



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA NA AMAZÔNIA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE ENDOCITOSE DE DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* EM MACRÓFAGOS E FIBROBLASTOS MURINOS**

ADENIELE LOPES DA CRUZ CARNEIRO

BELÉM

2023

ADENIELE LOPES DA CRUZ CARNEIRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE ENDOCITOSE DE DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* EM MACRÓFAGOS E FIBROBLASTOS MURINOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia. Orientador: Prof. Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias.

BELÉM

2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UEPA / SIBIUEPA

Carneiro, Adeniele Lopes da Cruz.

Avaliação *in vitro* do processo de endocitose de diferentes espécies de *Leishmania* em macrófagos e fibroblastos murinos / Adeniele Lopes da Cruz Carneiro. – Belém-Pa: UEPA; IEC 2023.

75f.

Orientadora: Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias

Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária da Amazônia)– Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Amazônia. Universidade do Estado do Pará, Belém, 2023.

1. Leishmanioses. 2. Ultraestrutura. 3. Endocitose 4. Fibroblastos. I. Farias, Ana Paula Drummond Rodrigues de, orient. II. Instituto Evandro Chagas. III. Universidade do Estado do Pará. IV. Título.

CDD 22. ed. 616.9364

ADENIELE LOPES DA CRUZ CARNEIRO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DE ENDOCITOSE DE DIFERENTES
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* EM MACRÓFAGOS E FIBROBLASTOS MURINOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária na Amazônia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária na Amazônia.

Orientador:

Prof. Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias
Laboratório de Microscopia Eletrônica, IEC-BELÉM

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silvia Helena Marques da Silva
Instituto Evandro Chagas, IEC-ANANINDEUA.

Prof. Dr. José Antonio Picanço Diniz Junior
Instituto Evandro Chagas, IEC-BELÉM

Profa. Dra. Lienne Silveira Moraes
Universidade Federal do Pará, UFPA.

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira (Suplente)
Instituto Evandro Chagas, IEC-ANANINDEUA

BELÉM, 27 DE SETEMBRO DE 2023.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE.....	10
1.2	BIOLOGIA DO PARASITO.....	13
1.2.1	Classificação	13
1.2.2	Morfologia	13
1.2.3	Ciclo de Vida	15
1.3	PASSOS INICIAIS DA INFECÇÃO.....	16
1.3.1	Exposição do parasito ao microambiente da pele	16
1.3.2	Interação parasito - macrófagos	17
1.3.3	Interação parasito - fibroblastos	18
1.4	ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS.....	20
1.4.1	Mecanismos de Endocitose	20
1.4.2	Sobrevivência da <i>Leishmania</i> em células hospedeiras	23
2.	JUSTIFICATIVA.....	25
3.	OBJETIVOS.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.1.1	Objetivos específicos	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	28
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.4	CULTIVO DE MACRÓFAGOS RAW 246.7 E FIBROBLASTOS 3T3.....	29
4.5	PROCESSO DE INTERAÇÃO ENTRE PARASITOS E CÉLULAS HOSPEDEIRAS.....	30
4.6	ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA INICIAL E TARDIO POR MICROSCÓPIO CONFOCAL.....	30
4.7	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ADESÃO E INFECÇÃO.....	31
4.9	DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO.....	32
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5.	RESULTADOS.....	33

5.1	ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA INICIAL POR MICROSCÓPIO CONFOCAL.....	33
5.2	ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA TARDIO POR MICROSCÓPIO CONFOCAL.....	39
5.2	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ADESÃO E INFECÇÃO	44
5.4	DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO	53
6.	DISCUSSÃO	55
7.	CONCLUSÃO.....	63
8.	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2020.....	10
Figura 2 - Principais formas de <i>Leishmania</i> spp.....	14
Figura 3- Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i>.....	16
Figura 4 - Desenho esquemático de fibroblastos	19
Figura 5- Vias endocíticas nas células de mamíferos	21
Figura 6- Representação esquemática da formação de lamelipódios e filopódios emitidos pela célula.....	23
Figura 7- Delineamento experimental dos métodos que foram desenvolvidos durante o projeto.....	28
Figura 8- Representação esquemática do processo metodológico do cultivo das células hospedeiras.....	30
Figura 9 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempo de 1 hora de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	34
Figura 10 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempos de 3 e 5 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>	36
Figura 11 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempos de 18 e 24 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	38
Figura 12 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempo de 1 hora de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>	39
Figura 13 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempos de 3 e 5 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	41
Figura 14 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempo de 18 e 24 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	43
Figura 15 – Índice de adesão e infecção em macrófagos/fibroblastos infectados com <i>Leishmania</i>.....	46
Figura 16- Análise ultraestrutural após 1 hora de interação de macrófagos ou fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	48
Figura 17 - Análise ultraestrutural após 3 horas de interação de macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	49
Figura 18 - Análise ultraestrutural de 5 horas de interação de macrófagos/fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	50

Figura 19 - Análise ultraestrutural após 18 horas de interação de macrófagos ou fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	51
Figura 20 - Análise ultraestrutural após 24 horas de interação de macrófagos ou fibroblastos e <i>Leishmania</i>.....	52
Figura 21 - Dosagem de citocinas nos tempos de 1, 3, 5, 18 e 24 horas de interação.....	54

RESUMO

As leishmanioses compõem um grupo de antroponozoonoses transmitidas a seres humanos e a outros mamíferos por vetores flebotomíneos e são consideradas doenças tropicais negligenciadas. Para adentrar, estabelecer a infecção e sobrevivência nas células hospedeiras, o parasito, perpassa por um processo que envolve o citoesqueleto de actina das células e mecanismos de endocitose com a formação de endossomos iniciais e tardios/lisossomos, marcados pela presença de Rab5 e LAMP1, respectivamente, sendo capaz de modificar esses mecanismos, como já visto por alguns estudos. Além disso, os níveis de citocinas e óxido nítrico expressos pelas células são importantes nesse processo de estabelecimento da infecção. Embora os macrófagos sejam considerados células hospedeiras mais importantes durante a infecção para os parasitos, os fibroblastos também podem ser células hospedeiras para *Leishmania*. Nesse sentido, nosso estudo objetivou avaliar os mecanismos de endocitose de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em macrófagos e fibroblastos murinos através da utilização da microscopia de varredura (para observação da ultraestrutura), microscopia de fluorescência (observação dos filamentos actina, endossomos iniciais Rab5a e endossomos tardios LAMP1) e microscopia de campo claro (contagem de parasitos aderidos) para estudar a interação entre as células em diferentes períodos (1h, 3h, 5h, 18h e 24h). Observamos o recrutamento de Rab5 em macrófagos para ambas as espécies de *Leishmania* desde 1 hora, em fibroblastos em 18 horas para *L. amazonensis* e em 24 horas para *L. braziliensis*. A formação de vacúolos parasitóforos (VPs) foi observada em macrófagos com *L. amazonensis* a partir de 1 hora, em macrófagos com *L. braziliensis* a partir de 3 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* a formação de VPs se deu a partir de 18 horas e se manteve em 24 horas. Houve maior número de parasitos aderidos das duas espécies de *Leishmania* em macrófagos nos tempos de 1, 3 e 5 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* em 1 hora, e em fibroblastos com *L. amazonensis* em 24 horas. O índice de infecção em macrófagos para ambas as espécies foi em 1, 3 e 5 horas. O índice de infecção em fibroblastos foi maior em 24 horas, também para as duas espécies de *Leishmania*. Pôde-se observar ultraestruturalmente as projeções membranares, como filópodios, lamelipódios e *ruffles* associadas ao processo de fagocitose e macropinocitose em fibroblastos. Durante o processo de infecção houve a produção de importantes citocinas, onde se destacam: maior produção de IL-6 em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas (potencialização resposta pró-inflamatória); maior produção de IL-17A em macrófagos com *L. braziliensis* em 3 horas e também em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas (associado com a progressão da doença e alguns processos inflamatórios); produção de IFN- γ em macrófagos com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em 1 hora e TNF em macrófagos com *L. braziliensis* em 18 e 24 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas houve maior produção de TNF (associado à potencialização da resposta imune inflamatória). Em suma, conclui-se que o processo inicial de infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em células fagocíticas profissionais (macrófagos) e células residentes (fibroblastos), são distintas podendo remodelar sua entrada e persistência nas diferentes células hospedeiras, e que apesar de não ser uma célula não fagocítica profissional, os fibroblastos são potenciais hospedeiros.

Palavras-chave: Leishmanioses; ultraestrutura; endocitose; fibroblastos.

ABSTRACT

Leishmaniasis makes up a group of anthroponoses transmitted to humans and other mammals by sandfly vectors and are considered neglected tropical diseases. To enter, establish infection and survival in host cells, the parasite goes through a process that involves the cells' actin cytoskeleton and endocytosis mechanisms with the formation of early and late endosomes/lysosomes, marked by the presence of Rab5 and LAMP1, respectively, being able to modify these mechanisms, as already seen in some studies. Furthermore, the levels of cytokines and nitric oxide expressed by cells are important in this process of establishing infection. Although macrophages are considered the most important host cells during infection for parasites, fibroblasts can also be host cells for *Leishmania*. In this sense, our study aimed to evaluate the mechanisms of endocytosis of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in macrophages and murine fibroblasts using scanning microscopy (to observe the ultrastructure), fluorescence microscopy (observation of actin filaments, Rab5a early endosomes and LAMP1 late endosomes) and bright field microscopy (counting attached parasites) to study the interaction between cells at different periods (1h, 3h, 5h, 18h and 24h). We observed the recruitment of Rab5 in macrophages for both *Leishmania* species from 1 hour, in fibroblasts in 18 hours for *L. amazonensis* and in 24 hours for *L. braziliensis*. The formation of parasitic vacuoles (PVs) was observed in macrophages with *L. amazonensis* from 1 hour onwards, in macrophages with *L. braziliensis* from 3 hours onwards. In fibroblasts with *L. braziliensis*, the formation of VPs began after 18 hours and was maintained for 24 hours. There was a greater number of attached parasites of the two *Leishmania* species in macrophages at 1, 3 and 5 hours. In fibroblasts with *L. braziliensis* in 1 hour, and in fibroblasts with *L. amazonensis* in 24 hours. The infection index in macrophages for both species was at 1, 3 and 5 hours. The infection rate in fibroblasts was higher at 24 hours, also for the two *Leishmania* species. It was possible to ultrastructurally observe membrane projections, such as filopodia, lamellipodia and ruffles associated with the process of phagocytosis and macropinocytosis in fibroblasts. During the infection process, important cytokines were produced, including: greater production of IL-6 in fibroblasts with *L. braziliensis* within 18 hours (potentiating pro-inflammatory response); greater production of IL-17A in macrophages with *L. braziliensis* in 3 hours and also in fibroblasts with *L. braziliensis* in 18 hours (associated with disease progression and some inflammatory processes); production of IFN- γ in macrophages with *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in 1 hour and TNF in macrophages with *L. braziliensis* in 18 and 24 hours. In fibroblasts with *L. braziliensis*, within 18 hours there was greater production of TNF (associated with the potentiation of the inflammatory immune response). In short, it is concluded that the initial process of infection by *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in professional phagocytic cells (macrophages) and resident cells (fibroblasts) are distinct and can remodel their entry and persistence in different host cells, and that despite not being a professional non-phagocytic cell, fibroblasts are potential hosts.

Palavras-chave: Leishmaniasis; ultrastructure; endocytosis; fibroblasts.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A LEISHMANIOSE

As leishmanioses compõem um grupo de doenças infecto-parasitárias transmitidas a seres humanos e a outros mamíferos por insetos vetores pertencentes a família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, comumente conhecido como flebotomíneo (Maroli *et al.*, 2013); ao redor do mundo está entre as principais doenças tropicais negligenciadas em termos de mortalidade e morbidade. Na Amazônia há um extenso número de focos de leishmaniose e uma diversidade de reservatórios de mamíferos, além de variadas espécies de vetores devido a riqueza e abundância do ambiente (Alvar *et al.*, 2012).

Segundo a organização mundial da saúde, em 2018, 92 países ou territórios foram considerados endêmicos para Leishmaniose Cutânea e 83 países para Leishmaniose Visceral respectivamente. Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob risco de infecção e estima-se que 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC ocorram anualmente no mundo (Who, 2023).

Nos países Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Líbia, Paquistão, República Árabe Síria e Tunísia ocorreram mais de 87% dos casos de LC em 2019. Já em 2020, foram registrados 16.056 casos de LC apenas no Brasil (Figura 1) (WHO, 2023).

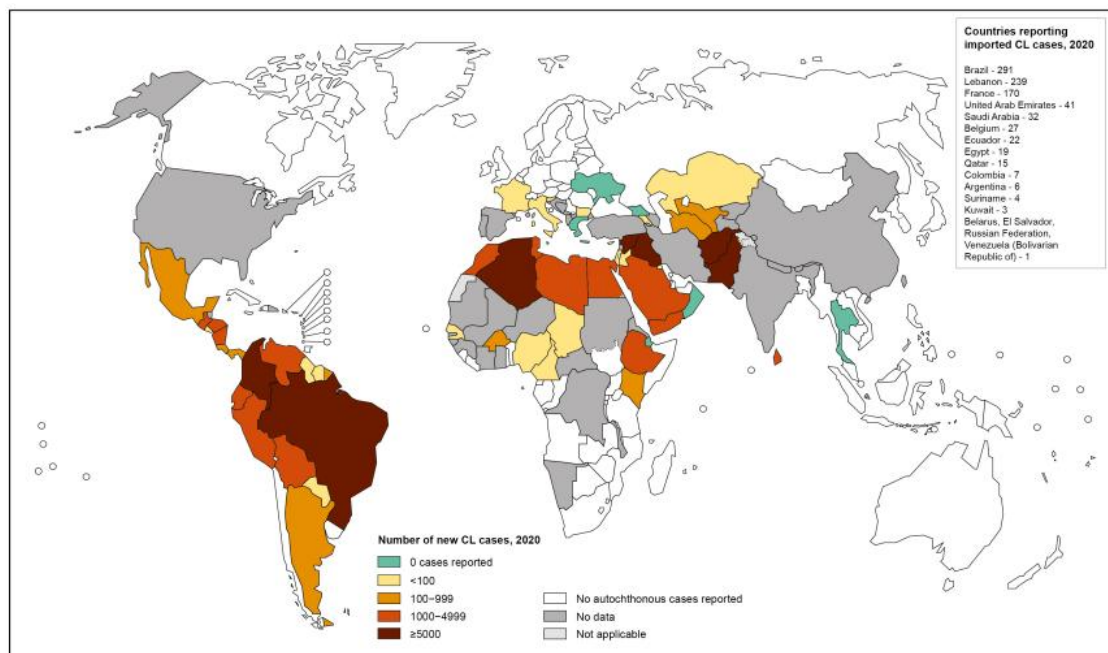


Figura 1 – Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2020. Fonte: World Health Organization – WHO, 2023.

Atualmente, existem 18 espécies diferentes de *Leishmania* descritas como patogênicas para humanos (Akhoundi *et al.*, 2016; Espinosa *et al.*, 2016). Embora as diferentes espécies de *Leishmania* sejam morfológicamente muito semelhantes, elas causam duas principais formas clínicas: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT) (Steverding *et al.*, 2017).

A LV é a forma mais grave da doença podendo ocasionar a morte se não tratada e consiste em uma infecção generalizada acometendo baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Who, 2020), as quais dependem da espécie do parasito. Dessa forma, algumas espécies são responsáveis por causar lesões que dependem da interação com perfil imunogenético do hospedeiro configurando os diferentes aspectos clínicos da doença (Pires *et al.*, 2012; Muxel *et al.*, 2018).

A LT é subdivida em diferentes formas clínicas, que são determinadas pela característica do parasito, do hospedeiro e da biologia do vetor, são elas: **a.** Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), **b.** Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica (LCDA), **c.** Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD) e **d.** Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (Akhoundi *et al.*, 2016; Burza *et al.*, 2018).

A LCL gera uma resposta imune do hospedeiro que se caracteriza por uma resposta do tipo celular mais modulada, com predominância de citocinas do tipo Th1, como IFN-gama, TNF-alfa e IL-12, havendo a presença de lesões únicas ou em pequenas quantidades na pele, representadas por ulcerações, geralmente indolores, com bordas delimitadas e elevadas, com fundo granuloso e avermelhado. A LCL pode ser causada por todas as espécies de *Leishmania* que causam as formas tegumentares e sua cura tende a ser espontânea (Brasil, 2017).

A LCDA, por outro lado, se caracteriza por gerar uma resposta imune maior do hospedeiro de um polo celular de hipossensibilidade, com uma maior tendência à resposta do tipo Th2, com a expressão de níveis mais elevados de IL-4 e menores níveis de INF-gama. Os parasitos do subgênero *Leishmania* são os causadores dessa forma anérgica, especialmente a espécie *L. (L.) amazonensis* no Brasil. Este perfil é caracterizado pela ocorrência de lesões nodulares disseminadas por todo o corpo, com a presença de infiltrado na pele, em que numerosos nódulos, pápulas, tubérculos e placas infiltradas podem surgir, predominando nas extremidades do corpo e que raramente se tornam ulceradas (Silveira *et al.*, 2004).

O perfil apresentado pela LD é caracterizado pela diminuição de resposta CD4 Th1 periférica, que permite a disseminação do parasito. Suas manifestações clínicas apresentam mais de 10 lesões cutâneas polimórficas distribuídas, onde aparecem em mais que duas partes não próximas do corpo, envolvendo, freqüentemente, a mucosa nasal. Essas lesões podem ser acneiformes, nódulos, pápulas inflamatórias, e úlceras, com raros casos de lesões vegetativas e verrucosas. O acometimento da mucosa nasal, a ocorrência de inflamação superficial sem ulceração é comum. Nas Américas, a espécie *L. (V.) braziliensis* é a responsável por causar a maioria dos casos de LD documentados (Machado *et al.*, 2019).

Na LMC as citocinas do tipo I, como IFN-gama e TNF-alfa são produzidas em níveis mais elevados que na LCL, desse modo, a inflamação gerada é considerada descontrolada e exacerbada (Strazzulla *et al.*, 2013). Os sintomas ocorrentes desta forma são: obstrução nasal, epistaxe, rinorreia e prurido nasal, e em alguns casos, podem ocorrer manifestações mais severas como ulceração, infiltração e perfuração nasal, além de deformidade nasal. A mucosa oral e o palato também podem ser afetados (Guerra *et al.*, 2011; Muvdi-Arenas e Ovalle-Bracho, 2019). A principal espécie envolvida na LMC é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas Leishmanioses do Novo Mundo, contudo, as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* também podem causar a forma mucosa (Goto e Lindoso, 2012).

Tendo em vista, o amplo espectro clínico da Leishmaniose, é possível observá-lo como um dos potenciais problemas de saúde pública no mundo e está comumente relacionada à pobreza e às precárias condições de moradia (Okwor e Uzonna, 2016). Sabe-se que existem tratamentos para essas doenças, porém, são baseados em quimioterápicos que apresentam elevado custo, efeitos adversos significativos e que tem apresentado resistência (Taslimi *et al.*, 2016). Por essa razão, as Leishmanioses com suas manifestações dermatológicas necessitam de atenção por parte da saúde pública devido aos elevados índices de internações por infecção e óbitos, sendo de suma importância mais estudos voltados à compreensão da patogenia dessas doenças para que melhores estratégias de controle e combate possam ser postas em prática.

1.2 BIOLOGIA DO PARASITO

1.2.1 Classificação

Aproximadamente, 53 espécies do gênero *Leishmania* já foram descritas, sendo reconhecidas 31 espécies capazes de infectar mamíferos e 20 espécies que podem causar patologias em humanos (Akhoundi *et al.*, 2016). Os parasitos flagelados que causam as Leishmanioses pertencem ao gênero *Leishmania* (Herrera *et al.*, 2020), que pertence ao filo Euglenozoa, família *Trypanosomatidae* e ordem *Kinetoplastida* (Maurício, 2018).

Os importantes subgêneros do gênero *Leishmania* com ênfase para a medicina são *Leishmania* e *Viannia*, pois possuem essa capacidade de infectar humanos. As espécies que compõem o subgênero *Leishmania* causam a Leishmaniose Visceral (LV) tendo como agentes etiológicos *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e *L. (L.) donovani* e a Leishmaniose Cutânea (LC) tendo como agentes etiológicos *Leishmania (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) amazonensis*. Compondo o subgênero *Viannia*, as espécies estão presentes nas Américas tropicais e subtropicais e podem causar LC e LMC, como *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* e as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi* causadoras apenas de LC (Akhoundi *et al.*, 2016; Ceccarelli *et al.*, 2020).

1.2.2 Morfologia

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório digenético, apresentando um ciclo de vida heteroxênico, envolvendo duas formas evolutivas: promastigota, forma alongada com flagelo externalizado, encontrada dentro do inseto vetor e amastigota, forma arredondada e possui o flagelo internalizado, são formas de resistência encontradas em vários tipos celulares, e principalmente nas suas células alvo, os macrófagos em hospedeiros vertebrados (mamíferos) (revisado por Teixeira *et al.*, 2013; Novo *et al.*, 2016).

A forma evolutiva promastigota encontrada no trato intestinal do vetor, com tamanho de 5-15 µm de comprimento, é a forma flagelada e móvel, emergindo da porção anterior do corpo do parasito (Figura 2B e 2D), que através de um complexo processo de desenvolvimento, torna-se infectante. A forma evolutiva amastigota vive no interior de células fagocíticas mononucleares (principalmente macrófagos) em compartimentos com pH ácido, denominados vacúolos parasitóforos, que apresentam tamanho de 2,5-5,0 µm de diâmetro,

formato esférico ou oval e são imóveis (Figura 2A e 2C) (Anversa *et al.*, 2017; Kelly *et al.*, 2020).

Apesar de suas diferenças, ambas as formas possuem arquitetura celular conservada, contendo em seu interior um núcleo, que anteriormente a este, está localizado o cinetoplasto (massa de DNA mitocondrial condensada, ligada ao corpo basal onde se estende o flagelo), além de apresentarem aparelho de Golgi e mitocôndria, a bolsa flagelar presente, corresponde à uma invaginação da membrana celular, sendo o local de realização de endocitose e exocitose (Figura 2A e 2B) (Sunter e Gull, 2017).

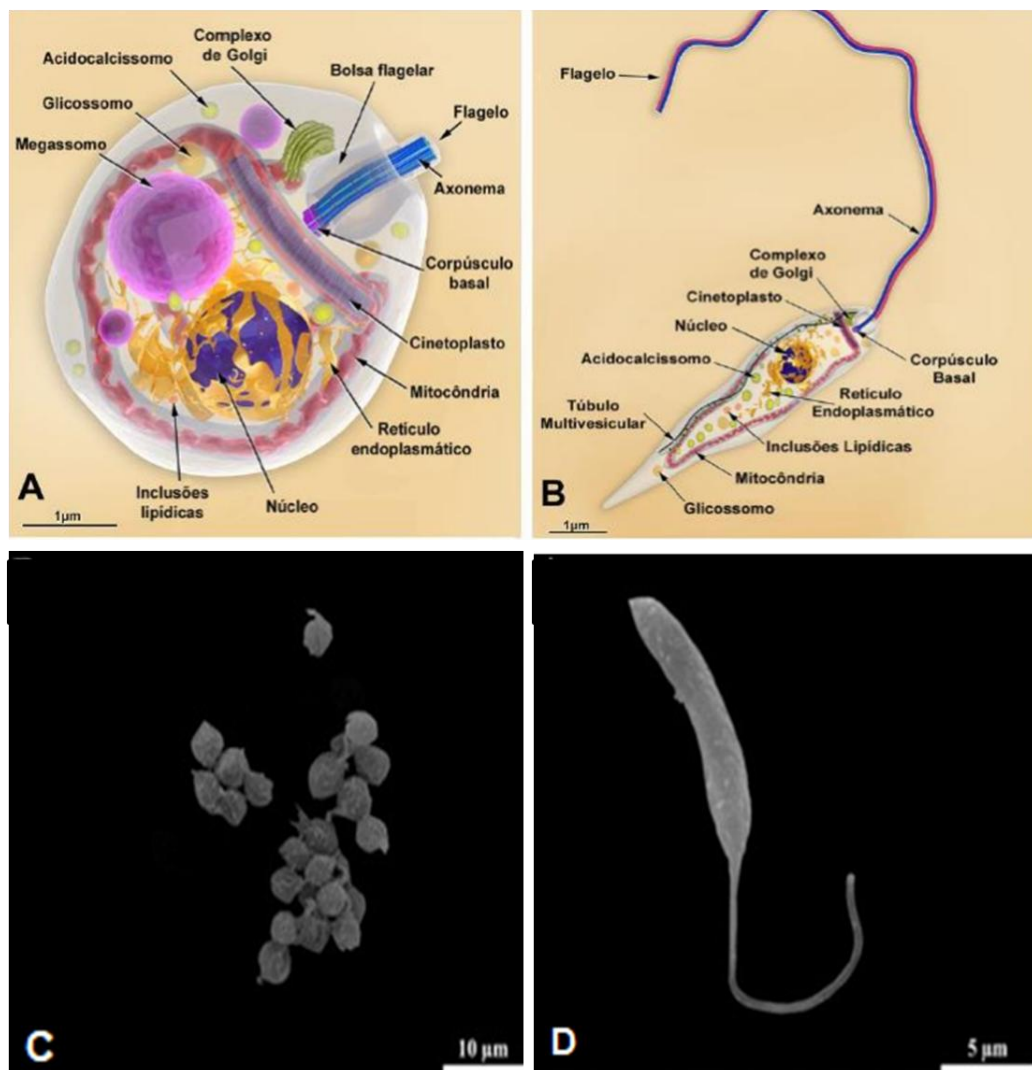


Figura 2 - Principais formas de *Leishmania* spp. Representação esquemática estrutural: (A) forma amastigota e (B) Forma promastigota. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013. (C e D) Imagem a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura (C) forma amastigota e (D) forma promastigota. Adaptado a partir da revisão de Holanda *et al.*, 2019.

1.2.3 Ciclo de Vida

O ciclo da *Leishmania* alterna entre os meios extracelular (promastigotas) nos vetores, presentes em diferentes espécies de flebotomíneos que pertencem ao gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha, cangalha, birigui, tatuquira e intracelular (amastigotas) em macrófagos do hospedeiro mamífero (Secundino *et al.*, 2011; Kohl *et al.*, 2018).

No vetor, o ciclo tem início quando o vetor flebotomíneo, no momento do repasto sanguíneo, ingere macrófagos infectados com amastigotas. Devido o aumento do pH e diminuição de temperatura os parasitos diferenciam-se em promastigotas procíclicas. Por fim, os parasitos se mantêm no trato digestivo do flebotomíneo fêmea onde passam por um processo denominado metaciclogênese e originam promastigotas metacíclicas, que possuem capacidade de infectar células de hospedeiros mamíferos. Os parasitos, então, se acumulam na porção anterior do trato digestivo do vetor e durante o repasto sanguíneo, são inoculados na derme do hospedeiro por regurgitação (revisado por Lievin-Le Moal & Loiseau, 2015; Séguin e Descoteaux, 2016).

Na região da inoculação do parasito no hospedeiro, ocorre, inicialmente, a indução do infiltrado de neutrófilos e o rápido recrutamento de macrófagos, assim as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos, mas também por outros tipos celulares, como células de Langerhans e fibroblastos. Os parasitos se aderem às células do hospedeiro por meio de diversas moléculas expressas na sua superfície, como por exemplo, o lipofosfoglicano (LPG) e, em seguida, são internalizados pelos fagócitos e se diferenciam em amastigotas, as quais se multiplicam intensamente e rompem a membrana da célula hospedeira, liberando os parasitos no tecido, podendo invadir novas células ou serem ingeridas por novos vetores durante o repasto sanguíneo (Figura 3) (revisado por Teixeira *et al.*, 2013).

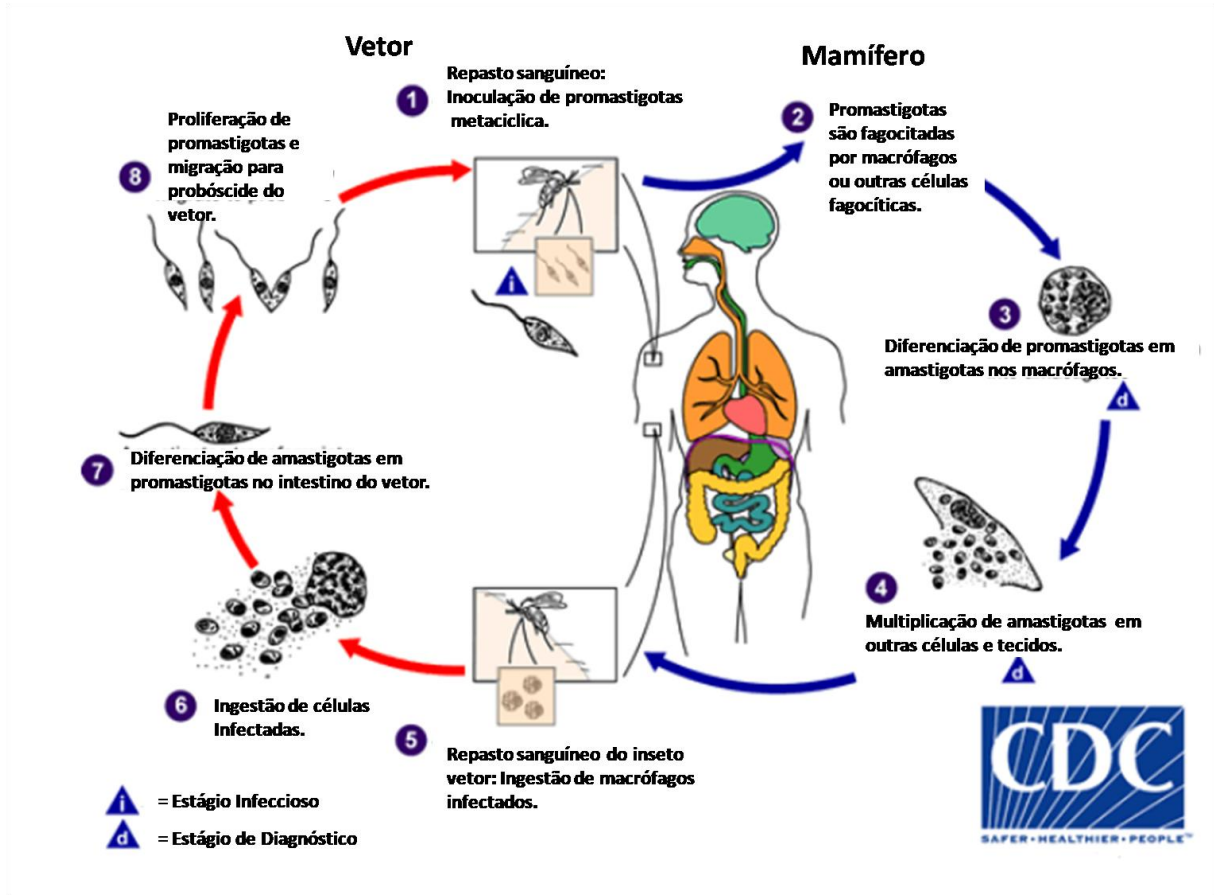


Figura 3- Ciclo evolutivo da *Leishmania*. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention - CDC, 2023.

1.3 PASSOS INICIAIS DA INFECÇÃO

1.3.1 Exposição do parasito ao microambiente da pele

Para que ocorra o sucesso da infecção, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, o protozoário *Leishmania* necessita de diversas moléculas indispensáveis para que este seja capaz de atravessar as barreiras que dificultam o processo de infecção, como a pele, no hospedeiro mamífero, ou enzimas digestivas, no hospedeiro invertebrado. No momento da inoculação do parasito na derme do hospedeiro, a promastigota é exposta ao microambiente da pele, o qual é composto principalmente por proteínas estruturais organizadas em uma rede fibrilar, denominada de matriz extracelular (MEC). Uma vez exposta, a promastigota é capaz de migrar pela MEC danificada e interagir com as moléculas presentes neste microambiente, tais como fibronectina, laminina e colágeno I, até alcançar as células de defesa (revisado por De Menezes *et al.*, 2016).

A *Leishmania* é capaz de produzir proteases capazes de destruir tanto proteínas da MEC quanto as barreiras da derme para que haja a propagação da infecção até o alcance da célula alvo (Chang, et al., 2002). A interação de moléculas do parasito com proteínas da MEC pode ser importante para patogênese da infecção (Lira et al., 1997). A interação do parasito com componentes da MEC pode estar envolvida com a sobrevivência intracelular da *Leishmania*, como sugerido por um estudo que verificou que a degradação de proteínas da MEC, como fibronectina por *Leishmania spp.* através de proteases, pode desestabilizar essa estrutura propiciando a dispersão dos parasitos e os fragmentos da proteína gerados podem afetar o estado de ativação de macrófagos infectados, contribuindo assim, para a sobrevivência intracelular do protozoário (Kulkarni *et al.*, 2008).

Outro estudo demonstrou que a presença de outros tipos de metaloproteinases (MMP) presentes durante a infecção, podem intensificar a migração celular, tornando possível o desenvolvimento de formas clínicas como leishmaniose mucocutânea e leishmaniose cutânea difusa devido à alteração da migração de células infectadas (Maretti-Mira *et al.*, 2010). Contudo, pouco se sabe sobre o processo inicial de interação do protozoário *Leishmania* e a MEC do hospedeiro, uma vez que o foco dos estudos descritos na literatura descreve, principalmente, as alterações amplas da MEC durante infecções experimentais. (Silva-Almeida *et al.*, 2012).

1.3.2 Interação parasito - macrófagos

Os macrófagos são um dos principais fagócitos do sistema imunológico e apresentam diferentes funções como: fagocitose de células apoptóticas e patógenos, atuam tanto na resposta imunológica inata quanto adaptativa. Os macrófagos são considerados células fagocíticas profissionais, e o processo de fagocitose deste com a *Leishmania* é bem amplamente abordado na literatura (Classen *et al.*, 2009; Abbas *et al.*, 2011; Muraille *et al.*, 2014).

Durante o processo de infecção, os macrófagos são as principais células-alvo do parasito e por serem fagócitos profissionais do sistema imunológico, a interação *Leishmania*-hospedeiro, pode acarretar diferentes respostas imunológicas, por exemplo, macrófagos polarizados para M1, expressam diferentes citocinas e quimiocinas, como IL-6, IL-12, TNF- α , IL-1 β , CXCL9, CXCL10, liberam NO e promovem uma resposta do tipo Th1, ocorrendo possível eliminação do patógeno intracelular, controlando a infecção. Enquanto, macrófagos polarizados para M2, liberam IL-10 e TGF- β , associadas com resposta imunossupressora,

suprimem Th1 e promovem a resposta Th2, relacionada à sobrevivência do parasito no interior do macrófago resultando na progressão da doença (revisado por Reza *et al.*, 2019; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018).

Em células fagocíticas profissionais, como os macrófagos, os endossomos formados logo após a internalização do parasito se fundem com o compartimento endossomal inicial adquirindo proteínas como Rab5 e EEA1 (Antígeno Endossomal Inicial 1). Posteriormente, esse vacúolo perde tais marcadores e se fundem com o compartimento endossomal tardio recebendo marcadores de lisossomos e endossomos tardios, como LAMP-1 (proteína de membrana associada a lisossomos) e proteases lisossomais, Rab7 e ATPase vacuolar (Courret *et al.*, 2002; Alberts *et al.*, 2010). Os compartimentos de endossomos têm participação no sistema imune, pois é o local onde alguns patógenos são destruídos por meio da fusão fagolisossomal. Entretanto, a *Leishmania* spp. tem a capacidade de subverter esse processo (Matheoud *et al.*, 2013).

1.3.3 Interação parasito - fibroblastos

Como mencionado, outras células são importantes para a infecção, tais como, os fibroblastos, que fazem parte do tecido conjuntivo, de origem mesenquimal, capazes de manter a homeostase da MEC em condições normais, realizando o depósito de colágeno e fibras elásticas, estando também envolvidos no processo de cicatrização tecidual (revisado por Zhi-Qiang *et al.*, 2019). A morfologia dessa célula é caracterizada por um citoplasma abundante, muitos prolongamentos, núcleo grande e ovóide, cromatina fina e nucléolo proeminente (Figura 4) (Junqueira e Carneiro, 2008; Albert *et al.*, 2010).

Apesar de não serem células fagocíticas profissionais, os fibroblastos parecem desempenhar um papel importante na infecção por *Leishmania*, podendo estar associada a uma forma de supressão da doença, resultando em um ambiente mais favorável que os macrófagos aos parasitos, permitindo que as amastigotas persistam no hospedeiro (Haldar *et al.*, 2020).

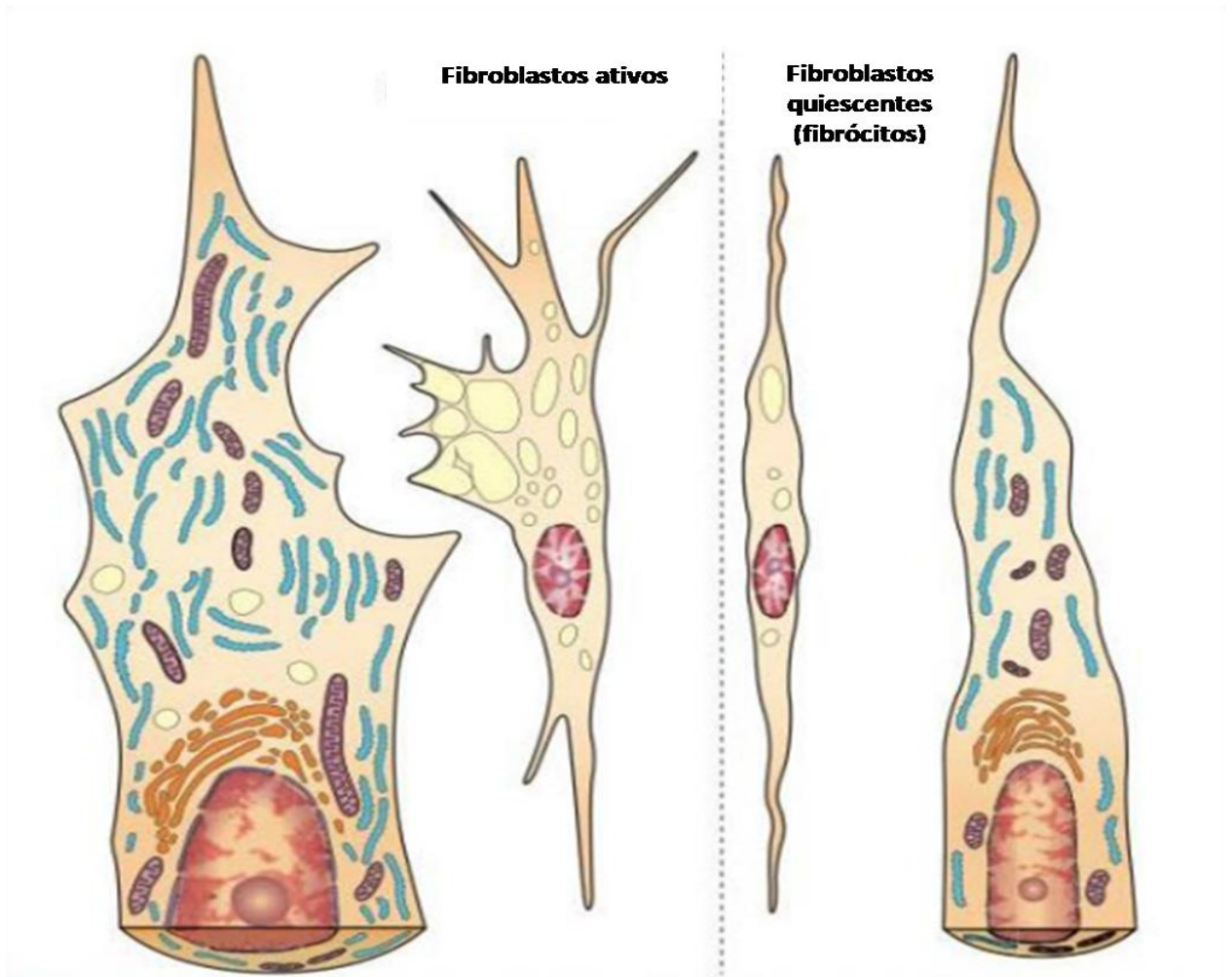


Figura 4 - Desenho esquemático de fibroblastos ativos (à esquerda) e fibroblastos quiescentes (à direita). Fibroblastos ativos são aqueles que produzem macromoléculas, são maiores e com mais projeções citoplasmáticas do que os fibrócitos. Fonte: Junqueira e Carneiro, 2008.

Um estudo sugeriu que uma baixa proporção das células mais abundantes da epiderme, os queratinócitos, internalizava os parasitos e que eram incapazes de sustentar a replicação destes em seu interior (Scorza *et al.*, 2017). Em contrapartida, os fibroblastos, células abundantes da derme, são capazes não só de internalizar as promastigotas metacíclicas, como também de abrigar a *Leishmania* conseguindo assumir a forma amastigota e se replicar em seu interior, como proposto por um estudo com fibroblastos embrionários de camundongos em interação com *L. amazonensis*, após 24 horas de infecção (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019).

Em outro estudo sobre a interação entre fibroblastos embrionários primários de camundongos e *L. major*, é sugerido que a maioria das células foi infectada após 12 horas de incubação, ocorrendo também o rearranjo do citoesqueleto de actina nas células infectadas e na infecção por *L. major* moléculas envolvidas na sinalização dos fibroblastos são moduladas, em que a gp63 do parasito parece regular proteínas sinalizadoras (Hallé *et al.*, 2009).

Entretanto, pouco se sabe sobre como ocorre a interação entre células não fagocíticas e o protozoário *Leishmania* durante a infecção e de que forma o microambiente no interior destas células contribuem para manutenção do parasito e/ou a progressão da infecção. Assim como os macrófagos, os fibroblastos parecem ter um potencial como hospedeiro do parasito, pois estão próximos aos locais onde o parasito inicia o processo inflamatório.

1.4 ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO NAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS

1.4.1 Mecanismos de Endocitose

O mecanismo de endocitose é um processo celular pelo qual, as células internalizam macromoléculas, proteínas de superfície, substâncias particuladas presentes no meio extracelular do material circundante a partir do surgimento, para o interior da célula. A membrana plasmática sofre uma alteração, resultando na formação de uma vesícula endocítica. Após a internalização de moléculas na vesícula, estas são transportadas por uma série de compartimentos túbulo-vesiculares pleiomórficos, genericamente denominados endossomos, participando, assim, da via endocítica (Ziello *et al.*, 2010).

Este processo é fundamental e envolve a captação de nutrientes da membrana lipídica, controle de receptores de superfície celular, sinalização, polarização, mitose e migração celular, e entrega de drogas. Sendo também utilizados por patógenos, que exploram as vias endocíticas, para mediar sua entrada nas células (Doherty e McMahon, 2009; Hinze e Boucrot, 2018).

Tendo em vista as diferentes vias endocíticas, o tipo de material contido no interior vesicular e os processos de internalização, pode-se determinar duas grandes categorias de endocitose: fagocitose (internalização de grandes partículas) e pinocitose. A pinocitose engloba quatro mecanismos básicos: I- macropinocitose, II- endocitose dependente de clatrina, III- endocitose dependente de cavéola e IV- endocitose independente de clatrina e cavéola (Figura 5) (Kornilova *et al.*, 2014; Khan e Steeg, 2021).

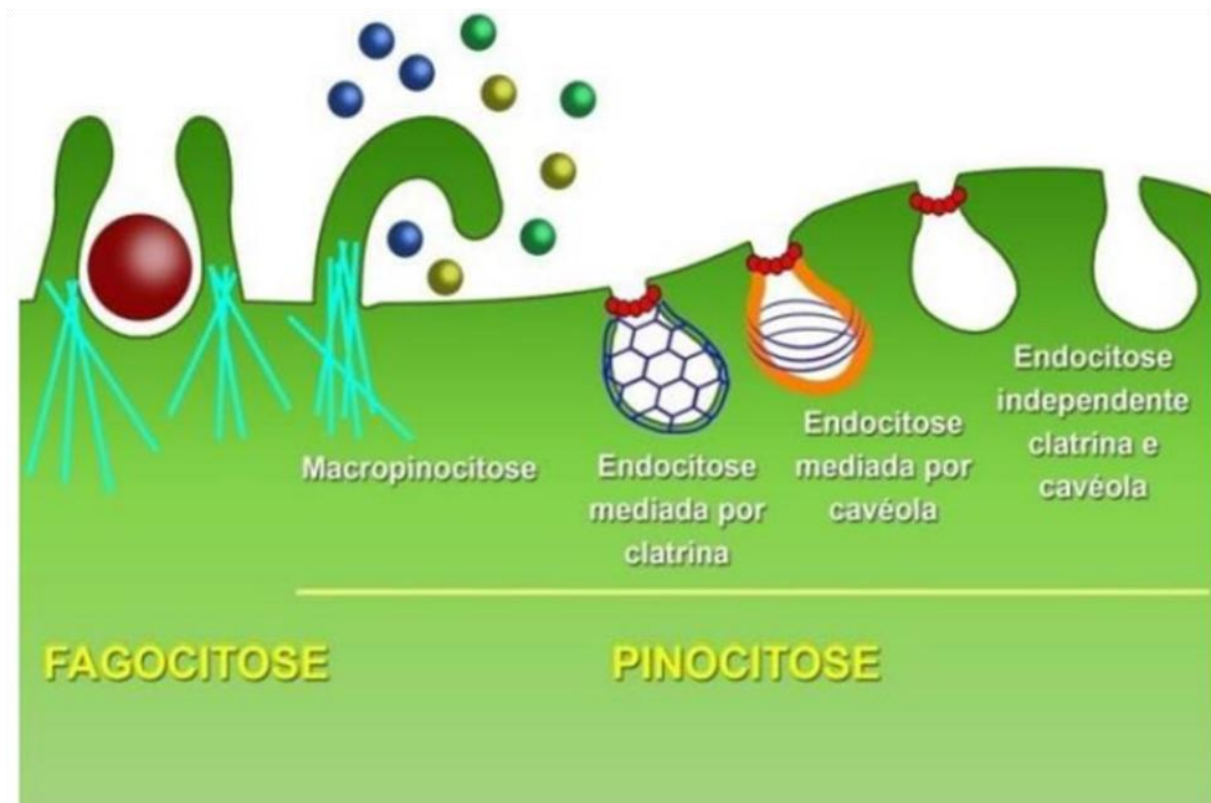


Figura 5- Vias endocíticas nas células de mamíferos. Fonte: Rubem, 2017.

A via endocítica da fagocitose se caracteriza por ser dependente de actina, na qual ocorre a internalização de partículas iguais ou maiores a $0,5 \mu\text{m}$ de diâmetro por células fagocíticas profissionais, como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, em compartimentos provenientes de invaginações da membrana plasmática, dando origem a largos vacúolos, denominada fagossomos. Esses fagossomos passarão por um processo de transformação através de uma cascata de eventos orquestrada de fusão e fissão que culminará na sua degradação (Levin *et al.*, 2015; Walpole e Gristein, 2020).

A via endocítica da pinocitose é um mecanismo em que são internalizados partículas ou fluidos, havendo a dobra da membrana para o interior da célula, em forma de uma pequena invaginação (Hartenstein e Martinez, 2020). Na macropinocitose, as vesículas formadas podem ter de 0,2 μm a 10 μm de diâmetro e formadas de maneira espontânea ou através da formação dos *ruffles* (Swanson, 2008). Os *ruffles* são protusões de membrana plasmática de células móveis, que formam grandes dobras que se assemelham a cortinas, sendo formadas a partir da polimerização de uma rede de filamentos de actina (Ridley, 1994). Essas protusões podem se apresentar como filopódios, que possuem formato semelhante a bastonetes, ou como lamelipódios, que apresentam forma fina e achatada (Figura 6) (Mylvaganam *et al.*, 2018).

Dentro do processo de endocitose, as proteínas Rab, pequenas GTPases, localizadas em compartimentos específicos da via endocítica e exocítica são capazes de regular as diferentes etapas de transporte vesicular intracelular. Dessa forma, a Rab5 é a proteína associada ao endossomo inicial, regulando os primeiros passos da endocitose a partir da membrana plasmática para os endossomas iniciais e é responsável pela maturação dos endossomos, controlando a seleção de proteína-carga desses compartimentos, regulando a motilidade e fusão dos endossomos e recrutando moléculas necessárias. O endossomo inicial passa, então, por um processo de transição para endossomo tardio, sendo esse mecanismo marcado pela “perda” do Rab5 e obtenção de Rab7 (Poteryaev *et al.*, 2010).

Nesse processo de maturação acompanhado de uma progressiva acidificação, o endossomo tardio, então, irá se fundir com lisossomos altamente ácidos, havendo a aquisição de hidrolases lisossomais e glicoproteínas como o LAMP1 (Podinovskaia e Spang, 2018), sendo o LAMP1 (proteína de membrana associada a lisossomos do tipo 1) constituinte da membrana do lisossomo (Chen *et al.*, 1985).

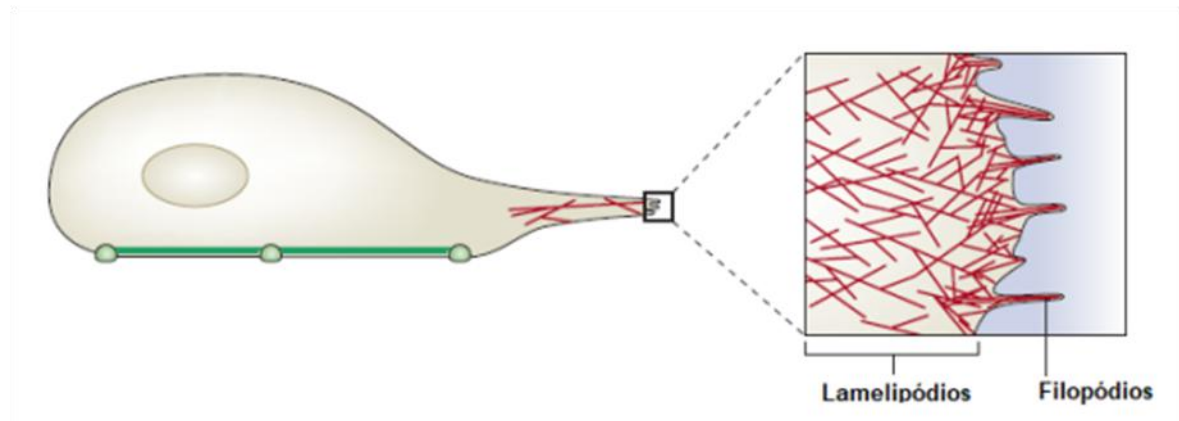


Figura 6- Representação esquemática da formação de lamelipódios e filopódios emitidos pela célula, em maior parte direcionado por polarização dos filamentos de actina (linhas vermelhas) Fonte: Adaptado de Matilla e Lappalainen, 2008.

1.4.2 Sobrevivência da *Leishmania* em células hospedeiras

A sobrevivência da *Leishmania* dentro dos macrófagos depende de sua resistência às condições adversas criadas pelo fagócito (alteração de pH, temperatura e estresse oxidativo). O parasito de *Leishmania* é capaz de modificar o ambiente hostil do fagolisossomo para garantir sua adaptação e sobrevivência, através da utilização de estratégias de evasão, que podem envolver a modulação de fatores relacionados ao processo de maturação do fagossomo e fusão com lisossomos. Dessa forma, para escapar do ambiente hostil do fagossoma, as promastigotas promovem o atraso da fusão do fagossomo e o lisossoma, retardando ou inibindo a maturação endossomal como observado pela expressão tardia de Rab7 e LAMP-1 (Olivier *et al.*, 2005; Podinovskaia e Descouteaux, 2015).

A *Leishmania amazonensis*, para diminuir o efeito leishmanicida do óxido nítrico (NO), regula a proteína LYST (*Lysosomal Trafficking regulator*) nas células dos mamíferos, tendo como resultado a formação de grandes vacúolos parasitóforos (VP) (Wilson *et al.*, 2008). Em outra análise de infecção por *L. donovani* em macrófagos humanos, foi observado que após 24 horas de infecção, ocorreu o recrutamento da Rab5a, uma isoforma de Rab5, para os VPs, de forma que o parasito pudesse residir em compartimentos endocíticos iniciais, bem como houve também a capacidade de inibição, em macrófagos infectados, de sua atividade proteolítica lisossomal (Verma *et al.*, 2017).

A inibição da maturação fagossomal e/ou atraso na fusão do fagossomo com lisossomo parece ser outra estratégia utilizada por parasitos de *Leishmania* para garantir sua sobrevivência intracelular (Desjardins e Descoteaux, 1997; Spath *et al.*, 2003; Gaur *et al.*, 2009). Em infecções por *L. donovani* em macrófagos J774, a expressão da molécula LPG está associada à prevenção da fusão do fagossomo com endossomo e maturação fagolisossomal, e as promastigotas que expressam essa molécula estariam contidas em compartimentos que não apresentaram LAMP1 (Desjardins e Descoteaux, 1997). Porém, a relação entre o LPG e a inibição da transformação fagolisossomal em infecções por *L. donovani* em macrófagos J774, em outro estudo, observou que a espécie não foi capaz de recrutar Rab7 mas obteve LAMP1 com baixa cinética (Scianimanico *et al.*, 1999).

Os mecanismos de sobrevivência de *Leishmania* spp. nos fibroblastos são pouco descritos. Embora os macrófagos sejam considerados como as células hospedeiras mais importantes durante a infecção para os parasitos, outros tipos celulares mostraram ser capazes de endocitar esses protozoários *in vitro* ou *in vivo*. Desse modo, os fibroblastos podem representar uma célula hospedeira importante no que diz respeito às recidivas da Leishmaniose. Apesar de estar bem definido que o sistema imune seja um dos principais responsáveis pela resolução da lesão causada pela infecção por *Leishmania*, não está bem claro como tais mecanismos permitem que os parasitas sobrevivam de forma latente no organismo (Bogdan *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2016).

Em um estudo, foi observado que ocorria a invasão de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fibroblastos dermais de cultura primária, sugerindo a participação do receptor de manose-fucose na invasão do parasito como ocorre em macrófagos, podendo haver a possibilidade de outros receptores estarem cooperando durante a infecção (Hespanhol *et al.*, 2005).

Contudo, o processo de invasão inicial do parasito em fibroblastos não está bem elucidado fazendo-se necessários mais estudos que descrevam o processo inicial de interação do parasito com estas células que não são fagócitos profissionais.

2. JUSTIFICATIVA

As LC e LV representam um sério problema de saúde pública em 98 países e três territórios nos cinco continentes onde a doença pode ser encontrada. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem mais de 220.000 casos de LC e 58.000 casos de LV por ano (Who, 2012). No Brasil, LC e LV são generalizados e podem ser encontrados não apenas em áreas rurais, mas também, em áreas urbanas, principalmente devido ao desmatamento e novos assentamentos (Alvar, 2012).

Dentre as espécies que causam a LC, a *Leishmania amazonensis* é responsável por parte considerável dos casos do Brasil, nas regiões norte e nordeste, sendo uma das principais espécies que causam todas as formas cutâneas, destacando a forma anérgica difusa da doença forma mais grave (revisado por Valdivia *et al.*, 2017; Silveira, 2019). A *Leishmania braziliensis*, por sua vez, é a espécie mais prevalente no Brasil (revisado por Brito *et al.*, 2018), responsável por causar, além das formas tegumentares citadas anteriormente, a forma clínica mais grave, a leishmaniose mucocutânea (revisado Silva *et al.*, 2018; Silveira, 2019).

Portanto, estudos tem buscado compreender o processo inicial de invasão da *Leishmania* no hospedeiro. O processo de entrada do parasito em macrófagos é bem descrito (Rodríguez *et al.*, 2006; Kumar *et al.* 2019), bem como o seu estabelecimento intracelular. Um estudo analisou a maturação fagossomal por diferentes cepas de *L. braziliensis* em macrófagos murinos derivados de medula óssea e verificaram que o LAMP-1 foi recrutado aos fagossomos de modo variável entre as cepas utilizadas no estudo, sugerindo que a modulação da biogênese fagolisossomal pode variar entre cepas (Vieira *et al.*, 2019).

Apesar dos macrófagos serem a principal célula hospedeira para esse protozoário, na infecção inicial, e devido os fibroblastos se apresentarem nas proximidades do local de inoculação da *Leishmania*, podem representar possíveis alvos do parasito, além de contribuir para sua disseminação (Hespanhol *et al.*, 2005). Entretanto, poucos são os estudos que visam compreender o processo de invasão da *Leishmania* em células não fagocíticas profissionais. Um estudo recente, utilizando *Leishmania amazonensis* e fibroblastos como modelo para análise, avaliou os mecanismos de entrada, a persistência e replicação do parasito nessas células. Os autores observaram que a *L. amazonensis* em fibroblastos, tal como ocorre em macrófagos, é capaz não só de sobreviver, como de se diferenciar em amastigota e se replicar em vacúolos fagolisossomais (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019).

Desse modo, apesar de descritos na literatura, principalmente no que diz respeito aos macrófagos, torna-se importante acrescentar informações acerca do processo inicial de infecção por *Leishmania* sp., sobretudo no processo de infecção com fibroblastos, pois, diversas questões ainda necessitam ser esclarecidas como: 1. As proteínas endossomais descritas na interação parasito-macrófono estão presentes na interação parasito-fibroblasto? 2. Em que momento há a formação do vacúolo parasitóforo em fibroblastos comparados aos macrófagos? 3. Como o parasito sobrevive no interior das células fagocíticas não profissionais?

Diante destas incógnitas, buscamos contribuir para melhor compreensão sobre o processo de endocitose dos parasitos nos diferentes tipos celulares (macrófagos e fibroblastos), a fim de desvendar e comparar de que forma o parasito sobrevive no interior destas células corroborando para ampliação do conhecimento no que diz respeito às recidivas da doença, avaliando os mecanismos de endocitose inicial e tardio de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, e se ambas as espécies, são capazes de modificar o processo de invasão em macrófagos e fibroblastos murinos de forma diferente. Portanto, este estudo torna-se importante para compreender o comportamento das promastigotas de *Leishmania* sp. na presença destas duas células, visando determinar seus papéis durante o processo de infecção das duas espécies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*) causadoras de diferentes formas clínicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os mecanismos de endocitose de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* em macrófagos e fibroblastos murinos.

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Determinar o índice de infecção de *Leishmania* sp. em macrófagos e fibroblastos murinos;
- b) Determinar o tempo de formação de endossoma inicial e tardio durante infecção por *Leishmania* sp. em macrófagos e fibroblastos murinos;
- c) Demonstrar os tipos de projeções de membrana compostos por filamentos de actina em macrófagos e fibroblastos murinos durante infecção por *Leishmania* sp.;
- d) Analisar ultraestruturalmente o padrão de formação de pseudópodes durante o processo de interação parasito-macrófago e parasito-fibroblasto.
- e) Quantificar a produção de óxido nítrico produzidos por macrófagos e fibroblastos murinos durante infecção por *Leishmania* sp.;
- f) Quantificar e demonstrar o perfil de citocinas produzidos por macrófagos e fibroblastos murinos durante infecção por *Leishmania* sp.;
- g) Determinar se ambas as espécies de *Leishmania*, são capazes de modificar o processo de invasão em macrófagos e fibroblastos murinos;
- h) Determinar o tempo para a formação do vacúolo parasitóforo em macrófagos e fibroblastos murinos infectados por *Leishmania* sp. por diferentes microscopias;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de um estudo experimental que envolve a utilização de linhagens celulares e não utilizar amostras humanas ou animais de laboratório, o projeto não precisou ser submetido aos respectivos comitês de ética em pesquisa.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

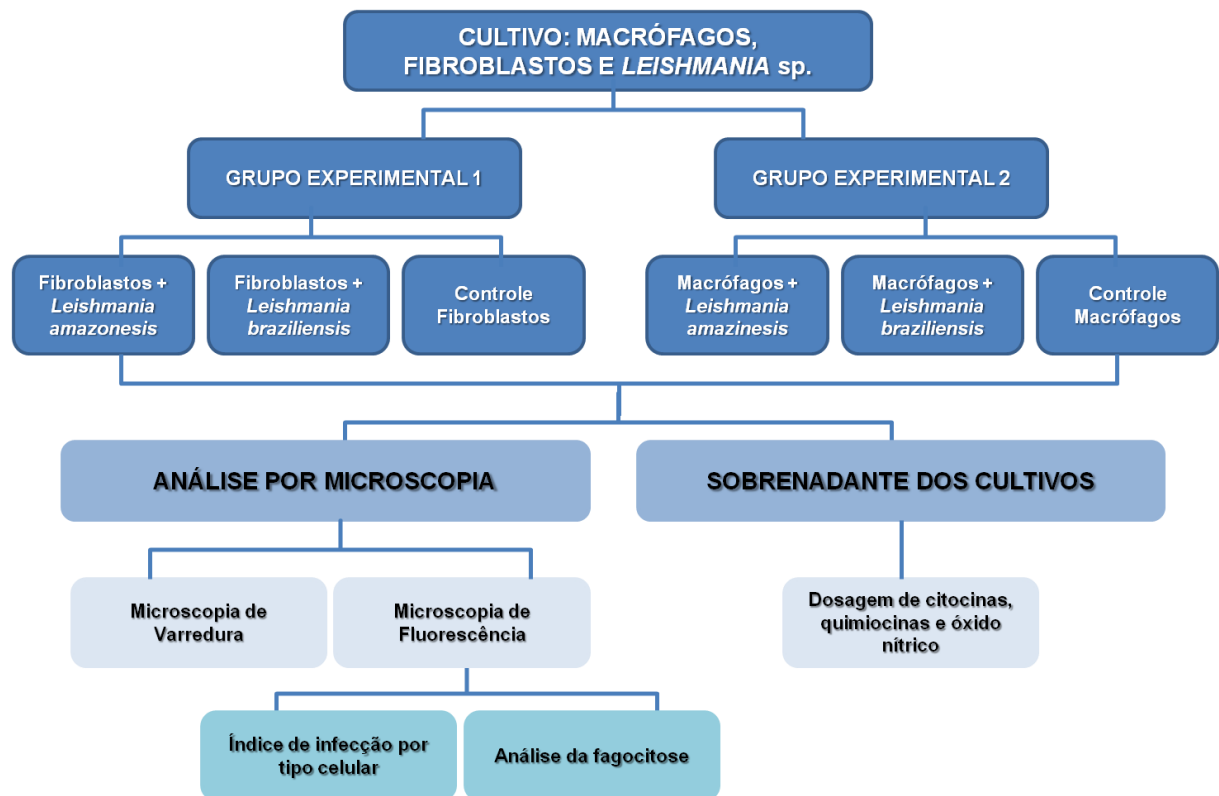


Figura 7- Delineamento experimental dos métodos que foram desenvolvidos durante o projeto.

4.3 CULTIVO, MANUTENÇÃO E UTILIZAÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/26361) e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/M17323) foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas do Laboratório de Leishmanioses "Prof. Dr. Ralph Lainson e gentilmente cedidas pelo pesquisador Fernando Silveira. Os parasitos foram mantidos em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado com soro bovino fetal (SBF) em estufa 27°C. O repique dos parasitos foi realizado a cada 7 dias de cultivo.

4.4 CULTIVO DE MACRÓFAGOS RAW 264.7 E FIBROBLASTOS 3T3

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram gentilmente cedidos pelo Banco de Células do Laboratório de Citogenômica e Mutagenese Ambiental (SEAMB) e os fibroblastos murinos da linhagem BALB/c 3T3, clone A31, provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ:0047). Ambas as células foram cultivadas em garrafas contendo meio de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de SBF até atingir aproximadamente 80% de confluência. A partir de então, os macrófagos foram lavados com solução fosfato-salina (PBS) estéril e submetidos à ação da tripsina para que fossem desprendidos da superfície da garrafa de cultura. Foram adicionados 0,05% de tripsina-EDTA, sendo incubados em estufa com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C por no máximo 3 minutos. Uma nova solução com meio DMEM suplementado com 10% de SBF foi adicionada para neutralizar a ação da tripsina, o conteúdo da garrafa foi transferido para tubo e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi, então, desprezado e as células sedimentadas ressuspensas em PBS estéril como etapa de lavagem, sendo novamente centrifugadas sob as mesmas condições anteriormente citadas. Posteriormente, foi desprezado o sobrenadante e as células ressuspensas em DMEM, sendo, em seguida, contadas em câmara de Neubauer e sua concentração ajustada para 1×10^5 células/poço.

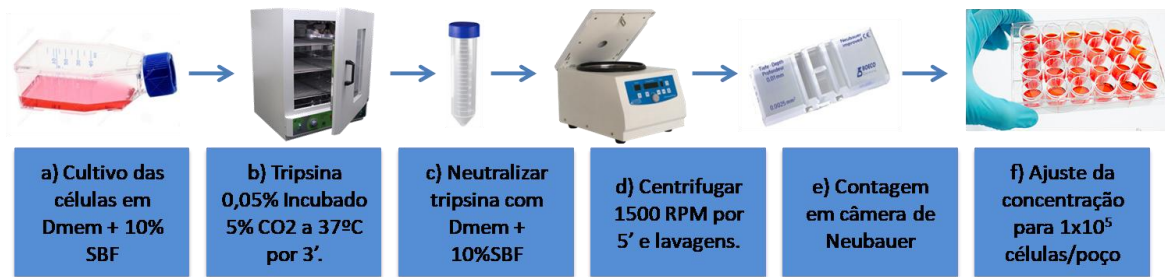


Figura 8- Representação esquemática do processo metodológico do cultivo das células hospedeiras.

4.5 PROCESSO DE INTERAÇÃO ENTRE PARASITOS E CÉLULAS HOSPEDEIRAS

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* foram utilizadas na fase estacionária de crescimento. Primeiramente, o conteúdo da garrafa de parasito foi centrifugado na temperatura de 27°C a 1500 rpm durante 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensionado em DMEM e, então, contado em Câmara de Neubauer. Após o cultivo de macrófagos e fibroblastos (1×10^5 células/mL) sob lamínulas, foram posteriormente, infectadas com 1×10^6 parasitos/mL e subdivididos em 6 grupos, cada um em triplicata: Fib- grupo controle contendo apenas fibroblastos; Fib/La- grupo infectado com *L. amazonensis*; Fib/Lb- grupo infectado com *L. braziliensis*; MO- grupo controle contendo apenas macrófagos; MO/La- grupo infectado com *L. amazonensis*; MO/Lb- grupo infectado com *L. braziliensis*. Foram avaliados os tempos de 1h, 3h, 5h, 18h e 24h (Brígida, 2023.) para observação dos processos iniciais de interação entre fibroblastos e *Leishmania* sp. e macrófagos e *Leishmania* sp. Após cada tempo, as células foram fixadas e processadas para as diferentes microscopias.

4.6 ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA INICIAL E TARDIO POR MICROSCÓPIO CONFOCAL

Para análise do processo de formação do endossoma inicial e tardio, as células foram fixadas com 3% de formaldeído durante 1 hora, e posteriormente lavadas com PBS. Em seguida, permeabilizadas com PBS-BSA a 3% por 20 minutos, e houve o bloqueio de seus sítios aldeídicos com cloreto de amônio a 50 mM por 40 minutos. Em seguida, um novo bloqueio com soro de cabra 10% foi realizado durante 1h, e as células, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário *rabbit* anti-Rab5a (endossoma inicial) e outro grupo com *rabbit* anti-LAMP1 (endossoma tardio), overnight, em câmara úmida a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas com PBS-BSA (tampão fosfato com albumina bovina sérica – 1 e 3% e Tween). Em seguida, incubadas com anticorpo secundário *goat anti-rabbit*

conjugados com Alexa 488nm por 1 hora e lavadas novamente. Posteriormente, as células foram incubadas com faloidina na concentração de 1:100 durante 10 min, para marcação dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto celular e seus núcleos marcados com 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) na concentração de 1:100 durante 15 min, sob abrigo da luz, e por fim, o experimento foi visualizado em microscópio confocal Leica SP8. As imagens e análises foram realizadas utilizando o software Leica Application Suite X do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas.

4.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ADESÃO E INFECÇÃO

Para determinar o índice de adesão e infecção foram realizadas contagens de 100 células (para cada tipo celular) em campos aleatórios das lâminas marcadas por imunofluorescência e foi aplicada a fórmula para determinação dos índices de adesão (onde se considerou os parasitos aderidos à membrana dos diferentes tipos celulares) e infecção (considerando os parasitos internalizados nos diferentes tipos celulares) de acordo com Elcicek *et al.* (2013). Para a análise foram feitas as contagens por microscopia de fluorescência, posterior análise e comparação entre os respectivos grupos utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de adesão/ infecção (II)} = \frac{\% \text{ células aderidas/ infectadas} \times \text{média dos parasitos}}{\text{N}^\circ \text{ de células aderidas/ infectadas}}$$

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para MEV, os macrófagos e fibroblastos cultivados em lamínulas, infectados e mantidos nos diferentes tempos pós-infecção informados anteriormente, foram fixados com 2,5% de gluraldeído, 4% de formaldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, e pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio, seguido da desidratação em solução com concentração crescente de etanol (Merck). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico usando CO₂ e cobertas com uma fina camada de ouro. As células, então, foram analisadas no Microscópio de Varredura MIRA3 TESCAN do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG-MCTI).

4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , TNF, IL-17A, IL-10 foi realizada a partir de sobrenadante dos cultivos celulares, após 1h, 3h, 5h, 18h e 24h de interação e do grupo controle não infectado, utilizando-se o kit BD *Cytometric bead assay – Cytokine kit* (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17. A obtenção dos dados ocorreu por meio do Citômetro de Fluxo FACSCanto II, através do software FACSDiva (BD *Biosciences*, USA) e os dados foram analisados utilizando FCAP Array 3.0. Os resultados foram expressos em pg/mL calculados a partir da curva padrão.

A determinação indireta da produção de óxido nítrico foi realizada a partir da dosagem de nitrito, utilizando sobrenadante dos cultivos celulares, após os tempos de interação supracitados. Foi utilizado o *Griess Reagent Kit for Nitrite Determination* (ThermoFisher) seguindo instruções do fabricante e a leitura realizada em espectrofotômetro (550-570nm). A concentração de nitrito foi expressa em μ M de acordo com a curva padrão estabelecida.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os testes foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 7, utilizando o teste estatístico t-Student, com nível alfa de 95%, e sendo considerada diferença estatisticamente significativa quando o valor de p fosse menor que 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA INICIAL POR MICROSCÓPIO CONFOCAL

As interações entre as duas espécies de *Leishmania* com macrófagos e fibroblastos foram analisadas nos cinco tempos determinados pelo estudo (1, 3, 5, 18 e 24 horas) para avaliação da formação dos filamentos de actina, extensões da membrana plasmática presentes no citoesqueleto celular através da marcação com faloidina e a presença do marcador endossomal inicial (Rab5).

Em macrófagos infectados com *L. amazonensis* – MO/La (Figura 9 B) e macrófagos infectados com *L. braziliensis* – MO/Lb (Figura 9 C), no tempo mais inicial do estudo, 1 hora, foram observadas as células espreiadas com prolongamentos finos de membrana, denominadas filopódios (Figura 9 B e C – seta verde) e com parasitos englobados por actina formando uma estrutura que se assemelha a uma cortina denominada *ruffles* (Figura 9 B e C – seta branca), presente nas fases iniciais da endocitose. A presença de Rab5 foi vista ao redor das duas espécies de *Leishmania* (Figura 9 B e C – seta amarela) próximas às células hospedeiras. Ainda, neste mesmo intervalo de tempo, em fibroblastos infectados com La – Fib/La (Figura 9 E) e fibroblastos infectados com Lb – Fib/Lb (Figura 9 F) assim como nos macrófagos, o Rab5 se manteve concentrado ao redor dos parasitos (Figura 9 E e F – seta amarela), mas também com uma sutil marcação distribuída pelo citoplasma da célula no grupo infectado com La (Figura 9 E – seta amarela).

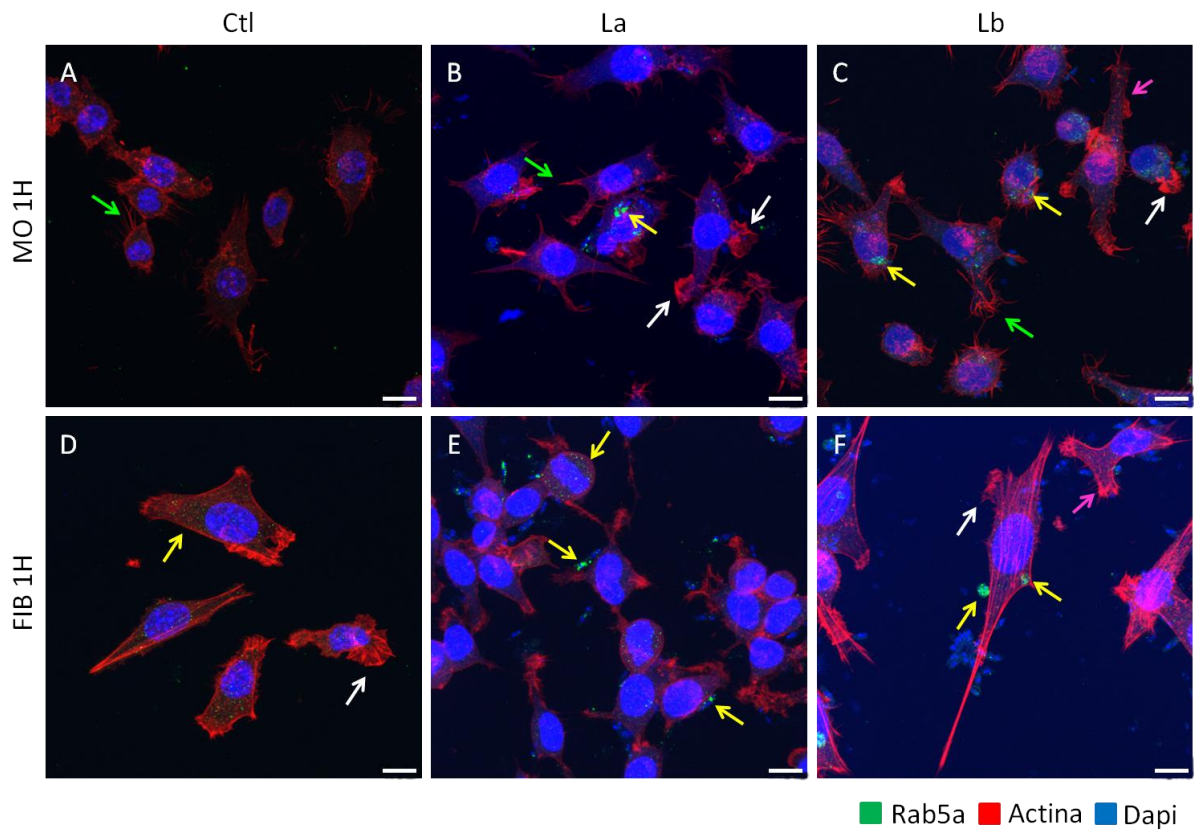


Figura 9 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempo de 1 hora de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La – Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb – Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La – Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb – Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10µm. Setas verdes= filopódios; Setas amarelas = marcação intensa do Rab5; Setas brancas = ruffles; Setas rosa= lamelipódios.

Nos períodos de infecção de 3 e 5 horas (Figura 10) entre MO e as espécies de *Leishmania* foi possível observar um aumento da intensidade na marcação do Rab5 concentrada ao redor dos parasitos (Figura 10 B, C, H e I), bem como, a extensão das projeções membranares formando lamelipódios em 3 horas (Figura 10 B e C – setas rosas), filopódios (Figura 10 B, C, H e I - setas verde) e *ruffles* (Figura 10 B, C, H e I - setas brancas). Na interação entre Fib e os parasitos, em 3 e 5 horas, é possível notar também o aumento na intensidade da marcação do Rab5 ao redor dos parasitos que estão em contato com o citoesqueleto celular (Figura 10 E, F, K e L – setas amarelas) bem como projeções de membrana – *ruffles*, englobando o parasito no grupo infectado com La em 3 horas de interação (Figura 10 E – seta branca).

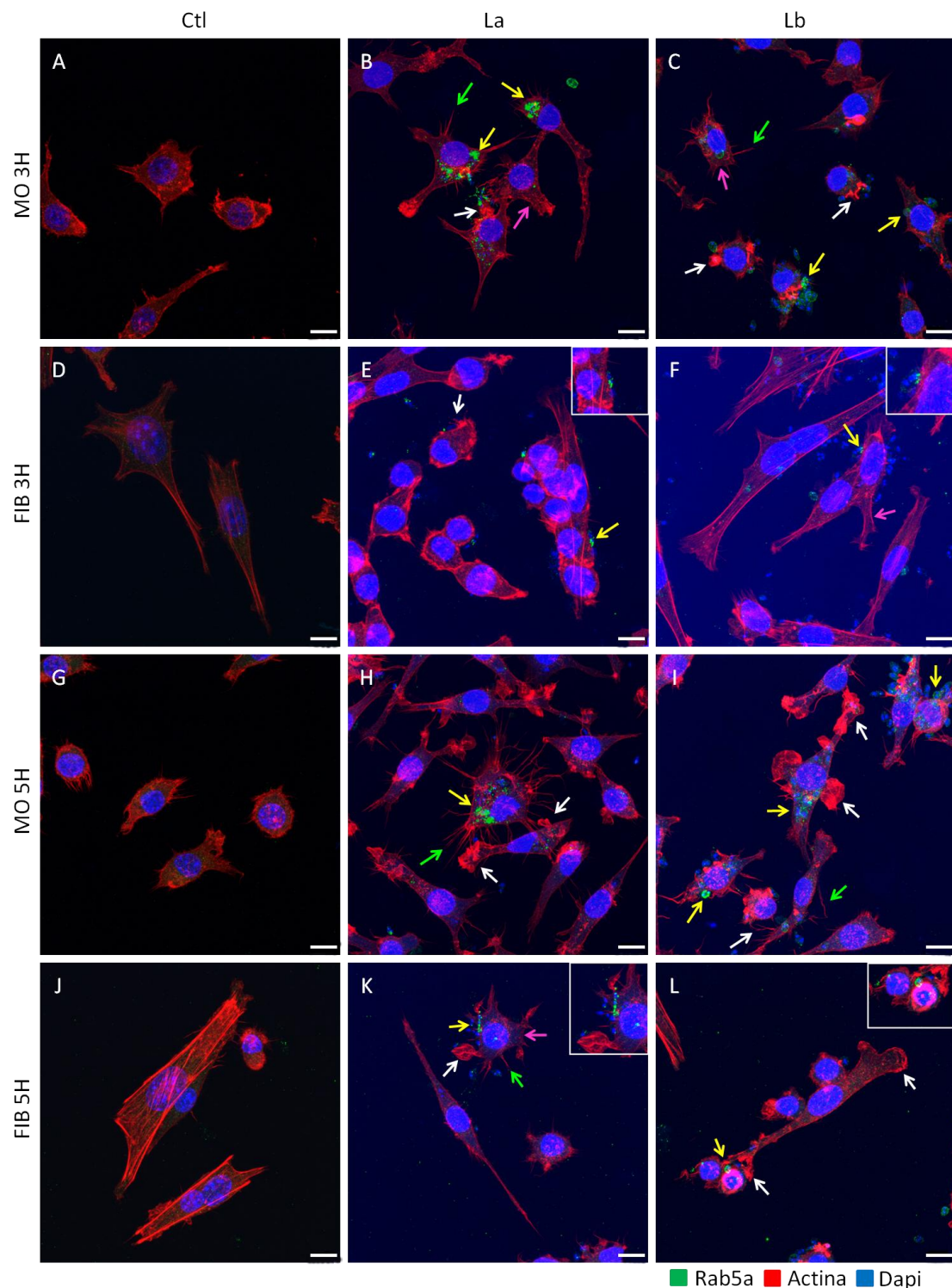


Figura 10 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempos de 3 e 5 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La - Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb - Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La - Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb - Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10 μ m. Setas verdes= filopódios; Setas amarelas = marcação intensa do Rab5; Setas brancas = ruffles; Setas rosa= lamelipódios.

Após 18 horas de infecção, de modo geral foi possível observar o início da diminuição da intensidade na marcação com Rab5. Porém, mais intensa em MO/La (Figura 11 B – setas amarelas) do que em MO/Lb (Figura 11 C). Em Fib, no mesmo período, nota-se também a diminuição do Rab5 (Figura 11 E e F), seguindo o mesmo padrão do que em macrófagos, com maior intensidade em Fib/La (Figura 11 E – seta amarela) e menor intensidade em Fib/Lb (Figura 11 F – seta amarela).

Já no tempo de 24 horas, MO/Lb apresentaram menores prolongamentos de membrana celular (Figura 11 H e I). Porém, houve uma marcação menos intensa de Rab5 comparada ao tempo de 18 horas, mas também sutilmente dispersa pelo citoplasma (Figura 11 H e I – setas amarelas). Por outro lado, em Fib no período de 24 horas, houve a marcação do Rab5 de maneira mais concentrada e ao redor de *L. braziliensis* comparado ao período de 18 horas e não disperso pelo citoplasma celular como em MO (Figura 11 L – setas amarelas).

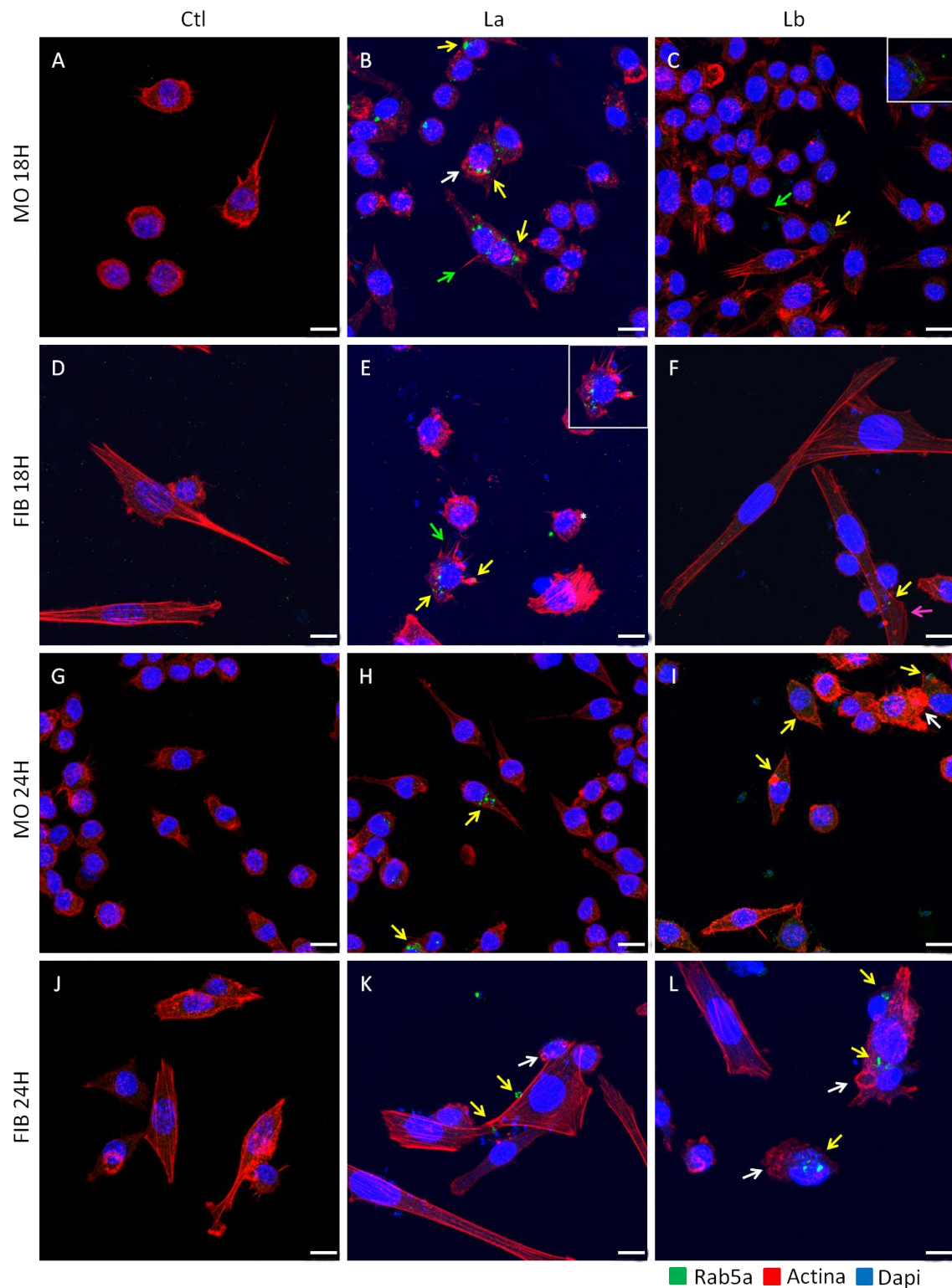


Figura 11 - Marcação por imunofluorescência para endossomo inicial - Rab5a: Tempos de 18 e 24 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La - Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb - Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La - Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb - Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10 μ m. Setas verdes= filopódios; Setas amarelas = marcação intensa do Rab5; Setas brancas = ruffles; Setas rosa= lamelipódios; Asteriscos = *Leishmania* (E).

5.2 ANÁLISES DO PROCESSO DE FORMAÇÃO DE ENDOSSOMA TARDIO POR MICROSCÓPIO CONFOCAL

A presença do marcador endossomal tardio (Lamp1) em MO sem infecção e infectados com La e Lb, no tempo de 1 hora, foi observada de forma intensa e distribuída pelo citoplasma da célula, ao redor do núcleo e em sua periferia (Figura 12 A, B e C). Em MO/La, observam-se estruturas em forma de filopódios (Figura 12 B – seta verde) e parasitos aparentemente dentro da célula (Figura 12 B – setas laranja) e em MO/Lb, observamos *ruffles* envolvendo os parasitos (Figura 12 C – setas brancas). Neste tempo também foi possível observar a presença intensa do Lamp1 distribuída de forma homogênea no citoplasma de Fib sem infecção, infectados com La e infectados com Lb (Figura 12 D, E e F), além de projeções membranares mais discretas (Figura 12 E e F).

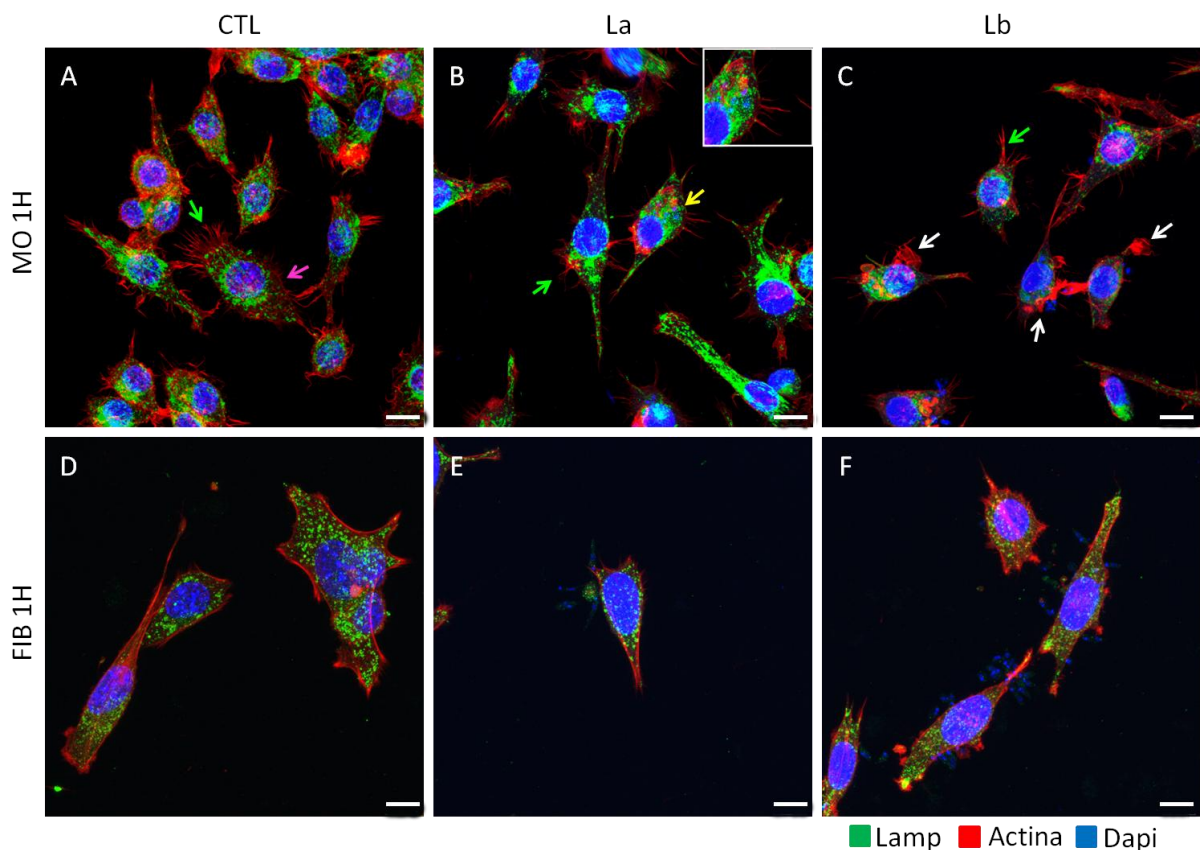


Figura 12 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempo de 1 hora de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La – Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb – Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La – Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb – Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10µm. Setas verdes= filopódios; Setas brancas = *ruffles*; Setas rosa= lamelipódios.

Após 3 horas de infecção, as protrusões de membrana em forma de filopódios, lamelipódios e *ruffles* são facilmente observadas em MO/La e com parasitos no interior das células, sendo possível observar a infecção através da formação de vacúolos parasitóforos (VPs) (Figura 13 B – setas amarelas), em MO/Lb, observa-se parasitos englobados por actina formando uma estrutura que se assemelha a um copo endocítico (Figura 13 C – seta laranja) também presente nas fases iniciais da endocitose, VPs bem delimitados também são observados (Figura 13 C - setas amarelas). Em Fib, neste tempo não é possível verificar a formação de VPs, mas a presença do Lamp1 é intensa e distribuída pelo citoplasma celular (Figura 13 E e F), bem como projeções discretas do citoesqueleto.

Após 5h, a presença do Lamp1 permanece intensa em todos os grupos, com as projeções mais acentuadas e pontuais nos VPs de MO/La (Figura 13 H - setas amarelas). Por outro lado, em MO/Lb observam-se múltiplos e aparentemente VPs maiores (Figura 13 I - setas amarelas). Após 5h de infecção por La em Fib se observa intenso espraiamento e prolongamento da membrana em forma de filopódios e *ruffles* (Figura 13 K – setas brancas e verdes) corroborando com os resultados que serão vistos para varredura para esta espécie no mesmo tempo (Figura 18 C), sendo possível perceber essas projeções na região de contato com o parasito, assim como também em Fib/Lb (Figura 13 L - setas brancas).

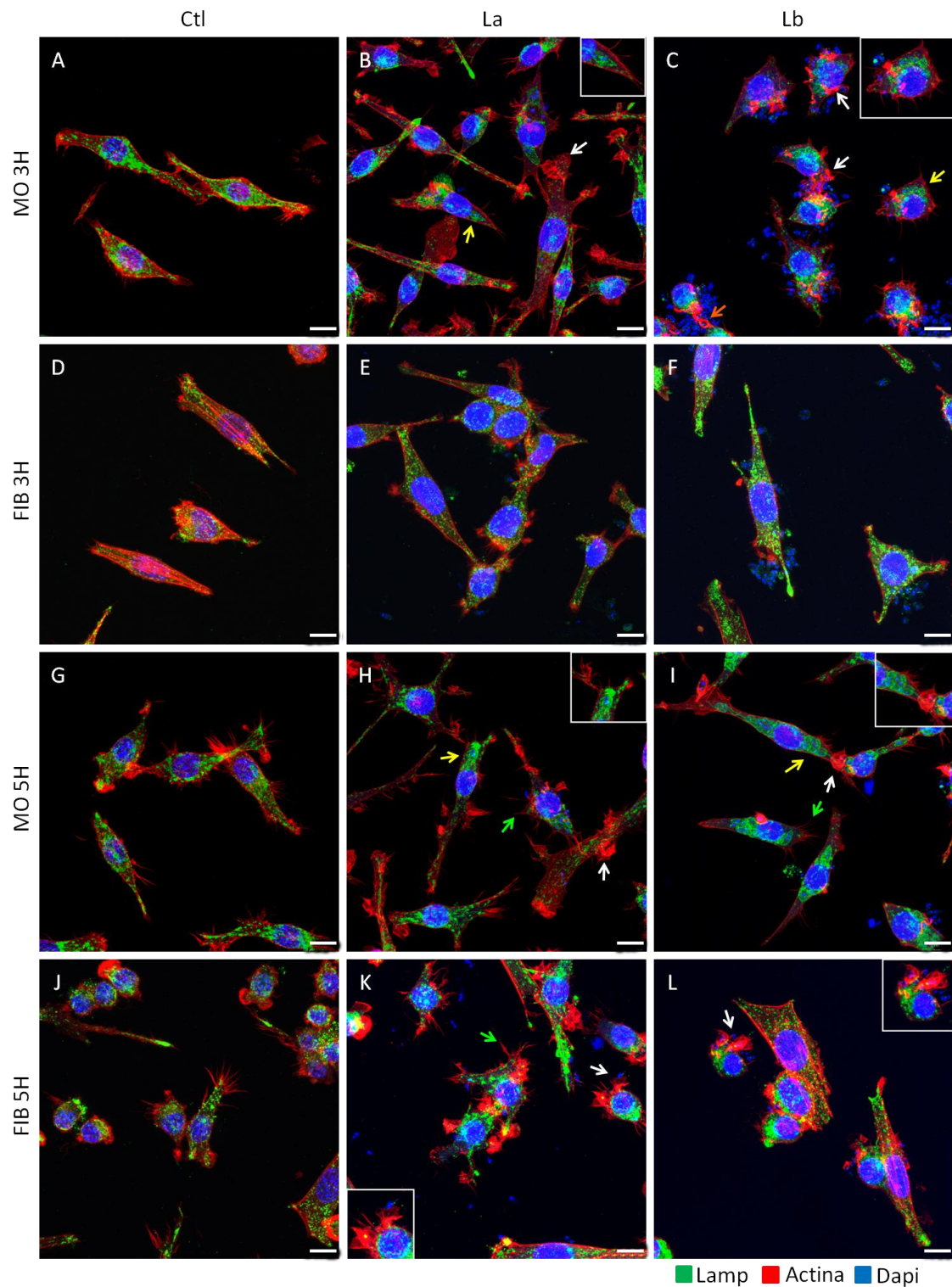


Figura 13 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempos de 3 e 5 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La – Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb – Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La – Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb – Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10 μ m. Setas verdes= filopódios; Setas brancas = *ruffles*; Setas amarelas= vacúolos parasitóforos.

Apesar da marcação para o Lamp1 se manter intensa e distribuída pelo citoplasma, após 18 horas de infecção, há uma diminuição de VPs em MO/Lb (Figura 14 C – seta amarela) comparado aos tempos anteriores, 3 e 5 horas. Em contrapartida, os VPs parecem surgir a partir deste momento em Fib/Lb (Figura 14 F - setas amarelas).

No último período de infecção, 24 horas, enquanto a presença de VPs parece diminuir para MO/Lb (Figura 14 I – seta amarela), em MO/La aparecem múltiplos e maiores VPs (Figura 14 H – seta amarela). Em Fib/La há uma sutil redução na intensidade da marcação do Lamp1 (Figura 14 K), entretanto, os VPs permanecem bem delimitados em Fib/Lb (Figura 14 L - seta amarela).

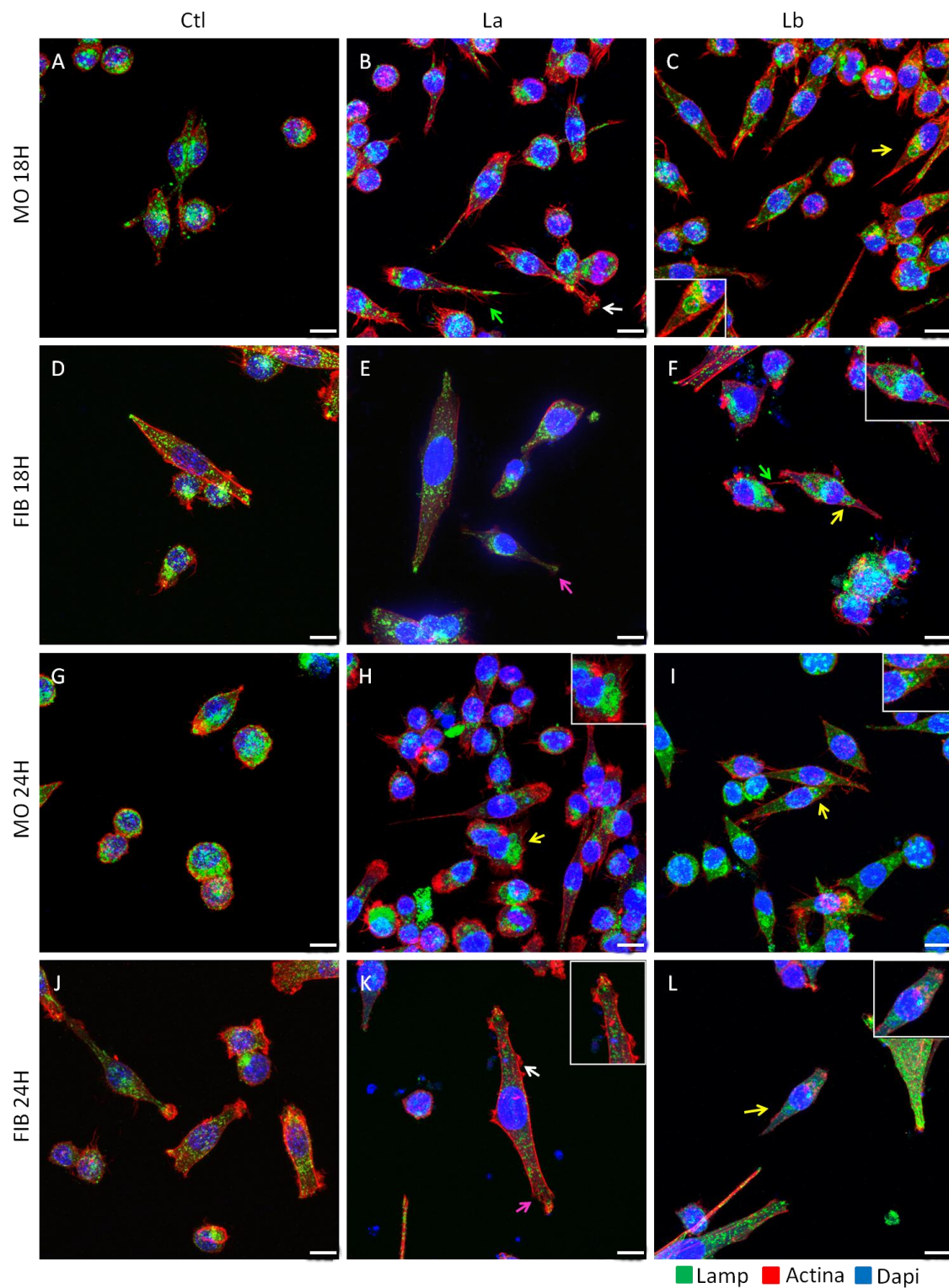


Figura 14 - Marcação por imunofluorescência para endossomo tardio – Lamp1: Tempo de 18 e 24 horas de interação entre macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) CTL - Macrófagos sem infecção. (B) MO/La – Macrófagos com *L. amazonensis*. (C) MO/Lb – Macrófagos com *L. braziliensis*. (D) CTL - Fibroblastos sem infecção. (E) Fib/La – Fibroblastos com *L. amazonensis*. (F) Fib/Lb – Fibroblastos com *L. braziliensis*. Barra de 10 μ m. Setas verdes= filopódios; Setas brancas = ruffles; Setas rosa= lamelipódios; Setas amarelas= vacúolos parasitóforos.

5.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ADESÃO E INFECÇÃO

Foi realizada a contagem por imunofluorescência de parasitos aderidos em todos os tempos de interação estipulados pelo estudo. A contagem de *L. amazonensis* aderidas em macrófagos (MO/La) e fibroblastos (Fib/La) apresentou diferença estatística significativa nos tempos de 1h, 18h e 24h configurando um número maior de parasitos aderidos em fibroblastos comparados aos macrófagos, e nos macrófagos, o número de parasitos aderidos diminui ao longo do tempo (Figura 15 A).

Na quantificação de *L. braziliensis* aderidos em macrófagos (MO/Lb) e em fibroblastos (Fib/Lb) houve diferença estatística significativa nos tempos de 1h e 18h, resultando também em um maior número de parasitos aderidos em fibroblastos do que em macrófagos. Ao longo do tempo, observou-se a diminuição do índice de adesão tanto para MO/Lb quanto para Fib/Lb (Figura 15 C).

Na comparação do índice de adesão entre as espécies de *Leishmania* em fibroblastos (Fib/La e Fib/Lb), houve diferença estatística no tempo de 1 hora, indicando *L. braziliensis* com um maior índice de adesão do que *L. amazonensis* no tempo inicial. Porém, ao longo o tempo este índice diminui (Figura 15 G). Em macrófagos, de forma significativa, os índices de adesão nos tempos de interação se assemelham diminuindo ao longo do tempo para ambas as espécies (MO/La e MO/Lb) (Figura 15 E).

Assim como realizado para o índice de adesão, foi realizada a contagem por imunofluorescência de parasitos internalizados, gerando o índice de infecção, em todos os tempos de interação estipulados pelo estudo. A contagem de *L. amazonensis* internalizados por macrófagos (MO/La) e fibroblastos (Fib/La) apresentou diferença estatística significativa nos tempos de 1h e 3h demonstrando um número maior de parasitos internalizados por macrófagos do que em fibroblastos, por outro lado, ao longo do tempo há um aumento de parasitos internalizados por fibroblastos (Figura 15 B).

Para as células infectadas com *L. braziliensis* nota-se diferença estatística também para os tempos de 1h e 3h, apresentando maior índice de infecção em macrófagos, comparados aos fibroblastos, e ao longo dos tempos estipulados há um aumento de fibroblastos infectados por Lb (Figura 15 D).

O índice de infecção de fibroblastos com as espécies de *Leishmania* demonstram uma progressão similar ao longo dos períodos, havendo diferença estatística entre ambas as

espécies (Fib/La e Fib/Lb), resultando em um maior índice de infecção em 24 horas. (Figura 15 H).

Em macrófagos infectados com *L. braziliensis* (MO/Lb), o índice de infecção parece ser maior em 1 hora, comparado com *L. amazonensis* (MO/La), mesmo havendo uma disparidade entre as espécies, não houve diferença estatística significativa (Figura 15 F).

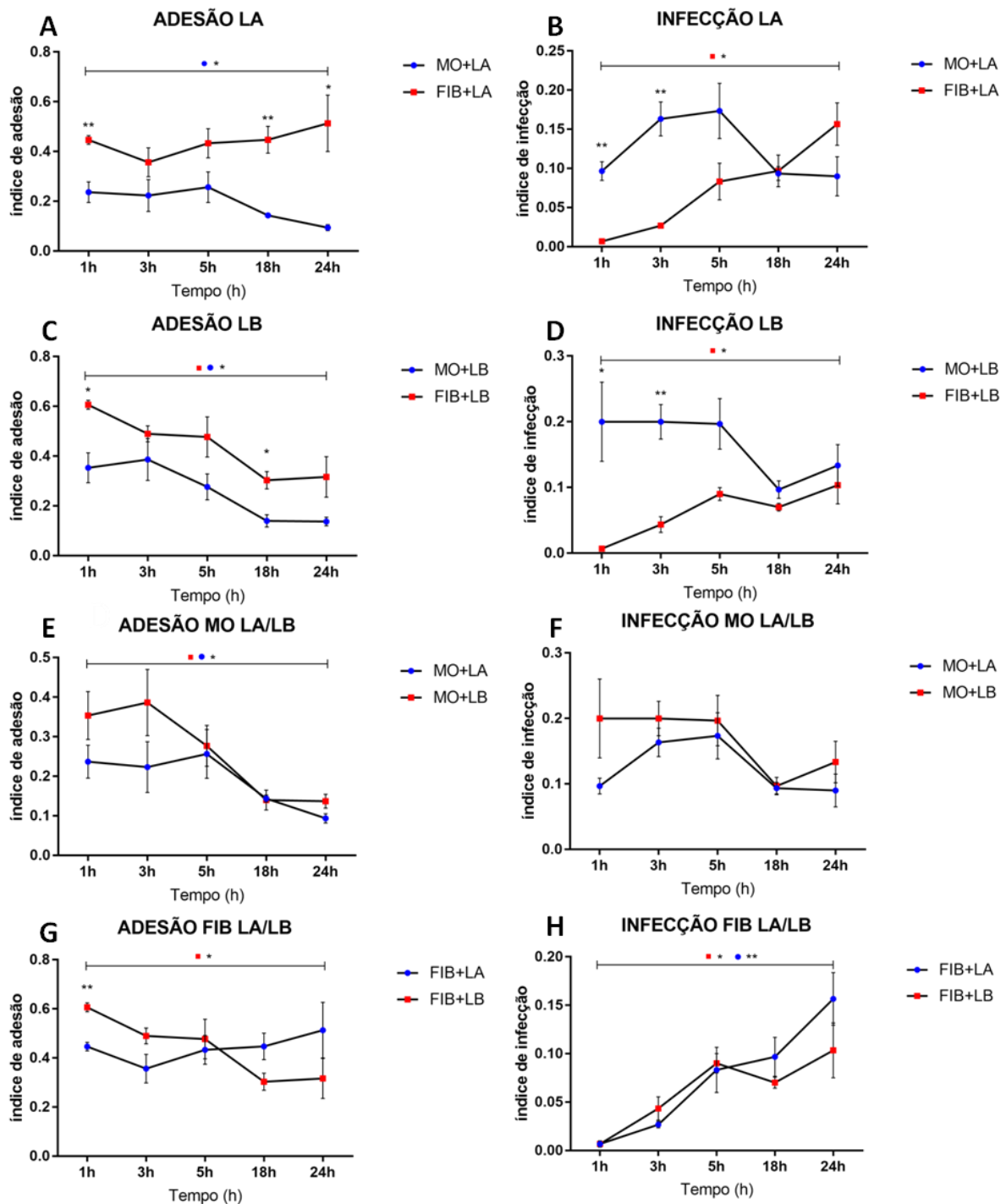


Figura 15 – Índice de adesão e infecção em macrófagos/fibroblastos infectados por 1, 3, 5, 18 e 24 horas de interação. (A) Índice de adesão – I. A. – comparando MO/La e Fib/La. (C) I. A. comparando MO/Lb e Fib/Lb. (E) I. A. comparando MO/La e MO/Lb. (G) I. A. comparando Fib/La e Fib/Lb. (B) Índice de infecção – I. I. – comparando MO/La e Fib/La. (D) I. I. comparando MO/Lb e Fib/Lb. (F) I. I. comparando MO/La e MO/Lb. (H) I. I. comparando Fib/La e Fib/Lb. Teste-t usado para análise estatística, * $p < 0,05$.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As interações nos diferentes períodos entre as espécies de *Leishmania* e os diferentes tipos celulares foram analisadas por Microscópio Eletrônico de Varredura, a fim de avaliar a formação das extensões membranares.

Em 1 hora de interação, foi possível observar um acúmulo de parasitos aderidos às células hospedeiras, assim como o espraiamento e a formação de protrusões da membrana denominadas lamelipódios em MO e Fib infectados com La (Figura 16 A e C - setas verdes), observou-se também a formação de extensões em forma de filopódios (Figura 16 A, B, C e D - setas vermelhas). O parasito *L. amazonensis* parece ter uma preferência de adesão através de seu flagelo tanto em MO quanto em Fib (Figura 16 A e C – setas amarelas). Enquanto *L. braziliensis*, de modo geral, mas não se restringindo, parece ter preferência de adesão através do corpo celular (Figura 16 B e D – setas amarelas) à membrana da célula hospedeira que por sua vez estende uma larga projeção em volta de Lb (Figura 16 B – seta branca).

Em 3 horas, vários parasitos permanecem aderidos às células hospedeiras, os parasitos de *L. amazonensis* pelos flagelos (Figura 17 A e C – seta amarela) e *L. braziliensis* em sua maioria pelo corpo celular (Figura 17 B e D – setas amarelas) como descrito anteriormente no tempo de 1 hora. Além disso, notam-se as projeções em formas de filópodos, sobretudo, em fibroblastos infectados com ambos os parasitos (Figura 17 C e D – setas vermelhas).

Curiosamente, os padrões de adesão do parasito em 5 horas (Figura 18) de interação permanecem parecidos comparados aos demais tempos, entretanto, com um menor número de parasitos aderidos às membranas da células hospedeiras. Em 18 horas, observaram-se parasitos ainda aderidos à membrana, porém, com uma morfologia diferente, aparentemente com a membrana de MO sobreposta aos parasitos (Figura 19 A e B – setas amarelas). Em fibroblastos, La está aderida pelo flagelo com *ruffles* se estendendo pelo parasito (Figura 19 C – seta amarela) e Lb, diferentemente do contexto geral, também está aderida pelo flagelo (Figura 19 D – seta amarela).

No último período do estudo, 24 horas, nota-se a diminuição significativa de parasitos em torno, ou aderida às células hospedeiras. Nota-se também um número grande de filopódios no corpo celular de fibroblastos (Figura 20 C e D – setas vermelhas) e *ruffles* próximo ao corpo celular de *L. amazonensis* na região de contato (Figura 20 C – seta branca) e *ruffles* parecendo envolver o flagelo de *L. braziliensis* (Figura 20 D – seta branca).

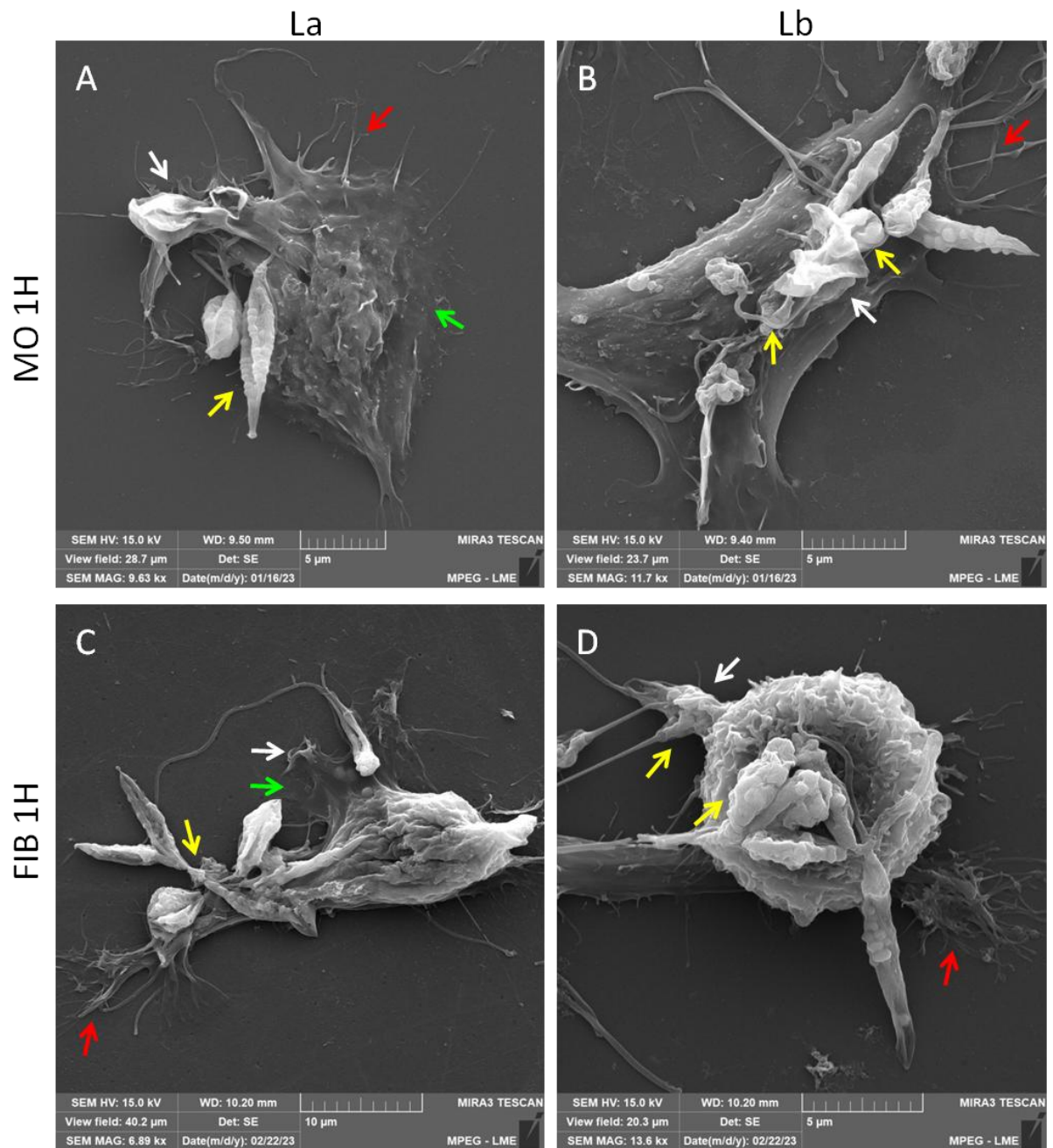


Figura 16- Análise ultraestrutural após 1 hora de interação de macrófagos ou fibroblastos e *Leishmania*. (A) MO/La. (B) MO/Lb. (C) Fib/La. (D) Fib/Lb. Setas brancas = emissão de protusões da membrana em forma de *ruffles*; Setas vermelhas = adesão celular na membrana espreada – filopódios; Setas verdes = adesão celular na membrana espreada – lamelipódios; Setas amarelas = adesão do parasito à célula hospedeira. Barra 5μm (A-B-D). Barra 10μm (C).

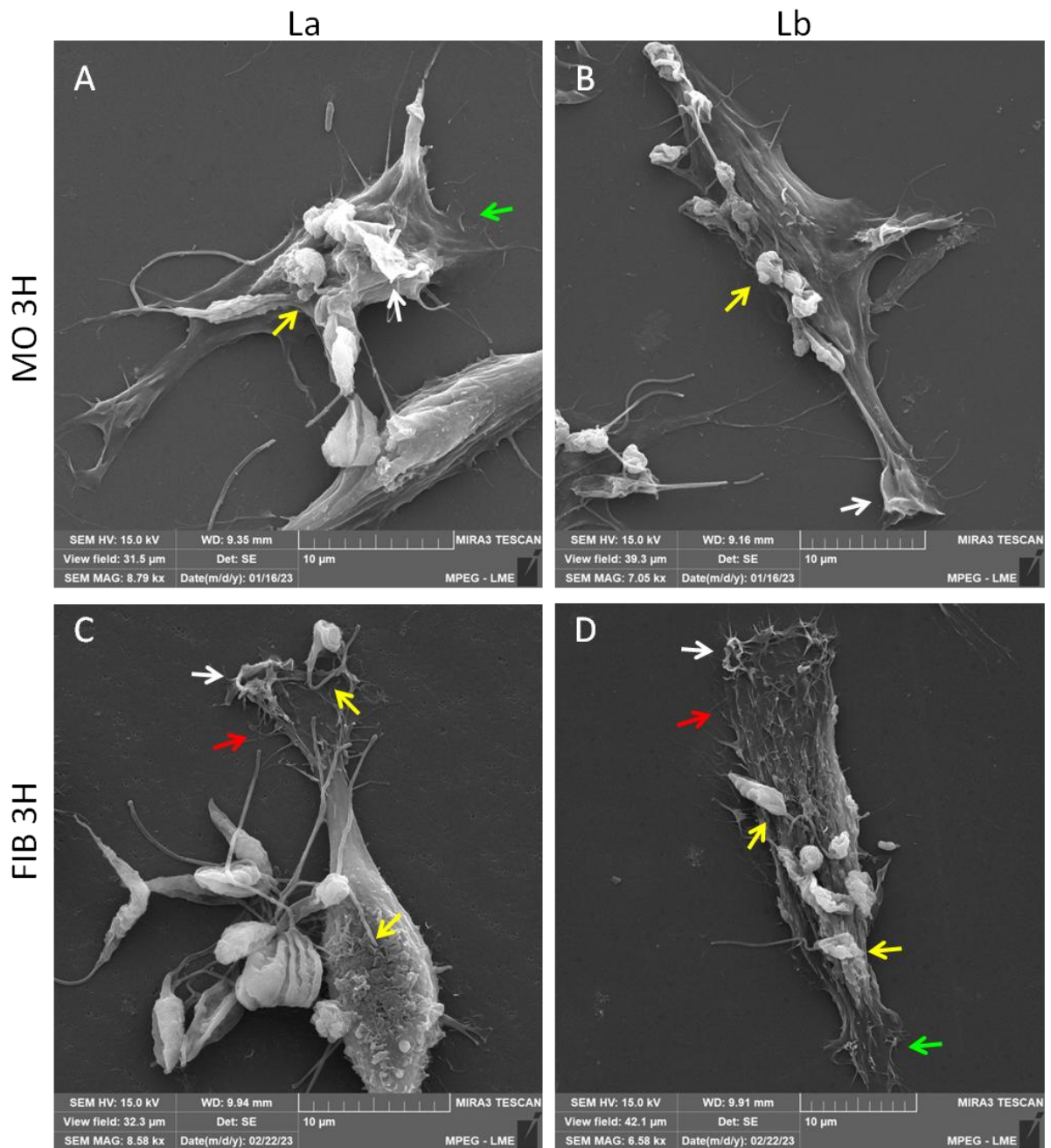


Figura 17 - Análise ultraestrutural após 3 horas de interação de macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) MO/La. (B) MO/Lb. (C) Fib/La. (D) Fib/Lb. Setas brancas = *ruffles*; Setas vermelhas = adesão celular na membrana espreada – filopódios; Setas verdes = adesão celular na membrana espreada – lamelipódios; Setas amarelas = adesão do parasito à célula hospedeira. Barra 10µm.

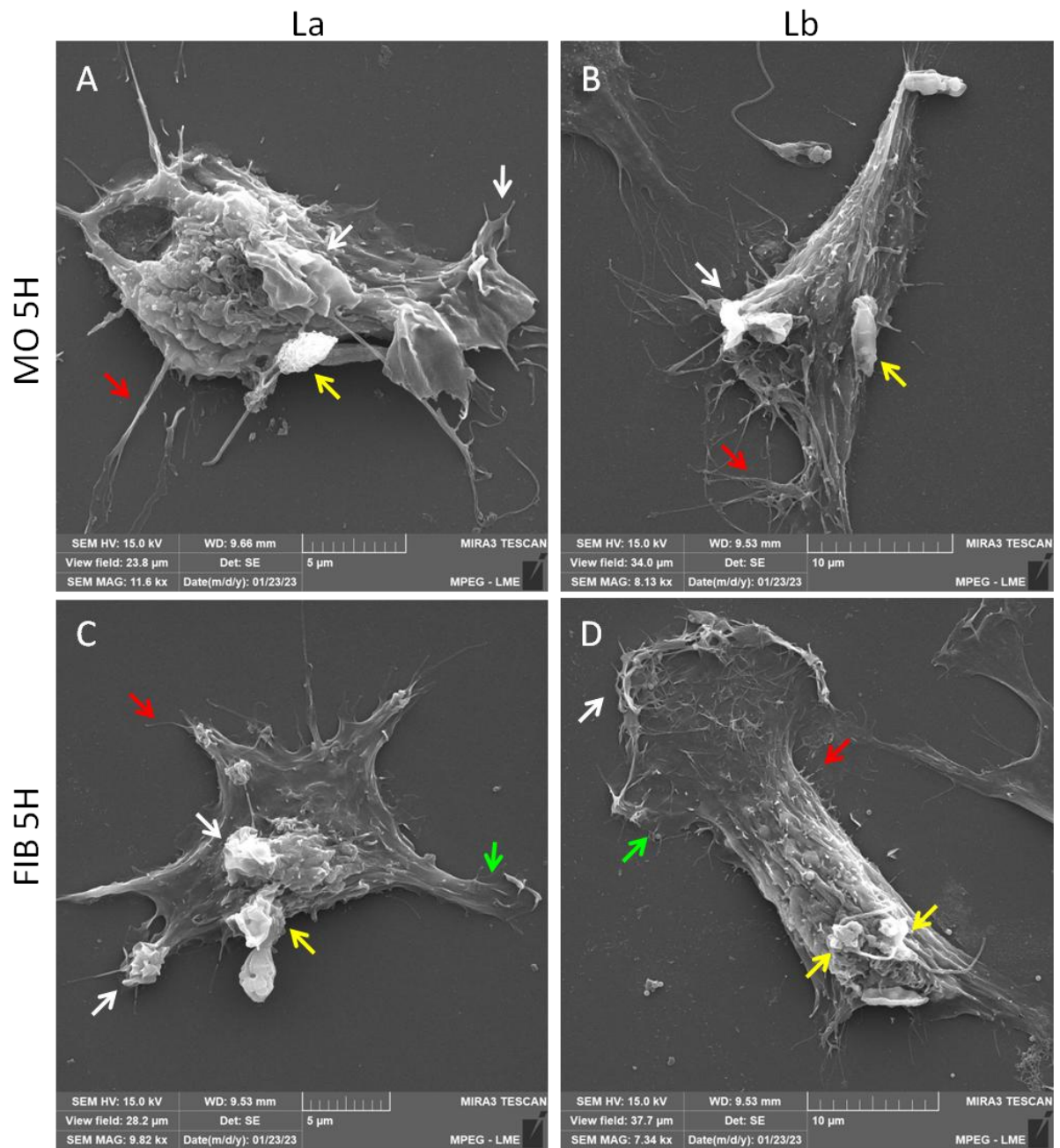


Figura 18 - Análise ultraestrutural de 5 horas de interação de macrófagos/fibroblastos e *Leishmania*. (A) MO/La. (B) MO/Lb. (C) Fib/La. (D) Fib/Lb. Setas brancas = *ruffles*; Setas vermelhas = adesão celular na membrana espreada – filopódios; Setas verdes = adesão celular na membrana espreada – lamelipódios; Setas amarelas = adesão do parasito à célula hospedeira. Barra 5μm (A-B-D). Barra 5μm (A-C). Barra 10μm (B-D).

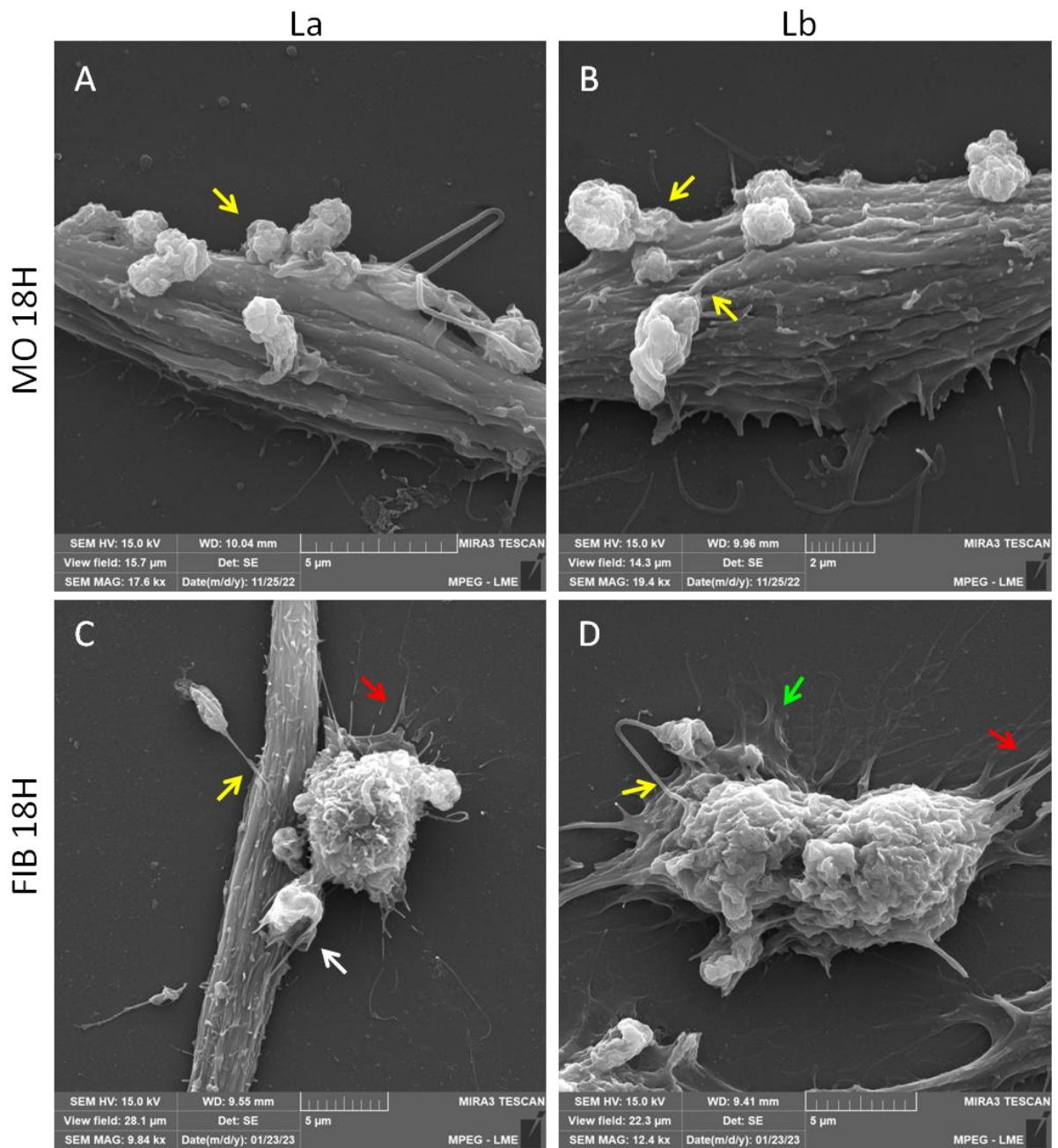


Figura 19 - Análise ultraestrutural após 18 horas de interação de macrófagos ou fibroblastos e *Leishmania*. (A) MO/La. (B) MO/Lb. (C) Fib/La. (D) Fib/Lb. Setas brancas = *ruffles*; Setas vermelhas = filopódios; Setas verdes = lamelipódios; Setas amarelas = adesão do parasito à célula hospedeira. Barra 5 μm (A-C-D). Barra 2 μm (B).

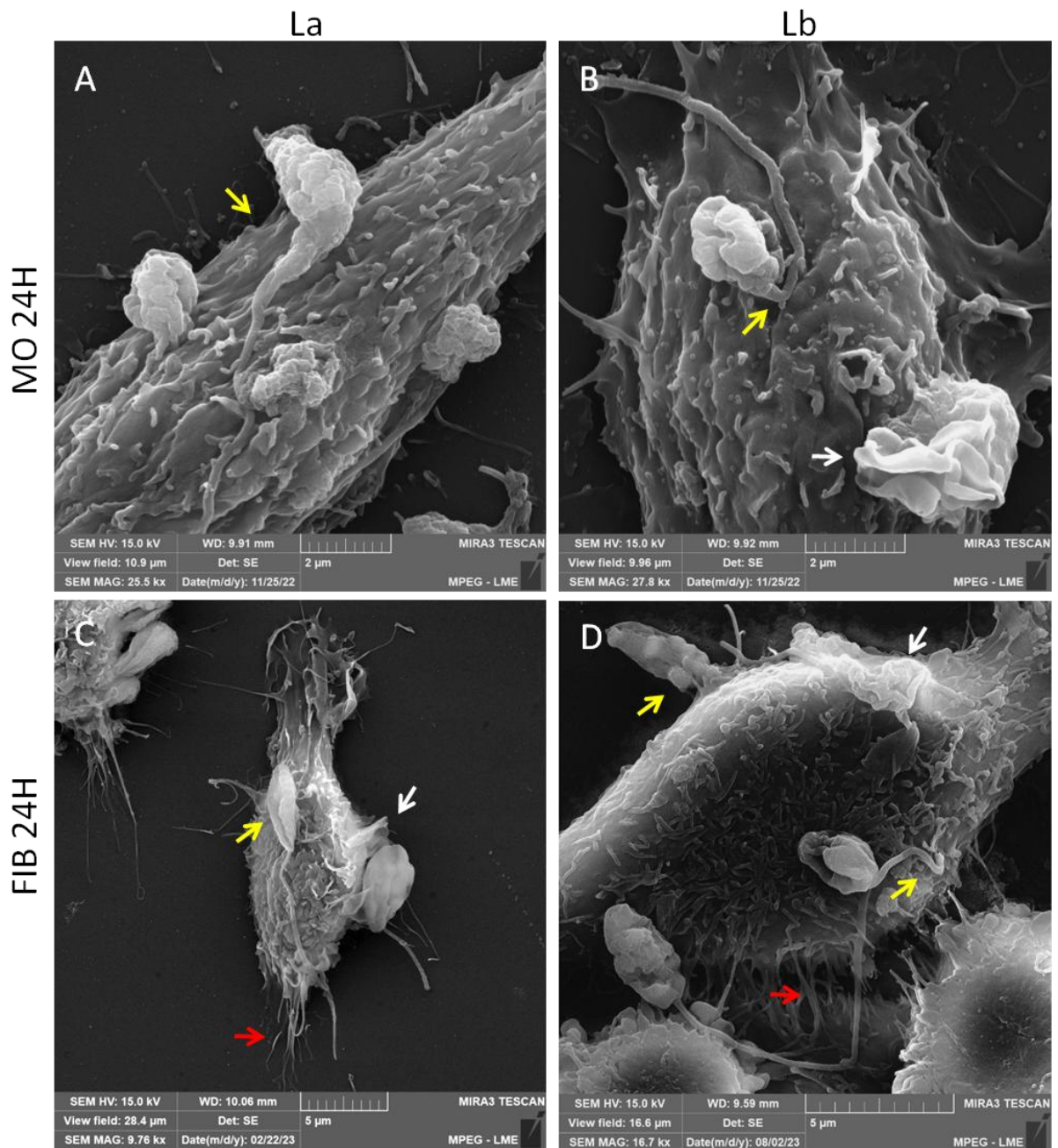


Figura 20 - Análise ultraestrutural após 24 horas de interação de macrófagos ou fibroblastos e *Leishmania*. (A) MO/La. (B) MO/Lb. (C) Fib/La. (D) Fib/Lb. Setas brancas = *ruffles*; Setas vermelhas = adesão celular na membrana espreada – filopódios; Setas amarelas = adesão do parasito à célula hospedeira. Barra 2 μ m (A-B). Barra 5 μ m (C-D).

5.4 DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO

A partir dos sobrenadantes obtidos após os períodos de interação, dosamos as citocinas que estão envolvidas no processo inflamatório, que por sua vez, geram uma resposta imunológica.

Desse modo, dosamos as citocinas IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 e a produção de NO. Observamos que houve produção de IL-17A, em macrófagos, esta projeção se mostrou homogênea entre os grupos infectados ao longo dos tempos. Entretanto, com aumento significativo no período de 3 horas entre MO sem infecção e MO infectados com *L. braziliensis*. (Figura 21 A). Em contrapartida, em fibroblastos, a produção desta interleucina pareceu aumentar a partir de 5 horas de infecção, havendo uma queda para Fib com *L. amazonensis* e aumentando ainda mais em Fib com *L. braziliensis* em 18 horas, conferindo diferença estatística significativa entre as espécies neste período (Figura 21 B).

A produção de TNF, em macrófagos, mostrou-se alta nos tempos de 3 e 5 horas, havendo uma diminuição a partir de 18 horas, promovendo diferença estatística entre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, e depois em 24 horas, com diferença estatística entre as espécies de *Leishmania*, e entre MO sem infecção comparado a MO/Lb (Figura 21 C). Em fibroblastos, o aumento se deu a partir de 5 horas, atingindo um limite máximo em 18 horas e diminuindo após 24 horas, com diferença estatística entre Fib/La e Fib/Lb apenas no período de 18 horas. (Figura 21 D).

Na dosagem de IFN- γ em macrófagos, houve diferença significativa entre espécies no tempo mais inicial de interação, 1 hora, MO com *L. amazonensis* teve maior produção do que MO com *L. braziliensis* (Figura 21 E). Em fibroblastos com *L. amazonensis* parece ter maior produção em 3 e 5 horas, comparada a fibroblastos sem infecção e fibroblastos com *L. braziliensis*, porém não houve diferença estatística significativa (Figura 21 F).

Em macrófagos, houve a produção homogênea de IL-6, em todos os grupos, sem diferença estatística (Figura 21 G). Por outro lado, em fibroblastos infectados com *L. braziliensis* há um aumento significativo na produção de IL-6 em 18 horas, havendo diferença estatística entre Fib/La e Fib/Lb, e, Fib sem infecção e Fib/Lb (Figura 21 H).

A produção de IL-10, IL-2, IL-4 e nitrito também foram dosadas, no entanto, não houve diferença estatística significativa (dados não mostrados).

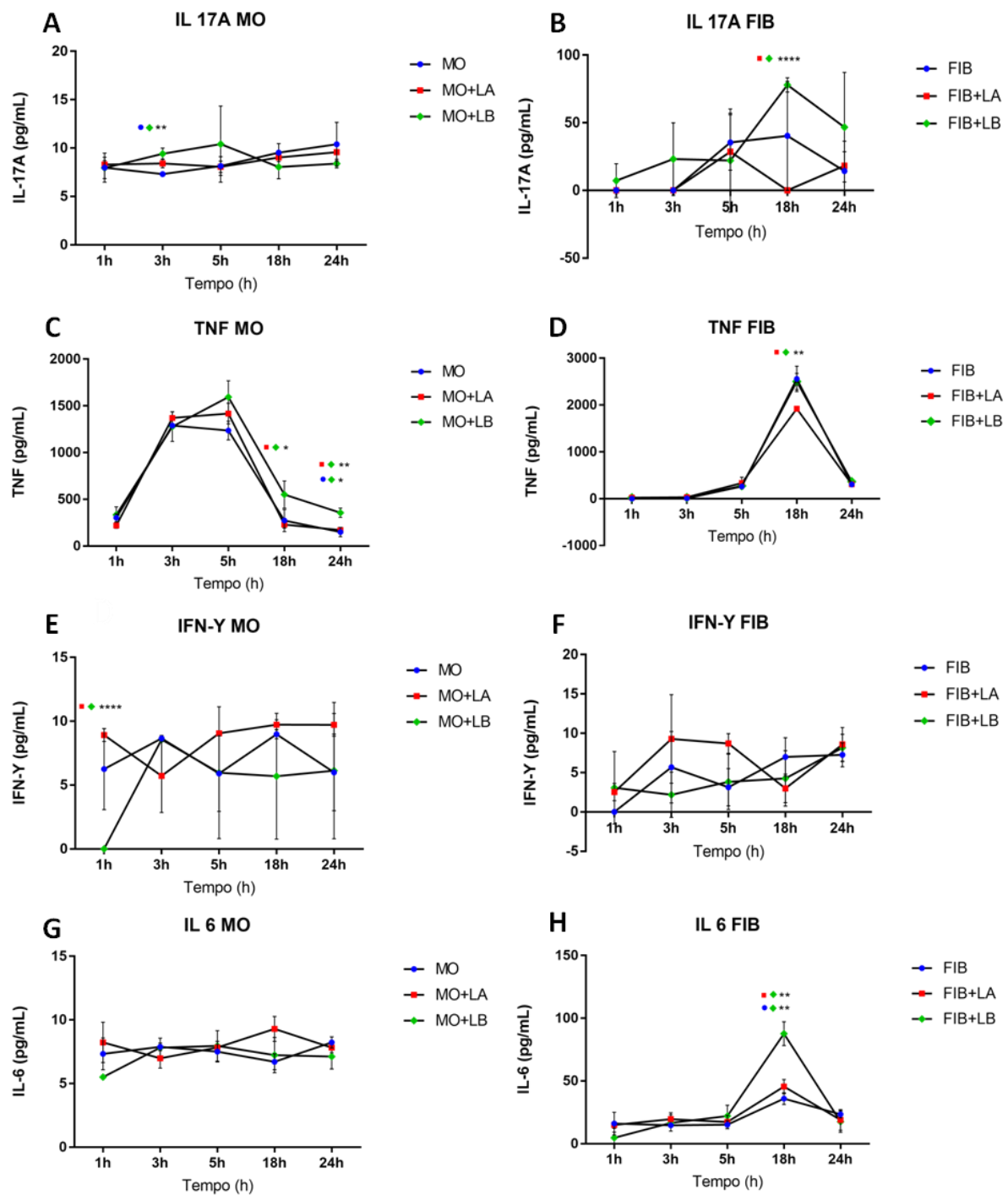


Figura 21 - Dosagem de citocinas nos tempos de 1, 3, 5, 18 e 24 horas de interação. (A) dosagem de IL-17A para os grupos MO, MO/La e MO/Lb. (B) IL-17A para os grupos Fib, Fib/La e Fib/Lb. (C) TNF para MO, MO/La e MO/Lb. (D) TNF para Fib, Fib/La e Fib/Lb. (E) IFN- γ para MO, MO/La e MO/Lb. (F) IFN- γ para Fib, Fib/La e Fib/Lb. (G) IL-6 para MO, MO/La e MO/Lb. (H) IL-6 para Fib, Fib/La e Fib/Lb. Teste-t usado para análise estatística, * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Na análise do estudo examinamos a interação entre macrófagos, fibroblastos e *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na forma promastigota, incluindo a adesão e endocitose de parasitos e a formação de vacúolos parasitóforos nos tempos iniciais do processo de interação. A maioria dos estudos sobre a entrada de parasitos em macrófagos se refere aos múltiplos sistemas de receptores-ligantes envolvidos na ligação e internalização de promastigotas e amastigotas (Alexander e Russell, 1992; Guy e Belosevic, 1993; Love *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1995) e apenas alguns relatos examinaram os eventos fagocíticos (Chang, 1983; Rittig *et al.*, 1998), sobretudo em fibroblastos.

Por outro lado, ao comparar a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em células fagocíticas profissionais – macrófagos e não profissionais – fibroblastos observamos algumas semelhanças. Um estudo sugeriu que o receptor de manose participava da entrada da *L. amazonensis* em fibroblastos, eles demonstraram por fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão a imunolocalização do receptor de manose durante a interação com o parasito, nesse sentido, o Rab5, tendo seu papel no tráfego endossomal (Hespanhol *et al.*, 2005).

Nos grupos de macrófagos infectados, houve o recrutamento do Rab5 para as duas espécies de *Leishmania*, porém a maior expressividade se deu em macrófagos infectados com *L. amazonensis* do que em *L. braziliensis* desde o período inicial, 1 hora. No processo de endocitose de macrófagos infectados com *L. donovani* há o recrutamento de Rab5 para a formação de vacúolos parasitóforos, onde os parasitos são capazes de residir nestes compartimentos (Verma *et al.*, 2017). Desse modo, sugerindo que o Rab5 poderia estar participando da endocitose de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* através da formação dos endossomos iniciais, em que *L. amazonensis* parece induzir maior recrutamento do que *L. braziliensis*.

Nos grupos de fibroblastos infectados, houve a participação da actina no processo de entrada dos parasitos e a formação de endossomo inicial em fibroblastos com *L. amazonensis* em 18 horas e em fibroblastos com *L. braziliensis* em 24 horas, sendo a marcação mais expressiva de Rab5 em fibroblastos com *L. braziliensis* também em 24 horas. Corroborando com um estudo, que observou que a marcação do Rab5 em fibroblastos diferiu entre as espécies nos tempos de 5 horas para *L. amazonensis* e 18 horas para *L. braziliensis* (Queiroz Filho, 2018). Sugerindo-se que a infecção em fibroblastos, assim como em macrófagos, pode adotar comportamentos diferentes dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida.

Houve a concentração pontual do Rab5 ao redor das duas espécies de *Leishmania* utilizadas nos tempos deste estudo, podendo ser devido ao fato do anticorpo ser policlonal e essa proteína ser conservada em células eucarióticas (Rastogi *et al.*, 2016).

A sobrevivência da *Leishmania* dentro dos macrófagos depende da resistência às condições adversas criadas pelo fagócito. Após a fagocitose, as promastigotas de *Leishmania* são internalizadas em fagossomas, onde elas se diferenciam em amastigotas e para escapar do ambiente hostil do fagossoma, as promastigotas promovem o atraso da fusão do fagossomo e o lisossoma, retardando ou inibindo a maturação endossomal como observado pela expressão tardia de Rab7 e LAMP-1 (Olivier *et al.*, 2005).

No processo de invasão, a interação das organelas da via endocítica com o vacúolo parasitóforo (VP) em formação foi confirmada com o uso de marcadores como Rab5, Rab7 e Lamp1 (De Souza *et al.*, 2010; Wilkowsky e Barbieri, 2002; Andrade, 2005) demonstrando a participação de endossomos iniciais, endossomos tardios e lisossomos na entrada por *T. cruzi*. Embora vários mecanismos tenham sido sugeridos para internalização de *T. cruzi* em células hospedeiras (De Souza *et al.*, 2010), porém, poucos deles foram cuidadosamente caracterizados.

De modo geral, observamos que nos períodos de interação de promastigotas tanto com macrófagos quanto com fibroblastos, houve a indução de estruturas semelhantes a cortinas que são ricas em actina. A entrada de promastigotas através do acúmulo de actina foi associada ao atraso na fusão do VP, observado pelo marcador de endossomo tardio e lisossomo Lamp-1, que, apesar de se mostrar homogêneo pelo citoplasma celular, também esteve presente no processo de formação dos VPs em macrófagos com *L. amazonensis* a partir de 1 hora, em macrófagos com *L. braziliensis* a partir de 3 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* a formação de VPs se deu a partir de 18 horas de interação, o que não ocorreu em *L. amazonensis*.

Enquanto em macrófagos, a endocitose induzida pela *Leishmania* é relatada após a captação do parasito (Forestier *et al.*, 2011) em diferentes células hospedeiras, pode facilitar o próprio processo de invasão (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019; Andrade, 2019). Este parece ser o caso da entrada de *L. braziliensis* nos fibroblastos observados em nosso estudo. A localização de promastigotas de *L. amazonensis* que entraram em fibroblastos com o marcador Lamp1 sugere que o recrutamento do lisossomo realmente ocorre concomitante com a invasão do

parasito e que os lisossomos podem doar sua membrana para a formação do VP (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019).

Quanto ao papel da actina no processo de endocitose, observamos estruturas que circundam os parasitos, como por exemplo, em macrófagos com *L. braziliensis* em 1 hora (Figura 12 C - seta laranja) e 3 horas (Figura 13 C - seta laranja) parecido como um copo de actina, que pode ser construído em eventos de fagocitose (Swanso, 2008). A presença de copos de actina circundando *L. amazonensis* se assemelhava ao mecanismo de fagocitose clássica (Morehed *et al.*, 2022).

A participação dos F-actina durante processo de infecção de macrófagos por *L. donovani*, utilizando a citocalasina-D, um despolarizador de F-actina, no qual, o grupo de macrófagos tratados com a droga teve uma diminuição no número de parasitos internalizados. (Roy *et al.*, 2014). Desse modo, a actina participa do processo de entrada de *Leishmania* em macrófagos (Love *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2014; Dixit *et al.*, 2021). Sugere-se que a actina também está participando do processo de internalização em fibroblastos, uma vez que, observamos projeções citoplasmáticas – filopódios e lamelipódios – próximas aos parasitos de ambas as espécies.

Assim como projeções citoplasmáticas - filopódios e lamelipódios, grandes projeções de membrana, que formam grandes dobras, semelhante a cortinas (Ridley, 1994) associados a macropinocitose (Swanso, 2008), denominado *ruffles*, também foram observados em nossos achados de forma complementar, na observação das projeções membranares através da imunofluorescência e microscopia de varredura.

A formação de agregados de actina do tipo *ruffles* no processo de adesão de promastigotas de *L. infantum* em macrófagos ocorre antes da formação fagossomal (Dixit *et al.*, 2014). Na interação entre *L. shawi*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e células do sistema nervoso (micróglia), a internalização ocorreu via fagocitose clássica apresentando projeções citoplasmáticas (*ruffles*) (Ramos *et al.*, 2014). Estas extensões apresentam-se em forma de folha na superfície celular que se formam através de montagem em feixes de filamentos de actina abaixo da membrana plasmática, característica ao mecanismo de macropinocitose (Borm *et al.*, 2005).

Além do seu envolvimento na infecção, a macropinocitose está recebendo atenção por seu papel na defesa imunológica e na eliminação de corpos apoptóticos. Os eventos

macropinocíticos podem começar com estímulos externos que desencadeiam a ativação dos receptores tirosina quinase, que por sua vez, ativam três vias de sinalização diferentes envolvendo as proteínas Rac1, Rab5, Arf6 e PI3 quinases (Bar-Sagi *et al.*, 1987).

Esses eventos induzem mudanças na dinâmica dos filamentos de actina, que são essenciais para a formação de projeções na membrana plasmática (Lanzetti *et al.*, 2004). Além disso, proteínas da superfamília Ras GTPases desempenham papel importante na ativação deste processo. Conferindo assim, a importância dessas vias para o fechamento da macropinocitose e o tráfego de membranas (Schnatwinkel *et al.*, 2004).

A presença de *ruffles* em fibroblastos também pode ser observada através da imunofluorescência e microscopia de varredura. A presença dessas projeções em fibroblastos em contato com as espécies de *Leishmania* sugerem a macropinocitose também como rota de entrada para estas células, que não são fagócitos profissionais (Queiroz Filho, 2018).

Desse modo, nossa hipótese é que, as projeções formadas por actina podem estar envolvidas no processo de adesão ou de entrada de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em macrófagos e fibroblastos e, conseqüentemente, a ativação dessas células para o processo de internalização possa ocorrer via fagocitose clássica, assim como também por macropinocite.

Entre as espécies, observamos que para *L. amazonensis* parece haver primeiramente o recrutamento de Rab5 juntamente com a atividade de actina, enquanto, para *L. braziliensis* o envolvimento de actina parece ser predominante. Por outro lado, outros estudos demonstraram que a entrada de *L. amazonensis* em fibroblastos murinos não necessitou de atividade do citoesqueleto de actina (Cavalcante-Costa, 2019) e a internalização de duas diferentes cepas de *T. cruzi* foi dependente ou não de actina (Ferreira *et al.*, 2006). Portanto, os parasitos de diferentes espécies parecem necessitar da actina para o processo de invasão em fibroblastos, mas parecem utilizar estratégias diferentes em seus processos de entrada e no caso deste estudo, em fibroblastos infectados com *L. amazonenses*, a actina parece ter um papel secundário.

Ao determinar o índice de adesão e infecção das promastigostas de *Leishmania* em macrófagos e fibroblastos, foi possível observar uma maior adesão de parasitos das duas espécies de *Leishmania* em macrófagos nos tempos iniciais, 1, 3 e 5 horas. Por outro lado, em fibroblastos com *L. braziliensis* houve um maior número de parasitos aderidos no tempo de 1 hora e em fibroblastos com *L. amazonensis* em 24 horas.

Para o índice de infecção, os macrófagos apresentaram um maior número de parasitos, de ambas as espécies, internalizados nos tempos iniciais, 1, 3 e 5 horas, havendo a diminuição deste índice a partir de 18 horas. Em contrapartida, em fibroblastos, o índice de parasitos internalizados aumentou progressivamente ao longo dos tempos e apresentam maior índice de infecção para o tempo de 24 horas, também para as duas espécies de *Leishmania*.

O índice de adesão de *L. amazonensis* apresentou comportamento distinto no que diz respeito às células hospedeiras, aumentando ao longo do tempo em fibroblastos e diminuindo em macrófagos. Em *L. braziliensis* o comportamento foi semelhante em ambas as células hospedeiras, onde houve uma diminuição no número de parasitos aderidos tanto em macrófagos quanto em fibroblastos. A divergência de comportamentos (afinidade e reprodução) dos parasitos *L. infantum* e *L. mexicana* nos fibroblastos podem ser provenientes de células de diferentes roedores (Minero *et al.*, 2004).

Dessa maneira, é possível observar que os achados da análise ultraestrutural corroboram com os resultados da imunofluorescência para actina, onde se pôde verificar e comparar através destas metodologias os diferentes tipos de projeções de membrana entre as células hospedeiras infectadas. Corroboraram também com o índice de adesão determinado neste estudo para macrófagos e fibroblastos infectados com as espécies de *Leishmania*, pois há, um maior acúmulo de parasitos nos tempos iniciais, 1 e 3 horas e partir de 5 horas este acúmulo parece diminuir, sugerindo-se a internalização destes parasitos, conforme observado nos índices de infecção.

Apesar de supor que a via de entrada em fibroblastos infectados seja dependente de actina, através de fagocitose/macropinocitose fazem-se necessários mais estudos para identificar outras possíveis estratégias para a invasão de fagócitos não profissionais. É possível que o próprio flagelo da promastigota desempenhe um papel mais importante na invasão do que se pensava. De acordo com estudos *in vitro* mais antigos, o flagelo poderia servir como âncora dentro da célula invadida, pelo qual o parasito se puxa para dentro ao penetrar células com capacidade fagocítica limitada (Lewis, 1974), o que nos permite sugerir que os parasitos parecem possuir vários mecanismos que lhe permitiriam entrar nas células hospedeiras. É provável que estes mecanismos possam alternar-se ou mesmo complementar-se dependendo do tipo de célula atacada e da espécie de *Leishmania* (Valigurová e Kolářová, 2023).

Os fagócitos profissionais do sistema imunológico dos mamíferos desempenham um papel essencial na homeostase e na inflamação, permitindo a eliminação de patógenos e a cura do tecido do hospedeiro (Carneiro e Peters, 2021; Rabinovitch, 1995). Eles são equipados com receptores fagocíticos e compostos envolvidos na morte celular. O material fagocitado em uma vesícula chamada fagossomo, se destina a se fundir com os lisossomos para a degradação hidrolítica do conteúdo do fagossomo. Se o fagossomo contiver uma carga patogênica, ela também poderá ser eliminada por meio da explosão oxidativa e produção de espécies reativas de nitrogênio, incluindo óxido nítrico (NO) como uma potente molécula leishmanicida (Kolářová e Valigurová, 2021). Neste estudo, os grupos de macrófagos e fibroblastos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania*, tiveram a produção de NO, porém, não houve diferença estatística significativa (dados não mostrados).

Os fibroblastos são uma das células mais abundantes no local de transmissão e são importantes produtores de quimiocinas que atraem macrófagos e neutrófilos. Estas células também interagem diretamente com os macrófagos durante a cicatrização de feridas e podem se mover por diapedese, sendo capazes de disseminar a *Leishmania* (Cavalcante-costa *et al.*, 2019). A vida útil, relativamente longa dos fibroblastos, e sua capacidade limitada de eliminar invasores podem levar a persistência da infecção (Rittig e Bogdan, 2000). Além disso, os fibroblastos são capazes de realizar a fagocitose, mas tem uma capacidade limitada de controlar a infecção por *Leishmania* através da produção de NO (Bogdan *et al.*, 2000). Em camudongos curados, aproximadamente 40% de amastigotas de *L. major* foram encontradas na pele e em fibroblastos de linfonodos drenantes, indicando que eles podem servir como um abrigo seguro e um local de potencial recrudescência (Bogdan *et al.*, 2000; Stenger *et al.*, 1996).

Sabe-se que estudos *in vitro* são bastantes contraditórios comparados aos cenários *in vivo*. Como por exemplo, de pacientes infectados com *L. braziliensis*, onde a resposta inflamatória exacerbada é observada e pequenas quantidades de parasitos são detectadas com a produção de TNF- α e quimiocinas (CCL2/MCP-1, CXL8/IL-8 e CXL9). As diferenças nas respostas dos macrófagos aos parasitos de *Leishmania* foram descritas e os macrófagos de indivíduos com infecção subclínica controlam o crescimento do parasita de forma mais eficiente do que os macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, como observado na infecção humana por *L. braziliensis* (Giudice *et al.*, 2012).

Ao mensurar a produção de citocinas, observamos que houve maior produção de IL-6 em fibroblastos infectados com *L. braziliensis* em 18 horas, comparados aos fibroblastos sem infecção e infectados com *L. amazonensis* sugerindo que *L. braziliensis*, pode ter tentado potencializar uma resposta imune pró-inflamatória. A interleucina-6 atua como uma citocina pró-inflamatória e uma miocina anti-inflamatória. A IL-6 é produzida por macrófagos e por linfócitos T, tem um papel na indução da febre e na resposta inflamatória aguda. Assim, atuam em receptores específicos da membrana das células estimulando a produção de citocinas (Ferguson *et al.*, 1988).

Houve a produção de IL-17A em macrófagos com diferença significativa entre macrófagos sem infecção e macrófagos infectados por *L. braziliensis* em 3 horas. Em contrapartida, em fibroblastos houve também a produção de IL-17A, porém, entre as espécies de *Leishmania* em 18 horas, onde a maior produção se deu na infecção por *L. braziliensis*. A IL-17A está associada a progressão da doença (Kostka *et al.*, 2008), a doenças autoimunes e alguns processos inflamatórios (McGeachy *et al.*, 2019), com papel na quimiotaxia de neutrófilos (Isailovic *et al.*, 2015), sugerindo a tentativa de manter a infecção nos períodos destacados em ambas as células hospedeiras.

Em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* houve a produção de IFN- γ a partir de 1 hora conferindo diferença significativa. Houve também a produção de TNF com diferença entre espécies em 18 e 24 horas, e entre macrófagos sem infecção e macrófagos infectados com *L. braziliensis*.

No entanto, em fibroblastos infectados, apesar de ter apresentado a produção de IFN- γ , não houve diferença estatística significativa. Contudo, houve a produção de TNF com diferença significativa entre as espécies de *Leishmania*, no qual, *L. braziliensis* demonstrou maior produção. Sugerindo assim, que *L. braziliensis* pode ter tentado potencializar uma resposta imune inflamatória, pois, esta espécie pode induzir uma maior resposta imunológica com níveis elevados de citocinas, principalmente de IFN- γ , e causar danos teciduais em pacientes com leishmaniose mucocutânea (Silveira *et al.*, 2009).

Sugere-se ainda, que a resposta exacerbada do sistema imune frente à *L. braziliensis*, pode levar o parasito a desenvolver novas formas de evadir da resposta imune do hospedeiro, infectando células não fagocíticas profissionais. Contudo, através destes mecanismos apresentados na interação entre fibroblastos e as duas espécies de *Leishmania*, e apesar de fibroblastos não usufruírem da mesma maquinaria celular presente nos macrófagos, propõe-se

sua pontencialidade como atores na dinâmica da infecção por *Leishmania* e na sua persistência através de ferramentas para a invasão em células que não são fagócitos profissionais (Valigurová e Kolářová, 2023). Dessa forma, as diferentes espécies de *Leishmania* utilizadas no presente estudo, apresentaram diferenças no que diz respeito ao tempo de recrutamento dos lisossomos, nos índices de adesão e infecção, análise ultraestrutural e produção de citocinas relacionadas à resposta imune inflamatória.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os achados obtidos neste estudo, pode-se inferir que os fibroblastos são de fato potenciais hospedeiros para o parasito *Leishmania* das espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, mesmo não possuindo a maquinaria disponível em fagócitos profissionais como os macrófagos.

No processo de endocitose, ambas as espécies de *Leishmania* em macrófagos recrutaram Rab5 desde o período inicial, 1 hora. Em fibroblastos, o recrutamento de Rab5 ocorreu em 18 horas na infecção por *L. amazonensis* e em 24 horas em infecção por *L. braziliensis*. Ambas as espécies também utilizaram a actina para invadir as diferentes células hospedeiras. Em fibroblastos com *L. amazonensis* parece haver o recrutamento do Rab5 juntamente com atividade de actina em seu processo endocítico, por outro lado, em fibroblastos com *L. braziliensis* o papel de actina parece ser predominante como observado através das projeções membranares por imunofluorescência e análise ultraestrutural.

Foi possível determinar formação dos VPs em macrófagos com *L. amazonensis* a partir de 1 hora, em macrófagos com *L. braziliensis* a partir de 3 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* a formação de VPs se deu a partir de 18 horas e se manteve em 24 horas, o que não ocorreu em fibroblastos com *L. amazonensis*.

Quanto ao índice de adesão, houve maior número de parasitos aderidos para as duas espécies de *Leishmania* em macrófagos, nos tempos iniciais - 1, 3 e 5 horas. Por outro lado, em fibroblastos com *L. braziliensis* houve um maior número de parasitos aderidos no tempo de 1 hora e em fibroblastos com *L. amazonensis* em 24 horas. Para o índice de infecção, os macrófagos apresentaram um maior número de parasitos, de ambas as espécies, internalizados nos tempos iniciais, 1, 3 e 5 horas, havendo a diminuição deste índice a partir de 18 horas. Em fibroblastos, o índice de parasitos internalizados aumentou progressivamente ao longo dos tempos e apresentam maior índice de infecção para o tempo de 24 horas, também para as duas espécies de *Leishmania*.

Durante o processo de infecção houveram a produção de importantes citocinas, onde destacam-se: maior produção de IL-6 em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas (potencialização resposta pró-inflamatória); Maior produção de IL-17A em macrófagos com *L. braziliensis* em 3 horas e também em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas (associado com a progressão da doença e alguns processos inflamatórios); Produção de IFN- γ em macrófagos com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em 1 hora e TNF em macrófagos com *L.*

braziliensis em 18 e 24 horas. Em fibroblastos com *L. braziliensis* em 18 horas houve maior produção de TNF (associado à potencialização da resposta imune inflamatória).

Em suma, tais resultados são novos no que diz respeito a comparação do processo inicial de infecção de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em células fagocíticas profissionais (macrófagos) e células residentes (fibroblastos), demonstrando que as diferentes espécies causadoras das diferentes formas clínicas podem remodelar de forma distinta sua entrada e persistência nas diferentes células hospedeiras.

8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. *Imunologia celular e molecular*. Elsevier. Rio de Janeiro. 1: 564, 2008.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Biologia molecular da célula*. 5a edição. Porto Alegre. Artmed, 2010.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.
- ALEXANDER J; RUSSELL DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advan. Parasitol.* 31, 175–254, 1992.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 2, 2016.
- ANDRADE L.O. Chapter Nine—Plasma membrane repair involvement in parasitic and other pathogen infections. In: Andrade L.O., editor. *Current Topics in Membranes*. Vol. 84. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2019. pp. 217–238.
- ANDRADE LO; ANDREWS NA. The *Trypanosoma cruzi* host-cell inter play: location, invasion, retention, **Nat. Rev. Microbiol.** 3 (10) 819e823, 2005.
- BAR-SAGI D, FERNANDEZ A, FERAMISCO JR. **Regulation** of membrane turnover by ras proteins, **Biosci. Rep.** 7 - 427e434, 1987.
- BOGDAN C, DONHAUSER N, DÖRING R, RÖLLINGHOFF M, DIEFENBACH A, RITTIG MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine** **191 (12)**: 2121-2130, 2000.
- BORM B; REQUARDT RP; HERZOG V; KIRFEL G. Membrane ruffles in cell migration: Indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization. **Experimental Cell Research**, 302 (1): 83–95, 2005.

- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 189p., 2017.
- BRITO, C.C.B. et al. Molecular Cloning and Biochemical Characterization of Iron Superoxide Dismutase from *Leishmania braziliensis*. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 8, p. 595-600, 2018.
- CARNEIRO MB; PETERS NC. The paradox of a phagosomal lifestyle: How innate host cell-*Leishmania amazonensis* interactions lead to a progressive chronic disease. **Front. Immunol.** 12, 728848, 2021.
- CAVALCANTE-COSTA VS, COSTA-REGINALDO M, QUEIROZ-OLIVEIRA T, OLIVEIRA ACS, COUTO NF, DOS ANJOS DO, LIMA-SANTOS J, ANDRADE LO, HORTA MF, CASTRO-GOMES T. Leishmania amazonensis hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of Cell Science** 132 (6): jcs226183, 2019.
- CECCARELLI M, BUFFI G, DIOTALLEVI A, ANDREONI F, BENCARDINO D, VITALE F, CASTELLI G, BRUNO F, MAGNANI M, GALLUZZI L. Evaluation of a kDNA-Based qPCR Assay for the Detection and Quantification of Old World Leishmania Species. **Microorganisms** 8 (12): 2006, 2020.
- CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Leishmaniasis biology, 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/bioly.html>> Acesso em 24 de fev de 2023.
- COURRET N, FRÉHEL C, GOUHIER N, POUCHELET M, PRINA E, ROUX P, ANTOINE JC. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science** 115 (11): 2303-2316, 2002.
- CHANG, KP. Leishmania infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. **American Journal Tropical Medicine**, vol. 27, p. 1084–1096, 1987.

- CHEN JW, MURPHY TL, WILLINGHAM MC, PASTAN I, AUGUST JT. Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. **Journal of Cell Biology** **101** (1): 85-95, 1985.
- DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; AZEVEDO, B. R. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 264, 2016.
- DE SOUZA W, DE CARVALHO TM, BARRIAS ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **Int. J. Cell Biol.** 2010 (2010) 295394.
- DESJARDINS M, DESCOTEAUX A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine** **185** (12): 2061-2068, 1997.
- DOHERTY GJ, MCMAHON HT. Mechanisms of Endocytosis. **Annual Review of Biochemistry** **78**(1): 857–902, 2009.
- ELCICEK, S.; BAGIROVA, M.; ALLAHVERDIYEV, A. M. Generation of avirulent *Leishmania* parasites and induction of nitric oxide production in macrophages by using polyacrylic acid. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 3, p. 237-242, 2013.
- ESPINOSA, O. A., SERRANO, M. G., CAMARGO, E. P. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**. 145: 430– 442, 2016.
- FORESTIER CL, MACHU C, LOUSSERT C, PESCHER P, SPÄTH G.F. Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host Microbe**. 9:319–330. doi: 10.1016/j.chom.2011.03.011, 2011.
- FERGUSON-SMITH AC, CHEN YF, NEWMAN MS, MAY LT, SEHGAL PB, RUDDLE FH. Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. **Genomics**. **2** (3): 203–208, 1988.
- GAUR U, SHOWALTER M, HICKERSON S, DALVI R, TURCO SJ, WILSON ME, BEVERLEY SM. *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter

- LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Experimental Parasitology** **122 (3)**: 182–191, 2009.
- GIUDICE A; VENDRAME C; BEZERRA C; CARVALHO LP; DELAVECHIA T; CARVALHO EM; BACELLAR O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases**, 12, (1):75, 2012.
- GOTO H, LAULETTA LINDOSO JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America** **26 (2)**: 293–307, 2012.
- GUERRA JA, PRESTES SR, SILVEIRA H, COELHO LI, GAMA P, MOURA A, AMATO V, BARBOSA MD, FERREIRA LC. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases** **5 (3)**: e980 2011.
- GUY RA; BELOSEVIC M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and Immunity** 61, 1553–1558,1993.
- HALLÉ M, GOMEZ MA, STUIBLE M, SHIMIZU H, MCMASTER WR, OLIVIER M, TREMBLAY ML. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. **The Journal of biological chemistry** **284 (11)**: 6893-6908, 2009.
- HALDAR, A. K.; NIGAM, U.; YAMAMOTO, M.; et al. Guanylate Binding Proteins Restrict *Leishmania donovani* Growth in Nonphagocytic Cells Independent of Parasitophorous Vacuolar Targeting. **mBio**. **11(4)**:e01464-20, 2020.
- HARTENSTEIN V, MARTINEZ P. Phagocytosis in cellular defense and nutrition: a food-centered approach to the evolution of macrophages. **Cell and Tissue Research** **377 (3)**: 527-547, 2019.
- HERRERA G, BARRAGÁN N, LUNA N, MARTÍNEZ D, DE MARTINO F, MEDINA J, NIÑO S, PÁEZ L, RAMÍREZ A, VEGA L, VELANDIA V, VERA M, ZÚÑIGA MF, BOTTIN MJ, RAMÍREZ JD. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. **Scientific Data** **7 (1)**: 110, 2020.

- HESPANHOL RC, DE NAZARÉ C SOEIRO M, MEUSER MB, DE NAZARETH S L MEIRELLES M, CÔRTE-REAL S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 53 (1): 35-44, 2005.
- HINZE C, BOUCROT E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. **Journal of Cell Science** 131 (23): 1-10, 2018.
- HOLANDA VN, da SILVA WV, DO NASCIMENTO PH, OLIVEIRA RN, LIMA VLM, DE FIGUEIREDO RCBQ. Desafios e perspectivas no tratamento da leishmaniose tegumentar: revisão de literatura. **Revista Interfaces: saúde, humanas e tecnologia** 6 (17): 140-157, 2018.
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan – 10ª ed., 2004.
- KOLÁŘOVÁ I; VALIGUROVÁ A. Hide-and-seek: A game played between parasitic protists and their hosts. **Microorganisms**. 9, 2434, 2021.
- KOLÁŘOVÁ I; VALIGUROVÁ A. Unrevealing the Mystery of Latent Leishmaniasis: What Cells Can Host *Leishmania*? **Pathogens**. 12, 246, 2023.
- KELLY FD, YATES PA, LANDFEAR, SM. Nutrient Sensing in *Leishmania*: Flagellum and Cytosol. **Molecular Microbiology** 00: 1-11, 2020.
- KOHL K, ZANGGER H, ROSSI M, ISORCE N, LYE LF, OWENS KL, BEVERLEY SM, MAYER A, FASEL N. Importance of polyphosphate in the *Leishmania* life cycle. **Microbial Cell** 5 (8) :371-384, 2018.
- KORNILOVA, E. S. Receptor Mediated Endocytosis and Cytoskeleton. *Biochemistry (Moscow)*, 79 (9): 865–878, 2014.
- KULKARNI MM, JONES EA, MCMASTER WR, MCGWIRE BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. **Infection and Immunity** 76 (4): 1738-1747, 2008.
- KUMAR GA, KARMAKAR J, MANDAL C, CHATTOPADHYAY A. *Leishmania donovani* Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. **Scientific Reports** 9 (1): 12636, 2019.

- KHAN I, STEEG PS. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. **British Journal of Cancer** **124** (1): 66-75, 2021.
- LANZETTI L, PALAMIDESSI A, ARECES L, SCITA G, Rab5 is a signalling GTPase involved in actin remodelling by receptor tyrosine kinases, **Nature** 429 -309e314, 2004.
- LEWIS DH. Infection of tissue culture cells of low phagocytic ability by *Leishmania Mexicana mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 68:327–336. doi: 10.1080/00034983.1974.11686955, 1974.
- LEVIN R, GRINSTEIN S, SCHLAM D. Phosphoinositides in phagocytosis and macropinocytosis. **Biochimica et Biophysica Acta** **1851** (6): 805-823, 2015.
- LIEVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P. M. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. **FEBS Journal**, v. 4, n. 283, p. 598-607, 2015.
- LOVE DC; ESKO JD; MOSSER DM. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **The Journal of Cell Biology.** 123, 759–766, 1993.
- MACHADO GU, PRATES FV, MACHADO PRL. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 94 (1) :09-16, 2019.
- MAROLI, M.; FELICIANGLI, M. D.; BICHAUD, L. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology.** **27** (2):123-47, 2013.
- MARETTI-MIRA AC, OLIVEIRA-NETO MP, DA CRUZ AM, OLIEITA MP, CRAFT M, PIRMEZ, C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin. Exp. Imm.* 163(2): 207-214, 2010.
- MATHEOUD D., MORADIN N., BELLEMARE-PELLETIER A., SHIO M.T., HONG W.J., OLIVIER M., GAGNON E., DESJARDINS M., DESCOTEAUX A. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host & Microbe**, vol. 14, p. 15-25, 2013.

- MAURÍCIO IL. Leishmania Taxonomy. In: **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Bruschi F, Gradoni L. (eds.). Springer International, 2018. P. 15-30.
- MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9 (6): 446–454, 2008.
- MUVDI-ARENAS S, OVALLE-BRACHO C. Mucosal leishmaniasis: A forgotten disease, description and identification of species in 50 Colombian cases. **Biomédica** 39: 58-65. 2019.
- MUXEL, S. M.; AOKI, J. I.; FERNANDES, J. C. R. et al. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers Microbiology**. 8:2682, 2018.
- MYLVAGANAM S, FREEMAN SA, GRINSTEIN S. The cytoskeleton in phagocytosis and macropinocytosis. **Current Biology** 31 (10): R619–R632, 2021.
- NOVO, S. P. C. et al. The process of *Leishmania* infection - disease and new perspectives of paleoparasitology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 45, p. 1-8, 2016.
- OKWOR I, UZONNA J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 94 (3): 489–493, 2016.
- PETERS C; AEBISCHER T; STIERHOF Y; FUCHS M; OVERATH P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes **J Cell Sci**. 108 (12): 3715–3724, 1995.
- PIRES A. M.; COSTA G. C.; GONÇALVES E. G. R. et al. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Revista de Ciências da Saúde**. 14(1):30-39, 2012.
- PODINOVSKAIA M, DESCOTEAUX A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology** 10 (1): 111-129, 2015.
- PODINOVSKAIA M, SPANG A. The Endosomal Network: Mediators and Regulators of Endosome Maturation. **Progress in Molecular and Subcellular Biology** 57: 1–38, 2018.

- POTERYAEV D, DATTA S, ACKEMA K, ZERIAL M, SPANG A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. **Cell** **141** (3): 497-508, 2010.
- QUEIROZ FILHO TN. Avaliação do processo de invasão de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* em célula não fagocítica profissional. **Universidade Federal do Pará**, 2018.
- RABINOVITCH M. Professional and non-professional phagocytes: An introduction. **Trends Cell Biol.** 5, 85–87, 1995.
- RAMOS P; BRITO M; SILVEIRA F; SALGADO C; DE SOUZA W, PICANÇO-DINIZ C, & PICANÇO-DINIZ, J. In vitro cytokines profile and ultrastructural changes of microglia and macrophages following interaction with *Leishmania*. **Parasitology**, 141 (8): 1052-1063, 2014.
- RASTOGI R, VERMA JK, KAPOOR A, LANGSLEY G, MUKHOPADHYAY A. Rab5 Isoforms Specifically Regulate Different Modes of Endocytosis in *Leishmania*. **Journal Biol Chem**, 291(28):14732-46, 2016.
- REZA, S. et al. Cytokine profile and nitric oxide levels in macrophages exposed to *Leishmania infantum* FML. **Experimental Parasitology**, v. 203, n. 1, p. 1-7, 2019.
- RIDLEY DS. In *The Leishmaniases in Biology and Medicine. Vol. II* (ed. W. Peters and R. Killick-Hendrick), pp. 665–701, Pathology Academic Press, London, 1987.
- RITTIG MG; BOGDAN C. *Leishmania*-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol. Today** . 16, 292–297, 2000.
- RODRÍGUEZ NE, GAUR U, WILSON ME. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cellular Microbiology** **8** (7): 1106-1120, 2006.
- RODRIGUES, A. P. D. et al. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. **Cell Biology International**, v. 35, p. 335-343, 2011.
- ROSESTOLATO CT, DUTRA JM, DE SOUZA W, CARVALHO TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. **Cell Struct. Funct.** 27 -91e98, 2002.

- SCIANIMANICO S, DESROSIERS M, DERMINE JF, MÉRESSE S, DESCOTEAUX A, DESJARDINS M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. **Cellular Microbiology** **1** (1): 19-32, 1999.
- SCHNATWINKEL C, CHRISTOFORIDIS S, LINDSAY MR, UTTENWEILER-JOSEPH S, WILM M. The rab 5 effector Rabankirin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms, **PLoS Biol.** 2 - e261, 2004.
- SCORZA BM, WACKER MA, MESSINGHAM K, KIM P, KLINGELHUTZ A, FAIRLEY J, WILSON ME. Differential Activation of Human Keratinocytes by *Leishmania* Species Causing Localized or Disseminated Disease. **Journal of Investigative Dermatology** **137** (10): 2149-2156, 2017.
- SCOTT CC, VACCA F, GRUENBERG J. Endosome maturation, transport and functions. **Seminars in Cell & Developmental Biology** **31**: 2–10, 2014.
- SÉGUIN O, DESCOTEAUX A. (2016). *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology** **309**: 1–6, 2016.
- SILVA-ALMEIDA, M. et al. Extracellular matrix alterations in experimental *Leishmania amazonensis* infection in susceptible and resistant mice. **Veterinary Research**, v. 43, n. 10, p. 1-9, 2012.
- SILVA, S. C. et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that *Leishmania braziliensis* strain helps determine antimony response among American Tegumentary Leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, v. 178, p. 34-39, 2018.
- SILVEIRA FT, LAINSON R, CORBETT CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz** **99** (3): 239–251, 2004.
- SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 00: 1–12, 2019.
- STEVEDING, D.; The history of Leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 82, p. 1-10, 2017.

- SPÄTH GF, GARRAWAY LA, TURCO SJ, BEVERLEY SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** **100 (16)**: 9536-9541, 2003.
- STRAZZULLA A, COCUZZA S, PINZONE MR, POSTORINO MC, COSENTINO S, SERRA A, CACOPARDO B, NUNNARI G. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International** **2013**: 805108, 2013.
- SUNTER J, GULL K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology** **7 (9)**: 170165, 2017.
- STENGER S; DONHAUSER N; THÜRING H; RÖLLINGHOFF M; BOGDAN C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.** **183**, 1501–1514, 1996.
- SWANSON JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nature reviews Molecular cell biology** **9 (8)**: 639–649, 2008.
- TABBABI, A. Review of *Leishmania* in the Middle East and North Africa. **African Health Sciences.** **19 (1)**: 1329-1337, 2019.
- TASLIMI Y, ZAHEDIFARD F, RAFATI S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology** **145 (04)**: 497–507, 2018.
- TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 9, p. 1-4, 2013.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology.** v. 9, n. 2529, 2018.
- VALDIVIA, H. O. et al. Comparative genomics of canine isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral Leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Report.** v. 7, n. 40804, p 1-11, 2017.

- VERMA JK, RASTOGI R, MUKHOPADHYAY A. Leishmania donovani resides in modified early endosomes by upregulating Rab5a expression via the downregulation of miR-494. **PLOS Pathogens** **13** (6): e1006459, 2017.
- WALPOLE GFW, GRINSTEIN S. Endocytosis and the internalization of pathogenic organisms: focus on phosphoinositides. **F1000 Research** **9**: F1000 Faculty Rev-368, 2020.
- WALKER DM, OGHUMU S, GUPTA G, MCGWIRE BS, DREW ME, SATOSKAR AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell. Mol. Life Sci.** 71:1245–1263. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1, 2014.
- WHO. Clinical forms of the leishmaniasis. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/index2.html> Acesso em 24 de fev de 2023.
- WHO. Leishmaniasis, 2021. **World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em 24 de fev de 2023.
- WHO. “Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines an update based on the outcomes of WHO regional meetings, literature review and experts opinion” **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2012.
- WILSON ME, PEARSON RD. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. **Infection and immunity** **56** (2): 363–369, 1988.
- WILKOWSKY SE; BARBIERI MA; STAHL PD; ISOLA EL. Regulation of Trypanosoma cruzi invasion of non phagocytic cells by endocytically active GTPase dynamin, Rab5 and Rab 7, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 291- 516e521, 2002.
- ZHI-QIANG, Z. et al. Adipose extracellular matrix promotes skin wound healing by inducing the differentiation of adipose derived stem cells into fibroblasts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 43, n. 2, p. 890-900, 2019.
- ZIELLO JE, HUANG Y, JOVIN IS. Cellular endocytosis and gene delivery. **Molecular medicine** **16** (5-6): 222–229, 2010.