

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CITOESQUELETO E VIAS DE
SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE *Leishmania*
amazonensis. EFEITO DA PROTEÍNA P21-His₆ DE *Trypanosoma cruzi* EM
INFEÇÃO POR *Leishmania amazonensis in vivo*

Thaise Lara Teixeira

Uberlândia
Março – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CITOESQUELETO E VIAS DE
SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE *Leishmania*
amazonensis. EFEITO DA PROTEÍNA P21-His₆ DE *Trypanosoma cruzi* NA
INFECCÃO POR *Leishmania amazonensis in vivo*

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre.

Thaise Lara Teixeira

Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Uberlândia

Março – 2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Thaise Lara Teixeira

“PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CITOESQUELETO E VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO TRÁFEGO INTRACELULAR DE *Leishmania amazonensis*. EFEITO DA PROTEÍNA P21-His6 DE *Trypanosoma cruzi* EM INFECÇÃO POR *Leishmania amazonensis* in vivo”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 26 de março de 2014.

Prof. Dr. Matheus Henrique S. Dias – INSTITUTO BUTANTAN/SP

Profa. Dra. Kelly Yoneyama – INGEB/UFU

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

Dedicatória

Aos meus amigos e companheiros de pesquisa. Aos meus pais e meu 'namorado', pela paciência, pelo entendimento, pelo companheirismo durante a elaboração desse trabalho de pesquisa.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

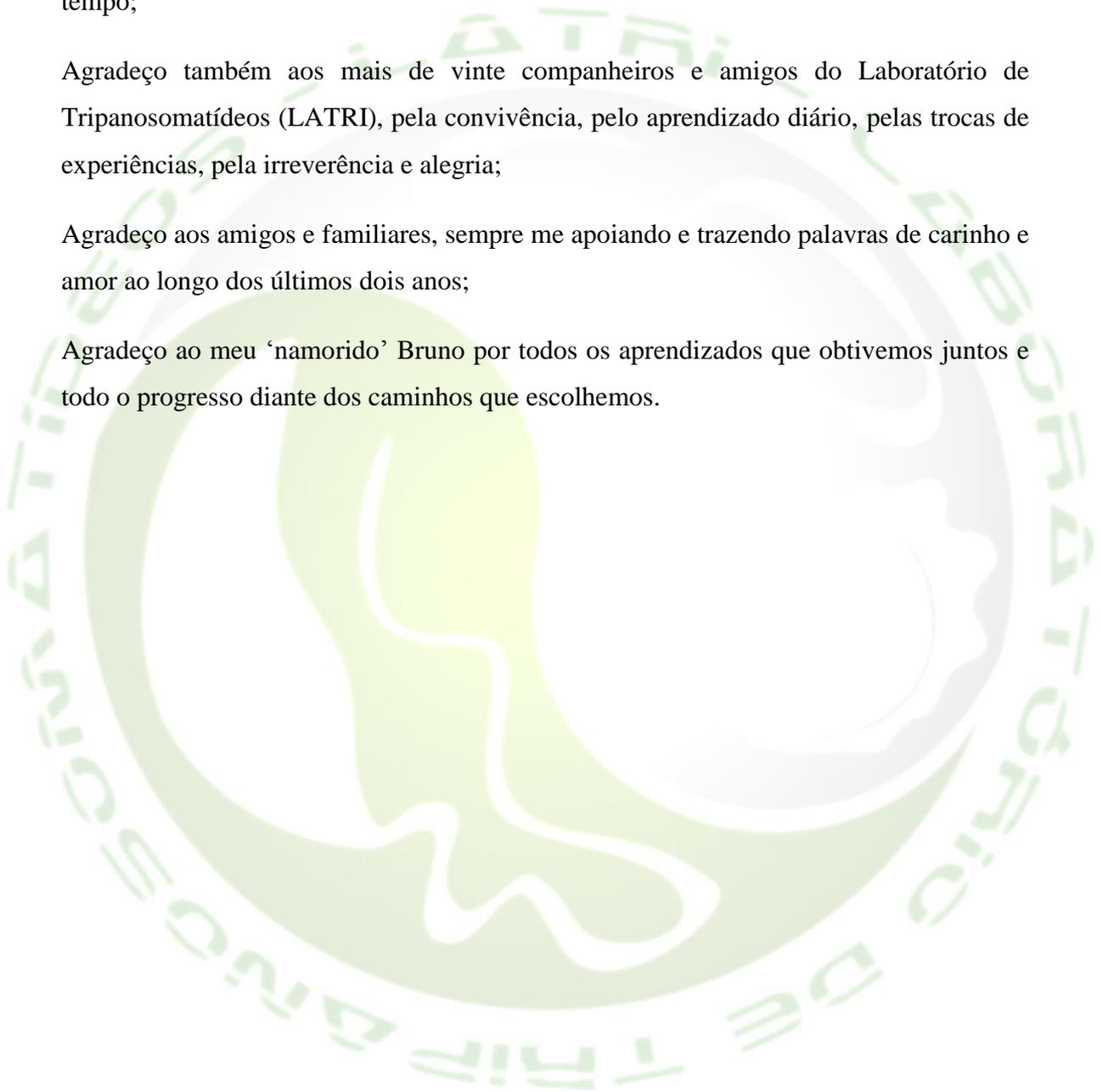
Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva pela oportunidade que me concedeu, pela confiança e amizade que construímos ao longo do tempo;

Agradeço também aos mais de vinte companheiros e amigos do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pela convivência, pelo aprendizado diário, pelas trocas de experiências, pela irreverência e alegria;

Agradeço aos amigos e familiares, sempre me apoiando e trazendo palavras de carinho e amor ao longo dos últimos dois anos;

Agradeço ao meu ‘namorado’ Bruno por todos os aprendizados que obtivemos juntos e todo o progresso diante dos caminhos que escolhemos.



LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Inibidores das vias de sinalização 38

Tabela 2. Dosagem proteica dos extratos celulares para Western blot das vias de sinalização 53

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Reagentes utilizados na reação de PCR convencional..... 92

Tabela 2. Condições de amplificação para Reação de PCR convencional..... 92

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real..... 93

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Efeito da citocalasina D na invasão e na multiplicação de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murinos.	43
Figura 2. Citometria de fluxo para confirmação do <i>Knockdown</i>	45
Figura 3. Ensaio de invasão com <i>L. amazonensis</i> e macrófagos C57 BL/6 WT e <i>knockdown</i> (KD) para AFAP1L1, Arp2, Gal-3, Septina 4 e 14 e WASp.	46
Figura 4. Multiplicação de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos C57 BL/6 WT e <i>knockdown</i> (KD) para Arp2, Gal-3 e WASp.....	47
Figura 5. Invasão de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos de C57 BL/6 WT e KD pré-fixados com formaldeído.....	48
Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos tratados durante 1 hora e 24 horas com os inibidores das vias de sinalização celular.	51
Figura 7. Sinalização celular envolvida do tráfego de lisossomos para o fagossomo contendo <i>L. amazonensis</i>	52
Figura 8. Western Blot para verificar ativação das vias ERK, AKT durante a cinética de invasão de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais de BALB/c..	53
Figura 9. Sinalização celular envolvida no processo de invasão de <i>L. amazonensis</i> . ..	54
Figura 10. Número de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais de BALB/c após 24 horas de invasão tratados continuamente com inibidores das vias mTOR, ERK, MEK1/2, Akt e Ras.	54
CAPÍTULO 2	
Figura 1. Efeito da proteína P21-His ₆ nas patas de camundongos BALB/c infectadas por <i>L. amazonensis</i>	95
Figura 2. Gel de poliacrilamida da curva de <i>L. amazonensis</i>	97
Figura 3. Dados representativos do qPCR em tempo real.....	99
Figura 4. Proteína P21-His ₆ aumenta a carga parasitária de <i>L. amazonensis</i> em patas de camundongos BALB/c.	100
Figura 5. Produção da citocina IL-1 β nos tecidos da pata, linfonodo do poplíteo e baço dos diferentes grupos.....	101

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
CAPÍTULO 1	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1.0 Introdução	15
1.1 Aspectos gerais dos protozoários pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	15
1.2 Interação entre <i>Leishmania</i> - hospedeiro vertebrado	17
1.3 Citoesqueleto Celular do Hospedeiro Vertebrado	20
1.3.1 Septinas	21
1.3.2 Complexo Arp2/3	21
1.3.3 AFAP1	22
1.3.4 Galectina-3	23
1.3.5 WASp	25
1.4 Sinalização celular	26
1.4.1 Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)	26
1.4.2 Proteína quinase B (AKT)	27
1.4.3 Proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK)	28
1.4.4 Proteína alvo da Rapamicina em mamíferos (mTOR)	29
1.4.5 Proteína Sarcoma Vírus (Ras)	29
1.4.6 Proteína quinase ativada por mitógeno (MEK)	30
1.4.7 Modulação da sinalização celular por <i>Leishmania</i> spp	30
2.0 Objetivos	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3.0 Material e Métodos	34
3.1 Aspectos éticos e local do estudo	34
3.2 Animais	34
3.3 Manutenção dos parasitos e células	34

3.4 Purificação de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> a partir de patas de camundongos BALB/c	35
3.5 Obtenção de macrófagos peritoneais de BALB/c	35
3.6 Ensaios de invasão e multiplicação com macrófagos de C57/B6 Wild Type imortalizados e peritoneais de BALB/c tratados ou não com citocalasina D	36
3.7 Obtenção de células <i>Knockdown</i> (KD) para diversas proteínas celulares	36
3.8 Ensaios de invasão e multiplicação com células <i>knockdown</i>	37
3.9 Citometria para confirmação do shRNA.....	37
4.0 Ensaio de invasão com macrófagos fixados	38
4.1 Inibidores de vias de sinalização e suas respectivas concentrações de uso	38
4.2 Ensaio de viabilidade com os inibidores das vias de sinalização	39
4.3 Ensaio de cinética durante a formação do fagolisossomo utilizando inibidores das vias de sinalização celular.....	39
4.4 Ensaio de invasão utilizando inibidores das vias de sinalização celular	40
4.5 Ensaio de multiplicação utilizando inibidores das vias de sinalização celular	40
4.6 Western Blot para verificar as vias de sinalização envolvidas durante o processo de invasão de <i>L. amazonensis</i>	40
4.7 Análise estatística	41
5.0 Resultados	42
5.1 Efeito da citocalasina D na invasão e multiplicação de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murinos.....	42
5.2 Proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina interferem no processo de invasão e multiplicação de <i>L. amazonensis</i>	44
5.3 Vias de sinalização envolvidas no tráfego intracelular de <i>L. amazonensis</i>	49
6.0 Discussão	55
6.1 Participação do citoesqueleto celular do hospedeiro na infecção de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	55
6.2 Sinalização celular envolvida no tráfego intracelular de <i>L. amazonensis</i>	60
7.0 Conclusão	64
8.0 Referências Bibliográficas	65

CAPÍTULO 2	83
RESUMO	84
ABSTRACT	85
1.0 Introdução	86
1.1 A proteína P21 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
2.0 Objetivos	88
2.1 Objetivo geral	88
2.2 Objetivos específicos	88
3.0 Material e Métodos	89
3.1 Aspectos éticos	89
3.2 Parasitos	89
3.3 Animais	89
3.4 Ensaio <i>in vivo</i>	89
3.5 Medição das patas	90
3.6 Coleta de órgãos	90
3.7 PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR)	91
3.8 ELISA para pesquisa da citocina IL-1 β	93
4.0 Resultados	94
4.1 Efeito da proteína P21-His ₆ na evolução da lesão de pata infectada com	94
<i>L. amazonensis</i>	94
4.2 Efeito da proteína P21-His ₆ na carga parasitária e na produção de IL-1 β	96
5.0 Discussão	102
5.1 Papel pró-fagocítico da proteína P21-His ₆ <i>in vivo</i>	102
5.2 Papel da Proteína P21-His ₆ na infecção por <i>L. amazonensis</i>	103
6.0 Conclusão	106
7.0 Referências Bibliográficas	107
ANEXOS	109

CAPÍTULO 1

RESUMO

Leishmania spp são protozoários intracelulares obrigatórios, que podem causar um complexo de doenças infecciosas conhecidas como leishmanioses, que afetam milhões de pessoas mundialmente. A interação entre patógeno-hospedeiro envolve moléculas de superfície do parasito e receptores celulares que culminam na fagocitose. Este processo de internalização envolve modificações no citoesqueleto celular por meio da interação com proteínas relacionadas à polimerização de actina, como AFAP, Complexo Arp2/3, Galectina-3, Septinas e WASp, bem como a ativação de vias de sinalização. Sabe-se que formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após a entrada nos fagócitos, estão presentes em fagossomos, e essas vesículas sofrem um processo de maturação, formando o fagolisossomo importante para a diferenciação da forma promastigota em amastigota. Este trabalho teve como objetivo, entender quais proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina exercem papel no processo de invasão e na multiplicação de *L. amazonensis*, bem como, quais vias de sinalização estão envolvidas no processo de formação do fagolisossomo, na invasão e na multiplicação deste protozoário na célula hospedeira. Para isso, fizemos ensaios de invasão e multiplicação em macrófagos imortalizados C57 BL/6 e peritoneais de BALB/c tratados ou não com citocalasina D, ensaio de invasão em macrófagos C57 BL/6 previamente fixadas em formaldeído, ensaio com macrófagos C57 BL/6 *knockdown* para as proteínas AFAP-1L1, Arp2, Galectina-3, Septina 4 e 14 e WASp, comparando com células *Wild Type*. E ainda, ensaios de cinética de formação do fagolisossomo e ensaios de invasão e multiplicação utilizando inibidores das vias de sinalização envolvendo Akt, ERK2, MEK1, MEK1/2, mTOR, PI3K e Ras foram realizados. Os resultados mostram que *L. amazonensis* invadiu células deficientes na polimerização de actina, e também células fixadas, bem como a diminuição da expressão das proteínas Arp2, Galectina-3 e WASp aumentaram a internalização desses parasitos. As vias de sinalização MEK1/2, ERK2, AKT atrasaram o recrutamento de lisossomos para o fagossomo, e a inibição das vias PI3K, MEK1/2 e ERK2 diminuíram drasticamente a internalização do parasito nas células. Concluímos que *L. amazonensis* foi capaz de invadir ativamente células fagocíticas, e que as proteínas Arp2, Galectina-3 e WASp estão envolvidas no processo de entrada na células hospedeira. Além disso, as vias de sinalização MEK1/2, ERK2 e AKT estão envolvidas na formação do fagolisossomo, bem como as vias PI3K, MEK1/2 e ERK2 parecem favorecer a infecção por *L. amazonensis*.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, citoesqueleto, vias de sinalização.

ABSTRACT

Leishmania spp are obligate intracellular protozoan that can cause a complex of known infectious diseases such as leishmaniasis, affecting millions of people worldwide. The host-pathogen interaction involves the parasite surface molecules and cellular receptors that culminate in phagocytosis. This internalization process involves changes in cytoskeleton through interaction with proteins related to actin polymerization, as AFAP, Arp 2/3 complex, Galectin-3, Septins and WASp, as well as activation and signaling pathways. It is known that *L. amazonensis* promastigotes after entry into phagocytes are present in phagosomes, and these vesicles undergo a maturation process, forming phagolysosome, important for differentiation of the promastigote forms to amastigotes. This study aimed to understand which proteins related to actin cytoskeleton exert role in the process of invasion and multiplication of *L. amazonensis* and which signaling pathways are involved in the formation of phagolysosome, the invasion and multiplication of this protozoan process the host cell. For this, we did invasion and multiplication assays with macrophages C57 BL/6 and BALB/c peritoneal treated or not with cytochalasin D, invasion assay with macrophages C57 BL/6 previously fixed in formaldehyde (0.01%), assay with macrophages C57 BL/6 knockdown for AFAP-1L1, Arp2, Galectin-3, Septin 4, 14 and WASP proteins compared to wild type cells. And yet, assays phagolysosome kinetics of formation and proliferation and invasion assays using inhibitors of Akt, ERK2, MEK1, MEK1/2, mTOR, PI3K and Ras signaling pathways. The results show that *L. amazonensis* invaded cells defective in actin polymerization, as well as fixed cells as well as decreased expression of Arp2, Galectin-3 and WASp proteins increased internalization of these parasites. The signaling pathways MEK1/2, ERK2 and AKT delayed the recruitment of the lysosomes to phagosome, and inhibition of PI3K, MEK1/2 and ERK2 pathways drastically decreased internalization of the parasite in the cells. We concluded that *L. amazonensis* were able to actively invade phagocytic cells, and that the Arp2, Galectin-3 and WASp proteins are involved in the process of entry into host cells. In addition, the MEK1/2, AKT and ERK2 signaling pathways are involved in the formation of phagolysosome as well as PI3K, MEK1/2 and ERK2 pathways seem to favor infection with *L. amazonensis*

Keywords: *Leishmania amazonensis*, cytoskeleton, signaling pathways.

1.0 Introdução

1.1 Aspectos gerais dos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania*, pertencem à Família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastea, e podem ser subdivididos em dois subgêneros: *Vianna* e *Leishmania*. Esta subdivisão está relacionada ao desenvolvimento das formas promastigotas no inseto vetor, às características morfológicas das formas amastigotas e às propriedades infectivas. No subgênero *Vianna*, os promastigotas colonizam os intestinos médio e posterior do flebotômíneo, os amastigotas apresentam tamanho menor (2 a 4 μm) e poucos parasitos ocorrem nas lesões, enquanto no subgênero *Leishmania* os parasitos colonizam o intestino anterior, médio e posterior do invertebrado, os amastigotas são maiores (3 a 6 μm) e as lesões são densamente parasitadas (SHAW, 2006).

Existem 21 espécies descritas no mundo atualmente, sendo que apenas 12 espécies são reconhecidas nas Américas. No Brasil, foram reconhecidas oito espécies sendo seis do subgênero *Vianna* e duas do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies encontradas no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (SHAW, 2006).

Estes protozoários são intracelulares obrigatórios, unicelulares, flagelados e podem causar um complexo de doenças infecciosas conhecidas como leishmanioses, que afetam milhões de pessoas mundialmente. As leishmanioses são consideradas endêmicas em cinco continentes, sendo o gênero *Leishmania* encontrado nas Américas Central e do Sul, bem como na Europa, África e Ásia (ALVAR, et al., 2012).

As leishmanioses afetam principalmente regiões pobres e países em desenvolvimento. Dessa forma, fazem parte do grupo de doenças negligenciadas, por não instigarem interesse da indústria farmacêutica, já que são doenças relacionadas à pobreza, cujo mercado consumidor é de baixa renda (WHO, 2010). Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção e cerca de dois milhões de novos casos ocorram anualmente (WHO 2010, KEDZIERSKI, 2010). O Brasil está entre os países de maior incidência das formas cutânea e mucocutânea, enquanto 90% dos casos de leishmaniose visceral estão distribuídos na Índia, Bangladesh, Etiópia,

Quênia, Sudão e Brasil (ALVAR, et al., 2012).

Existem ao menos quatro formas clínicas distintas causadas pelas espécies encontradas no Brasil: Leishmaniose cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. Estas formas podem ser agrupadas em: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que engloba as formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa e Leishmaniose Visceral (LV). As espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* estão mais relacionadas às LTA enquanto a *L. infantum chagasi* provoca a LV (KAYE; SCOTT, 2011).

Estes parasitos possuem uma notável capacidade de evitar a sua destruição em ambientes hostis, encontrados ao longo do seu ciclo de vida, alternando entre duas formas de vida: promastigotas (forma de vida móvel) flagelados encontrados no trato digestório dos flebotomíneos e amastigotas (forma de vida não móvel) que proliferam dentro das células do hospedeiro mamífero. Promastigotas podem ser ainda classificados como promastigotas procíclicos, que representam um estágio proliferativo e não infectivo, localizados no intestino do inseto vetor, ou promastigotas metacíclicos, forma infecciosa e não proliferativa. Estas saem das células epiteliais do intestino e migram para a parte anterior do trato digestório nos insetos vetores (SACKS, 1984; ASSIS, et al., 2011).

A infecção do inseto vetor ocorre durante o repasto sanguíneo quando a fêmea do flebotomíneo pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas e outras células, contendo formas amastigotas. Na porção anterior do trato digestório do inseto, ocorre à transformação dos amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Após o rompimento da matriz, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se multiplicam. Em seguida, vão para a região anterior do intestino, onde sofrem a metaciclogênese. Durante esse processo os promastigotas reduzem o tamanho corporal, aumentam o tamanho e o batimento flagelar e se tornam altamente infectivas, sendo denominados promastigotas metacíclicos. As formas metacíclicas migram para a probóscide e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo (MISHRA, et al., 2009).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica o mamífero, inoculando formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. Os promastigotas metacíclicos são regurgitados e penetram na pele do hospedeiro, aderindo e invadindo uma gama de tipos celulares. Primeiramente as

formas promastigotas são fagocitadas por células fagocíticas e no interior do vacúolo parasitóforo sofrem diferenciação para a forma amastigota (STUART, et al., 2008). Estas se multiplicam no interior de macrófagos e provocam a lise da célula, liberando amastigotas no tecido, que poderão invadir outras células ou serem sugados por outra fêmea do inseto vetor, completando assim o ciclo de vida desse protozoário (MISHRA, et al., 2009).

O tratamento das leishmanioses consiste primordialmente na quimioterapia. A primeira linha de tratamento é baseada em antimoniais pentavalentes, principalmente nas áreas endêmicas (BORJA CABRERA, et al., 2004; NAGILL; KAUR, 2011). Essas drogas atuam no mecanismo de produção de energia das formas amastigotas de *Leishmania*, interferindo na oxidação de ácidos graxos e na glicólise, causando uma redução na produção de ATP e GTP (BERMAN, et al., 1987). No entanto, sua utilização tem sido comprometida pelo aparecimento de cepas resistentes (NAGILL; KAUR, 2011).

A segunda linha de tratamento inclui drogas como a Anfotericina B e pentamidina, que são consideradas eficazes, mas são relativamente caras e provocam graves efeitos colaterais como: anemia, insuficiência renal, alterações cardiológicas, entre outros (BERMAN, 2003; DAVIS; KEDZIERSKI, 2005). Novas drogas tais como formulações lipídicas de Anfotericina B tem se mostrado eficazes no tratamento de leishmaniose visceral, mas o alto custo dessas drogas impossibilita sua disponibilidade para a maioria dos doentes (BERMAN, et al., 1998; MURRAY, 2004; NAGILL; KAUR, 2011).

1.2 Interação entre *Leishmania* - hospedeiro vertebrado

Após a entrada das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, essas aderem e internalizam em uma gama de células nucleadas como, por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e fibroblastos (KAYE; SCOTT, 2011). A adesão do parasito na célula hospedeira ocorre principalmente pelo flagelo ou corpo celular e o reconhecimento do parasito envolve moléculas presentes na sua superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína 63 (gp63), que se ligam a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos. Os principais receptores dos macrófagos

envolvidos na adesão e no reconhecimento de *Leishmania* são os receptores do sistema complemento (CR1 e CR3), receptores Fc γ , receptores de Manose (MR) e receptores de fibronectina (FnRs) (SILVA-ALMEIDA; et al., 2010; UNENO; WILSON, 2012).

Promastigotas entram em macrófagos predominantemente através do receptor 3 do complemento (CR3), podendo se ligar diretamente ou quando opsonizados, em um processo que depende principalmente da GTPase Rho A (LODGE; DESCOTEAUX, 2005b). O processo de exocitose de membrana celular do hospedeiro proveniente de endossomos, lisossomos, e retículo endoplasmático, contribui para a formação de vesículas conhecidas como fagossomos contendo promastigotas (VINET, et. al., 2009; FORESTIER, et. al., 2011). Esse fornecimento de membrana a partir de vários compartimentos intracelulares contribui para a formação e a composição do vacúolo parasitóforo (MORADIM; DESCOTEAUX, 2012).

Sendo assim, no início da infecção, promastigotas de *Leishmania* são internalizados por macrófagos em fagossomos. Estas estruturas sofrem uma série sequencial de fusões com organelas endocíticas e lisossomos, gerando um compartimento potencialmente microbicida. Em contrapartida, *Leishmania* spp. desenvolveram estratégias para sobreviver intracelularmente nesse ambiente lítico (DESJARDINS, et al., 1997; DERMINE, et al., 2000, MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

Um mecanismo usado por promastigotas para contornar as consequências microbicidas da fagocitose é a inibição da biogênese do fagolisossomo (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997). Assim, os promastigotas são internalizados em fagossomos que interagem com endossomos e lisossomos tardios apresentando um recrutamento tardio de LAMP-1, o que pode ser explicado como possível consequência de um recrutamento deficiente de Rab7 (GAUR, et. al., 2009; RODRIGUEZ, et al., 2011).

O atraso na maturação fagossomal induzida por promastigotas é caracterizada também por acumulação perifagossomal de F-actina (HOLM, et al., 2001), e por retenção fagossomal de componentes da maquinaria de polimerização da actina, incluindo complexo Arp 2/3, proteína Wiskott-Aldrich (WASp), α - actinina, miosina II, e Nck (LODGE; DESCOTEAUX, 2005a). As GTPases da família Rho, cdc 42, Rac 1, Rho A desempenham papel no desenvolvimento de organelas, na dinâmica do citoesqueleto, no movimento celular e outras funções celulares comuns, também estão presentes em fagossomos contendo promastigotas (LODGE; DESCOTEAUX, 2005a; LERM, et al, 2006). A importância desta acumulação perifagossomal de F-actina ainda não é clara, mas pode contribuir para a inibição da maturação fagossomal, interferindo

com o recrutamento de transdutores de sinais e tráfego de vesículas durante a formação do fagolisossomo (LERM, et al., 2006).

Foi demonstrado que moléculas de lipofosfoglicano presentes na membrana celular da *Leishmania* inibem a biogênese fagolisossomal, protegendo os promastigotas e proporcionando a diferenciação em amastigotas (ASSIS, et al., 2011). Além disso, há evidências de que fagossomos contendo promastigotas de *Leishmania* exibem baixas propriedades fusogênicas com organelas endocíticas. No entanto, os mecanismos moleculares pelos quais ocorre a inibição da fusão fagossomo–lisossomo ainda são pouco compreendidos (ASSIS, et al., 2011).

Os trabalhos de Alexander e Vickerman (1975), Chang e Dwyer (1976) foram os primeiros a revelarem que estes parasitos multiplicam nos macrófagos em compartimentos que se fundem com lisossomos. Esta descoberta levou ao estabelecimento de que em mamíferos, as formas amastigotas residem e se multiplicam dentro de fagolisossomos dos macrófagos do hospedeiro. Trabalhos subsequentes mostraram que os amastigotas são resistentes ao ambiente hidrolítico dos fagolisossomos (LEWIS; PETERS, 1977; CHANG; DWYER, 1978).

Os amastigotas entram nos macrófagos através de um processo dependente de Rac1 e ARF6 e são encontrados em vacúolos parasitóforos que interagem com endossomos e lisossomos e adquirem características lisossomais (CHANG; DWYER, 1976; LODGE; DESCOTEAUX, 2006). Consistentemente, vacúolos abrigando amastigotas contêm numerosas hidrolases lisossomais e suas membranas são enriquecidas com proteínas endossomais/lisossomais tardias, como Rab7, LAMP-1 e LAMP-2 (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

H⁺-ATPase vacuolar presente em vacúolos contendo amastigotas é responsável pelo pH ácido (pH 4.7 -5.2) (VINET, et al., 2009). Além disso, os vacúolos contendo amastigotas exibem moléculas características do retículo endoplasmático, tais como calnexina e o regulador de fusão de membrana Sec 22b (NDJAMEN, et al., 2010). Esta observação sugere que vacúolos contendo amastigotas são compartimentos híbridos compostos por componentes do retículo endoplasmático e da via endocítica (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

O fato de amastigotas residirem num ambiente ácido é consistente com o seu metabolismo ótimo (respiração, catabolismo de substratos energéticos e de incorporação de precursores para macromoléculas) em pH ácido (pH 4.0 a 5.5), ao contrário das

formas promastigotas em que estas atividades são ótimas em pH neutro (MUKKADA, et al., 1985).

1.3 Citoesqueleto Celular do Hospedeiro Vertebrado

Livros didáticos e uma vasta gama de artigos definem coletivamente citoesqueleto como um sistema de filamentos e túbulos encontrados dentro das células. Os três componentes bem estabelecidos do citoesqueleto eucariótico são filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários (FLETCHER; MULLINS, 2010). Além disso, as septinas estão presentes em quase todas as células eucarióticas, e assim representam um quarto potencial componente do “citoesqueleto” em eucariotos (MOSTOWY; COSSART, 2012; MOSELEY, 2013).

O citoesqueleto desempenha três funções gerais principais: organiza espacialmente o conteúdo intracelular da célula; liga a célula física e bioquimicamente ao meio ambiente externo; gera forças coordenadas que ativam a célula para se locomover e mudar sua conformação. Para alcançar estas funções, o citoesqueleto integra a atividade de uma ampla variedade de proteínas citoplasmáticas e organelas. Apesar das conotações da palavra "esqueleto", o citoesqueleto não é uma estrutura fixa, cuja função pode ser entendida em isolamento. Pelo contrário, é uma estrutura dinâmica e adaptável cujos componentes polímeros e proteínas reguladoras estão em fluxo constante (DOS REMEDIOS, et. al., 2003, MOSELEY, 2013).

Focando no componente do citoesqueleto celular, a actina, verificamos na literatura que mais de 150 proteínas, até agora, foram encontradas contendo domínios de ligação para a proteína actina. Embora a lista de proteínas associadas com o citoesqueleto de actina continua a crescer, o objetivo último continua - entender como as interações individuais entre essas moléculas dão origem aos comportamentos celulares que dependem delas, (WEINER, et al., 2007; FLETCHER; MULLINS, 2010) tais como Arp-2, AFAP-1L1, Galectina-3, Septinas e WASp que são exemplos de proteínas que interagem com o citoesqueleto participando de diferentes atividades celulares, como polimerização do citoesqueleto de actina e dinâmica na membrana celular (SMITH, et al., 2013; SNYDER, et al., 2011; KOCH, et al., 2010; MOSTOWY; COSSART, 2012).

1.3.1 Septinas

Septinas são proteínas de ligação a GTP que controlam muitos processos celulares por polimerização em complexos de proteína hetero-oligomérica que podem promover a formação de filamentos. Septinas têm sido reconhecidas como um quarto componente do citoesqueleto, devido a sua aparência filamentosa, bem como a sua associação com as membranas celulares, os filamentos de actina e os microtúbulos (MOSTOWY; COSSART, 2012). Nos últimos anos, um número maior de estudos mostrou que septinas orquestram uma grande variedade de processos celulares importantes, incluindo citocinese, ciliogênese e neurogênese, servindo como arcabouço para recrutamento de proteínas e/ou barreiras de difusão para compartimentar domínios celulares. Estudos de interações entre hospedeiro-microrganismo têm destacado papéis até então desconhecidos para septinas durante a infecção bacteriana e também na imunidade inata (MOSTOWY; COSSART, 2012).

Várias pesquisas demonstram a interação de septinas com actina (KINNOSHITA, et al., 2002) e microtúbulos (SELLIN, et al., 2011), bem como com fosfolipídios de membrana (BERTIN, et al., 2010), e estas interações podem influenciar na montagem de septinas em filamentos e anéis. Sendo assim, uma maior compreensão dessas interações ajuda a decifrar os mecanismos pelos quais septinas são encontradas em diferentes locais nas células.

A relação entre septinas e actina envolve uma gama de processos celulares, incluindo formação de filamentos (KINOSHITA, et al., 2002), fagocitose (HUANG, et al., 2008) e motilidade (MOSTOWY, et al., 2010). É também importante saber que septinas podem associar-se a maquinaria de nucleação de actina, como por exemplo, o complexo de proteínas relacionadas com a actina 2 e 3 (complexo ARP2/3) ou a família de proteína da síndrome de Wiskott- Aldrich (WASp), e, assim, controlar a polimerização da actina (MOSTOWY; COSSART, 2012).

1.3.2 Complexo Arp2/3

O controle espacial e temporal da montagem e desmontagem de filamentos de actina é crucial para vários processos celulares distintos, incluindo endocitose, motilidade e invasão de patógenos (POLLARD, 2007). A montagem espontânea de um

conjunto de filamentos de actina a partir de um *pool* de monômeros de actina requer a formação de um núcleo trímero de actina instável, onde a polimerização adicional é termodinamicamente favorável (SEPT; MCCAMMON, 2001). A montagem rápida de filamentos é conseguida por várias classes de proteínas que atuam como nucleadores de actina, constituindo um nível de regulação. Forminas, proteínas nucleadas espirais com filamentos não ramificados (KOVAR, 2006), e o complexo Arp2/3 facilitam a montagem de filamentos ramificados por nucleação (AMANN; POLLARD, 2001). Redes de filamentos ramificados gerados pelo complexo Arp2/3 são necessários para construir muitas estruturas celulares, o complexo Arp2/3 é o nucleador primário de novos filamentos de actina na maioria das células. Defeitos na atividade do complexo Arp2/3 têm sido implicados na ocorrência de diversas doenças, mais notavelmente a metástase em cânceres (GOLEY; WELCH, 2006).

A regulação direta da atividade de nucleação do complexo Arp2/3 leva a um segundo nível de controle sobre a montagem dos filamentos de actina. O complexo Arp2/3 é composto por subunidades: proteínas relacionadas com a actina Arp2 e Arp3, e ARPC1-5. Enquanto a ligação do filamento mãe contribui significativamente para ativação, a atividade total do complexo Arp2/3 requer também a ligação de ATP em Arp2 e Arp3 e a ligação de um Fator Promotor de Nucleação (NPF), como WASP, NWASP (ROHATGI et al., 2000), e as proteínas patogênicas ActA de *Listeria monocytogenes* (WELCH, et al., 1998) e RickA de *Rickettsia* (GOUIN, et al., 2004). A ligação de NPF aos monômeros de actina facilita a reação de nucleação, e a dupla NPF e complexo Arp2/3 ativam as GTPases da família Rho, as quais regulam numerosas funções celulares, muitas delas envolvendo alterações no citoesqueleto incluindo a fagocitose (NARAYANAN, et al., 2011).

1.3.3 AFAP1

Proteínas adaptadoras são proteínas não enzimáticas que têm a capacidade de ligar a diferentes componentes de complexos de sinalização celular através de motivos (motifs) de ligação a proteínas. A Proteína Associada a Filamentos de Actina, de 110 quilodaltons (kDa) (AFAP-110/AFAP1) é uma proteína adaptadora com múltiplos motivos de ligação a proteínas, e é conhecida por atuar tanto como uma proteína de ligação a actina como uma proteína de ativação de c-Src (tirosina-quinases capazes de

gerar transformações celulares via interações pelos domínios SH2 e SH3) (QIAN, et al., 2000).

AFAP1 é conhecida por se ligar aos filamentos de actina através de seu domínio de ligação carboxi-terminal e multimerizar através de seu domínio de leucina, permitindo assim a ligação cruzada com os filamentos de actina (QIAN, et al., 2002). Ativação pela proteína quinase serina/treonina PKC α dirige AFAP1 para co-localizar com c-Src na região perinuclear das células e ativar c-Src por ligação ao domínio SH3 através o seu motivo de ligação N-terminal ao SH3 (WALKER, et al., 2007). Subsequentemente, cSrc, então, tem a capacidade de ativar os sinais celulares a jusante que afetam a adesão, invasão e motilidade celular (FRAME; BRUNTON, 2002) .

AFAP1 representa uma família de três proteínas que incluem também a Proteína associada a Filamentos de Actina 1 tipo 1 (AFAP1L1) e a Proteína Associada a Filamentos de Actina 1 tipo 2 (AFAP1L2/XB130). AFAP1L1 apresenta alta similaridade e estrutura de domínios conservados com AFAP1. Também semelhante a AFAP1, tem capacidade de se associar com os filamentos de actina, podendo ser encontrada em estruturas ricas em actinas como invadossomos, e são capazes de induzir independentemente podossomos sobre superexpressão (SNYDER, et al., 2011).

1.3.4 Galectina-3

A galectina-3 é um membro da família das lectinas, das quais 14 galectinas de mamíferos já foram identificados. A galectina-3 possui aproximadamente 30 kDa e, como todas as galectinas, contém um domínio de reconhecimento e ligação a carboidratos (CRD) de cerca de 130 aminoácidos que permitem a ligação específica a β -galactosídeos (OEVER, et al., 2013).

A galectina-3 tem uma ampla distribuição em tecidos e é encontrada em células que envolvem a resposta imune (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esta proteína multifuncional está implicada em várias funções biológicas, a nível intracelular e extracelularmente (HOOD; CHERESH, 2002). A galectina-3 é essencialmente uma proteína citoplasmática que pode translocar para o núcleo, mitocôndria ou ainda ser secretada. No espaço extracelular, a galectina-3 liga-se a uma variedade de componentes da matriz extracelular como laminina, fibronectina, hensina, elastina e

colágeno IV (MELO, et al., 2011). Após a sua liberação, galectina-3 pode reticular ligantes específicos na superfície das células, induzindo comunicação intercelular e também pode influenciar a sinalização celular (OEVER, et al., 2013).

Além de ligante celular, galectinas também possuem alvos na superfície de microrganismos (VASTA, 2009) e, assim, atraem a atenção para a investigação de seus papéis como potenciais receptores de patógenos e reguladores de respostas à infecção. Por exemplo, galectina-3 humana se liga especificamente a proteínas de superfície de *Trypanosoma cruzi* melhorando a adesão desse protozoário a laminina, um componente de matriz extracelular (MOODY, et al., 2000). Em adição, a expressão de galectina-3 humana por células musculares lisas das artérias coronárias medeia a adesão de *T. cruzi* a estas células (KLESHCHENKO, et al., 2004). Trabalho recente realizado em nosso laboratório demonstrou que galectina-3 consiste em um importante marcador de lise do vacúolo parasitóforo contendo *T. cruzi*. Neste caso, verificamos que há um acúmulo de galectina-3 ao redor do parasito logo após a lise vacuolar (MACHADO, et al., 2014).

Por outro lado, a galectina-3 é um componente importante de fagossomas em macrófagos murinos (GARIN, et al., 2001) e de exossomos derivados de células dendríticas (THÉRY, et al., 2001). Além disso, a galectina-3 interage com proteínas endossomais e proteínas de membrana associadas a lisossomos 1 e 2 (LAMP-1 e LAMP-2) (DONG; HUGHES, 1997; SARAFIAN, et al., 1998).

A galectina-3 se localiza numa rede de túbulos e vesículas que intersectam com a via endocítica (PAZ, et al., 2010), em protrusões na membrana e lamelipódios, e é enriquecida em microdomínios lipídicos ou *lipid rafts* de células dendríticas e macrófagos estimulados (HSU, et al., 2009). Além disso, macrófagos deficientes para galectina-3 apresentam fagocitose defeituosa de eritrócitos opsonizados e células em apoptose (SANO, et al., 2003). Sendo assim, estas características da galectina-3 podem influenciar nas interações dos patógenos com as células hospedeiras.

1.3.5 WASp

A família WASp regula a polimerização de actina através ativação do complexo Arp2/3. Há oito membros compondo esta família dentre eles, a proteína WASp. Esta é uma proteína específica de células hematopoiéticas com distintos domínios funcionais os quais interagem com vários fatores citoplasmáticos envolvidos na transdução de sinais e na polimerização do citoesqueleto de actina. Estas proteínas não têm atividade catalítica intrínseca e atuam através de um domínio C-terminal conservado para ativar o complexo Arp2/3 (MOULDING, et al., 2013).

A região C-terminal da proteína WASp regula a organização do citoesqueleto de actina. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato se liga à região base, ao passo que Cdc42 liga-se ao domínio de ligação de GTPase. A ligação destes fatores de ativação celular, ativa a porção C-terminal VCA (Domínio verprolina /cofilina /ácido) da WASp, que por sua vez ativa o complexo Arp2/3, estimulando a polimerização de actina através da formação de junções de F-actina (THRASHER; BURNS, 2010).

A mutação ou deleção de WASP provoca várias anormalidades funcionais em células hematopoiéticas. Em macrófagos a deficiência de WASp provoca alterações morfológicas (ALBERT, et al., 2011), problemas na adesão (SAFAEI, et al., 2012), defeitos quimiotáticos (BEEL, et al., 2009) e fagocíticos (TSUBOI; MEERLOO, 2007).

Os podossomos também são estruturas à base de actina formados na membrana plasmática de células derivadas de monócitos, tais como macrófagos, osteoclastos, e células dendríticas. Podossomos são protrusões ricas em actina que desempenham funções importantes na migração quimiotática. Em pacientes deficientes em WASp os podossomos são completamente ausentes, indicando que WASp é um componente essencial dessa estrutura (TSUBOI; MEERLOO, 2007).

A partir das inúmeras funções desempenhadas pelas proteínas Arp2, AFAP1, Galectina-3, Septinas e WASp relacionadas ao citoesqueleto de actina, poderiam essas proteínas estarem envolvidas nos processos de entrada e/ou permanência de protozoários na célula hospedeira? Considerando essa hipótese, no presente estudo objetivamos verificar a participação dessas proteínas nos processos de invasão e multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos murinos.

1.4 Sinalização celular

A sinalização celular faz parte de um complexo sistema de comunicação que governa e coordena as atividades celulares básicas. A capacidade das células para compreender e corretamente responder ao seu microambiente é a base do desenvolvimento, da reparação de tecidos, imunidade, bem como a homeostase do tecido. Erros no processamento das informações celulares são responsáveis por doenças como o câncer, a autoimunidade e diabetes. Ao compreender a sinalização celular envolvida com os diversos agentes causadores de doenças, estas podem ser tratadas de forma mais eficaz (BU; CALLAWAY, 2011).

Pesquisas se concentram principalmente em estudar partes individuais de vias de sinalização celular. A investigação desses sistemas nos ajuda a compreender a estrutura subjacente das redes de sinalização celular e como as mudanças nessas redes podem afetar a transmissão e circulação da informação (BU; CALLAWAY, 2011).

Nesse contexto, a relação entre patógeno-hospedeiro pode ser mais bem estudada quanto mais esclarecido estiver quais vias de sinalização celular estão envolvidas no processo de infecção. Sendo assim, surge a seguinte ideia: Quais vias de sinalização estão envolvidas no processo de invasão e multiplicação de patógenos como *Leishmania amazonensis*? Nesse trabalho visamos compreender quais vias de sinalização são mais importantes no tráfego intracelular desse protozoário.

1.4.1 Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K)

Fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) constituem uma família de proteínas que fosforilam fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) na porção 3'-OH do anel inositol, dando origem ao segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5- trifosfato (PIP₃) envolvido na transdução de sinais celulares. Estas quinases atuam em uma série de processos homeostáticos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, regulação do ciclo celular, apoptose, migração, entre outros (OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

A família de PI3K é dividida em três classes, com base na distribuição subcelular, ativação de sinais, e na especificidade do substrato (DEANE; FRUMAN, 2004).

Embora a estrutura básica de sinalização envolvendo a PI3K tem sido bem estudada, a contribuição de várias isoformas da família PI3K permanece desconhecida.

PI3K γ é uma PI3K pertencente a classe I B predominantemente expressa por células do sistema imunológico e consiste de uma subunidade catalítica (p110 γ) e uma subunidade reguladora (p101 ou p8). PI3K γ medeia sinalização iniciada primeiramente através de receptores acoplados a proteína G e desempenha um papel crucial na migração celular induzida por quimioatrativos controlando o rearranjo do citoesqueleto actina (DEANE; FRUMAN, 2004).

A ativação de PI3K γ resulta na geração de fosfatidilinositol (3,4,5) P3 e a ativação de AKT. Fosfatidilinositol (3,4,5) P3 coopera com a subunidade G $\beta\gamma$ para iniciar a polimerização da actina e subsequente acumulação de F-actina induzida por PI3K δ (DEANE; FRUMAN, 2004). Neutrófilos de camundongos deficientes em PI3K γ (-/-) exibem ativação prejudicada de Rac e diminuição na acumulação de F-actina, características as quais se relacionam com a sua reduzida capacidade para migrar em resposta aos estímulos quimiotáticos (HANNIGAN, et al., 2002). Estudos utilizando inibidores da PI3K, como wortmanina ou LY294002, mostram que a PI3K do tipo I estão envolvidos na fagocitose (KAMEN, et al., 2007) e medeiam a entrada de parasitas, tais como *Trypanosoma cruzi*, em células hospedeiras (WOOLSEY, et al., 2003). Entretanto, o papel preciso de cada isoforma, ainda permanece obscuro (CUMMINGS, et al., 2012).

1.4.2 Proteína quinase B (AKT)

AKT é uma serina/treonina quinase que desempenha um papel fundamental em diversos processos celulares, tais como o metabolismo da glucose, apoptose, proliferação celular, transcrição dependente de NF κ B, migração celular (FAYARD, et al., 2005).

O papel fundamental da AKT na sinalização tornou-se evidente quando se mostrou ser um componente *downstream* na sinalização por PI3K. PI3-quinase, uma enzima chave na geração do segundo mensageiro PtdIns (3,4,5) P3 da PtdIns (4,5) P2 . PIP3 permite a translocação da AKT do citoplasma para a membrana plasmática, envolvendo

o seu domínio PH. Uma vez recrutada para a membrana, AKT é ativada por um processo que requer a fosforilação de Thr308 e Ser473 no domínio de regulação HM – motivo hidrofóbico (FAYARD, et al., 2005).

Atualmente outros mecanismos de ativação de AKT têm sido descritos, de forma independente de PI3K. Embora a PI3K seja um importante regulador da ativação de AKT em resposta a uma variedade de ligantes, estudos recentes destacam grupos diversos de tirosina (Ack1/TNK2, Src, PTK6) e serina/treonina (TBK1, IKBKE, DNAPKcs) quinases que também ativam AKT diretamente ou seja, de forma independente da PI3K (GUO, et al., 2011; XIE et al., 2011).

1.4.3 Proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK)

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são um importante grupo de serina/treonina que são ativadas por fosforilação dupla em resposta a diversos estímulos extracelulares, ligando a sinalização transmembrana com eventos de indução gênica no núcleo (RADLER-POHL, et al., 1993).

ERK 1/2 foram as primeiras MAPKs identificadas e têm sido extensivamente caracterizadas devido as suas diversas funções nas atividades celulares, e estão ainda relacionadas ao desenvolvimento de várias doenças. A ativação dessa via é iniciada através do reconhecimento de um ligante pelo receptor tirosina quinase na membrana plasmática, levando a ativação da proteína G. ERK 1 e 2 fosforilam um grande número de substratos e vários componentes básicos de outras vias de sinalização são capazes de ativar ERK1/2 incluindo cálcio e proteína quinase C (RUNCHEL, MATSUZAWA, ICHIJO, 2011).

ERK2 é uma proteína quinase amplamente distribuída, possui atividade máxima quando seus resíduos de Thr183 e Tyr185 são fosforilados pela MAPKK ou MEK1. Após sua ativação ERK2 fosforila diversas proteínas reguladoras, proteínas quinase e fatores de transcrição (FOX, et al., 1998).

1.4.4 Proteína alvo da Rapamicina em mamíferos (mTOR)

mTOR é uma proteína quinase serina/treonina, reguladora central do metabolismo celular, crescimento e sobrevivência em resposta a hormônios, fatores de crescimento, nutrientes, energia e estresse. mTOR regula diretamente ou indiretamente a fosforilação de pelo menos 800 proteínas. Esta proteína é participante de dois complexos de sinalização estrutural e funcionalmente distintos: mTORC1 e mTORC2 (complexo mTOR 1 e 2). Quando ativado, mTORC1 aumenta a síntese de proteínas por fosforilação de reguladores-chave de tradução do mRNA. Em paralelo com a síntese de proteínas, também regula a síntese de lipídios. Para manter a homeostase energética mTORC1 também pode regular a biogênese mitocondrial; entre outros alvos potenciais mTORC1 pode fosforilar clip1 e regular microtúbulos (BEN-SAHRA, et al., 2013).

Como parte do complexo mTOR, mTORC2 pode regular outros processos celulares, incluindo a sobrevivência celular e organização do citoesqueleto. Desempenha um papel crítico na fosforilação da 'Ser-473' de AKT1, um efetor de PI3K, o que facilita a sua ativação por PDK1. mTORC2 pode regular o citoesqueleto de actina, através da fosforilação de PRKCA, PXN e ativação RhoA, Rac 1a ou Rac 1b (BEN-SAHRA, et al., 2013).

1.4.5 Proteína Sarcoma Vírus (Ras)

Ras é uma proteína de ligação a nucleotídeos guanina associada à membrana, que é normalmente ativada em resposta à ligação de sinais extracelulares, tais como fatores de crescimento, os RTKs (Receptores Tirosina-Quinase) e TCR (Receptores de Células T). A sinalização Ras afeta diversas funções celulares, incluindo a proliferação celular, a apoptose, a migração e a diferenciação celular (GAY, et al., 1999).

Nas células em repouso, Ras está firmemente ligada a GDP (guanosina difosfato), o qual é trocado por GTP (guanosina trifosfato) após a ligação de estímulos extracelulares aos receptores de membrana celular. Na forma ligada a GTP, Ras interage especificamente com proteínas efetoras, iniciando assim cascatas de interações proteína-proteína que pode conduzir a proliferação celular. Ras ativa uma série de vias de sinalização, incluindo RAF1, MEK/ERK e PI3K (GAY, et al., 1999).

1.4.6 Proteína quinase ativada por mitógeno (MEK)

A ligação de ligantes extracelulares, tais como fatores de crescimento, citocinas e hormônios nos receptores de superfície celular ativa RAS e esta inicia a ativação de RAF1. RAF1 ativa as proteínas quinases de dupla especificidade MAP2K1/MEK1 e MAP2K2/MEK2. Ambas MAP2K1/MEK1 e MAP2K2/MEK2 atuam especificamente na cascata de MAPK/ERK, e catalisam a fosforilação concomitante de uma treonina e um resíduo de tirosina na sequência de Thr-Glu-Tyr localizado nas quinases reguladas por sinais extracelulares MAPK3/ERK1 e MAPK1/ERK-2, levando a sua ativação após a transdução do sinal no interior da cascata de MAPK/ERK. Dependendo do contexto celular, esta via medeia diversas funções biológicas, tais como o crescimento celular, a adesão, a sobrevivência e diferenciação, predominantemente através da regulação da transcrição, metabolismo e rearranjos do citoesqueleto. A cascata de MAPK/ERK está envolvida na regulação da dinâmica endossomal, incluindo processamento de lisossomo e a ciclagem endossômica por meio do compartimento de reciclagem perinuclear (PNRC), bem como a fragmentação do aparelho de Golgi, durante a mitose (CATALANOTTI, et al., 2009).

1.4.7 Modulação da sinalização celular por *Leishmania* spp

Para sobreviver com sucesso e se multiplicar dentro dos macrófagos, os parasitos devem conter adaptações bioquímicas e morfológicas, como por exemplo, a expressão de glicoconjugados (TURCO, 1992). Em *Leishmania*, estas moléculas incluem lipofosfoglicano (LPG), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), glicoproteínas 63 (gp63) e proteofosfoglicano (PPG), ou são secretadas como proteínas contendo fosfoglicanos (PGs), incluindo o proteofosfoglicano (PPGs) e fosfatases ácidas (SAP) (NADERER, et al., 2004; ASSIS, et al., 2011).

Os lipofosfoglicanos são conhecidos por participarem de uma variedade de processos durante o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Estes processos incluem: resistência à ação lítica do sistema complemento, fixação e entrada em macrófagos, proteção contra danos proteolíticos dentro dos vacúolos ácidos (BOGDAN, 1999), inibição da maturação fagossomal (DERMINE, et al., 2000), produção e modulação de óxido nítrico (NO) e IL-12, inibição da proteína quinase C

(GUIMARÃES–COSTA, et al., 2009), e indução da proteína quinase R (PKR) (DE CARVALHO–VIVARINI, et al., 2011).

Muitos trabalhos têm avaliado o papel da proteína quinase C α (PKC α), um dos componentes envolvidos no processo de infecções *L. donovani*. PKC α está associada com a membrana fagossomal, fosforila um substrato da quinase C rico em alanina miristoilado (MARCKs), que é uma proteína de membrana associada a actina, consequentemente relaciona-se com a motilidade e o tráfego de membrana. Esta via participa do transporte de lisossomos e fagossomos sobre os microtúbulos (ROSEN, et al., 1990). Em macrófagos, a inibição da PKC α por LPG de *L. donovani* leva à inibição da polimerização de actina e a despolimerização na membrana fagossomal, evitando os eventos de fusão para a entrega de conteúdos endossômicos no vacúolo parasitóforo (HOLM, et al., 2003).

A inibição da PKC α também foi observada em *Leishmania mexicana*. Curiosamente, *Leishmania mexicana* foi capaz de inibir a ativação PKC α em fêmeas suscetíveis de camundongos BALB/c mas não nos camundongos C57/BL6 resistentes. Este efeito foi também acompanhado por inibição da explosão oxidativa em BALB/c e não em C57/BL6 (DELGADO-DOMINGUES, et al., 2010).

Além da inibição da fusão fagoendossomal, foi demonstrado que LPG é inserido na superfície da bicamada lipídica da célula hospedeira após a internalização dos promastigotas (DERMINE, et al., 2005). Ao ser inserido, o LPG modifica a organização física da bicamada lipídica e interrompe microdomínios de membrana especializadas (*lipid rafts*). Essa estreita interação com a membrana celular provoca uma redução da fagocitose de promastigotas e inibição da explosão oxidativa, impedindo a sinalização celular normal e a acidificação do fagossomo (WINBERG, et al., 2009; VINET, 2011).

Existem várias maneiras pelas quais patógenos intracelulares como *Leishmania* aproveitam a maquinaria da célula hospedeira a fim de sobreviver e reproduzir. Interferências com as vias de transdução de sinais dos fagócitos do hospedeiro é uma das estratégias de sobrevivência utilizadas pelos parasitas (GREGORY, et al., 2005). Esses mecanismos podem ocorrer devido a eventos de fosforilação e desfosforilação em cascatas de quinases e fosfatases (ASSIS, et al., 2011).

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também têm sido implicadas em infecção por *Leishmania* (BHARDWAJ, et al., 2010). O primeiro estudo *in vitro* utilizando formas promastigotas metacíclicas *L. major* indicaram que fosfoglicanos presentes na membrana dos parasitos regulam diferencialmente IL-12 e a produção de NO em macrófagos. Isto ocorre independentemente de ativação NF- κ B, o efeito supressivo observado na indução de IL-12 é resultante da ativação da MAPK-ERK1/2 (FENG, et al., 1999).

A atividade da PI3K durante a invasão da célula por promastigotas de *Leishmania* foi verificada em um estudo que mostrou o papel da sinalização PI3K em conferir resistência da célula hospedeira para apoptose (RUHLAND, et al. 2007). Em outro estudo usando o inibidor de PI3K γ (PI3K de classe 1) AS-605240 e camundongos deficientes em PI3K γ , foi visto que o bloqueio seletivo ou a deficiência de PI3K γ aumenta significativamente resistência contra *Leishmania mexicana* associada com uma significativa supressão de entrada do parasita em fagócitos e redução no recrutamento de fagócitos nos hospedeiros, bem como células T reguladoras para o local de infecção (CUMMINGS, et al. 2012).

A partir dessas informações fica evidente a importância do entendimento da complexa relação entre patógenos e as vias de sinalização ativadas nas células hospedeiras. Os estudos voltados para este fim podem trazer informações relevantes que poderão ser utilizadas no entendimento e no tratamento dos diversos tipos de Leishmanioses.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das proteínas reguladoras do citoesqueleto de actina AFAP-1L1, Arp-2, Galectina-3, Septina-4, Septina-14 e WASp durante a invasão de *L. amazonensis* em macrófagos murinos. E ainda, identificar as vias de sinalização mobilizadas durante o processo de invasão, biogênese do fagolisossomo e multiplicação intracelular de *L. amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar se células *knockdown* para proteínas relacionadas ao citoesqueleto afetam a taxa de invasão e multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos murinos;
- Verificar se a inibição específica das diferentes vias de sinalização afetam os processos de entrada, formação do fagolisossomos e de multiplicação de *L. amazonensis*;
- Compreender quais vias de sinalização estão sendo ativadas durante o processo de invasão desse protozoário.

3.0 Material e Métodos

3.1 Aspectos éticos e local do estudo

Este estudo foi realizado respeitando-se todas as normas de biossegurança. Para execução dos experimentos descritos no presente trabalho envolvendo a utilização de animais, o projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA). A aprovação do projeto (Protocolo nº 111/12) segue em Anexo.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos pertencente ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado no bloco 6T sala 07.

3.2 Animais

Foram utilizados animais BALB/c, os quais foram cuidados, manipulados e sacrificados conforme normas estabelecidas pela Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Biotério da UFU em condição padrão de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com ração e água repostos periodicamente.

3.3 Manutenção dos parasitos e células

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivados em meio Brain Heart Infusion – HIMEDIA (BHI) suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies, de Nova York, EUA), a 26°C . Apenas parasitos na fase estacionária (promastigota metacíclico) foram utilizados para a infecção experimental.

Macrófagos imortalizados de camundongos C57 BL/6 foram mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* – HIMEDIA (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10%, 100mg de gentamicina/mL e incubados em estufa a 37°C e 5% CO₂.

3.4 Purificação de amastigotas de *L. amazonensis* a partir de patas de camundongos BALB/c

Para manutenção da virulência da cepa, promastigotas de *L. amazonensis* foram injetados em camundongos BALB/c por inoculação subcutânea de 10⁷ parasitos na região palmar da pata, diluídos em cerca de 40 microlitros de tampão fosfato salina (PBS). Após 6 semanas, os animais foram devidamente eutanasiados e as patas foram retiradas para purificação dos amastigotas. Para isso, as patas foram lavadas três vezes com meio de cultura sem soro. A pele recobrindo a pata foi retirada e a área lesada raspada com bisturi. Posteriormente, o lavado obtido foi transferido para tubo com pistilo para o rompimento celular e centrifugado por 5 minutos a 500 rpm. O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo falcon e submetido à centrifugação por 8 minutos a 1000 rpm. Novamente o sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo e submetido à centrifugação por 12 minutos a 1800 rpm. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o Pellet contendo os parasitos foi utilizado para infectar outros camundongos.

3.5 Obtenção de macrófagos peritoneais de BALB/c

Para obter macrófagos peritoneais de BALB/c, foi inoculado peritonealmente um mL de meio de tioglicolato (DifcoTM Fluid Thioglycolate Medium - BD) a 3%, que funciona como um agente inflamatório, provocando quimiotaxia de macrófagos para a região peritoneal. Após 72 horas, os animais foram eutanasiados e os macrófagos peritoneais recuperados por meio da injeção de meio DMEM a 10% SFB gelado na cavidade peritoneal e posterior sucção da solução obtida.

3.6 Ensaios de invasão e multiplicação com macrófagos de C57 BL/ 6 Wild Type imortalizados e peritoneais de BALB/c tratados ou não com citocalasina D

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e imortalizados de C57 BL/6 foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm na ordem de 10^5 /poço. Após a adesão celular nas lamínulas circulares, as células foram tratadas ou não com citocalasina D, na concentração final de $4\mu\text{M}$ (MOREHEAD, et al., 2002). Após 1 hora de tratamento, as células foram lavadas com PBS por três vezes, e promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionados na ordem de 10 parasitos por célula nos ensaios de invasão e 5 parasitos por célula nos ensaios de multiplicação. Após os tempos de 4, 24 e 48 horas as lamínulas foram fixadas com Bouin por 15 minutos, lavadas com PBS e coradas com Giemsa (SIGMA- ALDRICH) (1:20) por 40 minutos. Após esse tempo as lamínulas foram descoradas com concentrações decrescentes de acetona e crescentes de xilol (VALLADA, 2002).

3.7 Obtenção de células *Knockdown* (KD) para diversas proteínas celulares

Macrófagos de camundongos C57/BL6 imortalizados foram transduzidos com partículas de lentivirus contendo um shRNA para várias proteínas. Para isso as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na ordem de $2,5 \times 10^5$ células/ poço. No dia 2 o meio celular foi substituído por uma solução de meio DMEM e polybrene (brometo de hexadimetrina) (sc-134220) em uma concentração final de $5\mu\text{g/mL}$. Polybrene é um polímero catiônico que neutraliza a interação entre as cargas virais e do ácido siálico na superfície das células com a finalidade de aumentar a ligação do capsídeo viral com a membrana celular. O volume de $10\ \mu\text{L}$ das partículas de Lentivírus contendo shRNA para as proteínas Arp-2 (sc-29738-V), AFAP1L1 (sc-140895-V), Galectina-3 (sc-35443-V), Septina-4 (sc-36477-V), Septina-14 (sc-153339-V) e WASp (sc-36830-V) foram adicionados nos poços separadamente em duplicata para cada proteína, as células foram agitadas levemente e incubadas em estufa a 37°C e $5\% \text{CO}_2$ *overnight*. No dia 3, o meio de cultura foi repostado sem o Polybrene e as células foram incubadas novamente *overnight*. No dia 4, as células foram tripsinizadas e repartidas na proporção 1:3 (as células contidas em um poço foram divididas em 3 poços), essa divisão é necessária para iniciar o processo de seleção das células transduzidas com maior eficiência. Para

selecionar as células contendo shRNA, estas foram mantidas em solução de meio DMEM e Dicloridrato de Puromicina (sc-108071) (antibiótico de seleção) em uma concentração final de 5µg/mL.

3.8 Ensaios de invasão e multiplicação com células *knockdown*

Células transduzidas foram plaqueadas em placas de 24 poços na ordem de 10^5 /poço e incubadas *overnight* em estufa de CO₂. No dia seguinte, promastigotas de *L. amazonensis* foram adicionados na ordem de 10^6 parasitos/ poço para os ensaios de invasão e 5×10^5 parasitos/ poço nos ensaios de multiplicação. Nos tempos de 4, 24 e 48 horas as lamínulas foram fixadas em formaldeído 4% ou Bouin para Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) ou coloração com Giemsa, respectivamente (VALLADA, 2002).

3.9 Citometria para confirmação do shRNA

Para confirmação do *knockdown*, células wild type (WT) e *Knockdown* (KD) para AFAP-1L1, ARP2, Galectina-3, Septina 4, Septina 14 e WASp foram contadas (10^7) e fixadas em formaldeído 4 % (Milliore) por uma hora. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e incubadas em solução de PGN (PBS+ Gelatina 0,25% + Azida sódica 0,1%) por 3 horas. Para marcação das células, foram preparadas soluções com os anticorpos anti-AFAP1L1 (sc-134653), anti-Arp2 (sc-15389), anti-Galectina-3 (sc-19283), anti-Septina 4 (sc-20179) anti-Septina 14 (sc-244109) e anti-WASp (sc-8353) na proporção de 1:50 diluídos em PGN+ 0,1% Saponina *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de PGN saponina e anticorpo secundário (1:100) conjugado com fluorocromo FITC (Invitrogen A11034) durante 3 horas. Após esse tempo as células foram lavadas novamente com PBS e submetidas à análise pelo citômetro FACS Canto II. Os resultados da citometria foram analisados pelo software FlowJo 10.

4.0 Ensaio de invasão com macrófagos fixados

Para verificar o processo de entrada ativa de promastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos imortalizados de C57BL/6, 10^5 células foram previamente plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares e fixadas em solução de DMEM e 0,01% de formaldeído por 40 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas com PBS e promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* foram incubados na quantidade de 10 parasitos/ célula por 4 horas. Após esse período, as células foram lavadas novamente com PBS por duas vezes para retirar parasitos não internalizados e não aderidos. Posteriormente as células foram fixadas em bouin por 15 minutos e coradas com Giemsa para análise em microscopia óptica.

4.1 Inibidores de vias de sinalização e suas respectivas concentrações de uso

Inibidores das vias de sinalização utilizados nos experimentos, fabricantes e concentrações de uso, estão reunidos na tabela abaixo.

Tabela 1. Inibidores das vias de sinalização

Inibidor	Via de sinalização inibida	Fabricante	Concentração de uso	Tempo de tratamento
LY294002	PI3K	Cayman Chemical	50 μ M	1-2h
U0126	MEK1/2	Cell Signalling	10 μ M	1-2h
PD98059	MEK1	Cell Signalling	50 μ M	1-2h
Rapamicina	m-TOR	Cayman Chemical	10 nM	1-2h
Itu	ERK2	Santa Cruz	20 μ M	1-2h
FTS	Ras	Cayman Chemical	50 μ M	1-2h
Triciribine	Akt	BioVision	3,1 mM	1-2h

4.2 Ensaio de viabilidade com os inibidores das vias de sinalização

Para verificar se a atividade biológica dos inibidores nas células seria devido à diminuição da viabilidade celular, fizemos um ensaio de viabilidade celular utilizando a resazurina (Alamar Blue). Macrófagos peritoneais de BALB/c foram plaqueadas em placas de 96 poços na ordem de 2×10^4 células/poço e incubadas em estufa de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, os diferentes inibidores foram adicionados na mesma concentração utilizada nos experimentos subsequentes e após 1 hora ou 24 horas de tratamento com os inibidores, foi acrescentado 8 µL de resazurina (volume previamente padronizado para este tipo celular) por poço. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO₂ coberta com papel alumínio, evitando a luz e, após cerca de 20 horas fizemos a leitura da absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda a 594 nm.

4.3 Ensaio de cinética durante a formação do fagolisossomo utilizando inibidores das vias de sinalização celular

Macrófagos peritoneais de BALB/c na ordem de 10^5 células/poço foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 milímetros. Após 24 horas, tempo necessário para adesão celular, as células foram tratadas com os inibidores das vias de sinalização (Akt, MEK1, MEK1/2, PI3K, m-TOR, ERK2, Ras), nas concentrações indicadas pelos fabricantes (resumidas na tabela 1). Após uma hora de tratamento as células foram lavadas com PBS e as formas promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na ordem de 10^6 /poço foram adicionadas. Após 15 minutos todos os poços foram lavados com PBS para retirar os parasitos não aderidos ou não internalizados. Nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 6 horas, as lamínulas foram fixadas com formaldeído 4%, e marcadas com solução contendo anticorpo primário anti-*Leishmania* na proporção (1:3000) e anti-LAMP 1 (1:10) diluídos em PGN saponina (PBS + Gelatina + Azida (0,1%) + saponina (0,1%)). As lamínulas foram mantidas *overnight* em câmara escura, e no dia seguinte foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário na proporção (1:100) e 4',6-diamidino-2-fenilindole-DAPI (marcador de ácidos nucleicos) (1:500). As lâminas foram analisadas por microscopia confocal.

4.4 Ensaio de invasão utilizando inibidores das vias de sinalização celular

Macrófagos peritoneais de BALB/c foram plaqueados, tratados e incubados com promastigotas da mesma forma descrita no item 4.3. Após 4 horas de invasão, os parasitos não aderidos ou não internalizados foram lavados com PBS, as lamínulas foram fixadas em formaldeído 4% e marcadas com anticorpo primário anti-*Leishmania* (1:3000) na mesma proporção indicada acima. As lâminas foram analisadas por microscopia confocal (SILVA, et al., 2009).

4.5 Ensaio de multiplicação utilizando inibidores das vias de sinalização celular

Macrófagos peritoneais de BALB/c também foram plaqueados, tratados e incubados com promastigotas de *L. amazonensis* como descrito no item 4.3. Após 4 horas de invasão os parasitos não aderidos ou internalizados foram retirados por lavagens sucessivas com PBS. O tratamento foi repetido durante três dias, uma vez ao dia, sendo o tratamento considerado contínuo após o momento da invasão. Nos tempos de 24, 48 e 72 horas as lamínulas foram fixadas em formaldeído 4% e marcadas com anticorpo anti-*Leishmania*, seu conjugado e DAPI. As lâminas foram analisadas por microscopia confocal (SILVA, et al., 2009).

4.6 Western Blot para verificar as vias de sinalização envolvidas durante o processo de invasão de *L. amazonensis*

Para verificar quais vias de sinalização estão envolvidas na cinética de invasão de *L. amazonensis*, macrófagos peritoneais de BALB/c foram plaqueados em placas de 6 poços na ordem de 10^6 células/poço em duplicata, e incubadas em estufa *overnight*. No outro dia, formas promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (na quantidade de 10 parasitos/célula) foram incubadas com os macrófagos. Nos tempos de 15, 30 minutos, 1, 3, 6 e 12 horas após a invasão, os poços foram lavados com PBS e extratos celulares foram obtidos por meio do acréscimo de 200 μ L de tampão fosfatase. A solução obtida

foi centrifugada a 10000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e as amostras foram congeladas a -20°C . Para normalizar a quantidade de amostras proteicas a serem analisadas foi realizada uma dosagem proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras foram enviadas para o Instituto Butantan (São Paulo) para que fossem analisadas por Western blot pelo Pesquisador Pós Doutorando Matheus Henrique Santos Dias, colaborador da pesquisa.

4.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes, em triplicata. A comparação de dos resultados entre os grupos foi analisada pelo teste t ou ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5.0 Resultados

5.1 Efeito da citocalasina D na invasão e multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos murinos.

Para compreendermos o papel da polimerização do citoesqueleto de actina no processo de entrada e permanência de *L. amazonensis*, ensaios de invasão e multiplicação foram realizados com macrófagos peritoneais de BALB/c e macrófagos imortalizados de camundongos C57/BL6 (10^5 / poço) pré-tratados ou não com 4 μ M de Citocalasina D por uma hora antes da incubação com os parasitos. Nos ensaios de invasão e multiplicação, após uma hora e antes da incubação com os promastigotas de *L. amazonensis* os poços foram lavados para retirar o tratamento. Nos ensaios de multiplicação, após 4 horas de invasão, as células foram lavadas para retirar os parasitos não internalizados e o tratamento com citocalasina D foi resposto na mesma concentração (4 μ M).

Os resultados mostraram uma grande redução na taxa de invasão de *L. amazonensis* em ambas as células tratadas com citocalasina D. A quantidade de parasitos também foi contabilizada evidenciando uma redução significativa na carga parasitária, entretanto ainda existe uma taxa de invasão relevante, com cerca de 40% das células totais invadidas, ou seja, independente do efeito da citocalasina D (Figura 1A e 1F). Em contraste, contabilizamos maior número de parasitos nos macrófagos pré-tratados com citocalasina D do que nos macrófagos não tratadas no tempo de 24 horas após a invasão (Figura 1G).

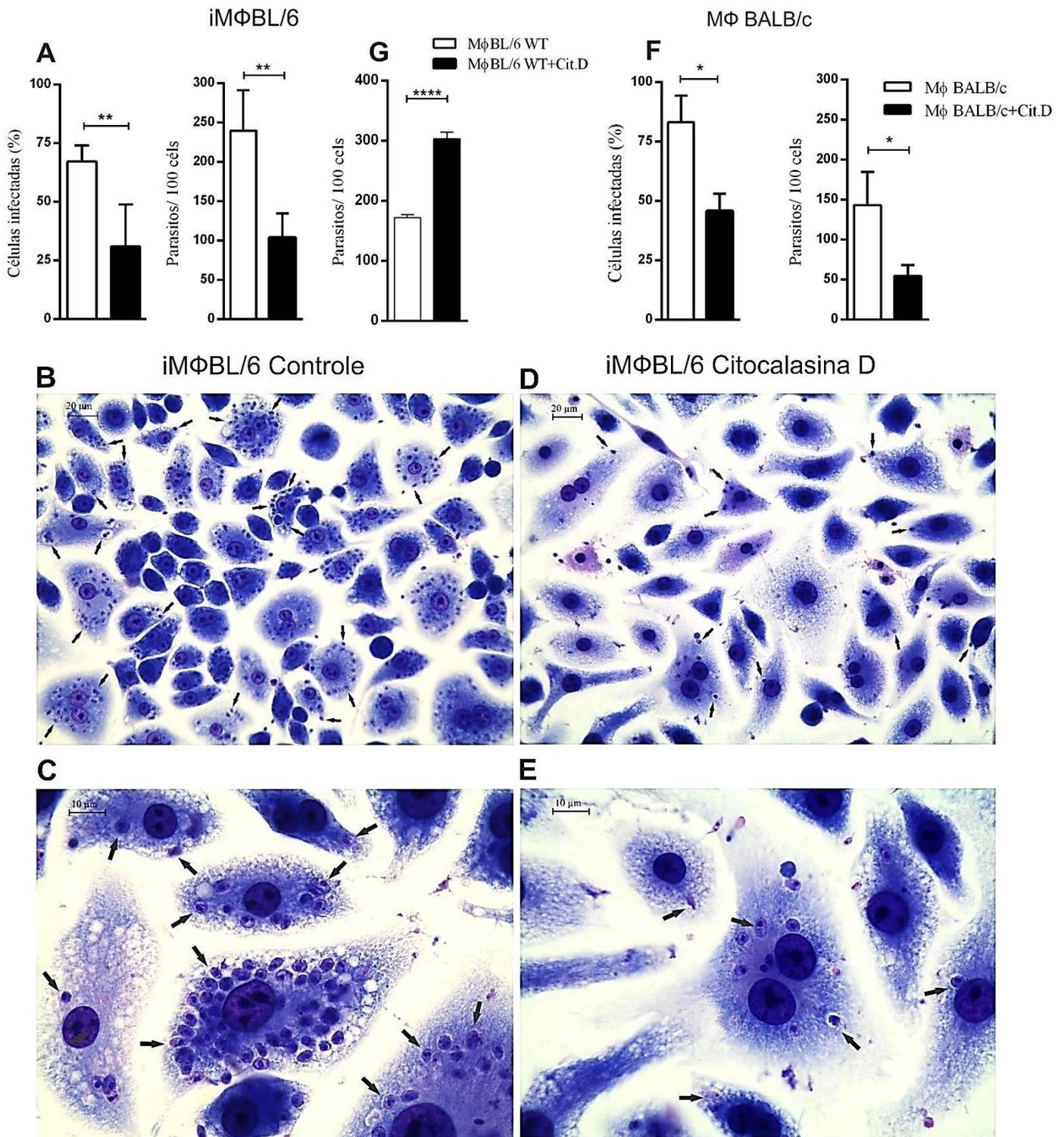


Figura 1. Efeito da citocalasina D na invasão e na multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos murinos. Macrófagos imortalizados de camundongos C57 BL/6 e peritoneais de BALB/c foram pré tratados com citocalasina D (4 μ M) por 1 hora e incubados com promastigotas de *L. amazonensis* na ordem de 10 parasitos/ célula nos ensaios de invasão por 4 horas e 5 parasitos/ célula nos ensaios de multiplicação por 24 horas. Após esse tempo, as células foram fixadas e coradas com Giemsa **A**. Porcentagem de células infectadas e número de parasitos internalizados em macrófagos C57 BL/6 (iMφBL/6) pré-tratados ou não com citocalasina D; **B**. Ilustração de iMφBL/6 sem tratamento (Aumento de 40x); **C**. Aumento de 100x. **D**. Ilustração de iMφBL/6 tratados com citocalasina D (Aumento 40x); **E**. Aumento 100x; **F**. Porcentagem de células infectadas e número de parasitos internalizados em macrófagos de BALB/c pré tratados ou não com citocalasina D; **G**. Número de parasitos em 100 macrófagos infectados, tratados ou não com citocalasina D, após 24 horas de invasão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.2 Proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina interferem no processo de invasão e multiplicação de *L. amazonensis*.

Para demonstrar o efeito nas células transduzidas com partículas de lentivírus contendo shRNA específicos que provocam a diminuição da expressão das proteínas AFAP1L1, Arp2, Galectina-3, Septinas 4, 14 e WASp, nós realizamos um ensaio de citometria de fluxo para análise da expressão da proteína de interesse na célula *knockdown* (KD) em comparação com a célula *Wild Type* (WT). Os nossos resultados mostraram que houve redução na expressão das proteínas nas células transduzidas com partículas virais contendo shRNA específicos para cada proteína (Figura 2).

Macrófagos C57 BL/6 (10^5 células/poço) WT e KD para as proteínas, AFAP1L1, Arp2, Galectina-3, Septinas 4 e 14, WASp foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis* por 4 horas (10 parasitos/célula), após adesão celular *overnight*. Os resultados mostraram aumento significativo na internalização e na carga parasitária nas células KD para Galectina-3, Arp2 e WASp (Figura 3A e 3B). Entretanto, a baixa expressão das outras proteínas não interferiu no processo de entrada desse protozoário.

Por outro lado, após 24 e 48 horas da invasão, houve aumento no número de parasitos por célula nos macrófagos KD para Gal-3 em relação à célula WT. As células KD para Arp2 apresentaram um discreto aumento no número de parasitos, mas a diferença não foi estatisticamente relevante (Figura 4A e 4B).

Após esses resultados, realizamos ensaio de invasão com macrófagos WT fixados ou não com 0,01% de formaldeído e outro ensaio de invasão com as células WT, Arp2 KD, Gal-3 KD e WASp KD pré-fixadas por 40 minutos. Os resultados mostraram que mesmo com as células fixadas houve internalização de parasitos, comparando as células WT fixadas ou não (Figura 5A), e houve também aumento significativo na internalização de *L. amazonensis* quando comparamos as células fixadas WT e Arp2 KD, Gal-3 KD e WASp KD (Figura 5B).

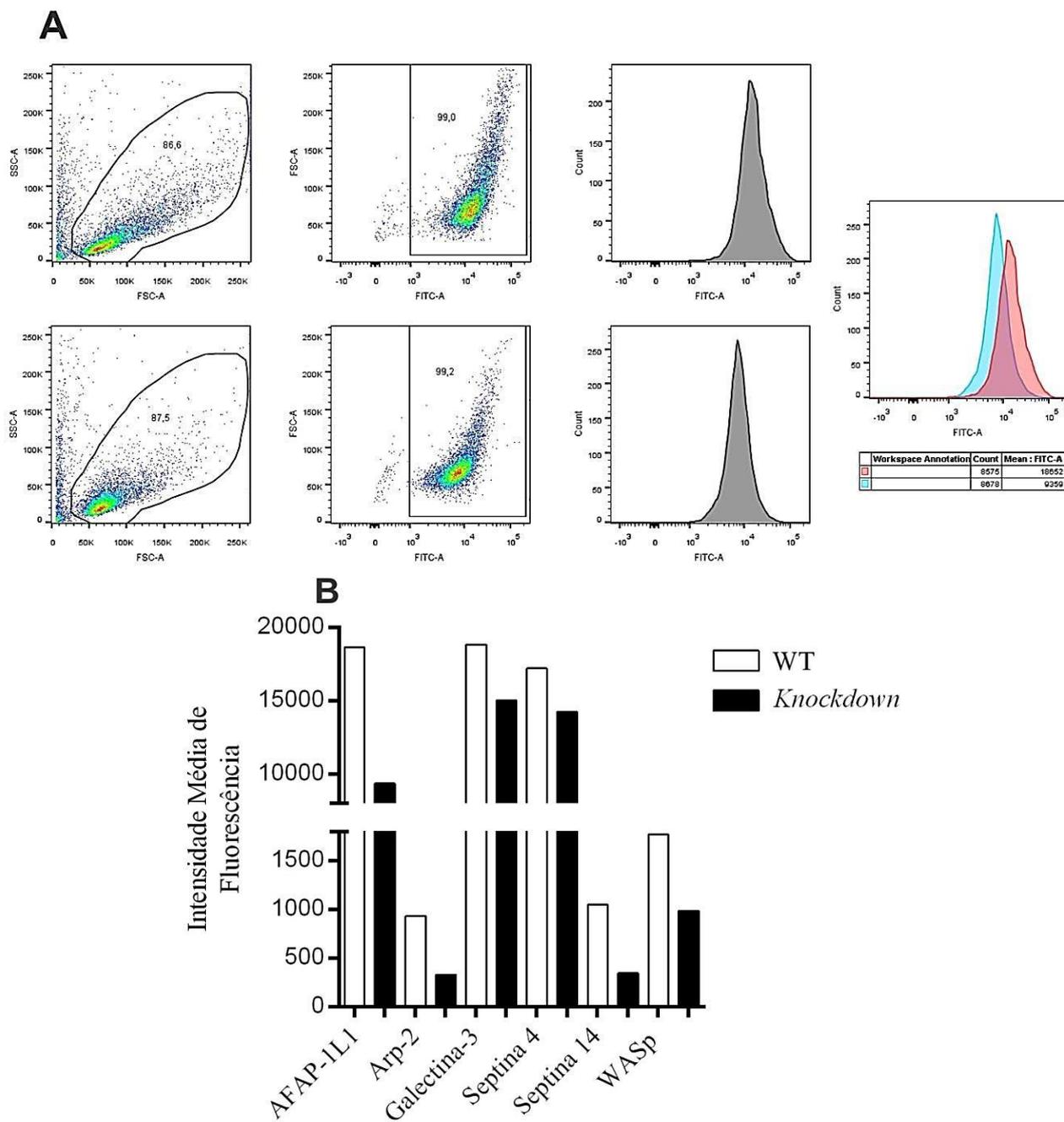


Figura 2. Citometria de fluxo para confirmação do *Knockdown*. A. Figura representativa da análise por citometria da Intensidade Média de Fluorescência entre de macrófagos C57 BL/6 *Wild Type*-WT (rosa) e macrófagos C57 BL/6 AFAP1-L1 *Knockdown*-KD (azul); B. Intensidade Média de Fluorescência comparando as células WT e KD .

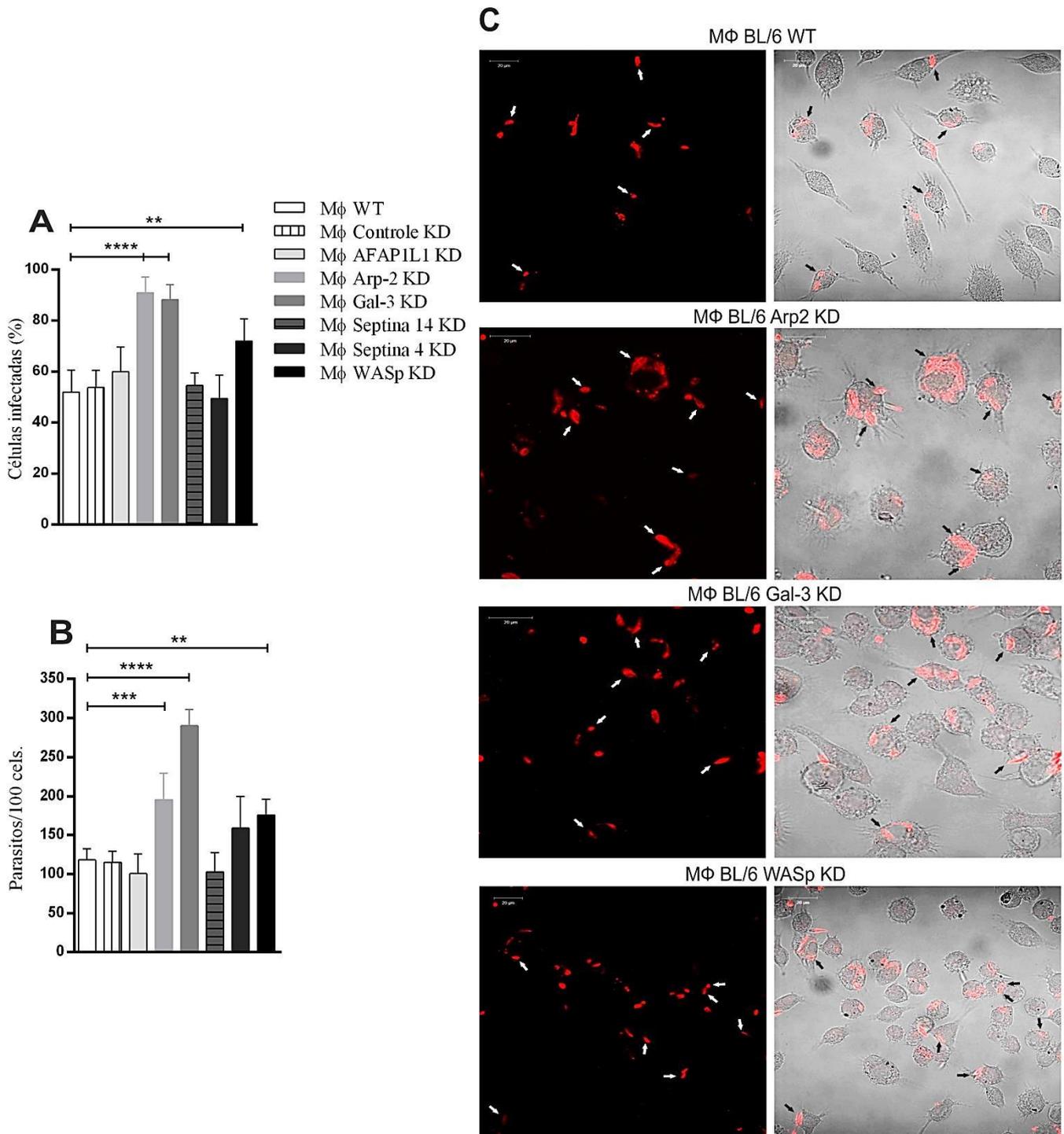


Figura 3. Ensaio de invasão com *L. amazonensis* e macrófagos C57 BL/6 WT e *knockdown* (KD) para AFAP1L1, Arp2, Gal-3, Septina 4 e 14 e WASp. Macrófagos C57 BL/6 WT e KD foram incubados com 10 parasitos / célula por 4 horas. Após esse período as células foram fixadas e marcadas com anticorpo primário Anti-*Leishmania* e anticorpo secundário conjugado com TRITC. **A.** Porcentagem de células infectadas após 4 horas de invasão em 100 células totais; **B.** Número de parasitos internalizados; **C.** Microscopia confocal com as células *knockdown* para Arp2, Gal-3 e WASp, as quais apresentaram diferenças significativas em relação as células *wild type* (WT). Em vermelho: *L. amazonensis* internalizadas; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

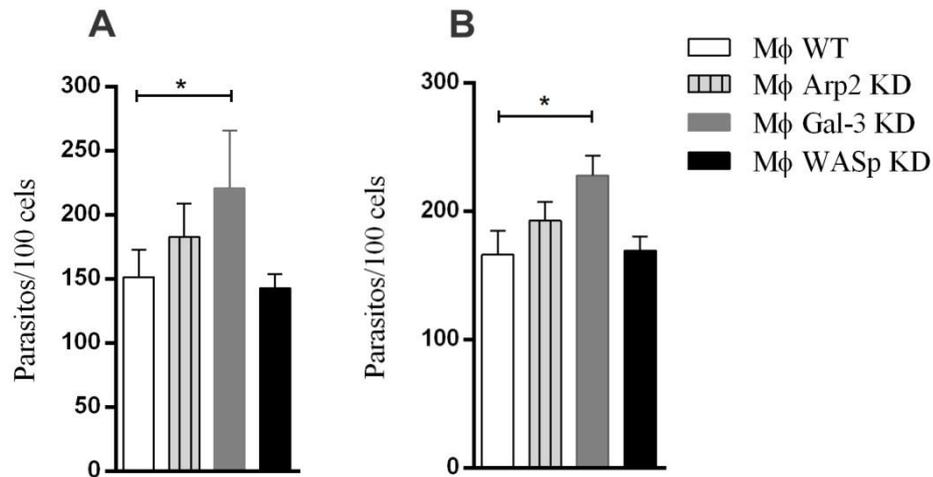


Figura 4. Multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos C57 BL/6 WT e *knockdown* (KD) para Arp2, Gal-3 e WASp. Macrófagos C57 BL/6 WT e KD que apresentaram diferença na taxa de invasão foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 4 horas (5 parasitos/célula), após esse período os parasitos não aderidos ou não internalizados foram lavados e após os tempos de 24 e 48 horas as células foram fixadas, marcadas com Giemsa e analisadas por microscopia óptica. **A.** Carga parasitária após 24 horas de invasão; **B.** Carga parasitária após 48 horas de invasão. * $p < 0,05$.

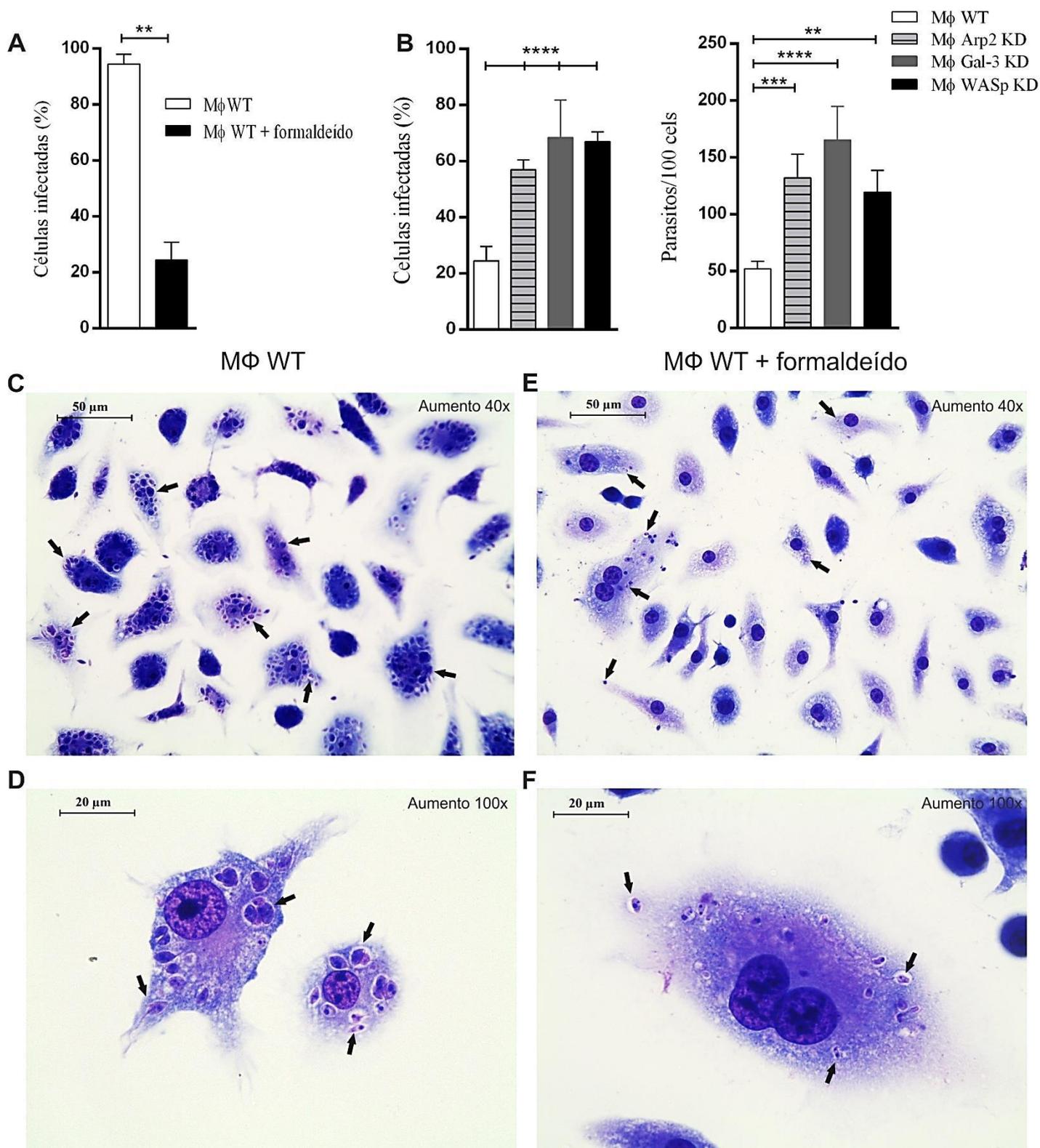


Figura 5. Invasão de promastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos de C57 BL/6 WT e KD pré-fixados com formaldeído. A. Porcentagem de macrófagos C57 BL/6 infectados pré-fixados ou não com formaldeído (0,01%); B. Porcentagem de células infectadas pré-fixadas com formaldeído. C. Foto de microscopia óptica com macrófagos WT não fixados corados com Giemsa (aumento 40x); D. Aumento 100x; E. Foto de microscopia óptica com macrófagos WT pré-fixados com formaldeído e corados com Giemsa (aumento 40x); F. Aumento 100x. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.3 Vias de sinalização envolvidas no tráfego intracelular de *L. amazonensis*

Antes de iniciar os ensaios envolvendo o protozoário *L. amazonensis* e os inibidores das vias de sinalização, fizemos um teste de viabilidade celular, com o objetivo de demonstrar que o efeito ou atividade desses inibidores não foram mascarados pela redução da viabilidade celular. O ensaio foi realizado com tratamentos de 1 hora e 24 horas para abranger as situações subsequentes. Os resultados mostraram que não há redução da viabilidade celular nas células tratadas com os inibidores nos dois tempos descritos acima (Figura 6A e 6B).

A partir disso, para compreender quais vias de sinalização celular são mobilizadas durante o tráfego intracelular de *L. amazonensis*, fizemos ensaios de cinética de recrutamento de lisossomos para o fagossomo contendo parasitos em macrófagos peritoneais de BALB/c nos tempos de 15 minutos, 1, 3 e 6 horas, após um pré-tratamento celular com os diversos inibidores das vias de sinalização (mTOR, ERK, MEK 1, MEK1/2, PI3K, AKT, Ras) por uma hora. Após esse período, lavamos as células para retirar o tratamento antes da incubação com os parasitos. Nossos resultados mostraram que a inibição das vias de sinalização envolvendo AKT, MEK1/2, ERK, mTOR e Ras atrasou o tráfego de lisossomos até o fagossomo contendo parasitos nos primeiros tempos (15, 30 minutos), a via de AKT até uma hora, e as vias de ERK e MEK1/2 até o tempo de 3 horas após a internalização do protozoário (Figura 7 A, B, C, D e E). Nestes experimentos, não realizamos nenhuma análise envolvendo o tamanho dos vacúolos contendo parasitos.

Para complementar o entendimento das vias de sinalização ativadas no processo de entrada e estabelecimento de *L. amazonensis* em macrófagos murinos, nós investigamos quais vias estariam sendo ativado por meio de Western blot em parceria com o Dr. Matheus Henrique dos Santos Dias do Instituto Butantan. Os resultados mostraram que a via de AKT é ativada com a entrada da *L. amazonensis* na célula hospedeira nos tempos de 15 e 30 minutos, e que a via envolvendo MEK-ERK é ativada principalmente nos tempos de 15 e 30 minutos e 1 hora após a invasão (Figura 8).

Além disso, realizamos ensaios de invasão utilizando macrófagos peritoneais de BALB/c (10^5 /poço), promastigotas de *L. amazonensis* e os diversos inibidores das vias de sinalização. Os resultados indicaram que houve redução altamente significativa na

taxa de invasão e na carga parasitária dos macrófagos peritoneais tratados com inibidores das vias de PI3K, ERK, MEK1/2 e ainda, redução discreta na taxa de invasão nas células tratadas com inibidor de AKT (Figura 9A e B).

Para verificar se as vias de sinalização que apresentaram atividade no atraso da maturação fagossomal podem interferir na continuidade da infecção, ensaios de multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de BALB/c com tratamento contínuo também foram realizados. Os resultados mostraram que a inibição das diferentes vias de sinalização provocou uma discreta diminuição, mas não estatisticamente relevante, na quantidade de *Leishmania* após 24 horas de invasão (Figura 10).

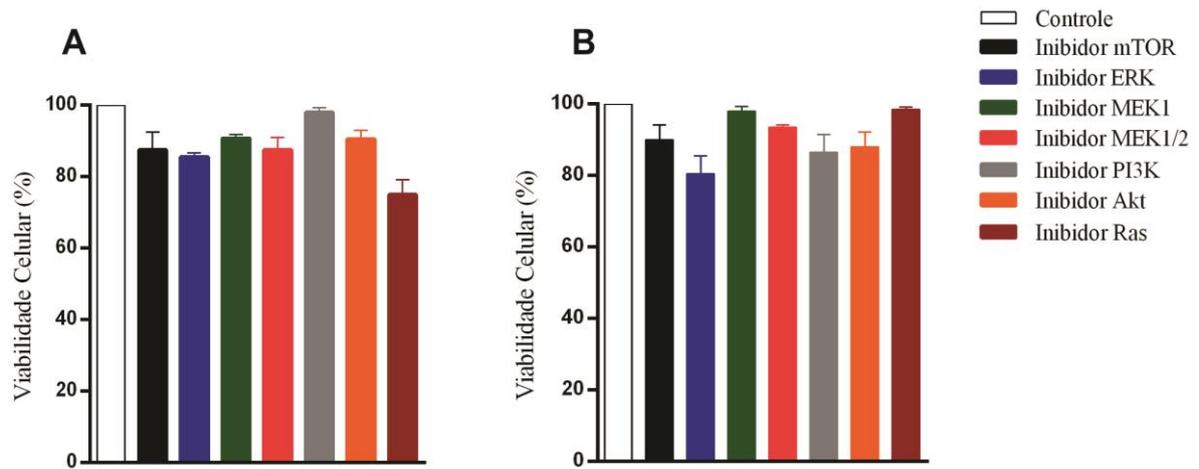


Figura 6. Viabilidade celular de macrófagos tratados durante 1 hora e 24 horas com os inibidores das vias de sinalização celular. Macrófagos peritoneais de BALB/ c foram pré-tratados com os diversos inibidores das vias de sinalização nas concentrações sugeridas pelos fabricantes por 1 hora ou 24 horas, para verificar a viabilidade das células. Para o teste utilizamos a Resazurina (Alamar blue) **A.** Viabilidade celular após 1 hora de tratamento; **B.** Viabilidade celular após 24 horas de tratamento.

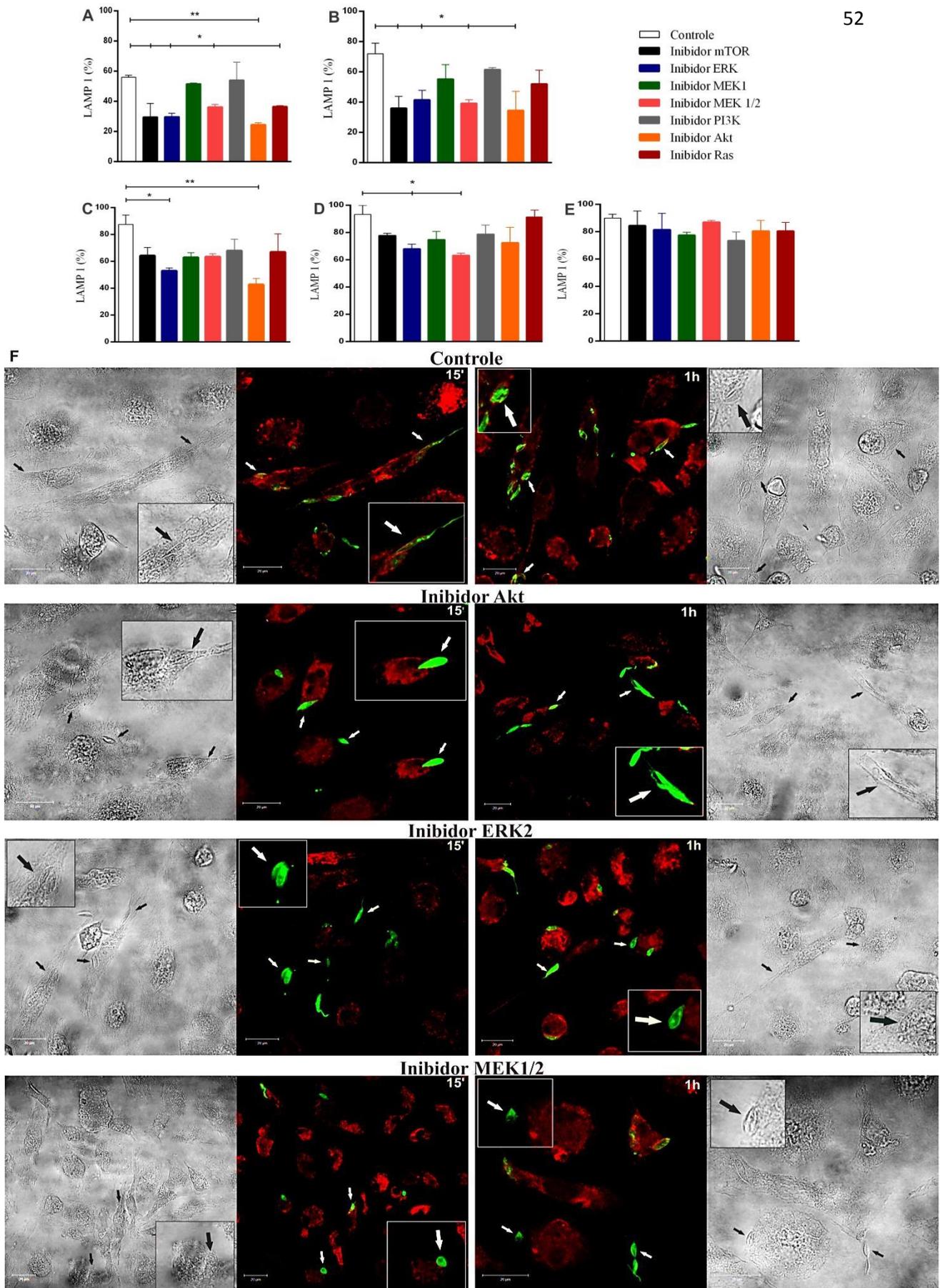


Figura 7. Sinalização celular envolvida do tráfego de lisossomos para o fagossomo contendo *L. amazonensis*. **A.** 15 minutos de invasão; **B.** 30 minutos de invasão; **C.** 1 hora de invasão; **D.** 3 horas de invasão; **E.** 6 horas de invasão; **F.** Microscopia confocal, Vermelho: LAMP-1 (Proteína associada ao lisossomo 1), Verde: *L. amazonensis* marcada com anticorpo primário anti-*Leishmania* e secundário anti-*Leishmania* conjugado com fluorocromo FITC. Setas indicam parasitos internalizados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 2. Dosagem proteica dos extratos celulares para Western blot das vias de sinalização

Amostras	Dosagem proteica (mg/mL)
Macrófagos peritoneais de BALB/c sem <i>L. amazonensis</i>	2,4
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 15 minutos de invasão	1,6
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 30 minutos de invasão	1,4
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 1 hora de invasão	2,9
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 3 horas de invasão	3,2
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 6 horas de invasão	3,5
Macrófagos peritoneais de BALB/c após 12 horas de invasão	2,7

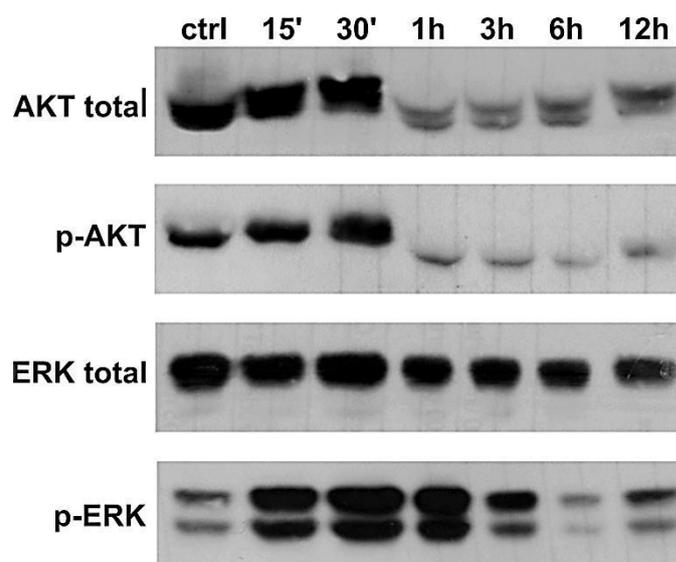


Figura 8. Western Blot para verificar ativação das vias ERK, AKT durante a cinética de invasão de promastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de BALB/c. Ctrl- macrófagos peritoneais de BALB/c não infectados. 15'- macrófagos peritoneais de BALB/c após 15 minutos de invasão; 30'- após 30 minutos de invasão; 1h – após 1 hora de invasão; 3h- após 3 horas de invasão; 6h – após 6 horas de invasão; 12h- após 12 horas de invasão.

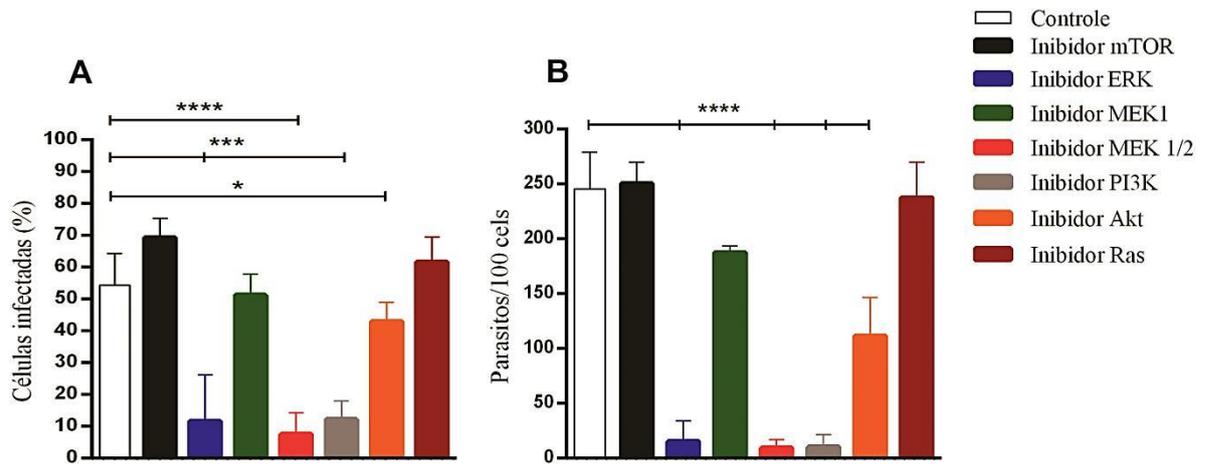


Figura 9. Sinalização celular envolvida no processo de invasão de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de BALB/c foram previamente tratados com os diversos inibidores das vias de sinalização por uma hora. Posteriormente foram lavados e incubados com 10 parasitos por célula por 4 horas. Ao final desse período, as lamínulas foram fixadas e coradas com Giemsa para análise por microscopia óptica. **A.** Porcentagem de macrófagos peritoneais de BALB/c infectadas por *L. amazonensis* após pré-tratamento com diversos inibidores das vias de sinalização celular. **B.** Número de parasitos em 100 células infectadas. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,00001$.

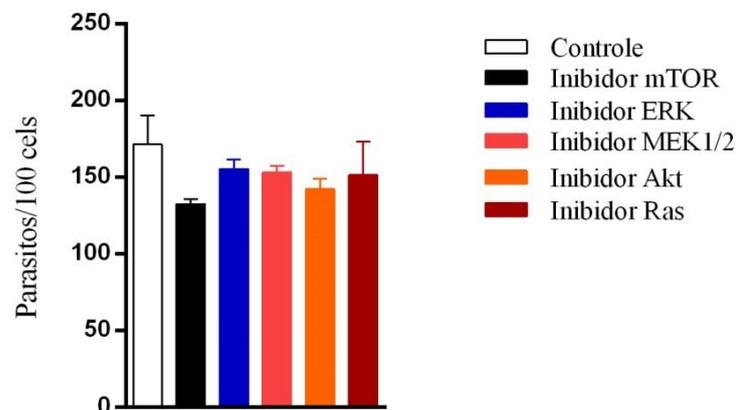


Figura 10. Número de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de BALB/c após 24 horas da invasão, tratados continuamente com inibidores das vias mTOR, ERK, MEK1/2, AKT e Ras. Macrófagos peritoneais de BALB/c foram previamente tratados com os inibidores das vias de sinalização descritas acima, após uma hora, as células foram lavadas, incubamos os parasitos (5 parasitos/ célula) e deixamos por 4 horas. Após esse período de internalização as células foram novamente lavadas para retirada de parasitos não internalizados e o tratamento com os inibidores foram repostos. Ao final das 24 horas as lamínulas foram fixadas e coradas com Giemsa, e analisadas por microscopia óptica.

6.0 Discussão

6.1 Participação do citoesqueleto celular do hospedeiro na infecção de formas promastigotas de *L. amazonensis*

Leishmania são protozoários transmitidos por flebotomíneos hematófagos que causam doenças humanas e zoonoses, provocando mortalidade significativa em todo o mundo (DESJEUX, 2004). Após a entrada de promastigotas metacíclicos no hospedeiro mamífero, estes entram em macrófagos mediados por interações específicas entre moléculas da superfície do protozoário e receptores da célula hospedeira, como receptores de manose, receptores do complemento 2 e 3 e receptores Fc γ , desencadeando processo de fagocitose (KAYE; SCOTT, 2011).

Fagocitose é um mecanismo de internalização de partículas $>0,5 \mu\text{m}$, e é usada por células especializadas tais como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, para se livrarem de partículas estranhas ou debris celulares. Esse processo é iniciado pelo reconhecimento de partículas estranhas por diversos receptores na superfície celular. A ligação nestes receptores inicia uma série complexa de eventos, incluindo polimerização do citoesqueleto de actina, extensão da membrana plasmática, finalmente levando a internalização de partículas. A família de GTPases Rho (Rac, Rho e Cdc 42) regulam numerosas funções celulares, as quais muitas delas requerem alterações no citoesqueleto de actina.

As citocalasinas são metabólitos fúngicos que têm a capacidade de se ligar aos filamentos de actina e bloquear ou impedir a polimerização de actina. Como resultado da inibição da polimerização da actina as citocalasinas podem alterar a morfologia celular e inibir processos celulares tais como a divisão celular e a fagocitose (HEPTINSTALL, et al.,1998).

Nossos resultados mostraram diminuição na entrada de promastigotas de *L. amazonensis* nos macrófagos pré-tratados com citocalasina D, o que era esperado já que a principal forma descrita de entrada desse protozoário em macrófagos é por meio da fagocitose. Em contrapartida, existe a presença de *L. amazonensis* em aproximadamente 43% a 56% das células totais em macrófagos C57BL/6 e macrófagos peritoneais de BALB/c, respectivamente, tratados com citocalasina D, fato que não pode ser

desconsiderado. Diferentemente do estudo realizado por Morehead e colaboradores (2002) que mostra uma drástica redução da entrada de formas amastigotas de *L. amazonensis* com diminuição de cerca de 70% da fagocitose em células CHO (células ovarianas de hamster chinês) tratadas com citocalasina D.

Células não fagocíticas tem sido descritas como possíveis hospedeiras de *L. amazonensis*, como fibroblastos (KAYE; SCOTT, 2011) e células musculares (SILVA-ALMEIDA, et al., 2010). Entretanto, os mecanismos envolvidos na entrada e permanência do protozoário dentro das células não fagocíticas permanecem pobremente entendidos. Desta forma, nossos resultados sugerem que além do processo fagocítico, formas promastigotas de *L. amazonensis* podem invadir ativamente a célula hospedeira.

Outro resultado interessante aparece no tempo de 24 horas após a invasão de *L. amazonensis* em macrófagos tratados ou não com citocalasina D. Fica evidente que a não polimerização de actina ou deficiência da mesma, provoca um aumento na multiplicação e/ou na persistência (se a diferença não for devido à multiplicação) desse protozoário em relação às células não tratadas com citocalasina D no tempo de 24 horas após a internalização.

Sabe-se que o processo de entrada de *Leishmania* nos macrófagos que ocorre por meio da fagocitose desencadeia a formação de endossomos que se fundem a vesículas contendo pH ácido, os lisossomos, e que durante esse processo, ocorre a mudança da forma promastigota para a forma amastigota, que pode ser resistente às hidrolases presentes nos lisossomos (VINET, et al., 2009; ASSIS, et al., 2011). A forma amastigota se multiplica neste ambiente hostil e por isso é considerada a forma responsável pela persistência da infecção. Contudo em experimentos *in vitro* a taxa de sobrevivência dos amastigotas não é muito alta, o que explicaria o não aumento do número de *Leishmanias* após a invasão em macrófagos não tratados com citocalasina D (HSIAO, et al., 2011). E ainda, todo esse processo é dependente do citoesqueleto celular, principalmente dos microtúbulos (SOLDATI; SCHLIWA, 2006) Sendo assim, estaríamos presenciando um processo de entrada ativo, independente do citoesqueleto de actina, das formas promastigotas de *L. amazonensis*? E a menor quantidade de parasitos no tempo de 24 horas nos macrófagos não tratados com citocalasina D seria devido ao fato dessas células possuírem seus mecanismos de defesa iniciais, como a formação do fagolisossomo após o processo de fagocitose, funcionais? E no caso das

células tratadas com citocalasina D, ocorre um processo de persistência dos parasitos por não haver condições de respostas intracelulares eficazes e adequadas na ausência de citoesqueleto funcional?

Para entendermos um pouco melhor sobre o processo de entrada de *L. amazonensis* nos macrófagos dependente do citoesqueleto celular, células *knockdown* (KD) para proteínas relacionadas com o citoesqueleto de actina como Arp2, WASp, Septinas 4 e 14 e Galectina-3 foram preparadas durante nossos estudos. Nossos dados mostraram um aumento da internalização dos parasitos nas células KD para WASp, Arp2 e Galectina-3.

WASp é uma proteína celular que interage com vários fatores citoplasmáticos envolvendo transdução de sinais e citoesqueleto de actina. O estudo desenvolvido por Haein Park e Dianne Cox (2009) mostrou diminuição de aproximadamente 50% da fagocitose de células vermelhas do sangue por macrófagos com baixa expressão de WASp. A fagocitose residual foi atribuída a outra proteína da família WASp, a N-WASp. Quando esses pesquisadores utilizaram um inibidor seletivo de WASp e N-WASp, a Wiskostatina, a fagocitose foi praticamente nula.

N-WASp possui extensa homologia com WASp possuindo 80% de identidade em domínios funcionais. Estas proteínas podem se substituir em muitos ensaios *in vitro* (MOULDING, et al., 2013). Sendo assim, nossos resultados sugerem a participação de N-WASp na manutenção do processo de fagocitose, o que poderia explicar parcialmente o aumento do número de células infectadas, juntamente com um mecanismo, supostamente alternativo e independente do citoesqueleto, de entrada ativa de *L. amazonensis* nos macrófagos murinos, vistos nos experimentos anteriores.

Arp2 faz parte de um complexo de proteínas relacionadas à actina (complexo Arp 2/3) que tem papel importante na nucleação de filamentos de actina. WASp contém um domínio VCA que ativa a nucleação do complexo Arp 2/3 durante a polimerização de actina em tempos e locais biologicamente adequados. Com isso, as duas proteínas possuem papéis importantes e interligados, e a diminuição dessas proteínas que regulam o citoesqueleto parece favorecer o processo de entrada de *L. amazonensis*.

Além disso, o atraso na maturação fagossomal induzida por promastigotas é caracterizada por acumulação perifagossomal de F-actina (HOLM, et al., 2001), e por

retenção fagossomal de componentes da maquinaria de polimerização da actina, incluindo complexo Arp 2/3, proteína WASp (LODGE; DESCOTEAUX, 2005a). Com base nisso, estaríamos presenciando um evento de entrada promovido pelo próprio parasito independente do citoesqueleto? O que explicaria também a entrada em células não fagocíticas.

Galectinas formam uma família de lectinas que possuem domínio conservado de reconhecimento de carboidratos e normalmente se ligam a glicanos contendo β -galactosídeos. Entretanto, existem diferenças sutis nos domínios de reconhecimento entre as galectinas que resultam em afinidades de ligação distintas para ligantes específicos (COOPER; BARONDES, 1999). Elas são reguladores essenciais do sistema imunológico, são expressas em quase todas as células imunes e têm papéis fundamentais em processos biológicos, incluindo a adesão celular, quimiotaxia, regulação do crescimento e inflamação (DI LELLA, et al., 2011). Funções efetoras de galectinas são exercidas intra e extracelularmente, podendo fazer ligação cruzada com a superfície da célula ou glicoconjugados da matriz, conduzindo a adesão e/ou a ativação de cascatas de sinalização que modulam atividades celulares e sobrevivência (BOSCHER, et al., 2011). Além de ligantes celulares, galectinas também se ligam na superfície de microrganismos e, assim, tem atraído a atenção para a investigação em seus papéis como potencial receptor de patógenos e regulador de respostas à infecção (VASTA, 2009).

Galectina-1 (Gal-1) inibe a liberação de ácido araquidônico, bloqueia a síntese de óxido nítrico e aumenta a atividade da arginase. Por conseguinte, o tratamento com Gal-1 inibe a produção de IFN- γ induzida pela fagocitose a partir do receptor Fc, inibe a expressão de MHC II em monócitos e macrófagos humanos (BARRIONUEVO, et al., 2007) e bloqueia a secreção de IL-12 a partir de macrófagos infectados com parasitos (ZUNIGA, et al., 2001). Foi descrito também que Gal-1 pode regular negativamente a função e ativação da apresentação de antígenos em monócitos e macrófagos. Por outro lado, Gal-3, modula a produção de algumas citocinas, tais como IL-1, IL-5 e IL-8 em de monócitos e macrófagos, assim como em alguns outros tipos celulares (FILER, et al., 2009). Gal-3 também induz influxo de Ca^{2+} em monócitos (LIU, et al., 1995), atua como um quimio atraente de monócitos, macrófagos e células endoteliais, aumenta depuração de macrófagos de neutrófilos apoptóticos e participa de muitos outros processos (NOVAK, et al., 2012). Macrófagos que são deficientes para galectina-3

apresentam fagocitose defeituosa (SANO, et al., 2003). Além disso, Gal-3 e Gal-9 ligam-se a superfície de *Leishmania major* e gal -9 promove a interação entre *L. major* e o macrófago hospedeiro, facilitando sua invasão (PELLETIER, et al., 2003).

A partir dessas informações, nossos resultados mostraram que a diminuição da expressão de Gal-3 facilitou a entrada e também a multiplicação e /ou permanência de *L. amazonensis* em macrófagos murinos, sugerindo um papel protetor da galectina-3 contra esse protozoário. Por outro lado, a diminuição da expressão de Galectina-3 pode ter favorecido a ligação a outras galectinas na superfície dos macrófagos como as galectinas 1 e 9. Como visto acima, Gal-1 poderia favorecer a infecção e Gal-9 que já foi descrita como ligante de *L. major*, estaria mediando sua adesão e entrada na célula hospedeira. Além disso, Gal-3 está associada ao processo de polimerização de actina e dinâmica de membrana da célula hospedeira, tornando-se mais uma possível evidência da entrada de *L. amazonensis* independente do citoesqueleto de actina.

Nossos dados também mostraram a presença de *L. amazonensis* em aproximadamente 30% dos macrófagos pré-fixados com formaldeído, outro indício de entrada desse parasito de forma independente da célula hospedeira, o que pode caracterizar entrada ativa. De forma contrária, a pesquisa realizada por Zenian e colaboradores (1979) que descreve a entrada de *Leishmania tropica* em macrófagos peritoneais de murinos, e apresentam entrada de *L. tropica* próxima de zero em células pré-fixadas.

Com base nesses resultados, acreditamos estar diante de uma possível quebra de paradigma envolvendo a *Leishmania* spp e sua interação com as células do hospedeiro. Outros experimentos devem ser determinantes para entender melhor esse fenômeno. Será que as formas promastigotas se transformam em formas amastigotas após a entrada nas células não fagocíticas? Será que ela é capaz de se multiplicar e manter a infecção por longos períodos? ou seria apenas um forma de escape das células da resposta imune do hospedeiro? Muitas questões ainda precisam ser elucidadas.

6.2 Sinalização celular envolvida no tráfego intracelular de *L. amazonensis*

Elucidar componentes reguladores da complexa interação entre o parasita e os alvos celulares é imprescindível para o entendimento da patologia das leishmanioses. Estudos demonstram a modulação das vias de sinalização e respostas transcricionais do hospedeiro pelas espécies de *Leishmania* (OLIVIER, et al., 2012), levando os parasitos à sobrevivência dentro dos macrófagos (UNENO; WILSON, 2012).

No início da infecção, promastigotas de *Leishmania* são internalizados por macrófagos em fagossomos. Em seguida essas estruturas sofrem maturação, gerando um compartimento microbicida. Em contrapartida, estes protozoários desenvolveram mecanismos de evasão para resistir ao ambiente lítico, como por exemplo, a inibição ou atraso da biogênese fagolisossomal (DESJARDINS, et al. 1997; DERMINE, et al. 2000, MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). No entanto, os mecanismos de sinalização celular envolvidos nesse processo de atraso da fusão fagossomo–lisossomo são pouco compreendidos (ASSIS, et al., 2011). Neste estudo, procuramos determinar a sinalização envolvida na internalização e na biogênese do fagossomo contendo promastigotas de *L. amazonensis*.

Nossos resultados mostram o envolvimento das proteínas mTOR, ERK2, MEK1/2, Akt e RAS no recrutamento de lisossomo para o fagossomo, já que a fusão dessas organelas foi inibida nos primeiros 15 minutos de invasão e posteriormente o envolvimento das vias ERK2, MEK1/2 e Akt até o tempo de 1 hora, sendo que a inibição das vias de ERK2 e MEK1/2 causaram retardo no recrutamento de lisossomos até 3 horas após a internalização.

Com isso, Akt, ERK2 e MEK1/2 parecem ser as vias de sinalização mais importantes relacionadas ao tráfego de vesículas nos macrófagos infectados. Além disso, a pesquisa da sinalização ativada durante a infecção por *L. amazonensis* realizada por western blot confirma a ativação das vias MEK/ERK e Akt nos tempos iniciais após a invasão.

AKT é indispensável para as vias de transdução de sinais que regulam processos intrínsecos à sobrevivência e defesa do organismo, como crescimento celular, proliferação, sobrevivência e imunidade. A ativação da AKT é bastante regulada nas células, possuindo pelo menos, três eventos necessários para a ativação completa de sua

atividade enzimática. O primeiro evento é a rápida translocação de AKT para a membrana plasmática, em resposta a algum estímulo, os dois eventos subsequentes são a fosforilação dos resíduos Thr308 e Ser473, que transforma AKT em uma potente quinase (DONG; LIU, 2005).

Enquanto PI3K, é considerado um importante regulador da ativação AKT em resposta a uma variedade de ligantes, estudos recentes destacam grupo diverso de tirosina (Ack1/TNK2, Src, PTK6) e serina/treonina (TBK1, IKBKE, DNAPKcs) quinases que também ativam AKT diretamente (MAHAJAN; MAHAJAN, 2012).

Efeitos relacionados à fusão fagolisossomal com a participação de AKT ativada por meio da PI3K foram relatados em *Dictyostelium discoideum*. A fosforilação de AKT atrasou a fusão do fagossomo-lisossomo promovendo a sobrevivência de patógenos infectando *D. discoideum* (RUPPER, et al., 2001). De forma semelhante, nossos resultados mostraram que a ativação de AKT parece estar envolvida no recrutamento de lisossomo para o fagossomo contendo *L. amazonensis*, já que a sua inibição provocou redução da fusão fagossomo-lisossomo nos tempos iniciais após a invasão. Curiosamente a inibição da PI3K não interferiu na formação do fagolisossomo contendo *L. amazonensis*, o que indica que AKT pode ter sido ativada de forma independente da PI3K que é comumente responsável pela translocação de AKT para a membrana plasmática.

Durante a invasão de *L. amazonensis* nos macrófagos murinos vimos que a inibição das vias de sinalização PI3K, e das MAPKs ERK2 e MEK1/2 provocaram alta redução da invasão e da carga parasitária, indicando que essas vias podem favorecer a infecção ou serem moduladas por esse parasito para garantir a sua sobrevivência.

ERK, uma serina/treonina-quinase envolvida na transdução de sinal a partir de uma grande variedade de receptores (GUTKIND, 2000), medeia à ativação de fatores nucleares, como fator nuclear- κ B, que é importante para a expressão de citocinas (SÁNCHEZ-MEJORADA; ROSALES 1998, REYES-REYES, et al., 2001). No entanto, o papel da ERK na fagocitose não é tão claro. Pelo menos duas vias que conduzem à ativação de ERK já foram descritas. Em fagócitos, a ativação de ERK pode resultar de PKC (BRETON; DESCOTEAUX, 2000) ou de PI3K (GARCIA-GARCIA, et al., 2002). A via dependente de PKC para a ativação de ERK envolve a translocação de PKC e Raf-1 para a membrana plasmática. Raf-1, por sua vez ativa a MAPK quinase

(MEK), e a ativação de MEK leva diretamente a ativação de ERK (MARSHALL, 1994).

As moléculas envolvidas na ativação de ERK pela PI3K estão ainda sendo identificadas, mas é possível que AKT desempenhe um papel na ativação de ERK (KING, et al., 1997). Independentemente da via de ativação, foi visto que a inibição de ERK pelo inibidor PD98059 (MEK/ERK) abole a fagocitose em neutrófilos e macrófagos (GARCIA-GARCIA, et al., 2002).

Esses dados corroboram com nossos resultados relacionados à fagocitose de *L. amazonensis*, a qual foi inibida drasticamente após o tratamento com os inibidores específicos de ERK2 e MEK1/2. Por outro lado, o papel das MAPKs no processo de maturação das vesículas endocíticas ainda permanece obscuro. Entretanto, nossos resultados também mostram que ocorre a fosforilação de ERK até 1 hora após a invasão do parasito, assim, podemos afirmar que a ativação de MEK/ERK consiste em um importante evento para o tráfego intracelular de *L. amazonensis* dentro do macrófago hospedeiro.

A PI3K atua em uma série de processos homeostáticos celulares, incluindo crescimento, sobrevivência, regulação do ciclo celular, apoptose, migração, entre outros (OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Um estudo utilizando o inibidor de PI3K γ (PI3K de classe 1) AS-605240 e camundongos deficientes em PI3K γ , mostrou que o bloqueio seletivo ou a deficiência de PI3K γ provocou uma significativa supressão de entrada de *Leishmania mexicana* em fagócitos e também redução no recrutamento de fagócitos para os locais da infecção, o que sugere que a sinalização por PI3K γ não confere resistência contra esse parasito (CUMMINGS, et al. 2012).

Em outro estudo realizado por Ruhland e colaboradores (2007) mostrou que ativação da sinalização PI3K/AKT na presença de *Leishmania* spp. pode conferir resistência às células hospedeiras contra apoptose. Macrófagos derivados de medula ou macrófagos RAW infectados com *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. mexicana pifanoi* tratados com inibidor de PI3K/Akt LY294002 ou inibidor de AKT não apresentaram resistência contra ativadores de apoptose (RUHLAND, et al. 2007). Esse estudo mostra como a ativação da via PI3K em células infectadas pode favorecer a continuidade da infecção por *Leishmania*, o que poderia explicar a diminuição da taxa de invasão e da carga parasitária, após a inibição dessa via, visto em nossos experimentos.

A invasão de *L. amazonensis* é capaz de induzir a fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos MAPKs (MEK/ERK). Assim, o bloqueio dessas vias mostraram considerável diminuição da infecção dos macrófagos pelos parasitos, sugerindo que as vias dependentes da ativação das MAPKs são importantes para o estabelecimento da infecção.

Por outro lado, vimos também que apesar do atraso na formação do fagolisossomo provocado pelo tratamento prévio das células com os inibidores de mTOR, ERK, MEK1/2 e AKT e da diminuição da invasão nas células pré-tratadas com inibidores de ERK2 e MEK1/2, não houve alteração da carga parasitária nas células tratadas continuamente com esses mesmos inibidores, após 24 horas de infecção. Esses resultados sugerem que após a invasão, as vias de sinalização mTOR, ERK2, MEK1/2 e AKT parecem não interferir diretamente no processo de multiplicação de *L. amazonensis* na célula hospedeira.

Neste estudo, mostramos o envolvimento e a importância da ativação de várias vias de sinalização para o recrutamento de vesículas e para o processo de invasão de *L. amazonensis* em macrófagos de BALB/c. Muitos outros experimentos devem ser realizados com o objetivo de elucidar melhor os mecanismos envolvidos na ativação de cada via descrita neste estudo. Outras vias de sinalização ativadas durante esses processos devem ser investigadas para melhor compreensão da modulação do parasito frente à maquinaria celular do hospedeiro.

Muitas questões ainda precisam ser entendidas e poderão ser utilizadas em trabalhos futuros, como por exemplo, por meio de quais mecanismos a sinalização envolvendo AKT está sendo ativada de forma independente da PI3K durante a formação do fagolisossomo? Qual mecanismo celular está envolvido no recrutamento de lisossomos ao fagossomo pelas MAPKs? Porque a inibição das vias de sinalização envolvendo PI3K, MEK1/2 e ERK 2 provocaram forte redução na taxa de invasão mas não tiveram nenhum efeito sobre a multiplicação de *L. amazonensis*?

7.0 Conclusão

Com base no que foi realizado neste estudo, podemos concluir que o processo de invasão de *L. amazonensis* pode ocorrer de forma independente do citoesqueleto de actina. *L. amazonensis* foi capaz de invadir células previamente fixadas e com deficiência na polimerização de actina. Além disso, o processo de invasão nas células hospedeiras foi favorecido pela diminuição da expressão das proteínas relacionadas ao citoesqueleto de actina Arp2, Galectina-3 e WASp. O processo de multiplicação também foi favorecido em células *knockdown* para Galectina-3.

As vias de sinalização MEK1/2, ERK2 e AKT estão envolvidas no processo de biogênese fagolisossomal em macrófagos peritoneais de BALB/c invadidos por promastigotas de *L. amazonensis*. As vias de sinalização envolvendo AKT e ERK são prontamente ativadas nos tempos iniciais durante a cinética de internalização de *L. amazonensis* nos macrófagos hospedeiros, mostrando a importância dessas vias no estabelecimento da infecção.

A inibição de ERK, MEK1/2 e PI3K provocaram grande redução na taxa de invasão e na carga parasitária, sugerindo papel importante na ativação dessas vias para a internalização dos parasitos nas células hospedeiras. O processo de multiplicação de *L. amazonensis* não foi afetado pela inibição das vias PI3K, ERK e MEK1/2.

8.0 Referências Bibliográficas

ALBERT, M. H.; NOTARANGELO, L. D.; OCHS, H. D. Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. **Curr Opin Hematol.**, v.18, p. 42-48, 2011.

ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **J. Protozool.** v. 22, p. 502-508, 1975.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012.

AMANN, K. J.; POLLARD, T. D. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 98, p. 15009-15013, 2001.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M. SOARES, R. P.; SALVATORE, J. T. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1354-1365, 2011.

BARRIONUEVO, P.; BEIGIER-COMPADRE, M.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; BIANCO, G. A.; ISTURIZ, M. A., RABINOVICH, G. A. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. **J. Immunol.**, v. 178, p. 436-445, 2007.

BEEL, K. et al. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. **Br J Haematol.**, v. 144, p.120-126, 2009.

BEN-SAHRA, I.; HOWELL, J. J.; ASARA, J. M.; MANNING, B. D. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. **Science**, v. 339, p. 1323-1328, 2013.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 16, p. 397-401, 2003.

BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOE, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, K.; BRYCESON, A. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p. 25-32, 1998.

BERMAN, J. D.; GALLALE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem Pharmacol**, v. 36, p. 197-201, 1987.

BERTIN, A.; MCMURRAY, M. A.; THAI, L.; GARCIA, G.; VOTIN, V.; GROB, P. ALLYN, T. THORNER, T.; NOGALES, E. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. **J. Mol. Biol.**, v. 404, p. 711-731, 2010.

BHARDWAJ, S.; SRIVASTAVA, N.; SUDAN, R.; SAHA, B., *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **J. Biomed. Biotechnol.**, 2010.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol. Today**, v. 15, p. 22-28, 1999.

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; HASHIMOTO OKADA, L. Y.; DE ATRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, p. 2234-2243, 2004.

BOSCHER, C.; DENNIS, J. W.; NABI, I. R. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 2, p. 383-392, 2011.

BRADFORD, M. Analytical Biochemistry, v.72, p. 248-254, 1976.

BRETON, A.; DESCOTEAUX, A. Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, p. 472-476, 2000.

BU, Z.; CALLAWAY, D. J. Proteins MOVE! Protein dynamics and long-range allostery in cell signaling. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 83, p. 163-221, 2011.

CATALANOTTI, F.; REYES, G.; JESENBERGER, V.; GALABOVA-KOVACS, G.; DE MATOS SIMOES, R.; CARUGO, O.; BACCARINI, M. A Mek1-Mek2 heterodimer determines the strength and duration of the Erk signal. **Nat Struct Mol Biol.** v. 16, p. 294-303, 2009.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **J. Exp.Med.** v. 147, p. 515-530, 1978.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages *in vitro*. **Science**, v. 193, p. 678-680, 1976.

COOPER, D. N.; BARONDES, S. H.. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology**, v.9: 979-984, 1999.

CUMMINGS, H. E.; BARBI, J.; REVILLE, P.; OGHUMUA, S.; ZORKO, N.; SARKAR, A.; KEISER, T. L.; LU, B.; RUCKLE, T.; VARIKUTI, S.; LEZAMA-DAVILA, C.; WEWERS, M. D.; WHITACRE, C.; RADZIOCH, D.; ROMMEL, C.; SEVEAU, S.; SATOSKAR, A. R. Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in

parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. **PNAS**, v. 4, p. 1251-1256, 2012.

DAVIS, A. J.; KEDZIERSKI, L. Recent advances in antileishmanial drug development. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 6, p. 163-169, 2005.

DE CARVALHO VIVARINI, A.; PEREIRA, R. D.; DIAS TEIXEIRA, K. L.; CALEGARI-SILVA, T. C.; BELLIO, M.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; DE CASTRO GOMES, C. M.; SOARES, R. P.; MENDES SILVA, A.; SILVEIRA, F. T.; LOPES, U. G. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **FASEB J.**, v. 25, p. 1-12, 2011.

DEANE, J. A.; FRUMAN, D. A. Phosphoinositide 3-kinase: Diverse roles in immune cell activation. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 563-598, 2004.

DELGADO-DOMINGUEZ, J.; GONZALEZ-AGUILAR, H.; AGUIRRE-GARCIA, M.; GUTIERREZ-KOBEH, L.; BERZUNZA-CRUZ, M.; RUIZ-REMIGIO, A.; ROBLES-FLORES, M.; BECKER, I. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC alpha-induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice, **Parasite Immunol.** v. 32, p. 440-449, 2010.

DERMINE, J. F.; GOYETTE, G.; HOUDE, M.; TURCO, S. J.; DESJARDINS, M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages, **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 1263-1270, 2005.

DERMINE, J. F.; SCIANMANICO, S.; PRIVE, C.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis, **Cell. Microbiol.**, v. 2, p. 115-126, 2000.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan, **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 2061-2068, 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology. Microbiology and Infectious Disease*, v. 27, p. 205-318, 2004.

DI LELLA, S.; SUNDBLAD, V.; CERLIANI, J. P.; GUARDIA, C. M.; ESTRIN, D. A.; VASTA, G. R.; RABINOVICH, G. A. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*, v. 50, p. 7842-7857, 2011.

DONG, S.; HUGHES, R. C. Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen). *Glycoconj J.* v. 14, p.267-274, 1997.

DONG, L. Q.; LIU, F. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 289, p.187–196, 2005.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA, M.; BERRY, D. A. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.*, v. 83, p. 433-473, 2003.

FAYARD, E.; TINTIGNAC, L. A.; BAUDRY, A.; HEMMINGS, B. A. Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 118, p. 5675-5678, 2005.

FENG, J.; GOODRIDGE, H. S.; HERNETT, M. M.; WEI, X. Q.; NIKOLAEV, A.V.; HIGSON, A. P.; LIEW, F. Y. Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: *Leishmania* phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase, *J. Immunol.*, v. 163, p. 6403-6412, 1999.

FILER, A.; BIK, M.; PARSONAGE, G. N.; FITTON, J.; TREBILCOCK, E.; HOWLETT, K.; COOK, M.; RAZA, K.; SIMMONS, D. L ; THOMAS, A. M.; SALMON, M.; SCHEEL-TOELLNER, D.; LORD, J. M.; RABINOVICH, G. A BUCLEY, C. D. Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways. *Arthritis Rheum.* v. 60, p. 1604-1614, 2009.

FLETCHER, A. D.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, p. 485-492, 2010.

FORESTIER, C. L.; MACHU, C.; LOUSSERT, C.; PESCHER, P.; SPATH, G. F. Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. **Cell Host Microbe**, v. 9, p. 319-330, 2011.

FOX, T.; COLL, J. T.; XIE, X.; FORD, P. J.; GERMANN, U. A.; PORTER, M. D.; PAZHANISAMY, S.; FLEMING, M. A.; GALULLO, V.; SU, M. S.; WILSON, K. P. A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. **Protein Sci.**, v. 7, p. 2249-2255, 1998.

FRAME, M. C.; BRUNTON, V. G. Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. **Curr Opin Genet Dev.**, v. 12, p. 36-43, 2002.

GARCIA-GARCIA, E.; ROSALES, R.; ROSALES, C. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte to macrophage differentiation. **J. Leukoc. Biol.**, v. 72, p. 107-114, 2002.

GARIN, J.; DIEZ, R.; KIEFFER, S.; DERMINE, J. F.; DUCLOS, S.; GAGNON, E.; SADOUL, R.; RONDEAU, C.; DESJARDINS, M. The phagosome proteome: Insight into phagosome functions. **J Cell Biol.** v. 152, p. 165-180, 2001.

GAUR, U.; SHOWALTER, M.; HICKERSON, S.; DALVI, R.; TURCO, S. J.; WILSON, M. E.; BEVERLY, S. M. *Leishmania donovani* lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts. **Exp. Parasitol.**, v. 122, p. 182-191, 2009.

GAY, B.; SUAREZ, S.; CARAVATTI, G.; FURET, P.; MEYER, T.; SCHOEPFER, J. Selective GRB2 SH2 inhibitors as anti-Ras therapy. **Int J Cancer**, v. 83 p. 235-241, 1999.

GOLEY, E. D.; WELCH, M. D. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 7, p. 713-726, 2006.

GOUIN, E.; EGILE, C.; DEHOUX, P.; VILLIERS, V.; ADAMS, J.; et al. The RickA protein of *Rickettsia conorii* activates the Arp2/3 complex. **Nature**, v. 427, p. 457-461, 2004.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*, **Parasitology**, v. 130, p. S27-S35, 2005.

GUO, J. P.; COPPOLA, D.; CHENG, J. Q. IKBKE activates Akt independent of phosphatidylinositol 3-kinase/ PDK1/mTORC2 and PH domain to sustain malignant transformation. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, p. 37389-98, 2011.

GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, p. 6748-6753, 2009.

GUTKIND, J. S. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Networks by G Protein-Coupled Receptors. **Science Signaling**, v. 2000, p. re1, 2000.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANNIGAN, M. et al. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 3603-3608, 2002.

HEPTINSTALL, J. A.; MAY, H.; RATAN, J. R.; GLENN, W. L. GPIIb-IIIa antagonists cause rapid disaggregation of platelets pre-treated with cytochalasin D. Evidence that the stability of platelet aggregates depends on normal cytoskeletal assembly. **Platelets**, v. 9, p. 227 -232, 1998.

HOLM, A.; TEJLE, K.; MAGNUSSON, K. E.; DESCOTEAUX, A.; RASMUSSEN, B. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC alpha and defective phagosome maturation. **Cell.Microbiol.** v. 3, p. 439-447, 2001.

HOLM, A.; TEJLE, K.; GUNNARSSON, T.; MAGNUSSON, K. E. DESCOTEAUX, A.; RASMUSSEN, B. Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 302, p. 653-658, 2003.

HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p. 91-100, 2002.

HSIAO, C. C.; UENO, N. SHAO, J. Q.; SCHROEDER, K. R.; MOORE, K. C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The effects os macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survivak of *Leishmania*. **Microbes Infect.**, v. 13, p. 1033-1044, 2011.

HSU, D. K.; CHERNYAVSKY, A. I.; CHEN, H. Y.; YU, L.; GRANDO, S. A.; LIU, F. T. Endogenous galectin-3 is localized in membrane lipid rafts and regulates migration of dendritic cells. **J Invest Dermatol.**, v. 129, p. 573-583, 2009.

HUANG, Y.; YAN, M.; COLLINS, R. F.; DICICCIO, J. E.; GRNSTEIN, S.; TRIMBLE, W. S. Mammalian septins are required for phagosome formation. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, p. 1717-1726, 2008.

KAMEN, L. A.; LEVINSOHN, J.; SWANSON, J. A. Differential association of phosphatidylinositol 3-kinase, SHIP-1, and PTEN with forming phagosomes. **Mol Biol Cell**, v. 18, p. 2463-2472, 2007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 604-615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Where are We Today? **J Glob Infect Dis.**, v. 2, p. 177-85, 2010.

KING, W. G.; MATTALIANO, M. D.; CHAN, T. O.; TSICHLIS, P. N.; BRUGGE, J. S. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. **Mol. Cell. Biol.** v. 17, p.4406-4418, 1997.

KINNOSHITA, M.; FIELD, C. M.; COUGHLIN, M. L.; STRAIGHT, A. F.; MITCHISON, T. J. Self- and actin-templated assembly of mammalian septins. **Dev. Cell**, v. 3, p. 791-802, 2002.

KLESHCHENKO, Y. Y.; MOODY, T. N.; FURTAK, V. A.; OCHIENG, J.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human artery smooth muscle cells. **Infect Immun.**, v. 72, p. 6717-6721, 2004.

KOCH, A.; POIRIER, F.; JACOB, R.; DELACOUR, D. Galectin-3, a novel centrosome-associated protein, required for epithelial morphogenesis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 219-231, 2010.

KOVAR, D. R. Molecular details of formin-mediated actin assembly. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 18, p.11-17, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LERM, M.; HOLM, A.; SEIRON, A.; SARNDAHL, E.; MAGNUSSON, K. E.; RASMUSSEN, B. *Leishmania donovani* requires functional Cdc42 and Rac1 to prevent phagosomal maturation. **Infect.Immun.** v. 74, p. 2613-2618, 2006.

LEWIS, D. H.; PETERS, W. The resistance of intracellular *Leishmania* parasites to digestion by lysosomal enzymes. **Ann.Trop.Med. Parasitol.** v. 71, p. 295-312, 1977.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc 42. **Cell.Microbiol.** v. 7, p. 1647-1658, 2005 a.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome bio- genesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clin. Immunol.** v. 114, p. 256-265, 2005b.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1-dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, p. 2735-2744, 2006.

LIU, F. T.; HSU, D. K.; ZUBERI, R. I.; KUWABARA, I.; CHI, E. Y.; HENDERSON JR, W. R. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 1016-1028, 1995.

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.DA SILVA, A. A.; CRUZ, M. C.; MORTARA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; DA SILVA, C. V. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology**, v. 24, p. 179-184, 2014.

MAHAJAN, K.; MAHAJAN, N. P. PI3K-Independent AKT Activation in Cancers: A Treasure Trove for Novel Therapeutics. **J Cell Physiol.**, v. 227, p.3178-3184, 2012

MARSHALL, C. J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase, and MAP kinase. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v. 4, p. 82-89, 1994.

MELO, F. H. M.; BUTERA, D.; JUNQUEIRA, M. S.; HSU, D. K.; DA SILVA, A. M. M.; FU-TONG LIU; SANTOS, M.F.; CHAMMAS, R. The Promigratory Activity of the Matricellular Protein Galectin-3 Depends on the Activation of PI-3 Kinase. **PLoS ONE**, v. 6, p. e29313, 2011.

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J.; TIWARI, V. K. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, p. 107-123, 2009.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. **FEBS Lett.** v. 470, p. 305-308, 2000.

MORADIM, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-7, 2012.

MOREHEAD, J.; COPPENS, I.; ANDREWS, N. W. Opsonization modulates Rac-1 activation during cell entry by *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 4571-4580, 2002.

MOSELEY, J. B. An expanded view of the eukaryotic cytoskeleton. **Molecular Biology of the cell**, v. 24, p.1615-1618, 2013.

MOSTOWY, S.; COSSART, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 13, p. 183-194, 2012.

MOSTOWY, S.; BONAZZI, M.; HAMON, M. A.; THAM, T. N.; MALLET, A.; LELEK, M.; GOUIN, E.; DEMANGEL, C.; BROSCHE, R.; ZIMMER, C.; SARTORI, A.; KINOSHITA, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. **Cell Host Microbe**, v. 8, p. 433-444, 2010.

MOULDING, D. A.; RECORD, J.; MALINOVA, D.; THRASHER, A. J. Actin cytoskeletal defects in immunodeficiency. **Immunological Reviews**, v. 256, p. 282-299, 2013.

MUKKADA, A. J.; MEADE, J. C.; GLASER, T. A.; BONVENTRE, P. F. Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acid pH: an adaptation for intracellular growth. **Science**, v. 229, p. 1099-1101, 1985.

MURRAY, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, p. 279-292, 2004.

NADERER, T.; VINCE, J. E.; MCCONVILLE, M. J. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host, **Curr. Mol. Med.**, n. 4, p. 649–665, 2004.

NAGILL, R; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1464-1488, 2011.

NARAYANAN, A.; LE CLAIRE, L. L.; BARBER, D. L.; JACOBSON, M. P. Phosphorylation of the Arp2 Subunit Relieves Autoinhibitory Interactions for Arp2/3 Complex Activation. **PLoS Comput Biol.**, v. 7, p. e1002226, 2011.

NDJAMEN, B.; KANG, B. H.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cell.Microbiol.**, v. 12, p. 1480-1494, 2010.

NOVAK, R.; DABELIC, S.; DUMIC, J. Galectin-1 and galectin-3 expression profiles in classically and alternatively activated human macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1820, p. 1383-1390, 2012.

OEVER, J.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J.; VAN DE VEERDONK, F. L.; STELMA, F. F.; SIMON, A.; JANSSEN, M.; JOHNSON, M.; PACHOT, A.; KULLBERG, B. J.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G. Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 32, p.1605-1610, 2013.

OGHUMU, S.; SATOSKAR, R. A. PI3K- γ inhibitors in the therapeutic intervention of diseases caused by obligate intracellular pathogens. **Communicative and Integrative Biology**, v. 6, p. e23360, 2013.

MARTIN, O.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, p. 1377-1389, 2012.

PARK, H.; COX, D. Cdc42 Regulates Fc- Receptor-mediated Phagocytosis through the Activation and Phosphorylation of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) and Neural-WASP. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, p. 4500-4508, 2009.

PAZ, I. SACHSE, M.; DUPONT, N.; MOUNIER, J.; CEDERFUR, C.; ENNINGA, J.; LEFFLER, H.; POIRIER, F.; PREVOST, M. C.; LAFONT, F.; et al. Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. **Cell Microbiol.** v. 12, p. 530-544, 2010.

PELLETIER, I.; HASHIDATE, T.; URASHIMA, T.; NISHI, N.; NAKAMURA, T.; FUTAI, M.; ARATA, Y.; KASAI, K.; HIRASHIMA, M. Specific Recognition of

Leishmania major Poly- β -galactosyl. The journal of biological chemistry, v. 278, p. 22223-22230, 2003.

POLLARD, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, v. 36, p. 451-477, 2007.

QIAN, Y.; BAISDEN, J. M.; CHEREZOVA, L.; SUMMY, J. M.; GUAPPONE-KOAY, A.; SHI X, M. T.; PUSTULA, J.; ZOT, H. G.; MAZLOUM, N. et al. PC phosphorylation increases the ability of AFAP-110 to cross-link actin filaments. **Mol Biol Cell.**, v. 13, p. 2311-2322, 2002.

QIAN, Y.; BAISDEN, J.M.; ZOT, H.G.; VAN WINKLE, W.B.; FLYNN, D.C. The carboxy terminus of AFAP-110 modulates direct interactions with actin filaments and regulates its ability to alter actin filament integrity and induce lamellipodia formation. **Experimental Cell Research**, v. 255, p. 102-113, 2000.

RADLER-POHL, A.; SACHSENMAIER, C.; GEBEL, S.; AUER, H. P.; BRUDER, J. T.; RAPP, U.; ANGEL, P.; RAHMSDORF, H. J.; HERRLICH, P. UV-induced activation of AP-1 involves obligatory extranuclear steps including Raf-1 kinase, **Embo J.**, v.12, p.1005-1012, 1993.

REYES-REYES, M.; MORA, N.; ZENTELLA, A.; ROSALES, C. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF- κ B and MAPK activation through separate signaling pathways. **J. Cell Sci.** v. 114, p. 1579-1589, 2001.

RODRIGUES A. A.; SAOSA, J. S.; DA SILVA, G. K.; MARTINS, F. A.; DA SILVA A. A.; SOUZA NETO, C. P; HORTA, C. V.; ZAMBONI, D. S.; DA SILVA, J. S.; FERRO, E. A.; DA SILVA, C. V. IFN- γ Plays a unique role in protection against low virulent *Trypanosoma cruzi* strain. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 6, p. e1598, 2012.

RODRIGUEZ, N. E.; GAUR DIXIT, U.; ALLEN, L. A.; WILSON, M. E. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. **PLoS ONE**, v. 6, p. e19000, 2011.

ROHATGI, R.; HO HY, KIRSCHNER, M. W. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. **J Cell Biol.**, v. 150, p. 1299-131, 2000.

ROSEN, A; KEENAN, K. F. THELEN, M.; NAIM, A.C.; ADEREM, A. Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctuate structures in macrophage filopodia, **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1211-1215, 1990.

RUHLAND, A.; LEAL, N.; KIMA, PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. **Cell Microbiol.**, v. 9, p. 84-96, 2007.

RUNCHEL, C.; MATSUZAWA, A.; ICHJO, H. Mitogen-activated protein kinases in mammalian oxidative stress responses. **Antioxid Redox Signal.**, v. 15, p. 205-218, 2011.

RUPPER, A. C.; RODRIGUEZ-PARIS, J. M.; GROVE, B. D.; CARDELLI, J. A. p110-related PI 3-kinases regulate phagosome-phagosome fusion and phagosomal pH through a PKB/Akt dependent pathway in *Dictyostelium*. **J. Cell Sci.**, v. 114, p.1283-1295, 2001.

SACKS, D. L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, p. 1417-1419, 1984.

SAFAEI, S. et al. Detection of six novel mutations in WASP gene in fifteen Iranian Wiskott-Aldrich patients. **Iran J Allergy Asthma Immunol.**, v.11, p. 345-348. 2012.

SÁNCHEZ-MEJORADA, G.; ROSALES, C. Fc γ receptor-mediated mitogen- activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 27610-27619, 1998.

SANO, H.; HSU, D. K.; APGAR, J. R.; YU, L.; SHARMA, B. B.; KUWABARA, I.; IZUI, S.; LIU, F. T. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Invest.** v. 112, p.389-397, 2003.

SARAFIAN, V.; JADOT, M.; FOIDART, J. M.; LETESSON, J. J.; VAN DEN BRULE, F.; CASTRONOVO, V.; WATTIAUX, R.; CORNINCK, S. W. Expression of Lamp-1 and Lamp-2 and their interactions with galectin-3 in human tumor cells. **Int J Cancer.**, v. 75, p. 105-111, 1998.

SELLIN, M. E.; HOLMFELDT, P.; STENMARK, S.; GULLBERG, M. Microtubules support a disc-like septin arrangement at the plasma membrane of mammalian cells. **Mol. Biol. Cell**, v. 22, p. 4588-4601, 2011.

SEPT, D.; MCCAMMON, J. A Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. **Biophys J.**, v. 81, p.667-674, 2001.

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agente of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 577-579, 2006.

SILVA, C. V.; SILVA, E.; CRUZ, M.; CHAVRIER, P.; MORTARA, R. ARF6, PI3-kinase and host cell actin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii* cell invasion. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 378, p. 656-6, 2009.

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; ABREU-SILVA, A. L. D'ESCOFFIER, L. N.; CALABRESE, K. S. *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 315-318, 2010.

SMITH, B. A.; DAUGHERTY-CLARKE, K.; GOODE, B. L.; GELLES, J. Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex revealed by single-molecule imaging. **Proc Natl Acad Sci**, v. 110, p.1285-90, 2013.

SNYDER, B. N.; CHO, Y.; QIAN, Y.; COAD, J. E.; CUNNICK, J.; FLYNN, D. AFAP1L1 is a novel adaptor protein of the AFAP family that interacts with cortactin and localizes to invadosomes. **Eur J Cell Biol.**, v. 90, p. 376-389, 2011.

SOLDATI, T.; SCHLIWA, M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. **Nat Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, p. 897-908, 2006.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

THÉRY, C.; BOUSSAC, M.; VÉRON, P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; GARIN, J.; AMIGORENA, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **J Immunol.** v. 166, p. 7309-7318, 2001.

THRASHER, A. J.; BURNS, S. O. WASP: a key immunological multitasker. **Nat Rev Immunol.**, v. 10, 182-192, 2010.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TSUBOI, S.; MEERLOO, J. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is a Key Regulator of the Phagocytic Cup Formation in Macrophages. **The journal of biological chemistry**, v. 282, p. 34194-34203, 2007.

UNENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol.**, v. 28, p. 335-344, 2012.

VALLADA, E. P. Manual de técnicas hematológicas. São Paulo: **Atheneu**, 2002.

VASTA, G. R. Roles of galectins in infection. **Nat Rev Microbiol.**, v. 7, p. 424-438, 2009.

VINET, A. F.; FUKUDA, M.; TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathog.** v. 5, p. e1000628, 2009.

VINET, A. F.; JANAJI, S.; TURCO, S. J.; FUKUDA, M.; DESCOTEAUX, A. Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization, **Microbiology**, v. 157, p. 2619-2628, 2011.

XIE, X.; ZHANG, D.; ZHAO, B.; LU, M. K.; YOU, M.; CONDORELLI, G.; WANG, C. Y.; GUAN, K. L. IkappaB kinase epsilon and TANK-binding kinase 1 activate AKT by direct phosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.108, p 6474-6479, 2011.

WALKER, V. G.; AMMER, A.; CAO, Z.; CLUMP, A. C.; JIANG, B. H.; KELLEY, L. C.; WEED, S. A.; ZOT, H.; FLYNN, D. C. PI3K activation is required for PMA directed activation of cSrc by AFAP-110. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v. 293, p.119-132, 2007.

WEINER, O. D.; MARGANSKI, W. A.; WU, L. F.; ALTSCHULER, S. J.; KIRSCHNER, M. W. An actin-based wave generator organizes cell motility. **PLoS Biol.** v. 5, p. e221, 2007.

WELCH, M. D.; ROSENBLATT, J.; SKOBLE, J.; PORTNOY, D. A.; MITCHISON, T. J. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. **Science**, v. 281, p. 105-108, 1998.

WHO 2010. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> acessado em 05/01/14.

WIMBERG, M. E.; HOLM, A.; SARND AHL, E.; VINET, A. F.; DESCOTEAUX, A.; MAGNUSSON, K. E.; RASMUSSEN, B.; LERM, M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts, **Microbes Infect.**, n. 11, p. 215-222, 2009.

WOOLSEY, A. M.; et al. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of *Trypanosome* invasion and vacuole maturation. **J Cell Sci.**, v. 116, p. 3611-3622, 2003.

ZENIAN, A.; ROWLES, P.; GINGELL, D. Scanning electron-microscopic study of uptake of *Leishmania* parasites by macrophages. **J. Cell Sci.**, v. 39, p. 187-199, 1979.

ZUNIGA, E.; GRUPPI, A.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. I.; RABINOVISH, G.A. Regulated expression and effect of galectin-1 on *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: modulation of microbicidal activity and survival, **Infect. Immun.**, v. 69 p. 6804-6812, 2001.

CAPÍTULO 2

RESUMO

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* é o causador da Doença de Chagas. Estima-se a existência de 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo. *T. cruzi* apresenta diferentes proteínas de superfície relacionadas ao processo de invasão celular. Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa identificou em *T. cruzi*, uma proteína de 21 kDa (P21) que apresentou atividades pro-fagocíticas e quimiotáticas, exercendo papel importante na internalização desse protozoário *in vitro*. O presente trabalho teve como finalidade avaliar o papel da proteína recombinante P21-His₆ baseada na P21 nativa de *T. cruzi* na infecção por *Leishmania amazonensis*, a fim de buscar maior entendimento no mecanismo de ação dessa proteína e sua relação com o hospedeiro *in vivo*. Para isso, infectamos as patas de animais BALB/c e tratamos os animais com 40µg de P21 recombinante ativa e desnaturada, PBS e BSA por 6 semanas e avaliamos o tamanho da pata, a carga parasitária (PCR em tempo real) e a produção da citocina IL-1β nas patas, linfonodos do poplíteo e baços. Os resultados mostraram aumento na área da pata, bem como aumento da carga parasitária nos animais infectados e tratados com a P21-His₆. E ainda, aumento da produção da citocina IL-1β na pata e no linfonodo do poplíteo também nos animais tratados com a P21-His₆ também foram observados. Concluímos que a proteína P21 exerce papel pro-fagocítico também em experimentos *in vivo*, favorecendo a infecção.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, proteína P21-His₆.

ABSTRACT

The flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* is the causative agent for Chagas disease. It is estimated that there are eight million people infected worldwide. *T. cruzi* has different surface proteins related to cell invasion. In this context, our research group identified in *T. cruzi*, a protein of 21 kDa (P21) showed that pro-phagocytic and chemotactic activities, playing an important role in the internalization of this parasite *in vitro*. This study aimed to evaluate the role of recombinant protein P21-His₆ based on native P21 of *T. cruzi* in *Leishmania amazonensis* in order to seek greater understanding of the mechanism of action of this protein and its relationship with the host *in vivo*. To this end, the footpad infect BALB/c mouse treated with 40µg of active and denatured recombinant P21, BSA and PBS for 6 weeks and assess the footpad size, parasitic load (real time PCR) and cytokine production of IL-1β in the paws, the popliteal lymph nodes and spleen. The results showed an increase in the footpad area, as well as increased parasite load in the infected and treated animals with P21-His₆. Also, increased production of IL-β in the footpad and the popliteal lymph nodes also in animals treated with P21-His₆. We conclude that the P21 protein plays a role in pro-phagocytic also *in vivo* experiments, favoring infection.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, P21-His₆ protein.

1.0 Introdução

1.1 A proteína P21 de *Trypanosoma cruzi*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae (WHO, 2013). Estima-se a existência de 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Cerca de 40 milhões de pessoas vivem sob risco de contaminação, constituindo assim um grande problema de saúde pública (SCHOFIELD et al., 2006; WHO, 2013).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é heteroxênico e caracteriza-se morfologicamente por apresentar três estágios evolutivos distintos: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento de um estágio a outro é um processo complexo, envolvendo mudanças ultraestruturais, antigênicas e fisiológicas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984). Apenas as formas tripomastigotas e amastigotas são consideradas infectivas para o hospedeiro vertebrado (BEHBEHANI, 1973; ALVES; MORTARA, 2009). Durante o processo de invasão celular cada forma evolutiva apresenta diferentes proteínas de superfície ou secretadas. Por exemplo, a gp82 é a principal molécula de superfície de tripomastigotas metacíclicos especializada na adesão em mucinas gástricas e subsequente penetração em células epiteliais subjacentes. A ligação de metacíclicos a célula hospedeira mediada pela gp82 estimula a ativação de vias de transdução de sinais, que leva a mobilização de Ca^{2+} intracelular, o qual é necessário para a internalização de *T. cruzi* (DORTA, et al., 1995). Outra glicoproteína, a gp90 também presente em tripomastigotas, se liga as células de mamíferos por meio de receptores, mas não desencadeiam sinalização dependente de Ca^{2+} e funcionam como um regulador de baixa invasão, sua expressão é inversamente proporcional a infectividade do parasito (CORTEZ, et al., 2006). Por outro lado, amastinas, são exemplos de proteínas de superfície expressas por formas amastigotas de *T. cruzi*. Esta proteína participa na regulação da adesão e da invasão das formas amastigotas na célula hospedeira (CRUZ, et al., 2012).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores identificou em *T. cruzi*, uma proteína de 21 kDa (P21), um novo componente secretado que está envolvido na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A P21 é

uma proteína ubíqua em *T. cruzi* cuja forma recombinante (P21-His₆) adere à superfície de células HeLa de forma dose-dependente. Anticorpos policlonais desenvolvidos contra P21-His₆ inibiram a invasão celular por formas amastigotas e tripomastigotas metacíclicos *in vitro*. Em contrapartida, a adição da proteína recombinante junto com amastigotas extracelulares e tripomastigotas metacíclicos durante ensaios de invasão em células HeLa, provoca um significativo aumento na invasão celular por ambas as formas evolutivas também *in vitro* (SILVA et al., 2009). Recentemente, estudos realizados com a forma recombinante da P21 mostraram que esta proteína aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos por um mecanismo dependente da ligação da proteína ao receptor de quimiocinas CXCR4; induz a polimerização do citoesqueleto de actina da célula hospedeira e ativa a sinalização celular via PI3-quinase (RODRIGUES et al. 2012). Observamos, também, que a P21-His₆ apresenta alta atividade quimiotática tanto *in vitro* quanto *in vivo* (RODRIGUES et al. 2012).

Estes resultados sugerem que a P21 desempenha um importante papel na evasão pelo parasita da resposta imunológica do hospedeiro. Sua atividade quimiotática, associada com a propriedade pró-fagocítica garante ao parasito sua permanência no ambiente intracelular, onde ele pode escapar do fagolisossomo, dividindo-se e perpetuando a infecção. A habilidade da P21 em induzir a polimerização de actina da célula hospedeira sugere a possibilidade desta proteína se ligar a proteínas regulatórias da polimerização do citoesqueleto de actina no citoplasma celular e assim, mediante a resposta imune do hospedeiro na transição para a fase crônica da doença, a P21 induziria uma maior polimerização de actina de células infectadas, que mecanicamente impediria a intensa multiplicação parasitária observada na fase aguda, garantindo assim a perpetuação da infecção ao longo dos anos, com baixa ou nenhuma parasitemia.

A partir dos resultados obtidos até o momento, a proteína P21 vem demonstrando importância altamente significativa na infecção por *T. cruzi*. Por esse motivo é um alvo promissor de estudos que buscam entender os mecanismos de ação dos fatores de virulência desse parasito a fim de desenvolver tratamentos alternativos para a doença de Chagas. Neste contexto o presente trabalho teve como finalidade avaliar o papel da proteína recombinante P21-His₆ baseada na P21 nativa de *T. cruzi* na infecção por *Leishmania amazonensis*, a fim de buscar maior entendimento no mecanismo de ação dessa proteína e sua relação com o hospedeiro *in vivo*.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da proteína P21-His₆ na infecção de camundongos BALB/c por promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento da lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a proteína P21-His₆ na sua conformação ativa, inativa ou não tratados;
- Verificar carga parasitária *in vivo* após o tratamento com a proteína P21-His₆;
- Investigar a expressão da citocina IL-1 β nos diferentes grupos.

3.0 Material e Métodos

3.1 Aspectos éticos

Para execução dos experimentos descritos no presente trabalho envolvendo a utilização de animais, o projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA). A aprovação do projeto (Protocolo nº052/11) segue em Anexo.

3.2 Parasitos

Promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio BHI suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil), 100mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies, de Nova York, EUA), a 26 °C. Parasitas na fase estacionária foram utilizados para a infecção experimental de macrófagos.

3.3 Animais

Camundongos BALB/c, foram cuidados, manipulados e sacrificados conforme normas estabelecidas pela Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos no Biotério da UFU em condição padrão de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em temperatura de 25± 2°C, com ração e água repostos periodicamente.

3.4 Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 50 camundongos BALB/c machos, com idade de 4 a 6 semanas, divididos em 2 grupos: infectados e não infectados ou controles.

Para a infecção dos animais foram utilizadas formas promastigota de *Leishmania amazonensis* em fase estacionária na quantidade de 2×10^7 parasitos por animal. Com o auxílio de uma seringa de insulina, foram inoculados 40 µl, contendo a 10^7 promastigotas, nas patas direita e esquerda (via intradérmica) de cada camundongo.

Cada grupo continha 25 animais, subdivididos em cinco grupos com cinco animais em cada. Os subgrupos foram: tratados com 40 μL PBS; tratados com 40 μL de solução de PBS com BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); tratados com 40 μL de solução contendo PBS e P21-His₆ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); tratados com 40 μL de solução contendo PBS e P21-His₆ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) desnaturada a 100°C por 20 minutos e por fim um grupo de animais infectados e não infectados e não tratados. A cada 72h, durante seis semanas, os grupos de animais (com exceção dos dois grupos não tratados) receberam tratamento com a proteína P21-His₆, PBS 1x estéril, BSA e P21 desnaturada de acordo com a divisão descrita acima.

3.5 Medição das patas

A cada semana, 24 horas após o tratamento dos animais, foram medidas a altura e largura das patas direitas de cada animal, com o auxílio de um paquímetro digital (ZAAS-PAQ-DIGITAL), durante as seis semanas, a partir desses dados calculamos a área da pata direita de cada animal, sendo $\text{Área} = \text{Largura} \times \text{Altura}$.

3.6 Coleta de órgãos

Ao final do tempo de tratamento, os animais foram eutanasiados e tiveram alguns órgãos coletados para análises posteriores. Foram coletadas as patas direita e esquerda, baço e linfonodos poplíteo direito e esquerdo.

Linfonodo poplíteo direito, metade longitudinal do baço e raspado da pata direita foram macerados e armazenados em 500 μl de solução contendo coquetel de Inibidores de Protease (Sigma Aldrich – P8340) + PBS na proporção 1:100, no interior de tubos de polipropileno de 2 ml. Estes foram armazenados em *freezer* -20°C para posterior realização dos ensaios de ELISA - pesquisa de citocinas.

Linfonodo poplíteo esquerdo, metade longitudinal do baço e metade da pata esquerda foram armazenados no interior de tubos de polipropileno de 2 ml e fixados em formaldeído para posterior confecção de lâminas histológicas. A outra metade da pata esquerda também foi armazenada em tubo de polipropileno 2 ml para posterior realização de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

3.7 PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR)

Para a construção da curva padrão de *Leishmania* utilizou-se 10^8 promastigota de *L. amazonensis* diluídas em PBS em um volume de 1000 μ l. A partir desta solução, foi realizado 10 diluições seriadas na base 10 até 10^{-1} parasitos. Estas soluções foram armazenadas em *freezer* a -20°C .

Posteriormente, dois camundongos BALB/c, com oito semanas de vida, foram eutanasiados e tiveram ambas as patas coletadas. Para obtenção do tecido, foi realizado a raspagem das patas em placas de petri, com o auxílio de lâmina cortante. O raspado de das patas foram diluídos em 1 ml de PBS e, distribuídos igualmente (100 μ L) entre os pontos da curva e posteriormente, armazenados em *freezer* a -20°C . Para a extração do DNA da curva padrão, foi utilizado PureLink Genomic DNA mini kit – Life Technologies.

Após a extração do DNA, a curva foi submetida a PCR convencional (Tabelas 1 e 2) utilizando o Termociclador TC-412 (Techne), e com a solução final obtida após a PCR, fizemos um gel de poliacrilamida a 13% e coramos com nitrato de prata, para verificar o padrão decrescente da curva. Após visualizarmos esse padrão, a próxima etapa foi a extração de DNA das amostras coletadas. A PCR em tempo real foi realizada com as amostras e a curva para verificar a quantidade de parasitos nas patas (Tabela 3), utilizando o aparelho 7300 Real Time PCR System.

Tabela 1. Reagentes utilizados na reação de PCR convencional.

Reagentes	Volume /amostra (μL)
Taq DNA Polymerase Master Mix (cat n°: 140301- Ampliquon Bioreagents & PCR Enzymes)	12,5
Primer 1 (F) (13A 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3')	0,75
Primer 2 (R) (13 B: 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3')	0,75
H ₂ O Milli-Q	9,0
DNA	2,0
Volume Total da Reação	25

Tabela 2. Condições de amplificação para Reação de PCR convencional.

Etapas	PCR da curva padrão com <i>L. amazonensis</i> (10^5 - 10^{-1})
Desnaturação inicial	95°C – 5 min.
Número de ciclos	35
Desnaturação	95°C 5- 30 seg,
Anelamento	63°C – 45 seg.
Extensão	72°C – 30 seg.
Extensão final	72°C – 5 min.

Tabela 3. Reagentes utilizados na reação de PCR em tempo real.

Reagentes	Volume /amostra (μL)
Sybr green qPCR mix (Ludwing Biotec)	6,25
Primer 1 (F): (13A 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3')	0,75
Primer 2 (R): (13 B: 5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3')	0,75
H ₂ O Milli-Q	3,25
DNA	2,0
Volume Total da Reação	13,0

3.8 ELISA para pesquisa da citocina IL-1 β

Para dosagem de citocinas dos órgãos coletados, as amostras foram descongeladas no gelo e levadas ao sonicador (cada amostra foi submetida a 4 ciclos de 10 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os ciclos) para lise das células. Para pesquisa da citocina IL-1 β nos diferentes grupos, utilizamos o kit para ELISA da BD (cat:559603) de acordo com as instruções do fabricante.

4.0 Resultados

4.1 Efeito da proteína P21-His₆ na evolução da lesão de pata infectada com *L. amazonensis*.

Ao longo das seis semanas de infecção e duração do experimento, foram realizadas diversas medições das patas. Padronizamos a medição da pata direita 24 horas após a aplicação dos tratamentos nos diferentes grupos com auxílio de um paquímetro digital. Nos grupos tratados com P21-His₆ houve aumento da lesão em relação aos grupos controles e aos grupos infectados. E ainda, os animais apresentaram outros efeitos da inflamação, como rubor e calor, mas esses parâmetros não foram minuciosamente analisados neste trabalho. Curiosamente, nos grupos infectados e tratados com P21-His₆ desnaturada ocorreu maior inchaço das patas em relação aos outros grupos (Figura 1).

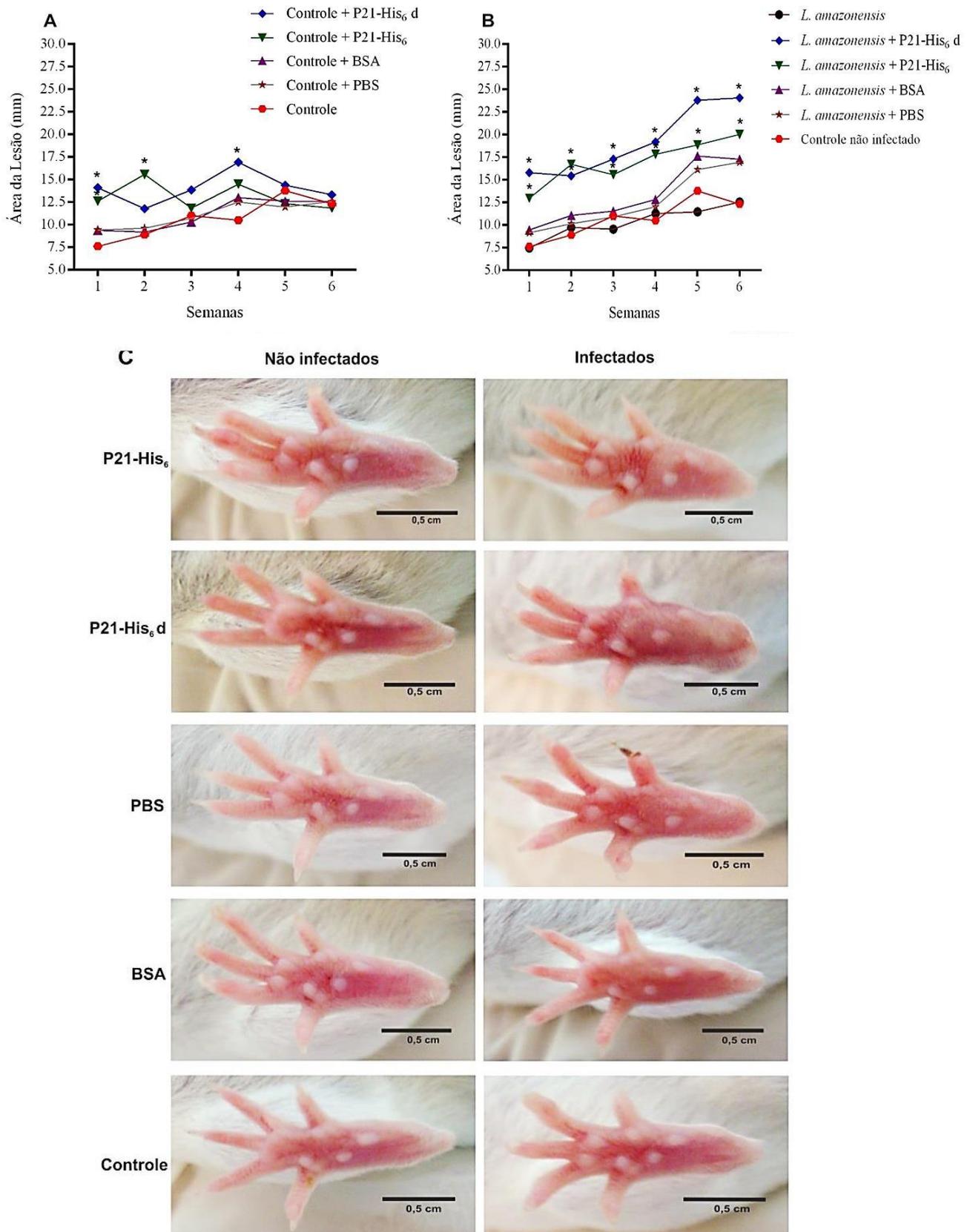


Figura 1. Efeito da proteína P21-His6 nas patas de camundongos BALB/c infectadas por *L. amazonensis*. **A.** Média do tamanho das patas dos 5 animais de cada grupo controle (não infectados) ao longo de 6 semanas. **B.** Média do tamanho das patas dos 5 animais de cada grupo infectado ao longo de 6 semanas. **C.** Foto da pata de um camundongo representante de cada grupo. * $p < 0,05$.

4.2 Efeito da proteína P21-His₆ na carga parasitária e na produção de IL-1 β

Para estabelecer uma relação entre a proteína P21-His₆ e a infectividade do protozoário *L. amazonensis*, fizemos uma quantificação dos parasitos nos diversos grupos por meio de PCR quantitativo em tempo real. Para isso, primeiramente construímos uma curva de *L. amazonensis* contendo 10 pontos (10^8 – 10^1). Para padronização da curva fizemos uma PCR convencional e corremos um gel de poliacrilamida, para verificar se os pontos da curva estavam seguindo uma lógica decrescente. Nossos resultados mostraram no gel um padrão de bandas decrescente, como era esperado (Figura 2). Posteriormente, fizemos uma PCR em tempo real da curva, para estabelecer a diferença entre os ciclos amplificação nos diferentes pontos. Os resultados mostraram que a curva foi padronizada, apresentando um $R^2 = 0,99$ e slope = -3,47 comprovando a eficiência (E) da reação (Figura 3).

Após a padronização da curva, fizemos uma PCR em tempo real com as amostras das patas dos animais infectados ou não dos diferentes grupos. Os resultados mostraram aumento do número de *L. amazonensis* nas patas dos animais infectados e tratados com P21-His₆ na sua forma ativa em relação dos demais grupos (Figura 4). Não houve amplificação nas amostras dos controles não infectados, como esperado (Dados não mostrados).

Em relação à produção da citocina IL-1 β , importante no processo de infecção por *L. amazonensis*, os resultados mostraram aumento da produção da IL-1 β nos linfonodos dos grupos infectados ou não e tratados com P21-His₆; em contraste, no baço houve aumento da citocina IL-1 β principalmente nos grupos infectados ou não e tratados com P21-His₆ desnaturada. Por outro lado, nas patas houve aumento da citocina IL-1 β apenas nos grupos infectados e tratados com BSA, P21-His₆ ativa e P21-His₆ na sua conformação desnaturada. Porém o maior aumento da produção desta citocina na pata ocorreu nos grupos infectados e tratados com a P21-His₆ (Figura 5).

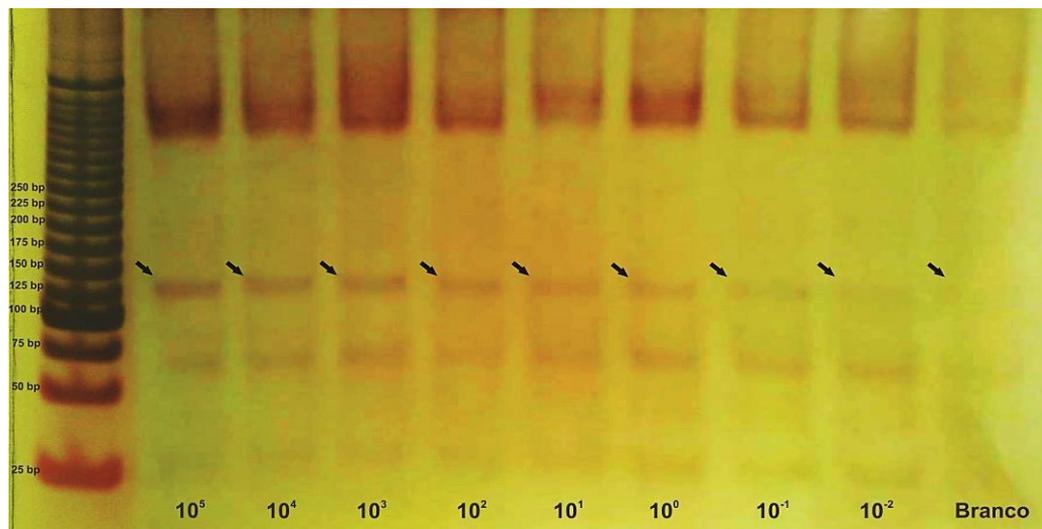
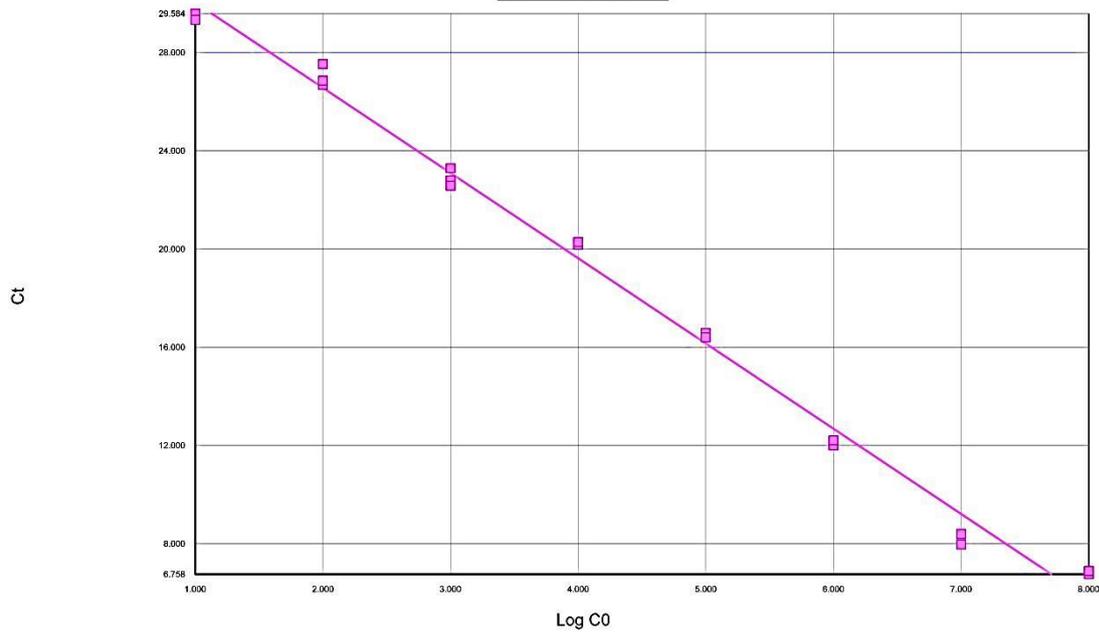


Figura 2. Gel de poliacrilamida da curva de *L. amazonensis*. Setas indicam banda correspondente a amplificação de *L. amazonensis* (120 bp KDNA - DNA do cinetoplasto).

A

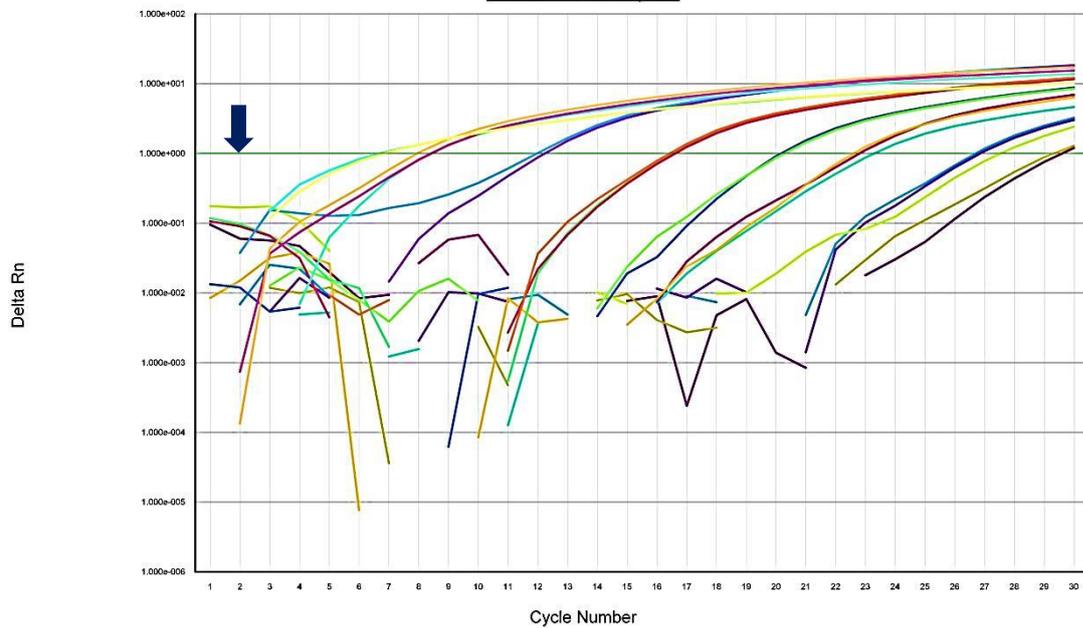
Standard Curve



Detector: LEISH LATRI, Slope: -3.469486, Intercept: 33.499596, R2: 0.992389
 Document: 24.02.14 TESTE CURVA AMOSTRAS CONTROLE 2.SDS (Standard Curve)

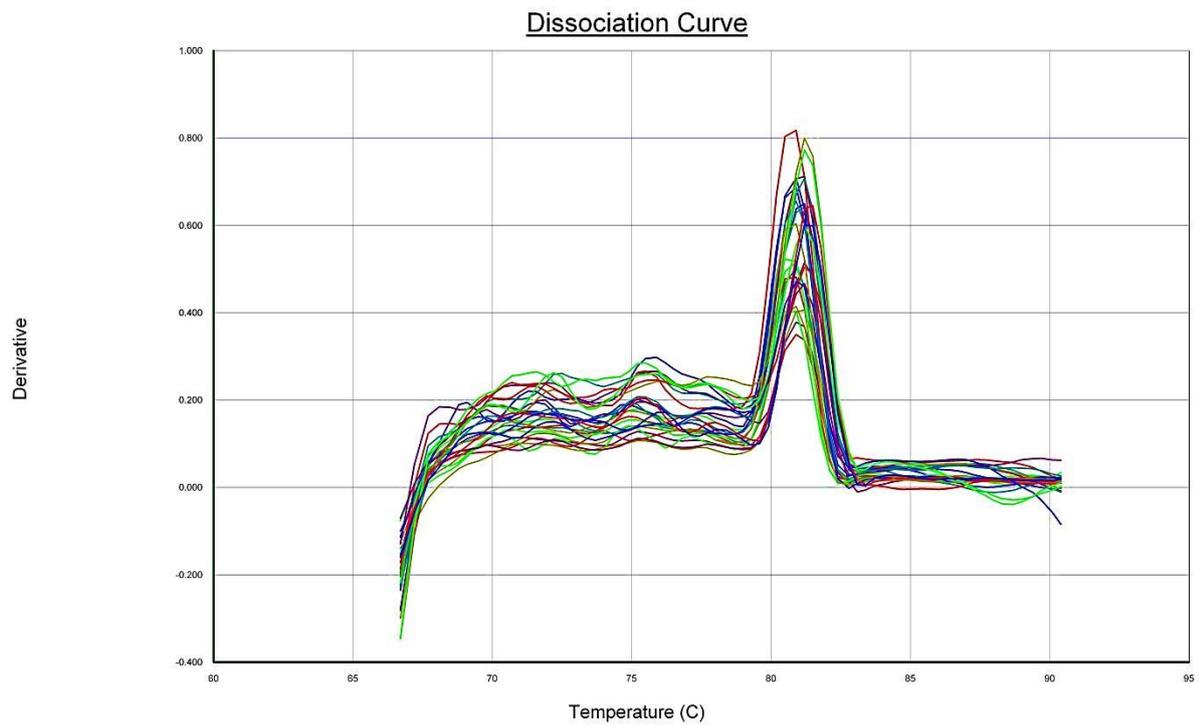
B

Delta Rn vs Cycle



Selected Detector: All
 Well(s): A1-H12
 Document: 24.02.14 TESTE CURVA AMOSTRAS CONTROLE 2.SDS (Standard Curve)

C



Detector = LEISH LATRI, Tm = 60.0 °C
Well(s): A1-A2,A6,A8-A11,B1,B3,B5-B6,B10-C6,C8,C10-D2,D9
Document: 25.02.14 INFECTADOS 1.SDS (Standard Curve)

Figura 3. Dados representativos do qPCR em tempo real. A. Padronização da curva de *L. amazonensis* (10^8 - 10^{-1}). **B.** Gráfico de amplificação da curva e das amostras. A seta azul indica o Threshold. **C.** Curva de dissociação (temperatura média de 81°C).

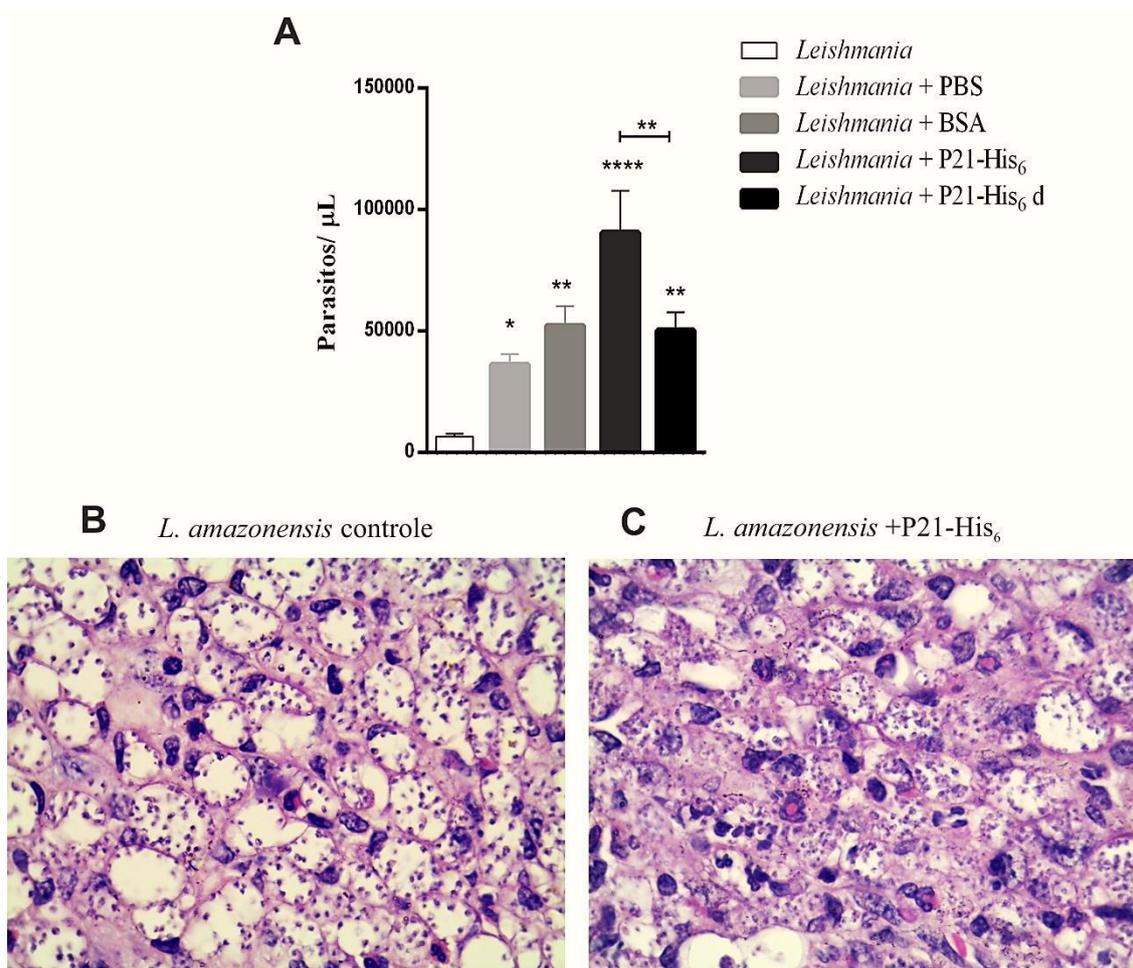


Figura 4. Proteína P21-His6 aumenta a carga parasitária de *L. amazonensis* em patas de camundongos BALB/c. Após 6 semanas de infecção e tratamento dos diferentes grupos, realizamos análise da quantidade de parasitos (PCR em tempo real). **A.** Quantidade de *L. amazonensis*; **B.** Foto de microscopia óptica de lâmina histológica da pata de um dos animais infectados com *L. amazonensis* e não tratados (aumento de 100x); **C.** Foto de microscopia óptica de lâmina histológica da pata de um dos animais infectados com *L. amazonensis* e tratados com P21-His₆. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

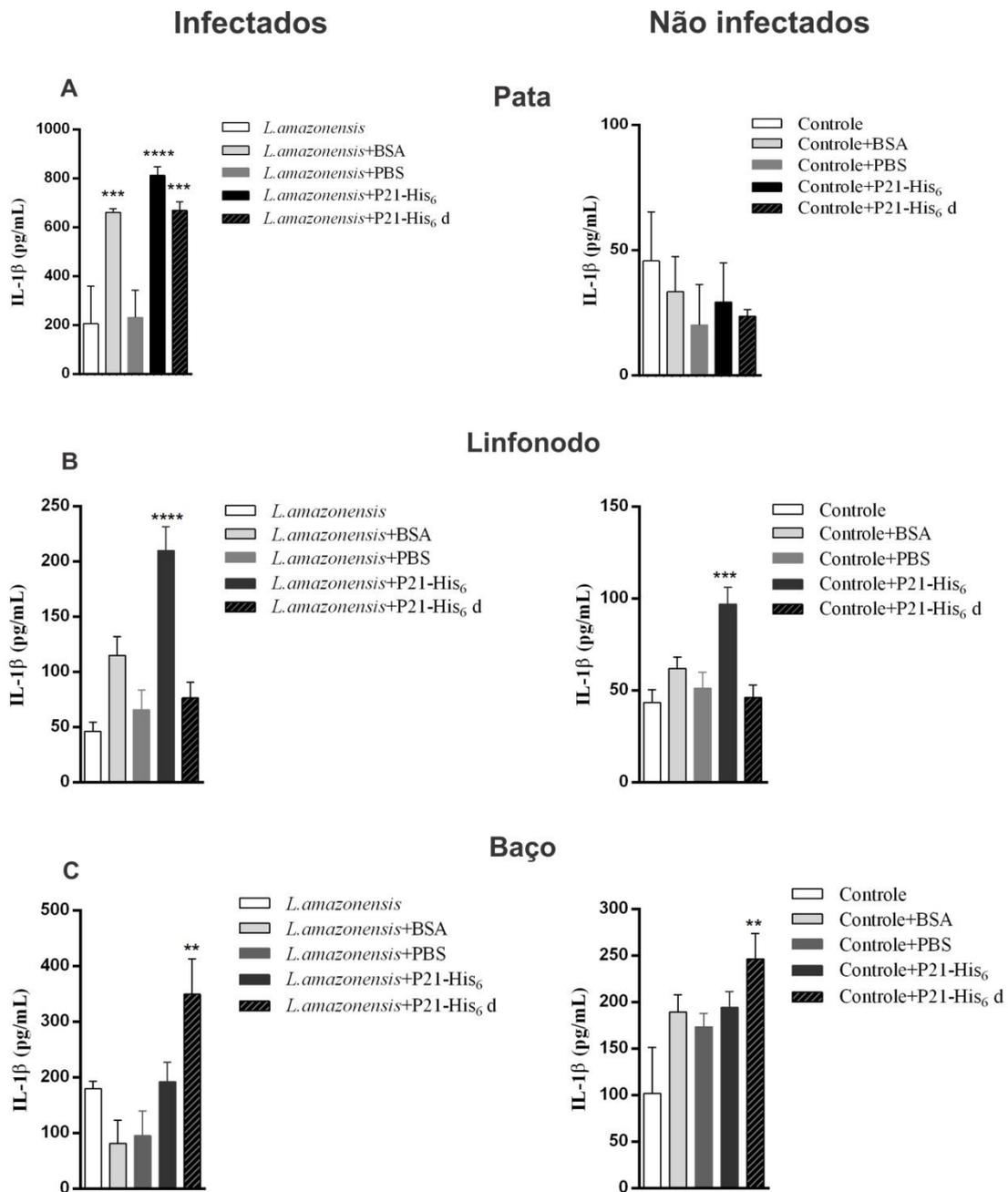


Figura 5. Produção da citocina IL-1β nos tecidos da pata, linfonodo do poplíteo e baço dos diferentes grupos.

A. Pata dos grupos infectados e grupos controles não infectados; B. Linfonodo do poplíteo dos grupos infectados e controles não infectados; C. Baço dos grupos infectados e controles não infectados. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

5.0 Discussão

5.1 Papel pró-fagocítico da proteína P21-His₆ *in vivo*

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é o agente etiológico da Doença de Chagas, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, constituindo assim, um grande problema de saúde pública (WHO, 2013). Dos três estágios evolutivos apresentados por *T. cruzi*, apenas as formas tripomastigotas e amastigotas são consideradas infectivas para o hospedeiro vertebrado (ALVES; MORTARA, 2009). Durante o processo de entrada na célula hospedeira, estes protozoários apresentam proteínas na sua superfície que medeiam à adesão e auxiliam no processo de invasão.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores, identificou em *T. cruzi*, a proteína de 21 kDa (P21), que é secretada pelo parasito e está envolvida na invasão celular por amastigotas e tripomastigotas metacíclicos. A P21 é uma proteína ubíqua em *T. cruzi* cuja forma recombinante (P21-His₆) está sendo utilizada para avaliar o seu papel junto às formas infectivas de *T. cruzi*. Durante ensaios de invasão em células HeLa, o tratamento com a P21-His₆ provocou significativo aumento na invasão celular por ambas as formas evolutivas *in vitro* (SILVA et al., 2009).

A partir disso, nós nos propomos a avaliar a atividade da P21-His₆ *in vivo* utilizando outro tripanosomatídeo, a *L. amazonensis*, com o objetivo de entender a atividade da proteína durante a interação entre o patógeno e a célula hospedeira.

Recentemente, outro estudo realizado com a forma recombinante da P21 mostrou que esta proteína aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos (RODRIGUES et al. 2012). Em concordância, nossos resultados mostram que na infecção por *L. amazonensis*, essa atividade parece ser mesmo atribuída à proteína P21-His₆. Houve um discreto aumento do número de parasitos nas patas dos grupos tratados com BSA e P21-His₆ desnaturada comparada ao grupo controle. Entretanto, o aumento da carga parasitária nas patas tratadas com a P21-His₆ ativa foi duas vezes maior que no restante dos grupos. A partir disso, fica evidente o papel pró-fagocítico dessa proteína também *in vivo*.

Vimos também que a P21-His₆ desnaturada provocou aumento exacerbado da inflamação local, em relação a todos os outros tratamentos, e possivelmente maior recrutamento de células fagocíticas (informação que será confirmada pela análise histológica posterior dos tecidos), que consistem nas principais células hospedeiras de *L.amazonensis*. Apesar da maior inflamação das patas, o aumento da quantidade de parasitos foi maior nos grupos tratados com P21-His₆ ativa, o que consiste em mais uma evidência do papel pro-fagocítico da proteína P21.

Estes resultados corroboram com os dados obtidos *in vitro* previamente, que a P21 secretada por *T. cruzi* apresenta uma forte atividade pró-fagocítica, Esta atividade na infecção natural por *T. cruzi* pode desempenhar um importante papel na evasão pelo parasita da resposta imunológica do hospedeiro, garantindo ao *T. cruzi* a permanência no ambiente intracelular.

5.2 Papel da Proteína P21-His₆ na infecção por *L. amazonensis*

Leishmania spp sobrevivem e se multiplicam em macrófagos, que são capazes de produzir produtos leishmanicidas que contribuem efetivamente para a restrição da proliferação parasitária (BOSQUE, et al., 2000; MOSSER; EDWARDS, 2008). Um fator leishmanicida potente produzido por macrófagos é o óxido nítrico (NO) produzido pela enzima NOS2, que é fortemente regulada em resposta a infecção por vias que não são completamente elucidadas (MUKBEL, 2007).

A ativação dos macrófagos é fundamental para o início de respostas imunes a diferentes doenças, incluindo as Leishmanioses. Essa ativação acontece quando receptores da célula hospedeira detectam componentes microbianos ou sinais de estresse. Os membros da família do receptor Nod-like (NLR) são importantes sensores da imunidade inata contra microrganismos e danos celulares (CHEN, et al., 2009). Alguns NLRs regulam a montagem de um complexo multimérico, chamado de inflamassomo que contém caspase-1 ativa (MARTINON, 2009). Uma vez ativada, a caspase-1 induz o processamento e a secreção de IL-1 β , que é transcricionalmente regulamentada quando componentes microbianos são detectados por receptores de reconhecimento padrão (MARIATHASAN, 2006)

A ativação do inflamassomo em resposta à infecções por patógenos intracelulares tem sido amplamente investigada. Um estudo realizado por Lima-Junior e colaboradores (2013) mostrou que o inflamassomo Nlrp3 está envolvido na resposta a infecção por *L. amazonensis* e que a ativação dessa plataforma molecular tem um papel crucial na restrição da replicação do parasita tanto em macrófagos de linhagem como *in vivo*. Verificou-se que a IL-1 β é importante para a resistência do hospedeiro à infecção mediando a produção de NO, que consiste em um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra *Leishmania* spp.

Neste estudo, nós infectamos patas de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* e tratamos esses animais com a proteína P21-His₆ de *T. cruzi*, buscando entender seu papel como importante fator de virulência liberado pelo *T. cruzi* durante a sua infecção. Após 6 semanas, nós fizemos a pesquisa da produção da citocina IL-1 β nos diferentes grupos em três órgãos: pata, linfonodo do poplíteo (linfonodo de drenagem mais próximo ao local da infecção) e baço.

Nossos resultados mostram que a produção de IL-1 β nas patas dos camundongos infectados e tratados com P21-His₆ é superior em relação aos outros grupos. Esses dados sugerem que o efeito da P21 na internalização dos parasitos nas células hospedeiras, pode ter desencadeado aumento da formação de inflamassomos e, por conseguinte da citocina IL-1 β , na tentativa de eliminar esse patógeno. Por outro lado, fica evidente que este mecanismo de defesa do hospedeiro não foi suficiente para controlar a infecção, sugerindo um papel protetor da P21-His₆ à multiplicação parasitária.

Em relação à atividade contrária das proteínas P21-His₆ ativa e desnaturada no linfonodo do poplíteo e no baço, acreditamos que devido à proximidade do local da infecção o linfonodo esteja mais sujeito a apresentar características provenientes da resposta imune local, ou seja, aumento na produção de IL-1 β no grupo tratado com a P21-His₆ ativa de forma semelhante à pata. Por outro lado, a produção da IL-1 β no baço ter sido aumentada nos grupos tratados com a P21-His₆ desnaturada possivelmente está relacionada ao processamento antigênico e a atividade das células apresentadoras de antígenos. Estas células podem ter migrado preferencialmente ao baço, ganhando a circulação sanguínea por uma provável maior vascularização e permeabilidade vascular no local da lesão (inflamação) nos animais tratados com a P21-His₆ desnaturada.

Entretanto, é preciso fazer outras análises para entender o perfil de citocinas produzido em cada um dos grupos, e ainda avaliar os aspectos histológicos dos diferentes órgãos.

6.0 Conclusão

Podemos concluir que a proteína P21-His₆ na sua conformação ativa e desnaturada provocaram aumento da lesão nos camundongos infectados com *L. amazonensis*, levando a ampliação dos sinais de inflamação.

Além disso, a proteína P21-His₆ ativa provocou enorme aumento na carga parasitária em relação aos outros tratamentos, o que evidencia a propriedade profagocítica dessa proteína também *in vivo*.

E ainda, a produção da IL-1 β foi aumentada em presença da proteína P21- His₆ ativa nas patas dos animais infectados, entretanto esse fato não foi o suficiente para garantir a proteção do animal, sugerindo que a proteína de *T. cruzi* tenha favorecido à infecção.

7.0 Referências Bibliográficas

ALVES, M. J.; MORTARA, R. A. A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 76-88, 2009.

BEHBEHANI, K. Developmental cycles of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909) in mouse peritoneal macrophages in vitro. **Parasitology**, v. 66, p. 343-353, 1973.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347-382, 1973.

CHEN, G.; SHAW, M. H., KIM, Y. G.; NUNEZ, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annu. Rev. Pathol.** v. 4, p. 365-398, 2009.

CORTEZ, M.; SILVA, M. R.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; SASSO, G. R.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. **Microbes Infect.**, v. 8, p. 36-44, 2006.

CRUZ, M. C.; SOUZA-MELO, N.; DA SILVA, C. V.; DA ROCHA, W. D.; BAHIA, D.; ARAUJO, P. R.; TEIXEIRA, S. R.; MORTARA, R. A. *Trypanosoma cruzi*: Role of d-Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. **PLoS One**, v. 7, p. e51804, 2012.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol.** v. 86, p. 197-283, 1984.

DORTA, M. L.; FERREIRA, A. T.; OSHIRO, M. E. M; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 73, p. 285-289, 1995.

LIMA-JUNIOR, D.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L. N.; MINEO, T. W. P.; GUTIERREZ, F. R. S.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S. ZAMBONI, D. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nat Med.**, v. 19, p. 909-152013

MARIATHASAN, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, p. 228-232, 2006.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annu. Rev. Immunol.** v. 27, p. 229-265, 2009.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 958-969, 2008.

MUKBEL, R. M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 76, p. 669-675 2007.

RODRIGUES, A. A.; CLEMENTE, T. M.; SANTOS, M. A.; MACHADO, F. C.; GOMES, R. G. B.; MOREIRA, H. H. T.; CRUZ, M. C.; BRIGIDO, P. C.; SANTOS, P. C. F.; ALVES, F.; BAHIA, D.; MARICATO, J. T.; JANINI, L. M. R.; HORJALES, E.; MORTARA, R. A.; SILVA, C. V. A Recombinant Protein Based on *Trypanosoma cruzi* P21 Enhances Phagocytosis. **Plos One**, v. 7, p. e51384, 2012.

SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006.

SILVA, C. V.; KAWASHITA, S. Y.; PROBST, C. M.; DALLAGIOVANNA, B.; CRUZ, M. C.; DA SILVA, E. A.; SOUTO-PADRÓN, T. C. B. S.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; BRIONES, M. R. S.; ANDREWS, N. W.; MORTARA, R. A. Characterization of a 21 kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 563-570, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2013) Chagas disease (American trypanosomiasis) <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>: Acesso em 23 de janeiro de 2014.

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 111/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 085/12**

Projeto Pesquisa: "Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* in vitro".

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de outubro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 052/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 105/10

Projeto Pesquisa: "Estudos do papel do citoesqueleto de actina, de citocinas e da proteína P21 de *T. cruzi* na evolução para a fase crônica da doença de chagas experimental".

Pesquisador Responsável: Cláudio Vieira da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 17 de maio de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU