



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Instituto de Biologia

BRUNO MENDES

ADIPÓCITOS COMO CÉLULAS HOSPEDEIRAS DE *LEISHMANIA* SPP.:  
INFECÇÃO TRANSITÓRIA OU ESTRATÉGIA PARA A PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA?

CAMPINAS  
2020

BRUNO MENDES

ADIPÓCITOS COMO CÉLULAS HOSPEDEIRAS DE *LEISHMANIA* SPP.:  
INFECÇÃO TRANSITÓRIA OU ESTRATÉGIA PARA A PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA?

*Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.*

Orientador: DANILO CICCONE MIGUEL

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE  
DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO MENDES,  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. DANILO  
CICCONE MIGUEL.

CAMPINAS  
2020

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M522a Mendes, Bruno, 1990-  
Adipócitos como células hospedeiras de *Leishmania* spp. : infecção transitória ou estratégia para a persistência parasitária? / Bruno Mendes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Danilo Ciccone Miguel.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Adipócitos. 2. Células 3T3-L1. 3. Leishmaniose. 4. Infecção. 5. *Leishmania*. I. Miguel, Danilo Ciccone, 1984-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Adipocytes as host cells for *Leishmania* spp. : transient infection or strategy for parasite persistence?

**Palavras-chave em inglês:**

Adipocytes

3T3-L1 cells

Leishmaniasis

Infection

*Leishmania*

**Área de concentração:** Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

**Titulação:** Mestre em Biologia Animal **Banca**

**examinadora:**

Danilo Ciccone Miguel [Orientador]

Angelica Zaninelli Schreiber

Catarina Rapôso Dias Carneiro

**Data de defesa:** 27-01-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Animal

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3756-6425>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/5876707361702795>

Campinas, 27 de janeiro de 2020.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angelica Zaninelli Schreiber  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Catarina Rapôso Dias Carneiro

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Um agradecimento especial aos professores: Danilo Ciccone Miguel, Fernanda Ramos Gadelha, José Rafael de Almeida, Paula Gomes, Nuno Vale, Saulo Luís da Silva, Selma Giorgio, Marlene Tiduko Ueta, Silmara Marques Allegretti, Adriano Cappellazzo Coelho, Patrícia Jacqueline Thyssen, Carlos Eduardo de Almeida, Fernanda Janku Cabral e Sílvio Roberto Consonni pelo apoio e confiança.

Aos colegas de bancada: Mariana Borges, Nathalia Grazzia, Karen Minori, Leticia Rosa, Luana Maria, Fernanda Marques, Juliano, Alejandro Pinos, Larissa Lopes, Thayna Avelino, Elizabeth, Bianca, Thales, Tabata, Cristiele.

E aos funcionários, servidores públicos e ao contribuinte.

## RESUMO

As leishmanioses são relevantes infecções causadas por protozoários do gênero *Leishmania* levando à mortalidade e morbidade em 98 países endêmicos, principalmente de populações em condições sociais menos favorecidas, incluindo o Brasil. Esta doença parasitária destaca-se por diversas manifestações clínicas com terapêutica limitada. Neste sentido, as infecções por *Leishmania* spp. constituem um sério problema de saúde pública e um desafio para a ciência. Durante a infecção, fagócitos mononucleares como os macrófagos são reconhecidos como principal alvo ocupado pelos amastigotas quando parasitam vertebrados. Entretanto, outros tipos celulares vêm sendo caracterizados como potenciais sítios de infecção pelas espécies de *Leishmania*. Neste contexto, o presente trabalho verificou a capacidade de infectividade das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar americana: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em culturas de adipócitos diferenciados de linhagens de fibroblastos 3T3-L1. Como primeira etapa, realizou-se um protocolo de diferenciação celular em adipócitos dentro de 14 dias. Em seguida, as células foram infectadas com promastigotas e amastigotas axênicos das espécies de *Leishmania* nos tempos de 1, 24, 48 e 144 h (MOI=20) e caracterizadas por microscopia óptica, de fluorescência e eletrônica de transmissão. Ambos estágios parasitários foram capazes de infectar e persistir em adipócitos por até 144 h, apesar de apresentarem um declínio no número de amastigotas a partir das 48 h de infecção inicial. *L. (L.) amazonensis* foi capaz de levar à formação de vacúolos parasitóforos de caráter ácido, evidenciados pela marcação com LysoTracker™ Red DND-99. Os resultados aqui apresentados indicam que os adipócitos constituem um ambiente capaz de sustentar a infecção de *Leishmania* spp. permitindo não somente a sobrevivência, mas também a multiplicação e persistência do parasito, uma vez que a viabilidade dos parasitos intracelulares também foi observada em ensaios de diferenciação de amastigotas a promastigotas. Este novo perfil de infecção pode ser de grande valia para a compreensão dos quadros de cronicidade, um sinal decorrente de esquemas de tratamentos ineficazes ou mesmo de quadros naturais de recaídas em casos clínicos de leishmaniose.

Palavras-chave: adipócito (3T3-L1), infecção in vitro, *Leishmania* spp.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are relevant infections caused by protozoa of the genus *Leishmania* and generates mortality and morbidity in 98 endemic countries, mainly from populations in less favored social conditions, including Brazil. This parasitic disease presents for several clinical manifestations with limited therapy. In this way, infections with *Leishmania* spp. prove to be a serious public health problem and a challenge for science. During infection, mononuclear phagocytes such as macrophages are recognized as the main target occupied by amastigotes when parasitizing vertebrates. However, other cell types have been characterized as potential sites of infection by *Leishmania* species. In this context, the present work verified the infectivity of the causative species of American cutaneous *Leishmania*: *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in differentiated adipocyte cultures of 3T3-L1 fibroblast strains. As a first step, a protocol for cell differentiation into adipocytes was developed within 14 days. Then, the cells were infected with axenic promastigotes and amastigotes of *Leishmania* species at 1, 24, 48 and 144 h (MOI = 20) and characterized by optical microscopy, fluorescence and transmission electron microscopy. Both parasitic stages were able to infect and persist in adipocytes for 144 h, although they showed a decline in the number of amastigotes from 48 h of initial infection. *L. (L.) amazonensis* occurred with the formation of acid parasitophorous vacuoles, evidenced by the LysoTracker™ Red DND-99 labeling. The results presented here indicate that adipocytes constitute an environment that supports *Leishmania* spp. infection, allowing not only survival but also multiplication and persistence of the parasite, as the viability of intracellular parasites was also observed in amastigote to promastigote differentiation assays. This new infection profile may be of great importance for understanding chronicity, a sign that comes from ineffective treatment regimens or even from natural relapse in clinical cases of leishmaniasis.

Keywords: adipocyte (3T3-L1), in vitro infection, *Leishmania* spp.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Status de endemicidade da leishmaniose no mundo em 2016 .....	15
<b>Figura 2:</b> Cenários de transmissão de leishmaniose visceral por países e índice composto de leishmaniose cutânea triênio por segundo nível administrativo subnacional, Américas, 2017.....	16
<b>Figura 3:</b> Ciclo de vida <i>Leishmania</i> spp .....	19
<b>Figura 4:</b> Obtenção de adipócitos a partir de linhagem de fibroblastos embriônicos de camundongos 3T3-L1.....	34
<b>Figura 5:</b> Adipócitos de fibroblastos 3T3-L1 albergando amastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	35
<b>Figura 6:</b> Pré-adipócitos de fibroblastos 3T3-L1 albergando amastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	36
<b>Figura 7:</b> Pré-dipócitos e adipócitos amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	39
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografias de vacúolos parasitóforos de <i>L. (L.) amazonensis</i> em adipócitos nos tempos 24 h e 48 h.....	42
<b>Figura 9:</b> Microscopia eletrônica de transmissão de infecções adipócíticas com <i>L. (L.) amazonensis</i> em diferentes estágios.....	45
<b>Figura 10:</b> Infectividade in vitro de <i>Leishmania</i> spp. em adipócitos.....	46
<b>Figura 11:</b> Viabilidade dos parasitos intracelulares de adipócitos infectados previamente com promastigotas (A) e amastigotas (B).....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Espectro clínico das principais espécies causadoras de Leishmanioses .....	17
<b>Tabela 2:</b> Células primárias (derivadas de tecido) ou linhagens celulares de origem não monocítica ou magrofágica infectadas por espécies de <i>Leishmania</i> .....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µm	Micrometro
µM	Micromolar
ATP	Adenosina trifosfato
BODIPY	Boro-dipirrometeno
C/EBPs	Proteínas ligantes ao amplificador
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FBS	Soro bovino fetal inativado
FnR	Receptor de fibronectina
G3PDH	Desidrogenase glicerol-3-fosfato
GLUT4	Transportadores de glicose
g	Aceleração da gravidade
gp63	Glicoproteína de 63 KDa
h	Hora
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-metanossulfônico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IFN-γ	Interferon-gama
IGF-I	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL	Interleucina
LPG	Lipofosfoglicano
LPL	Lipase de lipoproteína
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Millimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
NaPyr	Piruvato sódico
nm	Nanômetro
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR-γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama
TAB	Tecido adiposo branco

TAM	Tecido adiposo marrom
TBE	Tecido adiposo bege
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
Th1	Linfocito T auxiliar subtipo 1
Th2	Linfocito T auxiliar subtipo 2

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
$\alpha$	alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\delta$	Delta

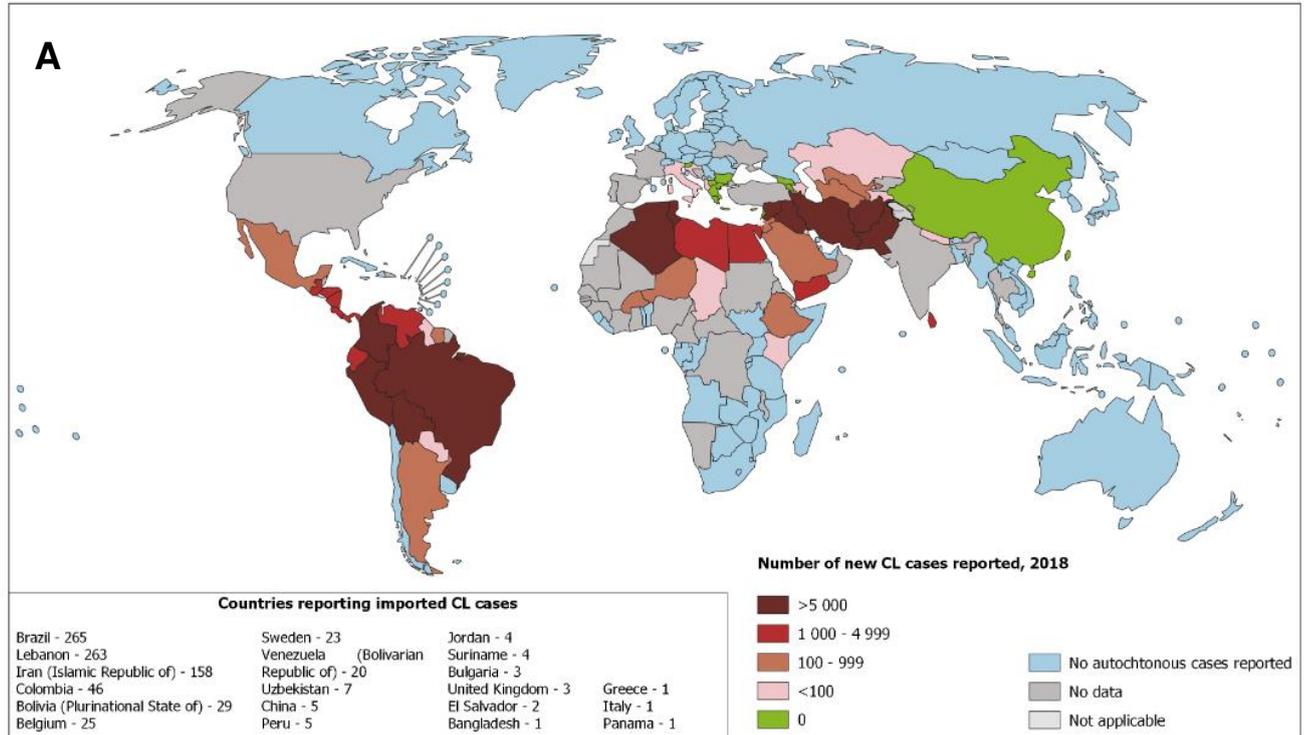
## SUMÁRIO

1. Introdução .....	14
1.1. Leishmanioses: aspectos gerais .....	14
1.2. Principais desafios encontrados no tratamento das leishmanioses .....	20
1.3. Células hospedeiras: aspectos bioquímicos e fisiológicos.....	20
1.4. Adipócito como célula hospedeira de tripanossomatídeos.....	25
1.5. Modelo celular: 3T3-L1 e adipogênese .....	27
1.6. Justificativa .....	29
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
3. Metodologia .....	30
3.1. Cultura de parasitos .....	30
3.2. Culturas de adipócitos (3T3-L1).....	30
3.3. Infecção de adipócitos com promastigostas e amastigotas.....	31
3.4. Microscopia de fluorescência .....	31
3.5. Identificação de pH do vacúolo parasitóforo em adipócitos.....	31
3.6. Análise ultraestrutural da infecção .....	32
3.7. Progresso da infecção: viabilidade dos amastigotas.....	32
3.8. Análise estatística.....	33
4. Resultados.....	33
4.1. Culturas de adipócitos diferenciados de fibroblastos 3T3-L1 .....	33
4.2. Microscopia Óptica: infecção de adipócitos com <i>Leishmania</i> .....	35
4.3. Microscopia de fluorescência para detecção de infecções de adipócitos com <i>Leishmania</i> .....	37
4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão: análise ultraestrutural do compartimento ocupado por <i>Leishmania</i> em adipócitos .....	42
4.5. Cinética da infecção com promastigostas e amastigostas de <i>Leishmania spp.</i> .....	45
4.6. Viabilidade dos amastigostas intracelulares.....	46
5. Discussão .....	47
6. Conclusão.....	52
7. Referências.....	53
8. Anexos.....	58
A. Resumo de artigo científico publicado durante o período acadêmico .....	58
B. Cópia da aprovação do comitê de ética para o uso de animais.....	59
A. Cópia da declaração de direitos autorais .....	60

## 1. Introdução

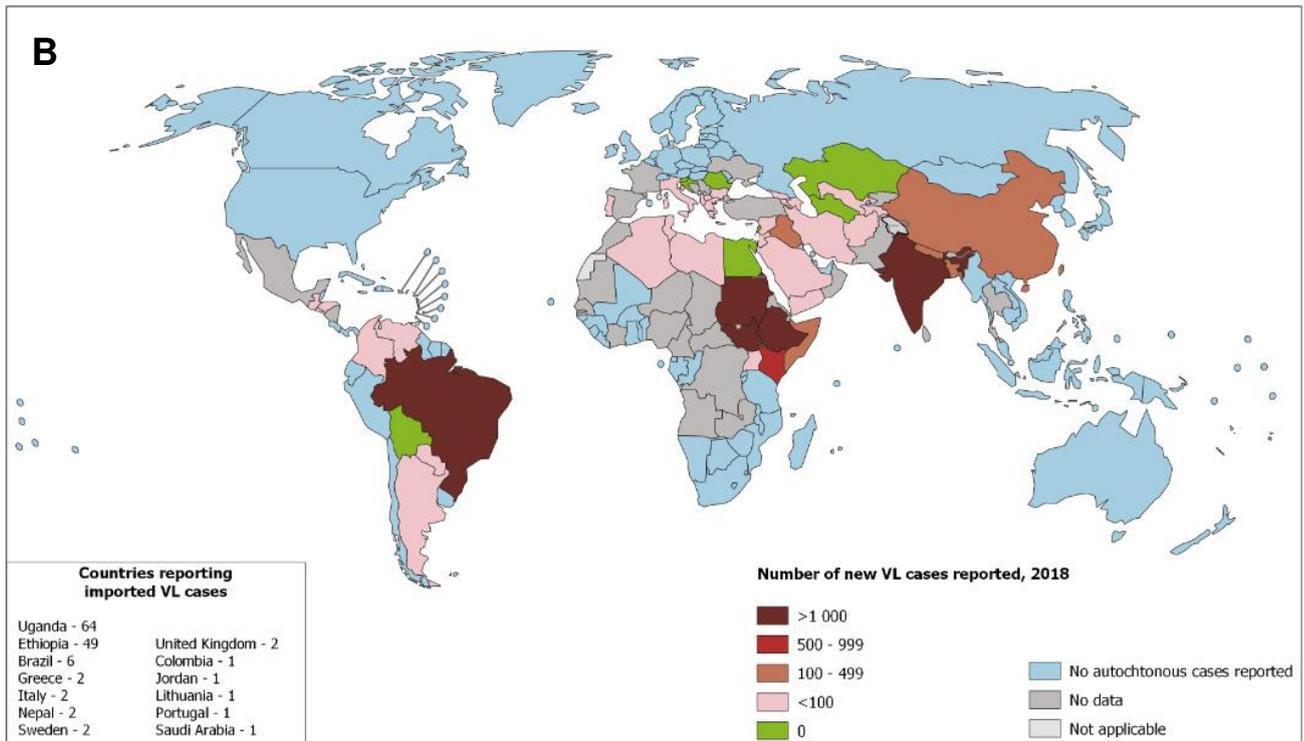
### 1.1. Leishmanioses: aspectos gerais

Mais de vinte espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) são consideradas agentes etiológicos da leishmaniose, uma enfermidade negligenciada, complexa e caracterizada por diversas manifestações clínicas <sup>1,2</sup>. Levantamentos epidemiológicos recentes realizados pela Organização Mundial de Saúde revelam registros de aproximadamente um milhão de novos casos e apontam para 26 a 65 mil mortes anuais causadas por esta importante doença no mundo. As figuras 1 A e B destacam a prevalência dos principais países afetados pelas leishmanioses cutânea e visceral, respectivamente. O Brasil também apresenta uma estatística significativamente preocupante, com mais de 17.500 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa reportados em 2017, para este mesmo ano, cerca de 4.114 casos de leishmaniose visceral, forma potencialmente fatal da doença. Atualmente, nosso país integra um grupo de 7 países que englobam mais de 90% dos casos reportados de leishmaniose. Estes dados estão alinhados com outra estatística alarmante: o aumento na expansão das áreas de transmissão do Brasil, Paraguai e Argentina revelando os aspectos de urbanização da leishmaniose visceral <sup>3</sup>. (Figura 2).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2019. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2019. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



**Figura 1: Status de endemicidade da leishmaniose no mundo em 2018. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose Visceral [Retirado de World Health Organization].**



**Figura 2: Cenários de transmissão de leishmaniose visceral por países e índice composto de leishmaniose cutânea triênio por segundo nível administrativo subnacional, Américas, 2017.** [Retirado de OPAS/OMS, Informe Epidemiológico das Américas, 2017 ].

A sintomatologia observada na maioria dos casos está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro, e frequentemente associada a determinadas espécies de espectro clínico bem distintos <sup>2,4</sup> (Tabela 1). A leishmaniose tegumentar americana apresenta diferentes formas clínicas, tais como: leishmaniose cutânea localizada, resultante de lesões ulcerosas, únicas ou múltiplas; leishmaniose cutânea difusa, manifestando-se com lesões não ulcerosas do tipo nódulos que se espalham por todo o corpo; leishmaniose mucocutânea, responsável por 1 a 10 % dos casos infectados com o subgênero *Viannia*, podendo evoluir para a forma mais agressiva da doença com comprometimento de mucosas e cartilagens; leishmaniose disseminada, forma na qual o paciente apresenta lesões acneiformes disseminadas por todo o corpo. Por fim, a leishmaniose visceral, ou calazar,

caracterizada por quadros nos quais os indivíduos desenvolvem hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, hipogamaglobulinemia, hipogamaglobulinemia, trombocitopenia e perda de peso, comumente de caráter crônico e alta letalidade se não diagnosticada e tratada a tempo <sup>2,4</sup>.

**Tabela 1:** Espectro clínico das principais espécies causadoras de leishmanioses. [Adaptado de Reithinger R. *et al*, 2007<sup>4</sup> e Burza S *et al*, 2018<sup>2</sup>].

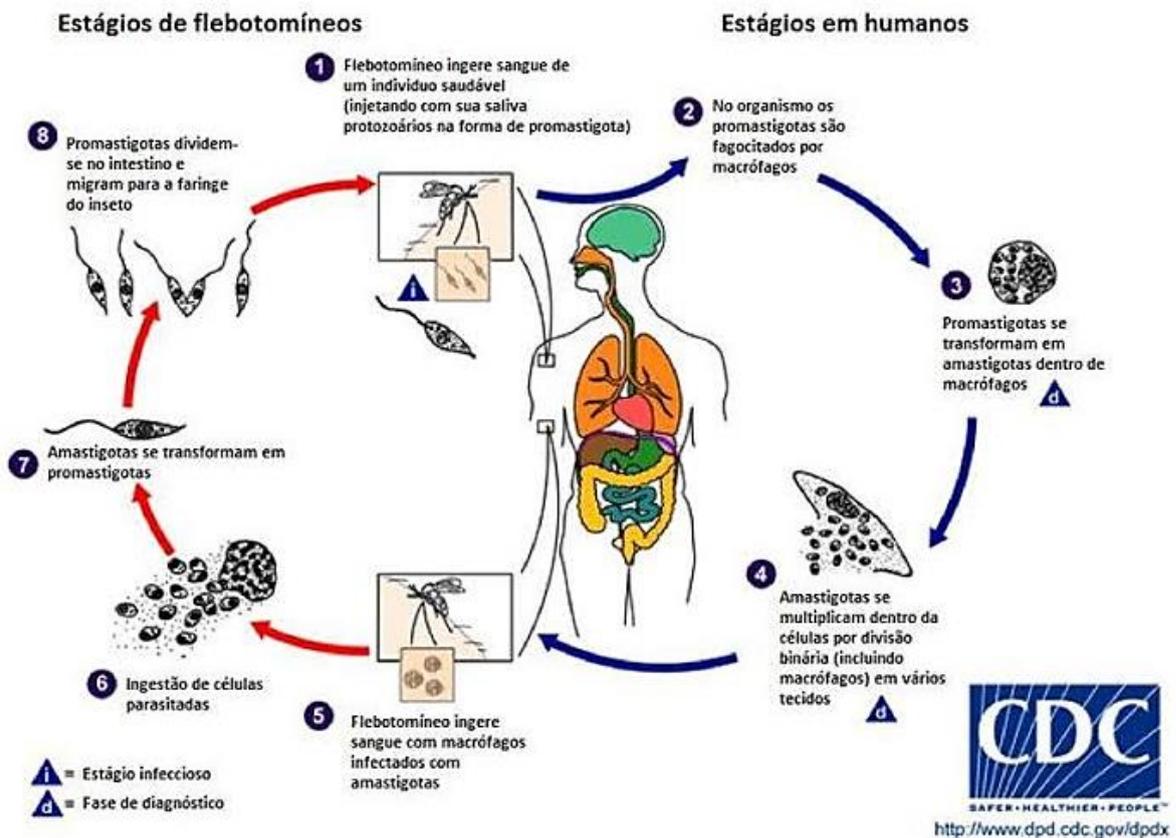
<b>Espécie</b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Doença</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<b>Novo mundo</b>			
<b><i>L. (Leishmania) amazonensis</i></b>	LCL, DCL e DsCL	Zoonose	América do Sul
<b><i>L. (Viannia) braziliensis</i></b>	LCL, MC, DsCL e LR	Zoonose	América do Sul
<b><i>L. (Viannia) panamensis</i></b>	CL, MC		Norte da América do Sul e Sul da América central
<b><i>L. (Viannia) peruviana</i></b>	LCL	Zoonose	Peru
<b><i>L. (Viannia) guyanensis</i></b>	LCL, DsCL e MCL	Zoonose	América do Sul
<b><i>L. (Viannia) lainsoni</i></b>	LCL	Zoonose	América do Sul
<b><i>L. (Viannia) colombiensis</i></b>	LCL	Zoonose	Norte da América do Sul
<b><i>L. (Leishmania) mexicana</i></b>	LCL, DCL e DsCL	Zoonose	América central e Sul da América do Norte
<b><i>L. (Leishmania) pifanoi</i></b>	LCL	Zoonose	América do Sul
<b><i>L. (Leishmania) venezuelensis</i></b>	LCL	Zoonose	Norte da América do Sul
<b><i>L. (Leishmania) garnhami</i></b>	LCL	Zoonose	América do Sul

**Continuação tabela 1:** Espectro clínico das principais espécies causadoras de leishmanioses. [Adaptado de Reithinger R. *et al*, 2007<sup>4</sup> e Burza S *et al*, 2018<sup>2</sup>].

Espécie	Forma clínica	Doença	Distribuição geográfica
<b>Velho mundo</b>			
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, DCL, DsCL e oral nasal CL	Zoonose	Ethiopia e Kenia
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonose	Norte da África
<i>L. (Leishmania) major</i>	LCL	Zoonose	Asia Central, norte e leste da África e Oriente Médio
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LCL, LR e raramente VL	Antroponose	Ásia Central, Oriente Médio, partes de norte da África, sudeste da Ásia
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	VL, LCL e PKDL	Antroponose	África, Ásia Central, Sudeste Asiático
<b>Velho e Novo mundo <i>Leishmania</i> spp.</b>			
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	Visceral e LCL	Zoonose	Europa, norte da África, América Central, América do Sul
<b>LCL = leishmaniose cutânea localizada; MC = leishmaniose muco cutânea; LV = leishmaniose visceral; PKDL = leishmaniose dérmica pós-calazar; LR = leishmaniose recidiva. DCL = leishmaniose cutânea difusa; DsCL = leishmaniose cutânea disseminada.</b>			

*Leishmania* é um parasito transmitido por insetos dípteros flebotomíneos. Durante seu ciclo de vida (Figura 3), o protozoário é ingerido pelas fêmeas durante a hematofagia de um animal vertebrado infectado. Neste estágio denominado amastigota, o parasito apresenta forma arredondada e um flagelo reduzido. Ao atingirem o tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, as quais se caracterizam por um corpo celular fusiforme e flagelo alongado e permanecem aderidas ao epitélio intestinal. Após alguns dias, período que varia de acordo com a espécie de *Leishmania*, fatores como alterações na morfologia e na superfície celular do parasito desencadeiam a liberação das formas promastigotas que se acumulam no esôfago do inseto. O processo de diferenciação que ocorre no intestino do vetor, denominado metaciclogênese, é marcado pela transformação das formas que se dividem (promastigotas procíclicos) em formas altamente móveis e incapazes de se dividir (promastigotas metacíclicos)<sup>5</sup>. Estes últimos são inoculados no hospedeiro vertebrado, infectando as células fagocíticas mononucleares, com destaque para os macrófagos. Os parasitos permanecerão no interior de fagolisossomos – vacúolos parasitóforos – destas células.

Estabelecida a entrada das formas promastigotas metacíclicas, tanto o aumento da temperatura como a diminuição do pH serão fatores importantes para a diferenciação em amastigotas. Um estudo recente demonstrou que a disponibilidade de ferro parece ser um fator crucial para o processo de diferenciação de formas flageladas a formas amastigotas, ampliando ainda mais a complexidade deste processo fisiológico <sup>6</sup>. Após a diferenciação completa, postula-se que os amastigotas se dividem até que a célula hospedeira se rompa ou, conforme sugerido há alguns anos, amastigotas podem ser transferidos de uma célula a outra <sup>7</sup>. Finalmente, células da linhagem macrófaga fagocitarão os parasitos tanto localmente quanto em tecidos distantes após a disseminação <sup>1,5</sup>. Passadas semanas a meses, a sintomatologia da leishmaniose pode se manifestar em seus hospedeiros vertebrados.



**Figura 3. Ciclo de vida *Leishmania* spp.** As formas de vida de *Leishmania* spp. alternam e multiplicam-se por reprodução assexuada em dois tipos de hospedeiros (vertebrados e invertebrados). A fêmea do flebotomíneo infectada, ao realizar o repasto sanguíneo, transmite para o hospedeiro vertebrado as formas promastigotas. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitas interagem com diversos tipos celulares e podem ser fagocitadas por células competentes como as do sistema fagocítico-mononuclear e transformar-se em formas amastigotas, que se multiplicam e infectam outras células do hospedeiro. Posteriormente, a fêmea, ao se alimentar deste hospedeiro, ingere células infectadas com amastigotas, que se diferenciam em promastigotas e se multiplicam no trato digestório. [Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2019].

## 1.2. Principais desafios encontrados no tratamento das leishmanioses

Esforços da comunidade científica e farmacêutica são extremamente necessários e relevantes para a otimização da terapêutica na leishmaniose, que atualmente é problemática e pouco efetiva, devido a vários fatores, tais como: elevada toxicidade dos medicamentos, diversidade de efeitos colaterais, alto custo, resistência parasitária e, na maioria dos casos, incluem administração parenteral e longos períodos de hospitalização do paciente<sup>9,10</sup>. Contudo, não existe um número elevado e diversificado de drogas disponíveis para tratamento dessa parasitose.

Globalmente, a quimioterapia utilizada na clínica se baseia principalmente no uso de antimonialis pentavalentes, anfotericina B lipossomal, pentamidina, paramomicina e miltefosina. Esta abordagem terapêutica é inespecífica, e também não considera as correlações estabelecidas entre os agentes etiológicos e o padrão clínico observado da doença<sup>11</sup>. Pesquisadores têm se empenhado em desenvolver uma melhor eficácia da quimioterapia atual, do espectro de atividade, da redução da dose, da minimização dos efeitos colaterais e do tempo de tratamento, a partir da combinação de drogas, ou seja com base na terapia combinada empregada em alguns países<sup>12</sup>. Entretanto, mais estudos são importantes para que sejam driblados os obstáculos que impedem o estabelecimento de uma terapia mais bem sucedida<sup>13</sup>.

Outro aspecto importante no desenvolvimento de novas drogas consiste na compreensão dos aspectos biológicos e bioquímicos da infecção provocada pelos parasitos *Leishmania*, pois podem revelar novos alvos moleculares e impulsionar a inovação nas intervenções clínicas.

## 1.3. Células hospedeiras: aspectos bioquímicos e fisiológicos

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem capacidade de infectar diversos tipos celulares, apesar de macrófagos residentes, células dendríticas e neutrófilos serem consideradas as principais células hospedeiras durante o ciclo do parasito nos vertebrados. Como mencionado anteriormente, no início da infecção, promastigotas metacíclicos subvertem o sistema imune inato do hospedeiro sendo albergados principalmente nestes três tipos celulares. Os corpos celulares dos parasitos são recobertos por diversas proteínas, como lipofosfoglicano (LPG) e gp63 (glicoproteína de 63 kDa), os quais auxiliam na orientação e adesão na célula hospedeira<sup>14</sup>. A fagocitose ocorre mediante complexa e intrínseca rede de ligações entre os receptores presentes na superfície do parasito com a célula hospedeira. Um conjunto de moléculas de superfície bem descritas na literatura como a gp63 e o LPG são essenciais para a interação, por exemplo, com receptor do

complemento 3 (CR3, *third complement receptor*), receptor do complemento 1 (CR1, *first complement receptor*) e receptor de fibronectina (FnR, *fibronectin receptor*) da membrana da célula hospedeira <sup>14,15</sup>.

Durante o estabelecimento da infecção, endossomos iniciais e tardios fundem-se com o fagossomo em transformação, que contribuem para o amadurecimento e formação do vacúolo parasitóforo (pH 4.7-5.2). Residindo dentro dos fagolisossomos de macrófagos, *Leishmania* spp. obtêm seus nutrientes através do citosol da célula hospedeira. Do ponto de vista bioquímico, amastigotas obtêm micro e macronutrientes a partir do tráfego vesicular da célula hospedeira. Diversos combustíveis metabólicos são internalizados como fonte de energia, por exemplo, monossacarídeos, aminoácidos, poliaminas, purinas e íons <sup>16</sup>. Os lipídios são transportados por estruturas chamadas junções de oclusão entre membrana celular do parasita e do macrófago <sup>16,17</sup>. Nos glicossomos ocorrem, principalmente, a glicólise de hexoses e riboses como fonte de energia. Na única e longa mitocôndria ocorre o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA),  $\beta$ -oxidação, transcrição de DNA e parte da síntese protéica. Na  $\beta$ -oxidação são liberadas 8 moléculas de acetil-Coa que podem ser incorporadas ao ciclo TCA para geração de ATP celular. Parte de acetil-Coa gerado nesse processo poderia ser utilizada para a gliconeogênese, entretanto, amastigotas não possuem duas enzimas-chaves do ciclo glicoxilato são elas: isocitratoliasa e malato sintase, que permitem a síntese de glicose a partir de ácidos graxos <sup>18</sup>. Todavia, Simon e colaboradores demonstraram a presença de ambas as enzimas do ciclo glicoxilato em algumas espécies de *Leishmania* <sup>19</sup>. Certamente, novos estudos são necessários para avaliar se os lipídios são usados como uma das principais fontes de carbono *in vivo*.

As necessidades metabólicas do parasita podem ser variáveis conforme as condições em que se encontra; por exemplo, macrófagos - quando ativados por linfócitos Th2 e citocinas IL-4/IL-13 e IL-10 - levam um aumento na endocitose de substratos energéticos e *upregulation* da atividade enzimática arginase-1, a qual atua na conversão de poliaminas e aminoácidos, resultando no crescimento e multiplicação rápida dos amastigotas <sup>20,21</sup>. Por outro lado, quando ativados por Th1, ocorre *downregulation* da arginase-1, desencadeando desta maneira o aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo e degeneração do parasita <sup>20,22</sup>. A habilidade do parasita em regular positivamente/negativamente suas vias metabólicas demonstra uma resposta ativa e dinâmica da *Leishmania* aos estresses encontrados no hospedeiro para obtenção de energia e garantir sua sobrevivência.

Apesar de se compreender parcialmente os mecanismos de infecção de células do sistema mononuclear fagocitário por *Leishmania* spp., outras células não pertencentes a esse sistema também foram identificadas albergando este protozoário <sup>23</sup>. Trabalhos tem

sugerido que diversos tipos celulares podem participar de maneira importante no curso da infecção por permitirem a persistência e manutenção da carga parasitária, durante um período latente <sup>24-26</sup>.

Em 1958, Edward Belle demonstrou a presença do protozoário em preparações de lamínulas de tecido epitelial humano a partir de 24 horas da inoculação <sup>27</sup>. A biologia e comportamento desta infecção foi posteriormente descrita no trabalho de Frothingham e Lehtimaki (1967), que destacou o papel das baixas temperaturas e presença do soro fetal na localização e multiplicação do parasito <sup>28</sup>.

Vários estudos também tem identificado que *Leishmania* podem desenvolver seu ciclo de vida em linhagens de fibroblastos humanos e de macacos, sendo consideradas células hospedeiras importantes durante a fase crônica da infecção por proporcionarem um ambiente menos hostil e mais adequado para os protozoários em comparação aos macrófagos <sup>29-31</sup>. Os fibroblastos que geralmente se localizam próximo ao sítio de infecção, caracterizam-se por apresentar baixa capacidade de produção de óxido nítrico e consequente reduzida habilidade de matar amastigotas <sup>24</sup>. O mecanismo molecular do processo infeccioso tem sido pesquisado e resultados tem apontado que glicoproteínas localizadas na membrana dos fibroblastos, receptores de manose, desempenham um papel similar ao reportado para macrófagos <sup>31</sup>.

Pessotti e colaboradores (2004) também evidenciaram a interação entre o parasito e células de macaco da linhagem Vero, uma linhagem celular modelo frequentemente utilizada em pesquisas com muitos propósitos, incluindo o estudo do ciclo de vida de parasitos eucarióticos <sup>32</sup>.

Recentemente, Arango e colaboradores (2016) reportaram as características biológicas da infecção de células musculares esqueléticas por *L. (L) amazonensis*. Os resultados demonstraram que o parasito foi capaz de interagir, reproduzir e permanecer viável nas fibras musculares, além de induzir uma resposta imune que provavelmente se relaciona com o reparo do tecido infectado <sup>33</sup>.

Na Tabela 2 são mostradas células primárias (derivadas de tecido) e linhagens celulares de origens não monocítica ou magrofágica aplicadas em diferentes estudos do ciclo de vida ou infecção por diferentes espécies de *Leishmania*.

**Tabela 2:** Células primárias (derivadas de tecido) ou linhagens celulares de origem não monocítica ou magrofágica infectadas por espécies de *Leishmania*. [Adaptado de M.G. Rittig and C. Bogdan, 2000<sup>23</sup>].

<b>Célula hospedeira</b>	<b>Espécies e tipo de tecido</b>	<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Forma infectante</b>	<b>Destino dos parasitas intracelulares</b>	<b>Refs</b>
<b>Epitélio amniótico</b>	Placenta humana	<i>L. donovani</i>	AMA/PRO	Multiplicação após 2-4 dias	23
		<i>L. donovani</i>	PRO		
		<i>L. braziliensis</i>	PRO	Liberação em 29-32 dias	
<b>Linhagem de epitélio amniótico (WISH)</b>	Âmnio humano	<i>L. donovani</i>	AMA	Não reportado	
<b>Fibroblasto</b>	Músculo embrionário de pintinho	<i>L. donovani</i>	AMA	Degeneração após 20-25 dias, sem multiplicação	
	Cérebro embrionário de pintinho	<i>L. donovani</i>	AMA	Viáveis por até 17 dias	
	Baço de hamster	<i>L. donovani</i>	AM	Viáveis por até 32 dias	
	Pele de hamster	<i>L. donovani</i>	PRO	Viáveis após 3 semanas	
	Pele humana Pele de camundongo ou linfonodo	<i>L. amazonensis</i>	AMA	Degeneração em 4-5 dias	
		<i>L. braziliensis-like</i>	PRO	Transformação em AMs, mas sem multiplicação; declínio após 4-5 dias	
		<i>L. donovani</i>	PRO	Transformação em AMs, mas sem multiplicação; viáveis por até 2 semanas	
	<i>L. major</i>	AMA/PRO	Sobrevivência limitada		
<b>HeLa</b>	Carcinoma cervical humano	<i>L. tropica</i>	AMA	Multiplicação	
		<i>L. donovani</i>	PRO	Declínio após 4 dias	
<b>CHO</b>	Células de ovário de hamster chinês	<i>L. amazonensis</i>	AMA	Multiplicação	
<b>Células renais</b>	Hamster	<i>L. braziliensis</i>	AMA	Multiplicação	
<b>LLC-MK2</b>	Macaco Rhesus	<i>L. donovani</i>	AMA	Multiplicação	
		<i>L. donovani</i>	PRO	Não reportado	
<b>Células Vero</b>	Macaco	<i>L. amazonensis</i>	AMA	Multiplicação	

**Continuação Tabela 2:** Células primárias (derivadas de tecido) ou linhagens celulares de origem não monocítica ou magrofágica infectadas por espécies de *Leishmania*. [Adaptado de M.G. Rittig and C. Bogdan, 2000<sup>23</sup>].

<b>Célula hospedeira</b>	<b>Espécies e tipo de tecido</b>	<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Forma infectante</b>	<b>Destino dos parasitas intracelulares</b>	<b>Refs</b>
<b>BHK21</b>	Filhote de Hamster	<i>L. donovani</i>	PRO	Não reportado	23
<b>Vários tipos</b>	Coelho, Macaco Rhesus e Macaco verde africano	<i>L. donovani</i>	AMA	Não reportado	
<b>Células dendríticas e Células de Langerhans</b>	Pele de camundongo	<i>L. major</i>	AMA	Multiplicação inexistente ou baixa	
<b>Células dendríticas de linfonodo</b>	Linfonodo de camundongo	<i>L. major</i>	AMA	Não reportado	
<b>Mastócitos</b>	Medula óssea de camundongo	<i>L. major</i> <i>L. donovani</i>	PRO PRO	Transformação em AMA; Lise celular tardia liberação de AMA	
<b>Neutrófilo e eosinófilo</b>	Humano e rato	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>	AMA/PRO PRO AMA/PRO	Morte parasitária	
<b>Sticker DS503</b>	Sarcoma de cão	<i>L. donovani</i> <i>L. mexicana</i>	PRO	Viáveis por até 5 meses Transformação em AMA, multiplicação após 3 dias e viáveis após 1 semana	
<b>Células cardíacas de tartaruga</b>	Tartaruga	<i>L. mexicana</i>	PRO	Transformação em AMA	
<b>Fibras musculares</b>	Camundongo C57BL/6 e Balb/C	<i>L. amazonensis</i>	PRO	Viáveis por até 6 semanas	33
<b>C2C12</b>	Mioblastos esquelético de camundongo	<i>L. amazonensis</i>	PRO	Transformação em AMA, multiplicação e viáveis por até 3 dias	
<b>SkMCs</b>	Célula muscular esquelética Humana	<i>L. amazonensis</i>	PRO	Transformação em AMA, multiplicação e viáveis por até 3 dias	

**Continuação Tabela 2:** Células primárias (derivadas de tecido) ou linhagens celulares de origem não monocítica ou magrofágica infectadas por espécies de *Leishmania*. [Adaptado de M.G. Rittig and C. Bogdan, 2000 <sup>23</sup>].

<b>Célula hospedeira</b>	<b>Espécies e tipo de tecido</b>	<b><i>Leishmania</i> spp.</b>	<b>Forma infectante</b>	<b>Destino dos parasitas intracelulares</b>	<b>Refs</b>
<b>Adipócitos</b>	Células tronco derivadas de tecido adiposo humano	<i>L. tropica</i> <i>L. donovani</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i> <i>L. braziliensis</i>	PRO	Transformação em AMA	25
<b>Adipócitos (3T3-L1)</b>	Adipócitos diferenciados de células embriônicas de camundongos	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i>	AMA/PRO	Transformação em AMA, multiplicação, viáveis por até 6 dias e declínio após 2 dias	Presente Estudo

**AMA = amastigotas; PRO = promastigotas.**

Neste cenário, a caracterização biológica de infecções em outros tipos celulares não pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário é de fundamental importância para investigação e compreensão da complexidade da doença. Além disso, o entendimento da diversidade de interação parasito-hospedeiro é chave para o desenho de intervenções terapêuticas para o controle desta enfermidade, para o desenvolvimento de outros estudos voltados ao estabelecimento de novos modelos celulares e compreensão do progresso da infecção, biologia e metabolismo deste protozoário.

#### **1.4. Adipócito como célula hospedeira de tripanossomatídeos**

Adipócitos são células constituintes do tecido adiposo que são classicamente divididas em dois tipos: 1. tecido adiposo marrom (TAM), predominante em fetos e em recém-nascidos, praticamente ausentes nos indivíduos adultos. Trata-se de um tecido especializado na regulação de calor, desempenhando funções termogênicas; 2. tecido adiposo branco (TAB), presente em diversas regiões do organismo, envolvendo órgãos e estruturas internas, com funções mais complexas e integrantes envolvidas em diversos sistemas fisiológicos <sup>34,35</sup>. Ainda pouco estudado, um terceiro tipo de tecido adiposo bege (TBE) encontra-se distribuído na região cervical, axilar, incluindo depósitos interescapulares.

A morfologia do TBE assemelha como intermediário aos dois primeiros tipos de tecido, possuindo gotículas lipídicas mais multiloculares, entretanto com características fisiológicas totalmente distintas e únicas <sup>36</sup>. O TAB distribui-se como um órgão dinâmico, além de armazenar e mobilizar energia em forma de triglicerídeos, é ativo na produção e secreção de uma variada gama de hormônios em um conjunto de processos celulares e fisiológicos <sup>37</sup>. Além das funções classicamente descritas, este tipo celular também tem sido identificado como potencial alvo de patógenos, modelos de estudo da biologia de infecção e ciclo de vida de parasitos de importância médica mundial <sup>38,39</sup>.

Diferentes tripanossomatídeos foram reportados associados às células do tecido adiposo de humanos e camundongos, como *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi*, agentes etiológicos da tripanossomíase africana e americana (doença de Chagas), respectivamente. *T. brucei* é um parasito extracelular encontrado livremente na corrente sanguínea que apresenta tropismo pelos tecidos do sistema nervoso central, levando ao acometimento das suas funções, incluindo alterações no padrão de sono/vigília. Contudo, formas distintas das sanguíneas já foram encontrados em espaços intersticiais entre os adipócitos <sup>40</sup>.

*T. cruzi*, comumente encontrado no interior de diversos tipos celulares, é responsável por diversas manifestações clínicas, desde uma infecção assintomática a disfunções cardíacas e digestivas na forma crônica da doença de Chagas. Formas deste parasita foram identificadas no interior de adipócitos <sup>41</sup>. Segundo Nagajyothi et al. <sup>42</sup>, receptores de lipoproteína de baixa densidade seriam alvos da interação com adipócitos e interfeririam no processo infectivo. Outro fator associado ao sucesso adaptativo do parasito estaria relacionado à expressão gênica diferenciada para obtenção de carbonos através da  $\beta$ -oxidação encontrada tipicamente em formas tripomastigotas da corrente sanguínea <sup>43</sup>.

Tanowitz et al <sup>44</sup>. definiram quatro tipos de mecanismos para o sucesso parasitário desses dois tripanossomatídeos em adipócitos. Primeiro, as formas tripomastigotas de ambos parasitos providas de flagelos atravessariam livremente os capilares sanguíneos e se dispersariam por diferentes tecidos e órgãos, entretanto, apenas haveria desenvolvimento das diferentes formas de vida onde o parasita conseguiria se multiplicar e evadir as respostas do sistema imune do hospedeiro. Nesse caso, o tecido adiposo confere esses requisitos. Na segunda hipótese, o mecanismo anterior seria mediado por receptores específicos presentes no tecido alvo, como encontrado na subunidade a4 da lâmina basal de endotélios que permitem a passagem de *T. brucei* através da barreira hematoencefálica. A terceira hipótese residiria na penetração de parasitas durante os efeitos da angiogênese, pois durante a remodelação vascular e o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos o parasita atingiria o tecido adiposo. A quarta possibilidade reside no eventual escape da resposta imune desenvolvida pelo parasito, por

exemplo, quando níveis de IFN- $\gamma$  estão elevados no plasma, *T. brucei* é capaz de se dispersar para o encéfalo. Além de adipócitos servirem como sítios de infecção para estes tripanossomatídeos na fase aguda, podem atuar como um reservatório durante a fase crônica da doença <sup>45</sup>.

Em relação ao curso da infecção por *Leishmania*, Allahverdiyev et al <sup>25</sup> também descreveram infecções *in vitro* por espécies de parasitos restritas ao Velho Mundo em adipócitos diferenciados de células-tronco mesenquimais. O modelo experimental permitiu detectar resquícios de DNA do parasito até 28 dias após a infecção, contudo, ressalta-se que não foram visivelmente demonstradas as formas parasitárias, tampouco, avaliação da cinética do perfil da infecção.

Do ponto de vista metabólico, pressupõem-se que as necessidades energéticas requeridas nesse ambiente sejam diferentes daquelas encontradas em células fagocíticas profissionais. Sabe-se também que os lipídios estão envolvidos no curso da infecção por *Leishmania* em macrófagos e observa-se a modulação positiva da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) a partir do ácido araquidônico na formação de vários lipídios bioativos, incluindo prostaglandina, tromboxano e prostaciclina <sup>46,47</sup>. Sugere-se também que a expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico, como receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR- $\gamma$ ), possa contribuir para cronicidade da infecção, pois quando este fator é ativado ocorre diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro, por consequência protegendo-o de uma resposta imune exacerbada <sup>48</sup>. Ainda nesse contexto, recentemente foi descrito o recrutamento e inclusões de corpos lipídicos para o interior do amastigota, demonstrando um papel crucial dos lipídios na manutenção da vida parasitária <sup>49</sup>.

### 1.5. Modelo celular: 3T3-L1 e adipogênese

O TAB é constituído por uma matriz de tecido conjuntivo, células adiposas, tecido nervoso, células do estroma vascular, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e células-tronco <sup>50</sup>. Quando as células pré-adiposas finalizam o processo de diferenciação celular tornam-se adipócitos maduros, morfologicamente reconhecidos pelo armazenamento de lipídios em inclusões no citoplasma <sup>37,50</sup>.

Estudos abordando a adipogênese ou aspectos relacionados ao tecido adiposo frequentemente utilizam as células 3T3-L1 derivados de camundongos como principal modelo celular. Ensaios *in vitro* da diferenciação das linhagens de fibroblastos 3T3-L1 compreendem um sistema molecular complexo envolvendo a expressão de genes regulados que anteriormente encontravam-se silenciados, incluindo a lipase de lipoproteína (LPL), PPAR- $\gamma$ , transportadores de glicose (GLUT4), desidrogenase glicerol-3-fosfato (G3PDH),

leptina, entre outros, expressos durante as diferentes etapas de diferenciação e contribuem para as alterações morfológicas e o acúmulo de triglicerídeos no citoplasma das células adiposas diferenciadas<sup>51,52</sup>. A insulina, como um fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e glicocorticoides, como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP)<sup>53</sup>, constituem-se como principais agentes reguladores da adipogênese. Logo, o emprego de insulina, dexametasona e 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX) constituem um coquetel adipogênico chave do processo de adipogênese. A diferenciação celular de linhagens 3T3-L1 compreende etapas iniciais, intermediárias e terminais altamente coordenadas e reguladas, constituindo a parada do ciclo celular, expansão clonal e, por fim, a diferenciação terminal.<sup>53,54</sup>

O emprego do coquetel adipogênico em placas confluentes de 3T3-L1 ativa os receptores de glicocorticoides pela dexametasona, receptores IGF-1 pela insulina e inibe receptores de fosfodilesterases pelo IBMX, juntos atuam regulando a diferenciação celular<sup>54,55</sup>. Com a estimulação celular de 3T3-L1 pelo coquetel adipogênico, ocorre o início dos eventos representados pela expressão das proteínas ligantes ao amplificador C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*). Nesse processo a adipogênese ocorre como duas “ondas” com fatores de transcrição bem característicos. A primeira onda representada pelas C/EBP- $\beta$  e C/EBP- $\delta$  responsáveis por reiniciar o ciclo celular, seguindo com pelo menos duas divisões de forma regulada (expansão clonal), que saem permanentemente do processo de ciclo celular e entram em diferenciação terminal por ativação da segunda onda representada principalmente por PPAR- $\gamma$  e C/EBP- $\alpha$ . O PPAR- $\gamma$  é considerado um fator limitante da adipogênese levando ao fenótipo característico do adipócito maduro<sup>53,54</sup>. As células comprometidas passam pela diferenciação terminal manifestada devido à produção de gotículas lipídicas no citoplasma, bem como a expressão de múltiplos programas metabólicos característicos de células adiposas maduras.

Os fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e C/EBP $\delta$  são inicialmente induzidos, estando diretamente relacionados na indução e aceleração da adipogênese em resposta a indutores hormonais. C/EBP $\beta$  responde principalmente a dexametasona, enquanto C/EBP $\delta$  responde ao IBMX, e diminui nas 48h subsequentes, enquanto o declínio de C/EBP $\beta$  é mais gradual de tal forma que ocorre por volta do oitavo dia<sup>56</sup>. Acredita-se que fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e  $\delta$  medeiam a expressão do PPAR- $\gamma$ , sendo transcrito durante as 48h após a indução da diferenciação, e atingindo a máxima expressão por volta de 72 a 96h. Acredita-se, também, que C/EBP $\beta$  e  $\delta$  induzem a expressão de C/EBP $\alpha$ , com níveis indetectáveis em pré-adipócitos e apresentando níveis detectáveis após 48h, com completa expressão em 96h do início do programa de diferenciação<sup>53,57</sup>. Uma vez ativados, o PPAR $\gamma$  e o C/EBP $\alpha$  retroalimentam-se para manter sua expressão gênica, apesar de uma redução na expressão

de C/EBP $\beta$  e  $\delta$ . C/EBP- $\alpha$  impede que ocorra mitose pós-confluente evitando que as células progridam da diferenciação celular. PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  são dois fatores críticos e necessários para os estágios tardios de diferenciação de maneira cooperativa e sinérgica, mas não são expressos em altos níveis nos pré-adipócitos e não estão envolvidos no desenvolvimento inicial<sup>58</sup>.

## 1.6. Justificativa

Apesar da importância epidemiológica e dos avanços científicos na área, a leishmaniose permanece como uma doença negligenciada, que demanda esforços para melhor compreensão de sua biologia, desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinais mais eficientes. A cronicidade da doença também é pouco compreendida e pode ser um fator chave para responder perguntas abertas neste campo de investigação. Neste âmbito, o estabelecimento de infecções de células adiposas com espécies de *Leishmania* causadoras de leishmaniose tegumentar americana, como *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, representam um campo fértil na investigação da interação parasita com uma célula hospedeira abundante, inclusive próxima ao sítio da lesão e não estritamente fagocítica.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de protozoários do gênero *Leishmania* em infectar células adiposas diferenciadas de linhagens de fibroblastos embrionários 3T3-L1.

### 2.2. Objetivos específicos

- I. Avaliar condições ótimas de cultivo de 3T3-L1, bem como padronizar um protocolo ideal de fixação e coloração de adipócitos para utilização em rotina no laboratório;
- II. Avaliar se adipócitos e pré-adipócitos são permissivos a infecção por *Leishmania* spp.;
- III. Determinar as cargas parasitárias de culturas de adipócitos infectadas por diferentes tempos com formas infectivas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*;
- IV. Identificar a formação do compartimento ocupado pela *Leishmania* spp. em adipócitos;

- V. Avaliar a viabilidade dos parasitos intracelulares que infectaram adipócitos.

### 3. Metodologia

#### 3.1. Cultura de parasitos

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) foram cultivadas em meio 199 (Sigma -Aldrich) com 20% de soro bovino fetal inativado (FBS) (Sigma-Aldrich), adenina 10 mM, L-glutamina 5 mM e penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg / mL) (Sigma, EUA) em garrafas 25 cm<sup>2</sup> mantidos a 26 °C. As culturas de *L. (V.) braziliensis* foram suplementadas com 10% de FBS e 5% de urina estéril masculina humana. Os experimentos foram realizados até a oitava passagem, e em fase estacionária de crescimento celular.

Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram cultivados de modo axênico. O meio de cultura utilizado foi o mesmo de promastigotas, entretanto esses foram acidificados a pH 4,8 e pH 5,2, e suplementados com 20% de FBS e mantidos na estufa 32°C e 34°C com 5% de CO<sub>2</sub> para a primeira e segunda espécie de *Leishmania*, respectivamente. Amastigotas axênicos foram obtidos a partir do quarto dia de cultivo.

#### 3.2. Culturas de adipócitos (3T3-L1)

3T3-L1 foram cultivadas em meio DMEM (Gibco) suplementados com 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 0.1 M de NaPyr (piruvato sódico), 40 mM de HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-1-piperazin-1-iletanosulfônico) e 1% de penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg / mL) (Sigma-Aldrich), em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com *filtro*, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. A manutenção da cultura foi estabelecida com repiques a cada dois ou três dias com 10<sup>5</sup> células/mL. Obtenção de adipócitos maduros foi realizada a partir do protocolo descrito por Zebish<sup>59</sup> com algumas modificações.

O período total de diferenciação celular foi de 14 dias, com trocas do meio a cada 48 h. No dia 0, as células foram semeadas numa densidade de 10<sup>4</sup>/mL em placas de 24 poços (Corning) contendo lamínulas (13 mm diâmetro). No dia 3, as culturas com 70-80% de confluência celular foram expostas ao coquetel adipogênico (0.25 µM de dexametasona, 2 µg/mL de insulina e 0.5 mM de IBMX) por um período de 48 h. No dia 5, o meio contendo o coquetel adipogênico foi substituído por novo meio contendo insulina (1 µg/mL) por mais 48 h. Fez-se necessário cultivar as células em placas de 24 poços com lamínulas em volume final de pelo menos 1mL/poço, sendo um dos fatores decisivos para o aparecimento de gotículas de lipídios. Nos dias 7-14, foram realizadas trocas de meios a cada 48 h. No 8°

dia foi possível observar a formação de pré-adipócitos com pequenas gotículas de lipídios. Finalmente, no 14º dia foram obtidos os adipócitos que foram confirmados com coloração de Oil-Red O<sup>59</sup>.

### **3.3. Infecção de adipócitos com promastigotas e amastigotas**

Nas placas de 24 poços os adipócitos foram infectados com promastigotas em fase estacionária de crescimento e amastigotas das culturas *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* na MOI=20 e mantidas em estufa a 34°C com 5% de CO<sub>2</sub> respectivamente. Após 4 h de incubação, as placas de cada espécie foram lavadas três vezes com PBS (1X) e acompanhadas nos tempos de 1, 24, 48 e 144 h. Em cada tempo determinado, as lamínulas foram coletadas, fixadas (4% formaldeído por 1h), coradas de modo sequencial, primeiramente com Oil-Red O por 2 h, e depois com Giemsa por 15 min. A determinação do número de parasito intracelular por adipócito foi obtida a partir da contagem aleatória de 300 adipócitos infectados com *Leishmania* spp. (MOI=20). A leitura das lâminas citológicas foi realizada em microscópio de luz (100x objetiva de imersão).

### **3.4. Microscopia de fluorescência**

Para tempos de 1, 24, 48 e 144 h, lamínulas contendo os adipócitos infectados com *Leishmania* spp. foram lavadas três vezes com PBS (1X), fixadas com paraformaldeído (4%) durante 30 min em temperatura ambiente, permeabilizadas com TRITON (0.5%) por 20 min e posterior coloração das gotículas lipídicas com 1µg/mL de Bodipy 493/503 (Invitrogen) por mais 20 min. As lâminas foram montadas com Prolong contendo DAPI (Invitrogen) e observadas ao microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager 2 com câmera acoplado que permitiram a aquisição das imagens com objetiva de imersão (100x) (Departamento de Biologia Animal - Laboratório de Protozoologia). O processamento das imagens foi feito utilizando o software *Image J* (NIH-USA).

### **3.5. Identificação de pH do vacúolo parasitóforo em adipócitos**

A marcação do vacúolo parasitóforo foi realizada utilizando LysoTracker™ Red DND-99. Um corante que apresenta alta seletividade para organelas e estruturas ácidas. Lamínulas contendo adipócitos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MOI=20) nos tempos 24 h e 48 h foram incubadas com 75 nM de LysoTracker™ Red DND-99 a 34°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h. Após esse período, a preparação, montagem e análise das lamínulas foi realizada previamente como descrito acima no tópico 3.4. Microscopia de fluorescência.

### 3.6. Análise ultraestrutural da infecção

Amostras de células adiposas infectadas com *Leishmania* spp. foram lavadas três vezes com PBS (1X), fixadas em tampão 0,1 M de cacodilato e 3 mM de CaCl<sub>2</sub> com 2,5 % de glutaraldeído durante 5 min em temperatura ambiente, posteriormente fixadas com 4% de paraformaldeído por mais 30 min a 4°C. O material foi lavado três vezes com o tampão (0,1 M de cacodilato e 3 mM de CaCl<sub>2</sub>) a 4 ° C, então pós-fixadas com 1% da solução de tetraóxido de ósmio em tampão 0,1 M de cacodilato e 3 mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,8% de ferrocianeto de potássio por 3 minutos a 4°C. Após lavar cinco vezes em água MilliQ a 4°C, as células foram contrastadas com 2% de acetato de uranila aquoso filtrado por 1 h a 4°C. Transcorrido esse período o material foi novamente lavado por mais cinco vezes em água MilliQ a 4°C, e empregado a desidratação sequencial em etanol com concentrações crescentes de 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 2x 100% a 4°C. Por fim, as amostras foram embebidas na resina Epon e etanol na proporção (1:1) em agitação constante por 30 minutos à temperatura ambiente, este procedimento foi repetido por mais cinco vezes durante 1 hora cada ciclo, sendo o último embebido em resina Epon pura por 12 h a temperatura ambiente. No dia seguinte, o material foi substituído por resina Epon pura por 72 h a 60°C. A partir da polimerização completa, o material foi seccionado no TA-X ultrótomo (RMC; Tucson, AZ) , e contrastado com citrato de chumbo e citrato de uranila por 20 minutos a 4°C. A análise microscópica eletrônica de transmissão foi realizada com microscópio Leo 906-Zeiss, junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do IB/UNICAMP. Nesta etapa contamos com a colaboração do Prof. Silvio R. Consonni do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do IB-UNICAMP.

### 3.7. Progresso da infecção: viabilidade dos amastigotas

Transcorridos o período total da infecção *in vitro* (144 h) foram avaliadas a viabilidade dos amastigotas a partir da transformação das formas de vida intracelular para as formas flageladas. Para isso, os adipócitos infectados foram lisados com SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0.04%. O conteúdo citoplasmático foi coletado e seguido para purificação com ciclos alternados de centrifugação. O primeiro ciclo, 100 g por 10 min constituiu na recuperação do sobrenadante e ressuspensão em PBS (1X). No segundo ciclo, 800 g por 10 min, descartou-se o sobrenadante para nova ressuspensão em PBS (1X). Este último ciclo foi repetido por mais três vezes. Por fim, os amastigotas foram semeados em placas de 96 poços (10<sup>5</sup>/mL) e cultivados em meio 199 para promastigotas como descrito anteriormente, a 26°C por até 9 dias. O crescimento celular foi avaliado pela contagem com câmara de Neubauer.

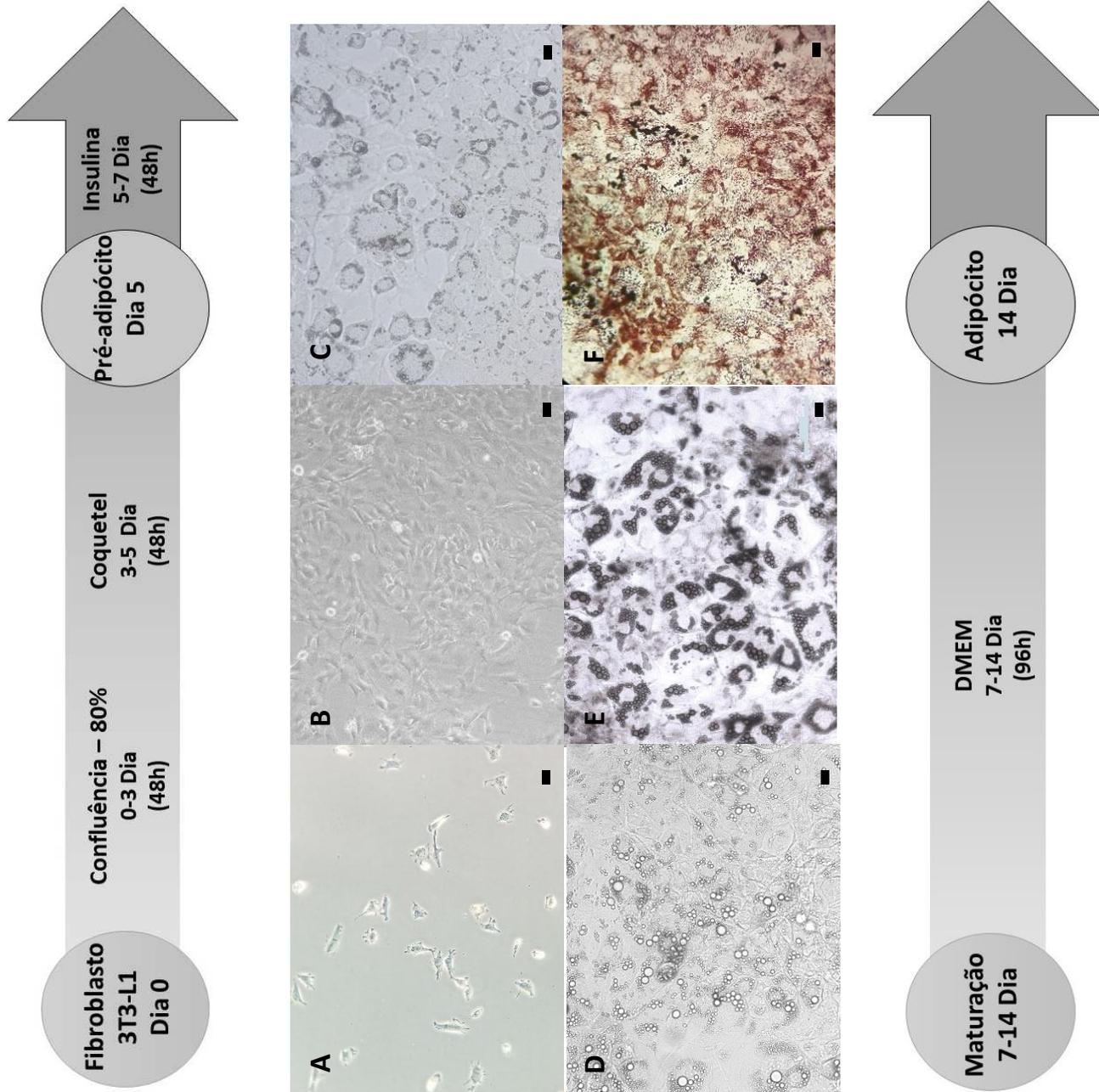
### **3.8. Análise estatística**

Os ensaios foram realizados em triplicatas e com pelo menos dois experimentos independentes. As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas com o programa OriginPro 8, utilizando a análise de variância (ANOVA) ou teste-*t* de Student, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Culturas de adipócitos diferenciados de fibroblastos 3T3-L1**

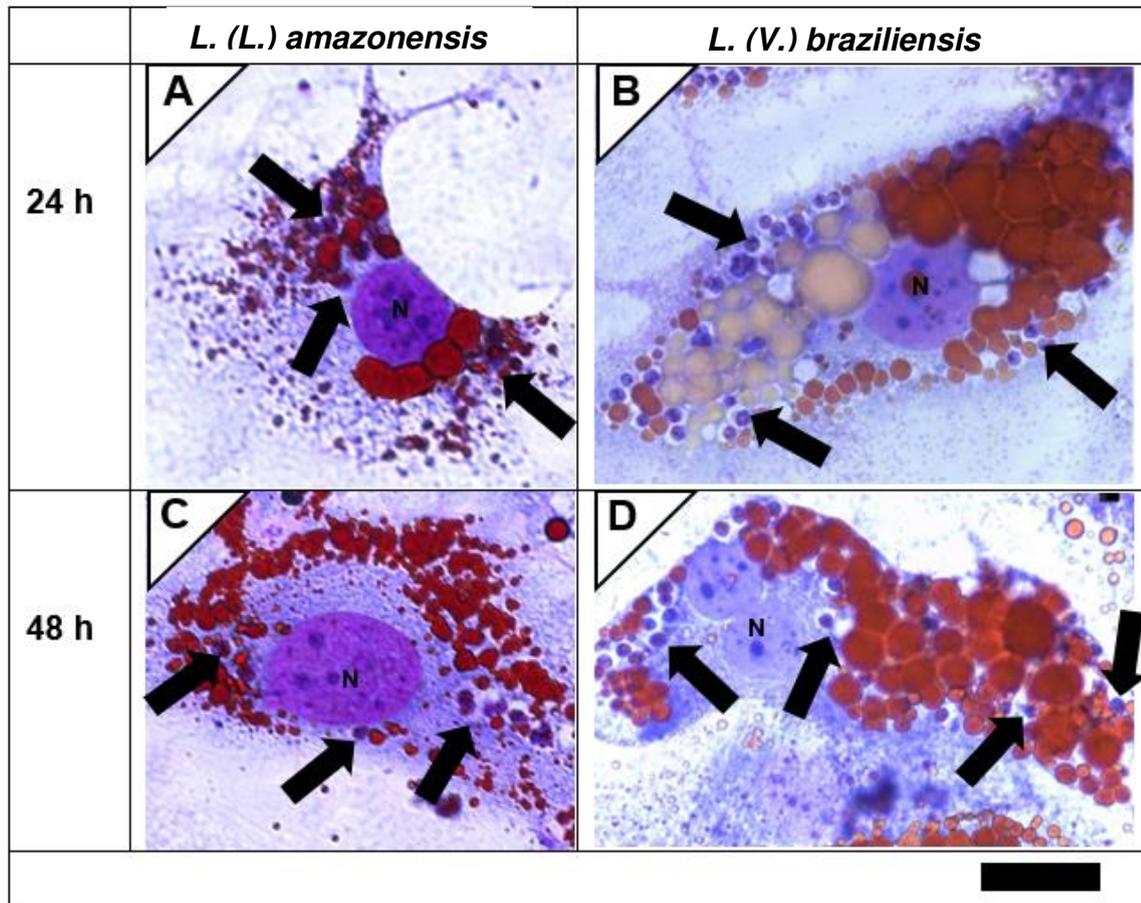
Os resultados permitiram a obtenção de adipócitos a partir da linhagem celular 3T3-L1 utilizando o protocolo descrito com algumas modificações, as quais foram estabelecidas em uso de rotina no laboratório a partir deste trabalho. Na figura 4A é possível visualizar fibroblastos a partir de um padrão de células aderidas e espreiadas sobre o fundo da superfície da garrafa de cultura. Alcançada a confluência celular de ~80% (Figura 4B), as células foram induzidas à diferenciação com adição do coquetel adipogênico passando por estágios compreendidos como pré-adipócitos, com hiperplasia das gotículas lipídicas no citoplasma celular (Figura 4C). Os adipócitos maduros foram obtidos em aproximadamente 14 dias (Figura 4E-F). Podemos verificar a hipertrofia das gotículas lipídicas características dos adipócitos corados em cinza escuro com imidazol (Figura 4E), e marcadas em Oil-red O (Figura 4F). A presença das gotículas lipídicas e as características celulares observadas a partir do 14º dia apontam para êxito na obtenção dos adipócitos necessárias para etapas seguintes de infecção.



**Figura 4: Obtenção de adipócitos a partir de linhagem de fibroblastos embrionários de camundongos 3T3-L1. (A-E)** Imagens obtidas da diferenciação celular em microscópio invertido com aumento de 20x. **(A)** Dia 0, fibroblastos semeados. **(B)** Dia 3, adição do coquetel adipogênico sobre 80% da confluência celular. **(C)** Dia 7, pré-adipócitos incubados com insulina por mais 48h. **(D)** Dia 12, hipertrofia celular. **(E)** Dia 14, adipócitos maduros contrastado com imidazol, no qual notam-se gotículas lipídicas coradas em cinza escuro. **(F)** Dia 14, adipócitos corados com Oil-red O, no qual as gotículas lipídicas são coradas em vermelho (10x). Barras = 10  $\mu$ m.

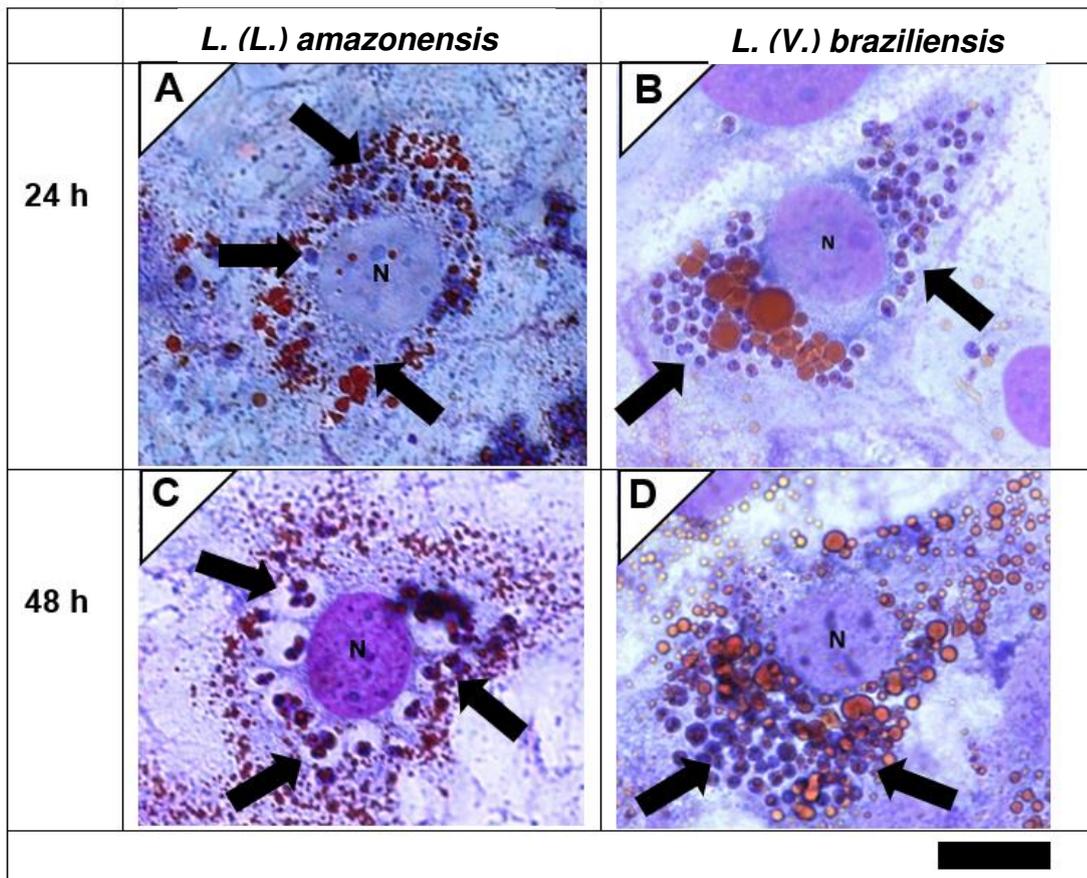
## 4.2. Microscopia Óptica: infecção de adipócitos com *Leishmania*

O objetivo do presente estudo consistiu em explorar a capacidade infectiva da *Leishmania* em culturas de adipócito *in vitro*. Portanto, os adipócitos diferenciados de fibroblastos 3T3-L1 foram expostos às duas formas infectivas de duas espécies de *Leishmania*. Os adipócitos demonstraram ser permissivos à infecção, ou seja, promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (V.) braziliensis* por até 144 h. A presença dos parasitos foram demonstradas em fotomicrografias obtidas nos tempos 24 e 48h (Figura 5). A coloração combinatória Oil-red O e Giemsa permitiu corar as gotículas lipídicas em vermelho/laranja e núcleos celulares e citoplasma em azul/violeta, respectivamente. Nas infecções por *L. (L.) amazonensis* encontramos um ou mais parasitos por vacúolo parasitóforo (Figura 5C). Em contrapartida, nas infecções por *L.(V.) braziliensis*, constatamos apenas um parasito delimitado por pequeno vacúolo (Figura 5B-D). Este fenômeno observado é similar ao descrito para fagócitos profissionais.



**Figura 5: Adipócitos de fibroblastos 3T3-L1 albergando amastigotas de *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. (A-C) Adipócitos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24h (A) e 48h (C). (B-D) Adipócitos infectados com *L. (V.) braziliensis* após 24h (B) e 48h (D) respectivamente; MOI=20. As setas apontam para amastigotas intracelulares. Observar (C), vacúolos expandidos com mais de um amastigota. "N": núcleo da célula hospedeira. A cultura em monocamada foi corada com Oil-Red O e Giemsa de modo combinatório. Barra = 10 µm.**

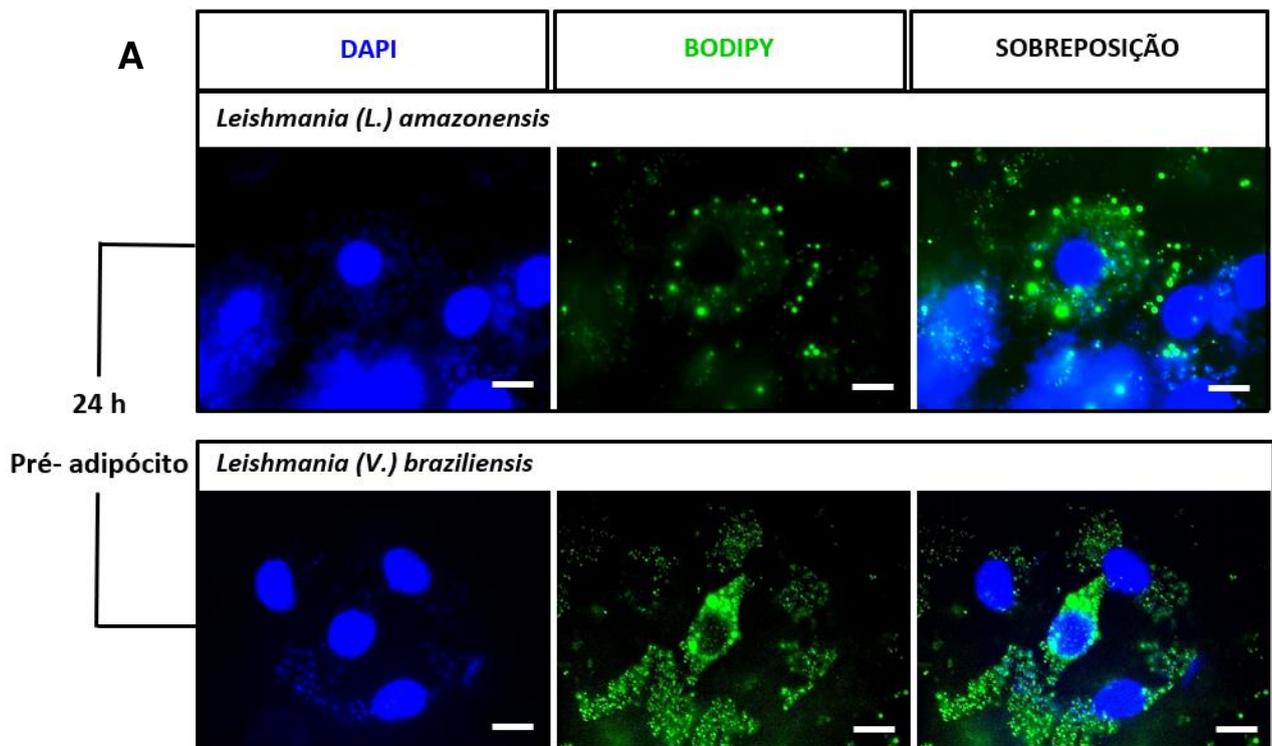
Além disso, pode-se visualizar que pré-adipócitos também apresentaram potencial em albergar os parasitos por até 144 h de infecção. Na figura 6 é possível observar formas amastigotas do parasita nos tempos 24 e 48 h de infecção para ambas espécies. O mesmo fenômeno - número de parasitos por vacúolo - foi igualmente observado nestas condições de infecção. Na Figura 6A é possível observar um ou dois parasitos delimitado(s) por vacúolo, já em 48 h de infecção (Figura 6C), foi possível observar 3 ou mais parasitos em alguns vacúolos. Diferentemente para *L. (V.) braziliensis* para a qual, nos tempos de 24 e 48 h foi encontrado apenas um parasito por vacúolo (Figuras 6B-D).

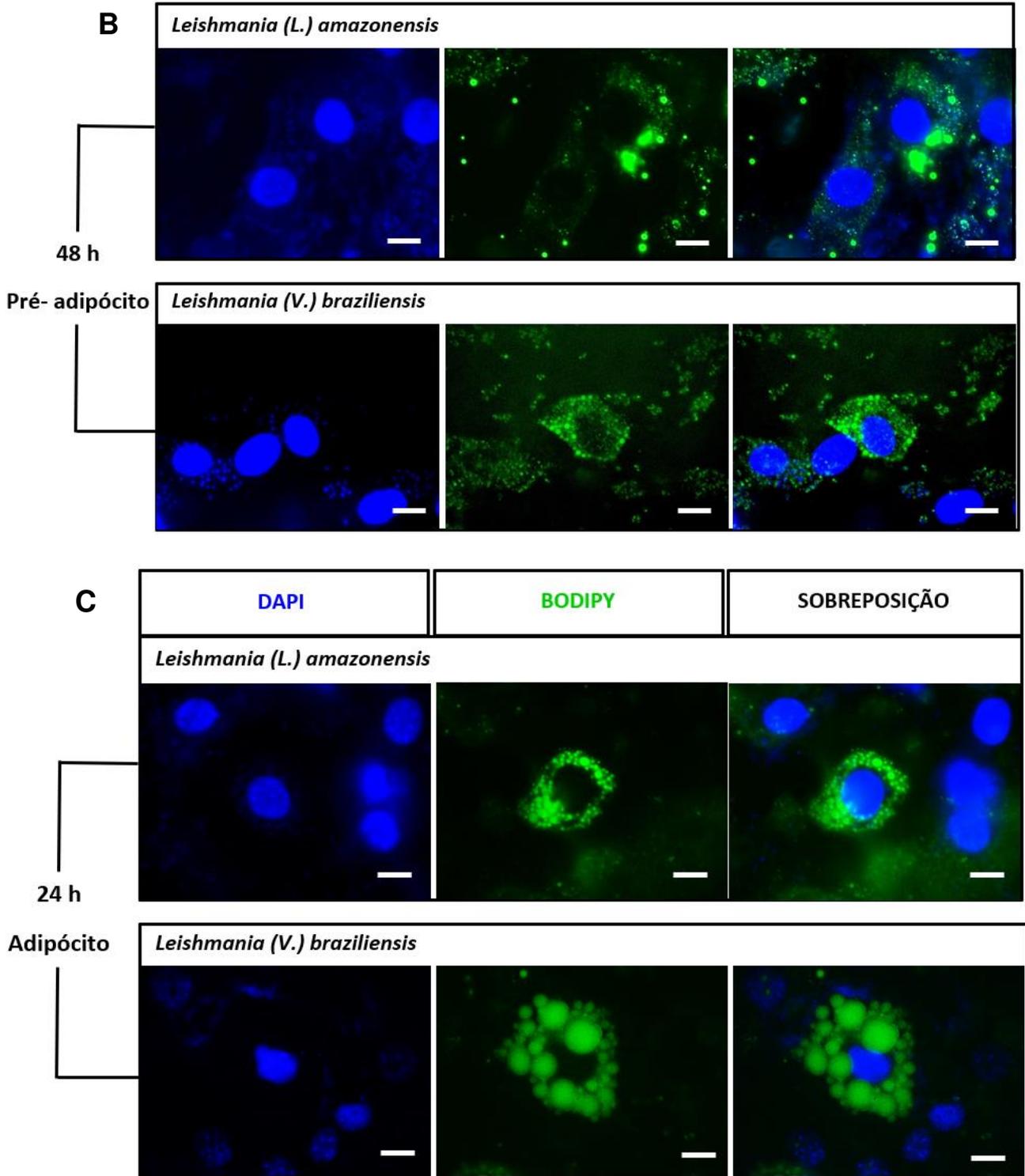


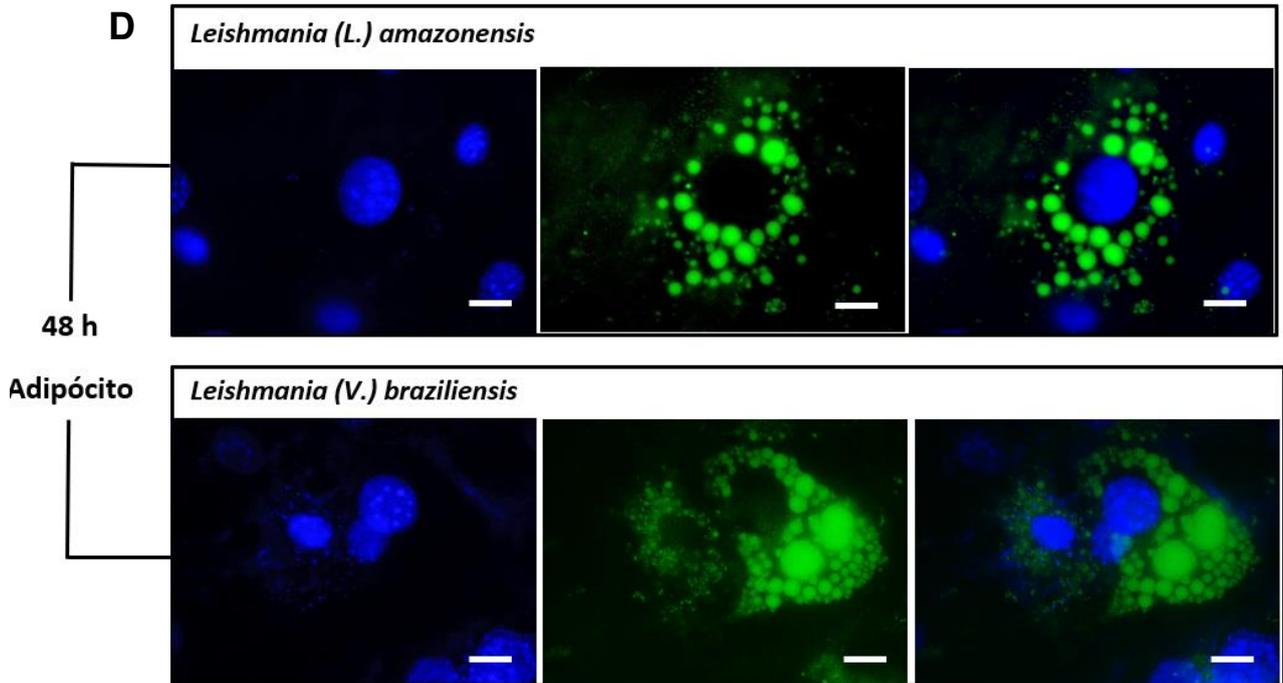
**Figura 6: Pré-adipócitos de fibroblastos 3T3-L1 albergando amastigotas de *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. (A-C) Pré-adipócitos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* após 24h (A) e 48h (C). (B-D) Pré-adipócitos infectados com *L. (V.) braziliensis* após 24h (B) e 48h (D) respectivamente; MOI=20. As setas apontam para amastigotas intracelulares. Observar (C), vacúolos expandidos com mais de um amastigota. "N": núcleo da célula hospedeira. A cultura em monocamada foi corada com Oil-Red O e Giemsa de modo combinatório. Barr = 10 µm.**

### 4.3. Microscopia de fluorescência para detecção de infecções de adipócitos com *Leishmania*

Os achados anteriores foram confirmados também por microscopia de fluorescência, sendo possível observar nitidamente gotículas lipídicas contendo óleos e lipídios não polares (Bodipy 493/503). Neste ensaio, o fluoróforo marcou especificamente estas gotículas em verde (Figura 7). A associação com DAPI revelou a presença do núcleo da célula hospedeira e dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Pré-adipócitos, do mesmo modo, foram incluídos no estudo (Figura 7A-B). A sobreposição das imagens evidencia que os parasitos ficaram proximalmente associados às gotículas lipídicas.

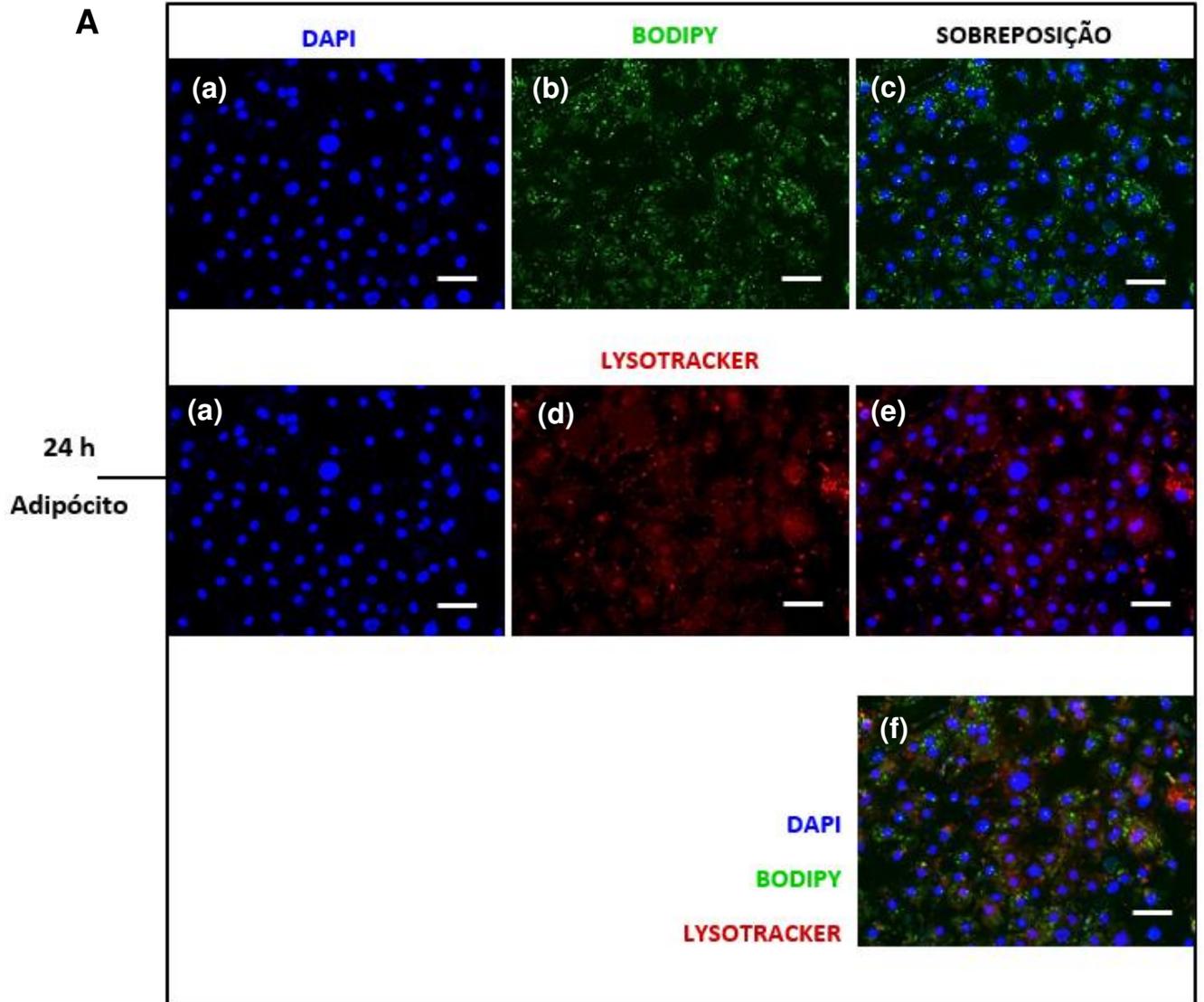


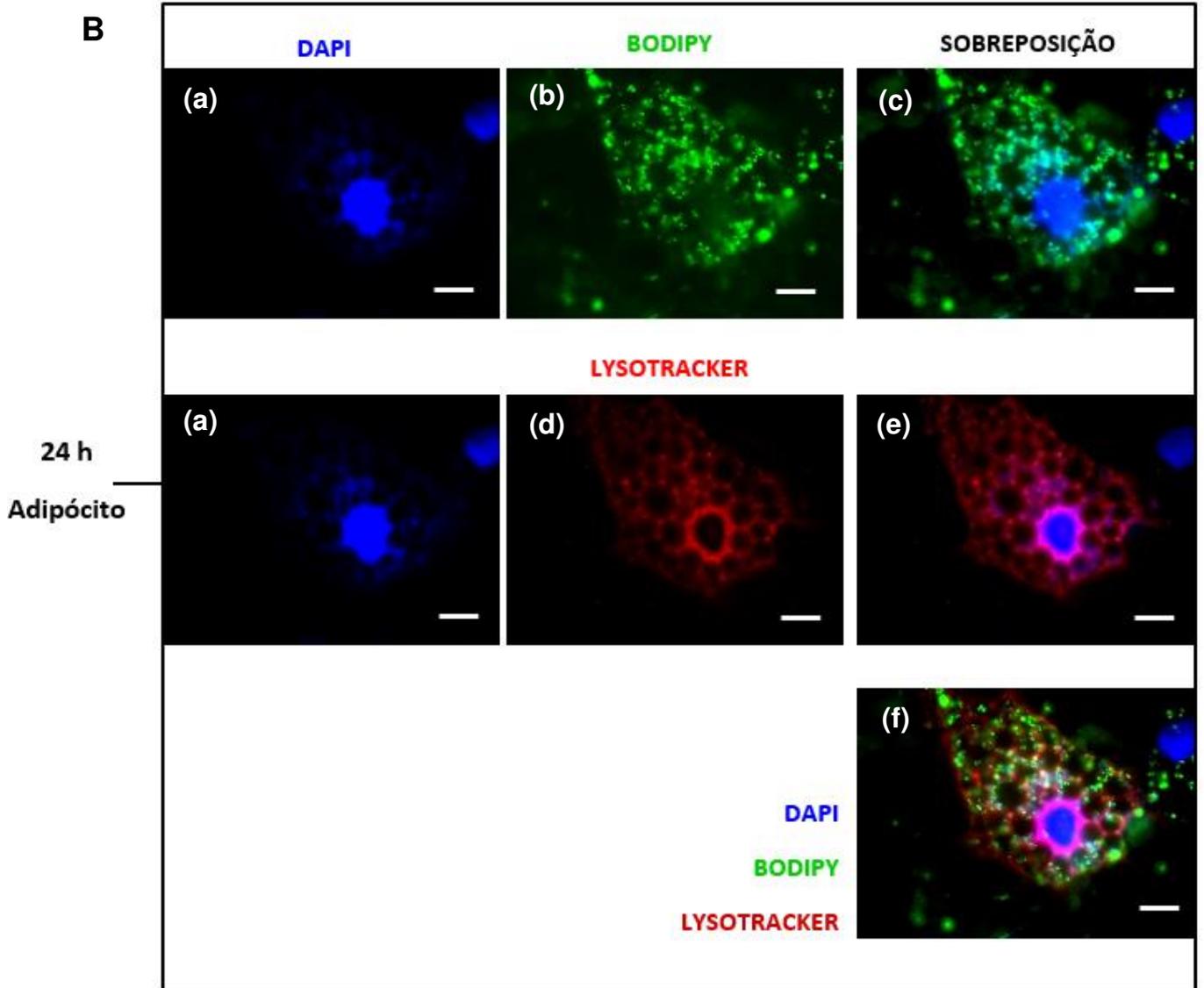


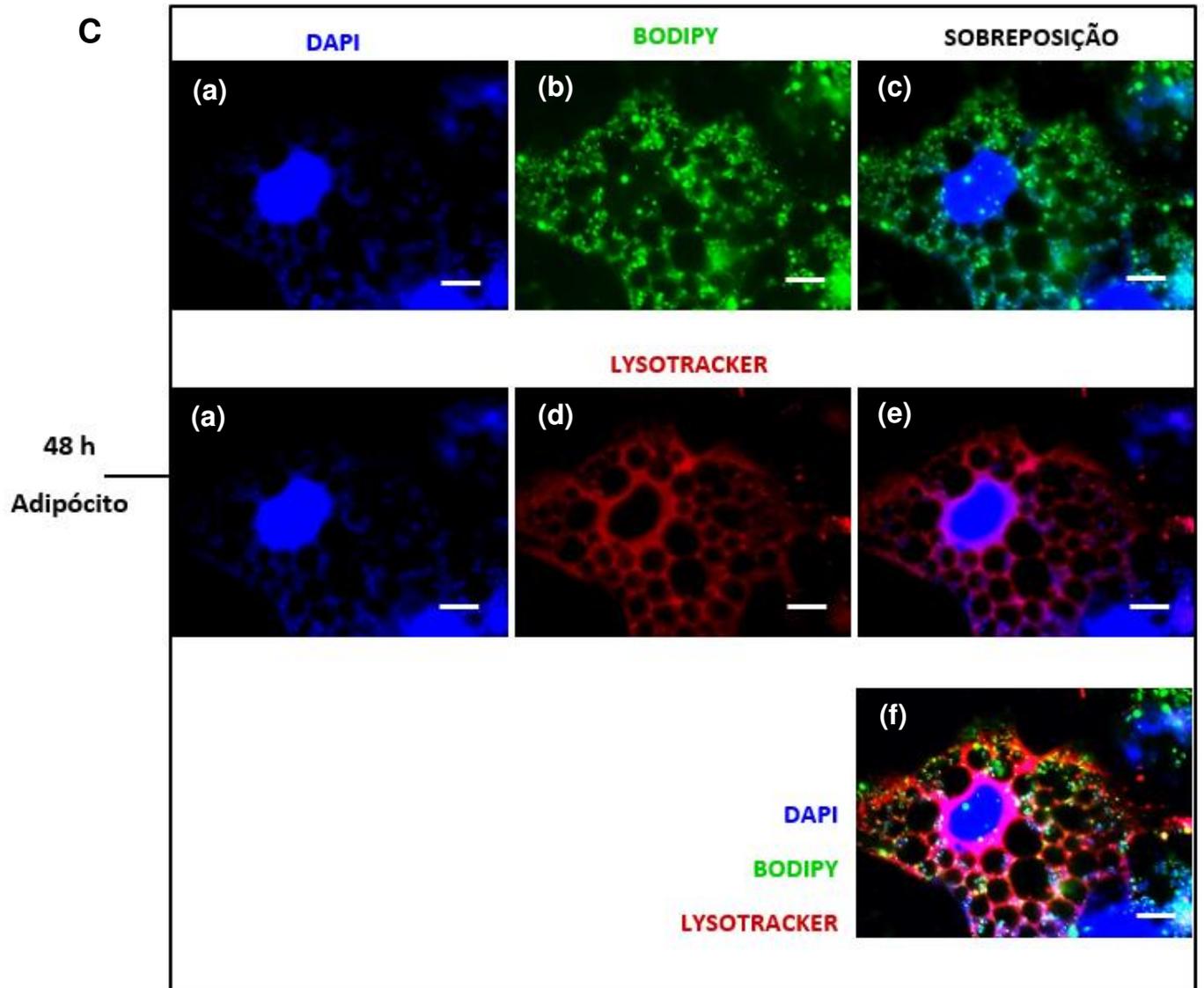


**Figura 7: Pré-dipócitos e adipócitos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.** (A-B) Pré-adipócitos infectados com amastigotas de *Leishmania* após 24 e 48h respectivamente. (C-D) Adipócitos infectados com *Leishmania* após 24h e 48h respectivamente; MOI=20. As imagens mostram gotículas lipídicas coradas com Bodipy 493/503 (fluorescência verde) e núcleos de adipócitos e amastigotas corados com DAPI (fluorescência azul). Barras = 10  $\mu$ m.

A acidez do compartimento ocupado por *Leishmania* em adipócitos foi caracterizada com auxílio do corante LysoTracker™ Red DND-99. Este corante de fluorescência vermelha é capaz de ligar-se a organelas e estruturas com pH mais ácido e ser detectado quando excitados no comprimento de onda de 577nm. Os resultados demonstram a formação de grandes vacúolos ácidos em adipócitos infectados nos tempos de 24 e 48 h (Figura 8). Ainda, quando marcados com DAPI, revelaram a presença de vários amastigotas por compartimento. Esses achados nos levaram a presumir que a composição química do vacúolo seja semelhante à encontrada em fagócitos profissionais. A associação com DAPI e Bodipy possibilitou a visualização dos núcleos celulares e gotículas lipídicas, respectivamente.



**B**

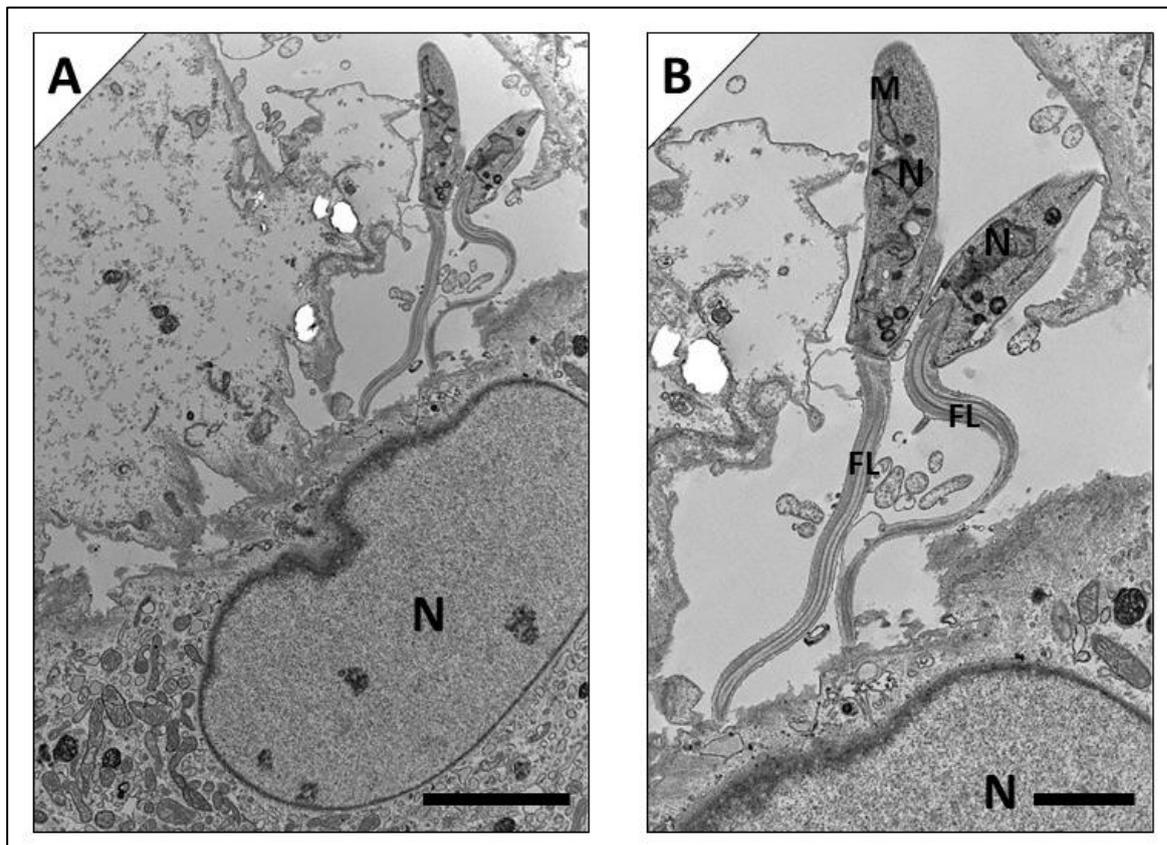


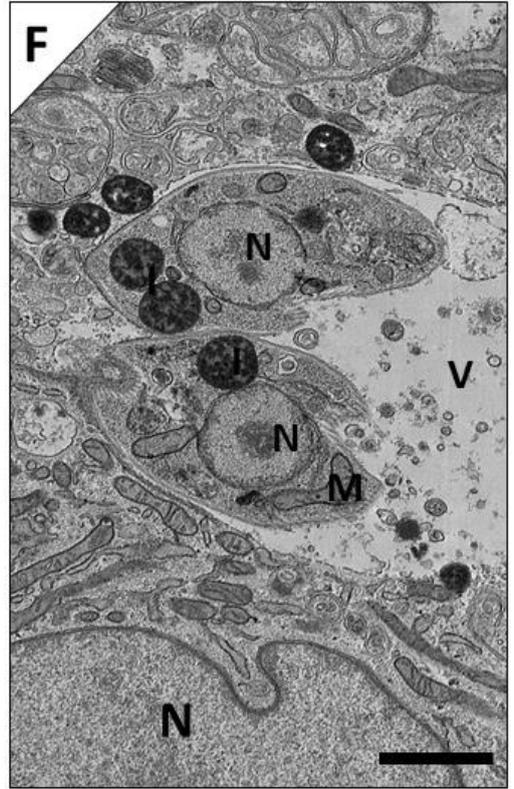
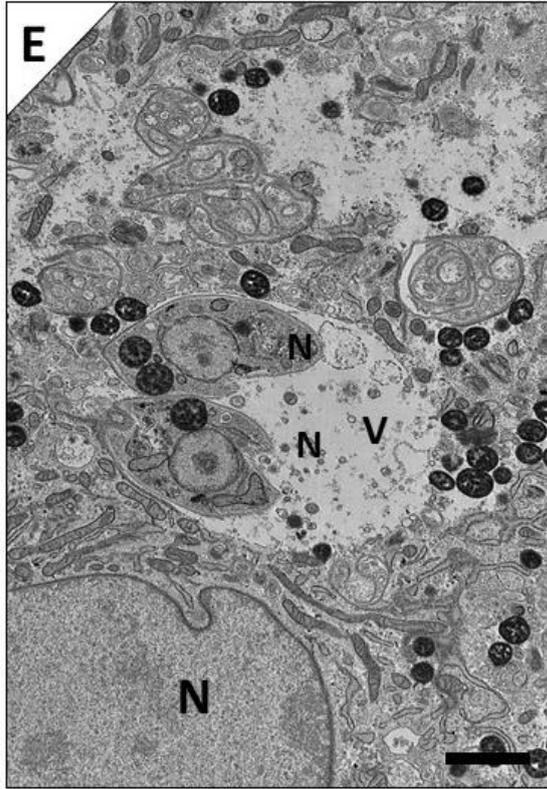
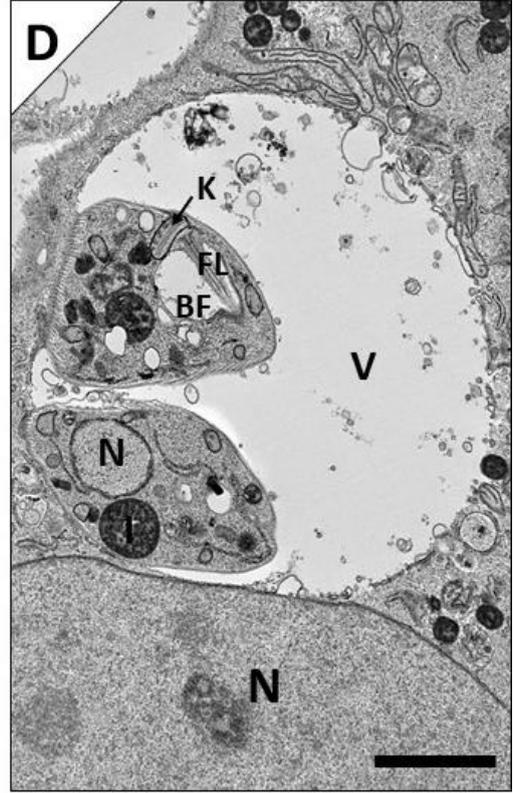
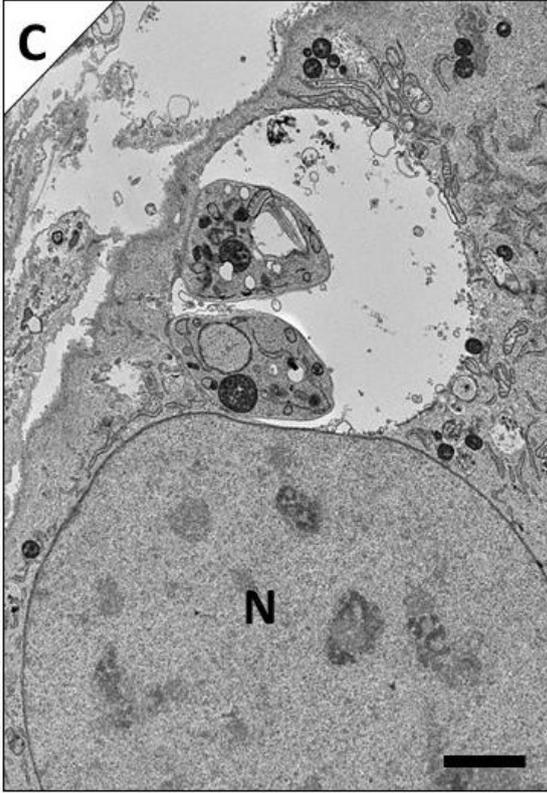
**Figura 8: Fotomicrografias de vacúolos parasitóforos de *L. (L.) amazonensis* em adipócitos nos tempos 24 h e 48 h. (A)** Confluência celular após 24 h de infecção com *L. (L.) amazonensis*. **(B)** Vacúolos parasitóforos de *L. (L.) amazonensis* marcados com LysoTracker® Red DND-99 (vermelho) após 24 h de infecção. **(C)** Vacúolos parasitóforos de *L. (L.) amazonensis* marcados com LysoTracker® Red DND-99 (vermelho) após 48 h de infecção. Núcleo celulares foram marcados com DAPI (azul); gotículas lipídicas com Bodipy 493/503 (verde). Barras = 10  $\mu$ m.

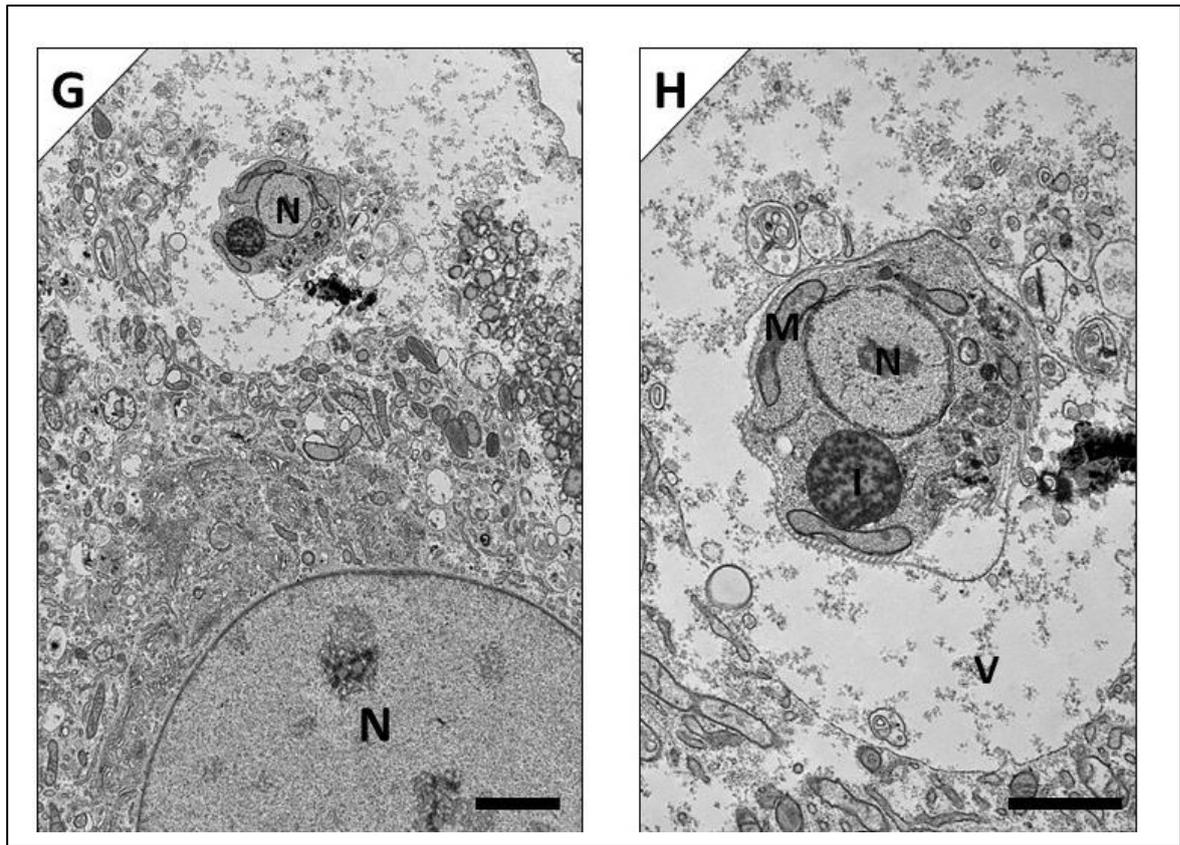
#### 4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão: análise ultraestrutural do compartimento ocupado por *Leishmania* em adipócitos

A análise ultraestrutural da infecção foi empregada com intuito de caracterizar o compartimento ocupado pelos amastigotas e as estruturas celulares, tendo em vista anteriormente em microscopia óptica e fluorescência a formação de vacúolos parasitóforos como encontrados nas

células hospedeiras habituais. Portanto, as análises foram obtidas de infecções adipocíticas para *L. (L.) amazonensis* nos tempos de 1, 24, 48 e 144 h (Figura 9). Nas primeiras horas de infecção, foi possível observar a porção livre do flagelo de promastigotas interagindo com adipócito (Figuras 9A-B). Após 24 h de infecção ocorreu a diferenciação para as formas amastigotas permitindo observar flagelo reduzido na bolsa flagelar, cinetoplasto, núcleo, inclusões lipídicas e a presença de um vacúolo parasitóforo expandido (Figuras 9C-D). Durante as 48 h de infecção foi possível observar que os amastigotas continuavam preservados estruturalmente e um grande tráfego de vesículas e corpos lipídicos para o fagossomo (Figuras 9E-F). No período final de infecção (144 h), notou-se poucos amastigotas e frequentemente uma desorganização citoplasmática com membrana perturbada indicando um possível estágio degenerativo (Figuras 9G-H).



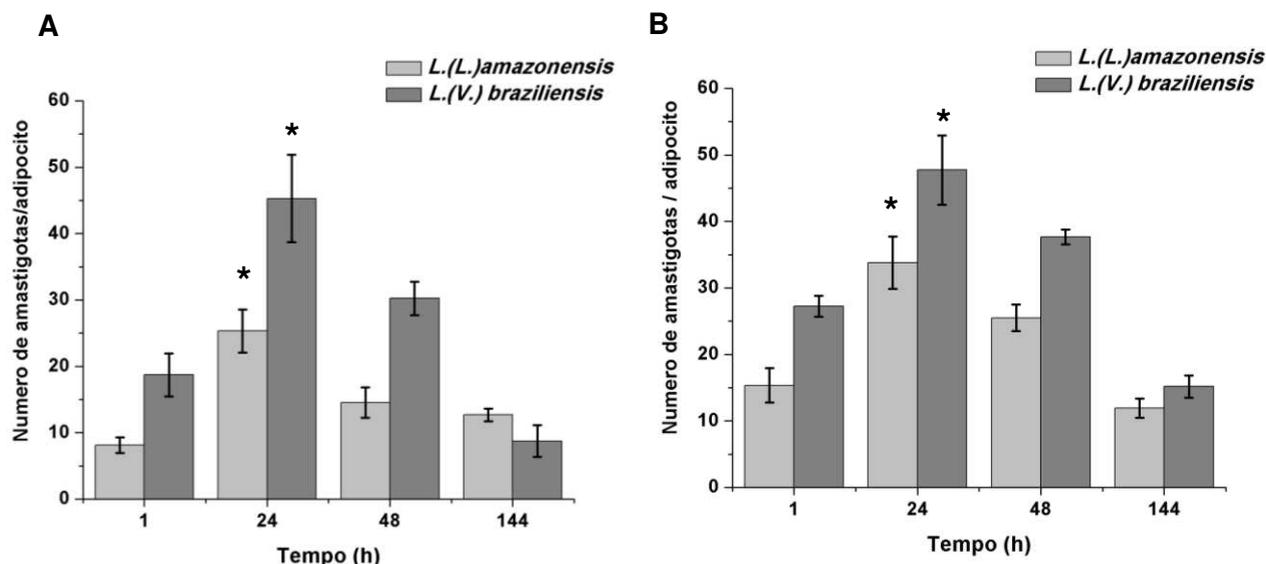




**Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de infecções adipocíticas com *L. (L.) amazonensis* em diferentes estágios. (A-B)** Interação flagelar de promastigotas em culturas de adipócitos após 1 h. **(C-D)** Amastigotas com grande inclusão lipídica (I) compartilhando um vacúolo expandido (V) próximo ao núcleo da célula hospedeira após 24 h. **(E-F)** Amastigotas envolto por um vacúolo parasitóforo (V) após 48 h. **(G-H)** Amastigota dentro de um vacúolo em degeneração após 144 h. Organelas celulares são facilmente reconhecíveis e preservadas nas figuras (A-F). Membrana citoplasmática do amastigota levemente perturbada nas figuras (G-H). Letras indicam: N, núcleo; M, mitocôndria; FL, flagelo; BF, bolsa flagelar; I, inclusão lipídica; V, vacúolo parasitóforo. A seta indica para o cinetoplasto, K. Barras: A, 5  $\mu$ m; B, C, D, E, F e G, 2  $\mu$ m; H, 1  $\mu$ m.

#### 4.5. Cinética da infecção com promastigotas e amastigotas de *Leishmania spp.*

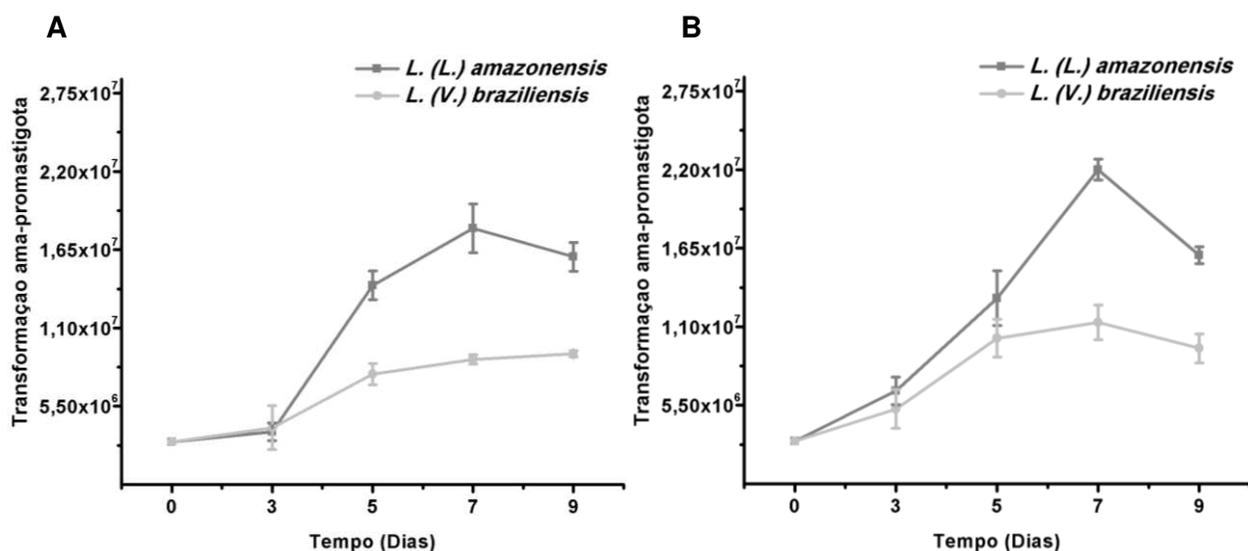
A cinética das infecções *in vitro* foi avaliada para os tempos de 1, 24, 48 e 144 h (MOI=20) para as formas de vida infectante de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Após cada período, as lâminas foram coradas com Oil-Red O e Giemsa, e seguidas para contagem do número adipócitos infectados com amastigotas. Na figura 10, o índice de infectividade de *Leishmania* em adipócitos foi determinado pelo número de parasitos a cada 100 adipócitos infectados previamente com promastigotas (A) ou amastigotas (B) (MOI=20). Foi possível observar um aumento na quantidade de amastigotas em relação às primeiras horas para ambas espécies de *Leishmania* e tipos de infecção.



**Figura 10: Infectividade *in vitro* de *Leishmania spp.* em adipócitos.** A Cinética da infecção foi determinada a partir da contagem do número de amastigotas por 100 adipócitos. Este infectado previamente com promastigotas (A) ou amastigotas (B) nos tempos de 1, 24, 48 e 144 h. As barras cinzas demonstram a média do números de parasitos intracelulares por adipócito  $\pm$  desvio padrão. Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes em triplicata, com contagem de 300 adipócitos por condição. Os asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nas infecções em relação ao tempo de 1 h.

#### 4.6. Viabilidade dos amastigotas intracelulares

Amastigotas purificados de infecções após 144 h foram semeados em placas de 96 poços em meio de cultivo para promastigota, como descrito previamente, e acompanhados durante 9 dias (Figura 11). O ensaio permitiu avaliar não somente a habilidade dos parasitos recuperados em sobreviver dentro de adipócitos. No 3º dia foi possível observar a transformação das formas amastigotas para promastigotas. Já no 5º dia, as formas flageladas seguiram um crescimento exponencial até o 7/8º dia de cultivo, alcançando a fase estacionária próximo ao dia 9.



**Figura 11: Viabilidade dos parasitos intracelulares de adipócitos infectados previamente com promastigotas (A) e amastigotas (B).** Amastigotas recuperados de infecções após 144 h seguiram para avaliação da capacidade de diferenciação e viabilidade em meio de promastigota. No 3º dia foi observada transformação amastigota para promastigota a partir do 5º dia verificou-se crescimento exponencial, até atingirem fase estacionária próximo 7º dia. As contagens representam a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.

## 5. Discussão

As leishmanioses integram um conjunto de manifestações clínicas pouco compreendidas, com terapia limitada e afetam principalmente populações de países em desenvolvimento<sup>2</sup>. De maneira particular, falhas terapêuticas e recidivas são frequentemente reportadas<sup>60-62</sup>. No Brasil, pelo menos 40% dos casos de leishmaniose tegumentar tratados com a droga de primeira escolha, o antimoníaco de meglumina, resultam em ausência de resposta clínica, quadro estável ou evolução da lesão com recidiva<sup>63-65</sup>. Nos casos de leishmaniose disseminada, as falhas terapêuticas são ainda mais expressivas, chegando em média a 90% de insucesso no tratamento<sup>66</sup>. Diversos fatores têm sido relacionados com a cronicidade da doença, tais como o estado imunológico, coinfeções com HIV, susceptibilidade, idade e estado nutricional do hospedeiro, carga parasitária, virulência da espécie e ainda órgãos e tecidos atingidos pelos parasitos<sup>2,67</sup>. Nesta direção, os estudos de diferentes sítios não habituais do parasito como apresentados na Tabela 1 e realizado neste trabalho tem elevado potencial para auxiliar no entendimento do percurso da infecção e parte das reflexões acerca da refratariedade das leishmanioses.

Os adipócitos constituem em sua maior parte o tecido adiposo, que funciona como um órgão altamente dinâmico, além de possuir a maior reserva energética do organismo. Outros tripanosomatídeos como *T. brucei* e *T. cruzi* foram reportados associando-se a esse tipo celular<sup>40,41</sup>. Além disso, o tecido adiposo distribui-se por todo o corpo preenchendo os espaços

intersticiais. Estes achados abrem caminhos para investigar se células adiposas representam um ambiente adequado para outros protozoários. Por exemplo, é possível que em algum momento no curso da infecção, *Leishmania* spp. possam se hospedar em adipócitos. Em consequência disso, a compreensão da interação parasito-adipócito pode ser decisiva para o tratamento dessa parasitose de comportamento proliferativo ou controlado.

Neste presente estudo, investigou-se a capacidade *in vitro* de adipócitos diferenciados de células 3T3-L1 (derivadas de embrião de camundongo SWISS) interagirem e albergarem *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Para isso, inicialmente foi desenvolvido um protocolo de diferenciação celular de 3T3-L1 em adipócitos como modelo celular. A partir desse protocolo, obtiveram-se adipócitos após 14 dias de cultivo, com morfologia e características intrínsecas deste tipo celular, como gotículas lipídicas no citoplasma. Uma vez concluído o processo de diferenciação, essas células foram incubadas com ambas formas de vida infectivas dos parasitos de *Leishmania*, promastigotas e amastigotas, numa proporção de 20 parasitos para 1 adipócito. As infecções após 24 e 48 h de contato entre parasito e a célula hospedeira demonstraram a internalização do parasito a partir da coloração combinatória de Oil-red O e Giemsa. Os resultados confirmaram a habilidade dos promastigotas de ambas espécies de *Leishmania* de infectar e diferenciar em amastigotas quando em contato com adipócitos. Previamente ao desenvolvimento de adipócitos maduros, durante a diferenciação celular, ocorre a formação de pré-adipócitos. A avaliação da capacidade infectiva com as formas de vida de ambas espécies de *Leishmania* spp. também demonstrou que pré-adipócitos são permissivos ao parasito. Com a finalidade de comprovar se realmente os parasitos eram internalizados pelos adipócitos e sua localização citoplasmática, foi utilizada a microscopia de fluorescência como segunda metodologia. Nestes ensaios, pré-adipócitos e adipócitos infectados com promastigotas de *Leishmania* foram corados com Bodipy (493/503) e DAPI para revelar a presença de gotículas lipídicas contendo óleos e lipídios não polares e núcleos celulares respectivamente. A sobreposição das imagens obtidas pelo *software ImageJ* mostrou vários parasitos no citoplasma da célula hospedeira, ao redor, e não dentro das gotículas de lipídios.

Na tentativa de analisar ultraestruturalmente a cultura em monocamada e caracterizar morfologicamente a infecção de adipócitos por *L. (L.) amazonensis*, foi utilizada a microscopia eletrônica de transmissão. Nos tempos iniciais de infecção foi possível visualizar promastigotas interagindo com adipócitos. Após o estabelecimento da infecção e a diferenciação celular foi possível encontrar amastigotas compartilhando o vacúolo e com suas estruturas celulares totalmente preservadas como núcleo, bolsa flagelar, cinetoplasto e membrana plasmática. A maioria dos amastigotas continuou íntegra nas 48 h posteriores. A partir de 144 h era notável que os amastigotas possuíam uma pequena desorganização celular, resultado de um possível estágio degenerativo.

Quando as infecções de pré-adipócitos e adipócitos foram coradas com Oil red-O e Giemsa foi evidenciada a formação de grandes vacúolos para *L. (L.) amazonensis*. Estes achados impulsionaram a análise do pH do vacúolo parasitóforo, pois poderia ser similar ao encontrado em fagócitos profissionais em torno de pH 4,7-5,2<sup>68</sup>. Para esse fim, o corante fluorescente vermelho LysoTracker™ Red DND-99 foi empregado para revelar a acidez do vacúolo. Em adipócitos infectados com *L. (L.) amazonensis* nos tempos 24 e 48 h, verificou-se a formação de grandes vacúolos que foram marcados com fluoróforo vermelho. Este achado corrobora com composição ácida de vacúolos parasitóforos mostrados em vermelho. A marcação com DAPI e Bodipy possibilitou a visualização de DNA e corpos lipídicos, respectivamente. A sobreposição das fotomicrografias obtidas ilustram a infecção por *L. (L.) amazonensis* em adipócitos. Os vacúolos aqui evidenciados apresentam um perfil de acidez similar ao caracterizado no trabalho desenvolvido por Antonie et al<sup>69</sup> que demonstraram a sobrevivência dos parasitos em condições ácidas de pH em macrófagos e também de acordo com o trabalho de Arango, que mostrou o parasito em vacúolos parasitóforos de caráter ácido em células musculares<sup>33</sup>.

Existem evidências de que este ambiente com alta quantidade de prótons é adequado para o desenvolvimento, diferenciação e nutrição dos protozoários, principalmente para forma amastigota, uma vez que seus sistemas de captação de aminoácidos, glicose, poliaminas e nucleotídeos são metabolicamente mais ativos nessas condições<sup>70</sup>. De fato, os protocolos de diferenciação *in vitro* desenvolvidos e utilizados em muitos laboratórios consistem, basicamente, em cultivar os promastigotas em meios ácidos e ricos em soro fetal bovino que mimetizam o ambiente privilegiado dos vacúolos e que favorecem a atividade dos transportadores presentes nas membranas celulares. Confirmando a presença do parasito no modelo celular estabelecido fez-se pensar que os adipócitos poderiam sustentar a infecção por *Leishmania* spp. Tendo isso em mente, esboçaram-se critérios para avaliar o perfil da infecção. Para isso, foram considerados os tempos: 1 h (após 4 h incubados com ambas formas de vida parasitária) com o intuito de examinar se parasitos seriam internalizados e, principalmente, se os adipócitos seriam permissivos a ambas formas de vida parasitária; 24, 48 e 144 h, a cinética da infecção nesses tempos revelaria a capacidade de sobrevivência dos parasitos nesse novo compartimento até antes pouco explorado. Um crescimento exponencial no número de amastigotas indicaria que o ambiente dos adipócitos forneceria condições apropriadas para o desenvolvimento do parasito, se o contrário fosse observado o adipócito não forneceria condições apropriadas para sobrevivência do parasito, ou ainda, se o número de parasitos se mantivesse basal, poderia se sugerir um quadro de persistência do parasito. Inicialmente, foi observado um padrão de crescimento semelhante para as duas espécies; isto é, nas primeiras 24 h, houve um número crescente de parasitos intracelulares proveniente de ambas formas de vida infectivas do parasito.

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* demonstraram ser ~70% mais infectivos do que *L. (V.) braziliensis* nas primeiras horas de contato com os adipócitos. Nos tempos seguintes foi verificada uma queda acentuada na população de parasitos intracelulares. Declínios de 42,5 e 33,2% foram observados nos tempos de 48 h em relação às 24 h para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente. No final da infecção (144 h), ocorreu aumento de 56,4% para *L. (L.) amazonensis* e redução de 53,4% para *L. (V.) braziliensis* no número de parasitos em relação ao tempo de 1 h. Para infecções com amastigotas, a cinética observada não foi muito diferente daquele notado com promastigotas (Fig. 10B). Houve aumento de 120 e 75% no número de amastigotas para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* nas primeiras 24h. Foi observado um declínio na proliferação dos parasitos. Uma redução de 24,5 e 53,7% foi apresentada nos tempos 48 e 144 h para *L. (L.) amazonensis*. Igualmente, uma diminuição de 21 e 60% na população de amastigotas foi observada para *L. (V.) braziliensis*. Finalmente, quando comparados os números de parasitos no tempo final de infecção (144 h) com a primeira hora de infecção (1 h), observou-se redução de 22,2 e 44,3% para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, respectivamente, sendo esse valor estatisticamente significativo apenas para *L. (V.) braziliensis*. A partir dos dados apresentados podemos concluir que o adipócito confere um local menos hostil para *Leishmania*, fator que poderíamos especular como relevante para contribuir para a persistência da doença de forma que promastigotas diferenciem-se em amastigotas, multipliquem-se e se mantenham em pequenas populações por até 144h.

O processo de investigação de novos sítios que alberguem o parasito consiste em avaliar não somente a viabilidade após residir em novos compartimentos, mas também a capacidade da alternância das formas de vida, que resultem no sucesso evolutivo na vida parasitária. Portanto, foi avaliada a viabilidade e capacidade dos amastigotas em diferenciar em promastigotas depois de serem internalizados pelos adipócitos. O desenvolvimento celular envolve mudanças morfológicas, funcionais e diferentes expressões de proteínas<sup>16</sup>. Portanto, os amastigotas recuperados das infecções realizadas com promastigotas ou amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* estavam viáveis após 144 h. Os parasitos intracelulares diferenciaram-se em formas flageladas, reproduziram-se assexuadamente e atingiram a máxima expansão celular como observado na literatura através da curva de crescimento. O perfil dessa curva apresentou duas fases distintas. A primeira fase de crescimento exponencial da cultura, chamada de logarítmica, do 3º ao 6º dia e, por fim, a segunda fase, chamada de estacionária onde predominam formas metacíclicas, ou seja, as formas infectantes para hospedeiros mamíferos a partir do 7º dia de cultivo celular.

Os resultados corroboram os achados de Allahverdiyev et al<sup>25</sup> e revelam, pela primeira vez, a cinética e caracterização morfológica da infecção de adipócitos por *Leishmania* spp. Além disso, foi o primeiro relato na literatura a demonstrar a infecção adipocítica experimental com

duas espécies do Novo mundo, já que Allahverdiyev et al <sup>25</sup> utilizaram espécies do Velho mundo em seus ensaios. O processo de infecção para ambas as espécies estudadas é similar, com diferenças na carga parasitária que provavelmente se deram pelas interações específicas parasito-célula hospedeira que podem resultar, por exemplo, da diversidade presente na superfície da membrana celular dos parasitos. Algumas proteínas conhecidas como SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) apresentam um papel importante para a fusão, entre outro conjunto de proteínas também atuam em sincronia para permitir a entrada e infecção <sup>71</sup>.

Apesar de deixar claro a capacidade de *Leishmania* spp. infectar e persistir adipócitos (3T3-L1) *in vitro*, o mecanismo como ocorre deve ser investigado e melhor elucidado. Por meio das infecções já caracterizadas na literatura, os parasitos devem ser capazes de utilizar mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro e estabelecer um ambiente favorável para manutenção da vida parasitária. Em macrófagos, por exemplo, a suscetibilidade ou resistência a *Leishmania* spp. pode estar relacionada ao tipo de ativação por linfócitos T. A ativação por linfócitos Th2 e citocinas IL-4/IL-13 e IL-10 resultam na suscetibilidade e persistência a infecção. A resistência ao parasito ocorre a partir da ativação de linfócitos Th1 com IFN- $\gamma$  e citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-18) que levam ao aumento da expressão da óxido nítrico sintase com elevada produção de espécies reativas de oxigênio resultando numa ação leishmanicida <sup>22,72</sup>. Por outro lado, quando células não estritamente fagocíticas como fibroblastos infectados por *L. major* apresentou baixa capacidade de produzir NO e conseqüentemente fracamente podem controlar a infecção <sup>24</sup>. Os estudos envolvendo a compreensão dos mecanismos de infecção de *Leishmania* spp. em adipócitos podem revelar informações valiosas. A exploração de adipócitos como alvos seguros para infecções por *Leishmania* spp. pode, por sua vez, justificar as falhas da quimioterapia disponíveis para os casos de leishmanioses, assim como estudos *in vivo* para corroborar os achados *in vitro* do presente estudo.

## 6. Conclusão

Neste estudo foi possível avaliar a permissividade de adipócitos e pré-adipócitos *in vitro* de linhagem 3T3-L1 aos parasitos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

- Foram estabelecidas culturas de adipócitos (3T3-L1), assim como se padronizou um protocolo ideal de fixação e coloração para as infecções por *Leishmania*;
- Adipócitos e pré-adipócitos demonstraram ser permissivos à infecção mediante promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* por até 144 h;
- *L. (L.) amazonensis* leva à formação de vacúolos parasitóforos com pH ácido em adipócitos;
- Adipócitos desenvolveram um perfil de controlar a infecção, mantendo quantidades de amastigotas equivalentes nas primeiras horas de infecção;
- Parasitos recuperados após 144 h de infecção estavam viáveis;
- Adipócitos podem representar sítios de persistência parasitológica.

## 7. Referências

- 1 The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Vol. 1. Biology and Epidemiology. Ed. W. Peters and R. Killick-Kendrick. 550 pages plus index. ISBN 0 12 552101 4. Academic Press, London, 1987. £69.00. *Parasitology* **96**, 642-642, doi:10.1017/S0031182000080264 (1988).
- 2 Burza, S., Croft, S. L. & Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **392**, 951-970, doi:10.1016/s0140-6736(18)31204-2 (2018).
- 3 (OPS/OMS), O. P.-A. d. s. Informe Epidemiológico das Américas. *Informe de Leishmanioses Nº 7* (2019).
- 4 Reithinger, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **7**, 581-596, doi:10.1016/s1473-3099(07)70209-8 (2007).
- 5 Sacks, D. & Kamhawi, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* **55**, 453-483, doi:10.1146/annurev.micro.55.1.453 (2001).
- 6 Mitra, B. *et al.* Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *The Journal of experimental medicine* **210**, 401-416, doi:10.1084/jem.20121368 (2013).
- 7 Real, F. *et al.* Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cellular microbiology* **16**, 1549-1564, doi:10.1111/cmi.12311 (2014).
- 8 Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet* **366**, 1561-1577, doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5 (2005).
- 9 Freitas-Junior, L. H., Chatelain, E., Kim, H. A. & Siqueira-Neto, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2**, 11-19, doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003 (2012).
- 10 Sundar, S. & Chakravarty, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* **14**, 53-63, doi:10.1517/14656566.2013.755515 (2013).
- 11 Uliana, S. R. B., Trinconi, C. T. & Coelho, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology* **145**, 464-480, doi:10.1017/s0031182016002523 (2018).
- 12 Atia, A. M. *et al.* Sodium stibogluconate and paromomycin for treating visceral leishmaniasis under routine conditions in eastern Sudan. *Trop Med Int Health* **20**, 1674-1684, doi:10.1111/tmi.12603 (2015).
- 13 Alcantara, L. M., Ferreira, T. C. S., Gadelha, F. R. & Miguel, D. C. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **8**, 430-439, doi:10.1016/j.ijpddr.2018.09.006 (2018).
- 14 Handman, E. & Bullen, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology* **18**, 332-334, doi:https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8 (2002).
- 15 Ueno, N. & Wilson, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in parasitology* **28**, 335-344, doi:10.1016/j.pt.2012.05.002 (2012).
- 16 McConville, M. J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V. A. & Naderer, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol* **23**, 368-375, doi:10.1016/j.pt.2007.06.009 (2007).
- 17 Barratt, G., Saint-Pierre-Chazalet, M. & Loiseau, P. M. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Curr Drug Metab* **10**, 247-255 (2009).
- 18 Naderer, T. *et al.* Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the

- gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5502-5507, doi:10.1073/pnas.0509196103 (2006).
- 19 Simon, M. W., Martin, E. & Mukkada, A. J. Evidence for a functional glyoxylate cycle in the leishmaniae. *J Bacteriol* **135**, 895-899 (1978).
- 20 Iniesta, V. *et al.* Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infection and immunity* **73**, 6085-6090, doi:10.1128/IAI.73.9.6085-6090.2005 (2005).
- 21 Acuna, S. M. *et al.* Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS One* **12**, e0187186, doi:10.1371/journal.pone.0187186 (2017).
- 22 Wanasen, N. & Soong, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol Res* **41**, 15-25, doi:10.1007/s12026-007-8012-y (2008).
- 23 Rittig, M. G. & Bogdan, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* **16**, 292-297 (2000).
- 24 Bogdan, C. *et al.* Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med* **191**, 2121-2130, doi:10.1084/jem.191.12.2121 (2000).
- 25 Allahverdiyev, A. M. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a new host cell in latent leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **85**, 535-539, doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0037 (2011).
- 26 Conceicao-Silva, F. & Morgado, F. N. *Leishmania* Spp-Host Interaction: There Is Always an Onset, but Is There an End? *Front Cell Infect Microbiol* **9**, 330, doi:10.3389/fcimb.2019.00330 (2019).
- 27 Belle, E. A. Cultivation of *Leishmania donovani* in human amnion epithelial cell tissue cultures: a preliminary report. *Can Med Assoc J* **79**, 726-728 (1958).
- 28 Frothingham, T. E. & Lehtimaki, E. *Leishmania* in primary cultures of human amniotic cells. *Am J Trop Med Hyg* **16**, 658-664, doi:10.4269/ajtmh.1967.16.658 (1967).
- 29 Chang, K. P. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes, and their intracellular transformation. *Am J Trop Med Hyg* **27**, 1084-1096, doi:10.4269/ajtmh.1978.27.1084 (1978).
- 30 Dedet, J. P., Ryter, A., Vogt, E., Hosli, P. & da Silva, L. P. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. *Ann Trop Med Parasitol* **77**, 35-44, doi:10.1080/00034983.1983.11811670 (1983).
- 31 Hespanhol, R. C., de Nazare, C. S. M., Meuser, M. B., de Nazareth, S. L. M. M. & Corte-Real, S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J Histochem Cytochem* **53**, 35-44, doi:10.1177/002215540505300105 (2005).
- 32 Pessotti, J. H., Zaverucha Do Valle, T., Corte-Real, S. & Goncalves Da Costa, S. C. Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the Vero cell line. *Parasite* **11**, 99-102 (2004).
- 33 ARANGO, N. F. CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS POR *Leishmania (L.) amazonensis*, Universidade de São Paulo, (2016).
- 34 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359, doi:10.1152/physrev.00015.2003 (2004).
- 35 Giralt, M. & Villarroya, F. White, Brown, Beige/Brite: Different Adipose Cells for Different Functions? *Endocrinology* **154**, 2992-3000, doi:10.1210/en.2013-1403 %J Endocrinology (2013).
- 36 Kajimura, S., Spiegelman, B. M. & Seale, P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab* **22**, 546-559, doi:10.1016/j.cmet.2015.09.007 (2015).

- 37 Ahima, R. S. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 327-332 (2000).
- 38 Desruisseaux, M. S., Nagajyothi, Trujillo, M. E., Tanowitz, H. B. & Scherer, P. E. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun* **75**, 1066-1078, doi:10.1128/iai.01455-06 (2007).
- 39 Hegde, V. & Dhurandhar, N. V. Microbes and obesity--interrelationship between infection, adipose tissue and the immune system. *Clin Microbiol Infect* **19**, 314-320, doi:10.1111/1469-0691.12157 (2013).
- 40 Trindade, S. *et al.* *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* **19**, 837-848, doi:10.1016/j.chom.2016.05.002 (2016).
- 41 Shoemaker, J. P., Hoffman, R. V. & Huffman, D. G. *Trypanosoma cruzi*: Preference for brown adipose tissue in mice by the Tulahuen strain. *Experimental Parasitology* **27**, 403-407, doi:https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90045-7 (1970).
- 42 Nagajyothi, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e953, doi:10.1371/journal.pntd.0000953 (2011).
- 43 Caradonna, K. L., Engel, J. C., Jacobi, D., Lee, C.-H. & Burleigh, B. A. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell host & microbe* **13**, 108-117, doi:10.1016/j.chom.2012.11.011 (2013).
- 44 Tanowitz, H. B., Scherer, P. E., Mota, M. M. & Figueiredo, L. M. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? *Trends Parasitol* **33**, 276-284, doi:10.1016/j.pt.2016.11.008 (2017).
- 45 Ferreira, A. V. *et al.* Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect* **13**, 1002-1005, doi:10.1016/j.micinf.2011.06.002 (2011).
- 46 Reiner, N. E. & Malemud, C. J. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (Donovani): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. *Cell Immunol* **88**, 501-510 (1984).
- 47 Bhattacharjee, A. *et al.* *Leishmania donovani*-Induced Prostaglandin E2 Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2-Cytosolic Phospholipase A2 Signaling. *Infection and immunity* **84**, 2963-2973, doi:10.1128/IAI.00528-16 (2016).
- 48 Chan, M. M., Adapala, N. & Chen, C. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ -Mediated Polarization of Macrophages in Leishmania Infection. *PPAR research* **2012**, 796235-796235, doi:10.1155/2012/796235 (2012).
- 49 Rodriguez, N. E. *et al.* Lipid bodies accumulation in Leishmania infantum-infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunol* **39**, doi:10.1111/pim.12443 (2017).
- 50 Kershaw, E. E. & Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 2548-2556, doi:10.1210/jc.2004-0395 (2004).
- 51 Sorisky, A. From preadipocyte to adipocyte: differentiation-directed signals of insulin from the cell surface to the nucleus. *Crit Rev Clin Lab Sci* **36**, 1-34, doi:10.1080/10408369991239169 (1999).
- 52 Ntambi, J. M. & Young-Cheul, K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **130**, 3122s-3126s, doi:10.1093/jn/130.12.3122S (2000).
- 53 Farmer, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* **4**, 263-273, doi:10.1016/j.cmet.2006.07.001 (2006).
- 54 Lefterova, M. I., Haakonsson, A. K., Lazar, M. A. & Mandrup, S. PPAR $\gamma$  and the global map of adipogenesis and beyond. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 293-302, doi:10.1016/j.tem.2014.04.001 (2014).
- 55 Petersen, R. K. *et al.* Cyclic AMP (cAMP)-mediated stimulation of adipocyte differentiation

- requires the synergistic action of Epac- and cAMP-dependent protein kinase-dependent processes. *Mol Cell Biol* **28**, 3804-3816, doi:10.1128/mcb.00709-07 (2008).
- 56 Lin, F. T. & Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8757-8761 (1994).
- 57 Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E. & Lane, M. D. CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2593-2597 (1991).
- 58 Madsen, M. S., Siersbaek, R., Boergesen, M., Nielsen, R. & Mandrup, S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBPalpha synergistically activate key metabolic adipocyte genes by assisted loading. *Mol Cell Biol* **34**, 939-954, doi:10.1128/mcb.01344-13 (2014).
- 59 Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M. & Brandsch, M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* **425**, 88-90, doi:10.1016/j.ab.2012.03.005 (2012).
- 60 Castro, M. D. M., Cossio, A., Velasco, C. & Osorio, L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005515, doi:10.1371/journal.pntd.0005515 (2017).
- 61 Vieira-Gonçalves, R. *et al.* First report of treatment failure in a patient with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania* (Viannia) *naiffi* carrying *Leishmania* RNA virus: a fortuitous combination? %J *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **52** (2019).
- 62 Showler, A. J. & Boggild, A. K. Cutaneous leishmaniasis in travellers: a focus on epidemiology and treatment in 2015. *Curr Infect Dis Rep* **17**, 489, doi:10.1007/s11908-015-0489-2 (2015).
- 63 Deps, P. D., Viana, M. C., Falqueto, A. & Dietze, R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada %J *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **33**, 535-543 (2000).
- 64 Rodrigues, A. M., Hueb, M., Santos, T. A. R. R. d. & Fontes, C. J. F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina %J *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **39**, 139-145 (2006).
- 65 Machado, P. R. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e912, doi:10.1371/journal.pntd.0000912 (2010).
- 66 Guimaraes, L. H. *et al.* Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **103**, 712-715, doi:10.1016/j.trstmh.2009.04.019 (2009).
- 67 Handman, E., Elso, C. & Foote, S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. *Adv Parasitol* **59**, 1-75, doi:10.1016/s0065-308x(05)59001-8 (2005).
- 68 Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C. & Bongrand, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **58**, 779-787 (1990).
- 69 Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T. & Courret, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* **6**, 392-401, doi:10.1016/s0966-842x(98)01324-9 (1998).
- 70 Burchmore, R. J. & Barrett, M. P. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* **31**, 1311-1320, doi:10.1016/s0020-7519(01)00259-4 (2001).
- 71 Matte, C. & Descoteaux, A. Exploitation of the Host Cell Membrane Fusion Machinery by *Leishmania* Is Part of the Infection Process. *PLoS pathogens* **12**, e1005962-e1005962,

doi:10.1371/journal.ppat.1005962 (2016).

72 Alexander, J. & Bryson, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm.

## 8. Anexos

## A. Resumo de artigo científico publicado durante o período acadêmico

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 226 (2019) 108612



Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)

## Potential use of 13-mer peptides based on phospholipase and oligoarginine as leishmanicidal agents

Bruno Mendes<sup>a</sup>, José R. Almeida<sup>b</sup>, Nuno Vale<sup>c,d</sup>, Paula Gomes<sup>e</sup>, Fernanda R. Gadelha<sup>f</sup>, Saulo L. Da Silva<sup>g</sup>, Danilo C. Miguel<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil<sup>b</sup> Universidad Regional Amazónica Ikiam, Km 7 Via Muyuna, Tena, Napo, Ecuador<sup>c</sup> Laboratório de Farmacologia, Departamento de Ciências do Medicamento, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal<sup>d</sup> IPATIMUP/Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S), Universidade do Porto, Portugal<sup>e</sup> LAQV/REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal<sup>f</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil<sup>g</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Cuenca, Azuay, Ecuador

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Leishmanicidal activity  
Oligoarginine  
Peptide  
Phospholipase

## ABSTRACT

Phospholipase A<sub>2</sub> toxins present in snake venoms interact with biological membranes and serve as structural models for the design of small peptides with anticancer, antibacterial and antiparasitic properties. Oligoarginine peptides are capable of increasing cell membrane permeability (cell penetrating peptides), and for this reason are interesting delivery systems for compounds of pharmacological interest. Inspired by these two families of bioactive molecules, we have synthesized two 13-mer peptides as potential antileishmanial leads gaining insights into structural features useful for the future design of more potent peptides. The peptides included p-Acl, reproducing a natural segment of a Lys49 PLA<sub>2</sub> from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom, and its p-AclR7 analogue where all seven lysine residues were replaced by arginines. Both peptides were active against promastigote and amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum*, while displaying low cytotoxicity for primary murine macrophages. Spectrofluorimetric studies suggest that permeabilization of the parasite's cell membrane is the probable mechanism of action of these biomolecules. Relevantly, the engineered peptide p-AclR7 was more active in both life stages of *Leishmania* and induced higher rates of ethidium bromide incorporation than its native template p-Acl. Taken together, the results suggest that short peptides based on phospholipase toxins are potential scaffolds for development of antileishmanial candidates. Moreover, specific amino acid substitutions, such those herein employed, may enhance the antiparasitic action of these cationic peptides, encouraging their future biomedical applications.

## B. Cópia da aprovação do comitê de ética para o uso de animais




---

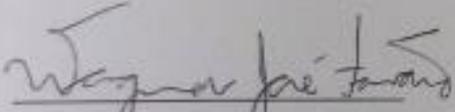
**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada Adipócitos como células hospedeiras de Leishmania spp.: Infecção transitória ou estratégia para a persistência parasitária?, registrada com o nº **4951-1/2018**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Danilo Ciccone Miquel e Bruno Mendes, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **13 de setembro de 2018**.

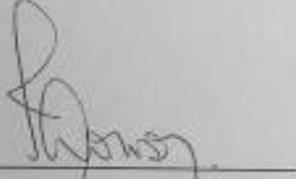
Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/03/2018-24/03/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	13/09/2018-24/03/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / BALB/cAnUnib
No. de animais:	15
Idade/Peso:	04 semanas / 23g
Sexo:	fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 13 de setembro de 2018.



Prof. Dr. Wagner José Favaro  
Coordenador



Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Prestar atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação do relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## C. Declaração de direitos autorais

### Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada ADIPÓCITOS COMO CÉLULAS HOSPEDEIRAS DE LEISHMANIA SPP.: INFECÇÃO TRANSITÓRIA OU ESTRATÉGIA PARA A PERSISTÊNCIA PARASITÁRIA?, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de janeiro de 2020

Assinatura : BRUNO MENDES  
Nome do(a) autor(a): **Bruno Mendes**  
RG n.º 467620519

Assinatura : *Danilo Ciccone Miguel*  
Nome do(a) orientador(a): Danilo Ciccone Miguel  
RG n.º 27895647-6

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti  
Coordenadora CCPG-Biologia Animal/IB  
Matr. 26416-9