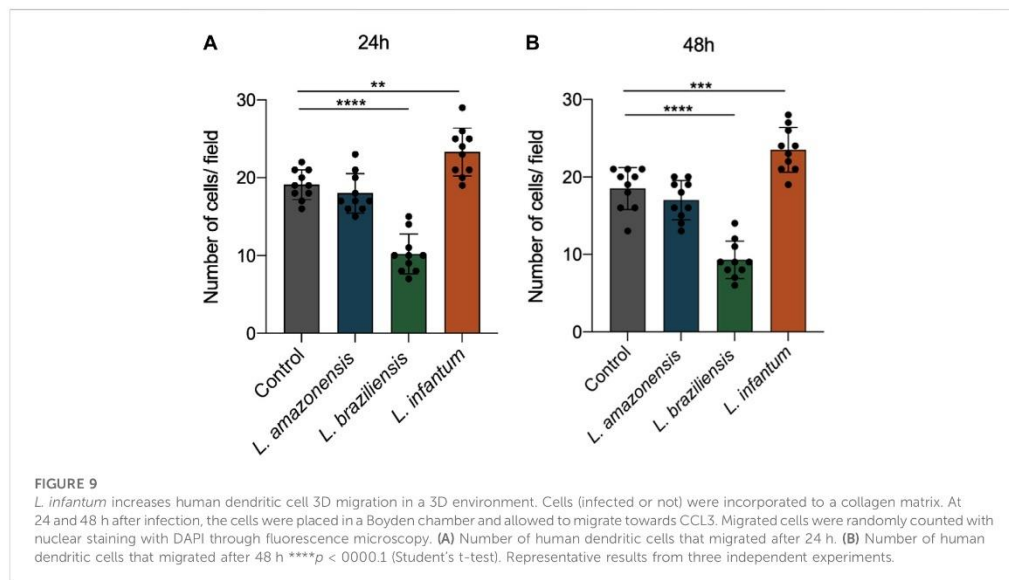
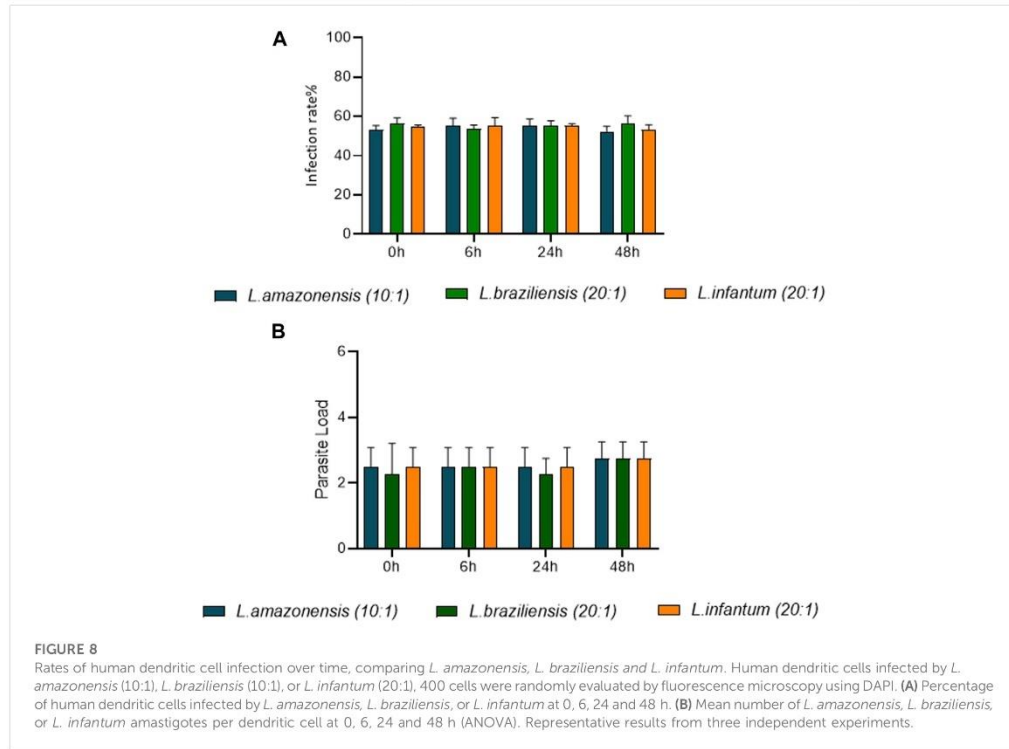
infantum, but not with *L. amazonensis* or *L. braziliensis*, led to increased Rac1, Cdc42, and RhoA expression compared to uninfected controls in a 3D environment (Figures 11C–F).

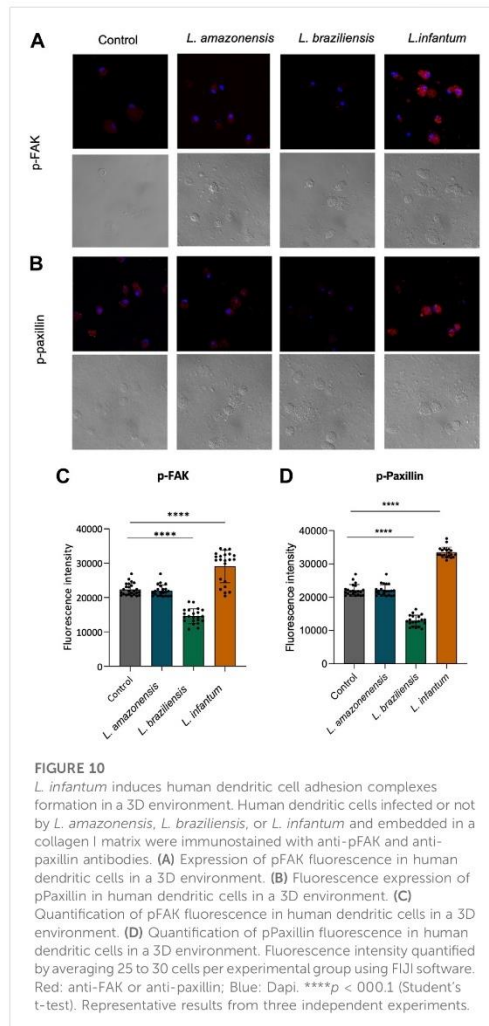
4 Discussion

The dissemination of *Leishmania* within the host subsequent to infection can result in a diverse range of clinical manifestations, varying from spontaneously healing skin ulcers to widespread lesions or disfiguring mucosal lesions; in extreme cases, visceral leishmaniasis can be lethal. The present study demonstrated that infection by three different species of *Leishmania* resulted in reduced macrophage migration in a 3D environment. In contrast, our results

demonstrated that *L. infantum* infection resulted in increased dendritic cell migration, while *L. braziliensis* infection led to reduced dendritic cell migration. However, infection with *L. amazonensis* did not significantly affect cell migration compared to uninfected controls. Our findings, which show that *L. infantum* infection can potentially enhance the migratory capacity of dendritic cells from the site of infection, are consistent with the visceral form of the disease associated with this parasite species. Moreover, the observed changes were associated with marked differences in adhesion complex formation and actin dynamics in infected macrophages and dendritic cells.

Previous studies have shown that *Leishmania* infection inhibits the macrophage's ability to adhere to different substrates, such as collagen, laminin, and fibronectin (Carvalho et al., 2004; Pinheiro et al., 2006). It has also been demonstrated that infection with *L.*



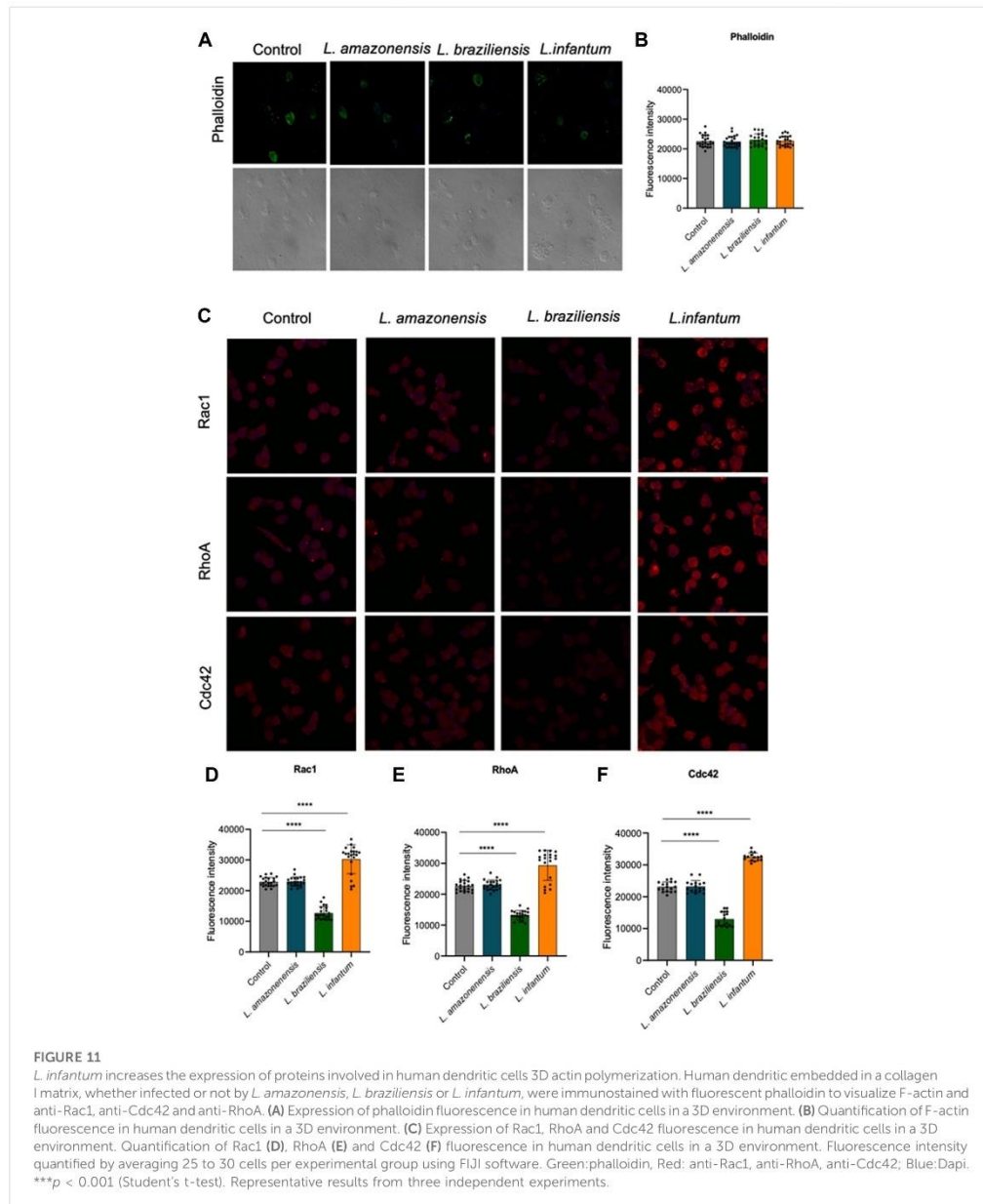


amazonensis leads to a reduction in macrophage migration in a two-dimensional environment (Blewett et al., 1971; Bray et al., 1983; de Menezes et al., 2017). In contrast, studies using *L. infantum* have shown an increase in BMDM migration following infection, via a PI3K-dependent pathway (Rocha et al., 2020). Additionally, studies have demonstrated that, following *Leishmania* infection, dendritic cells are able to migrate to draining lymph nodes, enabling antigen transportation (León et al., 2007; Lai et al., 2008). Furthermore, a recent work published by our group showed that *L. infantum*, but not *L. amazonensis* or *L. braziliensis*, the latter two being localized forms of CL, induces dendritic cell migration in a two-dimensional environment (Rebouças et al., 2021). Alterations in the migration of infected dendritic cells may significantly impact host immune

response to *Leishmania*. This was highlighted by a recent study reporting that *L. amazonensis* infection inhibited the migration of dendritic cells from the site of infection to draining lymph nodes (Hermida et al., 2014). Although numerous reports have investigated leukocyte migration in two-dimensional environments, the study of migration using a 3D matrix has been relatively limited. Given that 3D migration occurs within tissues, *in vitro* models that mimic three-dimensional extracellular environments can provide valuable insight into phagocyte migration. To our knowledge, this is the first study attempting to examine the migration of both *Leishmania*-infected macrophages and dendritic cells in an three-dimensional environment *in vitro* (Ley et al., 2007; Vérollet et al., 2011).

Our results evidenced reduced 3D migration in both murine and human *Leishmania*-infected macrophages, in association with lower FAK and paxillin expression, which stands in agreement with the data obtained from experimentation in a 2D environment by de Menezes et al. (2017). We also identified increased 3D migration of human dendritic cells associated with the expression of the same adhesion complex proteins, which is consistent with data previously published by our group in a 2D environment (Rebouças et al., 2021). The phosphorylation of FAK plays a fundamental role in cell adhesion, since its activation leads to the phosphorylation and the consequent activation of paxillin, a key protein in cellular adhesion and migration (Schaller and Parsons, 1995). Studies using embryonic mouse fibroblasts mutated for FAK, to which paxillin cannot bind, have demonstrated the loss of localization and phosphorylation of FAK in focal adhesion, resulting in altered migration dynamics and inhibited cell adhesion (Deramandt et al., 2014). In a study involving *T. cruzi*, it was observed that this pathogen is capable of increasing FAK activation, thus increasing the incidence of cardiomyopathy as well as suggesting an increase in disease dissemination (Melo et al., 2019).

The actin cytoskeleton is crucial for cell migration, with the Rho GTPase family of proteins playing a key role in the regulation of this dynamic process (Ridley and Hall, 1992). The inhibition of Rho GTPases was shown to provoke deficiencies in cell migration (Sander et al., 1999). Herein we observed increased Rac1 expression in BMDMs infected with *L. braziliensis* and *L. infantum*; by contrast, infection by *L. amazonensis* resulted in increased Cdc42 expression. It is possible that the enhanced expression of these GTPases in macrophages may be associated with increased actin dynamics at the leading edge of murine macrophages. However, we also identified reduced expression of Rac1 and Cdc42 following infection by all three *Leishmania* spp. In human macrophages, which suggests a reduction in actin dynamics at the leading edge of these cells. The alterations in actin dynamics observed in murine macrophages infected by *Leishmania* in a three-dimensional environment corroborate previously published data from experiments conducted in a two-dimensional environment by de Menezes et al. (2017). Additionally, it has been demonstrated that Cdc42 and Rac1 promote actin polymerization through the Arp2/3 complex by activating their effector proteins, N-WASP and WAVE-2, respectively (Spiering and Hodgson, 2011). Inhibition of Cdc42 has also been associated with reduced recruitment and chemotaxis of macrophages during invasion and metastasis (Zhang et al., 2021). Furthermore, a previous study has reported that macrophages deficient in Rac1 lose their ability to invade dense matrix environments such as Matrigel (Wheeler et al., 2006). Moreover, the differences observed in GTPases between murine and human macrophages could be related to the fact that murine



macrophages were stimulated with MCSF during their differentiation (Pixley, 2012). Further studies are required to investigate the state of activation of these GTPases in both cell types. In addition, the present results further identified increased Rac1 and Cdc42 expression in human dendritic cells infected with *L. infantum*, but not *L. amazonensis* or *L.*

braziliensis, which suggests increased F-actin turnover in these cells. This finding is consistent with our previous results conducted in a two-dimensional environment (Rebouças et al., 2021), leading us to speculate that *L. infantum* may facilitate the migration of infected dendritic cells to the draining lymph nodes. Of note, previously

published work was shown to induce dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection, thereby potentiating parasite dissemination (Lambert et al., 2006). In addition, RhoA, a member of the Rho GTPase family, plays a crucial role in regulating cell migration by mediating the formation of stress fibers in the cell body and posterior region (Ridley and Hall, 1992). Previous studies have also shown that RhoA activity is associated with reduced cell protrusion (Nobes and Hall, 1999; Rottner et al., 1999). Additionally, ROCK activation by RhoA can inhibit actin polymerization (Nobes and Hall, 1999). Furthermore, decreased levels of active GTP-bound RhoA in macrophages, caused by increased cholesterol in the cell membrane, hinder cell migration (Nagao et al., 2007). Our findings indicate reduced RhoA expression in murine macrophages infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, as well as in human macrophages infected with all three *Leishmania* spp. Evaluated. This finding provides evidence of the potential suppression of RhoA activity by these *Leishmania* species, which may result in decreased formation of stress fibers and cell protrusion, potentially impairing cell migration. In contrast, we also demonstrated that infection with *L. infantum* led to increased RhoA expression in human dendritic cells, which could favor cell migration. Our study further investigated the expression of gelsolin, an actin-binding protein known to facilitate F-actin breakage (McGough et al., 2003; Silacci et al., 2004; Khaitlina et al., 2013). Previous studies have reported that *Yersinia's* YopO protein can phosphorylate gelsolin, leading to actin binding and separation, which ultimately results in the alteration of actin dynamics in phagocytic cells (Singaravelu et al., 2017). As our study demonstrated a reduction in gelsolin expression in murine macrophages infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, this could lead to decreased F-actin breakage in these cells, which may also be responsible for the reduced migration capacity observed in BMDM.

Taken together, the present study showed that *Leishmania* spp. infection leads to decreased cell migration in both murine and human macrophages, indicating the critical role of these cells in controlling parasites at the lesion site. The present findings also provide evidence of increased human dendritic cell migration following *L. infantum* infection, suggesting a potential association between this cell type and disease visceralization. Elucidating the mechanisms underlying the migration of *Leishmania*-infected cells and their potential role in lesion development and parasite dissemination is crucial to understanding the pathogenesis of leishmaniasis. The findings presented herein serve to expand the base of knowledge on host cell migration during the course of *Leishmania* infection, as well as the consequent dissemination of the parasites within the vertebrate host.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (CEP/FIOCRUZ/BA). Written

informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements. The animal study was reviewed and approved by Institutional Animal Experimentation Review Board (CEUA—FIOCRUZ/BA).

Author contributions

Conceptualization: JdM; methodology: JdM, YL, AR, CB, ER, and TM; formal analysis: YL, AR, CB, ER, BS, and JdM; investigation: YL, AR, CB, and JdM; resources: JdM, WdS, PV, CB, and BS; writing original draft preparation: YL, AR, CB, and JdM; writing review and editing: BS, CB, PV, WdS, and JdM; supervision: JdM; project administration: JdM, funding acquisition: JdM. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was funded by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa Inova Fiocruz. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Claudio Pereira Figueira for technical support in confocal microscopy imaging. Finally, we would like to thank Andris K. Walter for critical analysis, English language revision, and manuscript copyediting assistance.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1206049/full#supplementary-material>

References

- Afrin, F., Khan, I., and Hemeg, H. A. (2019). Leishmania-host interactions-an epigenetic paradigm. *Front. Immunol.* 10, 492. doi:10.3389/fimmu.2019.00492
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7 (5), e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Ashford, R. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30 (12–13), 1269–1281. doi:10.1016/s0020-7519(00)00136-3
- Ato, M., Stäger, S., Engwerda, C. R., and Kaye, P. M. (2002). Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat. Immunol.* 3 (12), 1185–1191. doi:10.1038/ni861
- Blewett, T. M., Kadivar, D. M., and Soulsby, E. J. (1971). Cutaneous leishmaniasis in the Guinea pig. Delayed-type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20 (4), 546–551. doi:10.4269/ajtmh.1971.20.546
- Bray, R. S., Heikal, B., Kaye, P. M., and Bray, M. A. (1983). The effect of parasitization by *Leishmania mexicana mexicana* on macrophage function *in vitro*. *Acta Trop.* 40 (1), 29–38.
- Carvalho, D. G. F., Barbosa, A., D'El-Rei Hermida, M., Clarencio, J., Pinheiro, N. F., Veras, P. S. T., et al. (2004). The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion *in vitro*: Application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp. Parasitol.* 107 (3–4), 189–199. doi:10.1016/j.exppara.2004.06.003
- Cruz, K. P., Patrício, B. F. C., Pires, V. C., Amorim, M. F., Pinho, A. G. S. F., Quadros, H. C., et al. (2021). Development and characterization of PLGA nanoparticles containing 17-DMAG, an Hsp90 inhibitor. *Front. Chem.* 9, 644827. doi:10.3389/fchem.2021.644827
- de Menezes, J. P. B., Koushik, A., Das, S., Guven, C., Siegel, A., Laranjeira-Silva, M. F., et al. (2017). Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. *Cell Microbiol.* 19 (3), e12668. doi:10.1111/cmi.12668
- DeMali, K. A., and Burridge, K. (2003). Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J. Cell Sci.* 116, 2389–2397. doi:10.1242/jcs.00605
- Deramaut, T. B., Dujardin, D., Noulet, F., Martin, S., Vauchelles, R., Takeda, K., et al. (2014). Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. *PLoS One* 9 (3), e92059. doi:10.1371/journal.pone.0092059
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (5), 305–318. doi:10.1016/j.cimid.2004.03.004
- Friedl, P., and Wolf, K. (2010). Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19. doi:10.1083/jcb.200909003
- Gardel, M. L., Schneider, I. C., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036
- Hermida, M. D. R., Doria, P. G., Taguchi, A. M. P., Mengel, J. O., and dos-Santos, W. L. C. (2014). Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infect. Dis.* 14 (1), 450. doi:10.1186/1471-2334-14-450
- Huttenlocher, A., and Horwitz, A. R. (2011). Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (9), 0050744–a5116. doi:10.1101/cshperspect.a005074
- Huveneers, S., and Danen, E. H. J. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and rho. *J. Cell Sci.* 122, 1059–1069. doi:10.1242/jcs.039446
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9 (8), 604–615. doi:10.1038/nrmicro2608
- Khaitlina, S., Fitz, H., and Hinssen, H. (2013). The interaction of gelsolin with tropomyosin modulates actin dynamics. *FEBS J.* 280 (18), 4600–4611. doi:10.1111/febs.12431
- Lai, G. N., Hsu, A., Mandell, M. A., Roediger, B., Hoeller, C., Mrass, P., et al. (2008). Migratory dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 4 (11), e1000222. doi:10.1371/journal.ppat.1000222
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., and Barragan, A. (2006). Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol.* 8 (10), 1611–1623. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00735.x
- León, B., López-Bravo, M., and Ardavin, C. (2007). Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* 26 (4), 519–531. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.017
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689. doi:10.1038/nri2156
- Liarte, D. B., Mendonça, I. L., Luz, F. C., Abreu, E. A., Mello, G. W., Farias, T. J., et al. (2001). QBC for the diagnosis of human and canine American visceral leishmaniasis: Preliminary data. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34 (6), 577–581. doi:10.1590/s0037-86822001000600013
- López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., and Paxillin, L. E. (2017). Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *J. Hematol. Oncol.* 10, 50. doi:10.1186/s13045-017-0418-y
- McGough, A. M., Staiger, C. J., Min, J. K., and Simonetti, K. D. (2003). The gelsolin family of actin regulatory proteins: Modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.* 552, 75–81. doi:10.1016/s0014-5793(03)00932-3
- Melo, T. G., Adesse, D., Meirles, M. de N., and Pereira, M. C. S. (2019). *Trypanosoma cruzi* down-regulates mechanosensitive proteins in cardiomyocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114, e180593. doi:10.1590/0074-02760180593
- Mitra, S. K., and Schlaepfer, D. D. (2006). Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516–523. doi:10.1016/j.ccb.2006.08.011
- Nagao, T., Qin, C., Grosheva, I., Maxfield, F. R., and Pierini, L. M. (2007). Elevated cholesterol levels in the plasma membranes of macrophages inhibit migration by disrupting RhoA regulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (7), 1596–1602. doi:10.1161/ATVBAHA.107.145086
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144 (6), 1235–1244. doi:10.1083/jcb.144.6.1235
- Pinheiro, N. F., Hermida, M. D. R., Macedo, M. P., Mengel, J., Bafica, A., and Dos-Santos, W. L. C. (2006). Leishmania infection impairs β 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 74 (7), 3912–3921. doi:10.1128/IAI.02103-05
- Pixley, F. J. (2012). Macrophage migration and its regulation by CSF-1. *Int. J. Cell Biol.* 2012, 501962. doi:10.1155/2012/501962
- Playford, M. P., and Schaller, M. D. (2004). The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 23, 7928–7946. doi:10.1038/sj.onc.1208080
- Podinovskaia, M., and Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 10 (1), 111–129. doi:10.2217/fmb.14.103
- Rebouças, A., Silva, T. S., Medina, L. S., Paredes, B. D., Araújo, L. S., Souza, B. S. F., et al. (2021). Leishmania-induced dendritic cell migration and its potential contribution to parasite dissemination. *Microorganisms* 9 (6), 1268. doi:10.3390/microorganisms9061268
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70 (3), 389–399. doi:10.1016/0092-8674(92)90163-7
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., et al. (2003). Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709. doi:10.1126/science.1092053
- Rocha, M. I., Dias, F., Resende, M., Sousa, M., Duarte, M., Tomás, A. M., et al. (2020). *Leishmania infantum* enhances migration of macrophages via a phosphoinositide 3-kinase γ -dependent pathway. *ACS Infect. Dis.* 6 (7), 1643–1649. doi:10.1021/acinfed.0c00080
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9 (12), 640–648. doi:10.1016/s0960-9822(99)80286-3
- Sander, E. E., Ten Klooster, J. P., Van Delft, S., Van Der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: Reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J. Cell Biol.* 147 (5), 1009–1022. doi:10.1083/jcb.147.5.1009
- Schaller, M. D., and Parsons, J. T. (1995). pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell Biol.* 15 (5), 2635–2645. doi:10.1128/MCB.15.5.2635
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., and Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem. Soc. Symp.* 65, 233–243.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., and Hayoz, D. (2004). Gelsolin superfamily proteins: Key regulators of cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2614–2623. doi:10.1007/s00018-004-4225-6
- Singaravelu, P., Lee, W. L., Wee, S., Ghoshdastider, U., Ding, K., Gunaratne, J., et al. (2017). Yersinia effector protein (YopO)-mediated phosphorylation of host gelsolin causes calcium-independent activation leading to disruption of actin dynamics. *J. Biol. Chem.* 292 (19), 8092–8100. doi:10.1074/jbc.M116.757971
- Spiering, D., and Hodgson, L. (2011). Dynamics of the rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adhesion Migr.* 5, 170–180. doi:10.4161/cam.5.2.14403
- Toutant, M., Costa, A., Studler, J.-M., Kadaré, G., Carnaud, M., and Girault, J.-A. (2002). Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 22 (22), 7731–7743. doi:10.1128/MCB.22.22.7731-7743.2002
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat. Cell Biol.* 2, E231–E236. doi:10.1038/35046659
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I., and Le Cabec, V. (2010). Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human

- macrophages: Differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol.* 184 (2), 1049–1061. doi:10.4049/jimmunol.0902223
- Veras, P., and Bezerra de Menezes, J. (2016). Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (8), 1270. doi:10.3390/ijms17081270
- Vérollet, C., Charrière, G. M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., and Maridonneau-Parini, I. (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: Losing grip for a breakthrough. *Eur. J. Immunol.* 41 (10), 2805–2813. doi:10.1002/eji.201141538
- Wheeler, A. P., Wells, C. M., Smith, S. D., Vega, F. M., Henderson, R. B., Tybulewicz, V. L., et al. (2006). Rac1 and Rac2 regulate macrophage morphology but are not essential for migration. *J. Cell Sci.* 119 (13), 2749–2757. doi:10.1242/jcs.03024
- Wiesner, C., Le-Cabec, V., El Azzouzi, K., Maridonneau-Parini, I., and Linder, S. (2014). Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. *Cell Adhesion Migr.* 8, 179–191. doi:10.4161/cam.28116
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., and Geiger, B. (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 416–420. doi:10.1042/BST0320416
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 114 (20), 3583–3590. doi:10.1242/jcs.114.20.3583
- Zhang, B., Zhang, J., Xia, L., Luo, J., Zhang, L., Xu, Y., et al. (2021). Inhibition of CDC42 reduces macrophage recruitment and suppresses lung tumorigenesis *in vivo*. *J. Recept Signal Transduct. Res.* 41 (5), 504–510. doi:10.1080/10799893.2020.1828916

5 HIPÓTESE DO CAPÍTULO 2

A infecção por *L. braziliensis* induz a produção de mediadores inflamatórios que são capazes de alterar a regulação e a diferenciação de células na medula óssea de camundongos, de forma que, em camundongos infectados *in vivo*, a migração de BMM Φ é alterada.

5.1 Objetivo do capítulo 2

5.1.1 Objetivo geral do capítulo 2

Caracterizar as alterações de BMM Φ infectados por *L. braziliensis* e seu papel na modulação da migração.

5.1.2 Objetivos específicos do capítulo 2

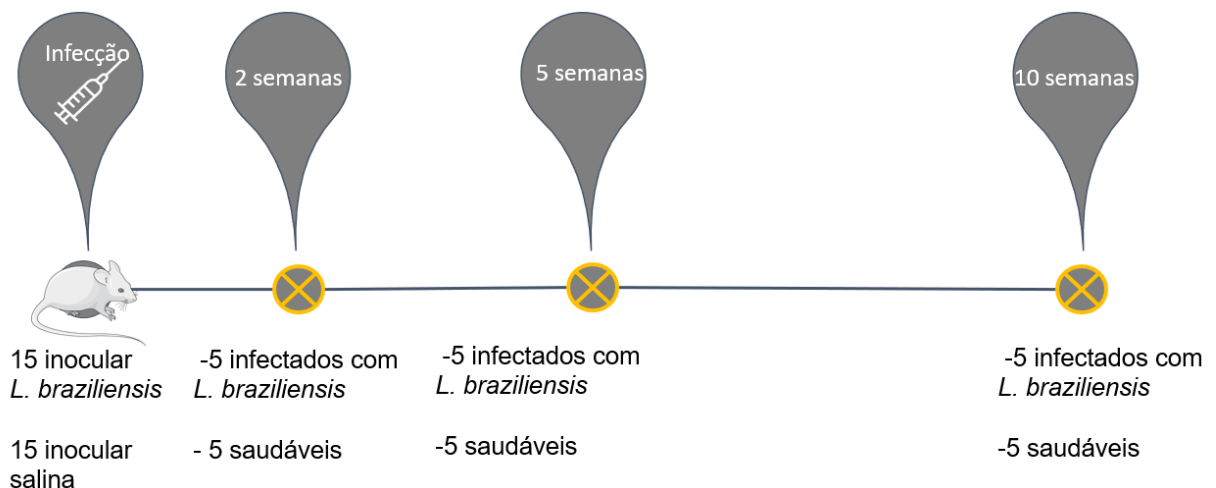
- Avaliar a migração de BMM Φ de camundongos infectados por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional e tridimensional;
- Avaliar a adesão de BMM Φ de camundongos infectados por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional e tridimensional;
- Investigar a organização dos filamentos de actina em BMM Φ de camundongos infectados por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional e tridimensional;
- Avaliar a formação de podossomos em BMM Φ de camundongos infectados com *L. braziliensis* em ambiente bidimensional e tridimensional;
- Avaliar o papel de proteases na migração de BMM Φ de camundongos infectados com *L. braziliensis* em ambiente tridimensional;
- Determinar as diferenças na expressão de proteínas de BMM Φ de camundongos infectados por *L. braziliensis* e camundongos saudáveis por análise proteômica.

6 MATERIAIS E MÉTODOS DO CAPÍTULO 2

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem Balb/c machos ou fêmeas, com 6 a 8 semanas de idade, obtidos e mantidos no Biotério do IGM, aprovados no protocolo do CEUA-IGM (Comissão Ética no Uso de Animais) 002/2021. Os animais foram infectados com 10^5 *L. braziliensis* na orelha, randomizados e divididos em 3 grupos: início do aparecimento da lesão (2 semanas após a infecção), pico da infecção (5 semanas após a infecção) e cura espontânea (10 semana após a infecção) (Oliveira; Barral, 2005). Nesses pontos os animais foram eutanasiados com um grupo controle para realização dos ensaios seguintes (Figura 6).

Figura 6 - Desenho experimental e pontos de eutanásia. Inicialmente 15 animais foram inoculados na orelha esquerda com 10^5 parasitos de *Leishmania braziliensis* e 15 animais foram inoculados com salina para controle. O primeiro ponto de sacrifício foi na segunda semana de infecção, na qual ocorre o início do aparecimento de lesões no local. Nesse ponto foram eutanasiados 5 animais infectados e 5 animais controle. O segundo ponto de sacrifício foi na quinta semana, período em que há o pico de infecção nesses animais. Assim como no ponto anterior, foram eutanasiados 5 animais infectados e 5 animais controle. O terceiro e último ponto foi na décima semana após a recuperação da lesão das orelhas dos animais e foram eutanasiados 5 animais infectados e 5 animais controle.



Fonte: Autora

6.2 Cultivo de células L929

Células de linhagem fibroblástica tumorgênico de camundongos L929, foram cultivadas para obtenção de M-CSF (do inglês, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*), em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio RPMI completo [RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10

% de Soro Bovino Fetal (Gibco), 1 % de glutamina (Sigma), 1 % de ciprofloxacino, 5 % de 36 bicarbonato de sódio (Sigma) e 2 % de HEPES (Sigma)] em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. Em seguida, essas células foram incubadas com 4 mL de Tripsina-EDTA a 0,05% (Gibco) durante 5 minutos, para que soltassem da garrafa, e foram então centrifugadas a 300 Xg por 10 min a 4 °C. Posteriormente, as células foram ressuspensas e plaqueadas na concentração de 5x10⁵ em garrafas de 75 cm² com 20 mL de meio RPMI completo por 7 dias. Após este período, o sobrenadante contendo M-CSF foi coletado, centrifugado a 300 Xg por 10 min a 4 °C para remoção de células, filtrado em sistema de filtração de 0,22 µm, aliquoteado e mantido a -20 °C para posterior diferenciação de células precursoras presentes na medula óssea em macrófagos.

6.3 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ)

Células precursoras de macrófagos presentes na medula óssea, foram obtidas por lavagem da cavidade do fêmur e da tíbia de camundongos da linhagem Balb/c com meio RPMI completo [meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 20 % de SBF inativado (Gibco), 200 mM glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma)] utilizando uma agulha 15 Gauge e centrifugadas a 300 Xg por 5 min a 4°C. Após a centrifugação, o sedimento celular foi ressuspensado e desfeito utilizando agulha de 20-21 Gauge e as células foram mantidas em placas de Petri 90 x 15 mm com meio RPMI completo em estufa a 37 °C e 5 % CO₂ *overnight*.

Macrófagos residentes da medula foram eliminados por adesão à placa de Petri e as células precursoras de macrófagos, presentes no sobrenadante da cultura foram coletadas. O sobrenadante foi, em seguida, centrifugado e o *pellet* ressuspensado em meio RPMI completo contendo 30 % de sobrenadante de célula L929. No 3º ou 4º dia do cultivo, a cultura celular foi suplementada com meio RPMI contendo 30 % de sobrenadante de L929. Após 7 dias de diferenciação, os macrófagos de medula óssea, BMMΦ (do inglês, *Bone marrow macrophages*), aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) contendo 1 mM de EDTA, centrifugados 300xg, 10 min à 4 °C, ressuspensos em meio RPMI completo e contados em câmara de Neubauer para uso posterior nos diversos ensaios.

6.4 Cultivo de parasitos de *leishmania*

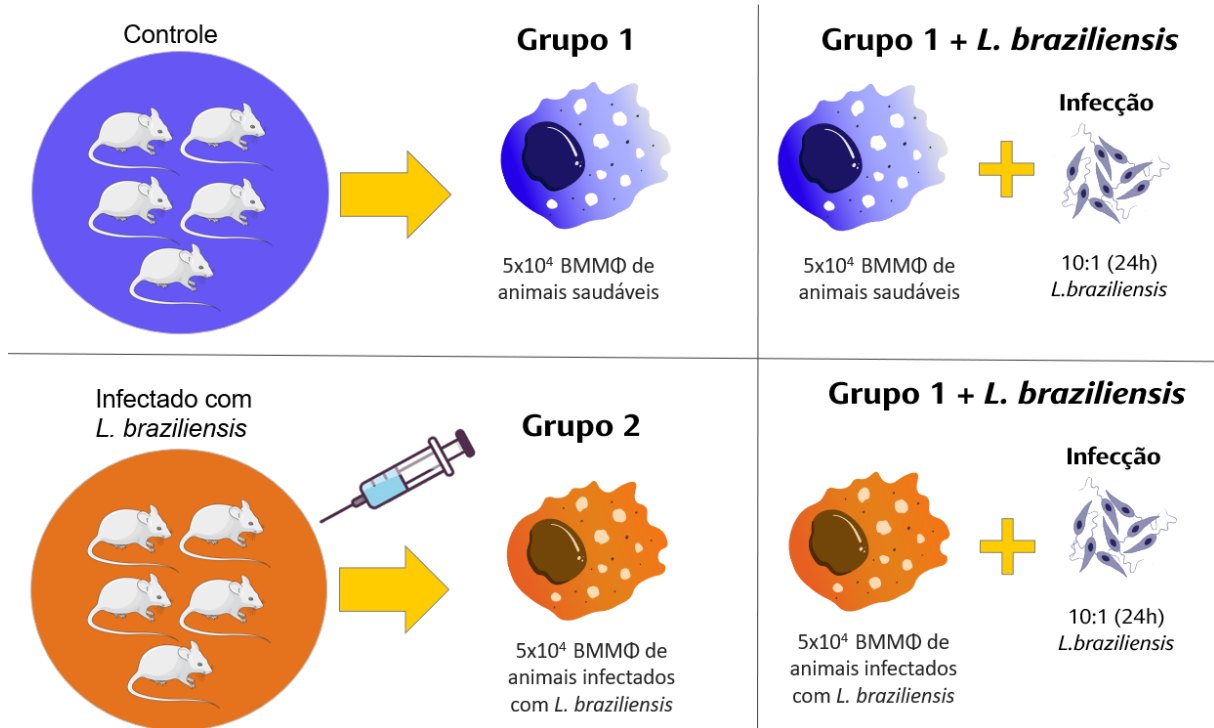
Foram utilizadas promastigotas de *L. braziliensis*, cepa MHOM/BR/01/BA788 (Cadastro A872CFF no SisGen). Os parasitos foram mantidos em meio ágar-sangue NNN (*Novy-Nicolle-MacNeal*) com 5 mL de meio Schneider completo, suplementado com 20% de SBF e mantidos em estufa B.O.D. (do inglês, *Biochemical Oxygen Demand*) a 24 °C. O cultivo das promastigotas de *L. braziliensis* foi realizado em 5 mL de meio Schneider completo (*Schneider's Insect Medium* contendo 20 % de SBF inativado e antibiótico gentamicina na concentração de 50 µg/ml). Os parasitos foram mantidos em garrafas de cultura de 25 cm² em estufa B.O.D. à 24°C. Para acompanhamento do crescimento das culturas, o número de parasitos foi quantificado diariamente, utilizando a câmara de Neubauer, até atingirem a fase estacionária de crescimento para realizar a infecção.

Para manutenção da cepa de *L. braziliensis* foram utilizados camundongos BALB/c. Os animais foram inoculados na palma da pata inferior com 5×10^6 promastigotas em fase estacionária de *L. braziliensis* em um volume total de 20 µL de salina estéril. Trinta dias após a infecção, estes camundongos foram eutanasiados e seus linfonodos drenantes removidos e macerados em meio Schneider, permitindo a liberação das formas amastigotas do parasito.

6.5 Infecção dos macrófagos

Após a diferenciação, os BMMΦ foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços na concentração 2×10^5 por poço (para imunofluorescência 2D e para avaliação do percentual de infecção), em tubos não aderentes na concentração de 5×10^5 em 2 mL de meio RPMI completo (para os ensaios de migração 2D e 3D), em placa de 6 poços na concentração de 2×10^6 (para os extratos para proteômica e luminex), ou em placas de petri na concentração de 10^7 (para confecção posterior das matrizes de colágeno). Após 24 h corridas do plaqueamento, foi realizada a infecção por *L. braziliensis*, na proporção 10 parasitos por célula por um período de 24 h. Conforme os grupos identificados abaixo (Figura 7).

Figura 7 - Esquema dos grupos experimentais: Os macrófagos utilizados nos experimentos tiveram origem de medula óssea de animais infectados por *L. braziliensis* ou de animais controle inoculados com salina. O grupo 1 (G1) é formado por BMMΦ de animal saudável apenas, o grupo 1 + *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) são BMMΦ de animal saudável submetidos a infecção na proporção de 10:1 por *L. braziliensis*. O grupo 2 (G2) é formado por BMMΦ de animais infectados por *L. braziliensis in vivo*, o grupo 2 + *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) são BMMΦ de animais infectados submetidos a infecção *in vitro* na proporção de 10:1 por *L. braziliensis*.



Fonte: Autora

6.6 Percentual de infecção

Após a diferenciação, os BMMΦ foram plaqueados sobre lamínulas em placas de 24 poços na concentração 2×10^5 por poço. Após 24 h corridas do plaqueamento, foi realizada a infecção por *L. braziliensis* (na proporção 10:1) por um período de 24 h. Decorrido os tempos de infecção, todos os poços foram lavados com salina e, em seguida, fixados utilizando paraformaldeído 4 % (PFA 4%). Para a marcação dos núcleos, as células foram montadas com kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen, ref: P36931). Por fim, foram contadas 400 células por grupo, no microscópio de fluorescência Olympus BX51 para determinação do percentual de infecção e número de parasitos por célula. Todos os grupos foram feitos em triplicata e os experimentos foram repetidos 3 vezes.

6.7 Confeção das matrizes tridimensionais

A matriz fibrilar de colágeno tipo I foi preparada na concentração de 2 mg/mL [Collagen I (Gibco, Ref: A10483-01) com 10% PBS 10X, 0,26 % NaOH 1N e ddH₂O (Farmace)]. Durante seu preparo, ainda com a matriz fluida, foram acrescentados 10⁵ macrófagos infectados ou não, conforme os grupos identificados anteriormente. As matrizes foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24h, permitindo assim adesão e migração das células a matriz, para posterior fixação com PFA 4 %.

6.8 Avaliação de migração de BMMΦ em ambiente bidimensional e tridimensional

Após a infecção dos macrófagos conforme os grupos já mencionados anteriormente, 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h ou 72 h de incubação, foram colocadas em um sistema de migração transwell na concentração de 2x10⁵, para a migração 2D. Adicionalmente, para a migração 3D, os macrófagos infectados ou não, foram incorporados na matriz de colágeno I, ainda fluída, na concentração de 2x10⁵ células por poço, e colocadas em um sistema de migração transwell. Para os ensaios de migração no sistema transwell, tanto no modelo 2D como no 3D, foram acrescentados de MCP-1 (ReD systems, Cat 479-JE) na concentração 0,01% no poço inferior como quimioatratador de macrófagos. As células foram deixadas por 4 h para migrar no sistema transwell a 37 °C e 5 % de CO₂. Após esse período, os grupos foram fixados com PFA 4 %. Para quantificar as células que migraram através da transwell, as membranas da transwell foram montados com kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen, ref: P36931), para coloração do núcleo da célula e da *Leishmania*. Em seguida, a análise da migração foi realizada pela contagem do núcleo de células que atravessaram a membrana do inserto da transwell, utilizando o microscópio de fluorescência Olympus BX51.

6.9 Imunomarcção para proteínas do complexo de adesão, organização de actina e formação de podossomos

BMMΦ de camundongos infectados por *L. braziliensis* foram plaqueados em lamínulas (2D) ou em matriz extracelular (3D) e, após 24 h de infecção por *L. braziliensis*, foram fixados com paraformaldeído a 4 %.

Para a imunomarcção 2D, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e foi adicionado NH₄Cl (50 mM) sob agitação por 20 minutos adicionais. Em seguida, as células

foram lavadas 3 vezes com PBS 1X por 5 minutos e permeabilizadas com PBS-Saponina 0,15 % sob agitação por 15 min. Após o período de permeabilização, foi feito o bloqueio com PBS-Saponina 0,15 %/BSA 3 % por 1 h. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-Saponina 0,15 % e incubadas com os anticorpos primários descritos na tabela 1 por 1 h. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, Ref: A11011) ou anti-IgG de rato conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, Ref: A32723), ambos na proporção de 1:500 diluídos por no mínimo 30 minutos. Em paralelo, a marcação da actina foi feita com faloidina Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat: A12379) na proporção 1:500, por 45 min. Por fim, as células foram lavadas e as lamínulas montadas em lâminas utilizando ProLong™ Gold Antifade Mountant com DAPI (Invitrogen, ref: P36931) para marcação nuclear.

Para a imunomarcacão 3D, as matrizes foram lavadas 5 vezes com PBS 1X e foi adicionado NH_4Cl (15 mM) sob agitação por mais 20 min, lavadas cinco vezes com PBS 1X e incubadas com solução pré-bloqueio (2 % de soro bovino albumina [BSA] em Glicina 1 %) por 30 min. As células foram então lavadas cinco vezes com PBS 1X e permeabilizadas com TRITON – X 100 0,5 % durante 15 min. Após a permeabilização da membrana celular, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com (1 % BSA em PBS) por 1h e 30min. Após este período, as células foram incubadas com os anticorpos primários conforme descrito na tabela 1, diluídos em PBS 1 % BSA, por 1 h a temperatura ambiente. Como controle negativo da reação, um grupo de células foi incubado com IgG de coelho ou rato (10,0 mg/mL) em substituição ao anticorpo primário. Posteriormente, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1X e incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 594 (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, Ref: A11011) ou anti-IgG de rato conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (Invitrogen, Ref: A32723), ambos na proporção de 1:500 diluídos em PBS 0,3 % BSA por 45 min. Em paralelo, a marcação da actina foi feita com faloidina Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Cat: A12379) na proporção 1:500, por 45 min. Por fim, as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1X e as matrizes foram então montadas utilizando o kit ProLong Gold DAPI (Invitrogen, ref: P36931) para marcação nuclear.

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal espectral, modelo TCS SP8 da Leica e as quantificações digitais de fluorescência foram realizadas utilizando o software Fiji, pela quantificação da fluorescência de aproximadamente 50 células por grupo.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nos experimentos

Anticorpos	Marca	Diluição	Referência
anti-FAK (pTyr397)	Invitrogen	1:500	RC222574
anti-paxilina (pTyr118)	Invitrogen	1:100	QF221230
Anti-Rac1	BD	1:100	610650
Anti-Cdc42	Invitrogen	1:200	PA1-092X
Anti-RhoA	Invitrogen	1:200	OSR00266W
Anti-gelsolina	Sigma Aldrich	1:50	G4896
Anti-talina	Sigma Aldrich	1:50	T3287
Anti- vinculina	Sigma Aldrich	1:50	V4505

Fonte: Autora

6.10 Avaliação da secreção de proteases por BMMΦ

Foram realizados imunoenaios baseados na tecnologia Luminex™ xMAP para quantificar as MMPs nas amostras de sobrenadante do cultivo dos BMMΦ de camundongos infectados com *L. braziliensis* ou saudáveis. Para a detecção das metaloproteases, utilizamos o Kit MILLIPLEX MAP Mouse MMP Magnetic Bead Panel 3 (MERCK, cat: MMMP3MAG-79K), capaz de detectar MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 e MMP12.

Os ensaios se baseiam na metodologia “sanduíche” convencional de dois-sítios e foram realizados em placas de 96 poços. Inicialmente, os poços foram lavados com o tampão de lavagem sob agitação por 10 min (20-25 °C) e, em seguida, foram adicionados os padrões e controles conforme cada Kit e nos poços das amostras foi acrescentado o tampão de ensaio. Adicionamos então a solução de matriz em todos os poços. Como as amostras utilizadas eram sobrenadantes, a recomendação é utilização de meio de cultivo como solução matriz, em seguida adicionamos nossas amostras nos poços. Depois, foi adicionado o mix de microesferas acoplado a anticorpos de captura específicos para as metaloproteases ou citocinas específicas, a placa foi selada e coberta com papel alumínio para proteger da luz, e deixada por 2 h em agitação (20-25 °C). Em seguida, a placa foi lavada e incubada sob agitação por 1 h (20-25 °C) com o anticorpo de detecção biotilado para se ligar ao analito específico. Em seguida, foi realizada a incubação com estreptavidinaficoeritrina (SA-PE) por 30 min (20-25 °C), para ampliação do sinal. SA-PE se liga ao anticorpo biotilado e é responsável pela revelação do ensaio, por meio da emissão de sinal fluorescente. As microesferas foram lidas no equipamento Luminex através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas

fluem através do fluxo celular. No Luminex, um feixe de laser detecta a microesfera (o código de cor específico para o ensaio) e o outro laser quantifica o sinal em cada microesfera. Ao passarem pelo fluxo celular Luminex, cada microesfera foi identificada e o sinal SA-PE associado a elas foi quantificado. Os valores dos padrões permitiram a construção de uma curva padrão, a partir da qual foi feita a quantificação das amostras.

6.11 Análise de proteômica

A proteômica foi feita a partir dos extratos proteicos de BMMΦ oriundos de animais saudáveis e de animais infectados por *L. braziliensis*, conforme grupos descritos acima. Para obtenção dos extratos proteicos, foram adicionados tampão de lise (Tris HCl pH 8,8, SDS 10 %, DTT 1 M e água milli-Q), agitado no vórtex por 30 seg, aquecido no banho-maria a 95 °C por 3 min, colocado no banho sonificador por 1 h, centrifugado a 20.000 Xg por 5 minutos a 20 °C, e os sobrenadantes contendo os extratos proteicos coletados e estocados no -80 °C. A concentração de proteínas nos extratos proteicos foi determinada utilizando o BSA Protein Assay kit (Pierce). Em seguida, os extratos proteicos foram degradados com tripsina e os peptídeos obtidos caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema Orbitrap Fusion Lumos / Ultimate 3000 RSLCnano.

Após a entrada da amostra no sistema, é realizada a ionização eletrospray (IE), a amostra líquida passa por um tubo microcapilar e é dispensada no espectrômetro de massas. Uma vez dentro do sistema de vácuo, os íons são guiados e manipulados por campos elétricos. No processo de ionização por eletrospray, os peptídeos tripsínicos geralmente tornam-se duplamente protonados, sendo designados como $(M + 2H)^{2+}$, onde M é a massa do peptídeo e H^+ é a massa de um próton. Assim, como os espectrômetros de massas medem o valor de m/z (massa/carga).

Os espectros de massas foram identificados no programa MaxQuant, versão 2.6.5.0 (Cox; Mann, 2008). Foram realizadas duas buscas, uma incluindo todas as amostras dos 3 tempos analisados e outra somente para os experimentos 1 e 2 da semana 10. O banco de dados usado para a reconstituição das proteínas foi de *Mus musculus*, baixado do Uniprot, contendo 55.286 sequências. Os parâmetros da busca foram: enzima tripsina, busca específica, carbamidometilação fixa em cisteína, oxidação variável em metionina e acetilação N-terminal variável em proteínas. A opção LFQ (*Label-Free Quantification*) foi habilitada nas duas buscas realizadas. A tabela “*protein groups*” gerada pelo MaxQuant foi usada como entrada no programa Perseus, versão 2.1.3.0 (Tyanova *et al.*, 2016.) Os diferentes grupos experimentais

foram avaliados independentemente para cada semana do experimento. Para isso, fez-se a conversão dos valores de LFQ intensity para \log_2 e consideraram-se somente as proteínas com LFQ Intensity em pelo menos duas réplicas biológicas. Aplicou-se o teste estatístico “one-way ANOVA (p -value $< 0,05$), seguido do Post hoc Tukey’s HSD (FDR 0.05) com a indicação dos pares que apresentaram diferença significativa na coluna “*significant pairs*”, para comparar estatisticamente os grupos, foi realizado a transformação das razões normalizadas em \log_2 com o valor hipotético de 0 (representando nenhuma alteração). Proteínas com \log_2 negativo (mudança de dobra) foram reguladas negativamente, enquanto proteínas com \log_2 positivo (mudança de dobra), na comparação entre os grupos avaliados. As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas e analisadas em conjunto (semanas 2, 5 e 10) na plataforma online GSEA-MSigDB (Tamayo, *et al.*, 2005.) considerando FDR $< 0,05$. Foi avaliado o enriquecimento em vias canônicas, *hallmark gene sets* e ontologia gênica.

6.12 Análise estatística

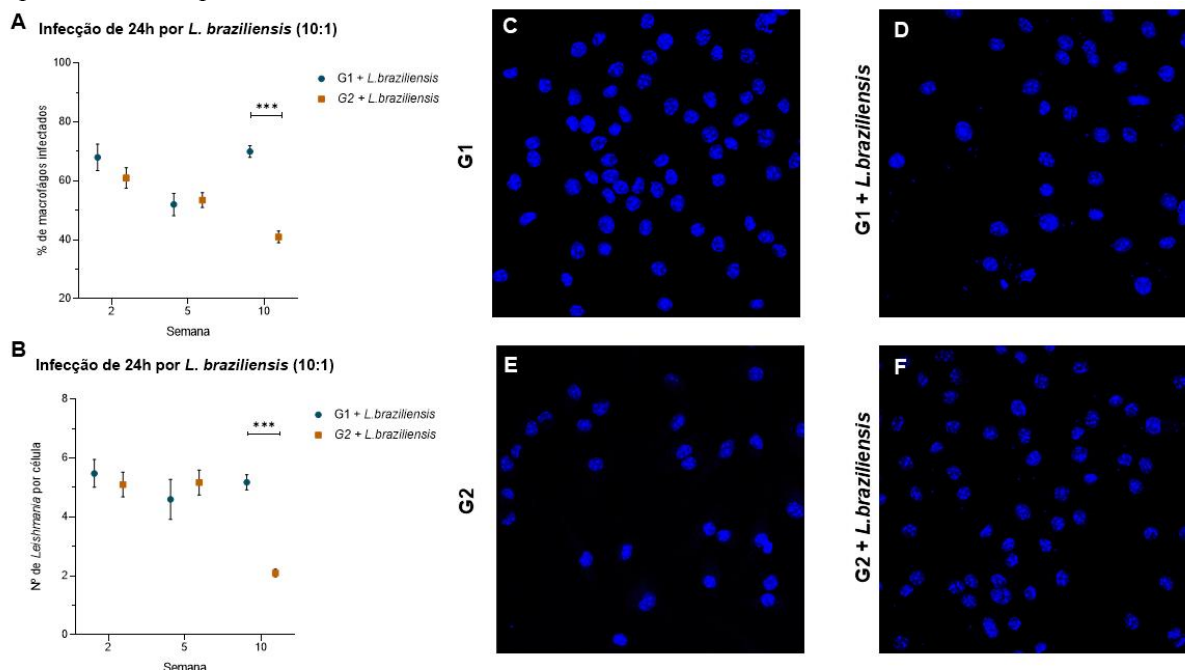
A análise dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, D’Agostino, Kolmogorov-Smirnov e ShapiroWilk para determinação do uso de testes paramétricos ou não paramétricos. Para dados paramétricos, foram utilizados o teste ANOVA (não pareado) e sua representação foi feita em gráficos de barras, destacando média e desvio padrão. Para os não paramétricos, foram utilizados o teste Kruskal-Wallis (não pareado) e sua representação foi feita utilizando gráficos de violinos ou *box plot*, destacando mediana e intervalo interquartil. As diferenças serão consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

7 RESULTADO DO MANUSCRITO 2

7.1 Percentual de infecção de BMMΦ infectados por *L. Braziliensis*

Com o intuito de entender como os BMMΦ de origem de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) respondem a infecção pelo parasito, realizamos o ensaio comparando o percentual de infecção de BMMΦ de animais saudáveis (G1) com os de animais infectados *in vivo* (G2) nos tempos de 2, 5 e 10 semanas após a infecção. Os resultados mostram um percentual equivalente de infecção entre BMMΦ de animais saudáveis (G1 + *L. braziliensis*) quando comparados com os de animais infectados *in vivo* (G2 + *L. braziliensis*), nos tempos de 2 e 5 semanas. Entretanto, foi observado que, no tempo de 10 semanas, os BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2 + *L. braziliensis*) apresentaram uma redução tanto da taxa de infecção como do número de *Leishmania* por célula (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação do percentual de infecção de BMMΦ infectados por *L. braziliensis*. BMMΦ de animais saudáveis (G1) ou que obtidos de animais infectados por *L. braziliensis* (G2), em diferentes semanas, foram plaqueados em lamínulas (2×10^5 /poço) e infectados por *L. braziliensis* na proporção de 10:1 durante 24 h. Um total de 400 células foram avaliadas randomicamente por microscopia de fluorescência através da marcação nuclear por DAPI. (A) Percentual de macrófagos infectados por *L. braziliensis* ao longo do tempo. (B) Média de amastigota de *L. braziliensis* por macrófago, ao longo do tempo. (C) Marcação dos núcleos de macrófagos de animais saudáveis (G1) no tempo de 10 semanas. (D) Marcação dos núcleos de macrófagos de animais saudáveis que foram infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) no tempo de 10 semanas. (E) Marcação dos núcleos de macrófagos de animais infectados (G2) no tempo de 10 semanas. (F) Marcação dos núcleos de macrófagos de animais infectados que foram infectados por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) no tempo de 10 semanas. ***, $p < 0,001$ (Kruskal- Wallis). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

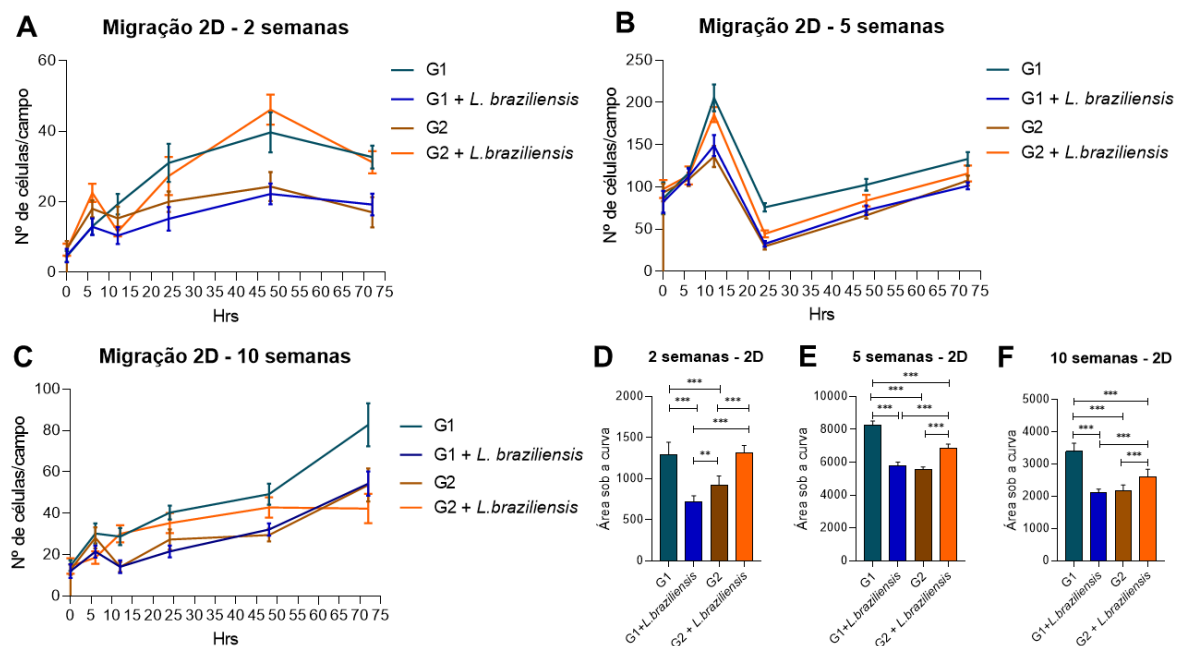


Fonte: Autora

7.2 Avaliação da migração de BMMΦ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente bidimensional

Para comparar a migração de macrófagos provenientes de animais saudáveis (G1) com aqueles de animais infectados (G2), foi realizado um ensaio de migração utilizando placas Transwell. As análises foram conduzidas em ambiente bidimensional nos tempos de 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h após a infecção, nos períodos de 2, 5 e 10 semanas (Figura 9). Os resultados indicam uma redução na migração bidimensional dos BMMΦ provenientes de animais saudáveis após a infecção por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), assim como dos BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2), quando comparados aos BMMΦ de animais saudáveis (G1), em todos os tempos analisados. Além disso, observou-se um aumento na migração bidimensional dos BMMΦ de animais previamente infectados por *L. braziliensis* após a infecção *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), em comparação com os BMMΦ de animais infectados que não foram submetidos à infecção *in vitro* (G2), em todos os tempos avaliados (Figura 9).

Figura 9 - Cinética de migração de BMMΦ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos de animais saudáveis (G1) ou de animais infectados por *L. braziliensis* por 2, 5 ou 10 semanas (G2) foram incubados e expostos à infecção com *L. braziliensis* na proporção de 10:1 por 24 h. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72 h antes de serem submetidas a um ensaio de migração direcional no sistema Transwell. A migração ocorreu por 4 h na presença de MCP-1 como quimioatratante. Após esse período, a membrana do sistema Transwell foi corada com DAPI, e os núcleos das células que migraram foram quantificados por microscopia de fluorescência. (A) Cinética de migração bidimensional no período de 2 semanas. (B) Cinética de migração bidimensional no período de 5 semanas. (C) Cinética de migração bidimensional no período de 10 semanas. (D) Área sob a curva referente a 2 semanas. (E) Área sob a curva referente a 5 semanas. (F) Área sob a curva referente a 10 semanas. ***, $p < 0,001$ (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

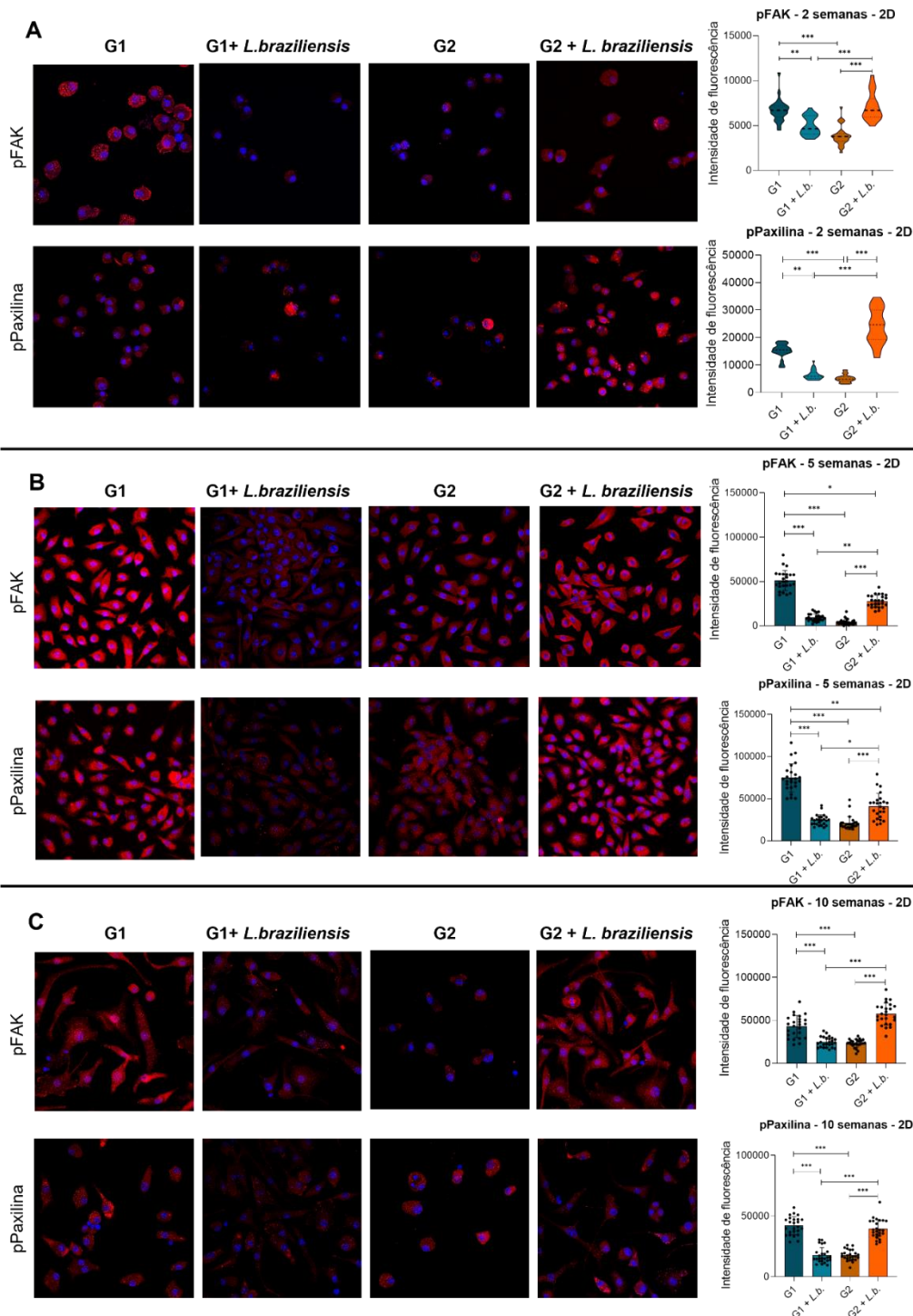


Fonte: Autora

7.3 Avaliação da formação do complexo de adesão em BMMΦ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente bidimensional

Para investigar os mecanismos envolvidos na migração, analisamos a formação de complexos de adesão em BMMΦ provenientes de animais saudáveis (G1) e de animais infectados (G2), por meio da expressão de pFAK e pPaxilina, proteínas essenciais para a adesão celular ao substrato. Os resultados demonstram uma redução na expressão de FAK e paxilina nos macrófagos de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos macrófagos oriundos de animais infectados *in vivo* (G2) nos períodos de 2, 5 e 10 semanas. Além disso, observou-se um aumento na expressão dessas proteínas nos BMMΦ de animais previamente infectados quando submetidos à infecção *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), em comparação com os BMMΦ de animais infectados que não foram infectados *in vitro* (G2) (Figura 10).

Figura 10 - Formação do complexo de adesão em BMMΦ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas e incubados por 24 h. Em seguida, foram infectados ou não com *L. braziliensis* na proporção de 10:1. Após 24 h da infecção, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos anti-pFAK e anti-pPaxilina. (A) Intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 2, obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 5, obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 10, obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. Vermelho: marcação com anti-pFAK ou anti-pPaxilina; Azul: DAPI. ***, $p < 0,001$ (ANOVA ou Kruskal-Wallis). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

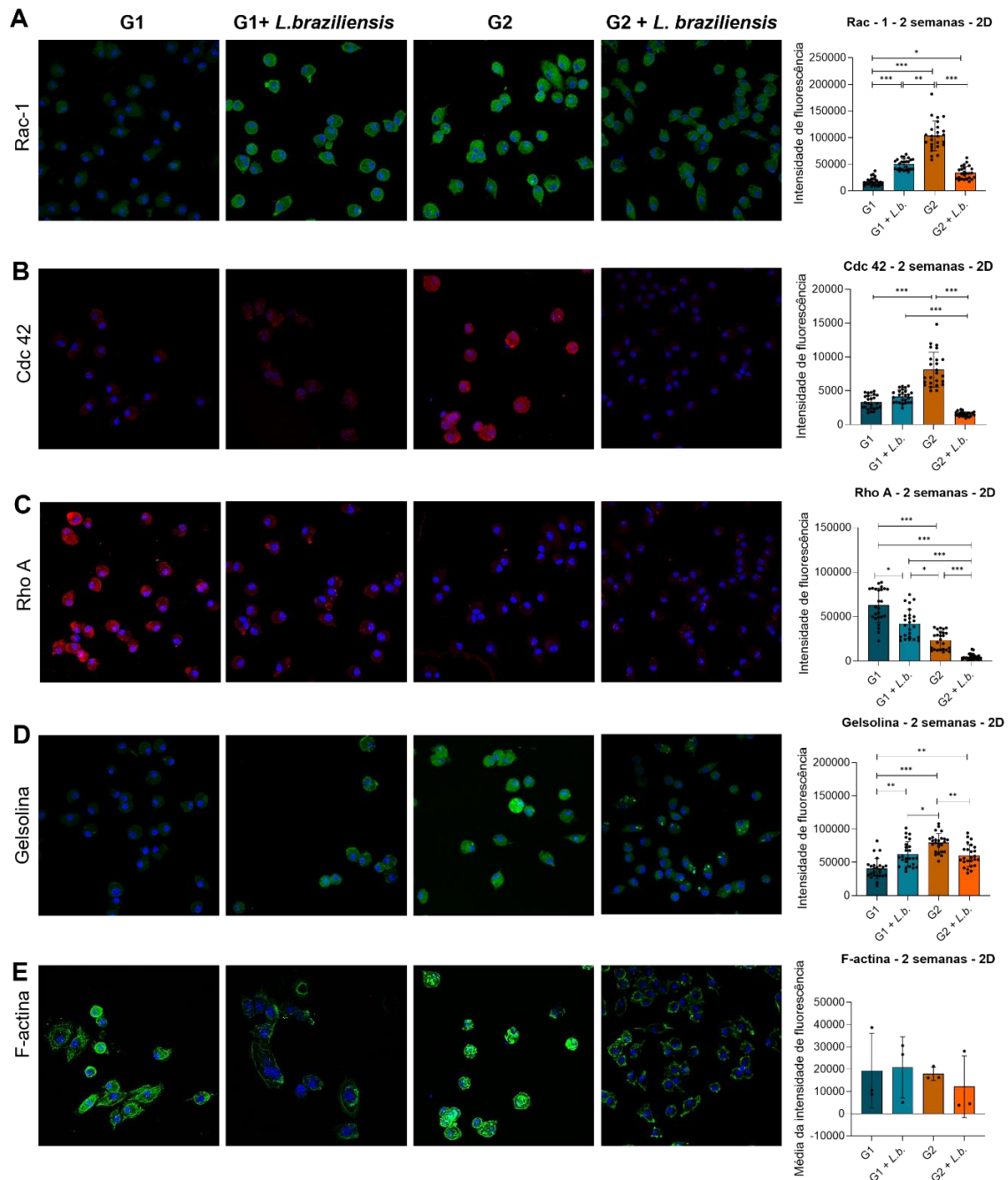


Fonte: Autora

7.4 Avaliação da organização dos filamentos de actina em BMMΦ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente bidimensional

Para compreender os mecanismos envolvidos na dinâmica do citoesqueleto de actina durante a migração, realizamos imunomarcagem para as proteínas Rac1 e Cdc42, associadas à formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente. Além disso, marcamos a proteína RhoA, que desempenha um papel fundamental na contração do citoesqueleto de actina, e a proteína gelsolina, que facilita a clivagem da actina. Adicionalmente, utilizamos faloidina fluorescente, que se liga especificamente à actina filamentosa. Nossos resultados indicam que, no período de 2 semanas, há um aumento da expressão de Rac1 e Cdc42 nos macrófagos oriundos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2) em comparação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). No entanto, quando os BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* são submetidos à infecção *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), observa-se uma redução na expressão de ambas as proteínas em relação ao grupo G2. Além disso, nos BMMΦ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), verificamos um aumento da expressão de Rac1 em comparação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Com relação RhoA, observamos uma redução da expressão desta molécula tanto nos BMMΦ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), quanto nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2), em relação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, foi observado que os BMMΦ de animais infectados por *L. braziliensis*, quando submetidos à infecção *in vitro*, apresentam uma redução na expressão de RhoA em relação ao grupo G2. Quanto à expressão de gelsolina, observamos um aumento da expressão nos BMMΦ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), bem como nos BMMΦ de animais previamente infectados quando submetidos à infecção *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Em relação à marcação com faloidina, os três experimentos conduzidos apresentaram variações nos resultados. Assim, foi calculado a média da intensidade de fluorescência dos experimentos individuais. A análise não mostra diferenças significativas na expressão de F-actina entre os grupos avaliados (Figura 11).

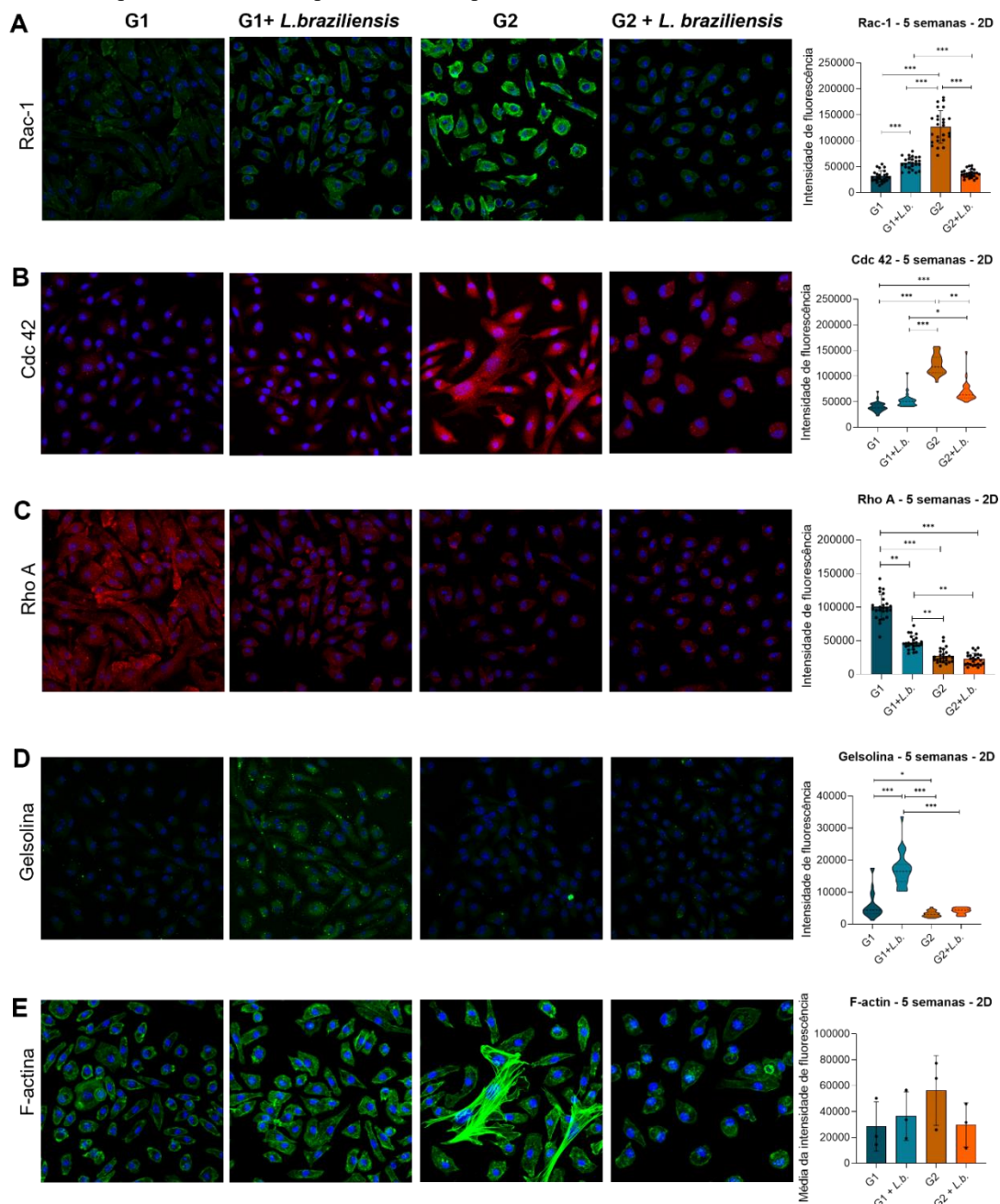
Figura 11 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em laminulas e incubados por 24 horas. Em seguida, foram infectados ou não com *L. braziliensis*. Após 24 horas da infecção, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos anti-Rac1, anti-Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina e com faloidina para marcação da actina filamentosa. (A) Intensidade de fluorescência para anti-Rac1 obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Intensidade de fluorescência para anti-RhoA obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (D) Intensidade de fluorescência para anti-gelsolina obtida por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (E) Intensidade de fluorescência para Faloidina obtida por microscopia confocal Leica SP8, com média da quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji de três experimentos individuais. Vermelho: marcação para anti-Cdc42 ou anti-RhoA; Verde: marcação para anti-Rac1, anti-gelsolina ou Faloidina; Azul: DAPI. ***, $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



Fonte: Autora

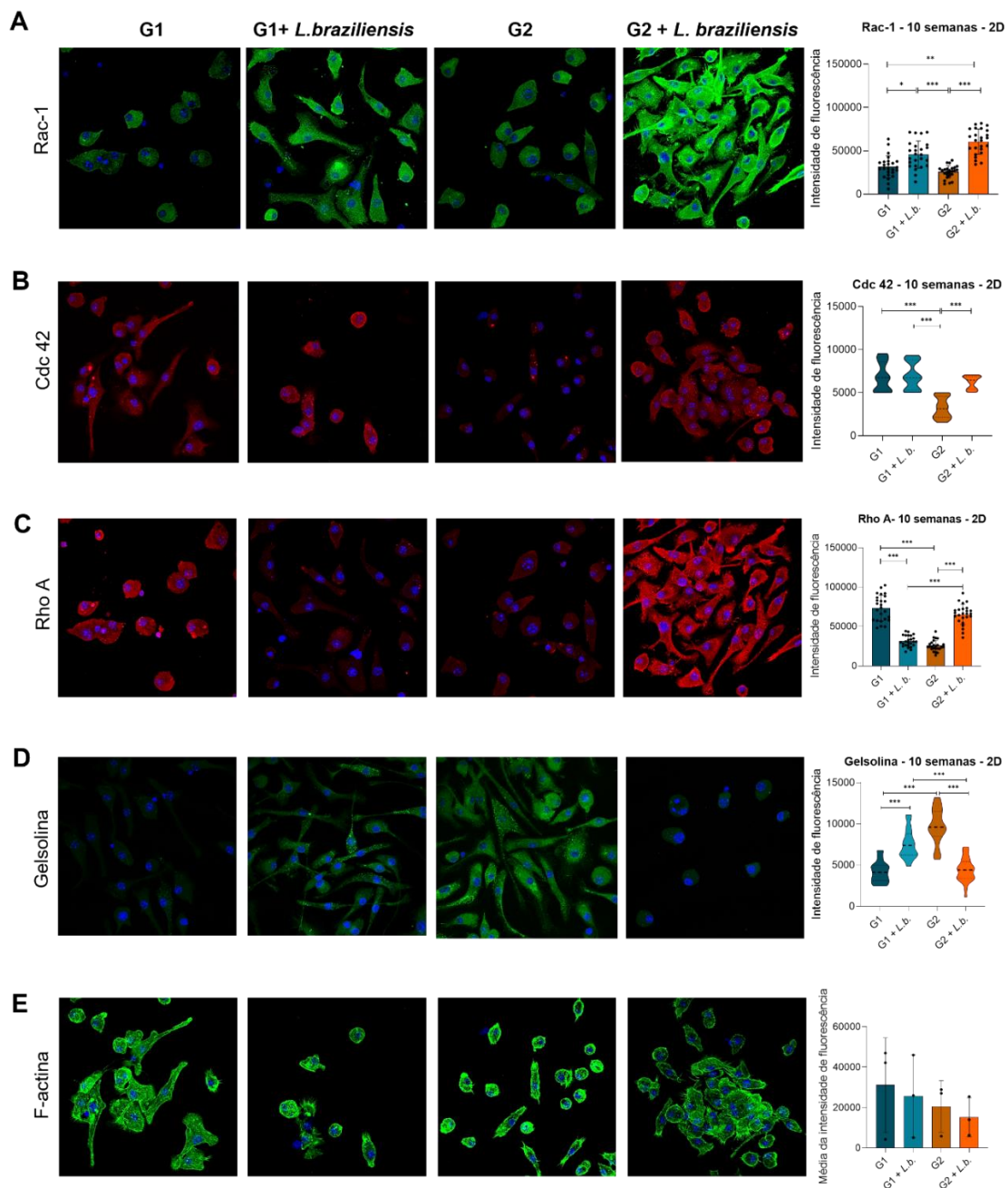
No ponto de 5 semanas, observou-se um aumento na expressão de Rac1 nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. +braziliensis*) e nos BMM Φ provenientes de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Em contrapartida, a expressão de Rac1 foi reduzida nos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* que foram posteriormente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*) em comparação ao grupo G2. Além disso, verificou-se um aumento na expressão de Cdc42 nos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) em relação aos macrófagos de animais saudáveis (G1), em conjunto com a expressão reduzida de Cdc42 nos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* que foram posteriormente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*) em comparação ao grupo G2, de forma semelhante aos observados em Rac1. Quanto à proteína RhoA, houve uma redução da sua expressão nos BMM Φ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2) e nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* que passaram por infecção *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados àqueles do grupo controle de animais saudáveis (G1). Por fim, ao analisar a expressão de gelsolina, observou-se um aumento da expressão nos BMM Φ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) em comparação ao grupo controle (G1). Por outro lado, a expressão de gelsolina foi reduzida nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2) em relação aos macrófagos de origem de animais saudáveis (G1). Quanto à marcação com Faloidina, os três experimentos realizados apresentaram variações nos resultados. Diante disso, foi calculada a média da intensidade de fluorescência dos 3 experimentos independentes, e não foram encontradas diferenças significativas na expressão de F-actina entre os grupos avaliados (Figura 12).

Figura 12 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram cultivados em lamínulas e incubados por 24 horas. Em seguida, foram infectados ou não por *L. braziliensis* e, após 24 horas da infecção, as células foram lavadas e submetidas à marcação com anticorpos anti-Rac1, anti-Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina, além de Faloidina para a marcação da actina filamentosa. (A) Intensidade de fluorescência para anti-Rac1 analisada por microscopia confocal Leica SP8, com quantificação da fluorescência de 50 células utilizando o software Fiji. (B) Intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 analisada por microscopia confocal Leica SP8, com quantificação da fluorescência de 50 células utilizando o software Fiji. (C) Intensidade de fluorescência para anti-RhoA analisada por microscopia confocal Leica SP8, com quantificação da fluorescência de 50 células utilizando o software Fiji. (D) Intensidade de fluorescência para anti-gelsolina analisada por microscopia confocal Leica SP8, com quantificação da fluorescência de 50 células utilizando o software Fiji. (E) Intensidade de fluorescência para Faloidina obtida por microscopia confocal Leica SP8, com média da quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji de três experimentos individuais. As marcações foram distribuídas da seguinte forma: vermelho para anti-Cdc42 ou anti-RhoA, verde para anti-Rac1, anti-gelsolina ou faloidina e azul para DAPI. *** $p < 0,001$ (Kruskal- Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



No ponto de 10 semanas, observou-se um aumento da expressão de Rac1 nos BMM Φ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* e posteriormente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados com o grupo controle de BMM Φ de animais saudáveis (G1). Em relação ao Cdc42, houve uma redução da sua expressão nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2) quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Os resultados também indicaram uma redução da expressão de RhoA nos macrófagos de origem de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), em comparação com o grupo controle de BMM Φ de animais saudáveis (G1). No entanto, os BMM Φ de animais infectados *in vivo* que foram infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) apresentaram um aumento na expressão de RhoA em relação aos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2). Quanto à expressão de gelsolina, observou-se um aumento nos BMM Φ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos macrófagos de origem de animais infectados *in vivo* (G2), quando comparados ao grupo controle de BMM Φ de animais saudáveis (G1). Por fim, em relação à marcação com faloidina, houve variação nos resultados obtidos nos três experimentos realizados. Assim, foi calculada a média da intensidade de fluorescência desses experimentos independentes, não sendo encontradas diferenças significativas na expressão de F-actina entre os grupos analisados. (Figura 13).

Figura 13 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas e incubados por 24 horas. Em seguida, foram infectados ou não por *L. braziliensis*. Após 24 horas de infecção, as células foram lavadas e submetidas à marcação com anticorpos anti-Rac1, anti-Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina e faloidina para marcação de actina filamentosa. (A) Expressão da intensidade de fluorescência para Rac1, analisada por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células utilizando o software Fiji. (B) Expressão da intensidade de fluorescência para Cdc42, analisada por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células utilizando o software Fiji. (C) Expressão da intensidade de fluorescência para RhoA, analisada por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células utilizando o software Fiji. (D) Expressão da intensidade de fluorescência para gelsolina, analisada por microscopia confocal Leica SP8 e quantificada em 50 células utilizando o software Fiji. (E) Intensidade de fluorescência para Faloidina obtida por microscopia confocal Leica SP8, com média da quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji de três experimentos individuais. As marcações foram visualizadas em diferentes canais: vermelho para anti-Cdc42 ou anti-RhoA; verde para anti-Rac1, anti-gelsolina ou Faloidina; e azul para DAPI. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, com nível de significância de $p < 0,001$ (Kruskal-Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.

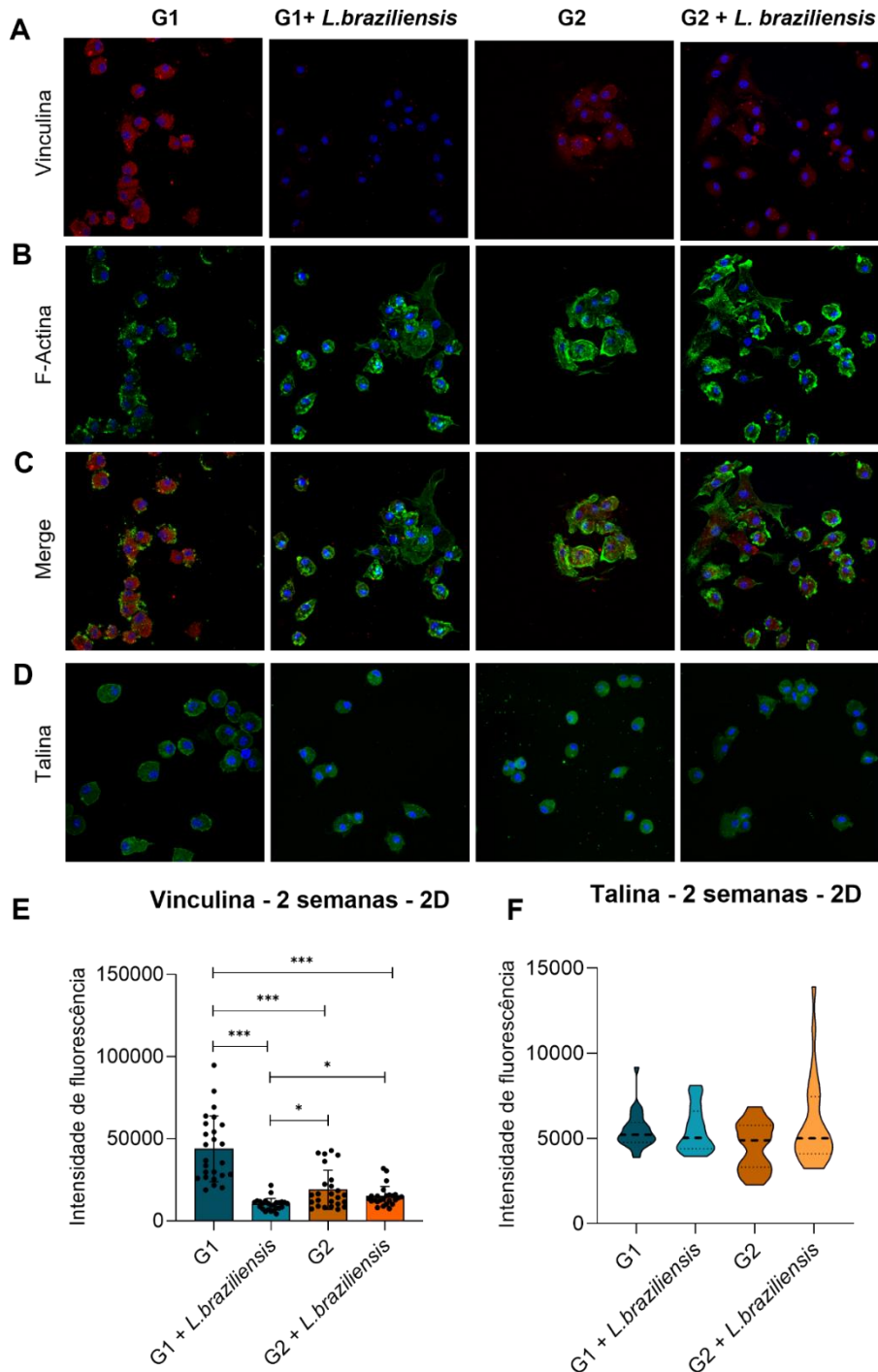


Fonte: Autora

7.5 Avaliação da formação de podossomos em BMM Φ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente bidimensional

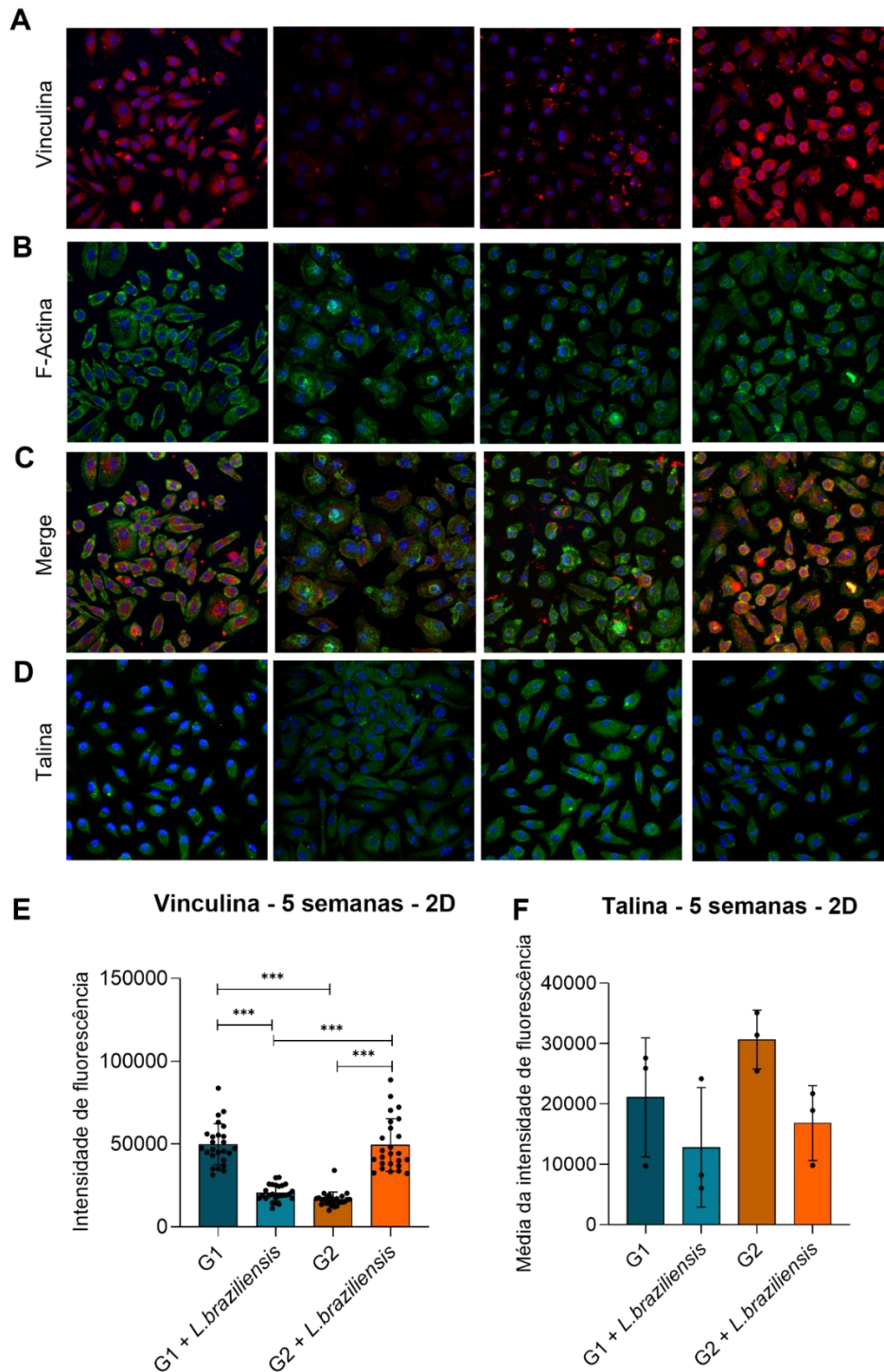
Com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na migração, analisamos a formação de podossomos em BMM Φ provenientes de animais saudáveis (G1) e de animais infectados (G2), por meio da expressão das proteínas vinculina e talina. Os resultados demonstraram uma diminuição na expressão de vinculina nos macrófagos de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), nos macrófagos de animais infectados *in vivo* (G2) e nos macrófagos de animais infectados *in vivo*, submetidos a infecção *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados ao grupo controle de BMM Φ de animais saudáveis (G1), no ponto de 2 semanas. Quanto à marcação para talina, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados nesse mesmo período (Figura 13).

Figura 14 - Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas e, após 24 horas de incubação, foram infectados ou não com *L. braziliensis*. Passadas 24 horas da infecção, as células foram lavadas e submetidas à marcação com anticorpos antivinculina/Faloidina ou anti-talina. (A) Análise da expressão da intensidade de fluorescência de vinculina por microscopia confocal Leica SP8. (B) Expressão de F-actina marcada com Faloidina, visualizada por microscopia confocal Leica SP8. (C) Imagem mesclada (merge) da fluorescência de vinculina e F-actina. (D) Expressão de talina avaliada por microscopia confocal Leica SP8. (E) Quantificação da fluorescência de 50 células marcadas com anti-vinculina utilizando o software Fiji. (F) Quantificação da fluorescência de 50 células marcadas com anti-talina também utilizando o software Fiji. As marcações foram visualizadas com: vermelho para vinculina, verde para talina ou Faloidina, e azul para DAPI. Resultados analisados por teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA, com *** $p < 0,001$. Resultado representativo de 1 experimento para vinculina e de 3 experimentos independentes para talina.



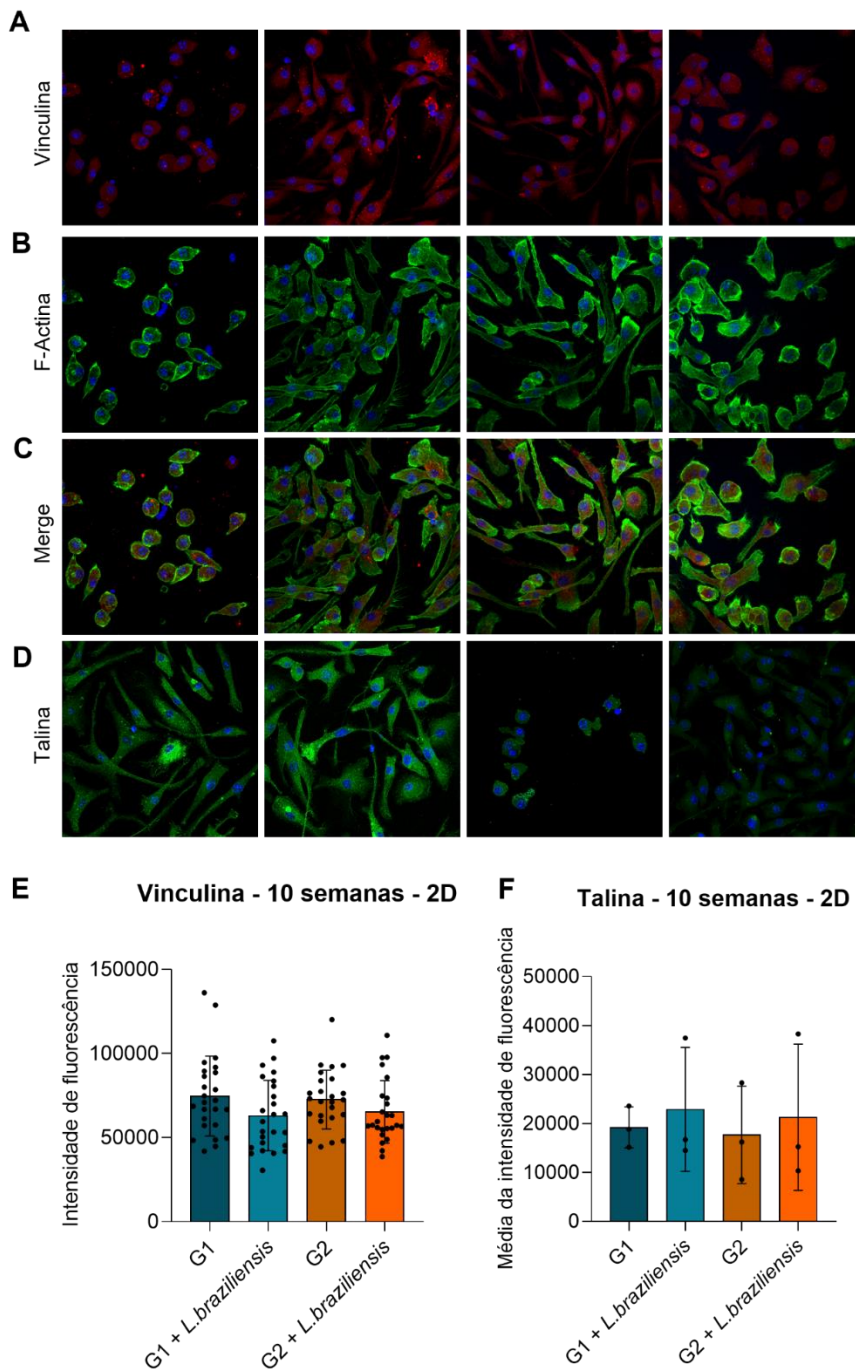
Os resultados obtidos no ponto de 5 semanas demonstram uma redução na expressão de vinculina nos BMM Φ provenientes de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), em comparação com os macrófagos de animais saudáveis não infectados (G1). Além disso, observou-se que os BMM Φ de animais infectados *in vivo*, ao serem infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), apresentaram um aumento na expressão de vinculina em relação aos BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2). No que se refere à expressão de talina, os resultados apresentaram variações nos três experimentos realizados, não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados (Figura 15).

Figura 15 - Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas e, após 24 horas de incubação, infectados ou não com *L. braziliensis*. Decorridas 24 horas da infecção, as células foram lavadas e submetidas à marcação com anticorpos anti-vinculina, anti-talina e faloidina para marcação da actina filamentosa (F-actina). (A) Expressão de vinculina detectada por microscopia confocal (Leica SP8). (B) Expressão de F-actina por Faloidina. (C) Imagem combinada (merge) da marcação de vinculina e F-actina. (D) Expressão de talina. (E) Quantificação da fluorescência de 50 células marcadas com anti-vinculina utilizando o software Fiji. (F) Média da quantificação da fluorescência de 50 células marcadas com anti-talina em três experimentos independentes, utilizando o software Fiji. Vermelho: vinculina; Verde: talina ou Faloidina; Azul: DAPI. *** $p < 0,001$ (teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA). Imagem representativa de um experimento para vinculina e três experimentos para talina.



No ponto de 10 semanas, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de vinculina ou talina entre os grupos analisados. (Figura 16).

Figura 16 - Formação de podossomo em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente bidimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas e, após 24 horas de incubação, foram infectados ou não por *L. braziliensis*. Passadas 24 horas da infecção, as amostras foram lavadas e submetidas à marcação com anticorpo anti-vinculina e Faloidina ou com anticorpo anti-talina. A análise foi realizada por microscopia confocal (Leica SP8), sendo observada: (A) a expressão da intensidade de fluorescência para vinculina; (B) a expressão da intensidade de fluorescência para F-actina; (C) a junção (merge) dos sinais de vinculina e F-actina; (D) a expressão da intensidade de fluorescência para talina. A quantificação da fluorescência foi realizada com o software Fiji em 50 células marcadas com (E) anticorpo anti-vinculina e (F) anticorpo anti-talina, considerando a média de três experimentos independentes para talina. As marcações foram representadas pelas cores: vermelho para vinculina, verde para talina ou Faloidina, e azul para DAPI. Resultados foram analisados estatisticamente por Kruskal-Wallis ou ANOVA, sendo considerado significativo $***p < 0,001$. Os dados apresentados correspondem a um experimento representativo para vinculina e três para talina.

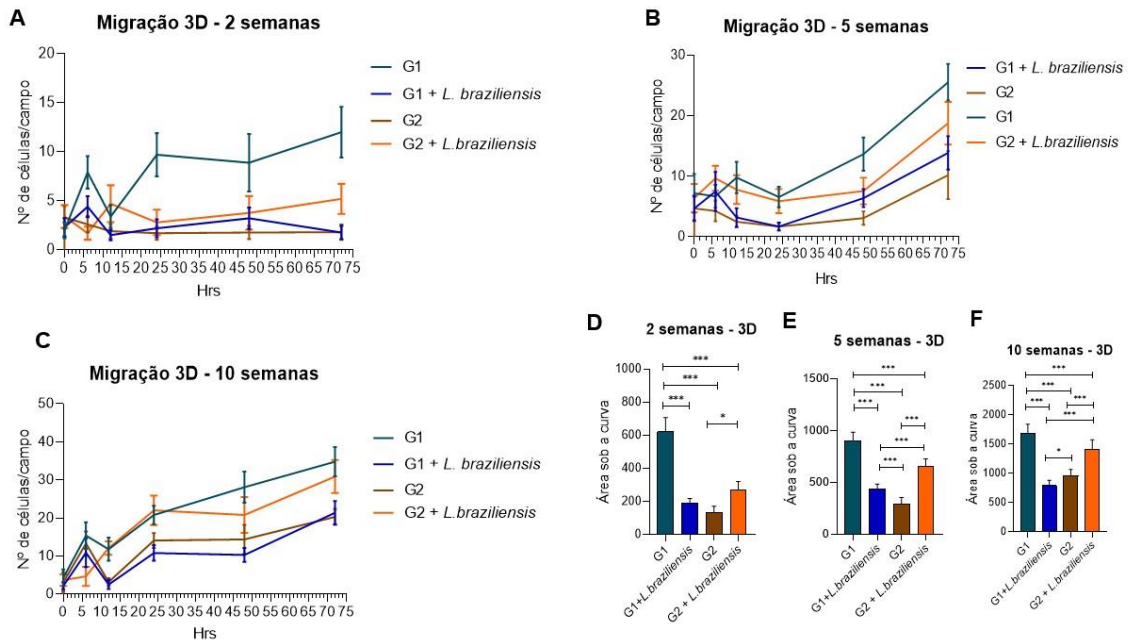


Fonte: Autora

7.6 Avaliação da migração de BMM Φ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente tridimensional

Para avaliar a migração em ambiente tridimensional de macrófagos de origem de animais saudáveis (G1) em comparação com macrófagos de animais infectados (G2), realizamos um ensaio de migração com placas transwell, onde foi colocado as células em uma matriz de colágeno I, construindo assim um ambiente tridimensional para a célula migrar. Essas placas permitem que a célula migre do compartimento superior em direção ao inferior através de um estímulo com quimioatratante, atravessando uma membrana porosa, capaz de reter células aderentes como macrófagos. Foram realizadas cinéticas de migração em ambiente tridimensional nos tempos de 0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h e 72h após a infecção, nos pontos de 2 semanas, 5 semanas e 10 semanas. Observa-se uma redução da migração tridimensional de BMM Φ de origem de animais saudáveis, após a infecção por *L. braziliensis* (G1+ *L. braziliensis*) e dos BMM Φ de animais infectados (G2) quando comparados aos BMM Φ de animais saudáveis (G1), em todos os tempos avaliados. Adicionalmente, observa-se um aumento da migração tridimensional de BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis*, após a infecção *in vitro* (G2+ *L. braziliensis*), quando comparados aos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* que não foram infectados *in vitro* (G2) em todas as semanas avaliadas (Figura 17).

Figura 17 - Cinética de migração de BMMΦ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente tridimensional. Macrófagos de origem de animais saudáveis (G1) ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* (G2) foram incubados e infectados na proporção de 10:1 de *L. braziliensis* por 24h, as células foram então lavadas e incubadas nos tempos de 0h, 6h, 12h, 24h, 48h e 72h, em seguida, foram submetidos a migração direcional em sistema transwell, contendo matriz de colágeno I, na presença de MCP-1 como quimioatratante por 4 horas de migração. Após o tempo decorrido, a membrana do sistema transwell foi corada com DAPI e os núcleos das células que migraram foram quantificados em microscopia de fluorescência. (A) Cinética de migração bidimensional no ponto de 2 semanas. (B) Cinética de migração bidimensional no ponto de 5 semanas. (C) Cinética de migração bidimensional no ponto de 10 semanas. (D) Área sob a curva do ponto de 2 semanas. (E) Área sob a curva do ponto de 5 semanas. (F) Área sob a curva do ponto de 10 semanas. ***, $p < 0,001$ (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos independentes.



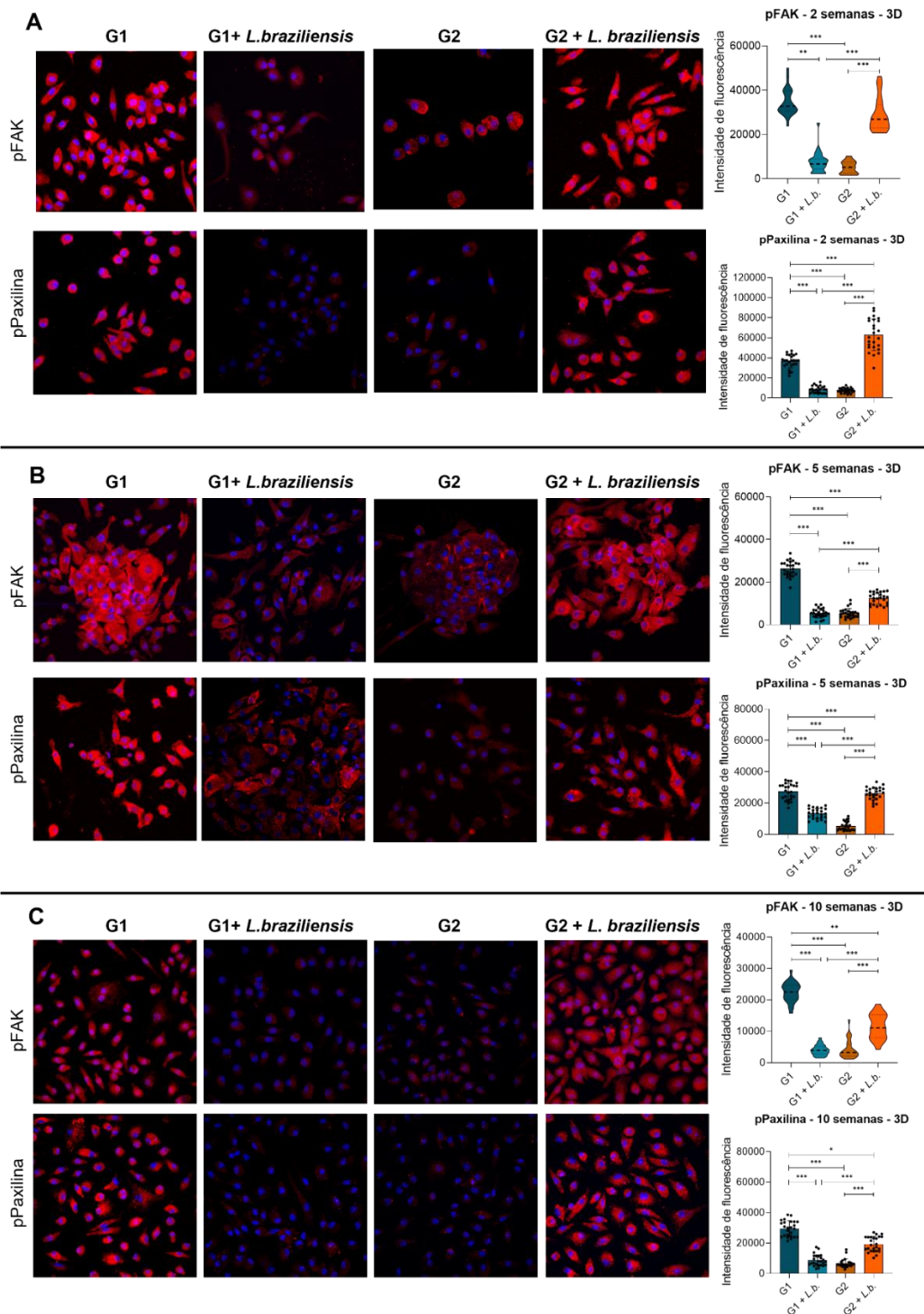
Fonte: Autora

7.7 Avaliação da formação do complexo de adesão em BMMΦ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente tridimensional

Para compreender os mecanismos associados à migração em ambiente tridimensional, utilizamos matrizes de colágeno I, onde foram colocados os macrófagos, com a matriz ainda fluida, de modo que, após a polimerização da matriz, as células ficaram rodeadas de matriz extracelular. Foi avaliada a formação de complexos de adesão em BMMΦ de animais saudáveis (G1) em comparação com macrófagos de animais infectados (G2), a partir da expressão de pFAK e pPaxilina, proteínas chaves na formação do complexo de adesão da célula ao substrato. Nossos resultados indicam uma redução da expressão de FAK e paxilina nos macrófagos de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos macrófagos de origem de animais infectados (G2), nos pontos de 2, 5 e 10 semanas, quando comparados aos BMMΦ de animais saudáveis (G1), em todos os tempos avaliados. Observa-se também que os

BMMΦ de animais infectados *in vivo*, quando são infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), apresentaram um aumento da expressão de FAK e paxilina quando comparado com o BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2) (Figura 18).

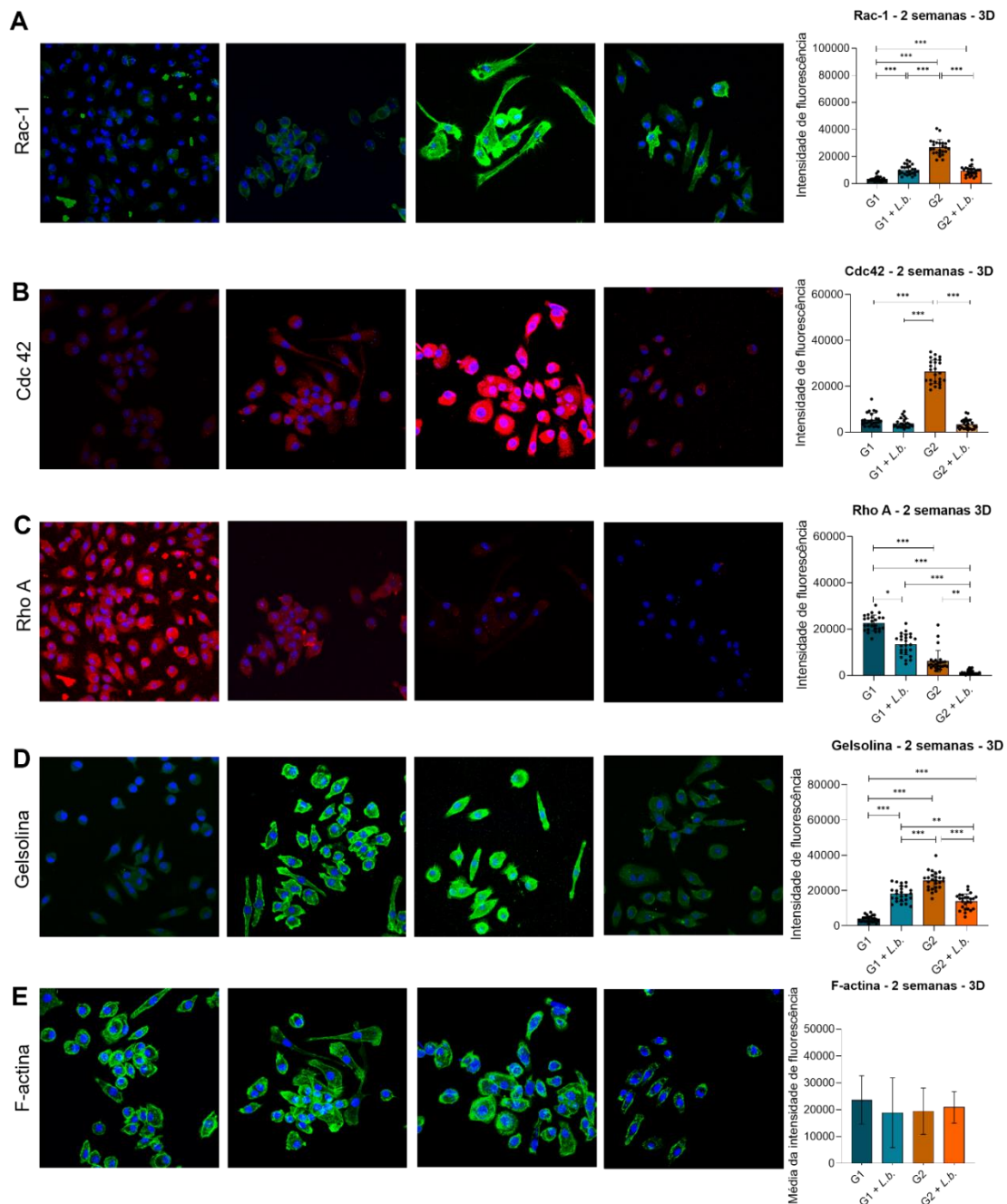
Figura 18 - Formação do complexo de adesão em BMMΦ de animais saudáveis ou após 2, 5 ou 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente tridimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em matriz extracelular, após 24h de incubação, foram infectados ou não por *L. braziliensis* na proporção de 10:1, decorrido as 24h da infecção, foram lavadas e marcadas com anticorpo anti- pFAK e anti-pPaxilina. (A) Expressão da intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 2, através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Expressão da intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 5, através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Expressão da intensidade de fluorescência para p-FAK e pPaxilina na semana 10, através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-pFAK ou anti-pPaxilina; azul, DAPI; ***, $p < 0,001$ (ANOVA ou Kruskal- Wallis). Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



7.8 Avaliação da organização dos filamentos de actina em bmm ϕ infectados por *L. Braziliensis* em ambiente tridimensional

Com o objetivo de entender os mecanismos relacionados à dinâmica do citoesqueleto de actina durante o processo de migração em ambiente tridimensional, utilizamos matrizes de colágeno I, onde foram colocados os macrófagos com a matriz ainda fluida, de modo que após a polimerização da matriz, as células ficaram rodeadas de matriz extracelular. Para isso, foi realizada a imunomarcagem para as proteínas Rac1 e Cdc42, relacionadas com a formação de lamelipódios e filopódios, respectivamente. Adicionalmente, avaliamos a expressão da proteína RhoA, importante na contração do citoesqueleto de actina e gelsolina, que possui função de facilitar a clivagem da actina. Por fim, além de marcação com faloidina fluorescente que é capaz de se ligar a actina filamentosa. Nossos resultados após 2 semanas de infecção *in vivo* nos camundongos, mostram que há um aumento da expressão de Rac1 e Cdc42 em BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2), quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, observamos uma redução da expressão de Rac1 e Cdc42 em BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis*, que foram submetidos a infecção *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados ao G2. Em contraste, observa-se uma redução da expressão de RhoA em BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* e dos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2), em relação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Vale ressaltar, que os BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis in vivo* quando infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), apresentam uma redução da expressão de RhoA quando comparados àqueles de animais infectados *in vivo* (G2). Em relação à expressão de gelsolina, observamos um aumento da expressão em BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2), quando comparados aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, observamos uma redução da expressão de gelsolina em BMM Φ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis*, que foram submetidos a infecção *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados ao G2. Por fim, em relação à marcação com faloidina, houve variação nos resultados obtidos nos dois experimentos realizados. Assim, foi calculada a média da intensidade de fluorescência desses experimentos independentes, não sendo encontradas diferenças significativas na expressão de F-actina entre os grupos (Figura 19).

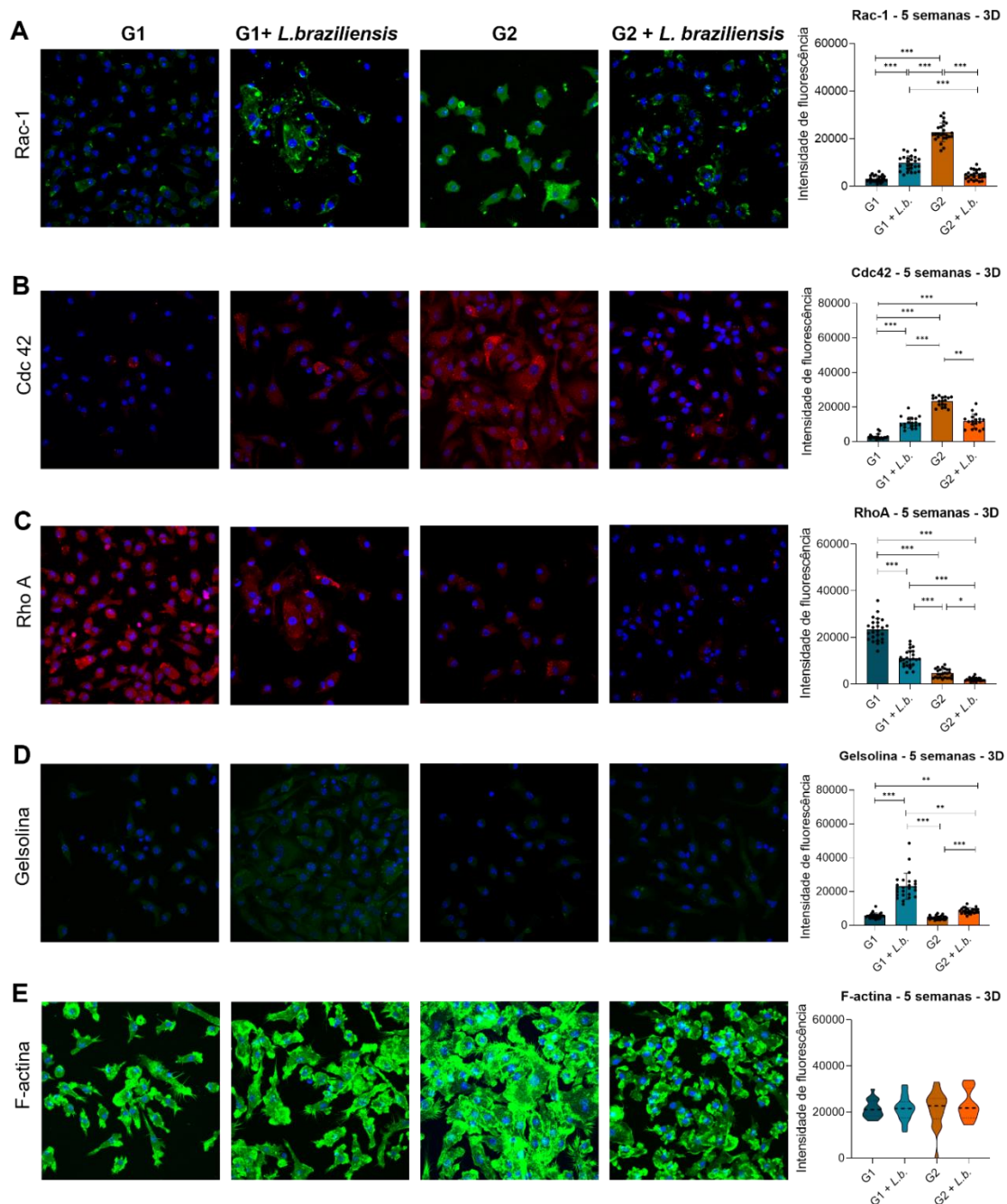
Figura 19 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 2 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente tridimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas, após 24h de incubação, foram infectados ou não por *L. braziliensis*, decorrido 24h da infecção, foram lavadas e marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti- Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina e faloidina para marcar actina filamentosa. (A) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rac1 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rho-A através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (D) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-gelsolina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (E) Expressão da intensidade de fluorescência para Faloidina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-Cdc42 ou anti-RhoA; Verde, anti-Rac1, anti-gelsolina ou Faloidina; azul, DAPI; ***, $p < 0,001$ (Kruskal- Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



Fonte: Autora

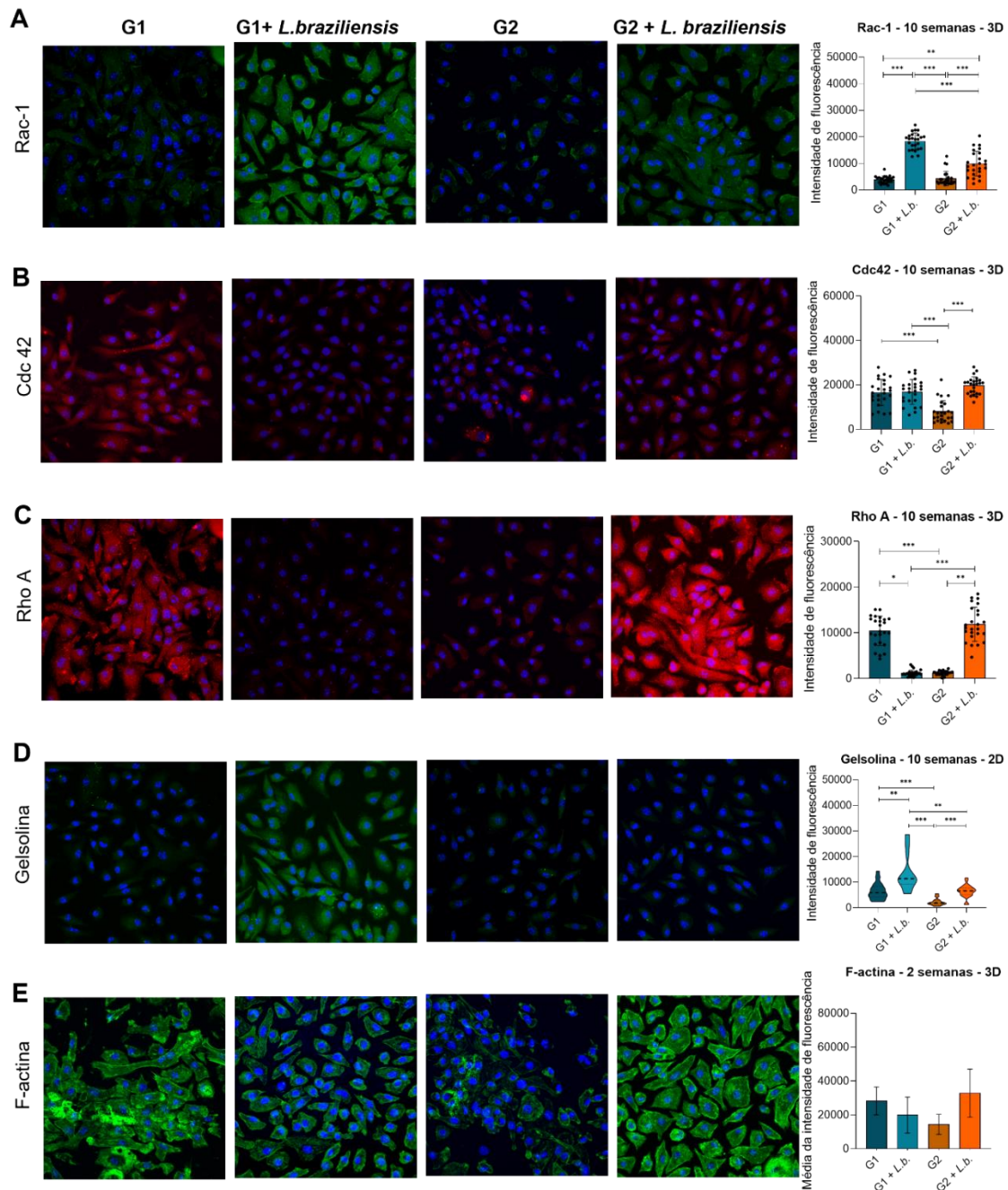
No ponto de 5 semanas, foi observado um aumento na expressão de Rac1 e de Cdc42 nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e dos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2), em relação ao grupo controle dos macrófagos de animais saudáveis (G1). Em contrapartida, houve uma redução da expressão de Rac1 nos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* quando infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), quando comparados com aqueles de animais infectados *in vivo* (G2). Já com relação a RhoA, observa-se uma redução da expressão nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), dos BMM Φ de origem de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) e BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) em relação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, ao analisar a expressão de gelsolina, observa-se um aumento da expressão nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), quando comparados ao grupo controle (G1). Observa-se ainda um aumento na expressão de gelsolina nos BMM Φ de animais infectados *in vivo*, quando estes são infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), em relação aos BMM Φ de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) e ao grupo controle de animais saudáveis (G1). Em relação à marcação por faloidina, não encontramos diferença na expressão entre os grupos analisados (Figura 20).

Figura 20 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 5 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente tridimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas, após 24h de incubação, foram infectados ou não por *L. braziliensis*, decorrido 24h da infecção, foram lavadas e marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti- Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina e Faloidina para marcar actina filamentosa. (A) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rac1 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-RhoA através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (D) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-gelsolina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (E) Expressão da intensidade de fluorescência para Faloidina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-Cdc42 ou anti-RhoA; Verde, anti-Rac1, anti-gelsolina ou Faloidina; azul, DAPI; ***, $p < 0,001$ (Kruskal- Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



No ponto de 10 semanas, observou-se um aumento de Rac1 nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e dos BMM Φ de animais infectados por *in vivo*, quando estes são infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) em relação ao grupo controle, macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, observa-se um aumento da expressão de Rac1 em BMM Φ de animais infectados por *in vivo*, quando estes são infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) em relação BMM Φ de animais infectados por *in vivo* (G2). Em relação a Cdc42, observamos uma redução na expressão nos BMM Φ de animais infectados por *in vivo* (G2) em relação aos macrófagos de animais saudáveis (G1). Adicionalmente, observa-se um aumento da expressão de Cdc42 em BMM Φ de animais infectados por *in vivo*, quando estes são infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*) em relação BMM Φ de animais infectados por *in vivo* (G2). Nossos resultados indicam ainda uma redução da expressão de RhoA nos macrófagos de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e nos macrófagos de animais infectados *in vivo* (G2), quando comparados com o grupo controle (G1). Observa-se também que os BMM Φ de animais infectados, quando são infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), apresentaram um aumento na expressão de RhoA, quando comparados àqueles de animais infectados (G2). No que diz respeito a gelsolina, foi observado um aumento da expressão nos BMM Φ de animais saudáveis infectados por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*) e uma redução da expressão nos macrófagos de animais infectados *in vivo* (G2), quando comparados ao grupo controle (G1). Vale destacar que os BMM Φ de animais infectados *in vivo*, quando são infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), apresentaram um aumento na expressão de RhoA, quando comparados com BMM Φ de animais infectados *in vivo* (G2). Por fim, em relação à marcação com faloidina, houve variação nos resultados obtidos nos dois experimentos realizados. Assim, foi calculada a média da intensidade de fluorescência desses experimentos independentes, não sendo encontradas diferenças significativas na expressão de F-actina entre os grupos (Figura 21).

Figura 21 - Organização dos filamentos de actina em macrófagos de medula óssea de animais saudáveis ou após 10 semanas de infecção por *L. braziliensis* em ambiente tridimensional. Macrófagos (2×10^5 /poço) foram plaqueados em lamínulas, após 24h de incubação, foram infectados ou não por *L. braziliensis*, decorrido 24h da infecção, foram lavadas e marcadas com anticorpo anti-Rac1, anti- Cdc42, anti-RhoA, anti-gelsolina e Faloidina para marcar actina filamentosa. (A) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rac1 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (B) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Cdc42 através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (C) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-Rho-A através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (D) Expressão da intensidade de fluorescência para anti-gelsolina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. (E) Expressão da intensidade de fluorescência para faloidina através de microscopia confocal Leica SP8 e quantificação da fluorescência de 50 células marcadas utilizando o software Fiji. Vermelho, anti-Cdc42 ou anti-RhoA; Verde, anti-Rac1, anti-gelsolina ou Faloidina; azul, DAPI; ***, $p < 0,001$ (Kruskal- Wallis ou ANOVA). Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

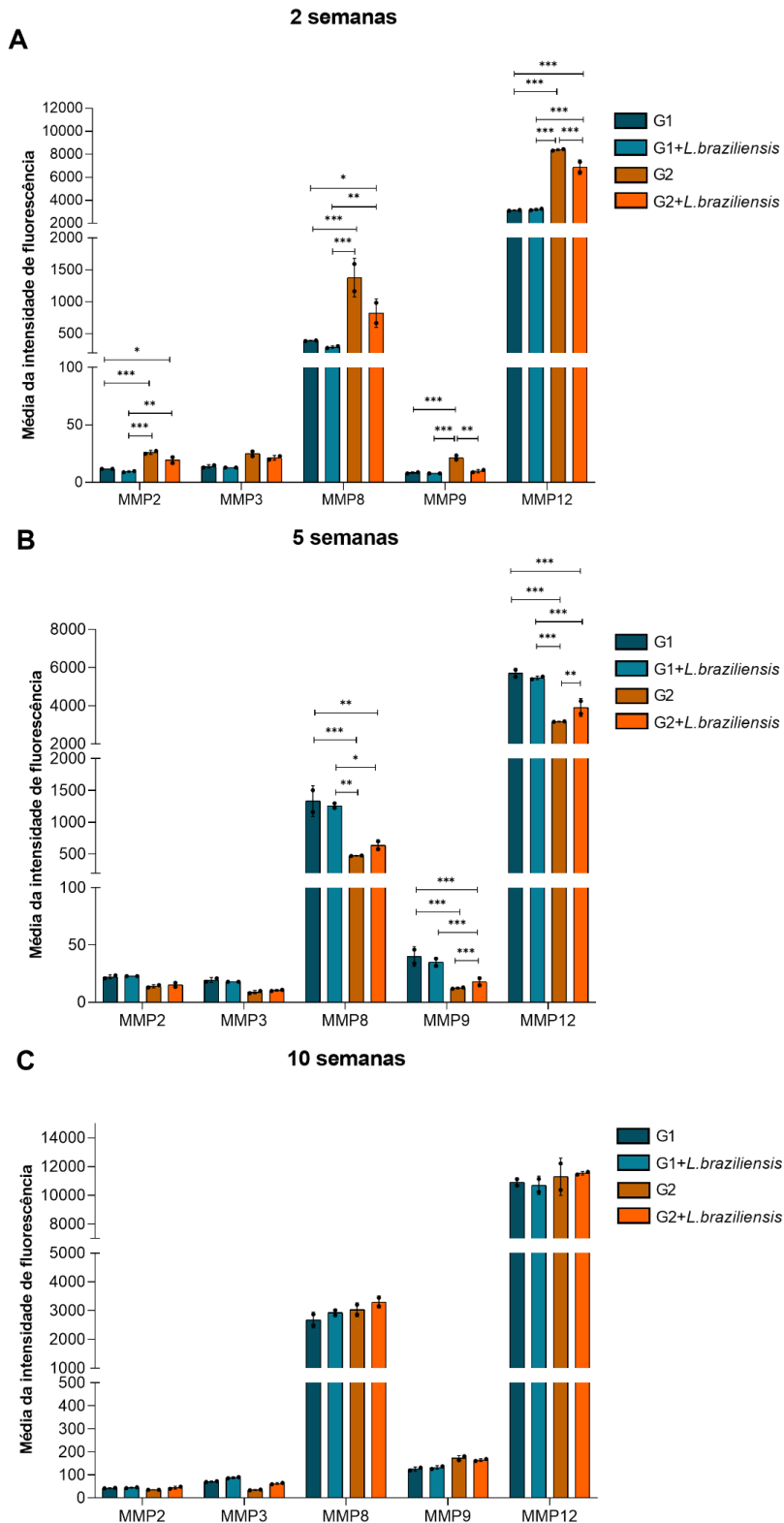


Fonte: Autora

7.9 Avaliação da expressão de proteases em BMM Φ de camundongos infectados com *L. Braziliensis*

Para avaliar a expressão de proteases foram realizados imunoenaios baseados na tecnologia Luminex™ xMAP para quantificar as metaloproteinases de matriz, MMP12, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, nas amostras dos sobrenadantes do cultivo dos macrófagos. Observamos que no ponto de 2 semanas houve um aumento da MMP2, MMP8 e MMP12 nos BMM Φ de origem de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) e nos BMM Φ de animais infectados, quando são infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), em relação aos macrófagos de origem de animais saudáveis (G1). Foi observado também um aumento da MMP9 nos BMM Φ de origem de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) em relação aos macrófagos de origem de animais saudáveis (G1). Já no ponto de 5 semanas, destaca-se a redução da MMP8, MMP9 e MMP12 nos BMM Φ de origem de animais infectados por *L. braziliensis* (G2) e nos BMM Φ de animais infectados, quando são infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), em relação aos macrófagos de origem de animais saudáveis (G1). No ponto de 10 semanas não foi observado diferença significativa entres os grupos para nenhuma das MMPs avaliadas (Figura 22).

Figura 22 - O papel de proteases na migração de BMMΦ de camundongos infectados com *L. braziliensis*. Sobrenadante do cultivo celular dos grupos analisados, foram submetidos a imunoenaios baseados na tecnologia Luminex™ xMAP para quantificar as metaloproteinasas de matriz, MMP12, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9. (A) Média da intensidade de fluorescência das MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 e MMP12 no ponto de 2 semanas. (B) Média da intensidade de fluorescência das MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 e MMP12 no ponto de 5 semanas. (C) Média da intensidade de fluorescência das MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 e MMP12 no ponto de 10 semanas. ***, $p < 0,001$ (Three-way ANOVA). Resultado representativo de 2 experimentos independentes.



7.10 Avaliação de proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMMΦ de camundongos infectados com *L. Braziliensis*

Para identificar as proteínas diferentemente expressas de BMMΦ de animais infectados com *L. braziliensis* em comparação a BMMΦ de animais saudáveis, lisamos as células com tampão de lise contendo DDT. Os extratos proteicos foram então degradados com tripsina e os peptídeos obtidos caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema Orbitrap Fusion Lumos / Ultimate 3000 RSLCnano.

Duas semanas após a infecção, identificamos um total de 26 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos avaliados. Nos BMMΦ de animais saudáveis (G1), nove proteínas apresentaram expressão reduzida — incluindo Hidroxiacil Glutathiona Hidrolase mitocondrial, Tirosina-proteína quinase Fes/Fps, Proteína da família Costars ABRACL, Cadeia leve de dineína Tctex-tipo 1, 5-formil tetrahidrofolato ciclo-ligase, Peroxirredoxina-1, Proteínas Ativadoras 1 de Rho GTPases, Endofilina-B1 e Proteína 4 do canal intracelular de cloreto — enquanto três proteínas apresentaram expressão aumentada (Subunidade U2AF do fator de splicing, Proteína 2 que interage com FMR1 citoplasmática e Fosfatidato citidina transferase 2).

Ao infectar esses macrófagos *in vitro* (G1 + *L. braziliensis*), observamos dez proteínas com expressão reduzida (entre elas, Molécula de interação estromal 1, Sialato O-acetilesterase, Proteínas Ativadoras 1 de Rho GTPase, Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase mitocondrial e Subunidade B do fator de iniciação da tradução eucariótica 3) e quatro proteínas com expressão aumentada (CUGBP membro da família Elav-like 2, Peroxirredoxina-1, Proteína de subunidade maior ribossômica uL11 e Grande transportador de aminoácidos neutros subunidade pequena 4).

Nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), seis proteínas apresentaram expressão reduzida (incluindo CUGBP membro da família Elav-like 2, Subunidade U2AF do fator de splicing e Fosfatidato citidina transferase 2) e nove proteínas exibiram expressão aumentada, dentre as quais Hidroxiacil Glutathiona Hidrolase mitocondrial, Proteína da família Costars ABRACL, Cadeia leve de dineína Tctex-tipo 1 e 5-formil tetrahidrofolato ciclo-ligase. Ao infectar esses macrófagos *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), foram detectadas quatro proteínas com expressão reduzida (Cadeia leve de dineína Tctex-tipo 1, Adenina fosforribosiltransferase, Peroxirredoxina-1 e Proteína de subunidade maior ribossômica uL11) e doze proteínas com expressão aumentada, destacando-se Tirosina-proteína quinase Fes/Fps, Proteína da família Costars ABRACL, Molécula de interação estromal 1,

Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase e Subunidade B do fator de iniciação da tradução eucariótica 3. Importante ressaltar que as Proteínas Ativadoras 1 de Rho GTPases e a Proteína da família Costars ABRACL, diretamente relacionadas à dinâmica da actina e migração celular, apresentaram expressão aumentada exclusivamente nos BMMΦ dos grupos infectados *in vivo* (G2) e infectados *in vivo* e *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*) (Figura 23 e Tabela 2).

De modo geral, a maioria das proteínas apresentou expressão aumentada nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2). Destacam-se a Hidroxiacil Glutathione Hidrolase mitocondrial (Hagh), altamente expressa em G2, e o CUGBP membro da família Elav-like 2 (Celf2), cuja expressão foi significativamente maior em G2 comparado aos BMMΦ de animais saudáveis infectados *in vitro* (G1 + *L. braziliensis*). A Tirosina-proteína quinase Fes (Fes) exibiu expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1, enquanto a Proteína da família Costars ABRACL (Aabracl) foi altamente expressa em G2 e G2 + *L. braziliensis*, mas reduzida em G1. A Cadeia leve de dineína Tctex-tipo 1 (Dyntl1) foi mais expressa em G2, porém apresentou expressão reduzida em G1 e G2 + *L. braziliensis*. A enzima 5-formil tetrahydrofolato ciclo-ligase (Mthfsl) apresentou expressão aumentada em G2 e G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1. A Adenina fosforribosiltransferase (Aprt) foi aumentada em G2 e reduzida em G2 + *L. braziliensis*. A proteína 2-hidroxiacil-CoA liase 2 (Ilvbl) foi mais expressa em G2 e G2 + *L. braziliensis*, e menos expressa em G1 + *L. braziliensis*. A Di-N-acetilquitobiase (Ctbs) e a Fosfatidato citidina transferase 2 (Cds2) seguiram padrão semelhante, sendo mais expressas em G2 e menos em G1 + *L. braziliensis*. A Sialato O-acetilesterase (Siae) apresentou expressão aumentada em G2 e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. A Proteína Ativadora 1 de Rho GTPase (Arhgap1) teve expressão aumentada em G2 e G2 + *L. braziliensis*, e reduzida em G1 e G1 + *L. braziliensis*.

Algumas proteínas exibiram expressão aumentada especialmente nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* e subsequentemente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), como a Subunidade B do fator de iniciação da tradução eucariótica 3 (Eif3b), Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase mitocondrial (Hadh), Molécula de interação estromal 1 (Stim1), Proteína 1 contendo domínio isocorismatase (Isocl1) e Componente redutor de amidoxima mitocondrial 2 (Mtarc2). Também a Endofilina-B1 (Sh3glb1) e a Proteína 4 do canal intracelular de cloreto (Clic4) apresentaram expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1.

Por outro lado, algumas proteínas tiveram expressão aumentada nos BMMΦ de animais saudáveis (G1), como a Subunidade U2AF do fator de splicing (U2af2), altamente expressa em G1 e reduzida em G2, e a Proteína 2 que interage com FMR1 citoplasmática (Cyfip2), aumentada em G1 e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. A Subunidade maior ribossômica uL11

(Rpl12) apresentou expressão elevada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida em G2 e G2 + *L. braziliensis*. A Peroxirredoxina-1 (Prdx1) mostrou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis*, e reduzida em G1 e G2 + *L. braziliensis*. Finalmente, o Grande transportador de aminoácidos neutros subunidade pequena 4 (Slc43a2) foi mais expresso em G1 + *L. braziliensis* e menos em G2 (Figura 23 e Tabela 2).

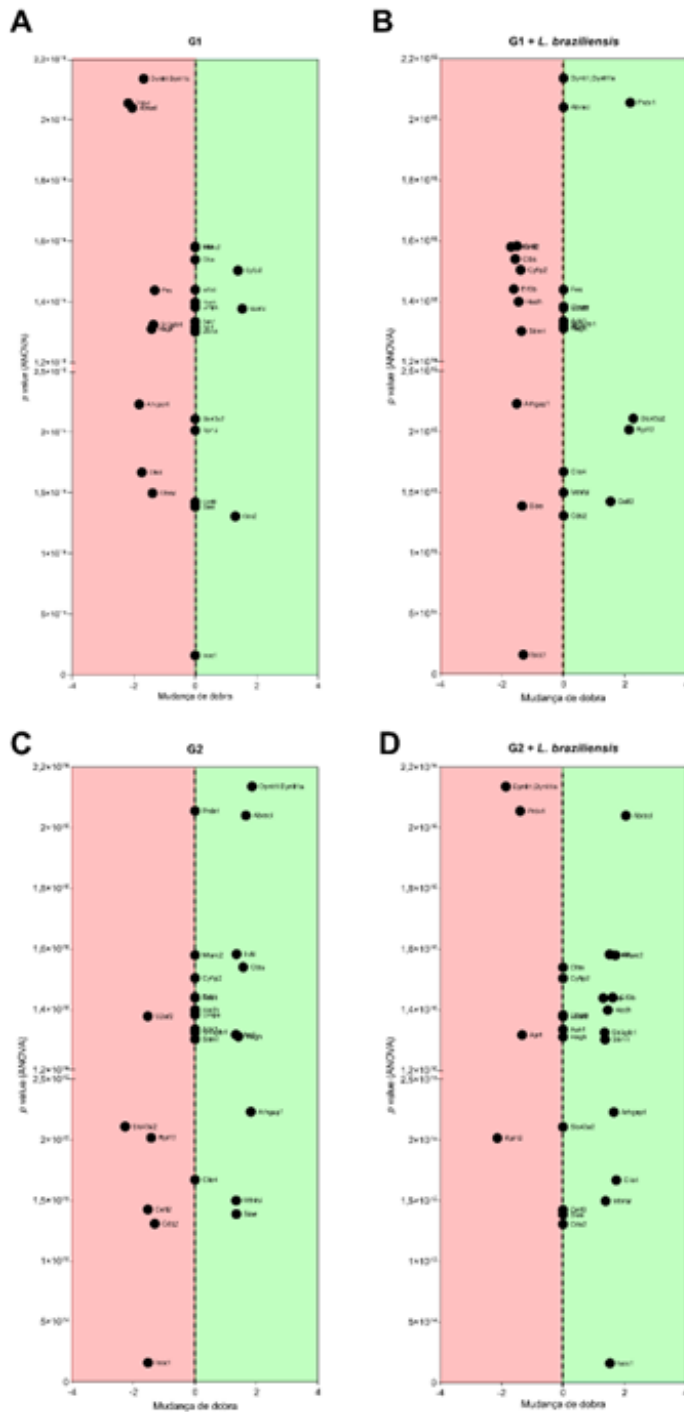
Tabela 2 - Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMMΦ no ponto de 2 semanas após a infecção por *L. braziliensis*

Proteína	Gene	<i>p</i> valor (ANOVA)	G1	G1 + <i>L.b.</i>	G2	G2 + <i>L.b.</i>
Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	Hagh	1,310	-1.414	0	1.414	0
CUGBP Elav-like family member 2	Celf2	1,425	0	1.530	-1.530	0
Tyrosine-protein kinase Fes/Fps; Tyrosine-protein kinase	Fes	1,438	-1.312	0	0	1.312
Costars family protein ABRACL	Abracl	2,040	-2.045	0	1.656	2.045
Dynein light chain Tctex-type 1	Dynlt1	2,136	-1.673	0	1.859	-1.859
5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase	Mthfs1	1,499	-1.385	0	1.337	1.385
Adenine phosphoribosyltransferase	Aprt	1,317	0	0	1.328	-1.328
Uridine 5-monophosphate synthase	Umps	1,382	0	0	0	0
Fator de splicing U2AF subunidade de 65 kDa	U2af2	1,377	1.534	0	-1.534	0
Peroxiredoxin-1	Prdx1	2,056	-2.176	2.176	0	-1.393
Large ribosomal subunit protein uL11	Rpl12	2,018	0	2.135	-1.423	-2.135
Stromal interaction molecule 1	Stim1	1,302	0	-1.368	0	1.368
Sialate O-acetyltransferase	Siae	1,387	0	-1.346	1.346	0
AP2-associated protein kinase 1	Aak1	1,335	0	0	0	0
Rho GTPase-activating protein 1	Arhgap1	2,231	-1.817	-1.517	1.817	1.652
Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2	Cyfip2	1,504	1.396	-1.396	0	0
Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	Hadh	1,399	0	-1.457	0	1.457

2-hydroxyacyl-CoA lyase 2	Ilvbl	1,583	0	-1.512	1.353	1.512
Large neutral amino acids transporter small subunit 4	Slc43a2	2,110	0	2.273	-2.273	0
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	Eif3b	1,440	0	-1.615	0	1.615
Di-N-acetylchitobiase	Ctbs	1,539	0	-1.567	1.567	0
Isochorismatase domain-containing protein 1	Isoc1	1,599	0	-1.306	-1.527	1.527
Mitochondrial amidoxime reducing component 2	Mtarc2	1,579	0	-1.704	0	1.704
Phosphatidate cytidyltransferase 2	Cds2	1,308	1.308	0	-1.308	0
Endophilin-B1	Sh3glb1	1,325	-1.354	0	0	1.354
Chloride intracellular channel protein 4	Clic4	1,671	-1.730	0	0	1.730

Fonte: Autora

Figura 23 - Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMMΦ de camundongos após 2 semanas de infecção por *L. braziliensis*. BMMΦ de camundongos saudáveis ou infectados por *L. braziliensis* foram lisados e degradados com tripsina, os peptídeos obtidos foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema Orbitrap Fusion Lumos / Ultimate 3000 RSLCnano. (A) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis (G1). (B) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*). (C) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2). (D) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*). ***, $p < 0,001$ (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.



Fonte: Autora

Na análise realizada 5 semanas após a infecção, foram identificadas 11 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos avaliados. Nos BMMΦ de animais saudáveis (G1), observamos duas proteínas com expressão reduzida (proteína de choque térmico mitocondrial 70 e peroxirredoxina-2) e três com expressão aumentada (subunidade 4 do complexo THO, prenilcisteína oxidase 1 e proteína A associada à membrana de vesícula). Nos BMMΦ de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*), foram identificadas cinco proteínas com expressão reduzida (subunidade 4 do complexo THO, subunidade 1 da manosiltransferase dolicol-fosfato, prenilcisteína oxidase 1, 6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante e proteína A associada à membrana de vesícula) e três com expressão aumentada (proteína de choque térmico mitocondrial 70, peroxirredoxina-2 e proteína unc-93 homólogo B1).

Nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), foram observadas quatro proteínas com expressão reduzida (proteína de choque térmico mitocondrial 70, proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1, peroxirredoxina-2 e proteína 1 do canal intracelular de cloreto) e duas com expressão aumentada (subunidade 4 do complexo THO e proteína A associada à membrana de vesícula). Já nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* que foram subsequentemente infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*), foram identificadas duas proteínas com expressão reduzida (proteína de choque térmico mitocondrial 70 e proteína unc-93 homólogo B1) e seis com expressão aumentada (subunidade 4 do complexo THO, subunidade 1 da manosiltransferase dolicol-fosfato, proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1, 6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante, proteína A associada à membrana de vesícula e proteína 1 do canal intracelular de cloreto) (Figura 23 e Tabela 3). A subunidade 4 do complexo THO (Alyref) apresentou expressão aumentada nos BMMΦ dos grupos G1, G2 e G2 + *L. braziliensis*, enquanto mostrou expressão reduzida no grupo G1 + *L. braziliensis*. A subunidade 1 da manosiltransferase dolicol-fosfato (Dpm1) foi mais expressa em G2 + *L. braziliensis* e menos expressa em G1 + *L. braziliensis*. A proteína de choque térmico mitocondrial 70 (Hspa9) apresentou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis*, enquanto teve expressão reduzida nos grupos G1, G2 e G2 + *L. braziliensis*. A proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1 (Pebp1) foi mais expressa em G2 + *L. braziliensis* e menos expressa em G2. A peroxirredoxina-2 (Prdx2) mostrou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida nos grupos G1 e G2. A proteína unc-93 homólogo B1 (Unc93b1) apresentou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida em G2 + *L. braziliensis*. A prenilcisteína oxidase 1 (Pcyox1) foi mais expressa em G1 e menos expressa em G1 + *L. braziliensis*. A 6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante (Pgd) teve expressão aumentada exclusivamente

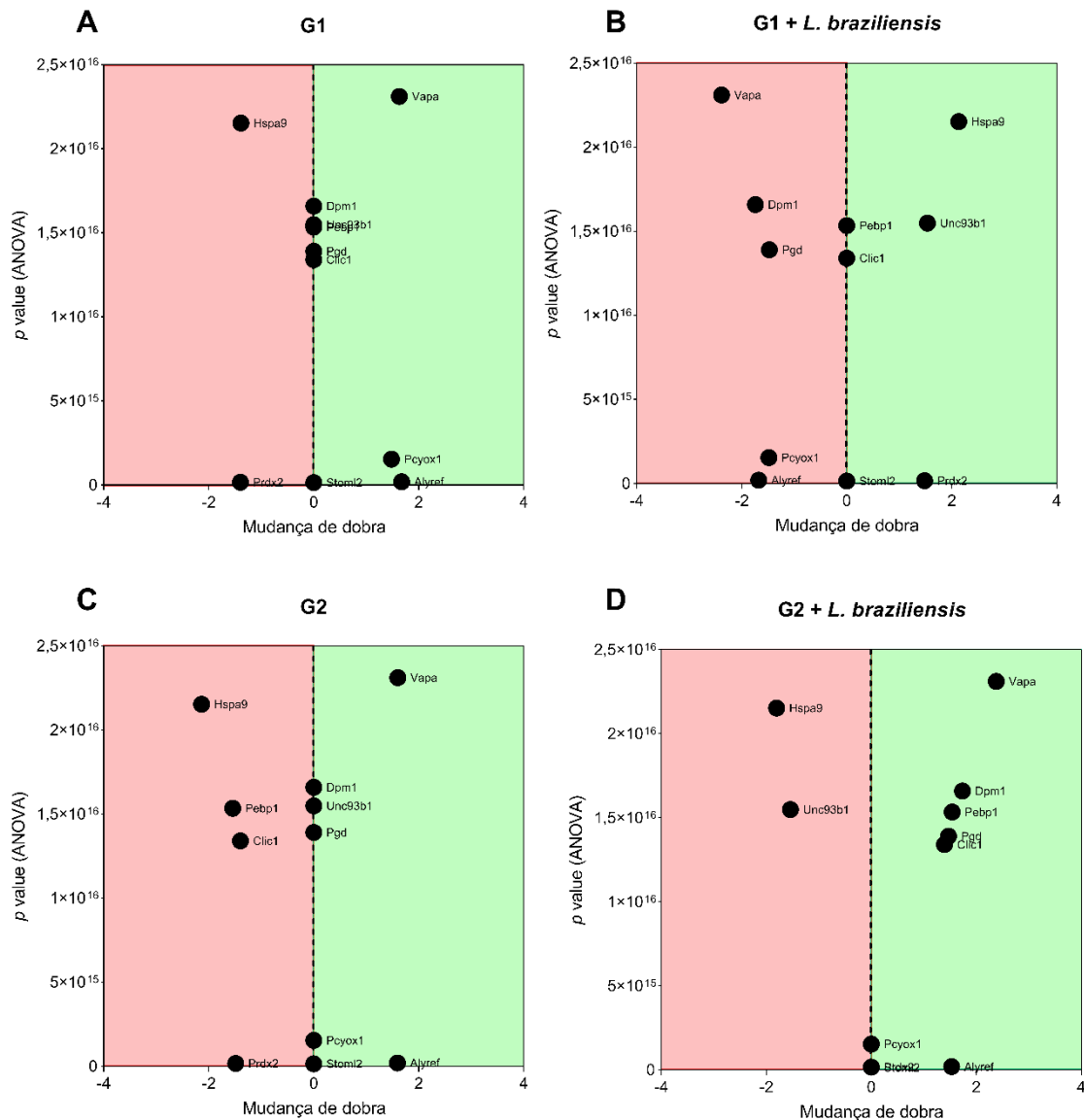
em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. A proteína A associada à membrana de vesícula (Vapa) apresentou expressão aumentada nos grupos G1, G2 e G2 + *L. braziliensis*, mas reduzida em G1 + *L. braziliensis*. Por fim, a proteína 1 do canal intracelular de cloreto (Clic1) foi mais expressa em G2 + *L. braziliensis* e menos expressa em G1 + *L. braziliensis* (Figura 23 e Tabela 3).

Tabela 3 - Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMMΦ no ponto de 5 semanas após a infecção por *L. braziliensis*

Proteína	Gene	p valor (ANOVA)	G1	G1 + <i>L.b.</i>	G2	G2 + <i>L.b.</i>
THO complex subunit 4	Alyref	1,899	1.676	-1.676	1.596	1.532
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	Dpm1	1,659	0	-1.738	0	1.738
Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	2,153	-1.387	2.134	-2.134	-1.802
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1	1,534	0	0	-1.541	1.541
Peroxiredoxin-2	Prdx2	1,578	-1.396	1.485	-1.485	0
Protein unc-93 homolog B1	Unc93b1	1,549	0	1.538	0	-1.538
Stomatin-like protein 2, mitochondrial	Stoml2	1,359	0	0	0	0
Prenylcysteine oxidase 1	Pcyox1	1,539	1.480	-1.480	0	0
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Pgd	1,390	0	-1.470	0	1.470
Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	Vapa	2,311	1.631	-2.381	1.600	2.381
Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	1,340	0	0	-1.395	1.395
THO complex subunit 4	Alyref	1,899	1.676	-1.676	1.596	1.532
Dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1	Dpm1	1,659	0	-1.738	0	1.738
Stress-70 protein, mitochondrial	Hspa9	2,153	-1.387	2.134	-2.134	-1.802

Fonte: Autora

Figura 24 - Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMMΦ de camundongos após 5 semanas de infecção por *L. braziliensis*. BMMΦ de camundongos saudáveis ou infectados por *L. braziliensis* foram lisados e degradados com tripsina, os peptídeos obtidos foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema Orbitrap Fusion Lumos / Ultimate 3000 RSLCnano. (A) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis (G1). (B) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*). (C) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2). (D) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*). ***, $p < 0,001$ (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.



Fonte: Autora

Após 10 semanas de infecção, identificamos um total de 6 proteínas diferentemente expressas entre os grupos analisados. Nos BMMΦ de animais saudáveis (G1), observamos uma

proteína com expressão reduzida (Proteína da autofagia 5 – Atg5) e quatro proteínas com expressão aumentada: Proteína da subunidade menor do ribossomo uS5 (Rps2), Proteína da subunidade menor do ribossomo eS1 (Rps3a), Testina (Tes) e Subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio (Atp1a1).

Ao infectar esses macrófagos *in vitro* (G1 + *L. braziliensis*), foi observada apenas uma proteína com expressão reduzida: Testina. Nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2), detectamos uma proteína com expressão reduzida (Testina) e duas proteínas com expressão aumentada: Proteína da autofagia 5 e Subunidade sigma-1 do complexo AP-3 (Ap3s1).

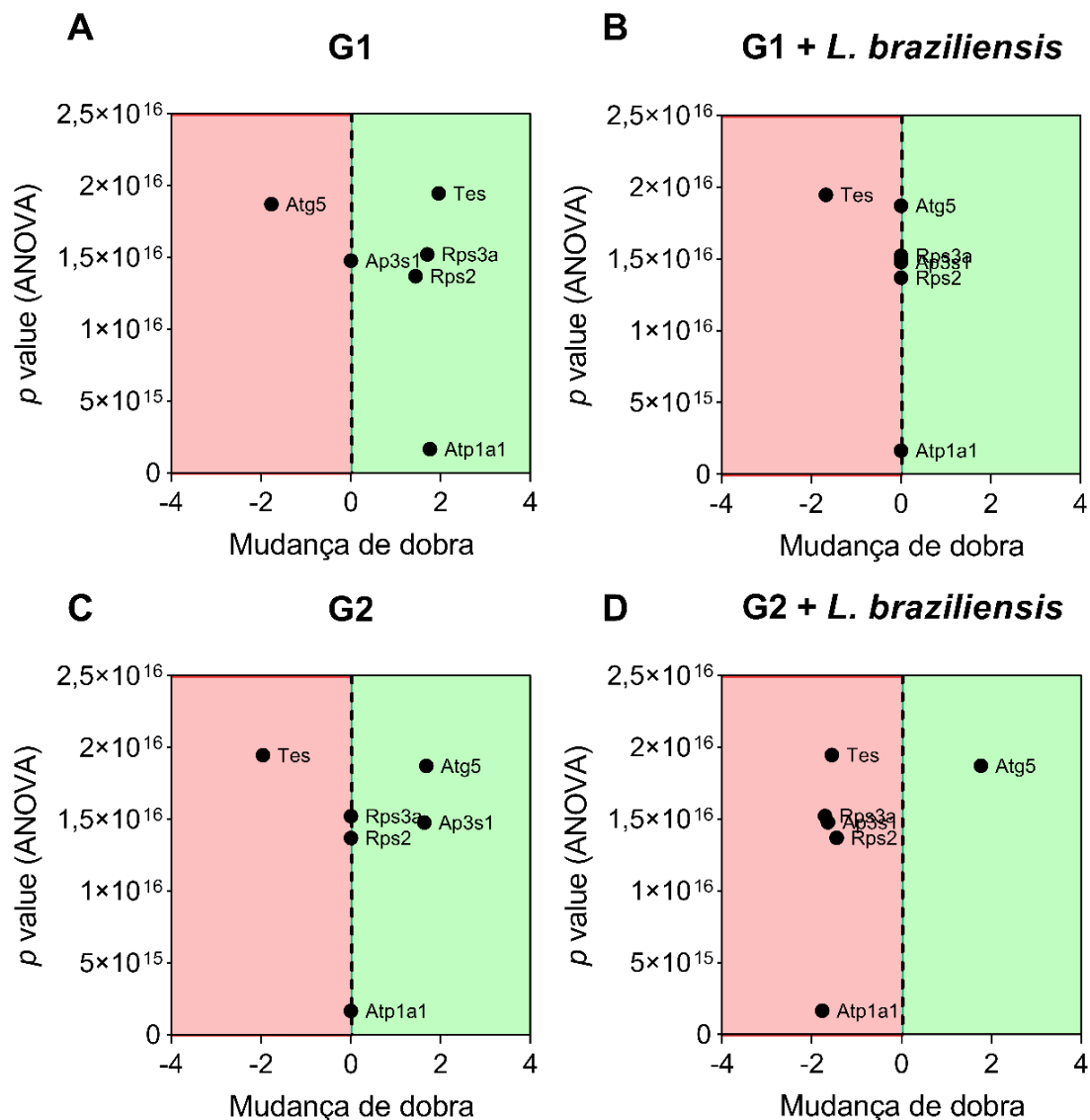
Ao infectar *in vitro* os BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2 + *L. braziliensis*), foram identificadas cinco proteínas com expressão reduzida: Proteína da subunidade menor do ribossomo uS5, Proteína da subunidade menor do ribossomo eS1, Testina, Subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio e Subunidade sigma-1 do complexo AP-3, além de uma única proteína com expressão aumentada, a Proteína da autofagia 5 (Figura 24 e Tabela 4). Dentre essas proteínas, destaca-se a Testina, componente do complexo de adesão celular, que apresentou expressão aumentada nos BMMΦ de animais saudáveis (G1), enquanto sua expressão foi reduzida nos grupos G1 + *L. braziliensis*, G2 e G2 + *L. braziliensis*. A Proteína da subunidade menor do ribossomo uS5 (Rps2) e a Proteína da subunidade menor do ribossomo eS1 (Rps3a) mostraram expressão aumentada nos BMMΦ de animais saudáveis (G1) e expressão reduzida nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* e posteriormente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*). A Subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio (Atp1a1) foi expressa de forma aumentada em G1, mas apresentou expressão reduzida em G2 + *L. braziliensis*. A Proteína da autofagia 5 (Atg5) exibiu expressão aumentada nos BMMΦ de animais infectados *in vivo* (G2) e nos BMMΦ infectados *in vivo* e posteriormente infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*), com expressão reduzida em BMMΦ de animais saudáveis (G1). Finalmente, a Subunidade sigma-1 do complexo AP-3 (Ap3s1) foi expressa de forma aumentada em G2, mas apresentou expressão reduzida em G2 + *L. braziliensis*.

Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas como diferentemente expressas nos BMMΦ no ponto de 10 semanas após a infecção por *L. braziliensis*

Proteína	Gene	p valor (ANOVA)	G1	G1 + <i>L.b.</i>	G2	G2 + <i>L.b.</i>
Small ribosomal subunit protein uS5	Rps2	1,370	1.444	0	0	-1.444
Small ribosomal subunit protein eS1	Rps3a	1,521	1.703	0	0	-1.703
Testin	Tes	1,946	1.958	-1.667	-1.958	-1.552
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	1,651	1.766	0	0	-1.766
Autophagy protein 5	Atg5	1,871	-1.767	0	1.685	1.767
AP-3 complex subunit sigma-1	Ap3s1	1,478	0	0	1.638	-1.638

Fonte: Autora

Figura 25 - Proteínas identificadas como diferentemente expressas em BMMΦ de camundongos após 10 semanas de infecção por *L. braziliensis*. BMMΦ de camundongos saudáveis ou infectados por *L. braziliensis* foram lisados e degradados com tripsina, os peptídeos obtidos foram caracterizados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema Orbitrap Fusion Lumos / Ultimate 3000 RSLCnano. (A) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis (G1). (B) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais saudáveis infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G1 + *L. braziliensis*). (C) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2). (D) Conjunto de proteínas identificadas com baixa regulação ou alta regulação em macrófagos de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* infectados *in vitro* por *L. braziliensis* (G2 + *L. braziliensis*). ***, $p < 0,001$ (ANOVA). Resultado representativo de 3 experimentos.

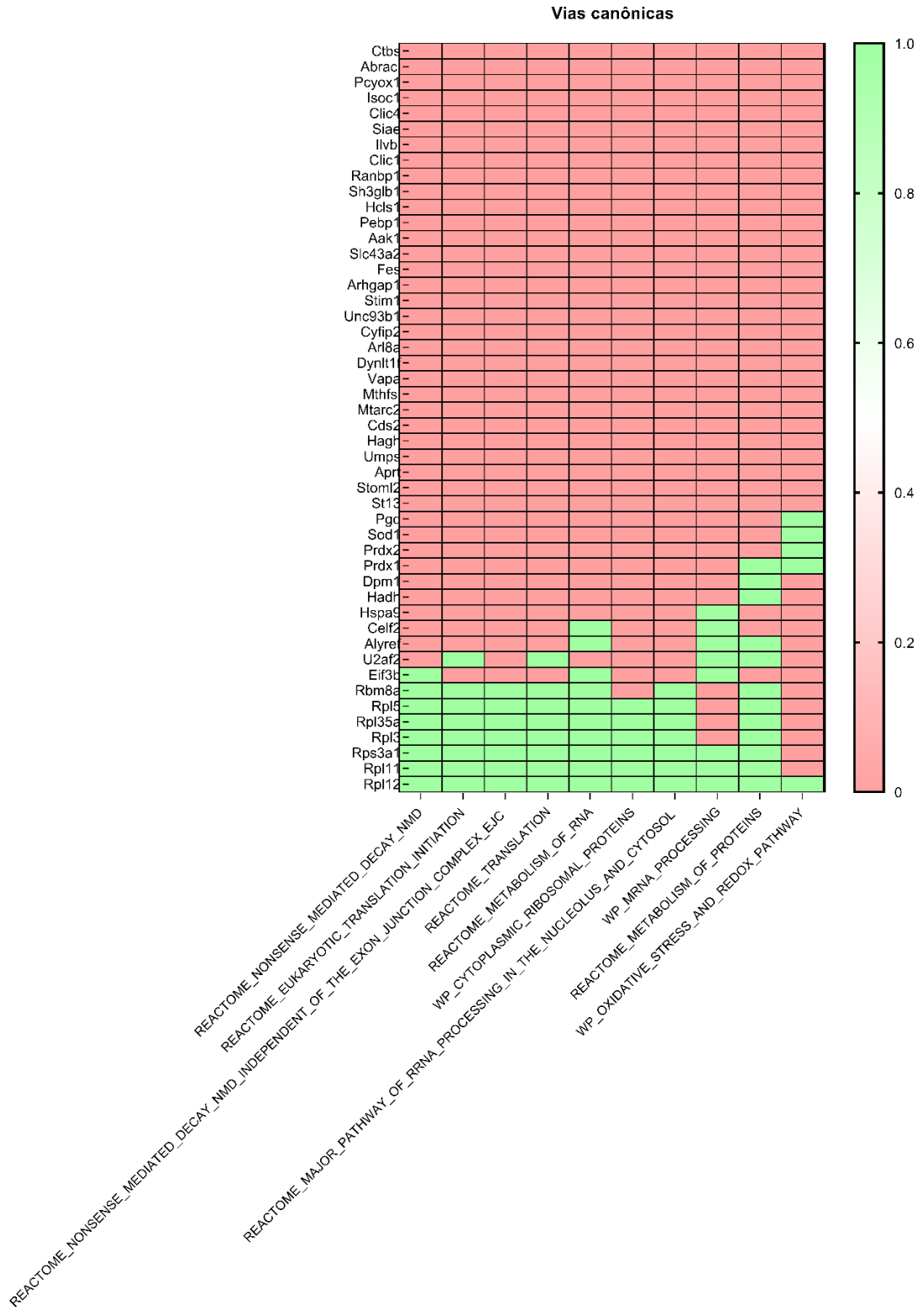


Fonte: Autora

As proteínas diferentemente expressas foram selecionadas e analisadas em conjunto (semanas 2, 5 e 10) na plataforma online GSEA-MSigDB (considerando $FDR < 0,05$). Foi avaliado o enriquecimento em vias canônicas, que inclui: Conjuntos de genes BioCarta,

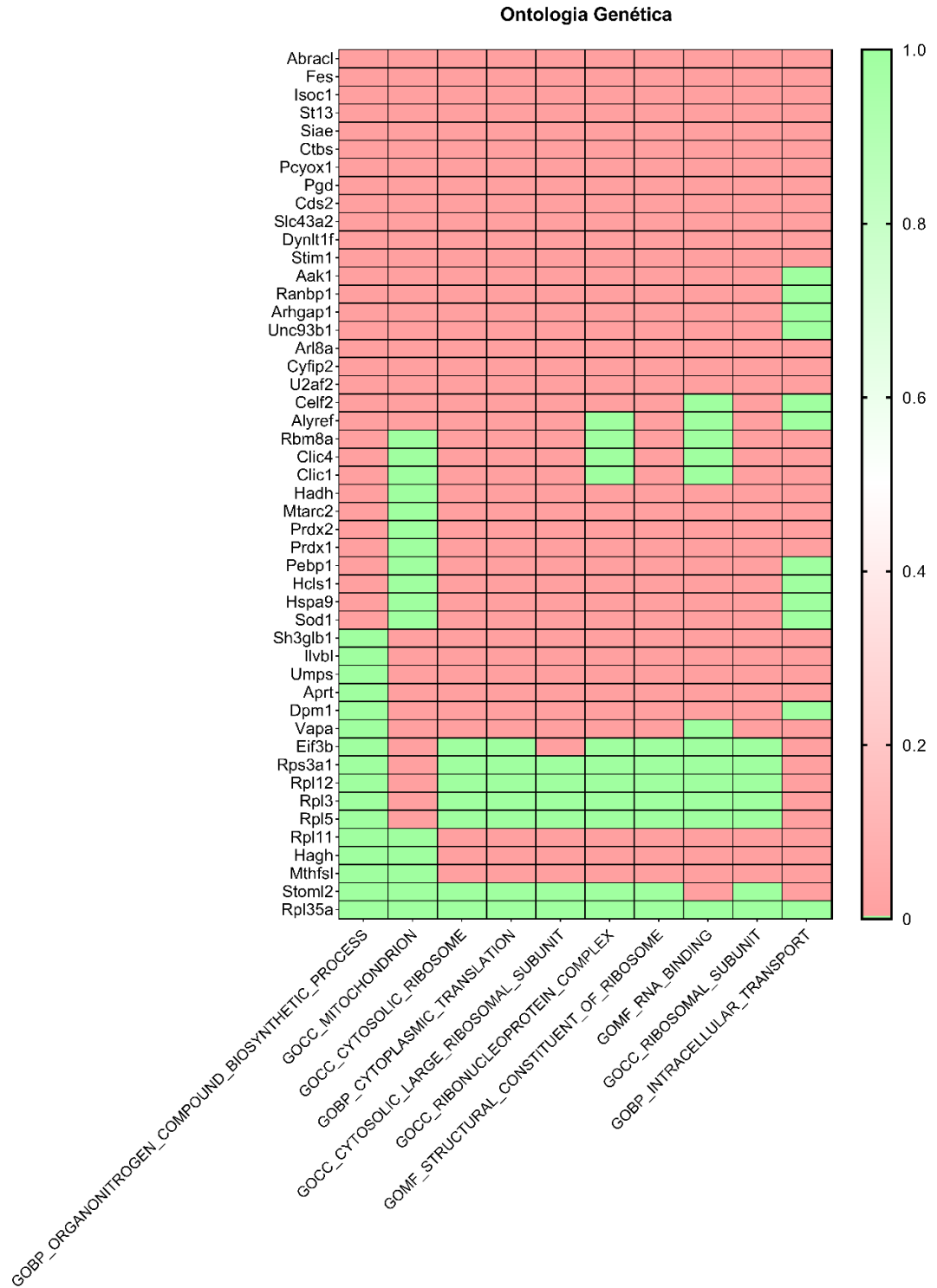
conjuntos de genes do Reactome e conjuntos de genes WikiPathways. Nessa análise foi possível identificar a alteração em dez diferentes vias: Nonsense-Mediated Decay (NMD), Eukaryotic Translation Initiation, Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC), Translation, Metabolism of RNA, Cytoplasmic ribosomal proteins, Major pathway of rRNA processing in the nucleolus and cytosol, mRNA processing e Oxidative stress and redox pathway (Figura 26) (Tabela 5). O enriquecimento em Ontologia genética identificou a alteração em 10 diferentes vias: Organonitrogen compound biosynthetic process, GOCC mitochondrion, GOCC cytosolic ribosome, GOBP cytoplasmic translation, GOCC cytosolic large ribosomal subunit, GOCC ribonucleoprotein complex, GOMF structural constituent of ribosome, GOMF RNA binding, GOCC ribosomal subunit e GOBP intracellular transport (Figura 27) (Tabela 5). Adicionalmente, o enriquecimento em Genes característicos mapeados por ortologia identificou 4 vias distintas, sendo elas: Reactive oxygen species pathway, DNA repair, Peroxisome e adipogenesis.

Figura 26 - Enriquecimento em vias canônicas das amostras de BMMΦ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por *L. braziliensis*. As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas e analisadas em conjunto (semanas 2, 5 e 10) na plataforma online GSEA-MSigDB considerando FDR < 0,05. Em verde estão marcados os genes que tiveram alterações nas respectivas vias identificadas.



Fonte: Autora

Figura 27 - Enriquecimento em Ontologia genética das amostras de BMMΦ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por *L. braziliensis*. As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas e analisadas em conjunto (semanas 2, 5 e 10) na plataforma online GSEA-MSigDB considerando FDR < 0,05. Em verde estão marcados os genes que tiveram alterações nas respectivas vias identificadas.



Fonte: Autora

Figura 28 - Enriquecimento em Genes característicos mapeados por ortologia das amostras de BMMΦ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por *L. braziliensis*. As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas e analisadas em conjunto (semanas 2, 5 e 10) na plataforma online GSEA-MSigDB considerando FDR < 0,05. Em verde estão marcados os genes que tiveram alterações nas respectivas vias identificadas.



Fonte: Autora

Tabela 5 - Lista de vias identificadas no GSEA como alteradas nas amostras de BMM Φ após 2, 5 e 10 semanas de infecção por *L. braziliensis*

Nome do conjunto de Gene	Nº de Genes no conjunto (K)	Genes em sobreposição (k)	k/K	p-valor	FDR q-valor
HALLMARK Reactive oxygen species pathway	48	4	0.0833	0.000000263	0.0000131
HALLMARK DNA Repair	148	4	0.027	0.0000239	0.000597
HALLMARK Peroxisome	103	3	0.0291	0.000217	0.00362
HALLMARK Adipogenesis	200	3	0.015	0.0015	0.0187
REACTOME nonsense mediated decay NMD	116	7	0.0603	6.06E-11	0.000000075
REACTOME Eukaryotic translation Initiation	122	7	0.0574	8.67E-11	0.000000075
REACTOME Nonsense mediated decay nmd independent of the exon junction complex EJC	97	6	0.0619	1.33E-09	0.000000765
REACTOME Translation	231	7	0.0303	7.5E-09	0.00000324
REACTOME Metabolism of RNA	595	9	0.0151	1.91E-08	0.00000662
WP Cytoplasmic ribosomal proteins	80	5	0.0625	3.25E-08	0.00000938
REACTOME Major pathway of RRNA processing in the nucleolus and cytosol	181	6	0.0331	5.62E-08	0.0000139
WP mRNA processing	452	7	0.0155	0.000000716	0.000155
REACTOME Metabolismo of proteins	1762	11	0.0062	0.00000313	0.000602
WP Oxidative stress and redox pathway	92	4	0.0435	0.00000364	0.000629
GOBP Organonitrogen compound biosynthetic process	1690	15	0.0089	2.71E-10	0.00000287
GOCC Mitochondrion	1912	15	0.0078	1.47E-09	0.00000779

GOCC Cytosolic ribosome	139	6	0.0432	1.16E-08	0.0000411
GOBP Cytoplasmic translation	155	6	0.0387	2.23E-08	0.0000531
GOCC Cytosolic large ribosomal subunit	76	5	0.0658	2.51E-08	0.0000531
GOCC Ribonucleoprotein complex	871	10	0.0115	3.81E-08	0.0000673
GOMF Structural constituent of ribosome	178	6	0.0337	5.09E-08	0.000077
GOMF RNA Binding	1193	11	0.0092	6.71E-08	0.0000888
GOCC Ribosomal subunit	213	6	0.0282	0.000000147	0.000173
GOBP Intracellular transport	1354	11	0.0081	0.000000239	0.000252

Fonte: Autora

8 DISCUSSÃO DO MANUSCRITO 2

A leishmaniose é uma doença infecciosa cuja patogênese é influenciada por fatores como a genética do hospedeiro e do parasito, bem como pela resposta imunológica decorrente dessa interação (Franco; Beverley; Zamboni, 2012). A disseminação da *Leishmania* no organismo pode gerar manifestações clínicas que variam desde úlceras cutâneas autolimitadas até lesões mucosas desfigurantes ou, em casos severos, a forma visceral, que se não tratada pode causar a morte do paciente (Ashford, 2000; Akuffo *et al.*, 2018; Scorza, Carvalho, Wilson, 2017).

Estudos prévios da literatura mostram que *Leishmania* é capaz de modular a migração de diferentes células hospedeiras (Blewett *et al.*, 1971; Bray *et al.*, 1983; Hermida *et al.*, 2014; de Menezes *et al.*, 2017; Rebouças *et al.*, 2021). Contudo, a maioria desses estudos avalia a migração em sistemas bidimensionais, enquanto a infiltração celular nos tecidos ocorre em um ambiente tridimensional (Ley *et al.*, 2007). Modelos *in vitro* tridimensionais oferecem, portanto, maior relevância para o estudo da migração de fagócitos (Ley *et al.*, 2007; Vérollet *et al.*, 2011). Deste modo, no manuscrito I, ao investigar a migração de células hospedeiras em ambiente tridimensional, observamos que a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* reduz a migração de macrófagos murinos e humanos em ambiente 3D. Por outro lado, *L. infantum* aumentou a migração de CDs humanas. As alterações na migração tanto em macrófagos como em CDs foram correlacionadas com mudanças na formação de complexos de adesão e na dinâmica do citoesqueleto de actina. Estes dados corroboram com estudos anteriores em ambiente bidimensional que demonstraram que a infecção por *Leishmania* compromete a adesão dos macrófagos a substratos como colágeno, laminina e fibronectina (Carvalho *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2006) e que *L. amazonensis* reduz a migração de macrófagos em ambiente bidimensional (Blewett *et al.*, 1971; Bray *et al.*, 1983; de Menezes *et al.*, 2017). Em contraste, um único estudo mostrou que *L. infantum* aumenta a migração de BMMΦ via PI3K-dependente (Rocha *et al.*, 2020). Já as células dendríticas demonstram capacidade de migrar para linfonodos drenantes após infecção, possibilitando o transporte de antígenos (León *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2008). Adicionalmente, Rebouças e colaboradores (2021) mostraram que apenas *L. infantum*, mas não *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, induz essa migração de CDs em ambiente 2D. Em conjunto, os dados apresentados no manuscrito I mostram que a infecção por *Leishmania* spp. levam à redução da migração celular em macrófagos, reforçando o papel crítico dessas células no controle dos parasitos no local da lesão. Além disso, os achados apresentados também fornecem evidência de aumento da

migração de células dendríticas humanas após infecção por *L. infantum*, sugerindo uma possível associação entre esse tipo celular e a visceralização da doença no hospedeiro vertebrado.

A infecção por *L. braziliensis*, principal agente etiológico da LT no Brasil (Alvar *et al.*, 2012), induz a produção de mediadores inflamatórios que intensificam o recrutamento celular, contribuindo para a formação das lesões ulcerativas características da doença (Ashford, 2000; Akuffo *et al.*, 2018; Scorza, Carvalho, Wilson, 2017). Apesar dessas evidências, os efeitos da infecção *in vivo* sobre a ativação, recrutamento e migração de células derivadas da medula óssea, particularmente macrófagos, ainda são pouco compreendidos. Considerando a plasticidade funcional dessas populações e a complexidade do microambiente hematopoiético durante a infecção, torna-se essencial aprofundar os estudos sobre a dinâmica de recrutamento e diferenciação de células mieloides oriundas da medula óssea.

Embora a infecção da medula óssea seja um achado clássico na LV, evidências recentes indicam que, mesmo nas formas tegumentares, a medula pode ser funcionalmente afetada. Infecções persistentes por *L. major* demonstraram que o microambiente inflamatório periférico é suficiente para ativar células-tronco/progenitoras hematopoéticas, promovendo mielopoese, mesmo sem a presença direta do parasito (Boettcher *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2022). Adicionalmente, em estudo recente, foi relatada a presença de *L. braziliensis* na medula óssea de camundongos infectados (Floro e Silva *et al.*, 2022), embora ainda faltem evidências claras dessa disseminação para órgãos visceralizantes em indivíduos com LT. Casos isolados, como o de um paciente HIV positivo com parasitos na punção esternal da medula, sugerem que a coinfeção e a imunossupressão podem favorecer essa disseminação (Barro-Traoré *et al.*, 2008). Além disso, infecções cutâneas crônicas também parecem modificar a sinalização de citocinas e quimiocinas no nicho hematopoiético, influenciando a produção de células mieloides e modulando a resposta imune sistêmica na LT (Ferreira *et al.*, 2022). Esses dados reforçam a hipótese de que a medula óssea, além de ser um alvo nas formas visceralizantes, atua como regulador da inflamação sistêmica também na LT. Adicionalmente, o microambiente inflamatório periférico induzido por *Leishmania* parece modular a hematopoese e alterar o recrutamento de macrófagos e células dendríticas a partir da medula (Follador *et al.*, 2002; Passos *et al.*, 2015), sugerindo que esta possa servir como elo entre o processo inflamatório periférico e a manutenção da resposta imune.

Os resultados apresentados no Manuscrito II indicam que BMM Φ de camundongos previamente infectados por *L. braziliensis* respondem de forma diferenciada à infecção *in vitro*, quando comparados aos BMM Φ de animais saudáveis. Embora nos estágios iniciais da infecção não tenham sido observadas diferenças significativas no percentual de infecção ou na carga

parasitária entre os grupos, após 10 semanas, período em que os animais já apresentavam redução na lesão da úlcera auricular e sinais de cicatrização (Oliveira; Barral, 2005), os BMMΦ dos animais infectados exibiram uma redução significativa no percentual de infecção e na carga parasitária. Esses achados sugerem que o microambiente hematopoiético sofre modulações ao longo da infecção, promovendo alterações funcionais nos progenitores mielóides que resultam em macrófagos mais eficientes no controle da infecção. Tal adaptação pode estar associada à indução de memória inata e à reprogramação funcional das células efectoras geradas durante a infecção (Ferreira *et al.*, 2022).

Os ensaios de migração em ambiente bidimensional e tridimensional deste estudo mostraram que macrófagos G1 + *L. braziliensis* e G2, após 2, 5 ou 10 semanas de infecção, apresentaram migração reduzida em comparação a G1, em todos os períodos analisados. Esse dado sugere uma modulação do microambiente da medula óssea, levando à ativação do macrófago G2 semelhante àquela induzida pela *Leishmania* (observada em G1 + *L. braziliensis*), apesar desta célula não ter sido infectada. Curiosamente, observamos ainda que G2 + *L. braziliensis* têm sua capacidade migratória alterada, aumentando a migração quando comparado a G2, o que reforça a hipótese de que a infecção *in vivo* leva a uma alteração do microambiente da medula e, conseqüentemente, da ativação das células precursoras neste tecido. Apesar de estudos anteriores já terem demonstrado que *Leishmania* é capaz de modular a migração de células hospedeiras (Blewett, Kadivar, Soulsby. 1971; Bray *et al.*, 1983; Carvalhal *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2006; De Menezes *et al.*, 2016), a maioria deles investiga os efeitos da infecção por *Leishmania* sobre a migração de macrófagos baseia-se em modelos *in vitro*. Esses estudos, embora valiosos para elucidar mecanismos celulares e moleculares básicos, não reproduzem integralmente o ambiente complexo e dinâmico do hospedeiro infectado, bem como, os mecanismos de regulação da migração celular que ocorrem *in vivo*, onde múltiplos sinais sistêmicos, fatores do microambiente tecidual e resposta imunológica influenciam o comportamento celular. Nesse contexto, destaca-se a importância da modulação da medula óssea durante a infecção por *Leishmania*. Em estudo recente, foi demonstrado que a infecção *in vivo* é capaz de reprogramar funcionalmente precursores mielóides ainda na medula óssea (Ferreira *et al.*, 2022). Nossos achados reforçam que a regulação deste tecido pode impactar na diferenciação e o fenótipo de macrófagos, influenciando assim na sua capacidade de responder à infecção e no recrutamento dessas células para o local da infecção.

Um dos mecanismos fundamentais na regulação da migração celular é a formação de complexos de adesão. Estudos com fibroblastos embrionários de camundongos deficientes em

FAK, nos quais a paxilina é incapaz de se ligar a esta proteína, demonstraram perda de localização e fosforilação de FAK nos pontos de adesão focal, resultando em alterações na dinâmica migratória e inibição da adesão celular (Deramautd, 2014). Nossos resultados indicam uma menor formação de complexos de adesão em G2 e G1 + *L. braziliensis*, em comparação a G1, mostrando novamente uma resposta similar de G2 às células G1 + *L. braziliensis*, apesar dos macrófagos G2 não terem sido infectados. Essa diferença foi evidenciada por uma redução na expressão das formas fosforiladas de FAK e paxilina, observada de forma consistente tanto em ambientes bidimensionais quanto tridimensionais, ao longo de todas as semanas avaliadas. Esses dados sugerem que a alteração na formação de complexos de adesão é um fenômeno contínuo, mantido durante a progressão da infecção. Adicionalmente, esse dado reforça a hipótese de que a modulação do ambiente da medula óssea induzida pela infecção *in vivo* influencia no perfil de ativação do macrófago oriundo deste tecido. Além disso, observamos que G2 + *L. braziliensis*, apresentaram aumento na expressão de pFAK e pPaxilina em relação a G2, indicando que a infecção modula a formação desses complexos. Em estudo conduzido por Menezes e colaboradores (2016), foi demonstrado que a redução da migração de macrófagos em ambiente bidimensional após a infecção por *L. amazonensis*, está associada à diminuição da formação dos complexos de adesão e à alteração na dinâmica do citoesqueleto de actina. Corroborando com esses achados, observamos também uma menor expressão de pFAK e pPaxilina em macrófagos murinos e humanos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* em ambiente tridimensional (Luz *et al.*, 2023), reforçando a relevância da modulação desses componentes na resposta migratória celular durante a infecção. Nossos achados estão de acordo com a literatura que mostram que a adesão celular é fundamental para que as células migrem de forma eficaz (Parsons *et al.*, 2010; Owen *et al.*, 2007).

Um outro mecanismo de migração importante é a organização do citoesqueleto de actina que desempenha um papel fundamental durante o processo de migração, sendo a família de Rho-GTPase essencial nessa dinâmica (Ridley; Hall, 1992). Já foi demonstrado que a inibição de Rho GTPases provoca deficiência na migração celular (Sander *et al.*, 1999). Assim, para avaliar o efeito da dinâmica da actina ao longo da infecção em camundongos infectados por *L. braziliensis* e seu possível envolvimento na modulação da migração em ambiente bidimensional e tridimensional, a marcação de F-actina por faloidina e a expressão de moléculas envolvidas na dinâmica destes filamentos de actina como Rac1, Cdc42, RhoA e gelsolina. Nossos resultados indicaram um aumento da expressão de Rac1 e de Cdc42 em G2 em 2 e 5 semanas quando comparados a G1, em ambiente 2D e 3D. Paralelo a isso, foi observado uma redução da expressão de Rac1 e Cdc42 em G2 + *L. braziliensis*, em relação a G2, o que não foi observada

em G1 + *L. braziliensis*, em relação a G1, em ambiente 2D e 3D. Em contraste, no ponto de 10 semanas após a infecção *in vivo* observamos uma redução da expressão apenas de Cdc42, em G2 quando comparados a G1, em ambiente 2D e 3D. Foi observado ainda no ponto de 10 semanas um aumento de Rac1 e Cdc42 em G2 + *L. braziliensis*, em relação a G2, em ambiente 2D e 3D, indicando que há uma modulação da organização do citoesqueleto de actina na borda anterior da célula. Estudos anteriores já demonstraram que macrófagos nocautes para Rac1, perdem a capacidade invasiva em ambientes de matriz densa (Wheeler *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que a infecção por *L. braziliensis in vivo* pode levar ao aumento da dinâmica de actina e protusão na borda anterior da célula nos pontos iniciais da lesão, em 2 e 5 semanas, em contrapartida, em momentos mais tardios da infecção *in vivo*, há uma redução da dinâmica na borda de ataque da célula. Estudos anteriores já demonstraram que macrófagos nocautes para Rac1, perdem a capacidade invasiva em ambientes de matriz densa (Wheeler *et al.*, 2006). Foi demonstrado também um aumento da dinâmica de actina em macrófagos murinos após a infecção *in vitro* por *L. amazonensis* (de Menezes *et al.*, 2016). De forma similar, estudos relataram o aumento da expressão de Rac1 após a infecção *in vitro* de macrófagos murinos por *L. braziliensis* e *L. infantum*, ao passo que a infecção por *L. amazonensis* leva ao aumento da expressão de Cdc42. Em contraste, em macrófagos humanos observa-se uma redução da expressão de Rac1 e de Cdc42 após a infecção *in vitro* por diferentes espécies de *Leishmania* (Luz, *et al.* 2023). Estes dados sugerem que a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* pode levar a uma alteração da dinâmica de actina e protusão na borda anterior da célula, resultando na alteração da migração celular.

Em relação à RhoA, proteína responsável pela formação de fibras de estresse no corpo celular e na porção posterior da célula (Ridley e Hall, 1992), sua atividade está associada à redução de protrusões celulares (Nobes e Hall, 1999; Rottner, Hall e Small, 1999). A ativação da ROCK por RhoA pode inibir a polimerização de actina (Zebda *et al.*, 2000). Nossos resultados mostram uma redução da expressão de RhoA no grupo G2 em comparação ao grupo G1, tanto em ambiente 2D quanto 3D, em todas as semanas avaliadas. Além disso, observamos um aumento na expressão de RhoA no grupo G2 + *L. braziliensis*, em relação ao G2, também em ambos os ambientes após 10 semanas de infecção *in vivo*, indicando uma possível modulação da contração do citoesqueleto de actina. Estudos prévios já demonstraram uma redução da expressão de RhoA em macrófagos murinos infectados *in vitro* por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, bem como em macrófagos humanos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* (Luz *et al.*, 2023), sugerindo que a infecção por *Leishmania* pode suprimir a atividade de RhoA.

Além da família Rho GTPase, investigamos o papel da gelsolina, uma proteína de ligação à actina que promove a fragmentação dos filamentos de F-actina (Khaitlina, Fitz e Hinssen, 2013; McGough *et al.*, 2003; Silacci *et al.*, 2004). Neste estudo, observamos um aumento na expressão de gelsolina em BMM Φ de camundongos após 2 semanas de infecção *in vivo*, quando comparados aos BMM Φ de animais saudáveis, em ambiente 2D e 3D. Além disso, após 5 semanas de infecção *in vivo*, também observamos uma redução da expressão de gelsolina em comparação aos animais saudáveis, em ambiente bidimensional. Em ambiente tridimensional, houve uma redução após 10 semanas, em relação aos controles saudáveis. Esses achados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram a redução da expressão de gelsolina em macrófagos murinos infectados *in vitro* por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em ambiente tridimensional (Luz *et al.*, 2023).

Os podossomos são estruturas especializadas de adesão celular, caracterizadas por um núcleo central rico em F-actina, cercado por proteínas associadas à adesão, como talina e vinculina. Essas formações atuam como pontos de contato entre a célula e a matriz extracelular (Murphy e Courtneidge, 2011; Foxall *et al.*, 2016; Martino *et al.*, 2016). Neste estudo, ao avaliarmos a expressão de talina e vinculina em ambiente bidimensional, observamos uma redução na expressão de talina em BMM Φ de camundongos após 2 e 5 semanas de infecção *in vivo*, em comparação aos BMM Φ de animais saudáveis. No entanto, após 10 semanas de infecção, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No ponto de 5 semanas, observamos ainda um aumento na expressão de vinculina no grupo G2 + *L. braziliensis* em relação ao G2. Por outro lado, não foram detectadas diferenças estatísticas na expressão de talina entre os grupos ao longo das semanas avaliadas. Evidências da literatura indicam que alterações na expressão e na organização espacial das proteínas talina e vinculina em células infectadas por patógenos intracelulares podem influenciar diretamente a capacidade migratória dessas células (Brito *et al.*, 2023; Cook, Ueno e Lodoen, 2018; Melo *et al.*, 2018). Já foi relatada, por exemplo, uma redução nas áreas de adesão contendo vinculina em macrófagos infectados por *Toxoplasma gondii*, associada ao aumento da migração celular (Cook, Ueno e Lodoen, 2018). Em relação à *Leishmania*, Brito e colaboradores (2023) demonstraram que macrófagos infectados por *L. amazonensis* apresentam redução na expressão de talina e vinculina. Os dados apresentados neste estudo, em conjunto com a literatura, indicam que a infecção *in vivo* por *Leishmania* é capaz de modular a expressão de proteínas associadas à formação de podossomos de maneira dinâmica e dependente do tempo de infecção.

Além da migração amebóide, a migração do tipo mesenquimal é essencial para o deslocamento celular através dos tecidos, permitindo, a transposição de barreiras estruturais

como a membrana basal (Van Goethem et al, 2010). Nesse tipo de migração os macrófagos adotam predominantemente um padrão de migração que depende da secreção de proteases e da subsequente degradação da matriz extracelular (Wiesner, 2014). Esse processo de degradação é mediado principalmente por MMPs (Verollet *et al.*, 2011). A literatura evidencia que a infecção por *Leishmania* induz a expressão de MMPs em macrófagos do hospedeiro, facilitando a degradação da matriz extracelular (Liarde *et al.*, 2001; Carvalhal *et al.*, 2004). A participação dessas enzimas já foi correlacionada com a progressão da LV tanto em humanos quanto em cães (Machado *et al.*, 2010). A elevação da atividade dessas enzimas também tem sido apontada como indicativa do desenvolvimento da forma mucocutânea da doença (Murase *et al.*, 2018; Maretti-Mira *et al.*, 2011). Ao quantificar as MMPs nos sobrenadantes do cultivo dos macrófagos, nossos resultados indicaram um que no ponto de 2 semanas houve um aumento da MMP2, MMP8 MMP9 MMP12 em G2 em relação a G1. Foi observado também uma redução das MMP2, MMP9 e MMP12 em BMM Φ em G2 + *L. braziliensis*, em relação a G2. Em contrapartida, no ponto de 5 semanas, destaca-se a redução da MMP8, MMP9 e MMP12 nos em G2 e em G2 + *L. braziliensis*, em relação a G1. Adicionalmente, observamos um aumento das MMP9 e MMP12 em G2 + *L. braziliensis* em relação a G2. No ponto de 10 semanas não foi observado diferença significativa entres os grupos para as MMPs avaliadas. Estudos já relataram níveis baixos de MMP2 após a infecção por *Leishmania* (Machado *et al.*, 2010; Maretti-Mira *et al.*, 2011), o aumento de MMP2 está também associado com o processo de reepitelização das lesões e sucesso terapêutico (Maretti-Mira *et al.*, 2011). Com relação a MMP8, estudos já demonstraram um aumento na secreção dessa metaloproteinase, por células infectadas com Δ *lpg1* *L. infantum* em comparação com aquelas infectadas com parasitas WT. Além disso, a degradação da matriz de colágeno I foi significativamente aumentada em células infectadas com parasitas Δ *lpg1*, mas não em controles infectados com WT (Quintela-Carvalho, et al. 2022). Níveis elevados de MMP9 têm sido observados em contextos de infecção por *Leishmania*, estando associados à degradação extracelular da matriz e à modulação da permeabilidade microvascular, eventos importantes na resposta inflamatória (Campos *et al.*, 2014; Maretti-Mira *et al.*, 2011). Macrófagos de indivíduos com menor atividade de MMP9 demonstrou serem mais eficazes no controle da infecção por *L. braziliensis* no sítio inicial da infecção, o que pode contribuir para o desenvolvimento da forma LCL (Maretti-Mira *et al.*, 2011). Pacientes na fase pré-ulcerativa da doença produzem níveis de MMP9 menores do que os que estão em fase ulcerativa, sugerindo que a progressão da doença pode estar associada com o aumento dos níveis de MMP9 (Campos *et al.*, 2014). Contudo, estudos na literatura não

observaram o balanço das MMPs, na progressão da leishmaniose em conjunto com a migração de macrófagos após a infecção *in vivo*.

Pesquisas em grande escala têm contribuído para a identificação de novos genes e redes de interação genética, além de aprofundar a compreensão sobre como células e organismos respondem a diferentes estímulos. Contudo, é fundamental utilizar métodos que possibilitem a análise das proteínas em sua forma nativa, refletindo os níveis reais das proteínas funcionalmente expressas pelas células (Gygi *et al.*, 1999). Nesse contexto, as análises proteômicas têm se mostrado ferramentas essenciais para identificar, em larga escala, a composição proteica das células em resposta a estímulos externos e internos (Graves; Haystead, 2002). Deste modo, no manuscrito II utilizamos análise proteômica com o objetivo de investigar as alterações induzidas em BMMF após a infecção *in vivo* de camundongos.

No ponto de 2 semanas após a infecção por *L. braziliensis*, foram identificadas 26 proteínas diferentemente reguladas. A proteína mitocondrial Hidroxiacil Glutathiona Hidrolase (HAGH), com expressão aumentada em G2 e diminuída em G1, integra o sistema glioxalase, principal via de detoxificação do metilglioxal, subproduto tóxico da glicólise, convertendo-o em d-lactato através da glutathiona (Cordell *et al.*, 2004). Nos tripanossomatídeos, o acúmulo de metilglioxal, seja por aumento de sua produção ou inibição de sua degradação, pode ser letal aos parasitas, o que torna o sistema glioxalase um potencial alvo terapêutico (Souza *et al.*, 2005). Outra enzima com expressão aumentada em G2 e reduzida em G1 + *L. braziliensis* foi a Fosfatidato citidina transferase 2 (CDS2). Essa proteína catalisa a redução de moléculas N-oxigenadas, atuando como contrapartida do citocromo P450 e das monoxigenases contendo flavina em ciclos metabólicos (Ott *et al.*, 2014; Kotthaus *et al.*, 2011). Já a proteína CUGBP Membro da família Elav-like 2 (CELF2), que também apresentou expressão aumentada em G2 e reduzida em G1 + *L. braziliensis*, está envolvida em adesão de células T e apoptose mediados por p53 (Saller *et al.*, 1999; Mayne *et al.*, 2004). Além dessas, a Di-N-acetilquitobiase (Ctbs) também apresentou expressão aumentada em G2 e expressão reduzida em G1 + *L. braziliensis*. Esta proteína participa da degradação de glicoproteínas ligadas à asparagina (Fisher; Aronson, 1992).

A maior parte das proteínas diferentemente expressas apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis*. A enzima mitocondrial Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase (HADH), apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e diminuída em G1 + *L. braziliensis*, e está associada à beta-oxidação de ácidos graxos (Barycki *et al.*, 1999; Clayton *et al.*, 2001). Dados na literatura já associaram sua expressão reduzida ao aumento da expressão de p-Akt e à expressão reduzida de PTEN, que promove a migração e invasão de células de

câncer gástrico (Shen, 2017). Com relação à infecção por *Leishmania*, um único estudo utilizando dados transcriptômicos de BMM Φ infectados por *L. major* observou a coexpressão dos genes *Acod1*, *Ldlr*, *Hadh* e *Src*, associando-os ao metabolismo lipídico e à polarização de macrófagos em direção ao fenótipo M2, criando assim um ambiente favorável à sobrevivência de *Leishmania* (Kihel *et al.*, 2025). O componente redutor de amidoxima mitocondrial 2 (MTARC2) também apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e expressão diminuída em G1 + *L. braziliensis*. Essa proteína catalisa a redução de moléculas N-oxigenadas, atuando como contrapartida do citocromo P450 e das monoxigenases contendo flavina em ciclos metabólicos (Ott *et al.*, 2014; Kotthaus *et al.*, 2011). Outra proteína que apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e expressão reduzida em G1 + *L. braziliensis* foi a subunidade B do fator de iniciação da tradução eucariótica 3 (EIF3B). Esta proteína é um componente de ligação ao RNA do complexo do fator de iniciação da tradução eucariótica 3 (eIF-3), necessário para várias etapas do início da síntese proteica. A depleção de eIF3b reduziu o crescimento de células cancerígenas *in vitro*, inibiu a migração e interrompeu o citoesqueleto de actina e as adesões focais (Wang, 2013). Adicionalmente, a supressão de EIF3B inibiu a invasão e a metástase de células do carcinoma por meio da estimulação da via de sinalização TGFBI/MAPK/ERK (Wang *et al.*, 2024). Além das proteínas mencionadas acima, a proteína 1 contendo domínio isocorismatase (ISOC1) também apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis* e G2. Essa proteína, pertencente à família das hidrolases, pode catalisar a transformação do isocorismato em 2,3-di-hidroxi-2,3-di-hidrobenzoato e piruvato (Young; Gibson, 1969). Estudos recentes revelaram que a expressão de ISOC1 foi aumentada em tecidos de câncer de pulmão e que esse aumento está associado ao aumento da proliferação, migração e invasão, causando um pior prognóstico dos pacientes (Shi *et al.*, 2021). *In vitro*, a inibição da expressão de ISOC1 inibiu a proliferação e a migração e induziu a apoptose de células de câncer de cólon através da via AKT/GSK-3 β (Gao *et al.*, 2020). Outro estudo mostrou que a inibição do ISOC1 pode prejudicar a tumorigênese e a progressão do câncer gastrointestinal por meio da ativação da via da proteína quinase B (Akt)/glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 β) (Cheng *et al.*, 2019). Outra proteína descrita por participar do processo de migração celular foi a proteína 4 do canal intracelular de cloreto (CLIC4), que apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1. Em seu estado solúvel, essa proteína catalisa reações de troca de dissulfeto de tiol semelhantes à glutaredoxina com glutatona reduzida como doador de elétrons (Al Khamici *et al.*, 2015). Esta também pode se inserir em membranas e formar canais condutores de íons dependentes de voltagem (Littler *et al.*, 2005). A superexpressão do CLIC4 pode reativar os efeitos supressores de tumores

induzidos pela inibição do TDRG1, que é capaz de promover a proliferação, migração e invasão celular no câncer de mama (Lv; Dong; Gao, 2021). Na membrana plasmática, o CLIC4 neutraliza a formação de filopódios e, após a ativação de Rho, o CLIC4 transloca-se reversivelmente do citosol para a membrana plasmática para regular a adesão e a migração celular (Argenzio; Innocenti, 2020). Adicionalmente, a Endofilina-B1 (SH3GLB1) também apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1. Esta proteína é necessária para a dinâmica normal da membrana mitocondrial externa e no transporte mediado por coatômero (Yang *et al.*, 2006). Além disso, há indícios de que está envolvida na ativação do apoptose dependente de caspase, promovendo a ativação de BAX/BAK1 (Takahashi *et al.*, 2005). A isoforma 1 ativa a lipídio quinase de PIK3C3 durante a autofagia e regula o tráfego de ATG9A do complexo de Golgi para o citoplasma periférico para a formação de autofagossomos, induzindo a fragmentação da membrana de Golgi (Wang *et al.*, 2014). Já a proteína 2-hidroxiacil-CoA liase 2 (ILVBL), apresentou expressão aumentada em G2 e G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis* e está envolvida na clivagem dependente de TPP durante a alfa-oxidação de ácidos graxos no retículo endoplasmático (Kitamura *et al.*, 2017).

Apenas uma proteína apresentou expressão aumentada em G1 e uma em G1 + *L. braziliensis*. A Proteína 2 que interage com FMR1 citoplasmática (CYFIP2) teve sua expressão aumentada em G1 e reduzida em G1 + *L. braziliensis* e participa da remodelação de actina e a metástase em câncer de mama através do eixo ELK3-CYFIP2 (Choi *et al.*, 2025). Já a proteína do grande transportador de aminoácidos neutros subunidade pequena 4 (SLC43A2) apresentou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e expressão reduzida em G2. Essa proteína é responsável por mediar o transporte dos aminoácidos estereoespecíficos L-fenilalanina, L-metionina e L-ramificados entre o espaço extracelular e o citoplasma, e controlar a reabsorção transepitelial de aminoácidos neutros (Bodoy *et al.*, 2005).

O perfil proteômico identificado na segunda semana de infecção por *L. braziliensis* revela um momento crítico na patogênese da LT, caracterizado pelo início da formação da lesão cutânea e pela ativação das primeiras respostas imunes adaptativas no modelo murino (Oliveira; Barral, 2005). Nesse estágio, observam-se alterações marcantes em vias relacionadas à migração celular, adesão, remodelação do citoesqueleto e metabolismo energético, sugerindo um cenário de recrutamento ativo de células imunes para o sítio da infecção (Scott; Novais, 2016). Ao todo, doze proteínas foram associadas a processos de migração celular, incluindo ARHGAP1, envolvida na regulação das Rho GTPases (RhoA, Rac1 e Cdc42), fundamentais para a dinâmica do citoesqueleto (Ridley e Hall, 1992; Sander *et al.*, 1999); CYFIP2, que atua

na adesão de células T e remodelação de actina (Saller *et al.*, 1999; Mayne *et al.*, 2004); EIF3B, relacionada à estrutura do citoesqueleto e adesões focais, com ação funcional dupla sobre o citoesqueleto e a adesão (Wang, 2013); ISOC1, envolvida em migração e invasão via AKT/GSK-3 β (Gao *et al.*, 2020); CLIC4, que regula a adesão e a migração celular por meio de sua translocação para a membrana após ativação de Rho (Argenzio e Innocenti, 2020); HADH, cuja expressão reduzida está associada à ativação da via AKT e aumento da migração em células tumorais (Shen, 2017); STIM1, amplamente estudada por seu papel na migração celular, modulando a polimerização de actina, formação de protrusões, ativação de PI3K, Rac1, cofilina, miosina, FAK, paxilina e vinculina (Pollard e Borisy, 2003; Evans e Falke, 2007; Price *et al.*, 2003; Larsson, 2006; Lin, 2021), estando também associada à metástase em carcinomas hepatocelulares (Zhao *et al.*, 2020) e à migração de células dendríticas (Nunes-Hasler *et al.*, 2017); U2AF2, cuja estabilização promove tumorigênese via sinalização AKT/mTOR (Li *et al.*, 2019) e que regula a troca de isoformas de CD44 necessária à migração e metástase via ativação de Src/Fak/RhoA (Zhang, 2016); FES, tirosina-proteína quinase que regula a migração celular via glicosilação do α -dístroglicano (Yoneyama *et al.*, 2012), promove migração por meio da via JNK (Li *et al.*, 2019) e atua no recrutamento de leucócitos durante a inflamação (Parsons *et al.*, 2007); ABRACL, proteína da família Costars que modula a migração celular alterando a dinâmica da actina (Hsiao *et al.*, 2021); CELF2, envolvida na modulação de múltiplas vias de sinalização celular como MAPK, PI3K/AKT, ERAD, autofagia e Wnt/ β -catenina (Li *et al.*, 2023), associada a proliferação, migração e invasão em diversos tipos de câncer (Liao, Chen e Wang, 2019; Shi *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020); e PRDX1, associada à migração e invasão celular em vários tipos de câncer (Fang *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2017). Dentre essas proteínas, algumas já foram previamente associadas à infecção por *Leishmania*, reforçando sua relevância no contexto da patogênese. A ARHGAP1, ativadora de GTPase da família Rho, foi descrita como modulada em macrófagos e células dendríticas infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*, sugerindo seu papel na reorganização do citoesqueleto induzida pelo parasita (Rebouças, 2021; Luz *et al.*, 2023). A HADH, enzima mitocondrial envolvida na beta-oxidação de ácidos graxos, foi identificada em análises transcriptômicas de macrófagos infectados por *L. major*, sendo coexpressa com outros genes relacionados ao metabolismo lipídico e à polarização para o fenótipo M2, o que favorece a sobrevivência do parasita (Kihel *et al.*, 2025). Além delas, a proteína mitocondrial HAGH (Hidroxiacil Glutathiona Hidrolase), integrante do sistema glioxalase, desempenha um papel essencial na detoxificação do metilglioxal, cujo acúmulo pode ser letal aos tripanossomatídeos, sendo considerada um potencial alvo terapêutico (Souza *et al.*, 2005). A PRDX1

(Peroxirredoxina-1), por sua vez, integra a maquinaria antioxidante de *Leishmania* e contribui para a resistência do parasita frente à ação microbicida do hospedeiro, sendo investigada como alvo terapêutico em diferentes estudos (Barr; Gedamu, 2003; Jaeger; Flohé, 2006; Iyer *et al.*, 2008; Castro, Duarte; Tomás, 2018; Acestor *et al.*, 2006). A enzima APRT (Adenina Fosforribosiltransferase), essencial na recuperação de adenina e síntese de poliaminas, é indispensável para o metabolismo de protozoários como *L. donovani*, reforçando a importância das vias de purina na manutenção da viabilidade do parasita (Phillips *et al.*, 1999; Bashor *et al.*, 2002). Assim, a segunda semana de infecção representa um ponto-chave de transição, no qual o perfil proteico dos macrófagos reflete um equilíbrio dinâmico entre as respostas do hospedeiro para conter a infecção e alterações celulares associadas à presença do parasita, em um cenário marcado pelo surgimento das primeiras lesões cutâneas, inflamação local e ativação dos processos imunológicos iniciais.

Nosso estudo foi capaz de identificar, no ponto de 5 semanas após a infecção de camundongos por *Leishmania braziliensis*, um total de 11 proteínas diferencialmente expressas. Duas proteínas descritas por participar o processo de migração celular apresentam expressão aumentada em G1, G2 e G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. A subunidade 4 do complexo THO (ALYREF) atua como adaptador de exportação de mRNA, integrando o complexo TREX, que participa da transcrição, processamento e exportação nuclear de mRNAs (Guo *et al.*, 2005; Masuda *et al.*, 2005). Estudos mostram que ALYREF, por meio da interação com mRNAs como o de Cdc42, pode promover proliferação, migração e invasão celular via sinalização PI3K-AKT (Zhao *et al.*, 2004). Já a proteína associada à membrana de vesícula (VAPA) ancorada no retículo endoplasmático (RE) que medeia a formação de locais de contato entre o RE e os endossomos por meio da interação com proteínas contendo o motivo FFAT, como STARD3 ou WDR44 (Di Mattia *et al.*, 2020). Além disso, é recrutada para a membrana plasmática por meio da ligação de OSBPL3 (Weber-Boyvat *et al.*, 2015). O complexo OSBPL3-VAPA estimula a sinalização RRAS, que por sua vez atenua a ativação da integrina beta-1 (ITGB1) na superfície celular (Weber-Boyvat *et al.*, 2015). Células epiteliais de adenocarcinoma depletadas para VAPA exibem vários defeitos de motilidade coletiva e individual, citoesqueleto de actina desorganizado e atividade protrusiva alterada. Adicionalmente, durante a migração, o VAPA regula a dinâmica das adesões focais (Siegfried *et al.*, 2024). Com relação a *Leishmania*, estudo mostra que após a infecção de BMMΦ com *L. amazonensis*, VAPA se associa gradualmente a vacúolos parasitóforos e que a inibição da VAPA impediu a replicação do parasito (Gdovinova; Descoteaux, 2025).

Das onze proteínas identificadas no ponto de 5 semanas, quatro proteínas apresentaram expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis*. A subunidade 1 da manosiltransferase dolicol-fosfato (DPM1) apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. Essa enzima participa da síntese de dolicol fosfato manose, essencial para glicosilação de proteínas (Maeda *et al.*, 2000). Outra proteína que apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis* foi a 6-fosfogluconato desidrogenase descarboxilante (PGD). Esta proteína é responsável por catalisa a descarboxilação oxidativa de 6-fosfogluconato em ribulose 5-fosfato, com redução de NADP em NADPH (Wexler *et al.*, 1998). A inibição da atividade da PGD atenuou a proliferação, migração e invasão de células de adenocarcinoma de pulmão, através da inibição de p-AMPK (Wu *et al.*, 2024). Além disso, a inibição da 6PGD inibiu significativamente a fosforilação da c-Met, o que se correlacionou com a inibição da migração celular *in vitro* em células de câncer de pulmão (Chan; VanderLaan; Sukhatme, 2013). Adicionalmente, a inibição da 6PGD ativa AMPK e reduz a atividade de RhoA e Rac1, influenciando a migração de células de câncer cervical (Guo *et al.*, 2019). Além dessas proteínas, a proteína 1 do canal intracelular de cloreto (CLIC1) também apresentou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G1 + *L. braziliensis*. No estado solúvel, essa proteína catalisa reações de troca de dissulfeto de tiol. Pode se inserir em membranas e formar canais condutores multi-íons dependentes de voltagem (Al Khamici *et al.*, 2015; *et al.*, 2023). A inibição de CLIC1 diminuiu a geração de ROS, a migração celular, a invasão e a fosforilação de ERK induzidas por hipóxia-reoxigenação em células LOVO. Além disso, a expressão de MMP2 e MMP9 pôde ser regulada pela via ROS/ERK mediada por CLIC1 (Wang *et al.*, 2014). Já a proteína de ligação à fosfatidiletanolamina 1 (PEBP1) mostrou expressão aumentada em G2 + *L. braziliensis* e reduzida em G2. Essa proteína liga-se a ATP e inibe a atividade quinase do RAF1, inibindo sua ativação e dissociando o complexo RAF1/MEK (Rath *et al.*, 2008). Estudos na literatura já demonstraram a relação dessa proteína com o processo de proliferação e invasão em diferentes tipos de câncer via eixo PI3K/Akt/mTOR (Jian W, *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2015). A supressão da degradação de PEBP1 é capaz de ativação da sinalização RAF1/MEK/ERK induzida por RIPK4 e a migração ou invasão de células cancerígenas do pâncreas (Qi *et al.*, 2018). Adicionalmente, a diminuição da expressão de PEBP1 consegue aumentar a expressão de MMP2 (Huang *et al.*, 2018).

Das proteínas diferentemente expressas em cinco semanas, apenas uma proteína apresentou expressão aumentada apenas em G1. A prenilecisteína oxidase 1 (PCYOX1) cliva a ligação tioéter de prenile-L-cisteínas, como farnesilcisteína e geranilgeranilcisteína (Tschantz *et*

al., 2001). Adicionalmente, três proteínas apresentaram expressão aumentada apenas em G1 + *L. braziliensis*. A proteína de choque térmico mitocondrial 70 (HSPA9) apresentou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida nos demais grupos. Essa chaperona mitocondrial atua no dobramento, montagem e importação de proteínas (Zhai *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2017). Já a peroxirredoxina-2 (PRDX2) teve expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida nos grupos G1 e G2. Esta proteína atua na neutralização de peróxidos, desempenhando papel na proteção contra estresse oxidativo e na regulação de vias de sinalização redox (Kang *et al.*, 1998). Além disso, está associada a migração e invasão em diferentes tipos de câncer (Guo *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2020; Jing *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2025). Foi mostrado ainda que inibição de PRDX2 consegue inibir a atividade de MMP9, resultando na menor capacidade invasiva em sarcoma de Ewing (Xue; Fan; An, 2024). Além dessas proteínas, a proteína unc-93 homólogo B1 (Unc93b1) apresentou expressão aumentada em G1 + *L. braziliensis* e reduzida em G2 + *L. braziliensis*. Ela regula a sinalização de receptores Toll-like (TLRs), essenciais para a imunidade inata. Em camundongos, a mutação de UNC93B1 leva à maior susceptibilidade à *L. major* (Schamber *et al.*, 2013), indicando um possível papel na resposta contra *Leishmania*.

Em síntese, das onze proteínas identificadas como diferentemente expressas no ponto de cinco semanas após a infecção, seis apresentaram evidências de envolvimento com a migração celular: ALYREF, PEBP1, PRDX2, PGD, VAPA e CLIC1. Essas proteínas atuam em diferentes vias moleculares relacionadas à motilidade, como PI3K-AKT (ALYREF), RAF/MEK/ERK e MMPs (PEBP1), modulação redox e MMP9 (PRDX2), AMPK, RhoA/Rac1 (PGD), regulação de adesão e protrusões celulares (VAPA), e via ROS/ERK-MMP2/MMP9 (CLIC1). A atuação convergente dessas proteínas em vias de remodelamento do citoesqueleto, degradação da matriz extracelular e sinalização de migração sugere um papel importante na modulação tecidual em resposta à infecção. Considerando que a análise foi realizada 5 semanas após a infecção, período crítico em que se observa a formação de lesões cutâneas ulceradas abertas no modelo murino de leishmaniose tegumentar (Oliveira; Barral, 2005), a expressão diferencial dessas proteínas pode estar relacionada à intensa ativação de vias inflamatórias, estresse oxidativo, remodelamento tecidual e migração celular. Um destaque importante é o papel das MMPs, especialmente MMP2 e MMP9, cuja expressão e ativação são reguladas por proteínas como PEBP1, PRDX2 e CLIC1. As MMPs são enzimas que degradam componentes da matriz extracelular e facilitam a migração celular (Van Goethem *et al.*, 2010), porém sua ativação exacerbada contribui significativamente para a desorganização do arcabouço dérmico e destruição do tecido, favorecendo a formação das úlceras abertas características da

doença (Liarte *et al.*, 2001; Carvalhal *et al.*, 2004). Assim, os perfis moleculares observados refletem tanto a resposta do hospedeiro ao dano cutâneo quanto possíveis mecanismos explorados pelo parasita para promover um microambiente permissivo à sua permanência e disseminação no tecido infectado.

Na décima semana após a infecção de camundongos por *L. braziliensis*, foram identificadas seis proteínas diferentemente expressas entre os grupos experimentais. Destas proteínas, quatro apresentaram expressão aumentada em G1. As proteínas ribossômicas RPS2 e RPS3A apresentaram expressão aumentada no grupo G1, enquanto mostraram expressão reduzida no grupo G2 + *L. braziliensis*. Ambas fazem parte da subunidade menor do ribossomo (SSU), responsável pela leitura do RNA mensageiro e pela seleção dos tRNAs durante a tradução (Anger *et al.*, 2013). A RPS3A, em particular, está envolvida na regulação da função mitocondrial e no controle dos níveis de ROS, os quais atuam na sinalização da via MAPK, promovendo a migração celular, especialmente em células tumorais (Li *et al.*, 2023). A subunidade alfa-1 da ATPase transportadora de sódio/potássio (ATP1A1), que também apresentou expressão aumentada no grupo G1 e reduzida no grupo G2 + *L. braziliensis*, catalisa a hidrólise do ATP para bombear íons Na⁺ e K⁺ através da membrana plasmática, mantendo o potencial eletroquímico necessário para o transporte ativo de nutrientes (Lassuthova *et al.*, 2018; Schlingmann *et al.*, 2018). Estudos mostraram que a degradação da ATP1A1 pode inibir a via de sinalização AKT/mTOR, reduzindo a migração e a proliferação celular em modelos tumorais (Hu *et al.*, 2024; Zhuang *et al.*, 2015). Já a Testina, apresentou expressão aumentada no grupo G1, com expressão reduzida nos grupos G1 + *L. braziliensis*, G2 e G2 + *L. braziliensis*. Esta proteína atua na adesão e disseminação celular, reorganização do citoesqueleto de actina e regulação da proliferação celular. Além disso, pode funcionar como supressora tumoral, inibindo o crescimento celular (Tobias *et al.*, 2001; Coutts *et al.*, 2003; Garvalov *et al.*, 2003).

A subunidade sigma-1 do complexo AP-3 (AP3S1) apresentou expressão aumentada no grupo G2 e expressão reduzida no grupo G2 + *L. braziliensis*. Esta proteína é parte do complexo adaptador AP-3, envolvido na brotação de vesículas a partir do complexo de Golgi e no transporte para os lisossomos (Simpson *et al.*, 1996). Por fim, a proteína da autofagia 5 (ATG5), que apresentou expressão aumentada nos grupos G2 e G2 + *L. braziliensis* e reduzida no grupo G1, é essencial para a formação de autofagossomos. Esta proteína participa do complexo ATG12–ATG5, que atua como uma enzima semelhante à E3 na lipidação de proteínas da família ATG8 e sua ancoragem nas membranas vesiculares (Eguchi *et al.*, 2024). Também está envolvida na apoptose e em alterações do citoesqueleto (Pyo *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que Atg5 participa da migração e proliferação celular em células tumorais,

especialmente sob hipóxia ou ativação do receptor muscarínico, por meio da via AMPK/mTOR (Li *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022). Além disso, no contexto da infecção por *Leishmania*, a ausência de Atg5 em *L. major* leva à disfunção mitocondrial e desequilíbrio lipídico, comprometendo a geração de energia (Williams *et al.*, 2012), o que demonstra uma associação direta com a biologia do parasita.

Em síntese, das seis proteínas identificadas como diferentemente expressa no ponto de 10 semanas após a infecção, quatro apresentaram funções descritas na literatura relacionadas à migração celular: RPS3A (via ativação da via MAPK mediada por ROS), Testina (via reorganização do citoesqueleto de actina), Atp1a1 (via sinalização AKT/mTOR) e Atg5 (via autofagia e regulação AMPK/mTOR). Dentre todas, apenas Atg5 demonstrou uma relação direta com a imunopatogênese da leishmaniose, atuando na manutenção da funcionalidade mitocondrial do parasita (Williams *et al.*, 2012). Esses achados indicam que a migração celular pode ser um mecanismo modulado em resposta à infecção *in vivo* por *L. braziliensis* e sugerem que Atg5 representa um possível alvo para investigação funcional em contextos infecciosos. Considerando que a coleta foi realizada na décima semana pós-infecção, período associado à fase de resolução inflamatória e início do processo de cicatrização na leishmaniose tegumentar no modelo murino (Oliveira; Barral, 2005), a presença e regulação diferencial dessas proteínas pode refletir mecanismos celulares envolvidos tanto na contenção do parasita quanto na restauração tecidual. Assim, proteínas associadas à migração celular, como Testina e Atg5, podem estar contribuindo para processos de reparo tecidual, reorganização celular e reepitelização, eventos fundamentais para a cicatrização das lesões cutâneas induzidas por *Leishmania*.

Embora a infecção da medula óssea seja classicamente associada à LV, evidências recentes indicam que, nas formas tegumentares, a medula também sofre modulação funcional importante. Em conjunto, os dados do manuscrito II corroboram essa hipótese ao demonstrar que BMMΦ de camundongos previamente infectados *in vivo* por *L. braziliensis* apresentam respostas funcionais distintas frente à infecção *in vitro*, com redução significativa da carga parasitária em estágios tardios da infecção, sugerindo reprogramação funcional dos precursores mielóides no microambiente hematopoiético. Observamos ainda uma diminuição da migração dos BMMΦ provenientes de animais infectados e uma modulação consistente na formação dos complexos de adesão, evidenciada pela redução das formas fosforiladas de FAK e paxilina, acompanhada por alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina, com variações temporais na expressão das Rho-GTPases Rac1, Cdc42 e RhoA. Tais modificações sugerem uma adaptação do perfil migratório e funcional dessas células ao longo da infecção. Além disso, foi

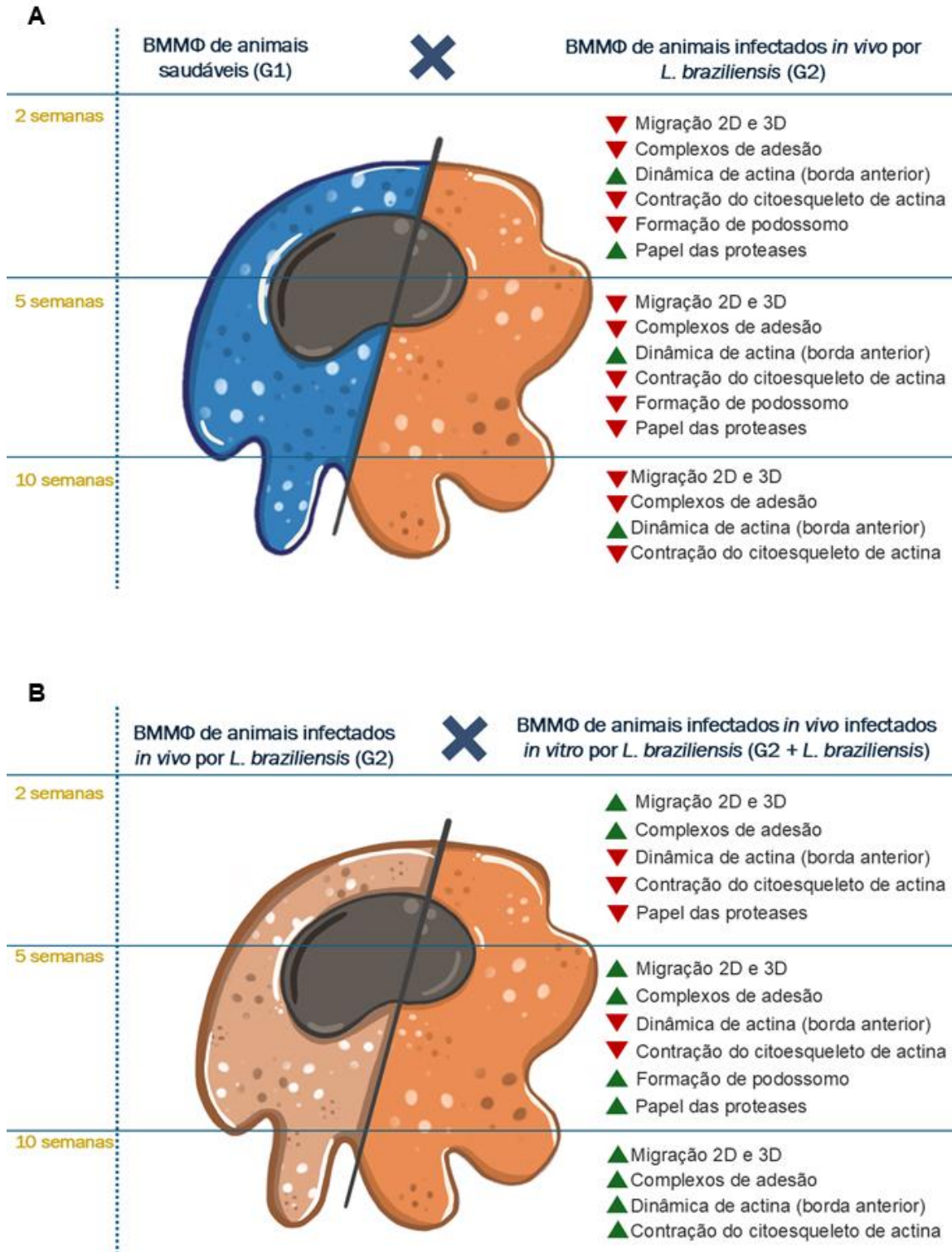
detectada uma regulação dinâmica da expressão de proteínas associadas à formação de podossomos, como talina e vinculina, e da produção de MMPs, que influenciam a capacidade invasiva e remodelação tecidual, processos críticos para a migração do tipo mesenquimal. Adicionalmente, o perfil protéico distinto observado em BMM Φ após a infecção de camundongos por *L. braziliensis*, reforça a hipótese de que a infecção *in vivo* leva à alteração do ambiente da medula. Estes achados, em conjunto, indicam que a infecção *in vivo* por *L. braziliensis* promove uma reprogramação do microambiente da medula óssea que impacta na ativação e mobilização dos macrófagos, modulando sua migração e capacidade efetora, o que reforça o papel da medula óssea como elo regulador entre a resposta imune sistêmica e o controle local da infecção na leishmaniose tegumentar.

9 CONCLUSÃO DO MANUSCRITO 2

A infecção por *Leishmania* spp. leva à diminuição da migração celular tanto em macrófagos murinos quanto humanos, indicando o papel crítico dessas células no controle dos parasitas no local da lesão. Os achados também fornecem evidências de aumento na migração de células dendríticas humanas após infecção por *L. infantum*, mas não de *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, sugerindo uma possível associação entre esse tipo celular e a visceralização da doença.

A infecção por *L. braziliensis in vivo* induz uma reconfiguração do microambiente da medula óssea, influenciando diretamente na ativação, capacidade de responder à infecção e mobilização dos macrófagos. O resumo desses achados está esquematizado nas figuras abaixo:

Figura 29 - Diagrama esquemático dos resultados. (A) Comparação dos resultados dos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2) ao longo dos tempos de 2, 5 e 10 semanas em comparação com BMMΦ de animais saudáveis (G1). (B) Comparação dos resultados dos BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* ao longo dos tempos de 2, 5 e 10 semanas, quando infectados *in vitro* (G2 + *L. braziliensis*) em comparação com BMMΦ de animais infectados *in vivo* por *L. braziliensis* (G2).



Fonte: Autora

REFERÊNCIAS

- ABIDIN, B. M.; HAMMAMI, A.; STÄGER, S.; HEINONEN, K. M. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, vol. 13, no. 8, 1 Aug. 2017.
- ACESTOR, N.; MASINA, S.; IVES, A.; WALKER, J.; SARAVIA, N. G.; FASEL, N. Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 8, p. 1160–1167, 2006.
- AEBERSOLD, R. H. e PATTERSON, S. D. Proteomics: the first decade and beyond. **Nat Genet**, v.33, p.311–23, 2003.
- AFRIN, F.; KHAN, I.; HEMEG, H. A. Leishmania-host interactions-an epigenetic paradigm. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, no. MAR, p. 492, 2019.
- AHN, J. et al. Fer protein-tyrosine kinase promotes lung adenocarcinoma cell invasion and tumor metastasis. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, n. 8, p. 952–963, 2013.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, no. 3, p. e0004349, 3 Mar. 2016.
- AL KHAMICI, H. et al. Members of the chloride intracellular ion channel protein family demonstrate glutaredoxin-like enzymatic activity. **PLoS One**, 2015.
- AKILOV, O. E.; KASUBOSKI, R. E.; CARTER, C. R.; MCDOWELL, M. A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 81, no. 5, p. 1188–1196, 1 May 2007.
- AKUFFO, H.; COSTA, C.; VAN GRIENSVEN, J.; BURZA, S.; MORENO, J.; HERRERO, M. New insights into leishmaniasis in the immunosuppressed. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 12, no. 5, 10 May 2018.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The Interaction of Leishmania Species with Macrophages. **Advances in Parasitology**, vol. 31, no. C, p. 175–254, 1 Jan. 1992.
- ALGHALAYINI, A. et al. *In vitro* enzymatic studies reveal pH and temperature sensitive properties of the CLIC proteins. **Biomolecules**, v. 13, n. 1, p. 112, 2023. DOI: 10.3390/biom13010112.
- AL KHAMICI, H. et al. Members of the chloride intracellular ion channel protein family demonstrate glutaredoxin-like enzymatic activity. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133702, 2015.
- ALMEIDA, L., et al., Analysis of expression of FLI1 and MMP1 in American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis infection. **Infect. Gene. Evol.**, v. 49, p. 212–220, 2017.
- ANGER, A. M. et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. **Nature**, v. 497,

n. 7449, p. 80–85, 2013.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. den. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One**, vol. 7, no. 5, p. e35671, 31 May 2012.

ANAND, S.; SAMUEL, M.; ANG, C. S.; KEERTHIKUMAR, S.; MATHIVANAN, S. **Label-based and label-free strategies for protein quantitation**. New York: Springer, 2017.

ARTHUR, W. T.; PETCH, L. A.; BURRIDGE, K. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. **Current Biology**, vol. 10, no. 12, p. 719–722, 1 Jun. 2000.

ATO, Manabu et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 2002.

BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 8, no. JUN, p. 222, 26 Jun. 2018.

BARR, S. D.; GEDAMU, L. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 12, p. 10816–10823, 2003.

BARRO-TRAORÉ, F.; PRENEY, L.; TRAORÉ, A.; DARIE, H.; TAPSOBA, P.; BASSOLÉ, A.; SAWADOGO, S.; NIAMBA, P.; GROSSHANS, E.; GENIAUX, M. Leishmaniose cutanée à *Leishmania major* avec atteinte de la moelle osseuse chez un malade infecté par le VIH au Burkina Faso. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Paris, v. 135, n. 5, p. 380–383, 2008.

BARYCKI, J. J. et al. Biochemical characterization and crystal structure determination of human heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase provide insights into catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 38, p. 5786–5798, 1999.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, vol. 37, no. 10, p. 1097–1106, 1 Aug. 2007.

BELLIS, S. L.; PERROTTA, J. A.; CURTIS, M. S.; TURNER, C. E. Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. **Biochemical Journal**, vol. 325, no. 2, p. 375–381, 15 Jul. 1997. DOI 10.1042/bj3250375.

BLEWETT, T. M.; KADIVAR, D. M.; SOULSBY, E. J. Cutaneous leishmaniasis in the guinea pig. Delayed-type hypersensitivity, lymphocyte stimulation, and inhibition of macrophage migration. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, vol. 20, no. 4, p. 546–551, 1971.

BODOY, S. et al. Identification of LAT4, a novel amino acid transporter with system L activity. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

BOETTCHER, S.; GEROSA, R. C.; RADPOUR, R.; BAUER, J.; AMPENBERGER, F.; HEIKENWALDER, M.; KOPF, M.; MANZ, M. G. Endothelial cells translate pathogen

signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. **Blood**, vol. 124, no. 9, p. 1393, 8 Aug. 2014.

BOETTCHER, S.; MANZ, M. G. Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis. **Trends in immunology**, vol. 38, no. 5, p. 345–357, 1 May 2017.

BRAR, H. K.; CHEN, E.; CHANG, F.; LU, S. A.; LONGOWAL, D. K.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; REINER, N.; NANDAN, D. *Leishmania* regulates host YY1: Comparative proteomic analysis identifies infection-modulated YY1-dependent proteins. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 20, n. 5, e0323227, 15 maio 2025

BRAY, R. S.; HEIKAL, B.; KAYE, P. M.; BRAY, M. A. The effect of parasitization by *Leishmania mexicana mexicana* on macrophage function *in vitro*. **Acta Trop**, vol. 40, no. 1, p. 29–38, 1983.

BRITO, Reginaldo et al. *Leishmania amazonensis* infection impairs VLA-4 clustering and adhesion complex assembly at the adhesion site of J774 cells. **Pathogens and Disease**, v. 81, p. ftad013, 2023.

BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin LIM domains in cell adhesion and motility. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 34, no. 7, p. 855–863, 2002.

BRÜNE, B.; DEHNE, N.; GROSSMANN, N.; JUNG, M.; NAMGALADZE, D.; SCHMID, T.; VON KNETHEN, A.; WEIGERT, A. Redox Control of Inflammation in Macrophages. **Antioxidants e Redox Signaling**, vol. 19, no. 6, p. 595, 8 Aug. 2013.

BUMANN, D., AKSU, S. *et al.* Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Infect Immun**, v.70, n.7, p.3396-403, 2002.

CAI, A. L. et al. Peroxiredoxin-1 promotes cell proliferation and metastasis through enhancing Akt/mTOR in human osteosarcoma cells. **Oncotarget**, New York, v. 8, n. 39, p. 63876–63887, 2017.

CALEY, M.P. et al. Metalloproteinases and Wound Healing. **Adv. W. C.**; v. 4, n. 4, p. 225–234, 2015.

CAMPOS, T.M., *et al.*, Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis. **Plos Negl. Trop. Dis.** v. 8, e3282, 2014.

CARVALHO, Lucas P. et al. Lymph node hypertrophy following *Leishmania major* infection is dependent on TLR9. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 3, p. 1394-1401, 2012.

CARVALHO, A. M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. **Pathogens**, vol. 11, no. 4, 1 Apr. 2022.

CASTRO, H.; DUARTE, M.; TOMÁS, A. M. **O metabolismo redox e o estresse oxidativo em *Leishmania* como uma encruzilhada para o efeito letal de fármacos.** The Royal Society of Chemistry, 2018.

CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1263–72, 1 out. 1994.

CHAN, B.; VANDERLAAN, P. A.; SUKHATME, V. P. 6-Phosphogluconate dehydrogenase regulates tumor cell migration *in vitro* by regulating receptor tyrosine kinase c-Met. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 439, n. 2, p. 247–251, 2013.

CHEN, Y.; YANG, S.; ZHOU, H.; SU, D. PRDX2 promotes the proliferation and metastasis of non-small cell lung cancer *in vitro* and *in vivo*. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 8359860, 2020.

CHENG, L. et al. A supressão do ISOC1 suprime a proliferação celular no câncer de pâncreas *in vitro*. **Oncology Letters**, 2019.

CHOI, S. H. et al. ELK3-CYFIP2 axis-mediated actin remodeling modulates metastasis and natural killer cell responses in triple-negative breast cancer. **Journal of Experimental e Clinical Cancer Research**, v. 44, p. 48, 2025.

CLAYTON, P. T. et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 457–465, 2001.

COOK, J. H; UENO, N; LODOEN, M. B. Toxoplasma gondii disrupts β 1 integrin signaling and focal adhesion formation during monocyte hypermotility. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 9, 2018.

CORDWELL, S. J., Nouwens, A. S. et al. Comparative proteomics of bacterial pathogens. **Proteomics**, v.1, n.4, p.461-72, 2001.

CORDELL, P. A.; FUTERS, T. S.; GRANT, P. J.; PEASE, R. J. The human hydroxyacylglutathione hydrolase (HAGH) gene encodes both cytosolic and mitochondrial forms of glyoxalase II. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 29, p. 28653–28659, 2004.

COUTTS, A. S. et al. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 12, p. 2463–2471, 2003.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 2008.

DA SILVA VIEIRA, T.; ARANGO DUQUE, G.; ORY, K.; GONTIJO, C. M.; SOARES, R. P.; DESCOTEAUX, A. Leishmania braziliensis: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 9, 6 Sep. 2019.

DANIELSEN, P.L. *et al.*, Matrix metalloproteinase-8 overexpression prevents proper tissue repair. **Surgery**, v. 150, p. 897–906. 2011.

DEAKIN, N. O.; TURNER, C. E. Paxillin comes of age. **Journal of Cell Science**, vol. 121,

no. 15, p. 2435–2444, 1 Aug. 2008.

DEMALI, K. A.; BURRIDGE, K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. **Journal of Cell Science**, vol. 116, no. 12, p. 2389–2397, 15 Jun. 2003.

DERAMAUDT, T. B.; DUJARDIN, D.; NOULET, F.; MARTIN, S.; VAUCHELLES, R.; TAKEDA, K.; RONDE, P. Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes. **PLoS ONE**, 2014.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 27, no. 5, p. 305–318, 2004.

DE TREZ, Carl et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000494, 2009.

DI MATTIA, T. et al. FFAT motif phosphorylation controls formation and lipid transfer function of inter-organelle contacts. **EMBO Journal**, v. 39, n. 2, p. e102366, 2020.

DING, C.; FAN, X.; WU, G. Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 193–202, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.12961>.

DOS-SANTOS, W. L. C.; DAVID, J.; BADARÓ, R.; DE-FREITAS, L. A. R. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, 2004.

D'SOUZA, K.; KIM, Y. J.; BALLA, T.; EPAND, R. M. Distinct properties of the two isoforms of CDP-diacylglycerol synthase. **Biochemistry**, v. 53, n. 47, p. 7358–7367, 2014.

DU, R.; HOTEZ, P. J.; AL-SALEM, W. S.; ACOSTA-SERRANO, A. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 10, no. 5, 2016.

EGELMAN, E. H. The structure of F-actin. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, vol. 6, no. 2, p. 129–151, Apr. 1985.

EGUCHI, T. et al. The V-ATPase-ATG16L1 axis recruits LRRK2 to facilitate the lysosomal stress response. **Journal of Cell Biology**, v. 223, n. 2, e202305118, 2024.

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; KAYE, P. M. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends in parasitology**, vol. 20, no. 11, p. 524–530, Nov. 2004.

EVANS, J. G.; CORREIA, I.; KRASAVINA, O.; WATSON, N.; MATSUDAIRA, P. Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. **Journal of Cell Biology**, vol. 161, no. 4, p. 697–705, 26 May 2003.

FAN, S.; CHEN, P.; LI, S. miR-145-5p inhibits the proliferation, migration, and invasion of esophageal carcinoma cells by targeting ABRACL. **BioMed Research International**, New York, v. 2021, p. 1–9, 2021.

FANG, Y.; HE, J.; JANSSEN, H. L. A.; WU, J.; DONG, L.; SHEN, X. Z. Peroxiredoxin 1, restraining cell migration and invasion, is involved in hepatocellular carcinoma recurrence. **Journal of Digestive Diseases**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 741–749, 2018.

FERREIRA, F. L. B.; SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A.; HEINONEN, K. M. Persistent Cutaneous Leishmania major Infection Promotes Infection-Adapted Myelopoiesis. **Microorganisms**, vol. 10, no. 3, 1 Mar. 2022.

FIELD, M. S.; SZEBENYI, D. M.; PERRY, C. A.; STOVER, P. J. Inhibition of 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 445, n. 2, p. 210–218, 2007.

FIGUEIRA, C. P.; CARVALHAL, D. G. F.; ALMEIDA, R. A.; D'EL-REI HERMIDA, M.; TOUCHARD, D.; ROBERT, P.; PIERRES, A.; BONGRAND, P.; DOS-SANTOS, W. L. C. Leishmania infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. **Scientific Reports**, vol. 5, no. August, p. 1–12, 2015.

FISHER, K. J.; ARONSON, N. N. Jr. Cloning and expression of the cDNA sequence encoding the lysosomal glycosidase di-N-acetylchitobiase. **Journal of Biological Chemistry**, 1992.

FLORO E SILVA, M.; ROQUE, G. A. S.; MACHADO, D. A.; ROCHA, F. J. S.; GIORGIO, S. *Leishmania (Viannia) braziliensis replicates in mouse bone marrow*. **Acta Tropica**, [S.l.], v. 230, p. 106407, jun. 2022.

FOLLADOR, I.; ARAÚJO, C.; BACELLAR, O.; ARAÚJO, C. B.; CARVALHO, L. P.; ALMEIDA, R. P.; CARVALHO, E. M. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of Leishmania braziliensis infection. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, vol. 34, no. 11, 2002.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

FRIEDL, P.; WOLF, K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. **Journal of Cell Biology**, vol. 188, no. 1, p. 11–19, 11 Dec. 2010.

FOXALL, E.; PIPILI, A.; JONES, G. E.; WELLS, C. M. Significance of kinase activity in the dynamic invadosome. **European Journal of Cell Biology**, v. 95, n. 11, p. 483-492, nov. 2016.

GARDEL, M. L.; SCHNEIDER, I. C.; ARATYN-SCHAUS, Y.; WATERMAN, C. M. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, vol. 26, p. 315–333, 10 Nov. 2010.

GARVALOV, B. K. et al. The conformational state of Tes regulates its zyxin-dependent recruitment to focal adhesions. **Journal of Cell Biology**, v. 161, n. 3, p. 699–709, 2003.

GDOVINOVA, I.; DESCOTEAUX, A. VAPA mediates lipid exchange between *Leishmania amazonensis* and host macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 21, n. 3, p. e1012636, 2025.

GEISSMANN, Frédéric et al. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 453-460, 2010.

GINSBERG, M. H. Integrin activation. **BMB Reports**, vol. 47, no. 12, p. 655–659, 2014.

GOLDMAN-PINKOVICH, A.; BALNO, C.; STRASSER, R.; ZEITUNI-MOLAD, M.; BENDELAK, K.; RENTSCH, D.; EPHROS, M.; WIESE, M.; JARDIM, A.; MYLER, P. J.; ZILBERSTEIN, D. An arginine deprivation response pathway is induced in *Leishmania* during macrophage invasion. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 4, e1005494, 2016.

GONZÁLEZ, C.; WANG, O.; STRUTZ, S. E.; GONZÁLEZ-SALAZAR, C.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; SARKAR, S. Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS neglected tropical diseases**, vol. 4, no. 1, Jan. 2010.

GORAK, P. M.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **European journal of immunology**, v. 28, n. 2, p. 687–95, fev. 1998.

GORDON, S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. **Immunity**, vol. 44, no. 3, p. 463–475, 15 Mar. 2016.

GRAND, R. J. et al. A novel protein expressed in mammalian cells undergoing apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 219, n. 1, p. 1–7, 1995.

GRAVES, P. R. e HAYSTEAD, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.1, p.39-63; table of contents, 2002.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 6, no. 3, p. 230–250, Jul. 1993.

GUO, H.; XIANG, Z.; ZHANG, Y.; SUN, D. Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase enhances chemotherapy efficacy in cervical cancer via AMPK-independent inhibition of RhoA and Rac1. **Clinical and Translational Oncology**, v. 21, n. 4, p. 404–411, 2019.

GUO, J. et al. Integrative single-cell RNA and ATAC sequencing reveals that the FOXO1-PRDX2-TNF axis regulates tendinopathy. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1092778, 2023.

GUO, K.; GAO, X. ABRACL upregulated by transcription factor CBX4 promotes proliferation and migration and inhibits the apoptosis of gastric cancer cells. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 40, 2025.

- GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**, vol. 133, no. 1, p. 27–39, Jan. 2011.
- GYGI, S. P., ROCHON, Y. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol Cell Biol**, v.19, n.3, p.1720-30, 1999.
- HERMIDA, M. D. R. et al. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 450, 20 ago. 2014.
- HOLMES, K. C.; POPP, D.; GEBHARD, W.; KABSCH, W. Atomic model of the actin filament. **Nature**, vol. 347, no. 6288, p. 44–49, 1990.
- HORVATH, F. et al. Swing-out opening of stromal interaction molecule 1. **Protein Science**, v. 32, p. 1–11, 2023
- HSIAO, B. Y. et al. Human Costars family protein ABRACL modulates actin dynamics and cell migration and associates with tumorigenic growth. **International Journal of Molecular Sciences, Basel**, v. 22, n. 13, p. 6827, 2021.
- HSU, Alice C.; SCOTT, Phillip. Leishmania mexicana infection induces impaired lymph node expansion and Th1 cell differentiation despite normal T cell proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8200-8207, 2007.
- HU, J. et al. GPR37-enhanced ubiquitination of ATP1A1 inhibits tumor progression and radiation resistance in esophageal squamous cell carcinoma. **Cell Death e Disease**, v. 15, n. 12, p. 933, 2024.
- HUANG, C. Z. et al. Somatostatin octapeptide inhibits cell invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma through PEBP1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 2340–2349, 2018.
- HUANG, L.; WEI, B.; ZHAO, Y.; GONG, X.; CHEN, L. DYNLT1 promotes mitochondrial metabolism to fuel breast cancer development by inhibiting ubiquitination degradation of VDAC1. **Molecular Medicine**, London, v. 29, n. 1, p. 72, 6 jun. 2023.
- HUTTENLOCHER, A.; HORWITZ, A. R. Integrins in cell migration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 3, no. 9, p. 1–16, 2011.
- HUVENEERS, S.; DANEN, E. H. J. Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho. **Journal of Cell Science**, vol. 122, no. 8, p. 1059–1069, 15 Apr. 2009.
- HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, vol. 110, no. 6, p. 673–687, 20 Sep. 2002.
- IBRAHIM, Marwa K. et al. Deficiency of lymph node-resident dendritic cells (DCs) and dysregulation of DC chemoattractants in a malnourished mouse model of Leishmania donovani infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 8, p. 3098-3112, 2014.
- Ilgoutz, S. C. e Mcconville, M. J. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. **Int J Parasitol**, v.31, n.9, p.899-908, 2001.

ISNARDI, I. et al. IRAK-4- and MyD88-dependent pathways are essential for the removal of developing autoreactive B cells in humans. **Immunity**, v. 28, n. 2, p. 274–285, 2008.

IYER, J. P. et al. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 372–391, 2008.

JAEGER, T.; FLOHÉ, L. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. **BioFactors**, v. 27, n. 1–4, p. 109–120, 2006.

JIAN, W. et al. Phosphatidylethanolamine-binding protein 4 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells by activating the sonic hedgehog signaling pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 4, p. 5386–5395, 2019.

JING, X. et al. Silencing of PRDX2 inhibits the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1276328, 2020.

JONES, G. E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 68, no. 5, p. 593–602, 2000.

KAMATANI, N. Adenine phosphoribosyltransferase (APRT). **Nihon Rinsho**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2890–2894, 1996.

KANG, S. W. et al. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 11, p. 6303–6312, 1998.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological reviews**, vol. 201, p. 239–253, Oct. 2004.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 9, no. 8, p. 604–615, 2011.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, vol. 33, no. 3, p. 579–593, 1 Jul. 2015.

KITAMURA, T.; SEKI, N.; KIHARA, A. Phytosphingosine degradation pathway includes fatty acid α -oxidation reactions in the endoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, p. E2616–E2623, 2017.

KOTTHAUS, J. et al. Reduction of N(ω)-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). **Biochemical Journal**, 2011.

LAFUSE, W. P.; STORY, R.; MAHYLIS, J.; GUPTA, G.; VARIKUTI, S.; STEINKAMP, H.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Leishmania donovani Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 3, p. 59509, 22 Mar. 2013.

LANE, R. P. Sandflies (Phlebotominae). **Medical Insects and Arachnids**. [S. l.]: Springer Netherlands, 1993. p. 78–119.

LASKAY, T.; DIEFENBACH, A.; RÖLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 25, n. 7, p. 2220–2227, 1995.

LASSUTHOVA, P. et al. Mutations in ATP1A1 Cause Dominant Charcot-Marie-Tooth Type 2. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 3, p. 505–514, 2018.

LEE, S. H.; CHARMOY, M.; ROMANO, A.; PAUN, A.; CHAVES, M. M.; COPE, F. O.; RALPH, D. A.; SACKS, D. L. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 215, no. 1, p. 357, 1 Jan. 2018.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, vol. 26, no. 4, p. 519–531, 2007.

LI, H. et al. BNIP3 enhances pancreatic cancer cell migration and proliferation via modulating autophagy under hypoxia. **Heliyon**, v. 8, n. 10, p. e11190, 2022.

LI, J.; CHEN, H. Actin-binding Rho activating C-terminal like (ABRACL) transcriptionally regulated by MYB proto-oncogene like 2 (MYBL2) promotes the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. **Bioengineered**, London, v. 13, n. 5, p. 11404–11417, 2022.

LI, J. et al. OTUB2 stabilizes U2AF2 to promote the Warburg effect and tumorigenesis via the AKT/mTOR signaling pathway in non-small cell lung cancer. **Theranostics**, Xi'an, v. 9, n. 1, p. 179–195, 2019.

LI, J.; XIAN, L.; ZHU, Z.; WANG, Y.; ZHANG, W.; ZHENG, R.; XUE, W.; LI, J. Role of CELF2 in ferroptosis: potential targets for cancer therapy (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 51, n. 2, 2023.

LI, P. et al. FER promotes cell migration via regulating JNK activity. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 52, n. 6, e12694, 2019.

LI, S. et al. Peroxiredoxin 1 aggravates acute kidney injury by promoting inflammation through Mincle/Syk/NF- κ B signaling. **Kidney International**, New York, v. 103, n. 5, p. 914–931, 2023.

LI, Z. et al. BTN3A3 inhibits clear cell renal cell carcinoma progression by regulating the ROS/MAPK pathway via interacting with RPS3A. **Cellular Signalling**, v. 112, p. 110914, 2023.

LIAO, C.; CHEN, W.; WANG, J. MicroRNA-20a regulates glioma cell proliferation, invasion, and apoptosis by targeting CUGBP Elav-like family member 2. **World Neurosurgery**, Philadelphia, v. 127, p. e320–e330, 2019.

LIMA, J. B. et al. Leishmania infantum lipophosphoglycan induced-Prostaglandin E2 production in association with PPAR- γ expression via activation of Toll like receptors-1 and 2. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 14321, 30 out. 2017.

LITTLER, D. R. et al. Crystal structure of the soluble form of the redox-regulated chloride ion channel protein CLIC4. **FEBS Journal**, 2005.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, 2012

LÓPEZ-COLOMÉ, A. M.; LEE-RIVERA, I.; BENAVIDES-HIDALGO, R.; LÓPEZ, E. Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. **Journal of Hematology and Oncology**, vol. 10, no. 1, 18 Feb. 2017.

LUZ, Y.; REBOUÇAS, A.; BERNARDES, C. P. O. S.; ROSSI, E. A.; MACHADO, T. S.; SOUZA, B. S. F.; BRODSKYN, C. I.; VERAS, P. S. T.; DOS SANTOS, W. L. C.; DE MENEZES, J. P. B. *Leishmania* infection alters macrophage and dendritic cell migration in a three-dimensional environment. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 11, p. 1206049, 28 jul. 2023

LYPACZEWSKI, P.; HOSHIZAKI, J.; ZHANG, W. W.; MCCALL, L. I.; TORCIVIA-RODRIGUEZ, J.; SIMONYAN, V.; KAUR, A.; DEWAR, K.; MATLASHEWSKI, G. A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, 1 Dec. 2018.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, fev. 2019.

MAEKAWA, M.; ISHIZAKI, T.; BOKU, S.; WATANABE, N.; FUJITA, A.; IWAMATSU, A.; OBINATA, T.; OHASHI, K.; MIZUNO, K.; NARUMIYA, S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. **Science**, vol. 285, no. 5429, p. 895–898, 6 Aug. 1999.

MAIER, O.; KNOBLICH, M.; WESTERMANN, P. Dynamin II binds to the trans-Golgi network. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 225, n. 3, p. 1075–1081, 1996.

MANDAL, C. et al. Regulation of O-acetylation of sialic acids by sialate-O-acetyltransferase and sialate-O-acylesterase activities in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Glycobiology**, v. 22, p. 1–9, 2012.

MARTINO, J.; HENRIET, E.; EZZOUKHRY, Z.; GOETZ, J. G.; MOREAU, V.; SALTEL, F. The microenvironment controls invadosome plasticity. **Journal of Cell Science**, v. 129, n. 9, p. 1759-1768, 2016.

MARETTI-MIRA, A.C. et al. MMP9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal Leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 119, p. 160–164, 2011.

- MASUTANI, M. et al. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. **EMBO Journal**, 2007.
- MAYNE, M. et al. CYFIP2 is highly abundant in CD4+ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. **European Journal of Immunology**, v. 34, p. 1–10, 2004.
- MERAD, Miriam et al. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annual Review Of Immunology**, v. 31, p. 563-604, 2013.
- MERINO-GRACIA, J. et al. Molecular basis for the protein recognition specificity of the dynein light chain DYNLT1/Tctex1: characterization of the interaction with activin receptor IIB. *Journal of Biological Chemistry*, v. 291, n. 40, p. 20962–20975, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da Leishmaniose. Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose>. Acesso em: 08 março. 2024.
- MITRA, S. K.; SCHLAEPFER, D. D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 18, no. 5, p. 516–523, Oct. 2006.
- MOLL, H.; FUCHS, H.; BLANK, C.; RÖLLINGHOFF, M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **European Journal of Immunology**, vol. 23, no. 7, p. 1595–1601, 1993.
- MORADIMOTLAGH, A.; CHEN, S.; KOOHBOR, S.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; REINER, N.; NANDAN, D. *Leishmania* infection upregulates and engages host macrophage Argonaute 1, and system-wide proteomics reveals Argonaute 1-dependent host response. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 14, p. 1287539, 30 nov. 2023.
- MURPHY, D. A.; COURTNEIDGE, S. A. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 7, p. 413-426, 23 jun. 2011.
- MOSES, M.A., et al. Temporal study of the activity of matrix metallo-proteinases and their endogenous inhibitors during wound healing. **J. C. Biochem.**, v. 60, p. 379–386, 1996.
- MULLER, M. *et al.*, Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP1 to TIMP1 is a predictor of wound healing. **Diabet. Med.**, v. 25, p. 419–426, 2008.
- MURASE, L.S. *et al.*, The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. **Parasitology**, v. 145, p. 1499–1509, 2018.
- NANDAN, D.; CHEN, E.; CHANG, F.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; REINER, N. Comprehensive proteomic analysis of autophagosomes derived from *Leishmania*-infected macrophages. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 18, n. 4, e0284026, 7 abr. 2023
- NELSON, M. M., JONES, A. R. et al. Modulation of the host cell proteome by the intracellular apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Infect Immun**, v.76, n.2, p.828-44, 2007.

NIU, W. et al. Peroxiredoxin 1 promotes invasion and migration by regulating epithelial-to-mesenchymal transition during oral carcinogenesis. **Oncotarget**, New York, v. 7, n. 24, p. 37793–37808, 2016.

NOBES, C. D.; HALL, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. **Journal of Cell Biology**, vol. 144, no. 6, p. 1235–1244, 22 Mar. 1999.

NOVAIS, F. O. *et al.*, Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 94-101, 2015

OHL, L. et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v. 21, n. 2, p. 279–88, ago. 2004.

OLIVEIRA, C. I. de; BARRAL-NETTO, M. O modelo experimental nas infecções causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, n. 1, p. 35–45, jan./jun. 2005.

OPAS. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Nº 11. 2022. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>. Acesso em: 16 de maio de 2025.

OTT, G. et al. Functional characterization of protein variants encoded by nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in MARC1 and MARC2 in healthy Caucasians. **Drug Metabolism and Disposition**, 2014.

PANAHI, E.; STANISIC, D. I.; PEACOCK, C. S.; HERRERO, L. J. Protective and pathogenic immune responses to cutaneous leishmaniasis. **Leishmaniasis – General Aspects of a Stigmatized Disease**, 2022.

PARSONS, S. A.; MEWBURN, J. D.; TRUESELL, P.; GREER, P. A. The Fps/Fes kinase regulates leucocyte recruitment and extravasation. **Immunology**. 2007.

PASSOS, S.; CARVALHO, L. P.; COSTA, R. S.; CAMPOS, T. M.; NOVAIS, F. O.; MAGALHÃES, A.; MACHADO, P. R. L.; BEITING, D.; MOSSER, D.; CARVALHO, E. M.; SCOTT, P. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in leishmania braziliensis infections. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 211, no. 2, p. 274–282, 15 Jan. 2015.

PETRITUS, Patricia M. et al. *Leishmania mexicana* induces limited recruitment and activation of monocytes and monocyte-derived dendritic cells early during infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, 2012.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global distribution maps of the Leishmaniasis. **eLife**, vol. 2014, no. 3, 27 Jun. 2014.

PINHEIRO, N. F.; HERMIDA, M. D. R.; MACEDO, M. P.; MENGEL, J.; BAFICA, A.; DOS-SANTOS, W. L. C. *Leishmania* infection impairs β 1-integrin function and chemokine

receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, vol. 74, no. 7, p. 3912–3921, 2006.

PLAYFORD, M. P.; SCHALLER, M. D. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. **Oncogene**, vol. 23, no. 48 REV. ISS. 7, p. 7928–7946, 18 Oct. 2004.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, vol. 10, no. 1, p. 111–129, 2015.

POULAKI, A.; PIPERAKI, E. T.; VOULGARELIS, M. Effects of Visceralising *Leishmania* on the Spleen, Liver, and Bone Marrow: A Pathophysiological Perspective. **Microorganisms**, vol. 9, no. 4, 1 Apr. 2021.

PREHAM, O.; PINHO, F. A.; PINTO, A. I.; RANI, G. F.; BROWN, N.; HITCHCOCK, I. S.; GOTO, H.; KAYE, P. M. CD4⁺ T Cells Alter the Stromal Microenvironment and Repress Medullary Erythropoiesis in Murine Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, p. 2958, 18 Dec. 2018.

PYO, J. O. et al. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8485–8493, 2005.

QI, Z. H. et al. RIPK4/PEBP1 axis promotes pancreatic cancer cell migration and invasion by activating RAF1/MEK/ERK signaling. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1105–1116, 2018.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, vol. 81, no. 1, p. 68–75, Aug. 2006.

REBOUÇAS, A.; SILVA, T. S.; MEDINA, L. S.; PAREDES, B. D.; ARAGÃO, L. S.; SOUZA, B. S. F.; BORGES, V. M.; SCHRIEFER, A.; VERAS, P. S. T.; BRODSKYN, C. I.; DE MENEZES, J. P. B. *Leishmania*-induced dendritic cell migration and its potential contribution to parasite dissemination. **Microorganisms**, Basel, v. 9, n. 2, 2021.

RIDLEY, A. J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. **Cell**, vol. 70, no. 3, p. 389–399, 7 Aug. 1992.

RIDLEY, A. J.; SCHWARTZ, M. A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R. A.; GINSBERG, M. H.; BORISY, G.; PARSONS, J. T.; HORWITZ, A. R. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, vol. 302, no. 5651, p. 1704–1709, 2003.

RITTER, U.; MOLL, H. Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. **European journal of immunology**, v. 30, n. 11, p. 3111–20, nov. 2000.

ROCHA, M. I.; DIAS, F.; RESENDE, M.; SOUSA, M.; DUARTE, M.; TOMÁS, A. M.;

CASTRO, H. *Leishmania infantum* Enhances Migration of Macrophages via a Phosphoinositide 3-Kinase \hat{I} -Dependent Pathway. **ACS Infectious Diseases**, vol. 6, no. 7, p. 1643–1649, 10 Jul. 2020.

ROMER, L. H.; BIRUKOV, K. G.; GARCIA, J. G. N. Focal adhesions: Paradigm for a signaling nexus. **Circulation Research**, vol. 98, no. 5, p. 606–616, Mar. 2006.

ROTTNER, K.; HALL, A.; SMALL, J. V. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. **Current Biology**, vol. 9, no. 12, p. 640–648, 17 Jun. 1999.

SAINI, P. et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis caused by the same zymodeme of *Leishmania donovani* in Kerala, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 1, p. 59–63, 2023.

SALGADO, V. R. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 4, p. 241–251, abr. 2016.

SANTIAGO-MEDINA, M.; GREGUS, K. A.; NICHOL, R. H.; O'TOOLE, S. M.; GOMEZ, T. M. Regulation of ecm degradation and axon guidance by growth cone invadosomes. **Development (Cambridge)**, vol. 142, no. 3, p. 486–496, 1 Feb. 2015.

SCHARTON-KERSTEN, T.; SCOTT, P. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 57, n. 4, p. 515–522, 1995

SCHLINGMANN, K. P. et al. Germline De Novo Mutations in ATP1A1 Cause Renal Hypomagnesemia, Refractory Seizures, and Intellectual Disability. **American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 3, p. 514–520, 2018.

SHEETZ, M. P.; FELSENFELD, D.; GALBRAITH, C. G.; CHOQUET, D. Cell migration as a five-step cycle. **Biochemical Society symposium**, vol. 65, p. 233–243, 1999.

SHEPARD, J. et al. Characterization of U2AF(6), a splicing factor related to U2AF(35). **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 6, p. 2213–2225, 2002.

SHI, M.; YANG, R.; LIN, J.; WEI, Q. I.; CHEN, L.; GONG, W.; LI, Y.; GUO, X. LncRNA-SNHG16 promotes proliferation and migration of acute myeloid leukemia cells via PTEN/PI3K/AKT axis through suppressing CELF2 protein. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 46, 2021

SIEGFRIED, H. et al. The ER tether VAPA is required for proper cell motility and anchors ER-PM contact sites to focal adhesions. **eLife**, v. 13, p. e85962, 2024.

SINGH, A. K.; PANDEY, R. K.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; KWON, Y. J.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; SHAHA, C.; MADHUBALA, R. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853–1868, 2015.

SIMPSON, F. et al. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. **Journal**

of Cell Biology, v. 136, n. 3, p. 775–788, 1997.

SOUSA SILVA, M. et al. Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in *Leishmania infantum* as a therapeutic target by modelling and computer simulation. **FEBS Journal**, v. 272, n. 10, p. 2388–2398, 2005

SOUSA SILVA, M.; FERREIRA, A. E.; GOMES, R.; TOMÁS, A. M.; PONCES FREIRE, A.; CORDEIRO, C. The glyoxalase pathway in protozoan parasites. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 302, n. 5, p. 225–229, out. 2012.

STÄGER, S.; BANKOTI, R. Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with *Leishmania donovani*. **Journal of Tropical Medicine**, vol. 2012, 2012.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites e Vectors**, vol. 10, no. 1, p. 82, 15 Dec. 2017.

SUBRAMANIAN, A.; TAMAYO, P.; MOOTHA, V. K.; MUKHERJEE, S.; EBERT, B. L.; GILLETTE, M. A.; PAULOVICH, A.; POMEROY, S. L.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; MESIROV, J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 25 out. 2005.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, vol. 7, no. 9, 1 Sep. 2017.

SUZUE, K. et al. Critical role of dendritic cells in determining the Th1/Th2 balance upon *Leishmania major* infection. *International immunology*, v. 20, n. 3, p. 337–43, mar. 2008.

TAKESHITA, F. et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 35, p. 14050–14055, 2007.

TANG, D. D.; GERLACH, B. D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. **Respiratory Research**, vol. 18, no. 1, 8 Apr. 2017.

TIBÚRCIO, R. et al. Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 227, 2019.

TOBIAS, E. S. et al. The TES gene at 7q31.1 is methylated in tumours and encodes a novel growth-suppressing LIM domain protein. **Oncogene**, v. 20, n. 45, p. 6559–6568, 2001.

TOUTANT, M.; COSTA, A.; STUDLER, J.-M.; KADARÉ, G.; CARNAUD, M.; GIRAULT, J.-A. Alternative Splicing Controls the Mechanisms of FAK Autophosphorylation. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 22, no. 22, p. 7731–7743, 15 Nov. 2002.

TURNER, C. E. Paxillin and focal adhesion signalling. **Nature Cell Biology**, vol. 2, no. 12, 2000.

TYANOVA, S.; TEMU, T.; SINITYN, P.; CARLSON, A.; HEIN, M. Y.; GEIGER, T.; MANN, M.; COX, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, New York, v. 13, n. 9, p. 731–740, 2016.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; DA LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 51, no. 2, p. 337–351, 15 Jul. 2011.

VAN DEN DRIES, K.; LINDER, S.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; POINCLOUX, R. Probing the mechanical landscape – new insights into podosome architecture and mechanics. **Journal of Cell Science**, vol. 132, no. 24, 15 Dec. 2019.

VAN GOETHEM, E.; POINCLOUX, R.; GAUFFRE, F.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; LE CABEC, V. Matrix Architecture Dictates Three-Dimensional Migration Modes of Human Macrophages: Differential Involvement of Proteases and Podosome-Like Structures. **The Journal of Immunology**, vol. 184, no. 2, p. 1049–1061, 15 Jan. 2010.

VERAS, P.; DE MENEZES, J. Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 17, no. 8, p. 1270, 19 Aug. 2016.

VERAS, P. S. T.; RAMOS, P. I. P.; DE MENEZES, J. P. B. In search of biomarkers for pathogenesis and control of leishmaniasis by global analyses of *Leishmania*-infected macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 8, 2018

VÉROLLET, C.; CHARRIÈRE, G. M.; 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.

VÉROLLET, C.; LE CABEC, V.; MARIDONNEAU-PARINI, I. HIV-1 infection of T lymphocytes and macrophages affects their migration via Nef. **Frontiers in Immunology**, vol. 6, no. OCT, 2015.

VON STEBUT, E. et al. Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 8, p. 1547–52, 19 Oct. 1998.

WANG, H.; HUANG, R.; GUO, W.; QIN, X.; YANG, Z.; YUAN, Z.; WEI, Y.; MO, C.; ZENG, Z.; LUO, J.; CAI, J.; WANG, H. RNA-binding protein CELF1 enhances cell migration, invasion, and chemoresistance by targeting ETS2 in colorectal cancer. **Clinical Science (London)**, London, v. 134, n. 5, p. 513–529, 2020.

WANG, P. et al. Chloride intracellular channel 1 regulates colon cancer cell migration and invasion through ROS/ERK pathway. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 8, p. 2071–2078, 2014.

WANG, Q. et al. Autophagy induced by muscarinic acetylcholine receptor 1 mediates migration and invasion targeting Atg5 via AMPK/mTOR pathway in prostate cancer. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. 6523195, 2022.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

WEBER-BOYVAT, M. et al. OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity. **Experimental Cell Research**, v. 334, n. 2, p. 177–187, 2015.

WEXLER, I. D. et al. Molecular characterization of pyruvate carboxylase deficiency in two consanguineous families. **Pediatric Research**, v. 44, n. 3, p. 358–363, 1998.

WHO. Leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 16 de maio de 2025

WIESNER, C.; LE-CABEC, V.; EL AZZOUZI, K.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; LINDER, S. Podosomes in space: Macrophage migration and matrix degradation in 2D and 3D settings. **Cell Adhesion and Migration**, 2014.

WILLIAMS, R. A. et al. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 5, p. e1002695, 2012.

WOZNIAK, M. A.; MODZELEWSKA, K.; KWONG, L.; KEELY, P. J. Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, vol. 1692, no. 2–3, p. 103–119, 5 Jul. 2004.

WU, F. et al. Peroxiredoxin2 regulates trophoblast proliferation and migration through SPIB-HDAC2 pathway. **Experimental Cell Research**, v. 422, n. 1, p. 113428, 2023. DOI: 10.1016/j.yexcr.2022.113428.

WU, J. et al. 6-Phosphogluconate dehydrogenase promotes glycolysis and fatty acid synthesis by inhibiting the AMPK pathway in lung adenocarcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 601, p. 217177, 2024.

WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Methylglyoxal metabolism in trypanosomes and leishmania. **Seminars in Cell e Developmental Biology**, v. 22, n. 3, p. 271–277, 2011.

ZAIDEL-BAR, R.; COHEN, M.; ADDADI, L.; GEIGER, B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. 32., Jun. 2004. **Biochemical Society Transactions** [...]. [S. l.]: Biochem Soc Trans, Jun. 2004. vol. 32, p. 416–420.

ZHAN, Yifan et al. Resident and monocyte-derived dendritic cells become dominant IL-12 producers under different conditions and signaling pathways. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2125-2133, 2010.

ZAMIR, E.; GEIGER, B. Components of cell-matrix adhesions. **Journal of Cell Science**, vol. 114, no. 20, 2001.

ZEBDA, N.; BERNARD, O.; BAILLY, M.; WELTI, S.; LAWRENCE, D. S.; CONDEELIS,

J. S. Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension. **Journal of Cell Biology**, vol. 151, no. 5, p. 1119–1127, 27 Nov. 2000.

ANEXOS

Manuscrito I: Cell migration and cell adhesion assays to investigate *Leishmania*-host cell interactions (Publicado, 2021).

Manuscrito II: 17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death (Publicado, 2021).

Manuscrito III: *Leishmania infantum* defective in lipophosphoglycan biosynthesis interferes with activation of human neutrophils (Publicado, 2022).

Anexo A - Manuscrito I

Cell migration and cell adhesion assays to investigate *Leishmania*-host cell interaction

Abstract: *Leishmania* is an intracellular protozoan parasite that causes a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from self-resolving localized cutaneous lesions to a highly fatal visceral form of the disease. An estimated 12 million people worldwide are currently infected, and another 350 million face risk of infection. It is known that host cells infected by *Leishmania* parasites, such as macrophages or dendritic cells, can migrate to different host tissues, yet how migration contributes to parasite dissemination and homing remains poorly understood. Therefore, assessing these parasites' ability to modulate host cell response, adhesion, and migration will shed light on mechanisms involved in disease dissemination and visceralization. Cellular migration is a complex process in which cells undergo polarization and protrusion, allowing them to migrate. This process, regulated by actin and tubulin-based microtubule dynamics, involves different factors, including the modulation of cellular adhesion to the substrate. Cellular adhesion and migration processes have been investigated using several models. Here, we describe a method to characterize the migratory aspects of host cells during *Leishmania* infection. This detailed protocol presents the differentiation and infection of dendritic cells, the analysis of host cell motility and migration, and the formation of adhesion complexes and actin dynamics. This *in vitro* protocol aims to further elucidate mechanisms involved in *Leishmania* dissemination within vertebrate host tissues and can also be modified and applied to other cell migration studies.

Keywords: *Leishmania*, migration, host cell

Trabalho publicado na revista Jove, 2021.

Cell Migration and Cell Adhesion Assays to Investigate *Leishmania*-Host Cell Interaction

Yasmin da Silva Luz¹, Amanda R. Paixão¹, Carla Polyana O. S. Bernardes¹, Thailla Souza da Silva¹, Natalia Machado Tavares¹, Cláudia I. Brodskyn¹, Patrícia S. T. Veras¹, Juliana P. B. de Menezes¹

¹Laboratory of Host - Parasite Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute

*These authors contributed equally

Corresponding Author

Juliana P. B. de Menezes
juliana.fullam@fiocruz.br

Citation

Luz, Y.d.S., Paixão, A.R., Bernardes, C.P.O.S., da Silva, T.S., Tavares, N.M., Brodskyn, C.I., Veras, P.S.T., de Menezes, J.P.B. Cell Migration and Cell Adhesion Assays to Investigate *Leishmania*-Host Cell Interaction. *J. Vis. Exp.* (174), e62461, doi:10.3791/62461 (2021).

Date Published

August 4, 2021

DOI

10.3791/62461

URL

jove.com/video/62461

Abstract

Leishmania is an intracellular protozoan parasite that causes a broad spectrum of clinical manifestations, ranging from self-resolving localized cutaneous lesions to a highly fatal visceral form of the disease. An estimated 12 million people worldwide are currently infected, and another 350 million face risk of infection. It is known that host cells infected by *Leishmania* parasites, such as macrophages or dendritic cells, can migrate to different host tissues, yet how migration contributes to parasite dissemination and homing remains poorly understood. Therefore, assessing these parasites' ability to modulate host cell response, adhesion, and migration will shed light on mechanisms involved in disease dissemination and visceralization. Cellular migration is a complex process in which cells undergo polarization and protrusion, allowing them to migrate. This process, regulated by actin and tubulin-based microtubule dynamics, involves different factors, including the modulation of cellular adhesion to the substrate. Cellular adhesion and migration processes have been investigated using several models. Here, we describe a method to characterize the migratory aspects of host cells during *Leishmania* infection. This detailed protocol presents the differentiation and infection of dendritic cells, the analysis of host cell motility and migration, and the formation of adhesion complexes and actin dynamics. This *in vitro* protocol aims to further elucidate mechanisms involved in *Leishmania* dissemination within vertebrate host tissues and can also be modified and applied to other cell migration studies.

Introduction

Leishmaniasis, a neglected tropical disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*, results in a wide-ranging spectrum of clinical manifestations, from self-healing localized cutaneous lesions to fatal visceral forms of the disease. It has been estimated that up to one million new leishmaniasis cases arise annually, with

a reported 12 million people currently infected worldwide¹. Visceral leishmaniasis (VL), which can be fatal in over 95% of cases when left untreated, causes more than 50,000 deaths annually, affecting millions in South America, East Africa, South Asia, and the Mediterranean region². The main etiological agent of VL in the new world, *Leishmania infantum*, is transmitted to humans by infected female sandflies during blood-feeding³. These parasites are recognized and internalized by phagocytes, e.g., macrophages and dendritic cells^{3,4,5}. Inside these cells, parasites differentiate into their intracellular forms, known as amastigotes, which will then multiply and be transported *via* the lymphatic system and bloodstream to different host tissues^{6,7}. However, the mechanisms by which *Leishmania* parasites are disseminated in the vertebrate host, as well as the role played by host cell migration in this process, remain unclear.

Cell migration is a complex process executed by all nucleated cells, including leukocytes⁸. According to the classic cycling model of cell migration, this process involves several integrated molecular events that can be divided into five steps: leading-edge protrusion; adhesion of the leading edge to matrix contacts; contraction of cellular cytoplasm; release of the rear edge of the cell from contact sites; and the recycling of membrane receptors from the rear to the front of the cell⁹.

For cell migration to occur, protrusions must be formed and then stabilized through attachment to the extracellular matrix. Among the different receptor types involved in the promotion of cell migration, integrins are notable. Integrin activation results in migration-related signaling; intracellular signaling then occurs via focal adhesion kinase (FAK) and Src family kinases, in addition to talin, vinculin, and paxillin molecules^{10,11,12}. The phosphorylation of paxillin by activated kinases, including FAK, leads to the recruitment

of effector molecules, which transduces external signals that prompt cell migration. It has been shown that paxillin is an intracellular molecule that is crucial to cell adhesion, actin polymerization, and cell migration processes^{13,14,15}.

The actin cytoskeleton plays a central role in the polarization and migration of phagocytes¹⁶. During cell migration process, protrusions formed due to actin polymerization become stabilized through cell adhesion to the extracellular matrix. This process may be modulated by integrin receptors associated with the actin cytoskeleton^{17,18,19}. Several actin-binding proteins regulate the rate and organization of actin polymerization in cellular protrusions²⁰. Studies have shown that RhoA, Rac, and Cdc42 regulate actin reorganization after the stimulation of adherent cells by extracellular factors^{21,22}. During migration, Rac1 and Cdc42 are located at the leading edge of the cell, controlling the extension of lamellipodia and filopodia, respectively, while RhoA, located at the rear of the cell, regulates the contraction of the actomyosin cytoskeleton^{15,23,24,25}.

Studies have shown that *Leishmania* infection modulates host cell functions, such as adhesion to the cellular substrate and migration^{26,27,28,29,30,31}. Immature DCs reside in peripheral tissues; upon interaction with PAMPS, these cells become activated and migrate to the draining lymph nodes, prompting antigen presentation to T cells. A previous study using a mouse model showed that *L. amazonensis* infection provokes a reduction in the migration of DCs to draining lymph nodes²⁹. It was also demonstrated that the inhibition of the adhesion process reduced DC migration after infection with *L. major*³⁰. Nonetheless, the impact of DC migration on parasite dissemination in the host, as well as the mechanisms involved in this process, remain poorly understood.

Here we present a compiled step-by-step protocol to perform an *in vitro* adhesion and migration assay involving human DCs infected by *Leishmania*. This method comprises not only the differentiation and infection of DCs, but also permits the analysis of host cell motility and migration, the formation of adhesion complexes, as well as actin dynamics. The presently described *in vitro* protocol allows researchers to further investigate the mechanisms involved in *Leishmania* dissemination within vertebrate host tissues and can also be manipulated and applied to other cell migration studies.

Protocol

The procedures described herein were approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ, protocol no. 2.751.345). Blood samples were obtained from healthy volunteer donors. Animal experimental procedures were conducted in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and were approved and licensed by the Ethical Committee for Animal Research of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ, protocol no. 014/2019).

1. Isolation and differentiation of human dendritic cells

1. Pipette 10 mL of the density gradient medium in 50 mL centrifuge tubes.
2. Label the 50 mL tubes according to each donor's sample.
3. Collect ~ 50 mL of venous blood from healthy donors and after collection, follow the procedures described below in the flow cabinet.
4. Carefully transfer the collected blood into centrifuge tubes and dilute in saline solution (0.9% sodium chloride) in a ratio of 1:1 at room temperature.
5. Slowly overlay the diluted blood on the top of the density gradient medium.
6. Centrifuge tubes containing the blood and density gradient medium at 400 x *g* for 30 min at room temperature.

NOTE: Switch off the brake before centrifuging to prevent the mixing of gradient layers. After the 1st centrifugation, lower the centrifuge temperature to 4 °C.
7. Carefully remove the tubes from the centrifuge.
8. Identify the ring of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in the sample (buffy coat); gently remove the residual plasma with a pipette.

NOTE: After centrifugation, the following gradient layers will have formed: erythrocytes, density gradient medium, PBMC ring, and plasma. The PBMC ring is located between the density gradient medium and plasma layers.
9. Transfer the cloud-like PBMC layer to a new tube and bring up the volume to 30 mL with saline solution.
10. Centrifuge the tubes containing cell suspension at 250 x *g* for 10 min at 4 °C. Discard the supernatant and resuspend the pellet in 1 mL of saline solution.
11. Collect an aliquot for cell counting with the trypan blue exclusion method. First, dilute at a ratio of 1:1,000. Then, use 10 µL of the diluted cells for trypan blue staining and count cells using a Neubauer chamber to determine cell viability.
12. Centrifuge again at 200 x *g* for 10 min under 4 °C.
13. Resuspend the pellet in MACS buffer. Use 80 µL of the buffer for every 1×10^7 cells.

NOTE: MACS buffer composition: Prepare a solution containing phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, 0.5% bovine serum albumin (BSA), and 2 mM EDTA.

- Dilute the buffer solution at a 1:20 ratio with the rinsing solution. Keep the buffer cold and store at 2-8 °C.
14. Add CD14 microbeads to the cell suspension prepared in step 1.13. Use 20 μL of CD14 microbeads for every 1×10^7 cells.

NOTE: CD14 microbeads are used for the positive selection of human monocytes from PBMCs, as beads bind to CD14-positive cells expressed on most monocytes.
 15. Homogenize the solution containing the pellet and microbeads using a pipette. Keep on ice for 15 min.
 16. Centrifuge the suspension at 300 x g for 10 min under 4 °C.
 17. Resuspend cells in MACS buffer. Use 1-2 mL for 1×10^7 cells in the cell microbead mixture.
 18. Centrifuge the suspension at 300 x g for 10 min under 4 °C.
 19. Aspirate the supernatant and resuspend the pellet in 500 μL of MACS buffer.

NOTE: This is the maximum volume of the cell suspension that can be processed through one column.
 20. Assemble the magnetic column.
 21. Wash the column once by adding 500 μL of MACS buffer. Allow buffer to flow under gravity through the column.

NOTE: Do not allow the column to dry, as any air that enters can obstruct the column.
 22. Add 500 μL of the cell sample solution from step 1.19 per column. Allow the cell sample solution to flow under gravity through the column.
 23. Wash the column by adding 500 μL of MACS buffer (2x). Only add the fresh buffer when the column reservoir is empty. Avoid drying.
 24. Pipette 1 mL of the MACS buffer onto the column and place it in a new tube underneath. Immediately flush out the magnetically labeled cells by firmly pushing the plunger into the column.
 25. Centrifuge the CD14 enriched cells at 300 x g for 10 min under 4 °C.
 26. Count cells using a Neubauer chamber.
 27. Resuspend cells in 1 mL complete RPMI with interleukin-4 (IL-4) (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (50 ng/mL).

NOTE: GM-CSF is a cytokine secreted by macrophages, T cells, mast cells, natural killer cells, endothelial cells, and fibroblasts that induces the differentiation and proliferation of myeloid progenitors in the bone marrow. GM-CSF and IL-4 are used to induce dendritic cell differentiation³².
 28. Seed cells in a 24 well plate at a concentration of 2×10^5 cells per well in 500 μL of complete RPMI medium containing and incubate the cells for 7 days in the cell culture incubator at 37 °C.

2. *Leishmania infantum* cultivation

NOTE: *Leishmania infantum* (MCAN/BR/89/BA262) parasites are used in this assay. Hamsters were intravenously infected with 20 μL of the solution containing 1×10^6 *L. infantum* promastigotes in sterile saline. After 1 to 2 months, animals were euthanized and the amastigote forms of *Leishmania* were recovered from their spleens and differentiated into promastigotes³³.

1. Grow *L. infantum* promastigotes isolated from previously infected hamster spleens in an inclined 25 cm^2 cell

culture flask containing 3 mL of Novy-Nicolle-MacNeal medium (NNN) and 5 mL of supplemented Minimum Essential Medium (MEM).

NOTE: In this assay, MEM medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 24.5 nM hemin bovine.

2. Incubate at 24 °C for 7 days in BOD (Bio-Oxygen Demand) incubator.
 3. Pipette 100 µL of promastigote culture into a new 25 cm² cell culture flask containing 5 mL of supplemented MEM medium.
 4. Incubate the promastigote culture at 24 °C in BOD incubator until promastigotes reach the stationary phase. Periodically count cultured promastigotes by transferring an aliquot of parasite suspension diluted in saline to a Neubauer chamber (i.e., hemocytometer) to determine the stationary phase of growth.
- NOTE:** It is not recommended to use first-passage parasites after cultivation in NNN medium to avoid residual traces of rabbit blood.
5. Transfer 1×10^5 of stationary growth phase culture of *L. infantum* promastigotes to a new 25 cm² cell culture flask and add 5 mL of MEM supplemented medium.
 6. Monitor the growth of the culture periodically for approximately 7 days using a Neubauer chamber until the stationary phase is achieved. Parasites are now ready for use in experimental infection procedures.

NOTE: Promastigote cultures are considered viable for infection for up to 7 passages *in vitro*; additional passages may induce loss of virulence.

3. Human dendritic cell infection

1. Inside a biological laminar flow cabinet, transfer all the contents from the parasite culture flask to 50 mL centrifuge tubes.
2. Add cold saline solution to a final volume of 40 mL.
3. Centrifuge at 1,600 *xg* for 10 min under 4 °C.
4. Discard the supernatant following centrifugation and resuspend the pellet in 1 mL of cold saline solution (Repeat steps 3.3-3.4 three times).
5. After washing the cells to remove any non-viable parasites, resuspend the pellet in 1 mL of cold saline solution.
6. Pass the contents slowly through a 1 mL syringe with a 16 G needle 5 times to separate the parasite clusters.
7. Remove an aliquot to determine the parasite concentration in a hemocytometer (calculate the mean number of parasites in 4 quadrants \times dilution factor $\times 10^4$).
8. Wash dendritic cells by adding 1 mL of saline solution and centrifuging cells at 300 *xg* for 10 min at room temperature (3 times).
9. Calculate the quantity of *L. infantum* required for the experimental infection; ratio: 20 parasites per cell.
10. Place the required volume of *L. infantum* in each well of cell culture plates.
11. Incubate dendritic cells with parasites for 4 h in an incubator at 37 °C under 5% CO₂.
12. After step 3.11, centrifuge plates at 300 *xg* for 10 min under 4 °C.

4. Migration assay using cell culture inserts

1. After infection, wash dendritic cells (infected or not) 3 times with 1 mL of saline solution at room temperature to remove non-internalized parasites. After each wash, centrifuge plates at 300 x g for 10 min under 4 °C.
2. Once non-internalized parasites are removed, detach cells by adding 200 µL of the cell dissociation reagent in each well and incubate for 15 min. Keep the cells in an incubator at 37 °C under 5% CO₂.
3. Homogenize cells using a 1,000 µL pipette tip to allow cells to loosen.
4. Transfer the dissociated cells to a 50 mL centrifuge tube.
5. Centrifuge at 300 x g for 10 min under 4 °C.
6. Resuspend the pellet in 1 mL of RPMI medium supplemented with 10% FBS.
7. Pass the contents of each tube slowly through a 1 mL syringe with a 25 G needle 5 times to separate cells.
8. Remove an aliquot, dilute using trypan blue to determine the cell concentration using a hemocytometer (mean of viable cells in 4 quadrants × dilution factor × 10⁴).
9. Preparation of cell culture microplate inserts:

NOTE: Cell culture inserts (5.0 µm pore polycarbonate membrane) are recommended for migration assays using dendritic cells, macrophages, and monocytes, as these inserts allow phagocytes to pass through the membranes.

 1. Remove inserts with sterile tweezers and place in empty wells.
 2. Add 600 µL of RPMI medium supplemented with 10% FBS to each well; add chemoattractant chemokine (C-C motif) ligand 3 (CCL3) (1 µL for every 1 mL of medium).

NOTE: CCL3 is a chemokine that regulates DC migration³⁴.
3. Using sterile tweezers, place inserts in wells containing the medium.
10. Add 2 x 10⁵ dendritic cells (infected or not) in 100 µL of medium to each insert.
11. Incubate for 4 h to allow cells to migrate.
12. After 4 h, take the plate out and aspirate the medium. Add 100 µL of 4% paraformaldehyde and incubate for 15 min.
13. Remove paraformaldehyde and add 100 µL of saline solution.

NOTE: Plates can be kept at 4 °C for later assembly.
14. Collect the supernatant from inserts or from wells to count non-migrating cells or those that crossed the membrane, respectively. Incubate with paraformaldehyde 4% for 15 min.
15. Concentrate cells using a cytocentrifugation technique³⁵.
16. Add 10 µL of the mounting medium with DAPI to the membranes and place coverslips over the wells.
17. Assembly of the insert membrane.

NOTE: This step can be performed outside the biosafety cabinets.

 1. Remove insert membranes from wells.
 2. Scrape the surface of the insert with a swab to remove any cells that have not migrated.
 3. Using a scalpel, remove the membrane from the insert.
 4. Place the membrane on a slide, with cells facing up.

5. Add 10 μ L of mounting medium with DAPI to each membrane and then place overlay coverslips.
6. Cover plates with aluminum foil.
7. Incubate plates at room temperature for 30 min, then store at -20°C
18. To analyze cell migration, count the number of cells per field (no less than 10 fields) using a fluorescence microscope at a laser excitation wavelength of 405 nm.
1. After infecting cells for 4 h, wash each well 3 times with sterile saline solution at room temperature to remove any non-internalized parasites.
2. Centrifuge the plate at $300 \times g$ for 10 min under 4°C . Add 500 μ L of 4% paraformaldehyde to each well for 15 min.
3. Remove paraformaldehyde and add 1 mL of saline solution.
4. Prepare solutions as described in **Table 1**.

5. Adhesion assay and evaluation of actin polymerization by immunofluorescence

NOTE: For this assay, use 24-well plates with coverslips.

Primary solutions	Chemical compound	Diluent	
Ammonium chloride solution	0,134 g of NH_4Cl	50 ml of PBS 1X	
Saponin 15%	150 mg of saponin	1 mL de PBS 1X	
Albumin from bovine serum (ABS) 10%	1 g of ABS	10 mL of PBS 1X	
Secondary solutions	Component 1	Component 2	Component 3
Saponin 0,15%	1mL of saponin 15%	100 mL of PBS 1X	-
PBS 1X / ABS 3% / Saponin 0,15%	13,8 mL of PBS 1X	6 mL of ABS 10%	200 μ L of Saponin 15%
PBS1X / ABS 0,3% / Saponin 0,15%:	19,2 mL of PBS 1X	0,6 mL of ABS 10%	200 μ L of Saponin 15%
PBS 1X / ABS 1% / Saponin 0,15%	17,8 mL of PBS 1X	2 mL of ABS 10%	200 μ L of Saponin 15%

Table 1: Buffer recipes.

5. Immunostaining
 - NOTE:** The following steps must be performed under agitation.
 - 1. Wash coverslips 3 times with 1x PBS for 5 min.
 - 2. Add 500 μ L of ammonium chloride solution per well for 10 min.

3. Wash coverslips 3 times with 1x PBS for 5 min.
 4. Permeabilize the membrane with Saponin 0.15% for 15 min.
 5. Incubate cells with the blocking solution (PBS 1x / ABS 3% / Saponin 0.15%) for 1 h.
 6. Wash coverslips 3 times with PBS 1x/Saponin 0.15% for 5 min.
 7. Dilute primary antibodies in PBS 1x /ABS 1% / Saponin 0.15% as: Rabbit anti-FAK (pTyr397): 1:500 dilution, Rabbit anti-paxilin (pTyr118): 1:100 dilution. Mouse Anti-Rac1: 1:100 dilution. Rabbit Anti-Cdc42: 1:200 dilution. Rabbit Anti-RhoA: 1:200 dilution.
 8. Incubate cells with primary antibody diluted in PBS 1x/ABS 1% /Saponin 0.15% for 1 h.
NOTE: FAK and Paxillin are key molecules involved in the formation of adhesion complexes^{13,14,15}. The Rho GTPase family is responsible for the organization of the actin cytoskeleton. RAC1 and Cdc42, located at the front edge of the cell, control the formation of lamellipodia and filopodia, respectively; RhoA is located at the rear of the cell and is involved in cytoskeleton contraction^{15, 23,24,25}.
 9. Wash coverslips 3 times with 1x PBS/Saponin 0.15% for 5 min.
 10. Dilute secondary antibody or phalloidin as follows: Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 568: 1:500 dilution; Anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488: 1:500 dilution; Anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594: 1:500 dilution; Phalloidin Alexa Fluor 488: 1:1200 dilution.
 11. Incubate cells with secondary antibody or phalloidin diluted in 1x PBS/ABS 0.3% Saponin 0.15% for 45 min.
NOTE: Incubation of the secondary antibody or phalloidin should be performed in the absence of light. Cover plates with aluminum foil to protect from light during the following steps.
 12. Wash coverslips 3 times with 1x PBS for 5 min.
 13. Remove coverslips from wells.
 14. In the absence of light, add 10 μ L of mounting medium with DAPI onto clean microscopic glass slides.
 15. Place coverslips with cells facing down to allow contact between cells and DAPI solution.
NOTE: Cover slides with aluminum foil to protect from light.
 16. Incubate for 30 min at room temperature.
 17. Store at -20 °C.
- 6. Confocal microscopy, image acquisition, and quantification using FIJI**
- NOTE:** To acquire/capture immunofluorescence images, use a confocal laser scanning microscope. Oil-immersion 63x objective lens is recommended for optimal resolution.
1. Allow coverslips to reach room temperature, protected from light, for at least 30 min prior to image acquisition.
 2. Clean the coverslips with absorbent tissue.
 3. Add a drop of immersion oil to the objective and place each slide under the microscope.
 4. Move the objective until the oil touches the slide.

5. Observe and adjust the microscope focus; select the **63x objective with oil**.
6. Turn on lasers at **488 nm, 552 nm, and 405 nm** wavelengths.
7. Select image resolution: **1024 x 1024**.
8. Click on the **Live** button, set the Z stack, and press **Begin**. Repeat the process and then press **End**.
9. After selecting the **Maximum Projection** option in the **Tool** menu, wait for the image to be acquired.
10. **Save** the experiment.
11. **Export** images in .lif format on a computer. Use FIJI open-source image analysis software to analyze images.
12. Select the images to be analyzed and select **Duplicate Image**.
13. To have the image in grayscale, select **Image | Adjust | Color Threshold**. Select **0** and **255** (saturation).
14. Select the threshold method: **Default**.
15. Select threshold color: **B and W** (black and white).
16. Do not select **Dark background**.
17. Select: **Process | Binary | Options** and then select the relevant data to be measured: **Area, Min, Max, gray value, integrate density**.
18. Select the free hands' tool in the Fiji toolbar and trace each cell manually carefully.
19. From the **Analyze** menu, select **Set measurements**. Make sure to have area integrated intensity and mean grey value selected. Repeat this process for each cell.
20. Select all data in the Results window and copy and paste into a spreadsheet file.
21. Calculate the corrected total cell fluorescence (CTCF):
CTCF (Integrate density = Area of selected cell x Mean fluorescence of background readings).
22. Open the file containing data using statistical analysis software to perform statistical analysis.

7. Statistical analysis

1. Open a **New Project** when a welcome dialog appears.
2. Choose the type of graph and medium with SD.
3. Apply the values obtained from the experimental results to the table.
4. Select **Descriptive Statistics** and choose the option column **Statistics [all tests]** to analyze data distribution.
5. If data follow a Gaussian distribution, choose the t-test to analyze samples by comparing two pairs. If the distribution is non-Gaussian, analyze data using the Mann-Whitney test.
6. Choose the best graph option for optimal data representation.

Representative Results

This protocol described herein enables the evaluation of cell migration and its associated mechanisms, such as actin dynamics and adhesion, thereby providing a tool to determine the migration of *Leishmania*-infected host cells within the vertebrate host. The results presented here demonstrate that this *in vitro* assay provides rapid and consistent indications of changes in cellular adhesion, migration, and actin dynamics prior to *in vivo* experimentation.

First, cells were successfully cultured following aseptic techniques and lab protocols. Data generated via migration

analysis using cell culture membrane inserts allowed us to evaluate the migration of *L. infantum*-infected or uninfected human dendritic cells. DAPI staining permitted the facile visualization of migratory cells, enabling us to discriminate between infected and non-infected cells as staining procedures incorporate both dendritic cell and parasite nuclei. Infected cells can be identified by visualizing the large macrophage nuclei and the number of smaller amastigote nuclei clustered around each macrophage nucleus. Next, infected cells (*L. infantum* infected group) and uninfected cells (control group) were then counted for each field of vision using a manual counter. Finally, the number of migratory infected cells was compared to the number of uninfected cells (control group) that migrated. Our results indicate higher rates of cell migration following *L. infantum* infection when compared to non-infected controls (**Figure 1**).

The evaluation of actin dynamics and the formation of adhesion complexes, factors critical to cellular migration, allows for an enhanced understanding of how infection may modulate host cell migration. To assess these mechanisms, we performed immunostaining for molecules involved in actin dynamics (phalloidin, Rac1, Cdc42, and RhoA) and adhesion complex formation (FAK and paxillin). The expression of each protein was evaluated using confocal microscopy. The differences in protein expression were

assessed by comparing the fluorescence intensity between infected and uninfected cells for each protein analyzed. Our results demonstrate actin polymerization in infected and non-infected cells and the formation and localization of adhesion complexes. DAPI staining enabled the identification of infected cells through the staining of parasite nuclei. Fluorescence analysis indicated increased FAK and paxillin expression in DCs following *L. infantum* infection (**Figure 2**). To evaluate the organization of actin filaments in DCs, actin was labeled with fluorescent phalloidin. The resulting images revealed more areas with actin polymerization, yet no differences in phalloidin staining comparing infected and non-infected cells (**Figure 3A**). However, considering that the structure of actin is highly dynamic, the evaluation of actin-associated molecules may provide additional insight into the organization of this structural protein. Thus, we evaluated the expression of Rho GTPase proteins. Although phalloidin staining yielded similar results in infected and non-infected cells, increases were noted in Rac1, Cdc42 and RhoA expression after *L. infantum* infection when compared to uninfected controls (**Figure 3B,C,D**). These results reinforce the need for further investigation of molecules involved in actin polymerization to gain a more comprehensive understanding of its associated dynamics.

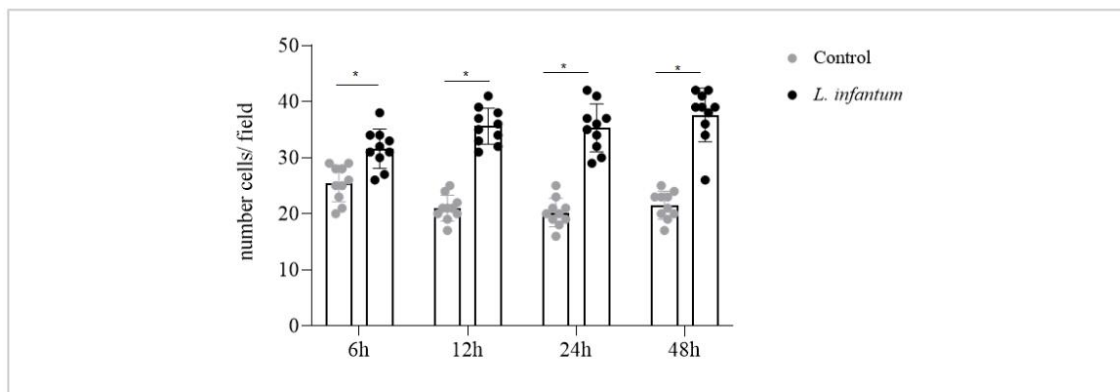


Figure 1: Evaluation of dendritic cell migration in *L. infantum* infection. Dendritic cells were infected by *L. infantum* at a ratio of 20:1 for 4 h. At 6, 12, 24 or 48 h after infection, dendritic cells could migrate in the presence of CCL3 chemoattractant through the cell culture insert system for an additional 4 h. Migrating cells were washed, fixed, and stained with DAPI. Bars represent numbers of migratory cells after *L. infantum* infection from random counts in 10 fields using confocal microscopy. Each dot represents one cell. * $p < 0.05$ (Student's *t*-test). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

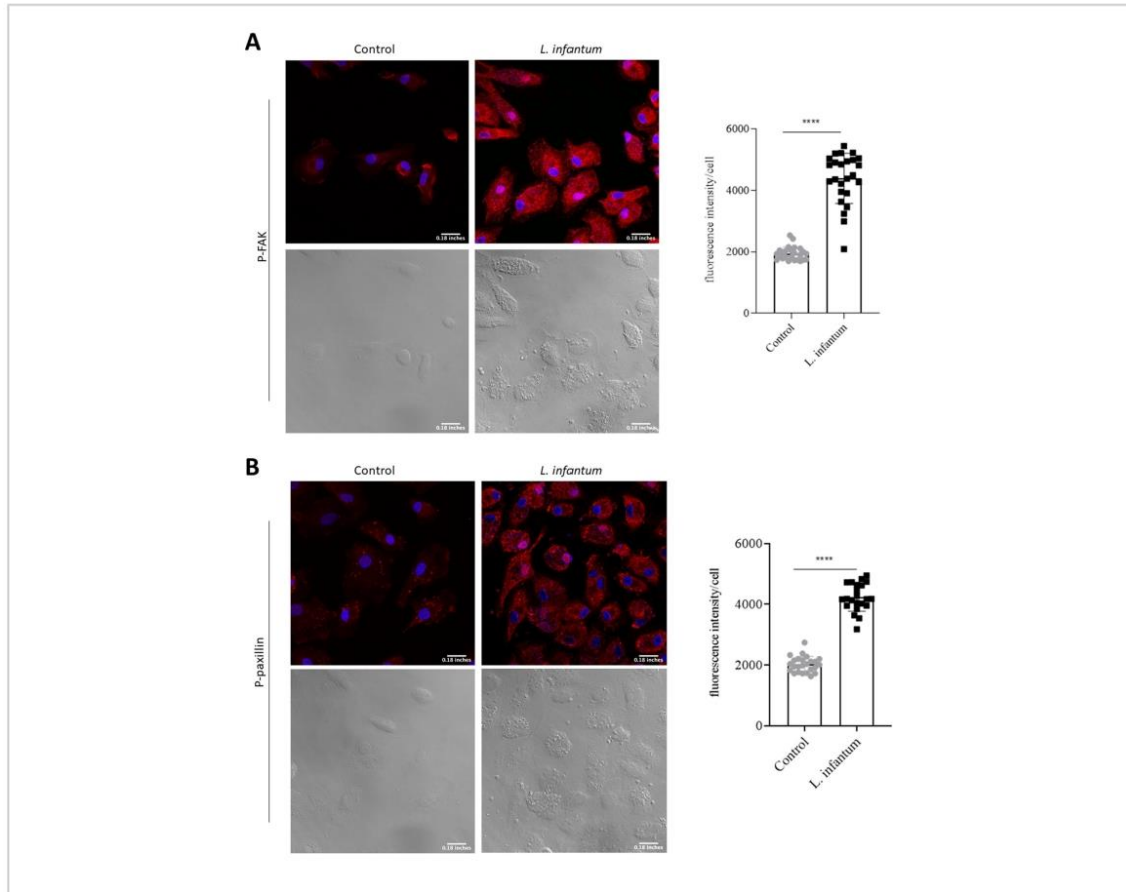


Figure 2: Evaluation of adhesion complex formation in *L. infantum*-infected dendritic cells. Dendritic cells infected or not with *L. infantum* were stained with anti-pFAK or anti-paxillin antibodies. **(A)** Fluorescence intensity of FAK expression. **(B)** Fluorescence intensity of paxillin expression. For each group, 30 cells were analyzed using FIJI software. Red: anti-pFAK, or anti-paxillin; Blue: DAPI; Grayscale: differential interference contrast (DIC). Scale bar = 0.18 inches. * $p < 0.05$ (Student's *t*-test). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

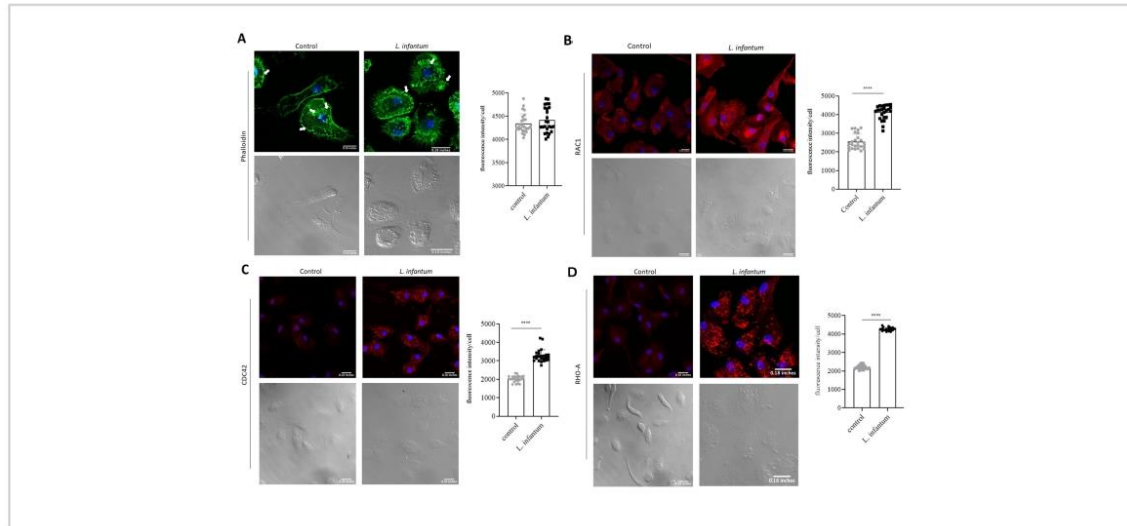


Figure 3: Evaluation of actin dynamics in *L. infantum*-infected dendritic cells. Dendritic cells infected or not with *L. infantum* were stained with anti-Rac1, anti-RhoA and anti-Cdc42 antibodies or fluorescent phalloidin. **(A)** Fluorescence intensity of phalloidin expression (green). **(B)** Fluorescence intensity of Rac1 expression (red). **(C)** Fluorescence intensity of Cdc42 expression (red) **(D)** Fluorescence intensity of RhoA expression (red). For each group, 30 cells were analyzed using FIJI software. Red: anti-Rac1 or anti-Cdc42; Green: anti-RhoA or phalloidin; Blue: DAPI; Grayscale: differential interference contrast (DIC). Scale bar = 0,18 inches. *, $p < 0,05$ (Student's t-test). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

Discussion

The method described here for evaluating cell migration using the cell culture membrane inserts system allows researchers to study the migratory response of cells in a two-dimensional environment. In this technique, some steps are considered critical. Firstly, the differentiation of human DCs and infection with *Leishmania* are determinative since the infection rate is donor-dependent. Using more than one donor per experiment and healthy *Leishmania* cultures will allow for more consistent results. It is also crucial that parasites be maintained in host animals, which favors the selection and maintenance of virulent strains and the ability to readily colonize host cells.

Following DC differentiation, we recommend checking the expression of surface markers CD80 and CD11c to verify that the cells being used in experimentation are, in fact, dendritic cells. Despite variability in infection rates, increased DC migration following *L. infantum* infection was observed in all experiments.

The cell culture membrane inserts system assay, employed herein, entails cell migration through a porous polycarbonate membrane from the upper to the lower compartment of the cell culture membrane inserts system. A chemoattractant is placed in the bottom of each well to direct cell migration through the porous membrane during incubation³⁶. It is

important to use an appropriate pore size for the cell type of interest. For DCs, we used a cell culture membrane inserts system with a 5 μ m pore size. Of note, after the fixation step, the surfaces of the insert membranes were scraped with a swab to remove cells that had not migrated. This step was implemented to ensure that only those cells that successfully migrated through the membrane were evaluated. Another critical point that warrants consideration is the use of DAPI staining, a rapid procedure that allows investigators to not only identify host cells but also parasite nuclei, thus enabling the convenient identification of infected cells.

Although the cell culture membrane inserts system has been extensively used as an effective tool for assessing migration^{28,36,37,38,39}, there are some limitations associated with this technique. During cell washing and fixation steps, less-adherent cells may be lost when analyzing the membrane, resulting in an underestimation of the number of cells that migrated. Another limitation is time related. After long incubation periods, gradient loss may occur due to diffusion through the porous membrane. Thus, this system should be considered more efficient for shorter incubation periods³⁶. On the other hand, the use of the cell culture membrane inserts system is advantageous compared to other methods such as the scratch assay or random migration since it allows the study of directional migration in the presence of a chemoattractant.

Another essential component of this protocol is the use of immunofluorescence to investigate mechanisms involved in cellular migration, such as adhesion complex formation and actin dynamics. This technique allows investigators to visualize specific targets in tissues or cells using specific antibodies for proteins of interest. In this protocol, to assess cellular adhesion, we evaluated the expression

of phosphorylated FAK and paxillin, both crucial proteins involved in the formation of adhesion complexes in different cell types, including leukocytes¹³, and consequently excellent tools for studying cell adhesion. Previous studies have shown that increased FAK signaling promotes cellular motility¹¹. Also, the use of this technique to evaluate cell adhesion does not require the use of more labor-intensive techniques, such as the use of inflamed connective tissue²⁶.

The phalloidin staining technique^{40,41} provides information about the expression of polymerized actin, F-actin, and the regions of cells with higher polymerization rates. To gain further insight into actin dynamics in *L. infantum*-infected cells, we also evaluated the expression of Rac1, Cdc42, RhoA, and Rho GTPase, which participate in the polymerization of actin filaments⁴². The expression of these molecules was also performed using immunofluorescence. This technique is not only an alternative to the use of transgenic mice expressing fluorescent actin²⁸ but also provides further information about molecules modulated during the actin polymerization process.

Several factors can affect immunofluorescence quality and efficacy. Antibody dilution, for example, when not carefully determined, can impair the acquisition of images and lead to non-specific staining due to elevated levels of background signals. Samples must also always be protected from light to avoid any loss of cell fluorescence or staining⁴³.

In summary, here we describe an *in vitro* protocol that allows for the evaluation of cell adhesion and migration processes in the context of *Leishmania* infection. Our primary focus was on DCs, which are known to play a significant role in the immunopathogenesis of leishmaniasis; however, how these cells participate in parasite dissemination in the vertebrate host remains poorly understood. This protocol can also be

modified to investigate cellular migration in other types of host cells for the investigation of other species of intracellular parasites. Also, extracellular matrix, such as collagen I or Matrigel, can be added to the cell culture membrane inserts system to evaluate 3D migration and cellular invasion in different fields of study.

Disclosures

The authors declare they have no competing financial interests.

Acknowledgments

This work was supported by Bahia Research Support Foundation (Fapesb), grant number 9092/2015. The authors acknowledge CNPq, Capes and Fapesb for financial support via scholarships. The authors would like to thank Andris K. Walter for critical analysis, English language revision and manuscript copyediting assistance.

References

- Burza, S., Croft, S. L., Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet*. **392** (10151), 951-970 (2018).
- Bi, K., Chen, Y., Zhao, S., Kuang, Y., John Wu, C. H. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. *BioMed Research International*. **2018** (2018).
- Serafim, T. D., Iniguez, E., Oliveira, F. Leishmania infantum. *Trends in Parasitology*. **36** (1), 80-81 (2020).
- Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A. I., Maes, L., Cos, P. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*. **51** (2), 337-351 (2011).
- Podinovskaia, M., Descoteaux, A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiology*. **10** (1), 111-129 (2015).
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and Immunity*. **58** (3) (1990).
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends in Microbiology*. **6** (10), 392-401 (1998).
- Friedl, P., Wolf, K. Plasticity of cell migration: A multiscale tuning model. *Journal of Cell Biology*. **188** (1), 11-19 (2010).
- Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., Choquet, D. Cell migration as a five-step cycle. *Biochemical Society symposium*. **65**, 233-243 (1999).
- Yano, H. et al. Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion. *Journal of Cell Biology*. **166** (2), 283-295 (2004).
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **6** (1), 56-68 (2005).
- Deramaudt, T. B. et al. Altering FAK-Paxillin Interactions Reduces Adhesion, Migration and Invasion Processes. *PLoS One*. **9** (3) (2014).
- Turner, C. E. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature Cell Biology*. **2** (12) (2000).

14. Linder, S., Aepfelbacher, M. Podosomes: Adhesion hot spots of invasive cells. *Trends in Cell Biology*. **13** (7), 376-385 (2003).
15. Huvenerers, S., Danen, E. H. J. Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*. **122** (8), 1059-1069 (2009).
16. Jones, G. E. Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *Journal of Leukocyte Biology*. **68** (5), 593-602 (2000).
17. De Fougères, A. R., Kotliansky, V. E. Regulation of monocyte gene expression by the extracellular matrix and its functional implications. *Immunological Reviews*. **186** (1), 208-220 (2002).
18. Cortesio, C. L., Boateng, L. R., Piazza, T. M., Bennin, D. a, Huttenlocher, A. Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*. **286** (12), 9998-10006 (2011).
19. Verkhovskiy, A. B. et al. Orientational order of the lamellipodial actin network as demonstrated in living motile cells. *Molecular Biology of the Cell*. **14** (11), 4667-4675 (2003).
20. Ridley, A. J. et al. Cell Migration: Integrating signals from front to back. *Science*. **302** (5651), 1704-1709 (2003).
21. Hall, a Small GTP-binding proteins, and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology*. **10**, 31-54, (1994).
22. Machesky, L.M., Hall, A. Rho: A connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*. **6** (8), 304-310 (1996).
23. Ridley, A. J., Hall, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. **70** (3), 389-399 (1992).
24. DeMali, K. A., Burridge, K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *Journal of Cell Science*. **116** (12), 2389-2397 (2003).
25. López-Colomé, A. M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., López, E. Paxillin: A crossroad in pathological cell migration. *Journal of Hematology and Oncology*. **10** (1) (2017).
26. 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*. **107** (3-4), 189-199 (2004).
27. Pinheiro, N. F. et al. Leishmania infection impairs β 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infection and Immunity*. **74** (7), 3912-3921 (2006).
28. de Menezes, J. P. B. et al. Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. *Cellular Microbiology*. **19** (3) (2017).
29. Hermida, M. D. R., Doria, P. G., Taguchi, A. M. P., Mengel, J. O., dos-Santos, W. L. C. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infectious Diseases*. **14** (1), 450 (2014).
30. Ballet, R. et al. Blocking junctional adhesion molecule c enhances dendritic cell migration and boosts the immune responses against Leishmania major. *PLoS Pathogens*. **10** (12) (2014).

31. Rocha, M. I. et al. Leishmania infantum enhances migration of macrophages via a phosphoinositide 3-Kinase γ -dependent pathway. *ACS Infectious Diseases*. **6** (7), 1643-1649 (2020).
32. Hiasa, M. et al. GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF- α converting enzyme (TACE). *Blood*. **114** (20), 4517-4526 (2009).
33. Melo, C. V. B. de et al. Phenotypical characterization of spleen remodeling in murine experimental visceral leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*. **11**, 653 (2020).
34. Gibaldi, D. et al. CCL3/macrophage inflammatory protein-1 α is dually involved in parasite persistence and induction of a TNF- and IFN γ -enriched inflammatory milieu in Trypanosoma cruzi-induced chronic cardiomyopathy. *Frontiers in Immunology*. **11**, 306 (2020).
35. Finger, P. T., Papp, C., Latkany, P., Kurlı, M., Iacob, C. E. Anterior chamber paracentesis cytology (cytospin technique) for the diagnosis of intraocular lymphoma. *British Journal of Ophthalmology*. **90** (6), 690-692 (2006).
36. Zhang, C., Barrios, M. P., Alani, R. M., Cabodi, M., Wong, J. Y. A microfluidic Transwell to study chemotaxis. *Experimental Cell Research*. **342** (2), 159-165 (2016).
37. Glynn, S. A., O'Sullivan, D., Eustace, A. J., Clynes, M., O'Donovan, N. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells. *BMC Cancer*. **8** (2008).
38. van de Merbel, A. F., van der Horst, G., Buijs, J. T., van der Pluijm, G. Protocols for migration and invasion studies in prostate cancer. *Methods in Molecular Biology*. **1786**, 67-79 (2018).
39. Omar Zaki, S. S., Kanesan, L., Leong, M. Y. D., Vidyadaran, S. The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. *Cell Biology International*. **43** (10), 1201-1204 (2019).
40. Borovikov, I. S. Izuchenie strukturnykh izmenenii sokratitel'nykh belkov myshechnogo volokna s pomoshch'iu poliarizatsionnoi ultravioletovoi fluorestsentnoi mikroskopii. VIII. Vliianie glutaral'degida i falloidina na konformatsiiu F-aktina. *Tsitologiya*. **26** (11), 1262-1266 (1984).
41. Cooper, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of Cell Biology*. **105** (4), 1473-1478 (1987).
42. Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. W., Ridley, A. J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *Journal of Cell Science*. **110**, 707-720 (1997).
43. Lichtman, J. W., Conchello, J. A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*. **2** (12), 910-919 (2005).

Anexo B - Manuscrito II

17-AAG-Induced activation of the autophagic pathway in *Leishmania* Is associated with parasite death

Abstract: The heat shock protein 90 (Hsp90) is thought to be an excellent drug target against parasitic diseases. The leishmanicidal effect of an Hsp90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), was previously demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. Parasite death was shown to occur in association with severe ultrastructural alterations in *Leishmania*, suggestive of autophagic activation. We hypothesized that 17-AAG treatment results in the abnormal activation of the autophagic pathway, leading to parasite death. To elucidate this process, experiments were performed using transgenic parasites with GFP-ATG8-labelled autophagosomes. Mutant parasites treated with 17-AAG exhibited autophagosomes that did not entrap cargo, such as glycosomes, or fuse with lysosomes. ATG5-knockout ($\Delta atg5$) parasites, which are incapable of forming autophagosomes, demonstrated lower sensitivity to 17-AAG-induced cell death when compared to wild-type (WT) *Leishmania*, further supporting the role of autophagy in 17-AAG-induced cell death. In addition, Hsp90 inhibition resulted in greater accumulation of ubiquitylated proteins in both WT- and $\Delta atg5$ -treated parasites compared to controls, in the absence of proteasome overload. In conjunction with previously described ultrastructural alterations, herein we present evidence that treatment with 17-AAG causes abnormal activation of the autophagic pathway, resulting in the formation of immature autophagosomes and, consequently, incidental parasite death.

Keywords: Hsp90, leishmaniasis, chemotherapy, Hsp90 inhibitors, autophagy, ubiquitin

Trabalho publicado na revista Microorganisms, 2021.



Article

17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death

Antonio Luis de O. A. Petersen ¹, Benjamin Cull ², Beatriz R. S. Dias ¹, Luana C. Palma ^{1,3}, Yasmin da S. Luz ¹, Juliana P. B. de Menezes ¹, Jeremy C. Mottram ^{2,4} and Patricia S. T. Veras ^{1,5,*}

¹ Laboratory of Parasite-Host Interaction and Epidemiology (LAIPHE), Gonçalo Moniz Institute—FIOCRUZ, Salvador 40296-710, Brazil; petersen.swe@gmail.com (A.L.d.O.A.P.); beatrizrsdias@gmail.com (B.R.S.D.); luanabio@hotmail.com (L.C.P.); yasmindasilvaluz.1997@gmail.com (Y.d.S.L.); juliana.fullam@fiocruz.br (J.P.B.d.M.)

² Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK; bcull53@hotmail.com (B.C.); jeremy.mottram@york.ac.uk (J.C.M.)

³ Post-Graduate Program in Experimental Pathology, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador 40110-909, Brazil

⁴ Department of Biology, York Biomedical Research Institute, University of York, York YO10 5DD, UK

⁵ National Institute of Tropical Disease (INCT-DT), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília 71605-001, DF, Brazil

* Correspondence: patricia.veras@fiocruz.br; Tel.: +55-(71)-3176-2263



Citation: Petersen, A.L.d.O.A.; Cull, B.; Dias, B.R.S.; Palma, L.C.; Luz, Y.d.S.; de Menezes, J.P.B.; Mottram, J.C.; Veras, P.S.T. 17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1089. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051089>

Academic Editor: Helena Castro

Received: 26 March 2021

Accepted: 23 April 2021

Published: 19 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The heat shock protein 90 (Hsp90) is thought to be an excellent drug target against parasitic diseases. The leishmanicidal effect of an Hsp90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), was previously demonstrated in both in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. Parasite death was shown to occur in association with severe ultrastructural alterations in *Leishmania*, suggestive of autophagic activation. We hypothesized that 17-AAG treatment results in the abnormal activation of the autophagic pathway, leading to parasite death. To elucidate this process, experiments were performed using transgenic parasites with GFP-ATG8-labelled autophagosomes. Mutant parasites treated with 17-AAG exhibited autophagosomes that did not entrap cargo, such as glycosomes, or fuse with lysosomes. ATG5-knockout ($\Delta atg5$) parasites, which are incapable of forming autophagosomes, demonstrated lower sensitivity to 17-AAG-induced cell death when compared to wild-type (WT) *Leishmania*, further supporting the role of autophagy in 17-AAG-induced cell death. In addition, Hsp90 inhibition resulted in greater accumulation of ubiquitylated proteins in both WT- and $\Delta atg5$ -treated parasites compared to controls, in the absence of proteasome overload. In conjunction with previously described ultrastructural alterations, herein we present evidence that treatment with 17-AAG causes abnormal activation of the autophagic pathway, resulting in the formation of immature autophagosomes and, consequently, incidental parasite death.

Keywords: Hsp90; leishmaniasis; chemotherapy; Hsp90 inhibitors; autophagy; ubiquitin

1. Introduction

Leishmania spp. are protozoan parasites [1,2] that cause leishmaniasis, which can present in a variety of clinical manifestations, including skin and visceral forms [3]. Being one of the most important neglected tropical diseases, leishmaniasis affects millions of people worldwide. Financial investment in new therapeutic strategies has been scarce [3], resulting in pentavalent antimonials being the drug of choice for more than 70 years in Brazil. However, antimonial therapy requires parenteral administration at high dosage and involves a lengthy therapeutic course that can result in a range of serious side effects [4]. Recent increases in therapeutic failure [5–7] reinforce the importance of developing new drugs capable of replacing or complementing existing strategies for leishmaniasis treatment.

Heat shock protein 90 (Hsp90) has been considered as a potential molecular target for the treatment of parasitic diseases [8–10]. Hsp90 inhibitors, such as geldanamycin or 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), have demonstrated inhibitory effects on the differentiation process of *Leishmania* in vitro [11] and were shown to exert anti-parasitic activity in vitro and in vivo [12–16]. These inhibitors are members of a family of antibiotics that selectively bind to the Hsp90 ATP pocket, preventing ATP hydrolysis and folding of client proteins that do not achieve a tertiary structure. In mammals, these unfolded proteins are eventually degraded in the ubiquitin-proteasome system, which can result in cell death secondary to proteasome overload. This can subsequently lead to the formation of protein aggregates [17–20], resulting in the activation of a protective selective autophagic process in order to avoid aggregate accumulation in the cytoplasm [21–23]. Alternatively, Hsp90 inhibition can lead to a pronounced transcription of Hsp70, Hsp90 and Hsp40, responsible for mounting mis- or unfolded proteins, thereby limiting the formation of polyubiquitylated protein aggregates [24].

In previous studies, we have demonstrated that 17-AAG was capable of controlling *Leishmania* infection (in vitro [15] and in vivo [16]) by eliminating promastigotes, which colonize the insect vector, as well as amastigotes, which are found within vertebrate host cells [15,16]. Nevertheless, the mechanism by which Hsp90 inhibition causes parasite death remains unclear. Electron microscopy revealed ultrastructural alterations suggestive of the activation of autophagy in parasites, including progressive cytoplasmic vacuolization, double-membrane vacuoles, myelin figures and vacuoles containing cytoplasmic material, all occurring in the absence of significant alterations in cellular nuclei, mitochondria or plasma membranes [15].

The conserved autophagic process in eukaryotic cells is responsible for the turnover of long-lived proteins and organelles inside autophagosomes [25,26], which plays an important role in cellular homeostasis and in cell survival in response to different types of stress [25,27–29]. Autophagosomes are formed in successive steps involving the recruitment and activation of proteins of the ATG (AuTophagy-related genes) family [30–32]. In *Leishmania* parasites, ATG12 must firstly conjugate with ATG5 in order for ATG8 to participate in the assembly of this complex, resulting in the formation of autophagosomes [33–35] that may acquire cargo and fuse with lysosomes, thereby forming autolysosomes [33,34]. The engulfed material is degraded, generating small molecules that may be utilized for cell survival [36,37]. Autophagy has also been identified as essential to the differentiation of *Leishmania* promastigotes into amastigotes [33]. By contrast, autophagic induction has been associated with death in eukaryotic cells [30,38]. Thus, the true role played by autophagy with respect to the mechanism responsible for causing protozoan parasite death in response to several stress stimuli, including antiparasitic drugs, remains to be elucidated [39].

We hypothesize that 17-AAG induces abnormal activation of autophagy in *Leishmania* spp., resulting in parasite death. To test this, several genes of the autophagic pathway were genetically modified in *L. major* promastigotes, which were used to investigate the participation of autophagy in parasite death following treatment with 17-AAG.

2. Materials and Methods

2.1. *Leishmania* Culturing

Leishmania major (MHOM/JL/80/Friedlin) were cultivated in modified HOMEM medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco) and 1% (*v/v*) penicillin streptomycin solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 25 °C until mid-log phase was achieved, corresponding to 5×10^6 parasites/mL.

2.2. Generation of Parasite Mutants Expressing Fluorescent Markers

All mutant parasites used in this research were previously generated by our collaborators and are described as follows: (i) green fluorescent protein-ATG8 (GFP-ATG8) plasmid as described by Besteiro et al. [33]; (ii) the glycosome targeting SQL motif labelled with RFP plasmid (RFP-SQL) as described by Cull et al. [40]; (iii) the proCPB lysosomal-marker

labeled with RFP plasmid (RFP-proCPB) by Huete-Perez et al. [41]. Null mutant *atg5* parasites ($\Delta atg5$), $\Delta atg5$ expressing GFP-ATG8 ($\Delta atg5(GFP-ATG8)$) and $\Delta atg5::ATG5$ parasites re-expressing ATG5 in the $\Delta atg5$ null mutant were generated by Williams et al. [35] and used as controls. In sum, two plasmids, both derived from pGL345-HYG, the pGL345ATG5-HYG5' 3' and pGL345ATG5-BLE5' 3', were generated with fragments of the 5' and 3' UTRs flanking the ORF of ATG5 gene. The resulting linearized cassettes were used in two rounds of electroporation using a nucleofector transfection system according to the manufacturer's instructions (Lonza, Basel, Switzerland) to produce a heterozygous cell line, simultaneously resistant to hygromycin and bleomycin. To select the parasites that successfully expressed the desired proteins, an appropriate antibiotic was used to treat each transfected parasite line: G418 (Neomycin) at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Hygromycin at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Blasticidin S at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Phleomycin at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (all from InvivoGen, San Diego, CA, USA).

2.3. Parasite Treatment with 17-AAG or Pentamidine

In accordance with each experimental protocol, promastigotes of *L. major* were submitted to treatment procedures using the antileishmanial 17-AAG (InvivoGen, San Diego, CA, USA) (100, 300 or 500 nM) or pentamidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10, 20 and 30 μM) for up to 72 h. At the end of each treatment period, parasites were pelleted by centrifugation for 3 min at $1000 \times g$ and then washed thrice in PBS for medium removal. Cells were then resuspended in PBS and a 10 μL suspension was spread thinly over a slide covered with a 22×40 mm coverslip, then sealed with nail varnish to perform fluorescence microscopy.

2.4. Assessment of Autophagosome Formation and Autophagosome Colocalization with Glycosomes and Lysosomes by Fluorescence Microscopy

Fluorescence microscopy was used: (i) to assess the presence of GFP-ATG8-labelled vesicles, characteristic of autophagosomes, which appear as punctate structures as previously described [40,42] and (ii) to evaluate the effects of 17-AAG treatment on the autophagosomal maturation process using the two *L. major* double-mutant promastigotes: GFP-ATG8 and RFP-SQL; GFP-ATG8 and proCPB-RFP. To quantify the number of GFP-ATG8-labelled vesicles and determine the percentage of parasites containing GFP-ATG8-labelled vesicles, after mounting for up to 1 h, parasite smears were observed under a DeltaVision Core deconvolution microscope (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, USA) using GFP or mCherry filters at 1,000 magnification. For cell visualization, DIC images were also obtained under polarized light. All images were processed and analyzed using SoftWoRx image analysis software (Applied Precision Inc.) [40,42]. At least 300 parasites were counted for each combination of treatment and time point, with no less than three independent experiments considered. Also, the effects of 17-AAG treatment on the autophagosomal maturation process was evaluated in the double-mutant *L. major* promastigotes. Autophagosome colocalization with glycosomal cargo or with lysosomes was evaluated after treatment with 500 nM of 17-AAG at 24 or 48 h. Parasites were also imaged using a DeltaVision Core deconvolution microscope as described above. Images were submitted to colocalization analysis using SoftWoRx image analysis as previously described [43].

2.5. Parasite Viability

Axenic parasites in mid-log phase were treated with serial dilutions of 17-AAG for 48 h at concentrations ranging from 10 to 15,625 nM or with DMSO (control), and after adding AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (10% final concentration) followed by incubation for another 24 h at 24 °C, reagent absorbance was measured at the wavelengths of 570 and 600 nm.

To evaluate the kinetics of 17-AAG on the viability of $\Delta atg5$ compared to WT and $\Delta atg5::ATG5$ parasites, promastigote cultures were treated with 300 nM and 500 nM of the Hsp90 inhibitor for 24 h, 48 h and 72 h at 24 °C. AlamarBlue was added and absorbance was measured as described above. Treatment effect was estimated by determining the area under the curve (AUC) for each group.

2.6. Parasite Growth Curve

Leishmania cell lines (WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$) at a concentration of 10^5 cells/mL were incubated in 10 mL of HOMEM medium supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal calf serum and 1% (*v/v*) penicillin streptomycin solution. Cells were treated or not with 100 nM of 17-AAG and counts were performed daily for at least 13 days. Parasite numbers were recorded and plotted.

2.7. Western Blot to Assess Ubiquitylated Proteins

The accumulation of ubiquitylated proteins in parasites treated with 17-AAG (500 nM) for 24 h was evaluated by Western blot analysis. As a positive control, parasites were treated with the proteasome inhibitor MG132 (3 μ M) for 24 h. Following treatment, parasites were pelleted by centrifugation for 3 min at $1000\times g$, and then washed thrice in PBS for medium removal. Protein extraction was then performed for Western blot analysis as described below.

Parasites were lysed with laemmli buffer (2-Mercaptoethanol 0.1%, bromophenol blue 0.0005%, glycerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM, pH 6.8) at a proportion of 10 μ L of buffer for 10^6 parasites, then boiled for 5 min and cell extracts were stored at -20°C . Proteins were transferred from a 12% polyacrylamide gel, following electrophoresis, to a Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Transfer was carried out by semi-dry blotting using a BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell at 30 volts for 45 min, with membranes and filter papers soaked in transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 15 mM glycine, 20% (*v/v*) methanol, in distilled water). Membranes were subsequently incubated in a blocking solution for 1 h at room temperature or overnight at 4°C under agitation. After blocking, each membrane was incubated with 1:1000 FK2 anti-ubiquitin antibody (LifeSensors, Malvern, PA, USA) diluted in fresh TBST buffer with 3% milk for 1 h at room temperature. Secondary anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Promega, Madison, WI, USA) was diluted at 1:10,000 in fresh TBST buffer and each membrane was first incubated with an ECL (Enhanced Chemiluminescence) solution (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit, Pierce, Rockford, IL, USA), and then exposed on Kodak photographic film. An antibody against elongation factor 1α (EF1 α) (Millipore, Germany) was used for loading control. Western blotting experiments were performed three times.

2.8. Assessment of Protein Aggregation

Axenic promastigotes of *L. major* lines (WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$) were treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3 μ M) for 24 h at 24°C . The aggregation of soluble proteins was analyzed following a previously described protocol [44] employing SDS-PAGE. Briefly, 3×10^8 parasites were centrifuged at $1800\times g$ at 4°C for 10 min. The pellet was resuspended in 500 μ L of lysis buffer (50 mM potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM protease inhibitor, Roche, Mannheim, Germany) and submitted to a 5 freeze-thaw cycles (liquid nitrogen-water). Intact cells were removed by centrifugation at $1800\times g$ for 5 min and proteins were quantified. Then, 1 mg of protein from each group was centrifuged at $15,000\times g$ for 20 min to isolate the membrane and aggregate fractions. Next, pellets were resuspended in lysis buffer, then sonicated and membrane proteins were removed via the addition of 2% NP40 followed by centrifugation at $15,000\times g$ for 20 min. Pellets were resuspended in 100 μ L of SDS sample buffer and heated at 95°C for 5 min. Samples were then analyzed using 10% SDS-PAGE, followed by silver labeling using a Bio-Rad Silver Stain kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Experiments were independently repeated three times.

2.9. Statistical Analysis

The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 17-AAG in *L. major* WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ promastigotes was determined by performing sigmoidal regression on each respective concentration-response curve. Data are presented as the mean \pm

standard deviation of the mean under parametric analysis (One-way ANOVA or Welch's ANOVA test followed by Tukey's or Dunnett's Multiple Comparisons) or medians and quartile ranges in the case of non-parametric analysis (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison). All data were analyzed using the Prism program (GraphPad software, V. 9.1.0 La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. 17-AAG Induces Autophagosome Formation in Promastigote Forms of *Leishmania*

Treatment of *Leishmania* parasites with 17-AAG at the concentration of 500 nM resulted in an increased number of parasites containing green-labeled punctate structures (Figure 1A). After 48 h of treatment at both 300 and 500 nM, among counted parasites, 33.1% (Q1: 29.3; Q3: 33.9) and 37.4% (Q1: 34.7; Q3: 37.8, $p < 0.05$), respectively, of parasites contained punctate structures, while these alterations were seen in only 19.2% (Q1: 17.2; Q3: 21.1) of control parasites (Figure 1B; $p < 0.05$). This percentage of *L. major* promastigotes containing punctate structures increased after 72 h of treatment, with a median value of 36.1% (Q1: 32.1; Q3: 44.4) of the parasites treated with 300 nM and 50.2% (Q1: 43.5; Q3: 55.2, $p < 0.05$) of those treated with 500 nM revealing labeled vesicles in the cytosol, while the level of control parasites containing punctate structures was 20.1% (Q1: 18.3; Q3: 22.6) at 72 h of treatment (Figure 1B). The median values of the number of punctate structures in parasites treated with 300 nM of 17-AAG at 48 and 72 h were not statistically different compared to diluent-treated *L. major* promastigotes. The median number of GFP-ATG8-labeled vesicles per parasite after 48 and 72 h was higher in parasites treated with 500 nM of 17-AAG, with values of 1.8 (Q1: 1.7; Q3: 1.8, $p < 0.05$) and 2.0 (Q1: 1.8; Q3: 2.2), respectively, compared to median values of 1.4 (Q1: 1.2; Q3: 1.5, $p < 0.05$) and 1.2 (Q1: 1.2; Q3: 1.4) (Figure 1B) in control parasites. The atg5-deficient parasites expressing GFP-ATG8 ($\Delta atg5$ (GFP-ATG8)) treated with 17-AAG exhibited no fluorescent punctate structures, confirming that the vesicles detected in GFP-ATG8 parasites were indeed autophagosomes (Figure 1C). As an additional control, parasites were treated with another antileishmanial, pentamidine, at concentrations of 10, 20 or 30 μ M for 24, 48 and 72 h. Treatment with pentamidine caused cell death (data not shown), yet few punctate structures were detected in the cytosol of treated parasites (Figure 1D). This indicates that parasite death is not always associated with autophagosome formation in *Leishmania* parasites.

3.2. 17-AAG Inhibits the Autophagosome Maturation Process

Since the inhibition of endosome and autophagosome fusion with lysosomes by chloroquine has been previously shown to be involved in parasite death [45–47], we investigated whether treatment with 17-AAG was capable of altering the autophagosomal maturation process. In double-mutant parasites expressing GFP-ATG8 and the glycosomal marker, RFP-SQL, a mean value of $22.7\% \pm 4.4$ of the total number of counted autophagosomes colocalized with glycosomes in parasites treated with 17-AAG (500 nM, 24 h), similar to untreated double-mutant parasites ($30.5\% \pm 6.4$) (Figure 2A,B). After 48 h of treatment, a comparable proportion of colocalization was observed in labeled compartments ($20.5\% \pm 3.9$) in treated parasites, which was significantly lower than that detected in control parasites treated with DMSO, $41.6\% \pm 5.2$ (Figure 2A,B; $p = 0.0006$). Additionally, double-mutant parasites expressing both GFP-ATG8 and the lysosomal marker, proCPB-RFP, when treated with 17-AAG (500 nM) for 24 and 48 h, exhibited a remarkably lower proportion of autophagosome-lysosome colocalization after 24 h, with mean values of $8.2\% \pm 5.1$ ($p = 0.0197$) and 48 h, $12.1\% \pm 11.6$, in comparison to DMSO-treated controls: $35.6\% \pm 16.6$ and $38.6\% \pm 25.6$, respectively (Figure 2C,D). These findings indicate that 17-AAG treatment resulted in inhibition of the autophagosome maturation process via fusion inhibition of ATG8-labelled vesicles with compartments labelled with lysosomal and glycosomal markers.

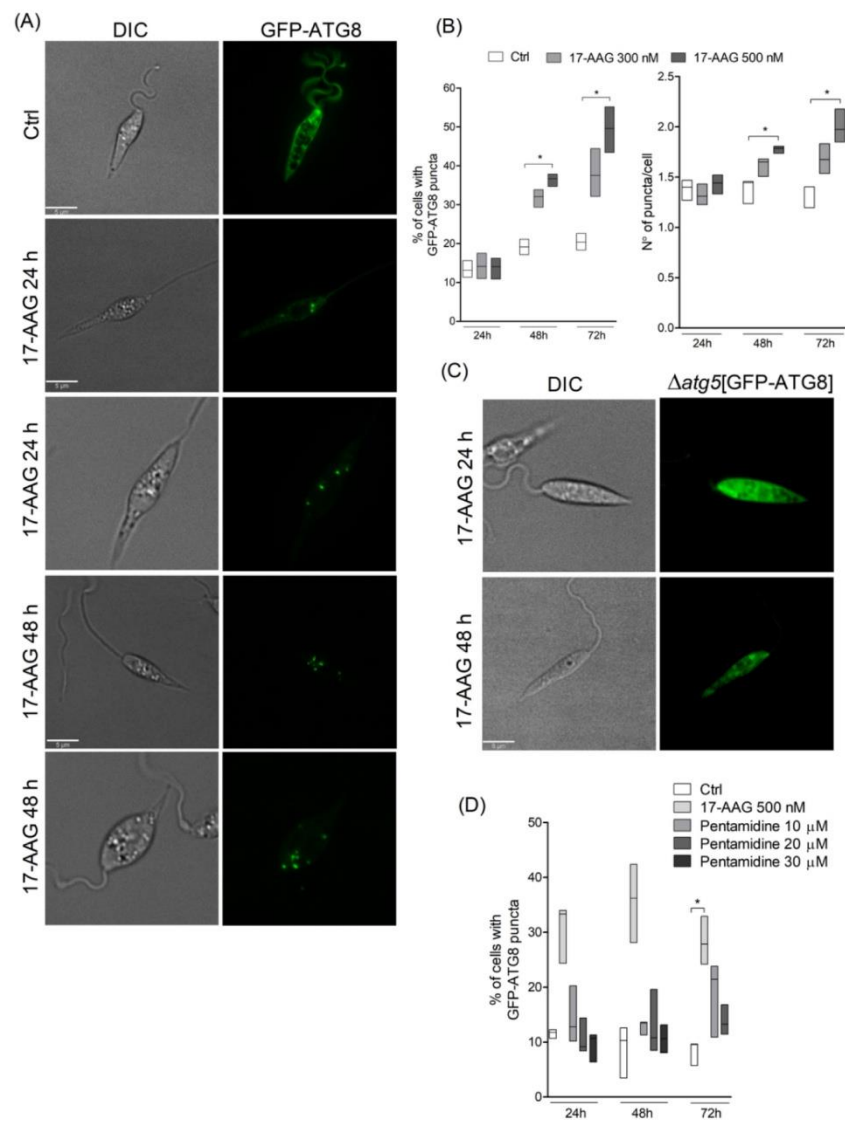


Figure 1. Evaluation of autophagosome formation in *Leishmania* promastigotes following treatment with 17-AAG. (A) Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 were treated or not with 17-AAG (500 nM) for 24 or 48 h and imaged by fluorescence microscopy. (B) The percentage of cells bearing autophagosomes and the number of autophagosomes per cell were calculated at 24, 48 and 72 h after treatment with 17-AAG (300 or 500 nM). (C) $\Delta atg5$ [GFP-ATG8] parasites were treated with 17-AAG and imaged by fluorescence microscopy. (D) Comparison of the percentage of cells bearing autophagosomes after treatment with pentamidine (10, 20 or 30 μ M) or 17-AAG (500 nM) for 24 and 48 h. Lines within the floating bars represent medians and floating bar quartiles (Q: 25% and 75%) from one out of three independent experiments (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$).

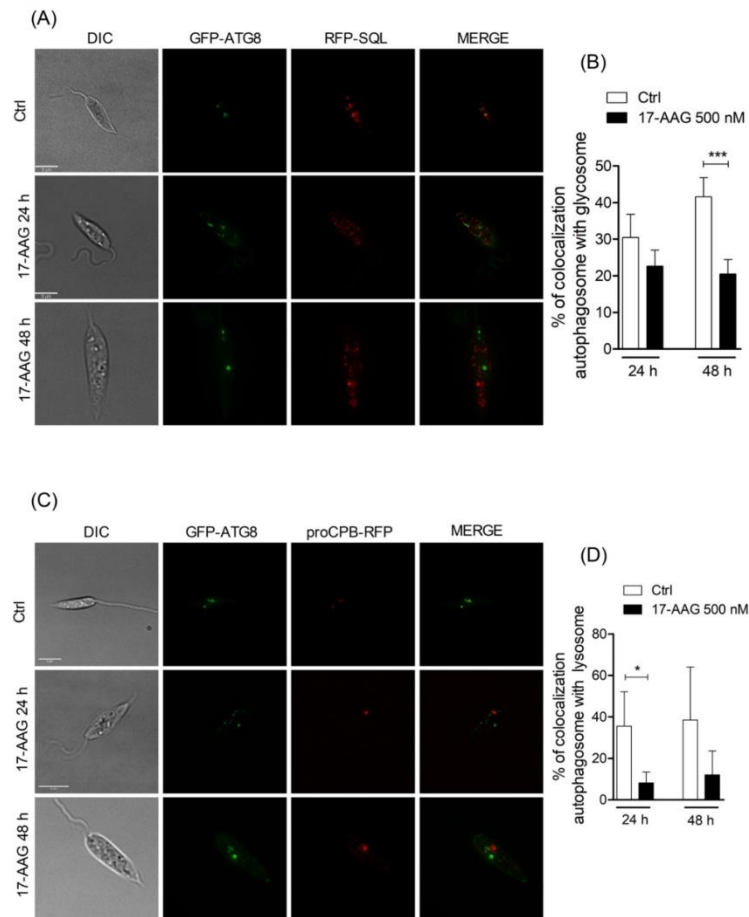


Figure 2. Analysis of fusion between autophagosomes and glycosomes or lysosomes. (A) Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 and RFP-SQL were treated or not with 17-AAG (500 nM) and imaged by fluorescence microscopy. (B) Quantification of autophagosome-glycosome colocalization after treatment of *Leishmania* with 17-AAG. (C) Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing ATG8-GFP and proCPB-RFP were treated or not with 17-AAG (500 nM) and imaged by fluorescence microscopy. (D) Quantification of *Leishmania* autophagosome-lysosome colocalization after treatment with 17-AAG. Bars represent medians \pm SD from one out of three independent experiments (Unpaired t test, *** $p = 0.0006$, * $p = 0.0197$).

3.3. *atg5*-Deficient Parasites Are More Resistant to 17-AAG-Induced Cell Death Than WT Parasites

To evaluate whether autophagy plays a role in 17-AAG-induced parasite death, IC_{50} values were determined for $\Delta atg5$ parasites treated with 17-AAG for 48 h, which showed a mean value of $174.3 \text{ nM} \pm 15.7$, 83.7% higher than that determined for WT (Figure 3A, $p < 0.01$). Moreover, when the *atg5* gene was added back to the $\Delta atg5$ parasites ($\Delta atg5::ATG5$), the resulting IC_{50} value was $104.3 \text{ nM} \pm 32.9$, similar to that found in WT *L. major* promastigotes ($95.0 \text{ nM} \pm 23.1$) (Figure 3A, $p < 0.01$). In addition, when cultivated in medium containing 100 nM of 17-AAG for 13 days, $\Delta atg5$ parasites grew faster than either WT or $\Delta atg5::ATG5$, as assessed by growth curves (Figure 3B) and the area under

the curve (AUC) (Figure 3C). This marked growth was especially noticeable during the log growth phase (days 5–6) when 500% more $\Delta atg5$ parasites were seen compared to WT or $\Delta atg5::ATG5$ (Figure 3B). In contrast, no differences in parasite growth rates were observed among these three parasite lines when cultivated in 17-AAG-free medium (Figure 3B). Even when the highest concentrations of 17-AAG (300 and 500 nM) were administered to promastigotes for up to 72 h, less toxicity was evidenced in the $\Delta atg5$ lineage compared to WT or $\Delta atg5::ATG5$ *L. major* parasites (Figure 3D). These findings provide evidence that $\Delta atg5$ parasites are less susceptible to cell death following treatment with 17-AAG, which suggests the participation of autophagy in inhibitor-induced parasite death.

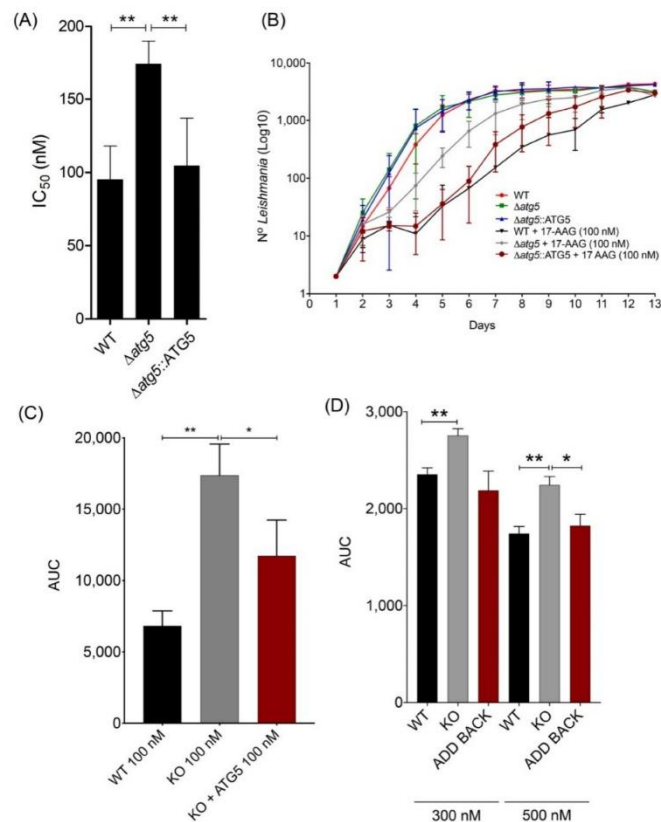


Figure 3. Effect of 17-AAG on survival and replication of WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ *Leishmania*. (A) IC₅₀ values for 17-AAG in different *Leishmania* lineages. Bars represent mean \pm SD from four independent experiments (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, ** $p < 0.01$). (B) Growth curve reflecting 13 day-counts of WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ parasites, treated or not with 17-AAG at 100 nM. Symbols are representative of means \pm SD from three independent experiments. (C) Area under the curve (AUC) analysis of WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ growth depicted in panel (B), following treatment with 17-AAG. Bars represent mean \pm SD from three independent experiments (one-way ANOVA test, Tukey's multiple comparison test * $p = 0.0321$ 0.05, ** $p = 0.0016$). (D) AUC analysis of WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ viability following treatment with 17-AAG at 300 nM and 500 nM for 24 h, 48 h and 72 h. Bars represent mean \pm SD of a single experiment performed in quadruplicate (Welch's ANOVA test, Dunnett's T3 multiple comparison test * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

3.4. 17-AAG Treatment Results in Increased Accumulation of Ubiquitylated Proteins, but Not Protein Aggregates, in *L. major* Parasites

Due to the participation of autophagy in *Leishmania* death arising from 17-AAG treatment, we hypothesized that autophagic activation could be consequent to Hsp90 inhibition, which causes a subsequent enhancement in the amount of ubiquitylated protein. Low basal levels of ubiquitylated proteins were seen in all untreated WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ parasites (Figure 4). Treatment with 17-AAG (500 nM for 48 h) induced an overall increase in the amounts of ubiquitin-labeled proteins in WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ parasites (Figure 4). A similar result was observed after 48 h of 17-AAG treatment (data not shown). As expected, of the three lines evaluated, $\Delta atg5$ parasites demonstrated the greatest accumulation of ubiquitylated proteins after treatment with either 500 nM of 17-AAG or 3 μ M of MG132 (Figure 4). Predictably, the treatment of parasites with MG132 (3 μ M, 48 h) increased the accumulation of ubiquitylated proteins in all three parasite lines evaluated. Moreover, treatment with MG132 also resulted in a higher proportion of autophagosomes in GFP-ATG8 parasites, as evidenced by the mean percentage of parasites bearing punctate structures: $14.7\% \pm 3.5$ in parasites treated for 24 h with 3 μ M of MG132, in comparison to a mean value of $10.9\% \pm 1.5$ in control parasites (Figure 5A,B). This difference increased at 48 h to $30.6\% \pm 4.6$ of parasites treated with 3 μ M of MG132 compared to $6.8\% \pm 2.0$ in controls (Figure 5B, $p = 0.0007$). As was also expected, positive controls treated with 500 nM of 17-AAG exhibited a significant increase in the percentage of parasites containing labeled vesicles: $20.8\% \pm 1.3$ ($p = 0.0035$) at 24 h and $21.1\% \pm 4.3$ at 48 h ($p = 0.0091$) (Figure 5B). Increased ubiquitylated protein accumulation can result in proteasomal overload and the accumulation of protein aggregates or, alternatively, enhancement in the transcription of Hsp70, Hsp90 and Hsp40 [48].

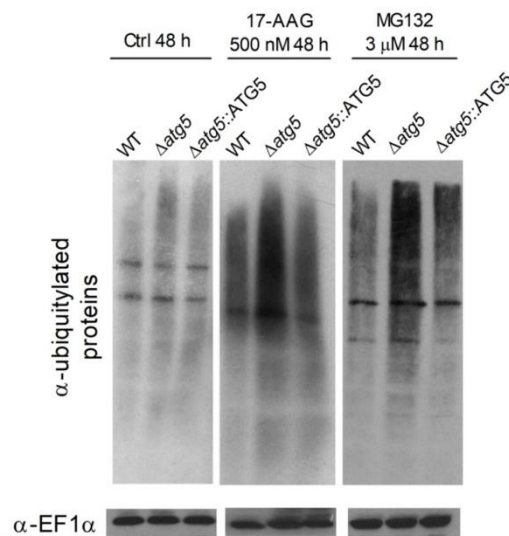


Figure 4. Ubiquitylated protein profiles of WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ after 17-AAG or MG132 treatment. WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ parasites were treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3 μ M) for 48 h. Protein extracts were electrophoresed on a 12% gel, blotted and probed with an FK2 anti-ubiquitin antibody. EF1 α was used as loading control.

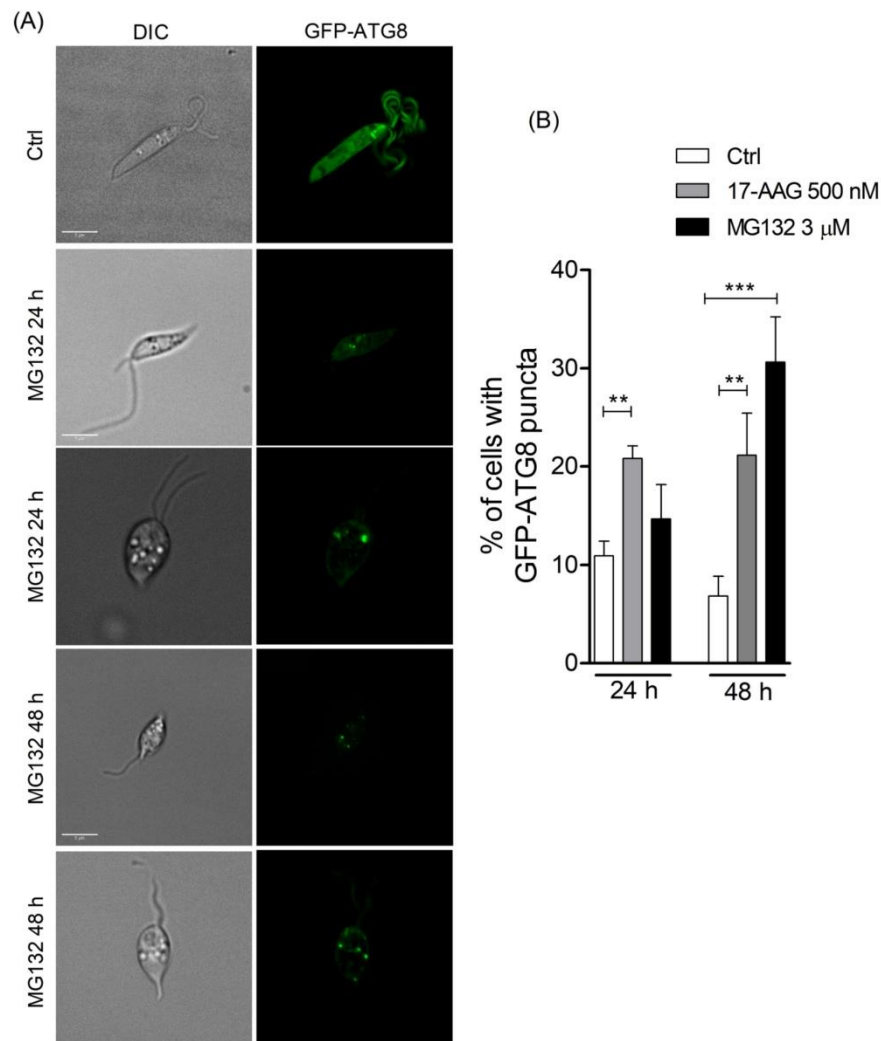


Figure 5. Evaluation of autophagosome formation in promastigotes of *Leishmania* following treatment with MG132. (A) Promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 were treated or not with MG132 (3 μ M) and imaged by fluorescence microscopy. (B) The percentage of cells bearing autophagosomes was calculated after treatment with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3 μ M) for 24 and 48 h. Bars represent mean \pm SD of three independent experiments (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Using SDS-PAGE, protein extracts of all parasite strains: WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ treated with 17-AAG (500 nM for 24 h) did not result in increased protein aggregate formation in comparison to untreated parasites, while positive control parasites treated with MG132 (3 μ M for 24 h) revealed increased amounts of protein aggregates (Figure 6).

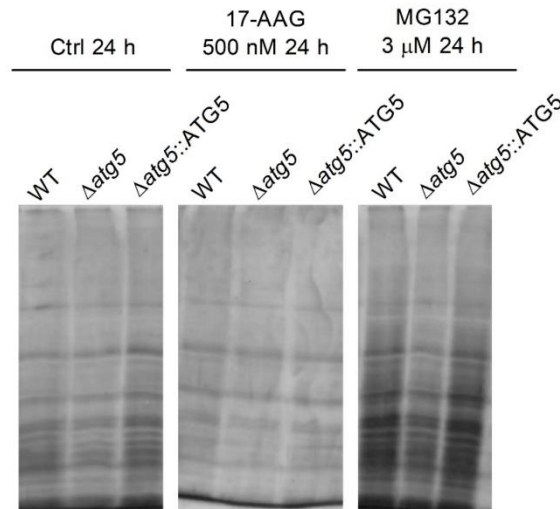


Figure 6. Effect of 17-AAG treatment on WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ protein aggregate formation. Culture aliquots from WT, $\Delta atg5$ and $\Delta atg5::ATG5$ parasites treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3 μ M) for 24 h were withdrawn and analyzed to determine quantities of insoluble protein aggregates by cell lysis and centrifugation. Protein aggregates were subjected to SDS-PAGE followed by silver staining. One experiment is representative of two independent experiments.

4. Discussion

The present study confirmed that in *Leishmania* treated with 17-AAG, autophagy is induced by an increased percentage of autophagosomes expressing GFP-ATG8, as well as higher overall numbers of labeled autophagosomes per parasite. We also found that the macroautophagy-deficient $\Delta atg5$ [GFP-ATG8] *Leishmania*, which is unable to form autophagosomes, did not form any detectable punctate structures.

The present study also found that treatment with 17-AAG induced a reduction in the degree of colocalization between autophagosomes and glycosomes, as well as between autophagosomes and lysosomes, in comparison to controls. Hsp90 is known to control the expression of hundreds of proteins involved in diverse cell functions [49,50]. A previous report described the involvement of Hsp90 in controlling vesicle trafficking and fusion by folding proteins, responsible for recycling RAB proteins from vesicle membranes back into the cytoplasm [51] and vesicle transport proteins that play a role in the transport of glycoproteins from the Golgi to other compartments [52]. Since reduced colocalization of the proCPB-RFP and GFP-ATG8 was observed in *Leishmania* following treatment with 17-AAG compared to untreated parasites, we speculate that Hsp90 inhibition results in the unfolding or incorrect folding of parasite proteins involved in vesicle trafficking and fusion. The inhibition of the fusion of newly-formed autophagosomes with lysosomes could result in the trapping of proteins and organelles within autophagosomes, leading to parasite death. In agreement with our findings, a recent study described that disrupting a cysteine protease located in the vacuolar compartment (VAC) of *Toxoplasma gondii* caused a reduction in the proteolytic activity of parasite lysosomes, the accumulation of undigested autophagosomes in parasite cytoplasm, and subsequently, a reduction in the intensity of infection [53].

We found that survival in $\Delta atg5$ *L. major* promastigotes increased compared to WT parasites under treatment with 17-AAG. Indeed, we showed that $\Delta atg5$ *L. major* were not only able to survive and proliferate more efficiently than WT at a low dosage of 17-AAG (100 nM) for 13 days, but were also found to be more resistant to death at higher dosages

(300 and 500 nM). These findings lead us to propose that the activation of the autophagic pathway contributes to *Leishmania* cell death. Macroautophagy is a successful adaptive strategy that functions as a protective mechanism activated under different physiological stress stimuli [54–56]. Similarly to our study, it has been shown that autophagy is induced in *T. gondii* in response to endoplasmic reticulum stress, followed by the accumulation of unfolded proteins [57]. Also, incomplete autophagosome maturation was shown to be harmful to eukaryotic cells [58], including mammals [48,59] and *T. gondii* [53]. Moreover, it was previously demonstrated that several *Leishmania* lines present an inability to complete the transformation process from promastigotes to amastigotes, including $\Delta atg5$ parasites [35], $\Delta atg4.2$ parasites expressing a mutant vesicular sorting protein 4 [33] form autophagosomes that do not fuse with lysosomes, and $\Delta cpa/cpb$ parasites, which do form autophagosomes that fuse with lysosomes, produce non-degraded lysosomal content due to the deficiency of CPA and CPB enzymes [42,60]. This inability to complete transformation leads to a reduced survival rates inside macrophages in vitro [33,35,42,60] and in vivo [35].

The inhibition of Hsp90 in cancer cells results in an increase in the accumulation of ubiquitylated proteins in the cytosol [19], and subsequently, proteasome overload, leading to both the accumulation of unfolded and misfolded proteins [23,61] and protein aggregate formation [62–64]. We speculate that a similar event could take place in parasites treated with 17-AAG. The accumulation of polyubiquitylated proteins following treatment with Hsp90 inhibitors in animal models of neurodegenerative disease [17,24,65] inhibited protein aggregate formation from the activation of Hsp70 and Hsp40 [48,66]. The present study showed that treating *Leishmania* parasites with 17-AAG led to the accumulation of ubiquitylated proteins at levels similar to those observed in parasites treated with the proteasome inhibitor, MG132. Although 17-AAG treatment induced the accumulation of polyubiquitylated proteins, Hsp90 inhibition most likely did not result in proteasome overload, as no enhancement in the formation of protein aggregates was detected (Figure 6), likely due to the activation of other Hsps [66].

In sum, our findings evidence that *Leishmania* cell death caused by 17-AAG is associated with abnormal activation of the autophagic pathway, resulting in the formation of autophagosomes unable to achieve complete autophagolysosomal maturation and therefore incapable of degrading engulfed material.

Author Contributions: A.L.d.O.A.P., J.C.M. and P.S.T.V. conceived and designed the experiments; A.L.d.O.A.P., B.C., B.R.S.D., L.C.P., Y.d.S.L. and J.P.B.d.M. performed the experiments; A.L.d.O.A.P., B.C., B.R.S.D., L.C.P., J.P.B.d.M., J.C.M. and P.S.T.V. analyzed the data; P.S.T.V. and J.C.M. contributed reagents/materials/analysis tools; A.L.d.O.A.P. and P.S.T.V. wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript elaboration and revision and approved the final version prior to submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. This work was also supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (P.S.T.V. <http://www.fapesb.ba.gov.br>, (accessed on 30 August 2013) and CNPq (P.S.T.V.—Universal 422867/2016-0 <http://www.cnpq.br>, (accessed on 30 August 2016) and the Medical Research Council (MR/K019384/1). P.S.T.V. holds a grant from CNPq for productivity in research (307832/2015-5). B.C. was supported by a Medical Research Council studentship.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, *354*, 1191–1199. [[CrossRef](#)]
- Banuls, A.L.; Hide, M.; Prugnolle, F. Leishmania and the leishmaniases: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **2007**, *64*, 1–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- World Health Organization. Control of the Leishmaniases. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2010**, *Xii–Xiii*, 1–186.
- Oliveira, L.F.; Schubach, A.O.; Martins, M.M.; Passos, S.L.; Oliveira, R.V.; Marzochi, M.C.; Andrade, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. *Acta Trop.* **2011**, *118*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Croft, S.L.; Seifert, K.; Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 399–410. [[PubMed](#)]
- Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Menezes, J.P.; Guedes, C.E.; Petersen, A.L.; Fraga, D.B.; Veras, P.S. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 815023. [[CrossRef](#)]
- Angel, S.O.; Matrajt, M.; Echeverria, P.C. A review of recent patents on the protozoan parasite hsp90 as a drug target. *Recent Pat. Biotechnol.* **2013**, *7*, 2–8. [[CrossRef](#)]
- Roy, N.; Nageshan, R.K.; Ranade, S.; Tatu, U. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 707–711. [[CrossRef](#)]
- Shonhai, A.; Maier, A.G.; Przyborski, J.M.; Blatch, G.L. Intracellular protozoan parasites of humans: The role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept. Lett.* **2011**, *18*, 143–157. [[CrossRef](#)]
- Wiesigil, M.; Clos, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in leishmania donovani. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3307–3316. [[CrossRef](#)]
- Ahn, H.J.; Kim, S.; Nam, H.W. Molecular cloning of the 82-kda heat shock protein (hsp90) of toxoplasma gondii associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 654–659. [[CrossRef](#)]
- Pallavi, R.; Roy, N.; Nageshan, R.K.; Talukdar, P.; Pavithra, S.R.; Reddy, R.; Venkatesh, S.; Kumar, R.; Gupta, A.K.; Singh, R.K.; et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of hsp90 from plasmodium falciparum and trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37964–37975. [[CrossRef](#)]
- Meyer, K.J.; Shapiro, T.A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 489–499. [[CrossRef](#)]
- Petersen, A.L.; Guedes, C.E.; Versoza, C.L.; Lima, J.G.; de Freitas, L.A.; Borges, V.M.; Veras, P.S. 17-aag kills intracellular leishmania amazonensis while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49496. [[CrossRef](#)]
- Santos, D.M.; Petersen, A.L.; Celes, F.S.; Borges, V.M.; Veras, P.S.; de Oliveira, C.I. Chemotherapeutic potential of 17-aag against cutaneous leishmaniasis caused by leishmania (viannia) braziliensis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3275. [[CrossRef](#)]
- Tokui, K.; Adachi, H.; Waza, M.; Katsuno, M.; Minamiyama, M.; Doi, H.; Tanaka, K.; Hamazaki, J.; Murata, S.; Tanaka, F.; et al. 17-dmag ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an sbma model mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 898–910. [[CrossRef](#)]
- Neckers, L.; Workman, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64–76. [[CrossRef](#)]
- Isaacs, J.S.; Xu, W.; Neckers, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 213–217. [[CrossRef](#)]
- Zuehlke, A.; Johnson, J.L. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **2010**, *93*, 211–217. [[CrossRef](#)]
- Driscoll, J.J.; Chowdhury, R.D. Molecular crosstalk between the proteasome, aggresomes and autophagy: Translational potential and clinical implications. *Cancer Lett.* **2012**, *325*, 147–154. [[CrossRef](#)]
- Wolff, S.; Weissman, J.S.; Dillin, A. Differential scales of protein quality control. *Cell* **2014**, *157*, 52–64. [[CrossRef](#)]
- Tyedmers, J.; Mogk, A.; Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 777–788. [[CrossRef](#)]
- Sittler, A.; Lurz, R.; Lueder, G.; Priller, J.; Leirach, H.; Hayer-Hartl, M.K.; Hartl, F.U.; Wanker, E.E. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1307–1315. [[CrossRef](#)]
- Mizushima, N.; Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **2011**, *147*, 728–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cheng, Y.; Ren, X.; Hait, W.N.; Yang, J.M. Therapeutic targeting of autophagy in disease: Biology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1162–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Klionsky, D.J.; Emr, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **2000**, *290*, 1717–1721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. Eating the endoplasmic reticulum: Quality control by autophagy. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mizushima, N.; Klionsky, D.J. Protein turnover via autophagy: Implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 19–40. [[CrossRef](#)]
30. Klionsky, D.J.; Abdalla, F.C.; Abeliovich, H.; Abraham, R.T.; Acevedo-Arozena, A.; Adeli, K.; Agholme, L.; Agnello, M.; Agostinis, P.; Aguirre-Ghiso, J.A.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 445–544. [[CrossRef](#)]
31. Duszynko, M.; Gínger, M.L.; Brennan, A.; Gualdrón-López, M.; Colombo, M.I.; Coombs, G.H.; Coppens, I.; Jayabalasingham, B.; Lingsley, G.; de Castro, S.L.; et al. Autophagy in protists. *Autophagy* **2011**, *7*, 127–158. [[CrossRef](#)]
32. Meijer, W.H.; van der Klei, I.J.; Veenhuis, M.; Kiel, J.A. Atg genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* **2007**, *3*, 106–116. [[CrossRef](#)]
33. Besteiro, S.; Williams, R.A.; Morrison, L.S.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of leishmania major. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11384–11396. [[CrossRef](#)]
34. Besteiro, S.; Williams, R.A.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Protein turnover and differentiation in leishmania. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 1063–1075. [[CrossRef](#)]
35. Williams, R.A.; Smith, T.K.; Cull, B.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Atg5 is essential for atg8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in leishmania major. *PLoS Pathog* **2012**, *8*, e1002695. [[CrossRef](#)]
36. Meijer, A.J.; Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2445–2462. [[CrossRef](#)]
37. Levine, B.; Klionsky, D.J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 463–477. [[CrossRef](#)]
38. Levine, B.; Yuan, J. Autophagy in cell death: An innocent convict? *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2679–2688. [[CrossRef](#)]
39. Sengupta, S.; Chowdhury, S.; Bosedasgupta, S.; Wright, C.W.; Majumder, H.K. Cryptolepine-induced cell death of leishmania donovani promastigotes is augmented by inhibition of autophagy. *Mol. Biol. Int.* **2011**, *2011*, 187850. [[CrossRef](#)]
40. Cull, B.; Prado Godinho, J.L.; Fernandes Rodrigues, J.C.; Frank, B.; Schurigt, U.; Williams, R.A.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Glycosome turnover in leishmania major is mediated by autophagy. *Autophagy* **2014**, *10*, 2143–2157. [[CrossRef](#)]
41. Huete-Perez, J.A.; Engel, J.C.; Brinen, L.S.; Mottram, J.C.; McKerrow, J.H. Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16249–16256. [[CrossRef](#)]
42. Williams, R.A.; Woods, K.L.; Juliano, L.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Characterization of unusual families of atg8-like proteins and atg12 in the protozoan parasite leishmania major. *Autophagy* **2009**, *5*, 159–172. [[CrossRef](#)]
43. Bolte, S.; Cordelieres, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232. [[CrossRef](#)]
44. Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H.; Lee, J.R.; Lee, S.S.; Moon, J.C.; Yun, J.W.; et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **2004**, *117*, 625–635. [[CrossRef](#)]
45. Amaravadi, R.K.; Thompson, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7271–7279. [[CrossRef](#)]
46. Cervantes, S.; Bunnik, E.M.; Saraf, A.; Conner, C.M.; Escalante, A.; Sardi, M.E.; Ponts, N.; Prudhomme, J.; Florens, L.; Le Roch, K.G. The multifunctional autophagy pathway in the human malaria parasite, plasmodium falciparum. *Autophagy* **2014**, *10*, 80–92. [[CrossRef](#)]
47. Hoppe, H.C.; van Schalkwyk, D.A.; Wiehart, U.I.; Meredith, S.A.; Egan, J.; Weber, B.W. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in plasmodium falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370–2378. [[CrossRef](#)]
48. Akerfelt, M.; Morimoto, R.I.; Sistonen, L. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 545–555. [[CrossRef](#)]
49. Hartl, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **1996**, *381*, 571–579. [[CrossRef](#)]
50. Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **2011**, *475*, 324–332. [[CrossRef](#)]
51. Chen, C.Y.; Balch, W.E. The hsp90 chaperone complex regulates gdi-dependent rab recycling. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 3494–3507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lotz, G.P.; Brychzy, A.; Heinz, S.; Obermann, W.M. A novel hsp90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 717–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Di Cristina, M.; Dou, Z.; Lunghi, M.; Kannan, G.; Huynh, M.H.; McGovern, O.L.; Schultz, T.L.; Schultz, A.J.; Miller, A.J.; Hayes, B.M.; et al. Toxoplasma depends on lysosomal consumption of autophagosomes for persistent infection. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Choi, A.M.; Ryter, S.W.; Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 651–662. [[CrossRef](#)]
55. Degenhardt, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Bray, K.; Anderson, D.; Chen, G.; Mukherjee, C.; Shi, Y.; Gelinas, C.; Fan, Y.; et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 51–64. [[CrossRef](#)]

56. Lum, J.J.; Bauer, D.E.; Kong, M.; Harris, M.H.; Li, C.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **2005**, *120*, 237–248. [[CrossRef](#)]
57. Nguyen, H.M.; Berry, L.; Sullivan, W.J., Jr.; Besteiro, S. Autophagy participates in the unfolded protein response in toxoplasma gondii. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*. [[CrossRef](#)]
58. Mizushima, N.; Levine, B.; Cuervo, A.M.; Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **2008**, *451*, 1069–1075. [[CrossRef](#)]
59. Chung, Y.; Lee, J.; Jung, S.; Lee, Y.; Cho, J.W.; Oh, Y.J. Dysregulated autophagy contributes to caspase-dependent neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1189. [[CrossRef](#)]
60. Williams, R.A.; Tetley, L.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Cysteine peptidases cpa and cpb are vital for autophagy and differentiation in leishmania mexicana. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 655–674. [[CrossRef](#)]
61. Theodoraki, M.A.; Caplan, A.J. Quality control and fate determination of hsp90 client proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 683–688. [[CrossRef](#)]
62. Janen, S.B.; Chaachouay, H.; Richter-Landsberg, C. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* **2010**, *58*, 1766–1774. [[CrossRef](#)]
63. Grumati, P.; Dikic, I. Ubiquitin signaling and autophagy. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5404–5413. [[CrossRef](#)]
64. Grumati, P.; Morozzi, G.; Holper, S.; Mari, M.; Harwardt, M.I.; Yan, R.; Muller, S.; Reggiori, F.; Heilemann, M.; Dikic, I. Full length rtn3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *Elife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
65. Silva-Fernandes, A.; Duarte-Silva, S.; Neves-Carvalho, A.; Amorim, M.; Soares-Cunha, C.; Oliveira, P.; Thirstrup, K.; Teixeira-Castro, A.; Maciel, P. Chronic treatment with 17-dmag improves balance and coordination in a new mouse model of machado-joseph disease. *Neurotherapeutics* **2014**, *11*, 433–449. [[CrossRef](#)]
66. Bose, S.; Cho, J. Targeting chaperones, heat shock factor-1, and unfolded protein response: Promising therapeutic approaches for neurodegenerative disorders. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *35*, 155–175. [[CrossRef](#)]

Anexo C - Manuscrito III

Leishmania infantum defective in lipophosphoglycan biosynthesis interferes with activation of human neutrophils

Abstract: Visceral leishmaniasis (VL) is often associated with hematologic manifestations that may interfere with neutrophil response. Lipophosphoglycan (LPG) is a major molecule on the surface of *Leishmania* promastigotes, which has been associated with several aspects of the parasite–vector–host interplay. Here, we investigated how LPG from *Leishmania (L.) infantum*, the principal etiological agent of VL in the New World, influences the initial establishment of infection during interaction with human neutrophils in an experimental setting *in vitro*. Human neutrophils obtained from peripheral blood samples were infected with either the wild-type *L. infantum* (WT) strain or LPG-deficient mutant ($\Delta lpg1$). In this setting, $\Delta lpg1$ parasites displayed reduced viability compared to WT *L. infantum*; such finding was reverted in the complemented $\Delta lpg1+LPG1$ parasites at 3- and 6-h post-infection. Confocal microscopy experiments indicated that this decreased survival was related to enhanced lysosomal fusion. In fact, LPG-deficient *L. infantum* parasites more frequently died inside neutrophil acidic compartments, a phenomenon that was reverted when host cells were treated with Wortmannin. We also observed an increase in the secretion of the neutrophil collagenase matrix metalloproteinase-8 (MMP8) by cells infected with $\Delta lpg1$ *L. infantum* compared to those that were infected with WT parasites. Furthermore, collagen I matrix degradation was found to be significantly increased in $\Delta lpg1$ parasite-infected cells but not in WT-infected controls. Flow cytometry analysis revealed a substantial boost in production of reactive oxygen species (ROS) during infection with either WT or $\Delta lpg1$ *L. infantum*. In addition, killing of $\Delta lpg1$ parasites was shown to be more dependent on the ROS production than that of WT *L. infantum*. Notably, inhibition of the oxidative stress with Apocynin potentially fueled $\Delta lpg1$ *L. infantum* fitness as it increased the intracellular parasite viability. Thus, our observations demonstrate that LPG may be a critical molecule fostering parasite survival in human neutrophils through a mechanism that involves cellular activation and generation of free radicals.

Keywords: lipophosphoglycan, *Leishmania infantum*, neutrophils, ROS, infection

Trabalho publicado na revista *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022.



Leishmania infantum Defective in Lipophosphoglycan Biosynthesis Interferes With Activation of Human Neutrophils

OPEN ACCESS

Edited by:

Tiago W. P. Mineo,
Federal University of Uberlândia, Brazil

Reviewed by:

Renan V. H. de Carvalho,
The Rockefeller University,
United States
Pedro Cecílio,
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases (NIH),
United States

*Correspondence:

Valéria M. Borges
vborges@bahia.fiocruz.br
Albert Descoteaux
albert.descoteaux@inrs.ca

[†]These authors have contributed
equally to this work

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share
senior authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 01 October 2021

Accepted: 10 March 2022

Published: 06 April 2022

Citation:

Quintela-Carvalho G,
Goicochea AMC, Mançur-Santos V,
Viana SdM, Luz YdS, Dias BRS,
Lázaro-Souza M, Suarez M,
de Oliveira Ci, Saraiva EM,
Brodszyn Ci, Veras PT,
de Menezes JPB, Andrade BB,
Lima JB, Descoteaux A and
Borges VM (2022) Leishmania
infantum Defective in
Lipophosphoglycan Biosynthesis
Interferes With Activation
of Human Neutrophils.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:788196.
doi: 10.3389/fcimb.2022.788196

Graziele Quintela-Carvalho^{1,2,3†}, Astrid Madeleine Calero Goicochea^{1,2†},
Vanessa Mançur-Santos^{1,2}, Sayonara de Melo Viana^{1,2}, Yasmin da Silva Luz^{1,2},
Beatriz Rocha Simões Dias^{1,2}, Milena Lázaro-Souza^{1,2}, Martha Suarez^{1,2},
Camila Indiani de Oliveira^{1,2}, Elvira M. Saraiva⁴, Cláudia I. Brodszyn^{1,2},
Patrícia T. Veras^{1,2}, Juliana P.B. de Menezes^{1,2}, Bruno B. Andrade^{1,2,5,6,7,8},
Jonilson Berlink Lima⁹, Albert Descoteaux^{10*†} and Valéria M. Borges^{1,2*†}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil, ²Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil, ³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano (IFBaiano), Alagoinhas, Brazil, ⁴Departamento de Imunologia, Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil, ⁶Multinational Organization Network Sponsoring Translational and Epidemiological Research (MONSTER) Initiative, Salvador, Brazil, ⁷Curso de Medicina, Faculdade de Tecnologia e Ciências, Salvador, Brazil, ⁸Universidade Salvador (UNIFACS), Laureate Universities, Salvador, Brazil, ⁹Núcleo de Agentes Infecciosos e Vetores (NAIVE), Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOPB), Barreiras, Brazil, ¹⁰Institut National de la Recherche Scientifique (INRS)–Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval, QC, Canada

Visceral leishmaniasis (VL) is often associated with hematologic manifestations that may interfere with neutrophil response. Lipophosphoglycan (LPG) is a major molecule on the surface of *Leishmania* promastigotes, which has been associated with several aspects of the parasite–vector–host interplay. Here, we investigated how LPG from *Leishmania* (*L.*) *infantum*, the principal etiological agent of VL in the New World, influences the initial establishment of infection during interaction with human neutrophils in an experimental setting *in vitro*. Human neutrophils obtained from peripheral blood samples were infected with either the wild-type *L. infantum* (WT) strain or LPG-deficient mutant ($\Delta lpg1$). In this setting, $\Delta lpg1$ parasites displayed reduced viability compared to WT *L. infantum*; such finding was reverted in the complemented $\Delta lpg1+LPG1$ parasites at 3- and 6-h post-infection. Confocal microscopy experiments indicated that this decreased survival was related to enhanced lysosomal fusion. In fact, LPG-deficient *L. infantum* parasites more frequently died inside neutrophil acidic compartments, a phenomenon that was reverted when host cells were treated with Wortmannin. We also observed an increase in the secretion of the neutrophil collagenase matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) by cells infected with $\Delta lpg1$ *L. infantum* compared to those that were infected with WT parasites. Furthermore, collagen I matrix degradation was found to be significantly increased in $\Delta lpg1$ parasite-infected cells but not in WT-infected controls. Flow cytometry analysis revealed a substantial boost in production of reactive oxygen species (ROS) during infection with either WT or $\Delta lpg1$ *L. infantum*. In addition, killing of

Δ lpg1 parasites was shown to be more dependent on the ROS production than that of WT *L. infantum*. Notably, inhibition of the oxidative stress with Apocynin potentially fueled Δ lpg1 *L. infantum* fitness as it increased the intracellular parasite viability. Thus, our observations demonstrate that LPG may be a critical molecule fostering parasite survival in human neutrophils through a mechanism that involves cellular activation and generation of free radicals.

Keywords: lipophosphoglycan, *Leishmania infantum*, neutrophils, ROS, infection

INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis (VL), also known as Kala-azar, is a reemerging neglected tropical disease spread throughout Asia, Europe, the Middle East, Africa, and the Americas, with an average of 400,000 cases per year (OPAS and WHO, 2016). In the Old World, VL is caused by parasites of the *Leishmania donovani* complex, while in Brazil, *Leishmania infantum* is its main etiological agent (Franssen et al., 2020). Clinically, the disease caused by this parasite is systemic and associated with chronic immunopathology, which causes approximately 59,000 deaths annually worldwide (OPAS and WHO, 2016; Franssen et al., 2020). The lack of a timely adequate treatment leads to disease progression with involvement of organs such as bone marrow, liver, and spleen. Lethality is usually associated with hepatosplenomegaly, persistent fever, weight loss, hematological manifestations, and immunosuppression, which is hallmarked by substantial neutropenia and high susceptibility to death caused by bacterial co-infections (Chappuis et al., 2007). Understanding the interplay between *Leishmania* parasites and host immune cells, and especially neutrophils, may help to develop innovative strategies to optimize patient management and reduce the disease burden.

Neutrophils play a key role in establishing *Leishmania* infection, although macrophages are the major host cells (Peters et al., 2008; Chaves et al., 2020). Neutrophils are the first phagocytic cells to migrate and arrive in the parasite inoculation site during transmission from the invertebrate vectors (Laskay et al., 2003; Laskay et al., 2008; Ribeiro-Gomes and Sacks, 2012). Upon arrival at the infection site, these innate immune cells promote a boost in inflammation through production and/or secretion of a variety of enzymes that result in tissue remodeling, such as the metalloproteinase-8 (MMP-8) (Dieffenbach et al., 2021), and of reactive oxygen species (ROS) that promote not only parasite killing but also immunopathology (Diaz-Gandarilla et al., 2013; Ferraz et al., 2015). When parasites are phagocytized, neutrophils rapidly release lysosomal enzymes in the intracellular compartment containing *Leishmania*, which results in parasite killing. It is critical for the *Leishmania* parasite to evade neutrophil microbicidal responses (Hurrell et al., 2016; Passelli et al., 2021).

Lipophosphoglycan (LPG) is localized at the surface of *Leishmania* promastigotes (Forestier et al., 2015) and has been described as a virulence factor (Forestier et al., 2014; Podinovskaia and Descoteaux, 2015) that protects the parasite from host-mediated damage. LPG also dampens the cellular

activation to favor silent entry of *Leishmania* and benefits its persistence inside infected cells (Becker et al., 2003; Spath et al., 2003; Lodge et al., 2006). During neutrophil infection with *Leishmania*, the presence of LPG has been reported to inhibit the pro-oxidative response (Laufs et al., 2002; Salei et al., 2017) and the fusion of phagocytic vacuoles with lysosomes (Gueirard et al., 2008), favoring the success of infection. LPG from *L. donovani* has also been described to favor parasite viability in the presence of neutrophilic microbicidal mechanisms, such as induction of neutrophil extracellular traps (NETs) (Gabriel et al., 2010). Thus, LPG is thought to be a key component of *Leishmania* promastigotes that sustains parasite viability by evading well-established antimicrobial mechanisms inside neutrophils. Whether this molecule operates similarly in other species of *Leishmania* is still an area of great interest and not fully understood. The present study aimed at filling this gap regarding *L. infantum*, which is mostly responsible for the high burden of VL in South America. To this end, we used an LPG-deficient lpg1-/- mutant, which has been previously developed by our group (Lázaro-Souza et al., 2018). The findings reported here point to an interesting role of LPG that promotes parasite survival through an intricate mechanism that involves neutrophil activation, extracellular matrix degranulation, and oxidative stress.

METHODS

Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all the study participants following the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058).

Obtaining Human Neutrophils

Human blood was obtained from healthy volunteers at the Hemocenter of the State of Bahia (HEMOBA). The isolation of neutrophils was done as previously described (Quintela-Carvalho et al., 2017). The collected blood was added in Polymorphprep medium to obtain the polymorphonuclear cloud, performed according to the manufacturer's instructions (Axis-ShieldPoc AS, Oslo, Norway). Then, the blood was centrifuged for 30 min at 1,300 RPM at 25°C. After centrifugation, two bands were detectable: the first consisted of mononuclear cells and the

second consisted of polymorphonuclear cells. Thus, neutrophils were collected and washed three times with saline at 4°C for 10 min at 1,200 RPM. This method allowed a purified population with about 94% neutrophils. Neutrophils were plated at a concentration of 5×10^5 per well, in 96-well plates, with RPMI 1640 medium supplemented with Nutritional-SP 1% and 1% L-glutamine (2 mM), 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

Parasite Cultures

Wild-type (WT) *L. infantum* BA262 promastigotes and the isogenic LPG-deficient mutant of *L. infantum* (Lázaro-Souza et al., 2018) were cultured in HOMEM medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, and 2 mM of L-glutamine, at neutral pH and in culture bottles (3 ml or 5 ml of medium) kept inside a BOD at 25°C. The Δ lpg1 parasites were grown in HOMEM medium supplemented with Hygromycin B 50 µg/ml and G418 70 g/ml to prevent LPG from being synthesized (Lázaro-Souza et al., 2018). For infections, WT and Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes were used in a stationary growth phase.

Infection of Human Neutrophils

Human neutrophils were plated at a concentration of 5×10^5 per well and were incubated with WT or Δ lpg1 *L. infantum* stationary promastigotes, with a 1:10 infection rate (neutrophil: promastigote). The cultures were incubated for 3 h to evaluate the infection.

Parasite Burden and Viability of Promastigotes *L. infantum* in Infected Human Neutrophils

The phagocytosis of WT, Δ lpg1, or Δ lpg1+LPG1 *L. infantum* promastigotes was analyzed through the frequency (%) of neutrophils with internalized parasites, examined by microscopy. The total number of parasites counted inside infected neutrophils (metric: parasites/200 neutrophils), was also examined by optical microscopy at 3- and 6-h post-infection. Moreover, the percentage of infected neutrophils containing CFSE-labeled parasites was assessed using flow cytometry (Fortessa, BD). The viability of promastigotes was assessed by counting viable parasites using an adaptation of the Schneider method (Ribeiro-Gomes et al., 2004; Quintela-Carvalho et al., 2017). Specifically, neutrophils were incubated with WT, Δ lpg1, or Δ lpg1+LPG1 *L. infantum* promastigotes for a time course of 3- and 6-h post-infection maintained in a CO₂ incubator at 37°C with 5% CO₂ in the presence of RPMI medium with 10% BFS. After 3-h and 6-h post-infection, infected neutrophils were centrifuged at 1,300 RPM for 10 min at 4°C and the supernatant containing non-internalized promastigotes was discarded and replaced with 200 µl of HOMEM medium. Then, the infected neutrophils were incubated in the BOD at 22°C, and after 24 h, viable promastigotes that form freely in the medium were counted in Neubauer chambers. During this time, *Leishmania* parasites proliferate/multiply extracellularly in HOMEM medium, thus

explaining why the total number of parasites at the 24-h time point is higher than that observed in the initial inoculum.

For membrane fusion inhibition assay, promastigote viability in infected neutrophils was assessed in 30 min pretreatment with Wortmannin (500 nM - SIGMA).

Transmission Electron Microscopy

After 3 h of infection with WT and Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes, neutrophils were washed, collected, and fixed in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, with 1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich), 4% formaldehyde, and 5 mM CaCl₂. Subsequently, they were post-fixed in 1% osmium tetroxide and 0.08% potassium ferricyanide. The dehydration was done in increasing series of acetone concentration and replaced by Polybed resin (Polysciences Inc., USA). After being cut into ultrafine sections, the cells were stained in uranyl acetate and citrate for observation under a Zeiss EM 109 transmission electron microscope and recording of representative images.

Confocal Immunofluorescence Microscopy

For the immunofluorescence assays, WT and Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes were labeled with probe 5(6)-Succinimidyl carboxyfluorescein ester (Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit) at a concentration of 2 µM, for 10 min and washed 3 times in PBS 1X buffer to remove excess CFSE. Human neutrophils were infected with WT or Δ lpg1 parasites labeled with CFSE and incubated with LysoTracker red for acid compartments localization (Molecular Probes). After 3 h of infection, nuclear staining was done with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and the samples were observed through a fluorescence confocal microscope (Leica Microsystems). The number of lysotracker positive vacuoles was quantified in 10 distinct fields and the spots represent individual cells containing colocalization of lysotracker and *Leishmania* positive vacuoles.

Quantification of MMP-8

To analyze the release of neutrophilic enzyme MMP-8, supernatants from controls and cultures of infected neutrophils with WT or Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes were collected and immediately tested for the presence of enzyme, according to the manufacturer's instructions (R&D systems, Minneapolis, USA).

Matrix Degradation Assay

Collagen type I matrix (Collagen I, Rat Tail - Gibco) was prepared at a 2 mg/ml concentration with 10% PBS phosphate buffer 10X, 0.26% NaOH 1 N and 10% fluorescent gelatin (Gelatin from pigskin, Oregon green 488 conjugate - Invitrogen). Neutrophils (5×10^4) were then added to the matrix and cultured for 3 h at 37°C and 5% CO₂, fixed with PFA 4% for 15 min, and visualized with a Leica DMi8 inverted fluorescence microscope. Quantification of matrix degradation was assessed by measuring the pixels of gelatin-FITC degradation area using FIJI software. Areas corresponding to 30 cells were quantified for each condition in 3 separate experiments.

Detection and Inhibition of Oxidative Response

To evaluate oxidative response inhibition, human neutrophils were previously incubated or not with 20 μ M of Apocynin (Sigma), a potent antioxidant (REF), for 1 h, followed by 30 min of infection with WT or Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes. After this period, these cultures were treated for an additional 30-min interval with 10 μ M of the dihydroethidium probe (DHE) (Invitrogen/Molecular Probes, Grand Island, NY, USA). Using this assay, upon entering cells, a DHE probe is oxidized by superoxide anions emitting red fluorescence and detected by flow cytometry (Fortessa, BD).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Infection experiments were performed in quintuplicate, and data on central tendency and dispersion are presented as medians and interquartile ranges, respectively. Comparisons were made using the nonparametric Mann–Whitney *U* test or the Kruskal–Wallis test (for more than two samples) with Dunn's multiple comparisons post-test. Frequencies (%) of categorical variables were compared using the Pearson's chi-square test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

LPG1-Null Mutants Exhibit Limited Survival in Neutrophils

To determine the role of LPG during infection, human neutrophils were infected for 3 h with WT, Δ lpg1, and Δ lpg1 + LPG1 *L. infantum* promastigotes. We performed assays counting frequency (%) of infected cells (Figure 1A) and the number of parasites per cell by microscopy (Figure 1B). Moreover, we used flow cytometry to determine the % of infected cells with CFSE-labeled parasites (Supplementary Figure 1 and Figure 1C). The survival assays revealed that Δ lpg1 parasites presented impaired viability inside neutrophils compared to that detected with wild-type *Leishmania* (Figure 1D). We also performed an infection comparing an early (3 h) and a later (6 h) time point where most of the parasites were already internalized. The percentage of infected cells (Figure 1E) and number of parasites per 200 cells (Figure 1F) were similar at both time points, indicating that Δ lpg1 parasites are more frequently internalized by neutrophils. In addition, parasite survival was analyzed and we observed that regardless of the time of infection (3 h or 6 h), the Δ lpg1 parasites presented impaired viability inside neutrophils compared to that detected with WT *Leishmania* (Figure 1G). Furthermore, morphology of neutrophils infected with WT or Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes was analyzed by transmission electron microscopy (TEM). We noted that the cellular structure and morphology of WT *L. infantum* in the parasitophorous vacuole were well preserved. In contrast, Δ lpg1 parasites exhibited disturbed morphology with degradation of intracellular

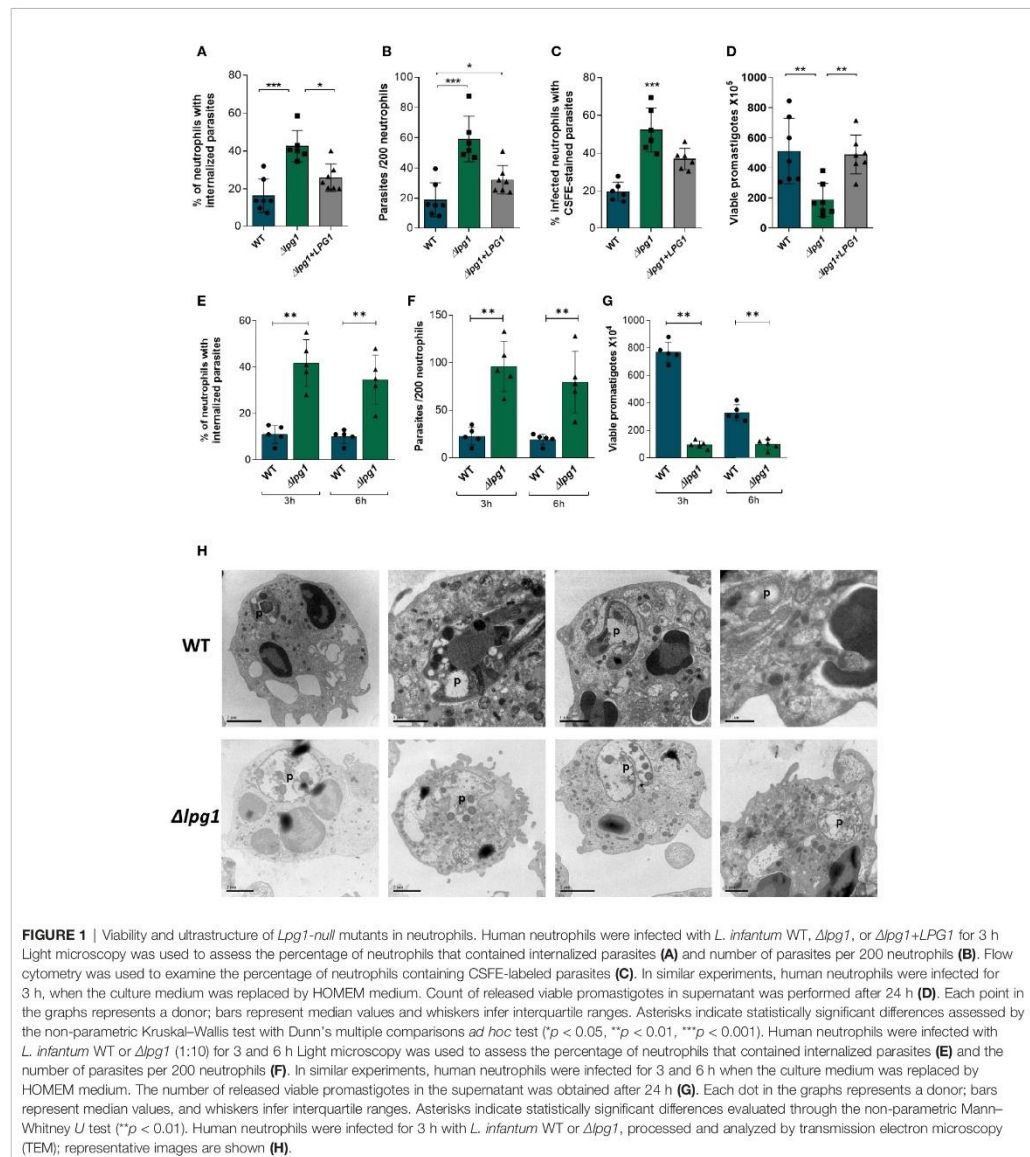
structures, which may be indicative of parasite killing (Figure 1H). These results show that the WT parasites and the Δ lpg1 + LPG1 complemented parasites behave similarly. For this reason, we performed the next experiments with the WT and Δ lpg1 mutant parasites only. These results show that Δ lpg1 *L. infantum* parasites infect more neutrophils than WT parasites, but they do not survive as much as the WT once they are internalized. The findings suggest that LPG may be important for parasite persistence inside infected cells.

LPG Hampers Lysosomal Fusion and Formation of Acidic Compartments Containing *L. infantum*

The results reported above indicated that viability of Δ lpg1 parasites was diminished compared to that observed in WT controls. This finding led us to hypothesize that a potential mechanism underlying such phenomenon may implicate lysosomal activity. To test this idea, human neutrophils were infected with WT or Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes labeled with CFSE (green fluorescence) followed by LysoTracker staining (red fluorescence). After 3 h of infection, we observed that Δ lpg1 *L. infantum* mutant co-localized with LysoTracker whereas WT controls did not (Figure 2A). Reinforcing the information shown in confocal microscopy, the quantitative results indicated that the frequency of LysoTracker-positive vacuoles/field was substantially higher in cultures of neutrophils infected with Δ lpg1 parasites compared to those of cells infected with WT controls (Figure 2B). To confirm that trafficking of Δ lpg1 parasites to lysosomes was involved with the impairment of their viability, we repeated the viability assay in the presence of Wortmannin, an inhibitor of parasitophorous vacuole acidification (Tavares et al., 2016). Inhibition of neutrophil vacuole acidification led to an increased viability of Δ lpg1 *L. infantum* parasites, which is consistent with the notion that LPG may protect *L. infantum* from degradation in acidic compartments (Figure 2C).

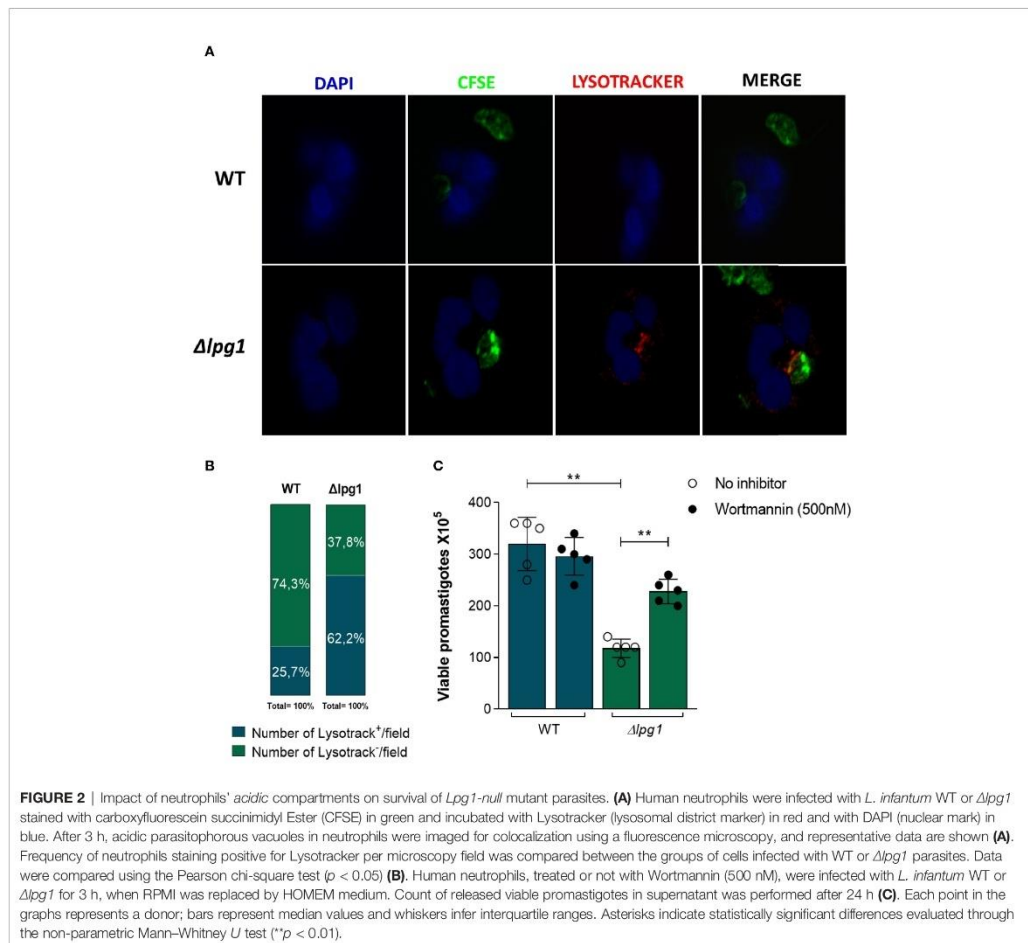
L. infantum Genetically Lacking LPG1 Activates Human Neutrophils to Secrete MMP-8

We next tested whether the absence of LPG could be driving neutrophil activation. MMP-8 is an important product of neutrophil activation and has a role in acute inflammation through collagen degradation (Dieffenbach et al., 2021). We found higher concentrations of MMP-8 in culture supernatants of neutrophils infected with Δ lpg1 *L. infantum* compared to uninfected cells or those infected with WT controls (Figure 3A). To delineate the potential consequences of this augmented secretion of MMP-8 by neutrophils infected with Δ lpg1 parasites, we performed a type-I collagen matrix degradation assay in our experimental model. The microscopy images confirmed the reduction of the collagen matrix in cultures of neutrophils infected with Δ lpg1 *L. infantum* (Figures 3B–D). Figure 3E summarizes the experiments to show that neutrophils infected with the Δ lpg1 *L. infantum* mutant displayed, on average, a higher matrix degradation area compared to control



or WT-infected neutrophils (Figure 3E). Although there were statistically significant differences in MMP-8 and collagen degradation measures between the experimental groups, the magnitude of such differences may be seen as low at a first glance. Increases of 30% in degranulation of enzymes that

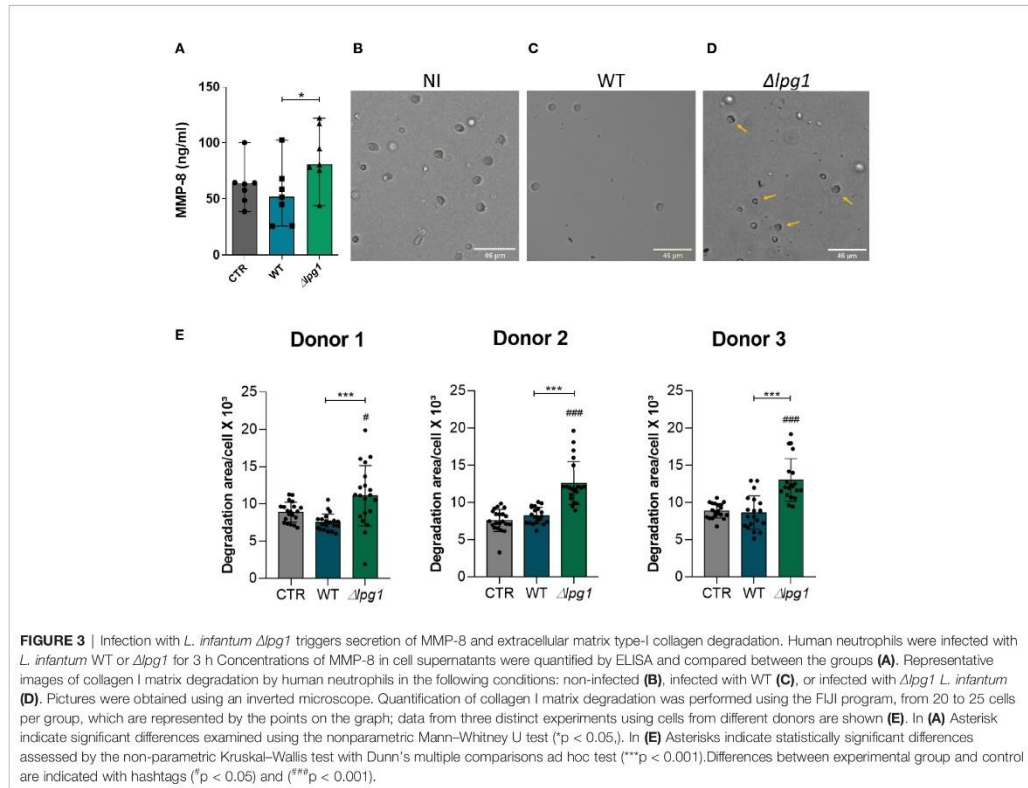
degrade extracellular matrix are likely to be relevant biologically; however, our experimental system does not allow us to investigate such matter *in vivo*. Regardless of such limitations, these results argue that LPG may indeed interfere with the production of neutrophil-associated matrix remodeling.



Death of *L. infantum* Δ lpg1 Promastigotes Is Dependent on ROS Production

Although the results so far have demonstrated a role for LPG in protecting *L. infantum* promastigotes from the microbicidal activity of neutrophils and in dampening neutrophil activation, the specific mechanism leading to the killing of the Δ lpg1 mutant parasites in neutrophils had not been clarified. ROS are well-known microbicidal mediators against bacteria and parasites (Díaz-Gandarilla et al., 2013; Forrellad et al., 2019). We therefore evaluated the potential role of ROS in the killing of Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes. First, we measured ROS production by neutrophils infected with WT or Δ lpg1 *L. infantum* promastigotes in the presence or not of a potent ROS inhibitor (Apocynin). The results demonstrated that both WT and Δ lpg1 parasites induced

ROS production to a similar extent (Figure 4A); such effect was reverted by the treatment with Apocynin, as expected. Since our results reported above indicated that LPG protects promastigotes from the microbicidal activity of neutrophils, we next investigated whether this protection occurs through affecting sensitivity to ROS. We performed a parasite viability assay in the absence or the presence of the ROS inhibitor Apocynin. As shown in Figure 4B, the presence of Apocynin in cultures of neutrophils infected with the WT promastigotes had no effect on the viability of the parasites. Strikingly, inhibition of ROS production led to substantial increase in the viability of the Δ lpg1 *L. infantum* parasites. These findings agree with our hypothesis that Δ lpg1 *L. infantum* are more sensitive to oxidative stress responses from neutrophils.



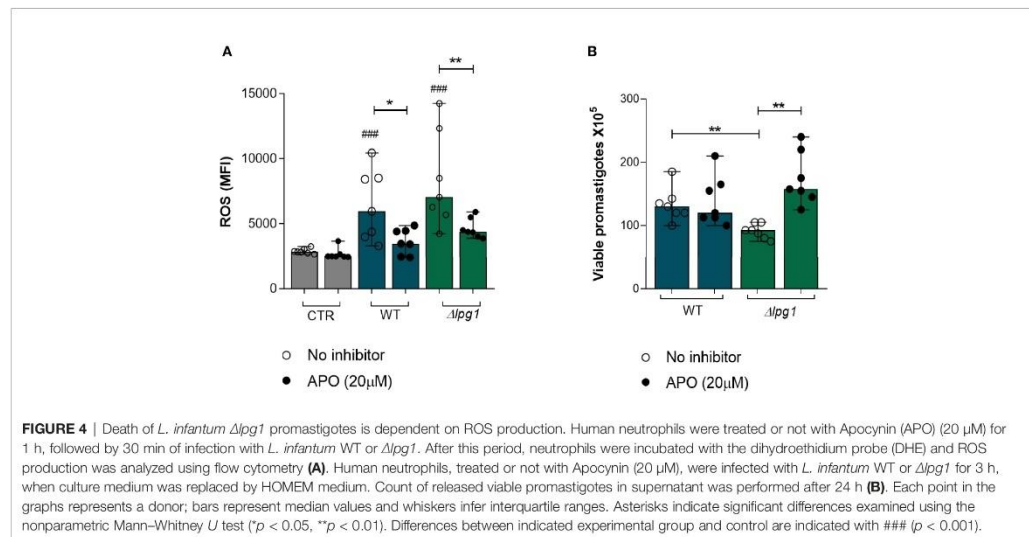
DISCUSSION

Lipophosphoglycan, the most abundant glycoconjugate on the surface of *Leishmania* promastigotes, has been shown to play a central role in the ability of these parasites to establish infection in the host phagocytes (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012). Results from previous studies with LPG-deficient $\Delta lpg1$ mutants in *L. donovani* or other species from the Old World cannot always be validated in species from the New World (Privé and Descoteaux, 2000). In our study, we investigated how LPG from *L. infantum*, the principal etiological agent of VL in Brazil, influences the initial establishment of infection during interaction with human neutrophils.

Using a well-established *in vitro* model with infection of human neutrophils, we observed that the LPG-deficient *L. infantum* parasites are more frequently phagocytized when compared to LPG-expressing WT or $\Delta lpg1 + LPG1$ parasites. However, the results from the viability assay indicate that once internalized, the LPG-defective parasites do not survive at 3 h post infection to the same extent as that observed with WT or $\Delta lpg1 + LPG1$ parasites. This observation suggests that this

molecule is important for the ability of the parasite to survive and establish infection in human neutrophils. In studies performed in the past (Ribeiro-Gomes and Sacks, 2012; Tavares et al., 2014; Quintela-Carvalho et al., 2017), we detailed analysis of the dynamicity of human neutrophil infection, activation, and death *in vitro*. In our hands, in the context of the experiments with *Leishmania* infection *in vitro*, neutrophils do not survive for much longer after isolation from peripheral blood (after 8 h post isolation since these cells undergo apoptosis). In addition, neutrophils are leukocytes with extremely rapid responses, and several important mediators are immediately released from endovesicles without the need of *de novo* production. Therefore, it is not possible to evaluate infectivity after 8 h post-infection without a high degree of bias due to death of neutrophils. For this reason, our experiments were carried out at 3 h and 6 h post infection.

Since the abovementioned results were similar to experiments of internalization and viability with WT and $\Delta lpg1 + LPG1$ parasites, we performed the next assays only comparing the WT with the LPG-deficient *L. infantum* parasites. When combined, our experiments indicate that LPG from *L. infantum* may be a



factor dampening neutrophil activation. Thus, LPG-lacking parasites may more robustly activate neutrophils, which would explain increased phagocytosis, infection, and intracellular killing. Our findings prompted us to hypothesize that such effect of LPG on human neutrophils may be a critical mechanism to foster parasite persistence and establishment of infection in susceptible hosts.

A previous observation that an antibody against LPG prevented *L. major* promastigote binding to macrophages (Handman and Goding, 1985) led to the conclusion that LPG is required for promastigote internalization. However, with the availability of genetically defined LPG-defective mutants generated in both *L. major* and *L. donovani*, it became clear that LPG is completely dispensable for promastigote internalization by macrophages (Holm et al., 2003; Spath et al., 2003). In fact, as reported by both Spath et al. (2003) and Holm et al. (2003), uptake of LPG-defective promastigotes by macrophages is superior to that of WT and add-back parasites. Further investigation revealed that LPG reduces the phagocytic capacity of macrophages by excluding the membrane fusion regulator Synaptotagmin (Syt) V from the nascent phagocytic cup (Vinet et al., 2011). Syt V regulates phagocytosis by controlling focal exocytosis of endocytic organelles (Vinet et al., 2008). Our results showing increased internalization of LPG-defective *L. infantum* by neutrophils are thus consistent with the previous findings described above.

To survive intracellularly, vacuolar pathogens have developed mechanisms to evade the action of microbicidal molecules acting inside vesicles of phagocytic cells. In macrophages, bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* or protozoa such as *Toxoplasma* and *Leishmania* can survive by preventing the formation of microbicidal phagolysosomes (Robert-Gangneux and Dardé,

2012; Forrellad et al., 2013; EDR and JE, 2016). Here, we investigated whether LPG interferes in a similar mechanism to protect *L. infantum* promastigotes within parasitophorous vacuoles in human neutrophils. Our observation that Δ lpg1 *L. infantum* parasites, but not WT, are found within acidified parasitophorous vacuoles is consistent with previously reported findings demonstrating that LPG prevents phagolysosome biogenesis and acidification (Desjardins and Descoteaux, 1997; Dermine et al., 2000; Gueirard et al., 2008; Vinet et al., 2009; da Silva Vieira et al., 2019; Matte et al., 2021). To confirm the role of acidified compartments in the killing of Δ lpg1 *L. infantum*, we performed a viability assay in the presence of Wortmannin, an inhibitor of vesicle fusion and phagolysosome formation (Tavares et al., 2016). Wortmannin treatment during neutrophil infection increased the viability of Δ lpg1 *L. infantum* to a similar degree of that quantified in cells infected with WT *L. infantum*. Notably, these observations are in agreement with previous investigations using promastigotes from *Leishmania major* and *L. donovani* species (Dias et al., 2018; Verma et al., 2018). In those experiments, promastigotes survived in human neutrophils by preventing the early fusion of specific and tertiary granules with the vacuole containing the parasite. This result reinforces the idea that LPG plays a protective role to favor *Leishmania* persistence inside neutrophils through a mechanism that involves phagosome fusion. Wortmannin is a potent PI3K inhibitor, and its effects on diminishing phagosome acidification are very well described (Krysko et al., 2006; Cheekata et al., 2012), but this drug may have pleiotropic effects and thus further investigations are required to address whether the effects described in our study are reproducible with other and more selective inhibitors of phagosomal acidification.

Neutrophil microbicidal mechanisms to control infections include the release of granule contents in the phagosome or extracellularly (Carlsen et al., 2015; Hurrell et al., 2016). We took two approaches to investigate this phenomenon in the context of our experimental model. We first examined whether infection was related with release of MMP-8, which represents an important neutrophil-associated collagenase. The experiments indicated that the concentration of the neutrophilic enzyme MMP-8 was increased in supernatants of neutrophils infected with $\Delta lpg1$ *L. infantum* when compared to ones infected with the WT.

MMPs are a family of proteolytic enzymes related to tissue remodeling and inflammation (Sivak and Fini, 2002). Some MMPs may be associated with damage to the extracellular matrix (Nusblat et al., 2011). To test whether increased MMP-8 release would result in potential tissue remodeling, we performed a matrix degradation assay. As expected, neutrophils infected with $\Delta lpg1$ *L. infantum* degraded a more extended area of matrix compared with uninfected cells or those infected with WT parasites. This augmented matrix degradation is a hallmark of tissue remodeling observed during infection of host tissues and thus our results argue that LPG may restrict tissue damage. We hypothesize that LPG contributes to a more silent infection and less disturbance of host homeostasis, which will minimize the inflammatory response against the parasite.

The second line of investigation of the microbicidal mechanisms was to define whether LPG also interferes with oxidative effector functions. Neutrophil activation status is directly associated with its ability to produce reactive oxidative species. Several pathogens such as *Leishmania* can induce or potentiate the oxidative response in neutrophils (Laufs et al., 2002; Carlsen et al., 2015). We measured ROS production by neutrophils using flow cytometry. The results indicated that infection with either WT or $\Delta lpg1$ *L. infantum* promoted a similar increase in ROS production by neutrophils. Thus, LPG does not seem to directly affect pro-oxidation promoted by neutrophil activation during infection. Previous work from our group has demonstrated that the reduction of $\Delta lpg1$ *L. infantum* survival during infection of murine macrophages is related to higher levels of NF- κ B-dependent iNOS induction, which drives nitric oxide generation (Lázaro-Souza et al., 2018). In macrophages, the LPG from *Leishmania* has been associated with reduction in superoxide levels as it impairs the assembly of the NADPH complex (Lodge et al., 2006). Neutrophils infected with *L. major* are also known to decrease oxidative stress in the presence of apoptotic cells, promoting the persistence of the parasite in these cells (Mollinedo et al., 2010; Salei et al., 2017). Our findings suggest that the oxidative response could contribute to the control of the parasite load in neutrophils infected with $\Delta lpg1$ *L. infantum* promastigotes, mainly because these parasites do not present LPG on its surface as a protective barrier.

Leishmania's LPG is thought to inhibit the maturation of vacuoles in which they are contained by blocking recruitment of the v-ATPase and acidification (Vinet et al., 2009; Matte et al., 2021) and assembly of the NADPH oxidase (Lodge et al., 2006).

The blockage of phagosome acidification inhibits action of ROS. As the results so far indicated that LPG was acting through a similar mechanism in our model, we speculated that $\Delta lpg1$ *L. infantum* is not capable of preventing phagosome maturation, causing an increased ROS production in neutrophils that could be reversed in the use of NADPH oxidase inhibitors. To test this hypothesis, we used Apocynin during the infection of neutrophils with $\Delta lpg1$ *L. infantum*. The results observed in **Figure 4B** show that APO treatment had no effect on parasite viability in cultures infected with WT but it did improve viability of the $\Delta lpg1$ mutant. Thus, diminished ROS seem to be contributing more to survival of the LPG-defective strain in this experimental setting than that of WT. The results cannot delineate why WT parasites were less sensitive to ROS inhibition with APO, but they do show that there was a robust effect on $\Delta lpg1$ parasites. Ideally, one could perform the assays in cells KO to NADPH oxidase, which could clarify the role of ROS in the system without the use of inhibitors and would also allow the identification of the role of host-derived ROS. It is possible that the presence of LPG in WT parasites has promoted escape mechanisms that involve resistance to ROS inside infected cells, minimizing the odds of detecting an effect of the Apocynin treatment. Altogether, these data support the role of LPG in the protection of *L. infantum* from ROS microbicidal effect.

The combined findings exposed here uncover novel nuances about the role of *L. infantum* LPG as a relevant virulence factor that interferes with the capacity of the neutrophils to promote successful parasite killing. By exerting a negative effect on phagosome fusion, neutrophil activation, and oxidative metabolism, LPG may support survival of parasites inside host cells, which is a critical path towards persistence of infection and parasitism. Further studies are necessary to investigate the pathways and other mechanisms involved in the role played by the activation of neutrophils and other cell types.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The protocol was approved by the Institutional Review Board of the Federal University of Sergipe, Brazil (license number: 04587312.2.0000.0058). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: GQ-C, AG, VM-S, BA, JL, AD, and VB. Methodology: GQ-C, AG, VM-S, SM, YS, BD, ML-S, MS, CO,

ES, CB, PV, JM, BA, JL, AD, and VB. Data analysis: GQ-C, AG, VM-S, SM, YS, BD, ML-S, MS, CO, ES, CB, PV, JM, BA, JL, AD, and VB. Writing: GQ-C, AG, VM-S, BA, JL, AD, and VB. Funding acquisition: AD and VB. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq, 431857/2018-0) and Programa Inova – Geração de Conhecimentos (FIOTEC, VPPCB-007-FIO-18-2-101) to VB and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant PJT-156416 to AD). CO, ES, CB, PV, BA, and VMB are senior investigators funded by CNPq. AD is the holder of the Canada Research Chair on the Biology of intracellular parasitism. AG received a fellowship from the FAPESB and VM-S received a fellowship from the CNPq. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, I. G., et al. (2003). Leishmania Lipophosphoglycan (LPG) Activates NK Cells Through Toll-Like Receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130 (2), 65–74.
- Carlsen, E. D., Liang, Y., Shelite, T. R., Walker, D. H., Melby, P. C., and Soong, L. (2015). Permissive and Protective Roles for Neutrophils in Leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 182 (2), 109–118. doi: 10.1111/cei.12674
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., et al. (2007). Visceral Leishmaniasis: What are the Needs for Diagnosis, Treatment and Control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (11), 873–882. doi: 10.1038/nrmicro1748
- Chaves, M. M., Lee, S. H., Kamenyeva, O., Ghosh, K., Peters, N. C., and Sacks, D. (2020). The Role of Dermis Resident Macrophages and Their Interaction With Neutrophils in the Early Establishment of Leishmania Major Infection Transmitted by Sand Fly Bite. *PLoS Pathog.* 16 (11), e1008674. doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1008674
- Checkatla, S. S., Aggarwal, A., and Naik, S. (2012). mTOR Signaling Pathway Regulates the IL-12/IL-10 Axis in Leishmania Donovanii Infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 201 (1), 37–46. doi: 10.1007/s00430-011-0202-5
- da Silva Vieira, T., Arango Duque, G., Ory, K., Gontijo, C. M., Soares, R. P., and Descoteaux, A. (2019). Leishmania Braziliensis: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fcimb.2019.00319
- Dermine, J. F., Scianimanico, S., Privé, C., Descoteaux, A., and Desjardins, M. (2000). Leishmania Promastigotes Require Lipophosphoglycan to Actively Modulate the Fusion Properties of Phagosomes at an Early Step of Phagocytosis. *Cell. Microbiol.* 2 (2), 115–126. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00037.x
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the Leishmania Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 185 (12), 2061–2068. doi: 10.1084/jem.185.12.2061
- Díaz-Gandarilla, J. A., Osorio-Trujillo, C., Hernández-Ramírez, V. I., and Talamás-Rohana, P. (2013). PPAR Activation Induces M1 Macrophage Polarization via cPLA₂-COX-2 Inhibition, Activating ROS Production Against Leishmania Mexicana. *BioMed. Res. Int.* 2013, 215283. doi: 10.1155/2013/215283
- Dias, B. R. S., de Souza, C. S., Almeida, N. J., Lima, J. G. B., Fukutani, K. F., and Dos Santos, T. B. S. (2018). Autophagic Induction Greatly Enhances Leishmania

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Deboraci Prates and Paloma Fiuza for helpful discussions. The authors thank Andreza Souza for technical and logistics support and Adriana Rangel and Cláudio Figueira from the electron microscopy facility at Gonçalo Moniz Institute (IGM) – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Bahia.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.788196/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Gating strategy of human neutrophils infected with CFSE-stained *L. infantum*. Parasites pre-stained with Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) were used to infect Neutrophils for 3 h. **(A)** Cells were first selected in a sideward scatter channel (SSC) vs. forward scatter channel (FSC) plot, then singlets were identified by FSC-H vs. FSC-A plot for exclusion of debris and live cells were selected based on negative Fixable Viability Dye staining. Subsequently, the gating of infected cells was set on the positive CFSE population. **(B)** Individual plots showing representative populations of neutrophils uninfected, or infected with *L. infantum* WT, Δ lpg1 or Δ lpg1+LPG1, respectively.

- major Intracellular Survival Compared to Leishmania amazonensis in CBA/J-Infected Macrophages. *Front. Microbiol.* 9, 1890. doi: 10.3389/fmicb.2018.01890
- Dieffenbach, P. B., Mallarino Haeger, C., Rehman, R., Corcoran, A. M., Coronata, A. M. F., Vellarikkal, S. K., et al. (2021). A Novel Protective Role for Matrix Metalloproteinase-8 in the Pulmonary Vasculature. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 204 (12), 1433–1451. doi: 10.1164/RCCM.202108-1863OC
- EDR, C., and JE, S. (2016). Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol. Spectr.* 4 (1), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0014-2015. doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0014-2015
- Ferraz, R., Cunha, C. F., Gomes-Silva, A., Schubach, A. O., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., et al. (2015). Apoptosis and Frequency of Total and Effector CD8+ T Lymphocytes From Cutaneous Leishmaniasis Patients During Antimonial Therapy. *BMC Infect. Dis.* 15 (1), 1–11. doi: 10.1186/s12879-015-0799-x
- Forestier, C.-L., Gao, Q., and Boons, G.-J. (2014). Leishmania Lipophosphoglycan: How to Establish Structure-Activity Relationships for This Highly Complex and Multifunctional Glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4 (January). doi: 10.3389/fcimb.2014.00193
- Forestier, C.-L., Gao, Q., and Boons, G.-J. (2014). Leishmania Lipophosphoglycan: How to Establish Structure-Activity Relationships for This Highly Complex and Multifunctional Glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 193. doi: 10.3389/fcimb.2014.00193Q19
- Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., García, J. S., Morbidoni, H. R., de la Paz Santangelo, M., et al. (2013). Virulence Factors of the Mycobacterium Tuberculosis Complex. *Virulence* 4 (1), 3–66. doi: 10.4161/viru.22329
- Forrellad, M. A., Vázquez, C. L., Blanco, F. C., Klepp, L. I., García, E. A., Rocha, R., et al. (2019). Rv2617c and P36 are Virulence Factors of Pathogenic Mycobacteria Involved in Resistance to Oxidative Stress. *Virulence* 10 (1), 1026–1033. doi: 10.1080/21505594.2019.1693714
- Franssen, S. U., Durrant, C., Stark, O., Moser, B., Downing, T., Imamura, H., et al. (2020). Global Genome Diversity of the Leishmania Donovanii Complex. *ELife* 9, e51243. doi: 10.7554/ELIFE.51243
- Gabriel, C., McMaster, W. R., Girard, D., and Descoteaux, A. (2010). Leishmania Donovanii Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Immunol.* 185 (7), 4319–4327. doi: 10.4049/jimmunol.1000893
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G., and Desjardins, M. (2008). Trafficking of Leishmania Donovanii Promastigotes in non-Lytic Compartments in Neutrophils Enables the Subsequent Transfer of Parasites

- to Macrophages. *Cell. Microbiol.* 10 (1), 100–111. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01018.x
- Handman, E., and Goding, J. W. (1985). The Leishmania Receptor for Macrophages is a Lipid-Containing Glycoconjugate. *EMBO J.* 4 (2), 329–336.
- Holm, A., Tejle, K., Gunnarsson, T., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., and Rasmussen, B. (2003). Role of Protein Kinase C Alpha for Uptake of Unopsonized Prey and Phagosomal Maturation in Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302 (4), 653–658. doi: 10.1016/S0006-291X(03)00231-6
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., and Tacchini-Cottier, F. (2016p). Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. *Trends Parasitol.* 32 (5), 392–401. doi: 10.1016/j.pt.2016.02.003
- Krysko, D. V., Denecker, G., Festjens, N., Gabriels, S., Parthoens, E., et al. (2006). Macrophages Use Different Internalization Mechanisms to Clear Apoptotic and Necrotic Cells. *Cell Death Differ.* 13 (12), 2011–2022. doi: 10.1038/SJ.CDD.4401900
- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003). Neutrophil Granulocytes - Trojan Horses for Leishmania Major and Other Intracellular Microbes? *Trends Microbiol.* 11 (5), 210–214. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00075-1
- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2008). Neutrophil Granulocytes as Host Cells and Transport Vehicles for Intracellular Pathogens: Apoptosis as Infection-Promoting Factor. *Immunobiology* 213 (3–4), 183–191. doi: 10.1016/j.imbio.2007.11.010
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., et al. (2002). Intracellular Survival of Leishmania Major in Neutrophil Granulocytes After Uptake in the Absence of Heat-Labile Serum Factors. *Infect. Immun.* 70 (2), 826–835. doi: 10.1128/IAI.70.2.826-835.2002
- Lázaro-Souza, M., Matte, C., Lima, J. B., Duque, G. A., Quintela-Carvalho, G., Vivarini, >Á., et al. (2018). Leishmania Infantum Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. *Front. Microbiol.* 9 (APR). doi: 10.3389/fmicb.2018.00626
- Lodge, R., Diallo, T. O., and Descoteaux, A. (2006). Leishmania Donovanii Lipophosphoglycan Blocks NADPH Oxidase Assembly at the Phagosome Membrane. *Cell. Microbiol.* 8 (12), 1922–1931. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x
- Matte, C., Duque, G. A., and Descoteaux, A. (2021). Leishmania Donovanii Metacyclic Promastigotes Impair Phagosome Properties in Inflammatory Monocytes. *Infect. Immun.* 89 (7), e0000921. doi: 10.1128/IAI.00009-21
- Mollinedo, F., Janssen, H., de la Iglesia-Vicente, J., Villa-Pulgarin, J. A., and Calafat, J. (2010). Selective Fusion of Azurophilic Granules With Leishmania-Containing Phagosomes in Human Neutrophils. *J. Biol. Chem.* 285 (45), 34528–34536. doi: 10.1074/jbc.M110.125302
- Nusblat, L. M., Dovas, A., and Cox, D. (2011). The non-Redundant Role of N-WASP in Podosome-Mediated Matrix Degradation in Macrophages. *Eur. J. Cell Biol.* 90 (2–3), 205–212. doi: 10.1016/j.ejcb.2010.07.012
- OPAS, P. A. H. O. and WHO, W. H. O. (2016). "LEISHMANIASIS," in *Epidemiological Report in the Americas*. Available at: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.
- Passelli, K., Billion, O., and Tacchini-Cottier, F. (2021). The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by Leishmania Infection. *Front. Immunol.* Vol. 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.649348
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., et al. (2008). *In Vivo* Imaging Reveals an Essential Role for Neutrophils in Leishmaniasis Transmitted by Sand Flies. *Science* 321 (5891), 970–974. doi: 10.1126/science.1159194
- Podinovskaia, M., and Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the Macrophage: A Multifaceted Interaction. *Future Microbiol.* 10 (1), 111–129. doi: 10.2217/FMB.14.103
- Privé, C., and Descoteaux, A. (2000). Leishmania Donovanii Promastigotes Evade the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases P38, C-Jun N-Terminal Kinase, and Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2 During Infection of Naïve Macrophages. *Eur. J. Immunol.* 30 (8), 2235–2244. doi: 10.1002/1521-4141(2000)30:8<2235::AID-IMMU2235>3.0.CO;2-9
- Quintela-Carvalho, G., Luz, N. F., Celes, F. S., Zanette, D. L., Andrade, D., Menezes, D., et al. (2017). Heme Drives Oxidative Stress-Associated Cell Death in Human Neutrophils Infected With Leishmania Infantum. *Front. Immunol.* 8 (NOV). doi: 10.3389/fimmu.2017.01620
- Ribeiro-Gomes, F. L., Otero, A. C., Gomes, N. A., Moniz-de-Souza, M. C. A., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A. C., et al. (2004). Macrophage Interactions With Neutrophils Regulate Leishmania Major Infection. *J. Immunol.* 172 (7), 4454–4462. doi: 10.4049/JIMMUNOL.172.7.4454
- Ribeiro-Gomes, F. L., and Sacks, D. (2012). The Influence of Early Neutrophil-Leishmania Interactions on the Host Immune Response to Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2. doi: 10.3389/fcimb.2012.00059
- Robert-Gangneux, F., and Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25 (2), 264–296. doi: 10.1128/CMR.05013-11
- Salei, N., Hellberg, L., Köhl, J., and Laskay, T. (2017). Enhanced Survival of Leishmania Major in Neutrophil Granulocytes in the Presence of Apoptotic Cells. *PLoS One* 12 (2), e0100628. doi: 10.1371/journal.pone.0171850
- Sivak, J. M., and Fini, M. E. (2002). MMPs in the Eye: Emerging Roles for Matrix Metalloproteinases in Ocular Physiology. *Prog. Retinal. Eye. Res.* 21 (1), 1–14. doi: 10.1016/S1350-9462(01)00015-5
- Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J., and Beverley, S. M. (2003). The Role(s) of Lipophosphoglycan (LPG) in the Establishment of Leishmania Major Infections in Mammalian Hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (16), 9536–9541. doi: 10.1073/pnas.1530604100
- Tavares, N., Afonso, L., Suarez, M., Ampuero, M., Prates, D. B., Araújo-Santos, T., et al. (2016). Degrantulating Neutrophils Promote Leukotriene B4 Production by Infected Macrophages To Kill Leishmania Amazonensis Parasites. *J. Immunol.* 196 (4), 1865–1873. doi: 10.4049/jimmunol.1502224
- Tavares, N. M., Araújo-Santos, T., Afonso, L., Nogueira, P. M., Lopes, U. G., Soares, R. P., et al. (2014). Understanding the Mechanisms Controlling Leishmania Amazonensis Infection *In Vitro*: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. *J. Infect. Dis.* 210, 656–666. doi: 10.1093/infdis/jiu158
- Verma, S., Mandal, A., Ansari, M., Kumar, A., Abhishek, K., Ghosh, A. K., et al. (2018). Leishmania donovani Inhibitor of Serine Peptidases 2 Mediated Inhibition of Lectin Pathway and Upregulation of C5aR Signaling Promote Parasite Survival inside Host. *Front. Immunol.* 9, 63. doi: 10.3389/fimmu.2018.00063
- Vinet, A. F., Fukuda, M., and Descoteaux, A. (2008). The Exocytosis Regulator Synaptotagmin V Controls Phagocytosis in Macrophages. *J. Immunol.* 181 (8), 5289–5295. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5289
- Vinet, A. F., Fukuda, M., Turco, S. J., and Descoteaux, A. (2009). The Leishmania Donovanii Lipophosphoglycan Excludes the Vesicular Proton-ATPase From Phagosomes by Impairing the Recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 5 (10). doi: 10.1371/journal.ppat.1000628
- Vinet, A. F., Jananji, S., Turco, S. J., Fukuda, M., and Descoteaux, A. (2011). Exclusion of Synaptotagmin V at the Phagocytic Cup by Leishmania Donovanii Lipophosphoglycan Results in Decreased Promastigote Internalization. *Microbiology* 157 (9), 2619–2628. doi: 10.1099/mic.0.050252-0

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Quintela-Carvalho, Goicochea, Mançur-Santos, Viana, Luz, Dias, Lázaro-Souza, Suarez, de Oliveira, Saraiva, Brodskyn, Veras, de Menezes, Andrade, Lima, Descoteaux and Borges. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.