NATALIA FIESCO ARANGO

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS POR *Leishmania (L.) amazonensis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Da Relação Parasito-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

NATALIA FIESCO ARANGO

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS POR *Leishmania (L.) amazonensis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Da Relação Parasito-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fiesco Arango, Natalia
CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS POR *Leishmania (L.) amazonensis*. /
Natalia Fiesco Arango; orientador Mauro Javier
Cortez Veliz. -- São Paulo, 2016.
101 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Mioblastos. 2. Miotubos. 3. Resposta imune.
4. Vacuolo parasitóforo. 5. Músculo esquelético. I.
Cortez Veliz, Mauro Javier , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Natalia Fiesco Arango.

Título de Dissertação: Caracterização da infecção de células musculares esqueléticas
por *Leishmania (L.) amazonensis*.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Javier Cortez Veliz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão
pública realizada a ____ / ____ / ____, considerou

() Aprovado (a)

() Reprovado (a)

Examinador (a):

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador (a):

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Presidente (a):

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

APROVAÇÃO COMITE DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05308-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **30** nas fls. **17** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Mauro Javier Cortez Veliz**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo do processo de infecção de células musculares por Leishmania (L.) amazonensis*" do qual participam o(s) aluno(s) **Natalia Fiesco Arango**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **25.03.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 27 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me trouxe até onde eu estou hoje, a meu amado esposo, porque sempre foi ele quem me deu seu apoio e fortaleza nos momentos difíceis, e aos meus pais que graças à formação que recebi deles agora estou cumprindo meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Meu principal agradecimento é para Deus, porque é Ele quem permite todas as coisas acontecerem na minha vida. Agradeço aos meus pais pelo apoio constante para eu realizar meus sonhos apesar de ter saído do país e não poder ficar mais perto deles. Também agradeço ao meu amado esposo, que me tem acompanhado desde o começo neste caminho da formação profissional, e que esteve comigo nos momentos de felicidade e também de tristeza e frustração por causa das coisas que não derem certo e ficar sempre com interesse por minhas coisas.

Quero também agradecer aos meus companheiros de laboratório Natalia Soares, Lina Borda e especialmente Ismael Sauter, pelo apoio, e ajuda durante estes dois anos, sem suas dicas e explicações meu mestrado não poderia ter sido possível.

Obrigada também a todas as pessoas que participaram de algum jeito na realização do meu projeto como a professora Noemi e a técnica Gislene do Instituto Adolfo Lutz que me ajudaram muito com as técnicas histológicas, e as pessoas de outros laboratórios do departamento que me permitiram o uso dos seus equipamentos.

Obrigada ao professor Mauro Cortez por ter me aceitado como sua aluna de mestrado. Obrigada pela ajuda no trabalho e pela dedicação para a realização dos experimentos.

Ao CNPq que financiou meu mestrado e me permitiu permanecer no Brasil.

“Somente seja forte e muito corajoso! Tenha o cuidado de obedecer a toda a lei que o meu servo Moisés lhe ordenou; não se desvie dela, nem para a direita nem para a esquerda, para que você seja bem-sucedido por onde quer que andar”.

Josué 1:7 Nova Versão Internacional (NVI-PT)

RESUMO

Fiesco N. Caracterização da infecção de células musculares esqueléticas por *Leishmania (L.) amazonensis*. [Dissertação (Mestre em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* com três manifestações clínicas principais: cutânea, mucocutânea e visceral. No Brasil, a leishmaniose é um importante problema de saúde pública pela alta incidência. O ciclo de vida da *Leishmania* envolve dois estágios principais de desenvolvimento, o promastigota que está presente no vetor, e o amastigota que é intracelular obrigatório do hospedeiro vertebrado. Este protozoário apresenta um alto grau de promiscuidade em quanto ao tipo de célula hospedeira, já que consegue infectar várias células do sistema imune como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, e também células não fagocíticas profissionais. Além disso, *Leishmania* pode infectar fibras musculares, como tem sido reportado em trabalhos prévios por meio de análises histológicas. Porém, as características da infecção por *Leishmania* no músculo têm sido pouco estudadas, o que permitiria estabelecer a importância destas células durante a infecção. O objetivo deste projeto foi avaliar as características biológicas da infecção por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em células musculares esqueléticas (SkMCs). Para atingir isso, camundongos C57BL/6 e BALB/c foram infectados nas patas traseiras, o musculo *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) foi extraído e processado para coloração com hematoxilina/eosina ou imunohistoquímica. Culturas de SkMCs como mioblastos e miotubos foram infectadas com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* por 72h. As infecções foram caracterizadas por meio de imunofluorescência indireta e microscopia confocal. As culturas de SkMCs foram caracterizadas e padronizadas por médio das proteínas Caveolina-1 e Caveolina-3, também foi medido o Ph dos vacúolos parasitóforos de mioblastos e miotubos com laranja de acridina (AO). Adicionalmente, culturas de SkMCs como miotubos foram pré-tratadas com Streptolisina O (SLO) e/ou infectadas com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* por 72h, com o intuito de esclarecer como ocorre a entrada do parasito nas células musculares. Neste caso foi avaliada a produção de IL-1 β , IL-6, IL-10 e NO. Além disso, foi quantificado o mRNA de *IL-1 β* , *IL-6*, *iNOS*, *Ama2*, *UbH* e *Lyst*. A infecção de células mostrou que *L. (L.) amazonensis* consegue infectar as fibras musculares *in vivo*, e também as células musculares esqueléticas (mioblastos e miotubos) *in vitro*. Além disso, o teste de viabilidade mostrou que *L. (L.) amazonensis* permanece viável dentro do vacúolo parasitóforo após 72h de infecção. Finalmente, foi observado que o tratamento com SLO pode favorecer a entrada do parasito nas SkMCs, como foi evidenciado pelas diferencias no nível de mRNA entre as células infectadas ou infectadas e tratadas com SLO. Os dados em conjunto sugerem que *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de infectar as células musculares esqueléticas, dado que consegue entrar nestas células, e permanecer viável dentro do vacúolo parasitóforo. A presença do parasito dentro das células induz uma resposta imune no músculo que pode estar relacionada com os processos de reparo do tecido. A entrada de *L. (L.) amazonensis* nas células musculares esqueléticas durante a infecção no hospedeiro mamífero é importante devido a sua capacidade de manter o parasito viável.

Palavras-chave: Mioblastos. Miotubos. Resposta imune. Vacúolo parasitóforo. Músculo esquelético.

ABSTRACT

Fiesco N. Characterization of skeletal muscle cell infection by *Leishmania (L.) amazonensis*. [Master thesis(Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Leishmaniasis is a group of diseases caused by parasites from genus *Leishmania*. The main clinical manifestations are cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. In Brazil, leishmaniasis is an important public health problem because of the high incidence. The *Leishmania* life cycle has two principal developing stages: promastigote inside the insect vector, and amastigote, an obligate intracellular parasite of vertebrate-host cells. This protozoan is highly promiscuous in host cell type, because it infects different immune cells like neutrophils, macrophages and dendritic cells, and also non-professional phagocytes. Besides, *Leishmania* might infect muscle fibers, as previous studies suggested from histological analysis. However, the characteristics of *Leishmania* infection in muscle cells is poorly understood, which is important to understand the role of these cells during the infection. The aim of this study was to characterize the infection process by promastigotes of *L. (L.) amazonensis* in skeletal muscle cells (SkMCs). C57BL/6 and BALB/c mice were infected in hind footpads, the *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) muscle was extracted and process to dyed with hematoxylin/eosin or immunohistochemistry. SkMCs as myoblasts and myotubes were infected with metacyclic promastigotes of *L. (L.) amazonensis* during 72h. The infections were characterized using indirect immunofluorescence and confocal microscopy. SkMCs culture were characterized and standardized through Caveolin-1 and Caveolin-3 proteins, and the pH of parasitophorous vacuoles both in myoblasts and myotubes was measured through acridine orange staining. In order to assess how the parasite invades the cells, myotubes were pretreated with SLO and/or infected with metacyclic promastigotes of *L. (L.) amazonensis* for 72h. The production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and NO was quantified, and the mRNA levels of *IL-1 β* , *IL-6*, *iNOS*, *Ama2*, *UbH* and *Lyst*. The cell infection showed that *L. (L.) amazonensis* can infect muscle fibers *in vivo*, and skeletal muscle cells *in vitro*. Moreover, viability test showed the parasite remains viable inside the parasitophorous vacuole until 72h of infection. Finally, the SLO treatment can favor parasite entrance in SkMCs, as evidenced by differences in mRNA levels between infected cells or infected and treated with SLO. All data suggest that *L. (L.) amazonensis* can infect skeletal muscle cells, by entering into the cells, and remaining viable inside the parasitophorous vacuole. The parasite presence inside the muscle cells triggers an immune response that may be related with muscle repair processes. The entrance of *L. (L.) amazonensis* into SkMCs during infection in a mammal host is important because it contribute with parasite proliferation.

Keywords: Mioblasts. Myotubes. Immune response. Parasitophorous vacuole. Skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Manifestações clínicas da leishmaniose.....	21
Figura 2 - Mapa de distribuição dos novos casos de leishmaniose cutânea no mundo durante o ano de 2013 segundo a OMS. Mapas adaptados da Organização Mundial da Saúde (6).....	22
Figura 3 - Mapa de distribuição dos novos casos de leishmaniose visceral no mundo durante o ano de 2013 segundo a OMS. Mapas adaptados da Organização Mundial da Saúde (6).....	23
Figura 4 - Ciclo de vida do protozoário <i>Leishmania</i>	24
Figura 5 - Histologia do músculo FDB infectado com <i>L. (L.) amazonensis</i>	40
Figura 6 - Esquema de indução de miogênese em células C2C12.	42
Figura 7 - Cultura in vitro de <i>L. (L.) amazonensis</i>	43
Figura 8 - Número de células presentes na cultura durante a diferenciação.	44
Figura 9 - Níveis de proteína Caveolina 3 em músculo FDB.	50
Figura 10 - Níveis das proteínas Caveolina 1 e Caveolina 3 em culturas em diferenciação de SkMCs.....	50
Figura 11 - Níveis de proteína Caveolina 3 em seis diferentes culturas de SkMCs.....	50
Figura 12 - Monitoramento do crescimento da lesão de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	54
Figura 13 - Histologia de músculo FDB infectado com <i>L. (L.) amazonensis</i>	55
Figura 14 - Quantificação dos vacúolos parasitóforos presentes em cortes histológicos de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	56
Figura 15 - Monitoramento do crescimento da lesão de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	57
Figura 16 - Imunohistoquímica de músculo FDB infectado com <i>L. (L.) amazonensis</i>	58
Figura 17 - Caracterização da infecção do músculo FDB de camundongos C57BL/6 com <i>L. (L.) amazonensis</i>	59
Figura 18 - Teste de viabilidade de fibras musculares após tratamento com colagenase.	60
Figura 19 - Infecção in vitro de fibras musculares com <i>L. (L.) amazonensis</i>	61
Figura 20 - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de mioblastos com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.	63
Figura 21 - Caracterização da infecção de SkMCs (mioblastos) infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.....	64
Figura 22 - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.....	66
Figura 23 - Caracterização da infecção de SkMCs (Miotubos) infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.....	67
Figura 24 - Avaliação da acidez do vacúolo parasitóforo de <i>L. (L.) amazonensis</i> em SkMCs.	68
Figura 25 - Níveis de proteína Caveolina 1, Caveolina 3 e iNOS em culturas não infectadas e infectadas de SkMCs.....	69
Figura 26 - Quantificação da produção de nitrito em SkMCs infectadas ou não com <i>L. (L.) amazonensis</i>	70
Figura 27 - Quantificação da viabilidade dos parasitos internalizados por SkMCs.....	70
Figura 28 - Quantificação da produção de citocinas em culturas de SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	72
Figura 29 - Expressão genica em SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> e/ou tratadas com SLO.	73

Figura 30 - Quantificação da produção de nitrito em SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> e/ou tratadas com SLO.	74
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários e secundários utilizados no <i>Western Blotting</i>	46
Tabela 2 - Lista de primers utilizados na reação de PRC em tempo real.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Fator de transcrição
ASC	Proteína adaptadora do inflammasoma
BALB/XID	<i>X-linked immunodeficient mice which are genetically deficient in B-1 cells.</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CD	Célula dendrítica
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFDA	<i>5(6) -Carboxyfluorescein diacetate</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
CR	Receptor de complemento
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Media</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FcR	Receptor Fc
FDB	<i>Flexor Digitorum Brevis</i>
FITC	Sotiocianato de fluoresceína
gp63	Glicoproteína 63
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid
<i>Hprt1</i>	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1
Hoechst	2,5'-Bi-1H-benzimidazole, 2'- (4-ethoxyphenyl) -5-(4-methyl-1-piperazinyl)
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G

IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase inducível
KCl	Cloreto de Potássio
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
<i>Lyst</i>	Gene regulador do tráfego lisossomal
MAC	Complexo de ataque à membrana
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MR	Receptor de manose
MRF	Fator de regulação miogênica
NaCl	Cloreto de Sódio
NaF	Fluoreto de Sódio
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLR	<i>Oligomerization domain (NOD)-like receptor</i>
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintase inducível
ns	Não significativo
Oligo (dT)	Primer de oligo nucleotídeos de desoxitimina
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	Valor p
Pax	<i>Paired-box transcription factors</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i> IFLA/BR/67/PH8
PI	Iodeto de propídeo

RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SC	Soro de Cavalo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro fetal bovino
SLO	Streptolicina O
SkMCs	<i>Skeletal Muscle Cells</i>
TBS	Tampão salina tris
TBS-T	TBS com Tween-20
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametilnodiamina
Th	<i>Helper T cells</i>
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
<i>UbH</i>	Ubiquitina
USP	Universidade de São Paulo
V.	<i>Viannia</i>
VP	Vacúolo parasitóforo

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
kDa	Kilodaltons
L	Litro
M	Molaridade
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
mA	Miliamperes
g	Gramas
mg	Miligrama
μ g	Micrograma
ng	Nanograma
pg	Picograma
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
cm ²	Centímetro quadrado
mm	Milímetro
μ m	Micrometro
°C	Graus Celsius
pH	Potencial de Hidrogenio
V	Voltagem
xg	Gravidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	A Leishmaniose: Generalidades.....	21
1.2	Biologia de <i>Leishmania</i>	23
1.3	Células envolvidas na infecção por <i>Leishmania</i>.....	25
1.4	Resposta imune contra <i>Leishmania</i> e mecanismos de evasão usados pelo parasito	28
1.5	O músculo	31
1.6	Músculo e <i>Leishmania</i>	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Hipótese de trabalho.....	36
2.2	Objetivo geral	36
2.3	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	Cultura de <i>Leishmania</i> e animais de experimentação	38
3.2	Infecção in vivo, histologia e imunohistoquímica	38
3.3	Isolamento de fibras musculares de camundongo	40
3.4	Avaliação da viabilidade celular de fibras dissociadas.....	41
3.5	Cultura <i>in vitro</i> de células musculares esqueléticas (SkMCs, C2C12).....	41
3.6	Purificação de promastigotas metacíclicos de <i>L. (L.) amazonensis</i>	42
3.7	Infecção experimental <i>in vitro</i>	43
3.8	Extração de proteína	44
3.9	Western Blotting.....	45
3.10	Imunofluorescência indireta e microscopia confocal	46
3.11	Marcação de pH de vacúolo parasitóforo de <i>L. (L.) amazonensis</i> em SkMCs.....	47
3.12	Teste de viabilidade de parasitos internalizados por SkMCs	47
3.13	Avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas.....	48
3.14	Caracterização da cultura de células musculares esqueléticas	48

3.15	Tratamento com SLO e infecção de SkMCs.....	49
3.16	RT - qPCR	51
3.17	Análise de dados	52
4	RESULTADOS	53
4.1	Internalização de <i>Leishmania</i> em fibras musculares <i>in vivo</i>	54
4.1.1	Infecção <i>in vivo</i> de camundongos C57BL/6 e BALB/c observada em cortes histológicos	54
4.1.2	Infecção <i>in vivo</i> de camundongos C57BL/6 observada com imunohistoquímica	56
4.1.3	Internalização de <i>Leishmania</i> em fibras musculares <i>in vitro</i>	59
4.2	Internalização de <i>Leishmania</i> em células musculares esqueléticas (SkMCs)	61
4.2.1	Internalização de <i>Leishmania</i> em mioblastos	61
4.2.2	Internalização de <i>Leishmania</i> em miotubos	65
4.2.2.1	Infecção de SkMCs com <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
4.2.2.2	SkMCs pré-tratadas com SLO e infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i>	71
5	DISCUSSÃO	75
6	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS*	84
	APÊNDICES	95
A	- Associação entre o número de núcleos e o comprimento do miotubo em miotubos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h	95
B	- Associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo em mioblastos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h	96
C	- Associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo em miotubos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h	97
D	- Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h com microscopia confocal.	98
E	- Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h com microscopia confocal.	99

F - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h com microscopia confocal.	100
ANEXOS	101
A - Vídeo de SkMCs em cultura realizando contração espontânea.	101
B -Vídeo de SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> realizando contração espontânea	101
C - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.	101
D - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.	101
E - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com <i>L. (L.) amazonensis</i> por 72 h.	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Leishmaniose: Generalidades

A leishmaniose é uma doença considerada como negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É endêmica em 98 países de 5 continentes (1), onde cada ano há aproximadamente 1,3 milhões de novos casos, com 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença, e 20.000 a 40.000 óbitos anuais (2). A leishmaniose é causada por protozoários da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, os quais são parasitos intracelulares obrigatórios de vertebrados transmitidos por um inseto vetor. A leishmaniose apresenta diferentes manifestações clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro, e são classificadas em três grupos principais: leishmaniose visceral (LV); leishmaniose cutânea (LC); e leishmaniose Mucocutânea (LMC) (3) (**Figura 1**).

Figura 1 - Manifestações clínicas da leishmaniose. (A) Paciente do Peru com CL que apresenta lesões ulcerativas grandes e poucas. (B) Paciente da Bolívia com MCL com úlceras em mucosas da boca. (C) Paciente do Uganda com VL que apresenta hepatoesplenomegalia. Imagens adquiridas de Chappuis e colaboradores, 2007 (4).

Setenta e cinco por cento dos casos de LC ocorrem em 10 países (Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru) (**Figura 2**); e 90% dos casos de LV ocorrem em 6 países (Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia) (**Figura 3**) (1). No caso do Brasil, nas últimas décadas os diferentes tipos de leishmaniose têm sido estabelecidos como importantes problemas de saúde pública em diferentes áreas metropolitanas. A LMC e a LC estão espalhadas pelo país, sendo o Brasil o país com maior número de casos de LC na América do Sul (1). A doença tem sido reportada ao longo do país desde 1950, com um incremento no número de casos registrados a partir de 1980. Este padrão epidemiológico está amplamente relacionado com o deslocamento da população desde as regiões rurais a regiões urbanas e com o desmatamento das florestas (1,5).

Figura 2 - Mapa de distribuição dos novos casos de leishmaniose cutânea no mundo durante o ano de 2013 segundo a OMS. Mapas adaptados da Organização Mundial da Saúde (6).

A primeira linha de tratamento contra a leishmaniose usa compostos antimoniais pentavalentes, e a segunda linha de tratamento usa a anfotericina B e a pentamidina (7,8). O sucesso no tratamento da leishmaniose depende da condição imune do paciente, da manifestação clínica da doença e da sensibilidade da espécie de *Leishmania* aos diferentes fármacos. Além disso, casos de diferentes espécies de *Leishmania* resistentes à drogas têm sido reportados no mundo todo (7–9). Por causa da toxicidade e da aparição de resistência aos tratamentos convencionais, tem-se desenvolvido pesquisas para explorar metodologias alternativas e a descoberta de compostos naturais candidatos à utilização no tratamento (7,10–12).

Figura 3 - Mapa de distribuição dos novos casos de leishmaniose visceral no mundo durante o ano de 2013 segundo a OMS. Mapas adaptados da Organização Mundial da Saúde (6).

1.2 Biologia de *Leishmania*

O agente etiológico da leishmaniose é o parasito do gênero *Leishmania*. O ciclo de vida deste protozoário é complexo e envolve dois estágios de desenvolvimento: **promastigota**, que por sua vez pode ser procíclico (forma proliferativa), ou metacíclico (forma infectiva), ambas encontradas no intestino do inseto vetor (fêmeas de flebotomíneo: *Lutzomyia* spp./ *Phlebotomus* spp.); e **amastigota**, a forma infectiva e proliferativa encontrada dentro das células hospedeiras do mamífero (13). A infecção tem início quando um flebotomíneo portador de *Leishmania* faz o repasto sanguíneo em um vertebrado. Durante o repasto sanguíneo o vetor injeta saliva que preveem a coagulação, e depois da ingesta de sangue os promastigotas metacíclicos são liberados na pele do hospedeiro por regurgitação. No sitio da picada, a perfuração do tegumento e os compostos injetados pelo inseto vetor induzem o recrutamento de células do sistema imune como neutrófilos e macrófagos, células que fagocitarão os parasitos por meio do reconhecimento de moléculas expostas na sua superfície (**Figura 4**) (13,14). Os promastigotas metacíclicos de *Leishmania* ingressam na célula hospedeira se-aderindo à superfície celular principalmente pelo flagelo ou pelo corpo, para ser fagocitados posteriormente (15).

Figura 4 - Ciclo de vida do protozoário *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo da fêmea do vetor os promastigotas de *Leishmania* são injetados na pele do hospedeiro mamífero. Uma vez dentro do hospedeiro o parasito é fagocitado por células principalmente do sistema imune, dentro das quais começa o processo de transformação para a forma amastigota. O amastigota se multiplica, destrói a célula e infecta outras células fagocíticas. Figura obtida de Chappuis e colaboradores, 2007 (4).

Uma vez que o parasito é internalizado, permanece no compartimento formado pela célula chamado vacúolo parasitóforo (VP), dentro do qual se transforma em amastigota. O vacúolo está formado pelo fagossomo (composto por diferentes membranas e vesículas intracelulares) e os lisossomos da célula hospedeira (16). Dentro do vacúolo, os amastigotas começam a se dividir até ser liberados para infectar outras células. Isto pode acontecer por rompimento da

membrana celular e depois serem fagocitados por outras células (13), ou os parasitos podem ser transferidos de uma célula para outra sem uma completa exposição ao meio extracelular através de bolhas de membrana celular (17).

Após um novo repasto, o sangue é digerido no tubo digestório médio do inseto, e os amastigotas ficam protegidos pela matriz peritrófica onde se transformam em promastigotas procíclicos. Após a transformação, a matriz peritrófica se rompe e libera os promastigotas que aderem ao epitélio do intestino médio. Após os promastigotas procíclicos sofrerem o processo de metaciclogênese, os promastigotas metacíclicos migram para a válvula estomodeal e permanecem no intestino anterior, para quando o flebotômíneo faça novamente o repasto sanguíneo serem regurgitados no sítio da picada (**Figura 4**) (13,18).

O vetor da leishmaniose pertence à ordem Díptera, família Psychodidae, gênero *Lutzomyia* nas Américas, e gênero *Phlebotomus* nos continentes Europeu, Asiático e Africano (3). Os principais reservatórios do parasito são os roedores (19), os cachorros, os cavalos e em raras ocasiões os gatos (20). Os cachorros são considerados os reservatórios domésticos mais importantes para LV, porque casos de infecção canina precederam a ocorrência ou ocorreram de forma paralela aos casos de infecção humana (21).

O gênero *Leishmania* está dividido em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, baseados no local de desenvolvimento do parasito no intestino do vetor. No subgênero *Viannia* o parasito desenvolve-se na parte posterior do intestino e no subgênero *Leishmania* desenvolve-se na parte média e anterior do intestino (3). As espécies principalmente responsáveis pelos casos de LV são *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum*. A LMC é geralmente causada pela espécie *L. (V.) braziliensis*, e a LC e seus subtipos pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) tropica* (3).

1.3 Células envolvidas na infecção por *Leishmania*

A *Leishmania* tem sido qualificada como um parasito com um alto grau de promiscuidade no tipo de célula hospedeira, já que tem sido reportada a infecção de múltiplos tipos de células tanto *in vitro* quanto *in vivo* (22,23). Quando a *Leishmania* é inoculada no hospedeiro mamífero, são as células do sistema imune como os neutrófilos (24), as células dendríticas (25) e os macrófagos (26–28) os principais alvos de infecção. Além disso, células que não são fagócitos profissionais também podem ser infectadas como os fibroblastos (29) e as células epiteliais (30).

Após a inoculação dos parasitos na pele do hospedeiro mamífero ocorre um rápido e massivo recrutamento de **neutrófilos** que fagocitam uma grande quantidade de parasitos por vias que podem ou não ser dependentes de opsoninas, já que são fagócitos profissionais (24,26,31). A importância dos neutrófilos foi sugerida por Laskay e colaboradores (31), e confirmada por Peters e colaboradores (32), por meio da observação de que o fagossomo do neutrófilo não tem atividade leishmanicida, pelo que o parasito consegue sobreviver dentro do vacúolo. É então, dentro do vacúolo que a *Leishmania* bloqueia a indução do estresse oxidativo na célula, promove a extensão do tempo de vida e a produção de interleucina 8 (IL-8) por parte dos neutrófilos, com o fim de atrair outras células (31,33,34). Assim, os neutrófilos infectados posteriormente entram em processo de apoptose, sendo os mesmos fagocitados pelos macrófagos sem serem ativados, permitindo a entrada do parasito e o estabelecimento da infecção (22,31). Ainda que alguns trabalhos têm mostrado a inativação dos neutrófilos por parte do parasito, tem sido demonstrado que os neutrófilos liberam armadilhas de DNA, histonas e proteínas granulares chamadas ‘Neutrophil Extracellular Traps’ ou NETs, que tem a capacidade de matar microorganismos. Guimarães-Costa e colaboradores (35) detectaram NETs associadas a promastigotas de *Leishmania*, e determinaram que o parasito tem a capacidade de induzir sua liberação.

As **células dendríticas** (CD) como sentinelas na epiderme, incorporam de forma eficiente uma grande quantidade de parasitos durante os primeiros minutos de infecção (36). O processo de fagocitose ocorre por meio da emissão de pseudópodes que rastreiam e fagocitam os parasitos com a ajuda da interação de múltiplos receptores e ligantes da célula e do parasito (FcR/anticorpos, componentes do sistema de complemento/CR, proteína de ligação à heparina/proteoglicanos) (25,36,37). Após a fagocitose dos parasitos, as CD maduram e migram para os linfonodos onde estimulam a resposta específica anti-*Leishmania* de linfócitos T, e posteriormente ajudam a manter a memória dos linfócitos T (25). Porém, a *Leishmania* desenvolveu a capacidade de evadir a resposta imune das CD, impedindo a migração da célula para o linfonodo e inibindo a função de apresentação de antígeno para os linfócitos T e a produção de IL-12 (38).

No hospedeiro mamífero os **macrófagos** são o principal alvo de infecção, porém, elas são células efectoras do sistema imune que fagocitam os microorganismos e após ativação têm a capacidade de matar esses microorganismos intracelulares. A fagocitose de *Leishmania* pelos macrófagos ocorre por meio da interação de moléculas de superfície do parasito como o gp63 e fosfoglicanos como o lipofosfoglicano (LPG), com os receptores de complemento (CR) 1, 3 e 4, receptor de fibronectina, receptor de manose (MR) e receptor Fc. Após a fagocitose os

parasitos são mantidos dentro do vacúolo parasitóforo composto pela fusão do fagossomo com lisossomos, sendo este compartimento ácido contendo peptídeos antimicrobianos e enzimas proteolíticas derivados dos lisossomos, que fazem parte da resposta imune do macrófago (revisado por 15). Os mecanismos de defesa dos macrófagos são principalmente o estresse oxidativo, a acidificação das vesículas e a indução de óxido nítrico sintase (iNOS/NOS2) para a produção de óxido nítrico (NO) (39). Os macrófagos estão amplamente envolvidos no processo de resolução da infecção por *Leishmania* já que ela depende do tipo de resposta imune que o hospedeiro estabelece (Th1 ou Th2), e da habilidade das células para destruir os parasitos. A resposta Th1 é caracterizada pela imunidade celular que permite a ativação dos macrófagos pela produção de IFN γ e a expressão de NOS2, enquanto na Th2 predomina a resposta humoral não efetiva contra *Leishmania* que leva à produção de IL-4 e IL-10 (40–43).

Os **mastócitos** são umas das primeiras células em interagir com os parasitos após a infecção. Estas foram descritas por Bidri e colaboradores (44) como células com a capacidade de fagocitar promastigotas de *Leishmania*, suportar a conversão para amastigota e a replicação do parasito. Embora a forma de internalização do parasito ainda não tenha sido estabelecida, é possível que ocorra através de uma interação mediada por receptor. Além disso, as citocinas secretadas pelos mastócitos junto com os produtos da desgranulação têm efeitos sobre a resposta imune frente à infecção, contribuindo na polarização da resposta celular Th1 ou Th2 (revisado por 45).

Os **eosinófilos** são células com atividade antimicrobiana que durante a infecção por *Leishmania* são atraídos por quimiotaxia ao local de infecção. Tem sido previamente reportado que a presença de um grande número de eosinófilos está correlacionada com uma baixa carga parasitária, mas não tem sido verificado se estas células fagocitam diretamente o parasito, apesar da sua capacidade como células apresentadoras de antígeno. Porém, tem sido proposto que os eosinófilos podem incrementar a atividade microbicida dos macrófagos, participando assim da resposta imune inata (revisado por 45).

As **células B1** são consideradas como células B da resposta imune inata que facilitam a resposta imediata de anticorpos. Estas células são importantes pela produção de anticorpos, citocinas e quimiocinas, a apresentação de antígenos, a modulação da resposta de células T e a manutenção da resposta de memória de célula B (46). Inicialmente, O'Garra e colaboradores (47) e Ronet e colaboradores (48) mostraram que as células B1 secretam uma grande quantidade de IL-10 que contribui com a susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. (L.) major*, levando o fenótipo da resposta imune para Th2. Recentemente, Gonzaga e colaboradores (49) usando camundongos BALB/c e BALB/XID reportaram a importância das células B1 na

susceptibilidade à infecção por *L. (L.) chagasi*. Neste trabalho observaram um aumento na população de células B1 após a infecção com o parasito e uma associação na produção de IL-10 por parte destas células com a carga parasitária. Adicionalmente, Geraldo e colaboradores (50) reportaram que as células B1 têm a capacidade de fagocitar promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por meio do receptor de manose (MR) e de complemento 3 (CR3), e ainda permite a diferenciação do parasito em amastigota, confirmando a importância destas células na resposta à infecção por *Leishmania*.

Os **fibroblastos** fazem parte da família de células que compõem o tecido conjuntivo e secretam o colágeno da matriz extracelular (51). Estas células têm sido reportadas com a capacidade de internalizar promastigotas de várias espécies de *Leishmania* e de permitir a transformação do parasito em amastigota dentro da célula (52–54). Tem sido postulado que a infecção de células não fagócitos profissionais, que não geram uma resposta imune, pode ser um mecanismo de sobrevivência do parasito para evadir a resposta gerada por células do sistema imune como os macrófagos. Nesse contexto, Bogdan e colaboradores (29) identificaram os fibroblastos de nódulos linfáticos como uma das principais células hospedeiras durante a fase latente da leishmaniose, porque são um ambiente menos hostil respeito à resposta imune, já que permitem a persistência dos parasitos. Adicionalmente, Hespanhol e colaboradores (55) encontraram evidencia que sugere a participação do receptor de manose (MR) na internalização dos promastigotas nos fibroblastos.

As **células epiteliais** e sua interação com *Leishmania* têm sido menos estudadas em comparação com outros tipos de células alvo. Belle (30) e Frothingham & Lehtimaki (56), usaram células epiteliais de placenta humana para cultivar *L. (L.) donovani*, e observaram a multiplicação do parasito dentro destas células. Por outro lado, Pessotti e colaboradores (57) estudaram a interação entre *L. (L.) chagasi* e a linha de célula Vero. Neste trabalho demonstraram que os promastigotas de *L. (L.) chagasi* interagem com as células, conseguem se transformar em amastigotas e se multiplicar dentro dos vacúolos parasitóforos, fornecendo um novo modelo para o estudo da relação parasito-hospedeiro em *Leishmania*.

1.4 Resposta imune contra *Leishmania* e mecanismos de evasão usados pelo parasito

Após a inoculação da *Leishmania* na pele do hospedeiro mamífero, o parasito tem que resistir a ação dos mecanismos da resposta imune inata do hospedeiro. Uma das primeiras barreiras é o **sistema de complemento**, o qual é efetivo eliminando os parasitos principalmente pela via de ativação alternativa. Porém, os principais fatores de virulência que a *Leishmania*

utiliza como estratégia de evasão são o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease gp63. Estas proteínas facilitam a ligação de moléculas do sistema de complemento, mas inibem a subsequente formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Além disso, facilitam o processo de opsonização dos parasitos para serem fagocitados pelas células do sistema imune (revisado por 58,59).

O início da resposta imune frente aos parasitos requer o reconhecimento de moléculas do patógeno principalmente por parte do macrófago, o qual leva à ativação de cascatas de sinalização intra- e intercelulares que permitem a produção de compostos antimicrobianos (60). Tanto os macrófagos quanto os neutrófilos apresentam **receptores de padrões de reconhecimento de patógenos** (PRRs) como os ‘Toll-like receptors’ (TLR) e ‘Nod-like receptors’ (NLR) (58).

Os TLRs são receptores que além de reconhecer padrões nos patógenos, ativam as células do sistema imune para induzir a produção de citocinas e moléculas co-estimuladoras. Alguns TLRs estão localizados na superfície da membrana celular e outros nas membranas dos endossomas e lisossomos. Após o reconhecimento do ligante os TLRs recrutam a molécula adaptadora que dá começo à cascata de sinalização (61), sendo a molécula adaptadora MyD88 comum para a maioria dos TLRs. Estudos independentes sobre o papel dos TLRs na infecção por *Leishmania* realçam uma redundância no papel dos diferentes receptores na resposta protetora contra a infecção pelo parasito. O TLR2 reconhece o LPG dos promastigotas metacíclicos e antígenos específicos dos amastigotas de *Leishmania*, e como resultado dessa interação ocorre a indução da produção de TNF- α , IL-12, NO e espécies reativas de oxigênio (ROS). Por causa da importância da cascata de sinalização do TLR2 na resposta imune protetora e eliminação do parasito, a *Leishmania* utiliza múltiplos mecanismos para alterar a sinalização e permitir o estabelecimento da infecção (revisado por 58,62).

Os NLRs são receptores citoplasmáticos com múltiplas funções, desde a regulação do MHC até a regulação positiva e negativa de várias vias de sinalização. Uma das funções mais importantes dos NLRs é a formação de um complexo multimérico chamado **inflamasoma** (58). O inflamasoma é um complexo de proteínas formado no citoplasma de células do sistema imune inato em resposta a antígenos ou sinais de estresse. Após sua formação, o inflamasoma facilita a indução de respostas inflamatórias por meio da secreção de citocinas como IL-1 β e IL-18. Finalmente, a célula hospedeira é guiada ao processo de morte celular programada chamado de piroptose (revisado por 63).

No caso da infecção por *Leishmania*, Lima-Junior e colaboradores (64) reportaram que *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum/chagasi* desencadeiam efetivamente a

ativação do inflamasoma, já que a caspase-1 é ativada em macrófagos de forma dependente de NLRP3 e ASC. Além disso, mostraram que a ativação do inflamasoma é importante para restrição da replicação do parasito no modelo de infecção murino. A secreção de IL-1 β ativa leva à regulação da transcrição de NOS2 e da produção de NO (63).

Os mecanismos de defesa dos macrófagos fazem parte da resposta imune inata do hospedeiro. Esses mecanismos são principalmente o **estresse oxidativo**, a **acidificação das vesículas** e a indução de óxido nítrico sintase (iNOS/NOS2) para a produção de **óxido nítrico** (NO) (39). A produção de radicais de superóxido e de hidroxilo é um dos mecanismos antimicrobianos que contribui principalmente com a redução do número de parasitos (65), mas a *Leishmania* produz fosfatases ácidas na sua superfície que ajudam a inibir o estresse oxidativo (59).

Outro mecanismo utilizado pelos macrófagos para degradar os parasitos é a acidificação das vesículas por meio da fusão de lisossomos ao fagossomo. Além disso, Wilson e colaboradores (66) sugeriram que a regulação do gene LYST/Beige, um gene envolvido no controle do tamanho dos lisossomos pela célula infectada funciona como parte da resposta imune inata para limitar a multiplicação do parasito dentro do vacúolo parasitóforo, reduzindo o seu volume. A acidificação das vesículas é resistida pelo parasito a través de uma bomba de prótons presente em sua membrana celular que permite manter o pH do vacúolo parasitóforo estável. Este processo também conta com o papel ativo do LPG na inibição das enzimas lisossomais (59). Adicionalmente, para sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo, a *Leishmania* ativa os transportadores de ferro e a enzima arginase próprios competindo com o uso de ferro e arginina da célula para sobreviver (revisado por 62).

Estudos prévios têm demonstrado a importância do NO na resolução da infecção por *Leishmania*. Este composto ajuda no controle da infecção e também dos parasitos persistentes. Além da sua função antimicrobiana, o NO também cumpre funções de sinalização que contribuem com a regulação da expressão de citocinas (65,67).

As **células T** têm um papel muito importante na geração de respostas específicas e de memória contra infecções parasitárias intracelulares. Esta resposta imune pode se polarizar para Th1 ou Th2. A resolução da infecção por *Leishmania* requer o estabelecimento da resposta imune protetora mediada por células T do tipo Th1. Este processo requer da produção de IL-12 pelos macrófagos e as células dendríticas durante as fases iniciais da infecção, já que a IL-12 é indutora da resposta Th1 e da produção de IFN γ (revisado por 59).

Além dos mecanismos de evasão da resposta imune que já foram mencionados, a *Leishmania* tem a capacidade de alterar as cascatas de sinalização intracelular usando múltiplos

mecanismos para subverter a resposta imune. Algumas dessas cascatas são: a sinalização do IFN γ essencial na produção de NO; a sinalização da via MAPK essencial na produção de várias moléculas efetoras como as citocinas e quimiocinas; e a sinalização de fatores de transcrição como AP-1 e NF-K β (revisado por 62).

1.5 O músculo

O músculo esquelético se origina a partir de estruturas embrionárias chamadas somitos formados de células mesodérmicas durante a embriogênese dos vertebrados. A miogênese é regulada por uma cascata de sinais dos fatores de transcrição ‘*Paired-box*’ como Pax3 e Pax7, e fatores de regulação miogênica (MRFs), como MyoD, myf-5, miogenina e MRF4. Em conjunto, estes fatores de diferenciação dirigem a especificação da linhagem muscular esquelética no somito; a migração das células progenitoras para a formação das extremidades; a condensação dos mioblastos em massas pré-musculares; e a formação de miofibras primárias e secundárias (68–70).

Durante a especificação da linhagem muscular as células embrionárias são ativadas e se comprometem como mioblastos, os quais dão origem ao músculo, mas também permanecem na fase pós-natal como células satélite quiescentes. Em resposta ao dano ou rompimento da lamina basal, as células satélite tornam-se ativadas e com a capacidade de se multiplicar. No final, estas células podem se fundir e formar miobubos multinucleados junto com o restabelecimento de células satélite quiescentes que poderão sustentar novos processos de regeneração (68,71).

O músculo foi classificado como um órgão endócrino que produz e libera citocinas chamadas miocinas em resposta a vários estímulos, principalmente a contração, as quais podem ter um efeito autócrino ou parácrino. As miocinas que têm sido reportadas são IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, TNF- α , e TGF- β , entre outras (72–76). A IL-6 derivada do músculo tem um importante papel metabólico, e tem-se demonstrado que sua fonte dentro do tecido muscular são os mioblastos, as células endoteliais, os fibroblastos e as células do músculo liso. A produção de IL-6 no músculo pode ser em resposta a estímulos causados por lipopolissacarídeos (LPS), espécies reativas de oxigênio, citocinas inflamatórias e contração durante a atividade física (72,77).

A miocina IL-8, assim como a IL-6, é influenciada pela contração do músculo. Embora sua importância fisiológica no músculo não tenha sido bem esclarecida, a expressão de IL-8 e sugere que atua de forma local para estimular a angiogênese e a quimioatração de neutrófilos e

macrófagos (72,77). A miocina IL-15 tem sido identificada como um fator anabólico altamente expresso no músculo, e tem sido sugerido que sua função envolve a interação entre o músculo e o tecido adiposo, e o favorecimento do crescimento e diferenciação do músculo (72,77). Além das miocinas, o músculo também produz NO como resposta à contração. No músculo o NO funciona como um regulador de sinais pré-traducionais que levam à produção de IL-6 (72,77).

Além de ser um órgão endócrino, o músculo também funciona como um sensor de estresse através dos sistemas de receptores de membrana, principalmente por meio de TLR. O músculo apresenta múltiplos TLRs que o fazem sensível a uma ampla variedade de compostos como antígenos microbianos e compostos provenientes do ambiente extracelular, que geram uma resposta independente da ativação do sistema imune. A resposta do músculo frente ao estresse por meio dos TLRs e dos receptores de citocinas pro-inflamatórias está ligada com a regulação da produção de IL-6 e outras miocinas (revisado por 74).

As caveolas são microdomínios que contêm lipídeos, e se apresentam como invaginações tubulares nas membranas plasmáticas (78). Se caracterizam pela presença de uma família de proteínas chamadas caveolinas, as quais são cruciais como componentes estruturais das membranas celulares. Esta família está composta por três tipos Cav1, Cav2 e Cav3, sendo as duas primeiras expressadas principalmente em células não musculares, enquanto que a Cav3 é amplamente expressada em músculo esquelético, cardíaco e liso. As caveolinas estão envolvidas na regulação de diferentes vias de tráfego de endocitose e exocitose, e também em vias de modificação de componentes específicos da superfície da membrana plasmática (78,79). O reparo das lesões na membrana é essencial para a sobrevivência da célula, e no caso das fibras musculares, as quais são muito susceptíveis ao dano no tecido, a falta de reparo pode conduzir ao desenvolvimento de doenças (80).

Corrote e colaboradores (80) realizaram um estudo onde fibras musculares foram tratadas com Streptolisina O (SLO), e propuseram um modelo alternativo para o processo de reparo da membrana plasmática no músculo. A SLO é uma toxina bacteriana que se liga no colesterol e forma poros na membrana plasmática de células de mamíferos. O poros geram lesões na membrana que não podem ser seladas pelo restabelecimento da membrana, nem aliviando a tensão da membrana plasmática (81,82). No mecanismo proposto por Corrote e colaboradores (80), o dano na célula desencadeia a entrada de íons de cálcio que leva à exocitose de lisossomos com compostos que promovem a formação das caveolas, que depois removem a área danificada por endocitose restaurando a integridade da membrana.

1.6 Músculo e *Leishmania*

A Miopatia Inflamatória é uma inflamação crônica do músculo que se apresenta com uma grande variedade de sintomas, e é causada por diferentes condições como infecções, toxinas, autoimunidade, entre outras. Diversos agentes infecciosos podem infectar e causar dano ao músculo produzindo uma resposta inflamatória, como vírus, bactérias, fungos e parasitos (83). Alguns dos parasitos que podem infectar o músculo e produzir uma inflamação ou miosite são *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Leishmania* (83,84).

Vamvakidis e colaboradores (85), Paciello e colaboradores (86) e Gomes e colaboradores (87) encontraram um perfil de miopatia inflamatória em cães infectados com *Leishmania*, nos quais observaram inflamação do músculo esquelético associada com a presença de amastigotas. Por outra parte, Naranjo e colaboradores (88) observaram a presença de parasitos de *Leishmania* spp. infectando os macrófagos do processo inflamatório e as fibras musculares de músculo associado ao olho em cães. Porém, existem outros músculos de cães com reportes de alterações histológicas por leishmaniose, como: músculo mastigatório (89); músculo intra, peri e extra-ocular (88); músculo cardíaco e pulmonar (90,91); músculos intestinais (92); e músculo apendicular (93).

Além dos reportes em cães, a infecção por *Leishmania* e a presença de miosite têm sido relacionadas em modelos de estudo em laboratório. Paciello e colaboradores (89) observaram músculo esquelético de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com *L. (L.) infantum* e inflamação no tecido. Além disso, Silva-Almeida e colaboradores (94) observaram o progresso da infecção em músculo esquelético de camundongos de duas linhagens (BALB/c e C3H.He), e encontraram parasitos de *L. (L.) amazonensis* infectando os macrófagos do infiltrado inflamatório e as fibras musculares de camundongos BALB/c.

Por outra parte, não existem relatos sobre o possível mecanismo de entrada do parasito na célula muscular, mas a pesquisa sobre os mecanismos em outras células tem fornecido evidências que abrem o caminho. A pesquisa desenvolvida por Forestier e colaboradores (95) sugeriu um papel ativo da viabilidade, a polaridade e a motilidade dos promastigotas de *L. (L.) donovani* no processo de infecção de macrófagos murinos. Além disso, mostrou que durante a invasão apresenta um movimento oscilante que causa um dano na membrana celular e está associado com a exocitose de lisossomos. Rodríguez e colaboradores (78,96) mostraram que a expressão de caveolina incrementa em resposta à fagocitose de *Leishmania*, o que está associado com a internalização dos promastigotas através das caveolinas e os microdomínios

de lipídeos, por tanto pode contribuir com o atraso na fusão dos lisossomos e favorecer a sobrevivência do parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Hipótese de trabalho

Observando que vários trabalhos têm associado a presença de formas infectivas de *Leishmania* com o tecido muscular, é possível supor que *Leishmania* tenha a capacidade de infectar células musculares esqueléticas. O entendimento do assunto permitiria delinear estudos adicionais sobre o papel de diferentes tecidos ou células no processo de infecção de *Leishmania* no hospedeiro mamífero.

2.2 Objetivo geral

O objetivo deste projeto foi avaliar as características biológicas da infecção por promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* em células musculares esqueléticas de mamífero.

2.3 Objetivos específicos

- A-** Verificar se ocorre a internalização de *L. (L.) amazonensis* em mioblastos e miotubos (diferenciados a partir de mioblastos C2C12).
- B-** Verificar a formação de vacúolo parasitóforo em mioblastos e miotubos infectados com *L. (L.) amazonensis*.
- C-** Verificar a viabilidade dos parasitos internalizados em mioblastos e miotubos infectados com *L. (L.) amazonensis*.
- D-** Verificar se ocorre a internalização do parasito no músculo *Flexor digitorum brevis in vivo* em camundongos C57BL/6 e BALB/c.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de *Leishmania* e animais de experimentação

A cultura de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) como promastigota foi feita a 25 °C em meio Grace (Vitrocell, Campinas SP, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, Vitrocell) em garrafas de 25 cm². Periodicamente, camundongos C57BL/6 foram infectados na pata traseira por via subcutânea com 1×10^6 parasitos de cultura estacionária *L. (L.) amazonensis* de passagem dois. Cinco ou seis semanas após a infecção os parasitos de lesão foram extraídos para manter em cultura no laboratório, com o objetivo de manter a virulência do parasito. Repiques semanais foram feitos para a manutenção da cultura com 1×10^5 parasitos/mL de meio, até no máximo oito passagens.

Camundongos fêmeas de 8-10 semanas C57BL/6 e BALB/c foram obtidos do biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os camundongos foram utilizados para obtenção de tecido muscular. Todos os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do ICB da USP (Protocolo 30/2014).

3.2 Infecção *in vivo*, histologia e imunohistoquímica

Camundongos fêmeas BALB/c e C57BL/6 foram infetados por via subcutânea em uma das patas traseiras com uma carga de 1×10^6 parasitos de cultura estacionaria de *L. (L.) amazonensis*, a outra pata foi tomada como controle da formação de lesão. A espessura e largura das patas foram medidas semanalmente com paquímetro de precisão 0,01 mm. Após 4, 5 ou 6 semanas de infecção, os camundongos foram sacrificados e o músculo FDB foi extraído cirurgicamente e fixado em PFA 4% diluído em PBS.

As amostras de tecido FDB fixadas em PFA 4% foram embebidas em parafina (Sigma-Aldrich) no banho histológico EP31-20151 (Easy Path) e cortadas a cada 3 µm longitudinalmente em micrótomo HM315 (MICROM). Os cortes aderidos em lâminas de vidro para microscopia foram esquentados a 60 °C e submersos em xilol, depois em álcool em concentrações decrescentes (100, 95, 70%) e água destilada, para desparafinar e hidratar. Depois, os cortes foram submersos em hematoxilina, seguido de álcool ácido e eosina. Após a coloração, os cortes foram submersos em álcool em concentrações crescentes (70, 95, 100%) e xilol. Finalmente os cortes foram montados com glicerina e foi observada a presença de

parasitos no tecido. As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMLB acoplado com câmera Leica DFC265.

O protocolo de realização da imunohistoquímica foi feito conforme ao descrito por Hsu e colaboradores (97). As amostras de tecido FDB fixadas em PFA 4% foram tratadas como descrito acima com as amostras de histologia, para cortar, desparafinar e hidratar. Depois foram bloqueadas para peroxidase endógena com uma solução de H_2O_2 e metanol, e mantidas em tampão Tris (Trisma base, NaCl, H_2O destilada, pH 7,6). Posteriormente, o tecido foi bloqueado com UltraVision Protein Block (Thermo Scientific) por 30 min a 37 °C em câmara úmida, e lavado uma vez com tampão Tris. O tecido foi incubado *overnight* com o anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania* (produzido em coelho no laboratório com a cepa IFLA/BR/67/PH8 de *L. (L.) amazonensis*), diluído 1:500 em BSA 5% em câmara húmida a 8 °C. O anticorpo primário foi retirado com tampão Tris e o anticorpo secundário R.T.U Vectastain Kit (composto por: RTU Biotinylated Universal Antibody anti-Rabbit/Mouse Ig (made in horse) e Vectastain-RTU Elite abc Reagent) (VECTASTAIN, Vector Laboratories) foi incubado por 30 min a 37 °C. Após retirar o anticorpo secundário com tampão Tris, o DAB (DAB, tampão Tris, H_2O_2) foi adicionado por 3-5s e lavado com água. Finalmente, os cortes foram corados com hematoxilina e submersos em álcool em concentrações crescentes (70, 95, 100%) e xilol. Os cortes foram montados com resina e foi observada a presença de parasitos no tecido com objetiva de 100X. As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMLB acoplado com câmera Leica DFC265.

Com base nos dados publicados sobre a presença de *Leishmania* em tecido muscular (85,86,88) foi realizado um ensaio preliminar. Camundongos fêmea BALB/c infectados com 1×10^6 parasitos de cultura estacionária de *L. (L.) amazonensis* por via subcutânea na pata traseira por 4 semanas (**Figura 5A**), com o objetivo de avaliar o tempo de infecção adequado no qual fosse possível observar as características de interesse da infecção. O músculo FDB foi extraído, fixado e processado para histologia, e corado com hematoxilina/eosina. Nos cortes histológicos foi observada a presença de infiltrado inflamatório e dano no tecido muscular com perda da estriação. Os parasitos encontravam-se infectando os macrófagos do infiltrado inflamatório, mas não foram observadas fibras musculares infectadas (**Figura 5B e C**).

Figura 5 - Histologia do músculo FDB infectado com *L. (L.) amazonensis*. (A) Aspecto da lesão na pata traseira de camundongo BALB/c infectado por 4 semanas com *L. (L.) amazonensis*. O músculo FDB de camundongos infectados foi extraído e corado com hematoxilina e eosina. (B e C) Imagens de cortes histológicos de músculo FDB de camundongo BALB/c infectado por 4 semanas com *L. (L.) amazonensis* mostrando o infiltrado inflamatório, danificação do tecido muscular e amastigotas infectando os macrófagos infiltrados no tecido.

3.3 Isolamento de fibras musculares de camundongo

O isolamento das fibras do músculo *Flexor digitorum brevis* (FDB) foi feito segundo descrito por Corrote e colaboradores (80) e Pasut e colaboradores (98). O músculo foi cirurgicamente isolado de camundongos C57BL/6 e mantido na solução Tyrode (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7.2). Posteriormente foi incubado 200 µL de colagenase do tipo I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) (2 mg/mL) diluída em DMEM alta glicose (25 mM) (Gibco-Life Technologies-Thermo Fisher Scientific), suplementado com piruvato de sódio 110 mg/mL, e incubado por 1h a 37 °C com 5% CO₂. Após incubação, o volume foi completado até 1 mL com Tyrode e deixado por 1 min à temperatura ambiente para sedimentação por gravidade, e assim eliminar fragmentos maiores de tecido e agregados. O sobrenadante contendo as fibras musculares foi transferido para um outro tubo e centrifugado a 300 xg por 5 min duas vezes para lavar o excesso de enzima. Por último, as fibras foram ressuspensas em 200 µL de Tyrode e centrifugadas a 300 xg sobre lamínulas tratadas com colágeno do tipo I (Sigma-Aldrich) em placas de plástico de 24 poços (Corning, Nova Iorque, Estados Unidos) para permitir a adesão, e mantidas em 500 µL de DMEM suplementado com HEPES 25 mM (Gibco), piruvato de sódio 1 mM (Gibco) e 10% SFB.

3.4 Avaliação da viabilidade celular de fibras dissociadas

A viabilidade das fibras musculares dissociadas a partir do músculo FDB foi feita com coloração por CFDA 2,5 mM (Sigma-Aldrich) e Hoechst (5 μ M) (Sigma-Aldrich) diluídos em PBS. As fibras foram incubadas durante 30 min a 37 °C com 5% CO₂ e lavadas uma vez com PBS, sendo ressuspensas em meio DMEM alta glicose com Iodeto de Propídeo (PI) (1:100 de 1 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Finalmente as fibras coradas foram colocadas em placa para microscópio com colágeno e as fibras tanto vivas quanto mortas foram visualizadas e contadas no microscópio de fluorescência Leica Microsystems DMI6000B/AF6000 acoplado com sistema de câmera digital DFC 365 FX. Para contagem, somente as células completas, não quebradas e coradas com CFDA e Hoechst foram consideradas viáveis. A contagem foi realizada em três experimentos independentes, com avaliação em três tempos diferentes.

3.5 Cultura *in vitro* de células musculares esqueléticas (SkMCs, C2C12)

As células de linhagem C2C12 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A cultura das células como mioblastos foi realizada em garrafas de 75 cm² sem atingir mais do 60% de confluência, em meio de crescimento: DMEM alta glicose suplementado com HEPES 25 mM, piruvato de sódio 1 mM, 10% SFB e 1% penicilina + estreptomicina (Vitrocell). O repique foi feito a cada três dias tripsinizando com 3 mL de Tripsina/EDTA 2,5g/L (Vitrocell) e recultivando 1,5 x 10⁵ células em 12 mL de meio de crescimento.

A indução da miogênese foi feita como descrito por Herbst e colaboradores (99) (**Figura 6**). Os mioblastos foram tripsinizados da cultura de manutenção e cultivados em placas de plástico de 6 poços (Corning) e placas de petri pequenas (Nunc-LabTek, Thermo Scientific-Thermo Fisher Scientific) com 10.000 células/cm² em meio de crescimento a 37 °C com 5% de CO₂ até atingirem 90-100% de confluência (3-4 dias). Após atingirem a confluência o meio de crescimento foi trocado para meio de diferenciação: DMEM (25 mM glicose, 4 mM L-glutamine, 44 mM bicarbonato de sódio) suplementado com HEPES 25 mM, piruvato de sódio 1 mM, 5% soro de cavalo (SC, Gibco) e 1% penicilina + estreptomicina. O meio de diferenciação foi substituído cada 48 h, e 4-5 dias depois do início da substituição de meio de diferenciação os miotubos começaram a aparecer. A cultura chega no número máximo de miotubos e se contraem espontaneamente de 3-4 dias depois de aparecerem os miotubos. Durante o processo de diferenciação, amostras de proteína foram obtidas como controle para garantir a maturação dos miotubos.

Figura 6 - Esquema de indução de miogênese em células C2C12. As células foram inicialmente cultivadas a uma densidade de 10.000 células/cm² em meio de crescimento, quando atingiram a confluência o meio foi substituído por meio de diferenciação cada 48 h. Os primeiros miotubos apareceram nos dias 8-9 de cultura, com a presença do número máximo para o dia 12 de cultura. No esquema, D significa dia de cultura.

3.6 Purificação de promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis*

As infecções foram realizadas com promastigotas de fase estacionária e com promastigotas metacíclicos purificados por coluna de Ficoll. A purificação dos promastigotas metacíclicos foi feita por meio de um gradiente de centrifugação de Ficoll PM400 (GE Healthcare Life Sciences) como descrito por Marques-da-Silva e colaboradores (100) com algumas modificações. Assim, 20 g de Ficoll PM400 foram diluídas em 100 mL de água milli-q a 60 °C sob constante agitação, para uma concentração de 20%, e posteriormente filtrado com filtro de 0,22 µm. A solução de Ficoll 10% foi preparada a partir da mistura de 50% de Ficoll 20%, 10% de PBS 10X estéril e 40% de água milli-q estéril, para um volume final de 4 mL.

A cultura de *L. (L.) amazonensis* foi iniciada com 1×10^5 parasitos/mL em meio Grace suplementado com 10% SFB por 6-7 dias, o período no qual a cultura chega na fase estacionária (**Figura 7A**). No dia 7 a cultura foi lavada duas vezes com PBS, centrifugada a 1540 xg por 10 min a 4 °C, no final sendo ressuspensa em 1 mL de DMEM para contagem. Para a preparação

da coluna de gradiente de centrifugação, após a contagem a cultura de parasitos foi ressuspendida em 2 mL de DMEM a cada 10^9 parasitos, e foram colocados em um tubo cônico de 15 mL. Posteriormente, a solução de Ficoll 10% foi adicionada sob a suspensão de parasitos, e a coluna foi centrifugada a $1070 \times g$ por 15 min a 25°C com aceleração lenta e sem freio. Depois, foram coletados 3 mL da parte superior da coluna que contém os promastigotas metacíclicos, e centrifugados a $2000 \times g$ por 10 min a 4°C . Finalmente, os parasitos foram lavados duas vezes com 10 mL de PBS centrifugando a $1540 \times g$ por 10 min a 4°C , o sobrenadante foi descartado e a suspensão contendo os parasitos ressuspendida em 1 mL de DMEM para contagem. Adicionalmente, amostras de parasitos purificados foram corados com Giemsa para observar a morfologia e a qualidade após a purificação (**Figura 7B**). As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMLB acoplado com câmera Leica DFC265.

Figura 7 - Cultura in vitro de *L. (L.) amazonensis*. (A) A cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi iniciada com 1×10^5 parasitos/mL em meio Grace suplementado com 10% de SFB. A curva foi realizada a partir da contagem diária dos parasitos em câmera de Neubauer durante 8 dias. (B) Amostra de parasitos de *L. (L.) amazonensis* purificados por coluna de Ficoll e corados com Giemsa.

3.7 Infecção experimental *in vitro*

As fibras dissociadas a partir do músculo FDB foram incubadas por 48 h à temperatura de 37°C com 5% CO_2 , e posteriormente infectadas com parasitos de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 10:1 (parasito: fibra) e mantidas a 33°C com 5% CO_2 por 72 h. Os ensaios de infecção de SkMCs (mioblastos) foram feitos em placas de 24 poços com lamínulas de vidro de 13 mm, contendo 3×10^4 células por poço em meio de crescimento. As células foram incubadas por 24 h a 37°C com 5% de CO_2 . Posteriormente foram infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 2:1

(parasitos: célula) e incubadas *overnight* a 33 °C com 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, os parasitos não aderidos foram lavados, o meio foi substituído e a infecção foi incubada até as 72 h.

Figura 8 - Número de células presentes na cultura durante a diferenciação. Uma cultura de SkMCs em diferenciação foi tripsinizada e as células contadas com o fim de comprovar que não havia crescimento celular depois de iniciado o processo de diferenciação, e estabelecer o número de células presentes no momento da infecção (Kruskal-Wallis $p=0,907$).

Prévio aos ensaios de infecção, uma cultura de miotubos foi tripsinizada e contada durante os dias 5, 6 e 8 de cultura em câmara Neubauer (Bright-Line-Precicolor HBG, Germany) para confirmar que depois do processo de diferenciação as células não se multiplicavam e também o número de células na cultura (Kruskal-Wallis $H=0,268$; $p=0,907$), essa foi a base para estabelecer o número de parasitos a serem usados durante a infecção (**Figura 8**). Os miotubos foram mantidos em placas de 6 poços ou em placas de petri pequenas até o dia 12 de cultura, onde o máximo número de miotubos foi atingido (**Figura 6**) e foram infectados com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 1:1 e incubadas em meio sem soro *overnight* a 33 °C com 5% de CO₂. Após o tempo de incubação os parasitos não aderidos foram lavados, o meio foi substituído e a infecção foi incubada até as 72 h, tempo em que o vacúolo parasitóforo pode ser observado sem comprometer a viabilidade do cultivo celular.

3.8 Extração de proteína

O protocolo de extração de proteína foi feito como descrito por Swierzy & Luder (101) com modificações. Para extrair a proteína da cultura de mioblastos, a cultura foi lavada duas

vezes com PBS, tripsinizada e centrifugada a 300 xg por 10 min para retirar os restos de enzima. Depois, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise RIPA (Thermo Scientific) suplementado com 1 X de coquetel de inibidor de proteases e 1 X de EDTA (Thermo Scientific), e incubadas por 1 h a 4 °C. Após incubação, a suspensão de proteínas foi centrifugada a 12000 xg por 5 min a 4 °C, e as proteínas solúveis foram armazenadas a -20 °C.

Para obter proteína de miotubos em placas de 6 poços, a cultura foi lavada duas vezes com PBS, e adicionado buffer de lise RIPA suplementado com 1 µL de coquetel de inibidor de proteases e 1 µL de EDTA. Depois, a suspensão de proteína foi feita com raspador de células (Corning), e incubada por 1 h a 4 °C. Finalmente, a suspensão de proteínas foi centrifugada a 12000 xg por 5 min a 4 °C, e a porção de proteínas solúveis foi armazenada a -20 °C.

Para obter proteína de músculo maduro, o músculo FDB foi cirurgicamente isolado de camundongos C57BL/6 e mantido na solução Tyrode. Depois, o tecido foi incubado com buffer de lise RIPA suplementado com 1 µL de coquetel de inibidor de proteases e 1 µL de EDTA por 1 h a 4 °C. Após incubação, o tecido foi macerado com homogeneizador (Radnoti, Monrovia, CA, Estados Unidos) e a solução de proteínas foi centrifugada a 12000 xg por 5 min a 4 °C. As proteínas solúveis foram armazenadas a -20 °C.

3.9 Western Blotting

A quantificação das proteínas foi feita pelo BCA Protein Assay kit (Pierce-Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A separação das proteínas totais foi realizada em gel de poliacrilamida de 10 ou 15% com 0,4% de SDS (SDS-PAGE) em tampão de corrida (Tris, glicina e SDS). A corrida do gel foi feita no sistema de eletroforese Mini-Protean (BioRad) a 80V por 30 min e depois a 120V por 1 h e 30 min aproximadamente. Foram utilizados 3 µL de marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (BioRad) e de 20-40 µg de proteína por amostra. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences) a 250 mA por 3 h em tampão de transferência (Tris, glicina, 20% metanol). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas em 2% de leite desnatado preparado em TBS-T 0,01% por 1 h à temperatura ambiente. Os anticorpos primários (**Tabela 1**) foram incubados *overnight* diluídos em leite desnatado 1% preparado em TBS-T 0,01% a 4 °C. Os anticorpos secundários (**Tabela 1**) foram incubados por 1 h em leite desnatado 1% preparado em TBS-T 0,01% a temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos, as membranas foram lavadas 5 vezes em TBS-T 0,01% e

reveladas com o kit de quimiluminiscência SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat (Thermo Scientific) e o equipamento ChemiDoc™ XRS+ (BioRad).

Tabela 1 - Lista de anticorpos primários e secundários utilizados no *Western Blotting*.

Anticorpo primário	Diluição	Peso molecular (kDa)
Caveolina 1 (BD Biosciences)	1:500	21-24
Caveolina 3 (Abcam)	1:500	17
Actina esquelética (Abcam)	1:1000	42
iNOS (Abcam)	1:1000	130
Anticorpo secundário (Imuny)	Diluição	Peso molecular (kDa)
Anti-mouse IgG conjugado com HRP	1:1000	-
Anti-coelho IgG conjugado com HRP	1:5000	-

3.10 Imunofluorescência indireta e microscopia confocal

A imunofluorescência foi utilizada para a observação de fibras musculares e SkMCs, e a quantificação dos parasitos intracelulares. Posterior aos ensaios de infecção, a cultura aderida em lamínulas foi lavada duas vezes com PBS e fixada com metanol 100% frio (Synth, Diadema, SP, Brasil). Foram feitas duas lavagens com PBS e o bloqueio, com solução permeabilizadora/bloqueadora contendo 0,1% de BSA e 0,1% de saponina em tampão TBS por 1 h. Após bloqueio, as amostras foram lavadas uma vez com PBS e incubadas por 2 h com o anticorpo primário policlonal anti-*Leishmania* (produzido em coelho) diluído 1:500 em solução permeabilizadora/bloqueadora. Depois, foi feita a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific-Thermo Fisher Scientific) diluído 1:1000. Junto com o anticorpo secundário foi incubado o DAPI para detecção de DNA das células e dos parasitos, diluído também 1:1000 em solução permeabilizadora/bloqueadora. Finalmente a montagem das amostras foi feita com ProLong (Molecular Probes-Life Technologies-Thermo Fisher Scientific). Todo o procedimento de incubação com anticorpos foi feito ao abrigo da luz e em câmara úmida.

Imagens das células fixadas infectadas e não infectadas foram adquiridas em microscópio de fluorescência Leica Microsystems DMI6000B/AF6000 acoplado com um sistema de câmera digital DFC 365 FX. Para a análise da infecção, foram quantificadas células totais, células infectadas, número de parasitos intracelulares, número de núcleos em cada miotubo e foram medidos o comprimento dos miotubos e o diâmetro maior dos vacúolos parasitóforos. O

processamento das imagens foi feito com o software incorporado ao sistema Leica AF6000 e com Image J 1.49.

Miotubos infectados durante 72 h com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* foram marcados com imunofluorescência indireta e observados em microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO para obter imagens multidimensionais e cortes em profundidade, com o objetivo de confirmar a presença do parasito no citoplasma das células infectadas. A microscopia confocal é considerada uma ferramenta muito útil nos estudos da biologia de *Leishmania* (102), pelo que permite realizar observações detalhadas e em alta definição de fenômenos particulares de interesse para os pesquisadores.

3.11 Marcação de pH de vacúolo parasitóforo de *L. (L.) amazonensis* em SkMCs

As SkMCs foram mantidas em cultura e infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 1:1 e incubadas em meio sem soro *overnight* a 33 °C com 5% de CO₂. A marcação do pH do vacúolo parasitóforo das SkMCs infectadas foi feito de acordo com o descrito por Krolenko e colaboradores (103). Após o tempo de incubação os parasitos não aderidos foram lavados, o meio foi substituído e a infecção foi incubada até as 72 h. Após as 72 h de infecção o meio foi substituído por meio sem soro com 1 µg/mL de Laranja de acridina (AO) (Sigma-Aldrich) e 5 µM de Hoechst por 30 min a 37 °C com 5% CO₂. Como controle da marcação da laranja de acridina, células RAW foram cultivadas e infectadas de forma paralela com as SkMCs. A visualização da marcação foi feita em microscópio de fluorescência Leica Microsystems DMI6000B/AF6000 acoplado com um sistema de câmera digital DFC 365 FX.

3.12 Teste de viabilidade de parasitos internalizados por SkMCs

Os miotubos foram mantidos em placas de 6 poços até o dia 12 de cultura. As células foram infectadas com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 1:1 incubada até 72 h a 33°C. Após o tempo de incubação os poços foram lavados duas vezes com PBS e o meio foi substituído por meio Grace com 10% de SFB. O tapete de células foi raspado usando a ponta da ponteira de 1000 µL para danificar levemente o tapete de células, com o objetivo de facilitar a liberação dos parasitos internalizados presentes nos vacúolos parasitóforos. A cultura foi mantida a 25 °C. Após 72 h os parasitos liberados das células que se transformaram em promastigotas foram quantificados usando câmera Neubauer.

3.13 Avaliação da produção de óxido nítrico e citocinas

Após os ensaios de infecção (72 h), o meio (sobrenadante) da cultura foi coletado e centrifugado a 2095 xg por 10 min e mantido a -80 °C até análise. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada por meio da quantificação de nitrito com o kit Measure-IT High-Sensitivity Nitrite Assay (Thermo Scientific). A leitura da fluorescência foi realizada no equipamento SpectraMax i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) acoplado com o software SoftMax Pro 6.4. O comprimento de onda de excitação foi 365 e de emissão foi 450, com resultados obtidos baseados na curva padrão.

A dosagem de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10) presentes no sobrenadante de cultura de SkMCs que foram infectadas com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* por 72 h, foi feita por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizando “Mouse ELISA Max” (BioLegend, San Diego, CA, USA), seguindo as especificações do fabricante. Placas de 96 poços com fundo chato foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em tampão pH 9,5 na proporção de 1:200 e incubadas *overnight* à 4 °C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20) e incubadas por 1 h com tampão de bloqueio (PBS/SFB 10%). Após a etapa de bloqueio, as placas foram lavadas novamente e incubadas por 2 h com as amostras, controle e a diluição seriada da curva padrão (começando com uma concentração de 2 ng/mL e diluindo 10 vezes). Após esse período, as placas foram lavadas novamente e foi adicionado o anticorpo de detecção na proporção de 1:200 por 1 h. A seguir, foi realizada a lavagem da placa e foi adicionada a streptavidina peroxidase na proporção de 1:1000 por 30 min. Por fim, após um novo ciclo de lavagem, foi adicionado o substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB, BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). A reação foi interrompida pela adição de ácido fosfórico (H₃PO₄ 1 M). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão e expressos em pg/mL.

3.14 Caracterização da cultura de células musculares esqueléticas

A cultura de células musculares esqueléticas (SkMCs-miotubos) foi caracterizada por meio do perfil de expressão das proteínas Caveolina 1 (Cav1), a qual está presente de forma constante na cultura, e Caveolina 3 (Cav3) que aparece ao longo do processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos. O músculo FDB foi macerado, a porção de proteína solúvel foi processada por western blotting e marcada com anticorpo para Cav3 (**Figura 9**). Assim, foi

possível observar que o músculo maduro expressa a Cav3 e que a quantidade ótima de proteína para ser detectada é de 20 µg para seu uso como controle positivo.

A diferenciação das células musculares esqueléticas foi monitorada com o perfil de expressão de Cav1 e Cav3 desde que a cultura atinge a confluência até o dia 12, quando a cultura apresenta o maior número de miotubos. Assim, foi observada a presença constante da Cav1 e a expressão crescente no caso da Cav3 (**Figura 10A e B**). Adicionalmente, o perfil de expressão de Cav3 de seis culturas independentes de miotubos foi avaliada no dia 12 de cultura, com o fim de estabelecer que as culturas a serem usadas durante a infecção com *L. (L.) amazonensis* estivessem homogêneas quanto ao conteúdo de miotubos, o qual foi comprovado com a análise de densitometria das bandas de proteína de Cav3 com respeito à actina (**Figura 11**). Finalmente, foi quantificado o grau de associação entre o número de núcleos e o comprimento do miotubo. Existe uma forte correlação entre as duas variáveis (Correlação de Spearman $r_s=0,624$, $p<0,05$; **Apêndice A**), indicando que na maior parte dos casos durante o processo de diferenciação das células musculares, ocorre a fusão de um número maior de células, o comprimento do miotubo incrementa.

3.15 Tratamento com SLO e infecção de SkMCs

Para este experimento os miotubos foram mantidos em placas de 6 poços até o dia 12 de cultura. Nesse dia, dois poços foram tratados com 800 ng/mL de estreptolisina O (SLO) (Sigma-Aldrich) por 5 min a 4 °C em DMEM. Após incubação, os poços tratados foram lavados com PBS duas vezes. Depois, um poço tratado e um poço não tratado foram infectados com cultura de promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* em proporção de 1:1 e incubados *overnight* a 33 °C com 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, o meio foi substituído por meio novo e a cultura foi mantida até as 72 h. Adicionalmente, foi mantida cultura de células não tratadas e não infectadas como controle. Após o período total de incubação, foi coletado 1 mL de meio (sobrenadante) e RNA total e armazenados a -20 °C. Além disso, antes e depois do tratamento as culturas foram fotografadas e filmadas com o microscópio invertido Zeiss Axio Vert.A1 acoplado com câmara Zeiss AxioCam 105 Color.

Figura 9 - Níveis de proteína Caveolina 3 em músculo FDB. Proteína obtida a partir de músculo FDB foi processada por western blotting e marcada com anticorpo para Cav3 em três concentrações. Adicionalmente foi feita a marcação com anticorpo para actina como controle da quantidade de proteína. Imagem representativa de três experimentos independentes.

diferenciação de células C2C12. Processada por western blotting e marcada com anticorpos para (A) Cav1 e (B) Cav3. Como controle positivo foi usada a proteína do músculo FDB, e actina como controle da quantidade de proteína. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Figura 11 - Níveis de proteína Caveolina 3 em seis diferentes culturas de SkMCs. Proteína obtida no dia 12 de cultura de células C2C12 em diferenciação foi processada para western blotting e marcada com anticorpo para Cav3. Como controle positivo foi usada a proteína do músculo FDB, e actina como controle da quantidade de proteína. Imagens representativas de três experimentos independentes. A densitometria das bandas de Cav3 foi realizada usando as bandas controle de actina.

Figura 10 - Níveis das proteínas Caveolina 1 e Caveolina 3 em culturas em diferenciação de SkMCs. Proteína obtida no momento da confluência e nos dias 4, 8 e 12 de culturas em

3.16RT - qPCR

O RNA total de miotubos tratados e não tratados com SLO, infectados e não infectados com *L. (L.) amazonensis* foi extraído e purificado com o kit *Quick-RNA MiniPrep* (Zymo Research, Irvine, CA, Estados Unidos) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, a quantificação do RNA foi feita em NanoDrop (Thermo Scientific) e posteriormente armazenado a -20 °C. Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit *SuperScript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante, partindo de 5 µg de RNA total e na presença de 0,5 mM dNTPs e 20 µM de oligo (dT) (Invitrogen), sendo ao final do processo o cDNA armazenado a -20 °C.

A amplificação dos transcritos foi feita no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems-Life Technologies) acoplado com o StepOne Software, em placa para PCR específica para o equipamento e selada com adesivos (Applied Biosystems). A reação foi feita com 50 ng de cDNA, 0,4 µM de cada primer (*forward* e *reverse*) (EXXTEND, Campinas, SP, Brasil ou IDT - Integrated DNA Technologies) (**Tabela 2**), e 7,5 µL da enzima Maxima SYBER Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) em um volume de reação de 15 µL. O programa de qPCR foi feito como descrito a seguir: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 10 min e 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15s, anelamento a 55 °C por 30s, extensão a 72 °C por 30s. As análises foram feitas para três experimentos biológicos independentes e para cada experimento as medições foram feitas com três repetições técnicas. A quantificação relativa da expressão genica foi obtida normalizando os dados com a expressão dos genes de referencia (HPRT1 ou UbH) pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (104). O protocolo geral para a realização da PCR foi feito seguindo as sugestões de Bustin e Colaboradores (105).

Tabela 2 - Lista de primers utilizados na reação de PRC em tempo real.

Gene	Primer <i>Forward</i>	Primer <i>Reverse</i>
<i>Hprt1</i>	5'-TCAGTCAACGGGGGACATAAA-3'	5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3'
<i>Lyst</i>	5'-AGCAGAAGGTGATAGACCAGAA-3'	5'-CCCACACTTGGATCATCAATGC-3'
<i>iNOS</i>	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'	5'-CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG-3'
<i>IL-1β</i>	5'-TGGTGTGTGGACGTTCCCATTA-3'	5'-CAGCACGAGGCTTTTTTGTG-3'
<i>IL-6</i>	5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3'	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
<i>UbH</i>	5'-AACGTGAACAACCTGGATGTGCGTC-3'	5'-ATGGTACCAAGCTTGACACATGCC-3'

Ama2 5'-CATCTTCGTGTACGGCTTTGCGTT-3' 5'-TTGGGTAAGTCACCACCATGAGCA-3'

3.17 Análise de dados

Todos os ensaios foram feitos por duplicata ou triplicata biológica, e os ensaios *in vivo* com $n=3$. As análises estatísticas e as gráficas dos resultados foram feitas nos programas GraphPad Prism 6, STATISTICA 8 e EXCEL. A distribuição normal dos dados foi avaliada com a prova Shapiro-Wilk's W e a homogeneidade das variâncias com a prova de Levene's.

Na comparação de dois ou três grupos com dados que obedeciam aos supostos de análises paramétricos foram usados o teste de t e ANOVA respectivamente, sendo a ANOVA acoplada com prova posterior de comparações múltiplas. Na comparação de três grupos com dados que não apresentavam distribuição normal, mas sim homogeneidade nas variâncias, foi usado o teste Kruskal-Wallis, sendo acoplada com teste de Dunn de múltiplas comparações. Na comparação de dois ou mais grupos com dados que seguiam a distribuição normal, mas não apresentavam homogeneidade nas variâncias foi usado o teste t ou a ANOVA com correção de Welch's, esta última acoplada com o teste de Games-Howell para múltiplas comparações. Na comparação de dois ou três grupos com dados que não obedeciam aos supostos de análises paramétricos foram usados os testes não paramétrico de t e ANOVA baseados em permutações, sendo a ANOVA acoplada com prova posterior de comparações múltiplas para grupos independentes.

Adicionalmente, para estabelecer o grau de associação entre duas variáveis independentes foi usado o Coeficiente de Correlação de Postos de Spearman, o qual não faz suposições sobre a distribuição de frequências ou da relação entre as variáveis. Para todas as análises estatísticas o nível de significância foi considerado com valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Internalização de *Leishmania* em fibras musculares *in vivo*

4.1.1 Infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 e BALB/c observada em cortes histológicos

O crescimento da lesão dos camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados na pata traseira com *L. (L.) amazonensis* foi monitorado por 6 semanas (**Figura 12**). A partir do músculo FDB destes camundongos infectados foram realizados cortes histológicos corados com hematoxilina/eosina. Nos cortes foi observada a presença de infiltrado inflamatório abundante a dano no tecido muscular com perda da estriação nas fibras musculares. Os parasitos foram observados infectando células do infiltrado e também de forma menos frequente as fibras musculares (**Figura 13**). O número de vacúolos parasitóforos encontrados por corte histológico foram quantificados, mas não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as duas linhagens de camundongo (Teste de t com correção de Welch $t=2,295$, $df=7,680$ $p=0,052$) (**Figura 14**).

Figura 12 - Monitoramento do crescimento da lesão de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. (A) Aspecto da lesão na pata traseira de camundongo C57BL/6 infectado por 6 semanas com *L. (L.) amazonensis* e crescimento da lesão durante o tempo de infecção. **(B)** Aspecto da lesão na pata traseira de camundongo BALB/c infectado por 6 semanas com *L. (L.) amazonensis* e crescimento da lesão durante o tempo de infecção. Barras de erro mostram o desvio padrão.

Figura 13 - Histologia de músculo FDB infectado com *L. (L.) amazonensis*. O músculo FDB de camundongos infectados foi extraído e colorido com hematoxilina e eosina. **(A e B)** Imagens de cortes histológicos de músculo FDB de camundongo C57BL/6 infectado por 6 semanas com *L. (L.) amazonensis*. **(A)** Corte histológico que mostra o infiltrado inflamatório de células do sistema imune, a danificação do tecido muscular e os amastigotas infectando os macrófagos infiltrados no tecido. **(B)** Ampliação da secção de um corte histológico mostrando a localização de um vacúolo parasitóforo dentro de uma fibra muscular. **(C e D)** Imagens de cortes histológicos de músculo FDB de camundongo BALB/c infectado por 6 semanas com *L. (L.) amazonensis*. **(C)** Corte histológico que mostra o infiltrado inflamatório de células do sistema imune, a danificação do tecido muscular e os amastigotas infectando os macrófagos infiltrados no tecido. **(D)** Ampliação da secção de um corte histológico mostrando a localização de um vacúolo parasitóforo dentro de uma fibra muscular. As setas indicam a presença de um vacúolo parasitóforos na fibra muscular.

Figura 14 - Quantificação dos vacúolos parasitóforos presentes em cortes histológicos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Em cada corte histológico analisado do músculo FDB de camundongos C57BL/6 e BALB/c foi quantificado o número de vacúolos parasitóforos (VP), mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na infecção entre as duas linhagens de camundongo (Teste de t com correção de Welch $p=0,052$). Barras horizontais representam a média.

4.1.2 Infecção *in vivo* de camundongos C57BL/6 observada com imunohistoquímica

Através da análise histológica foi observada a presença do infiltrado inflamatório com células infectadas e de vacúolos parasitóforos dentro das fibras musculares, principalmente em camundongos C57BL/6. Assim, com o objetivo de descrever com maior detalhe a infecção *in vivo*, camundongos C57BL/6 foram infectados com *L. (L.) amazonensis* na pata traseira, o crescimento da lesão foi monitorado por 5 semanas (**Figura 15**), e o músculo FDB foi processado para análise por imunohistoquímica com marcação para *Leishmania*.

Nestes cortes histológicos foi observada, de igual forma que na coloração com hematoxilina e eosina, a presença de infiltrado inflamatório, o tecido muscular danificado com perda da estriação e a estrutura das fibras musculares e parasitos infectando os macrófagos do infiltrado inflamatório e fibras musculares (**Figura 16**). Com esta análise foi possível obter maiores detalhes sobre a presença dos parasitos dentro das fibras musculares. Foram observados vacúolos parasitóforos com vários parasitos (**Figura 16A e B**) e também com um parasito só (**Figura 16C e D**), assim como vacúolos parasitóforos de diferentes tamanhos e formas. Alguns dos vacúolos foram observados perto de núcleos celulares (**Figura 16D**).

Figura 15 - Monitoramento do crescimento da lesão de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*. Aspecto da lesão na pata traseira de camundongo C57BL/6 infectado com *L. (L.) amazonensis* e crescimento da lesão durante as 5 semanas de infecção. Barras de erro mostram o desvio padrão.

Diferentes características desta infecção *in vivo* de fibras musculares foram quantificadas nos cortes histológicos de três músculos (**Figura 17**). No número de parasitos totais por corte histológico foram quantificados em média de 10-20 parasitos, com uma diferença estatisticamente significativa entre os músculos um e dois (Kruskal-Wallis $H=7,039$, $p=0,029$) (**Figura 17A**). Para o número de parasitos por cada vacúolo parasitóforo foram contados em média dois parasitos, podendo atingir até quatro parasitos, com uma diferença estatisticamente significativa entre os músculos um e três (ANOVA de Welch $F=3,607$, $df=2,404$, $p=0,028$) (**Figura 17B**). Na quantificação do número de vacúolos parasitóforos totais por corte histológico, se observou em média de 10-20 vacúolos dentro das fibras musculares por corte histológico sem diferenças estatisticamente significativas entre os músculos analisados (Kruskal-Wallis $H=4,370$, $p=0,112$) (**Figura 17C**). Finalmente, no caso do número de vacúolos associados a núcleos foram observados em média 4 ou 5 vacúolos por corte histológico, embora, em alguns casos foram quantificados mais de 15 vacúolos por corte histológico. O músculo três apresentou um número maior de vacúolos por corte histológico associados a núcleos do que os músculos 1 e 2 (ANOVA com permutações $F=6,18$, $df=2,36$ $p=0,002$; teste de t por permutações $p<0,05$) (**Figura 17D**).

Figura 16 - Imunohistoquímica de músculo FDB infectado com *L. (L.) amazonensis*. Músculo FDB de camundongos C57BL/6 infectado por 5 semanas com *L. (L.) amazonensis* marcado com anticorpo anti-*Leishmania*. **(A, B, C, D)** Cortes histológicos evidenciando infiltrado inflamatório, lesão do tecido muscular com perda de estriação estrutura do tecido, amastigotas infectando os macrófagos infiltrados no tecido, e fibras musculares infectadas apresentando vacúolos parasitóforos. **(D)** Imagem que exemplifica um vacúolo parasitóforo associado com o núcleo de uma célula. Seta e linha indicam a presença de vacúolos parasitóforos dentro das fibras musculares.

Figura 17 - Caracterização da infecção do músculo FDB de camundongos C57BL/6 com *L. (L.) amazonensis*. (A) Número de parasitos por corte histológico em três músculos independentes (Kruskal-Wallis $p=0,029$). (B) Número de parasitos por cada vacúolo parasitóforo, ponto indica a média e barras de erro mostram o desvio padrão (ANOVA de Welch $p=0,028$). (C) Número de vacúolos parasitóforos por corte histológico (Kruskal-Wallis $p=0,112$). (D) Número de vacúolos associados a núcleos (ANOVA com permutações $p=0,002$). Barras horizontais representam a média.

4.1.3 Internalização de *Leishmania* em fibras musculares *in vitro*

Com o objetivo de observar a formação do vacúolo parasitóforo nas células musculares, fibras do músculo FDB foram dissociadas e mantidas em meio DMEM como descrito nos materiais e métodos. Posteriormente, a viabilidade das fibras dissociadas foi avaliada com marcação com CFDA, Hoechst e Iodeto de Propídeo em microscópio de fluorescência. A

contagem das fibras musculares viáveis foi feita às 24, 96 e 120 h após a dissociação (**Figura 18**). Foi observado que a porcentagem média de fibras musculares viáveis diminui com o tempo de cultura, mas sem diferença estatisticamente significativa entre as 24 e as 120 h após dissociação (Anova $F=3,256$, $df=2$ e 6 , $p=0,110$).

Figura 18 - Teste de viabilidade de fibras musculares após tratamento com collagenase. (A) Porcentagem de sobrevivência das fibras musculares após dissociação com collagenase tipo I em 24, 96 e 120 h sem diferença estatisticamente significativa (Anova $p=0,110$). Dados obtidos a partir de três ensaios independentes. (B e C) Imagens representativas de fibras musculares para observar a viabilidade. (B) Contraste de fase e (C) fluorescência. Fibras em verde com núcleos azuis correspondem a fibras vivas (seta), e fibras vermelhas correspondem a fibras quebradas e mortas (cabeça de seta). Verde: CFDA (2,5mM); Azul: Hoechst (5 μ M); Vermelho: Iodeto de propídeo (50 μ g/mL).

Uma vez verificada a viabilidade das células após tratamento, procedeu-se à infecção das fibras musculares com cultura estacionária de *L. (L.) amazonensis* por 2 e 72 h, sendo posteriormente marcados com anticorpo anti-*Leishmania* para observar os parasitos internalizados. Nas fibras musculares dissociadas infectadas por 2 h foram observados os parasitos aderidos na membrana da célula (**Figura 19A-C**), no caso das fibras infectadas por

72 h foi possível observar a presença de parasitos dentro das células, mas não a formação de vacúolo parasitóforo (**Figura 19D-F**).

Figura 19 - Infecção in vitro de fibras musculares com *L. (L.) amazonensis*. Fibras musculares foram dissociadas do músculo FDB com collagenase tipo I, mantidas em cultura e posteriormente infectadas com cultura estacionária de *L. (L.) amazonensis* por 2 h (**A-C**) e por 72 h (**D-F**). (**A e D**) Imagens em contraste de fase da estrutura completa da fibra muscular com os parasitos associados. (**B e E**) Imagens em contraste de fase que mostram o aumento de uma secção da fibra muscular e a presença dos parasitos. (**C e F**) Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul).

4.2 Internalização de *Leishmania* em células musculares esqueléticas (SkMCs)

4.2.1 Internalização de *Leishmania* em mioblastos

Para comprovar a capacidade do parasito de infectar células musculares esqueléticas, mioblastos (células satélite) foram infectados com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* por 72 h, e posteriormente marcados com anticorpo anti-*Leishmania* com o qual foi possível observar a formação dos vacúolos parasitóforos dentro das células (**Figura**

20). Na caracterização da infecção dos mioblastos foram observados em média de 170 até 200 parasitos por cada 100 células infectadas (ANOVA $F=1,563$, $df=2$ e 6 , $p=0,284$) (**Figura 21A**). Quanto ao número de parasitos por vacúolo parasitóforo, 75% dos vacúolos apresentaram 1 ou 2 parasitos, mas também foram observados alguns vacúolos com mais de 5 parasitos. Nesta variável o ensaio dois foi diferente do três (Kruskal-Wallis $H=9,212$, $p=0,010$; teste de Dunn's $p<0,05$) (**Figura 21B**). O comprimento maior dos vacúolos parasitóforos foi medido, evidenciando que o tamanho dos vacúolos variou entre 4 e 14 μm , podendo alcançar até 20 μm . De igual forma, nesta variável o ensaio dois foi diferente do três (Kruskal-Wallis $H=7,099$, $p=0,028$; teste de Dunn's $p<0,05$) (**Figura 21C**).

Finalmente, foi avaliado o grau de associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo. Foi possível observar que existe uma correlação positiva entre as duas variáveis (Correlação de Spearman $r_s=0,318$, $p<0,05$; **Apêndice B**), indicando que na maior parte dos casos com a multiplicação do parasito dentro do vacúolo, ocorre um aumento no tamanho do vacúolo. Porém, se apresentam vacúolos com grande número de parasitos que são de tamanho reduzido.

Figura 20 - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de mioblastos com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. As células foram infectas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. (A, B C, D) Imagens representativas de células com vacúolos parasitóforos com diferente número de parasitos. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul).

Figura 21 - Caracterização da infecção de SkMCs (mioblastos) infectados com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. (A) Número de parasitos por 100 células infectadas (ANOVA $p=0,284$). Barras horizontais representam a média. **(B)** Número de parasitos por cada vacúolo parasitóforo (Kruskal-Wallis $p=0,010$). **(C)** Comprimento dos vacúolos parasitóforos (Kruskal-Wallis $p=0,028$). **(B e C)** A caixa representa os dados dentro dos percentis 25-75; o quadrado interno representa a mediana; as barras de erro representam o intervalo dos dados sem incluir os valores atípicos; o círculo representa os valores atípicos

e a cruz os valores extremos. Todos os dados foram quantificados a partir de três experimentos independentes.

4.2.2 Internalização de *Leishmania* em miotubos

4.2.2.1 Infecção de SkMCs com *L. (L.) amazonensis*

Após observar o progresso da infecção por *L. (L.) amazonensis* nos mioblastos e de estabelecer os parâmetros da cultura de miotubos, infectamos os miotubos com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* por 72 h. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* para observar a formação dos vacúolos parasitóforos e quantificar a infecção (**Figura 22**). Foram contados em média 300 parasitos por cada 30 células infectadas (**Figura 23A**). Na caracterização da infecção dos miotubos foram quantificados os mesmos parâmetros que na infecção de mioblastos. Assim, 75% dos vacúolos parasitóforos apresentaram de 1 até 3 parasitos, mas também foram observados alguns vacúolos com mais de 4 parasitos (**Figura 23B**). O tamanho dos vacúolos parasitóforos variou entre 2,5 e 25 μm (**Figura 23C**). Na infecção dos miotubos não foi observada uma associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo (Correlação de Spearman $r_s=0,089$, $p=0,296$; **Apêndice C**). Adicionalmente culturas de miotubos não infectadas e infectadas foram filmadas para mostrar a contração espontânea dos miotubos (**Anexo A-B**).

Figura 22 - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. As células foram infectas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. (A, B C, D) Imagens representativas de células com vacúolos

parasitóforos com diferente número de parasitos. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul).

Figura 23 - Caracterização da infecção de SkMCs (Miotubos) infectados com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. (A) Número de parasitos por 30 células infectadas. Barras horizontais representam a média. **(B)** Número de parasitos por cada vacúolo parasitóforo. **(C)** Comprimento dos vacúolos parasitóforos. **(B e C)** A caixa representa os dados dentro dos percentis 25-75; o quadrado interno representa a média; as barras de erro representam o intervalo dos dados sem incluir os valores atípicos; o círculo representa os valores atípicos e a cruz os valores extremos. Todos os dados foram quantificados a partir de um experimento.

Além da caracterização da infecção no microscópio de fluorescência, foram feitas imagens de microscopia confocal. Assim, miotubos infectados durante 72 h com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* foram marcados com imunofluorescência indireta (anticorpo anti-*Leishmania* e Dapi) e observados em microscópio confocal. Nas imagens obtidas foi possível comprovar a presença intracelular do parasito nos miotubos por meio da elaboração de cortes longitudinais da cultura celular (**Apêndice D-F; Anexo C-E**).

Como parte da caracterização da infecção dos miotubos foi realizado um ensaio preliminar sobre o pH dos vacúolos parasitóforos presentes em mioblastos e miotubos. Assim, células infectadas por 72 h foram incubadas com laranja de acridina (AO) e Hoechst por 30 min, e a marcação foi observada em microscópio de fluorescência. Os vacúolos parasitóforos dos três tipos de células avaliados (células RAW, mioblastos e miotubos) foram observados com marcação de cor laranja-vermelha, indicando um ambiente ácido dentro dos vacúolos (**Figura 24**). Porém, a marcação dos vacúolos parasitóforos dos miotubos algumas vezes foram fracas, pelo qual o ensaio deve de ser repetido e avaliado em profundidade.

Figura 24 - Avaliação da acidez do vacúolo parasitóforo de *L. (L.) amazonensis* em SkMCs. Células infectadas (RAW, mioblastos e miotubos) por 72 h foram incubadas com AO para marcar compartimentos ácidos e básicos, e Hoechst para marcar os núcleos. As células RAW foram usadas como controle positivo da marcação. A coluna da esquerda mostra as imagens das células em contraste de fase e a coluna da direita mostra as imagens das células com a dupla marcação (AO + Hoechst), mostrando o citoplasma das células em verde (básico), os vacúolos parasitóforos em laranja-vermelho

(ácidos) e os núcleos em azul. A fila superior mostra as células RAW, a fila do centro os mioblastos e a fila inferior os miotubos. As cabeças das setas indicam a presença de vacúolos parasitóforos. Imagens representativas de um experimento.

Além de caracterizar a infecção nos miotubos, foi observado o perfil de proteínas da cultura celular sem infectar e após 72 h de infecção. Foram avaliadas a Cav1 e a Cav3 para estabelecer a integridade da cultura durante a infecção e a presença de iNOS para monitorar os sinais de atividade leishmanicida no tecido muscular. No perfil de Cav1 e Cav3 não foi observada nenhuma mudança (**Figura 25A, B**); quanto para o iNOS, foi observada uma produção basal por parte das células musculares, sem diferença entre a cultura infectada ou não (**Figura 25C**). Adicionalmente, a quantidade de nitrito no sobrenadante da cultura celular foi quantificada, mas não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a cultura não infectada e a cultura infectada (Test de t $p=0,357$) (**Figura 26**).

Figura 25 - Níveis de proteína Caveolina 1, Caveolina 3 e iNOS em culturas não infectadas e infectadas de SkMCs. Proteína de músculo FDB e de cultura de células C2C12 não infectadas e infectadas após 72h, foi processada por western blotting e marcada com anticorpos para (A) Cav1, (B) Cav3 e (C) iNOS. Como controle positivo foi usada a proteína do músculo FDB, e actina como controle da quantidade de proteína. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Figura 26 - Quantificação da produção de nitrito em SkMCs infectadas ou não com *L. (L.) amazonensis*. Culturas de SkMCs foram infectadas ou não com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* e incubadas por 72 h. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a cultura não infectada e a cultura infectada em quanto à produção de nitrito (Test de t $p=0,357$). A concentração do nitrito se mostra em µM. Barras horizontais representam a média. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes.

Com o objetivo de estabelecer se os parasitos internalizados pelas SkMCs continuavam viáveis após a formação do vacúolo parasitóforo, culturas de miotubos infectados por 72 h foram lavadas, o meio foi substituído por Grace com 10% de SFB, e a cultura levemente danificada para facilitar a liberação dos parasitos presentes nos vacúolos parasitóforos. Após 72 h de incubação a 25°C, foram observados os promastigotas resultado da diferenciação dos amastigotas intracelulares (**Figura 27**), demonstrando que a *Leishmania* depois de ser internalizada pelos miotubos e permanecer no vacúolo parasitóforo continua viável.

Figura 27 - Quantificação da viabilidade dos parasitos internalizados por SkMCs. Os miotubos foram infectados e incubados por 72 h. Posteriormente as culturas foram lavadas e o meio substituído por meio de cultura para promastigotas de *Leishmania* (Grace), e o tapete de células danificado para facilitar a liberação dos parasitos presentes nos vacúolos parasitóforos. Após 72 h de incubação os amastigotas tinham se diferenciado em promastigotas e foram quantificados. Quantificação de parasitos em N° de parasitos/mL. Barras horizontais representam a média. Dados obtidos a partir de dois experimentos independentes.

4.2.2.2 SkMCs pré-tratadas com SLO e infectadas com *L. (L.) amazonensis*

Com o objetivo de indagar de forma preliminar qual é o mecanismo que a *Leishmania* usa para infectar as SkMCs, culturas de miotubos de 12 dias foram infectadas ou não com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis*, e pré-tratadas ou não com estreptolisina O (SLO). O SLO foi usado por sua capacidade para danificar a membrana celular pela formação de poros (81,82), favorecendo o dano na cultura de células musculares. Dessa forma, através da resposta imune das células estabelecer se com o dano nas células a infecção aumenta. Para todas as culturas foi quantificada a produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10; a produção de NO; e a expressão genica de *Ama2*, *UbH*, *IL-1 β* , *IL-6*, *Lyst*, *iNOS* e *Hprt1*.

A dosagem de citocinas foi realizada após 72 h de infecção por meio de uma prova de ELISA. A produção de IL-1 β foi inferior a 2,3 pg/mL em todos os grupos avaliados (Não infectado, infectado, tratado com SLO, tratado com SLO + infectado), apresentando um valor extremo no grupo tratado e infectado, mas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA com permutações $F=0,556$, $df=3,8$ $p=0,966$) (**Figura 28A**). A produção de IL-6 foi inferior a 43 pg/mL em todos os grupos, exceto no grupo tratado com SLO que apresentou concentrações maiores. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo não infectado e o tratado, e entre o grupo infectado e o tratado (ANOVA com permutações $F=2,310$, $df=3,8$, $p=0,037$) (**Figura 28B**). No caso da produção de IL-10, a concentração foi inferior a 35 pg/mL para todos os grupos, sendo o grupo tratado com SLO e infectado os que tiveram maiores concentrações de IL-10. Embora não tenha sido encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a produção de IL-10, foi possível observar que a infecção e o tratamento são fatores que induzem sua produção (ANOVA $F=3,507$, $df=3,8$ $p=0,069$) (**Figura 28C**).

A expressão dos genes *Ama2*, *UbH*, *IL-1 β* , *IL-6*, *Lyst*, *iNOS* e *Hprt1* foi quantificada a partir de culturas de SkMCs infectadas e/ou tratadas com SLO incubadas até as 72 h de infecção. De acordo com a expressão dos genes *Ama2* e *UbH* que indicam a presença do parasito na célula, o tratamento com o SLO pode favorecer o aumento da infecção nos miotubos (*Ama2*: ANOVA com permutações $F=201,185$, $df=3,8$, $p=0,002$; *UbH*: ANOVA com permutações $F=4134,991$, $df=3,8$, $p=0,0004$; teste de t por permutações $p<0,05$) (**Figura 29A e B**). Por outra parte, em quanto à produção de citocinas IL-1 β e IL-6, foi observado que a indução destes genes é estimulada apenas pela infecção e não significativamente pelo tratamento com SLO (IL-1 β : ANOVA com permutações $F=6,408$ $df=3,28$, $p=0,002$; IL-6: ANOVA com permutações $F=7,337$ $df=3,32$, $p=0,0004$; teste de t por permutações $p<0,05$) (**Figura 29C e D**). Pelo

contrário, foi observado que a indução do gene *Lyst* é estimulada pela infecção e pelo tratamento com SLO, sendo o grupo pré-tratado e infectado o que apresentou maior indução deste gene (ANOVA com permutações $F=5,109$, $df=3,29$, $p=0,006$; teste de t por permutações $p<0,05$) (**Figura 29E**). Finalmente, na indução da produção de iNOS foi observado que a infecção com o parasito é o que gera o estímulo para a transcrição do gene (ANOVA com permutações $F=4,601$, $df=3,28$, $p=0,010$; teste de t por permutações $p<0,05$) (**Figura 29F**), mas isso não se refletiu na quantificação de nitrito correspondente aos mesmos grupos (ANOVA $F=0,576$, $df=3,8$, $p=0,646$) (**Figura 30**).

Figura 28 - Quantificação da produção de citocinas em culturas de SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis*. Culturas de SkMCs foram infectadas e/ou tratadas com SLO e incubadas até 72 h, posteriormente a partir do meio de cultura foi quantificada a produção de citocinas (A) IL-1 β , (B) IL-6 e (C) IL-10 por meio de uma prova de ELISA. Diferencias estatisticamente significativas entre os grupos somente foram encontradas na produção de IL-6 (ANOVA com permutações $p=0,037$). A concentração das citocinas se mostra em pg/mL. Barras horizontais representam a média. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes.

Figura 29 - Expressão genica em SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* e/ou tratadas com SLO. A expressão genica foi quantificada a partir de culturas de SkMCs infectadas e/ou tratadas com SLO incubadas até as 72 h de infecção por meio de RT-qPCR, com a normalização da expressão usando o gene *UbH* para o caso de *Ama2* e *Hprt1* para os genes restantes. Se mostra a expressão dos genes (A) *Ama2*, (B) *UbH*, (C) *IL-1 β* , (D) *IL-6*, (E) *Lyst*, e (F) *iNOS*. As barras com o valor de p indicam os grupos

entre os quais foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Barras horizontais representam a média. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes.

Figura 30 - Quantificação da produção de nitrito em SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* e/ou tratadas com SLO. Culturas de SkMCs foram pré-tratadas e/ou infectadas com promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* e incubadas por 72 h. Após o tempo de infecção o meio de cultura foi retirado e preparado para a quantificação de nitrito por fluorescência. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos (ANOVA $p=0,567$). A concentração do nitrito se mostra em µM. Barras horizontais representam a média. Dados obtidos a partir de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

Durante a infecção por *Leishmania*, diferentes tipos de células do sistema imune estão envolvidas na resposta leishmanicida, acompanhadas de processos inflamatórios. Este entorno favorece o alto grau de promiscuidade no tipo de célula hospedeira que *Leishmania* utiliza, para facilitar sua sobrevivência dentro do hospedeiro mamífero (22,23). Por causa da natureza da infecção por *Leishmania*, é então muito importante um conhecimento profundo do papel que desempenha cada tipo de célula do sistema imune e também de outras células, não fagócitos profissionais, que possam ser infectadas.

Nesse contexto, poucos estudos têm abordado o papel do músculo durante a infecção por *Leishmania*, e os existentes têm foco na presença do parasito e sua associação com o desenvolvimento de miopatias inflamatórias essencialmente em cães (85,86,88). Os reportes prévios observaram a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. nas células imunes do infiltrado inflamatório e dentro de fibras musculares. Desta forma, foi caracterizada a infecção por *L. (L.) amazonensis* no músculo esquelético por meio de infecções *in vivo* em camundongos e análises histológicas. Foi observado o infiltrado inflamatório infectado, dano no tecido, e fibras musculares infectadas (**Figura 13**). Fibras musculares infectadas foram observadas com maior frequência em cortes histológicos de camundongos C57BL/6. As características observadas como o dano no tecido, são comparáveis com o reportado por Naranjo e colaboradores (88) e Silva-Almeida e colaboradores (94).

Com o intuito de melhorar a caracterização da infecção por *Leishmania* no músculo, e utilizar um método com maior sensibilidade para identificar formas amastigotas no tecido, camundongos C57BL/6 foram infectados e o músculo analisado por meio de imunohistoquímica (**Figura 16**). Embora a taxa de infecção observada com esta técnica seja pequena, é possível identificar que as fibras musculares fornecem para o parasito um local de proliferação pelo número de parasitos por vacúolo (entre 2 e 4) (**Figura 17B**). A associação entre os vacúolos parasitóforos e os núcleos de células observada na análise histológica (**Figura 16D, Figura 17D**) é consistente com os relatos de Silva-Almeida e colaboradores (94), os quais observaram células inflamatórias ocasionalmente infiltradas no sarcoplasma de fibras viáveis ou em degeneração por causa do processo inflamatório. A importância deste aspecto está em que os macrófagos infectados presentes no infiltrado do tecido muscular poderiam favorecer o desenvolvimento da infecção em outros tecidos, devido à migração das células do sistema imune.

Após a observação da presença de *L. (L.) amazonensis* em fibras musculares nos cortes histológicos, procedeu-se com ensaios *in vitro* para avaliar o processo de infecção e observar a formação de vacúolos parasitóforos e proliferação de parasitos intracelulares. A primeira

estratégia usada foi a preparação de ensaios como a dissociação das fibras musculares a partir do músculo FDB com colagenase I. Este método foi explorado porque as fibras obtidas têm um nível maior de maturidade em comparação com os miotubos obtidos a partir de células C2C12 (106). Prévio à infecção, foi comprovada a viabilidade destas fibras musculares (**Figura 18**). Nas fibras infectadas por 2 h foram observados os parasitos aderidos na membrana da célula, e nas infectadas por 72 h se observou a possível presença de parasitos dentro das células, mas não a formação de vacúolo parasitóforo (**Figura 19**). Com esta cultura celular não foi possível cumprir o objetivo de observar a formação do vacúolo parasitóforo, provavelmente pela natureza da cultura das fibras musculares, já que estas se mantêm em suspensão e não se aderem ao substrato. A falta de aderência pode ser um fator limitante para o parasito no momento da infecção, já que moléculas da matriz extracelular ou até receptores presentes na superfície podem ser fundamentais para o processo de infecção destas fibras musculares por *Leishmania*. Nesse sentido, se tem sugerido o uso de células C2C12, nas quais a comunicação entre as células (107) e o estabelecimento da matriz extracelular (108) são muito importantes para a estabilização da cultura, fatores que permitiriam o desenvolvimento da infecção.

Durante o desenvolvimento embrionário as células comprometidas como mioblastos dão origem ao músculo. Estas células também permanecem como células satélite quiescentes que em resposta ao dano ou rompimento do tecido muscular se ativam e multiplicam, para depois se fundir e formar novos mioblastos multinucleados e restaurar a arquitetura do tecido (68,71). Por causa da importância destas células satélite durante o processo de regeneração muscular decidiu-se caracterizar a infecção por *L. (L.) amazonensis* em mioblastos da linhagem C2C12, com o objetivo de verificar se estas células são também alvo durante a infecção no músculo. Nos ensaios com mioblastos foi possível estabelecer que *L. (L.) amazonensis* tem a capacidade de infectar e proliferar dentro de estas células, fatos corroborados com a quantificação do número de parasitos por cada 100 células infectadas, o número de parasitos por vacúolo e a correlação entre o número de parasitos e o tamanho do vacúolo, a qual mostra que com a multiplicação do parasito ocorre um aumento no tamanho do vacúolo (**Figura 20 e 21; Apêndice B**).

Prévio à realização da infecção em miotubos diferenciados a partir de mioblastos da linhagem C2C12, a cultura foi caracterizada no nível de proteína, para estabelecer a qualidade da cultura diferenciada durante a infecção. Para isso, foram monitoradas as proteínas Cav1 e Cav3, usadas como proteínas controle de maturação das culturas de miotubos, as quais dão evidência da formação e homogeneidade dos miotubos (80) (**Figura 10 e 11**). Embora a cultura de miotubos não seja completamente madura em quanto as características do músculo, como já

foi dito por Ravenscroft e colaboradores (106), é uma cultura adequada para o desenvolvimento do modelo de infecção por *Leishmania* no músculo proposto neste trabalho, já que permite observar as características biológicas da infecção *in vitro*, como já foi visto em modelos com *Toxoplasma gondii* (101,109).

A infecção dos miotubos foi caracterizada a partir de um ensaio de diferenciação de mioblastos em miotubos *in vitro*, no qual foram quantificados parâmetros similares aos usados na infecção de mioblastos, para avaliar a capacidade do parasito se internalizar em mioblastos e miotubos. Desta forma, foi evidenciado que *L. (L.) amazonensis* consegue infectar fibras musculares, sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo e proliferar (**Figura 22, 23, 27**). Estes resultados sugerem que as fibras musculares podem funcionar como abrigo para o parasito ao longo do desenvolvimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Por outro lado, com a marcação dos vacúolos parasitóforos de mioblastos e miotubos com laranja de acridina (**Figura 24**) foi demonstrado que mioblastos apresentam vacúolos parasitóforos ácidos, similares aos apresentados em macrófagos. Esta observação concorda como o reportado por Antoine e colaboradores (110) sobre o caráter ácido dos vacúolos parasitóforos, e a capacidade do parasito em sobreviver nessas condições dentro da célula. No caso do vacúolo parasitóforo de miotubos, foi observado o mesmo padrão, mas em menor frequência. Foram frequentes os vacúolos parasitóforos com uma marcação menos nítida, o que demonstra um pH mais neutro. Embora as variáveis avaliadas na infecção de miotubos e a avaliação do pH são dados ainda preliminares que precisam ser pesquisados com maior profundidade, os resultados apresentados neste trabalho são, ao conhecimento da autora, o primeiro relato sobre a infecção de células musculares esqueléticas *in vitro* por *L. (L.) amazonensis*, já que existem observações prévias da infecção, mas por meio de análises histológicas em cães infectados (86,88,94).

Durante a infecção dos miotubos com *L. (L.) amazonensis* foi monitorado o perfil de proteínas da cultura celular após 72 h de infecção, com as proteínas Cav1 e Cav3 para conhecer o estado de integridade da cultura durante a infecção (**Figura 25A e B**). De acordo com estudos prévios sobre processos inflamatórios no músculo, o resultado decorrente de uma infecção poderia levar à diminuição no nível de proteína do músculo por perda do tecido muscular associado com anormalidades fisiopatológicas no tecido (83,111), mas também ocorre a ativação do processo de regeneração. Porém, o perfil de expressão de proteínas não mudou com a infecção, mostrando que a proliferação do parasito não interfere com a cultura de miotubos.

Níveis fisiológicos de vários radicais e compostos oxidantes desempenham um papel importante nas células como reguladores em processos de sinalização (112), e o músculo não é exceção. Durante a infecção dos miotubos foi monitorada a presença da proteína iNOS e de

nitrito no meio de cultura como sinais de atividade leishmanicida no tecido muscular (**Figura 25C e 26**). Foi observada a presença da proteína e do nitrito na cultura de células infectadas e não, o que corresponde ao nível fisiológico de NO que o músculo produz. A produção de NO no músculo tem diferentes funções fisiológicas como o controle da expressão genica, regulação de vias de sinalização celular e a modulação da força muscular (113). No contexto da infecção por *Leishmania*, as funções do NO produzido pelo músculo podem estar envolvidas com a regulação da inflamação do músculo, e a regulação do dano no músculo por causa da invasão das células inflamatórias, gerando uma proteção (114).

De acordo com os resultados já discutidos, a hipótese estabelecida acerca da importância do músculo durante a infecção por *Leishmania*, está associada com o processo inflamatório desenvolvido no local de infecção momentos posteriores ao ingresso do parasito no hospedeiro mamífero. A resposta imune induzida como resultado da infecção no local pode-se juntar com a resposta requerida para a regeneração muscular necessária por causa do dano exercido sobre o tecido pelo parasito. Isto poderia ter um efeito sobre a infecção favorecendo o processo de invasão e sobrevivência do parasito, enquanto que limitaria a regeneração do músculo por causa do processo inflamatório como visto por Langen e colaboradores (115).

Procurando estabelecer o mecanismo de infecção de *Leishmania* nas células musculares, SkMCs foram infectadas e/ou tratadas com SLO, uma enzima capaz de fazer poros na membrana celular (81,82), e a resposta imune das células frente a esses estímulos foi quantificada por médio de citocinas e mRNA. A produção de IL-1 β foi ao redor de 2 pg/mL, mas a indução do mRNA incrementou em duas vezes somente com o estímulo da infecção (**Figura 28A e 29C**). Podbregar e colaboradores (116) avaliaram a produção desta citocina em células musculares e observaram que a atividade basal da IL-1 em células musculares é ao redor de 2 ng/100,000 núcleos, a qual incrementa se as células são previamente estimuladas com TNF- α ou LPS. Estudos prévios sobre a função desta citocina no músculo são escassos, mas tem sido relacionada com um importante papel na resposta imune e como um regulador negativo da diferenciação miogênica (115,116). Cabe sinalar que Lima-Junior e colaboradores (64) demonstraram que a IL-1 β é uma importante molécula ativada por *Leishmania* para controlar a infecção intracelular via inflamassomas.

A quantificação de IL-6 não apresentou nenhuma diferença significativa quando comparados os grupos controle com os infectados com *L. (L.) amazonensis*. Porém, a indução do mRNA incrementou em três vezes com o estímulo da infecção (**Figura 28B e 29D**). No estudo realizado por Podbregar e colaboradores (116) também foi avaliada a produção de IL-6 com uma atividade basal de 5 ng/100,000 núcleos, que de igual maneira incrementa com a

estimulação prévia com TNF- α ou LPS. Frost e colaboradores (117) realizaram um estudo similar onde avaliaram a produção de IL-6 em células musculares pré-tratadas com TNF- α , LPS ou IL-1 β , estímulos que incrementaram a produção da citocina. A produção de IL-6 pode ocorrer como resposta a diferentes estímulos como a presença de LPS e citocinas inflamatórias, embora esta citocina no músculo pode ter funções tanto inflamatórias como metabólicas (118). Evidência dessa função metabólica tem sido reportada em estudos onde a indução da expressão do mRNA de IL-6 e a consequente liberação da proteína está associada com o exercício e a diminuição do glicogênio no músculo (76,118). Os relatos existentes acerca das cascatas de sinalização que levam à produção de IL-6 no músculo, indicam que podem estar envolvidas as vias de sinalização JNK (117), NF- κ B (119–121) e MAP Kinase (120).

A produção de IL-10 apresentou uma concentração inferior a 34,7 pg/mL, sendo evidente apesar de não ser estatisticamente significativa, a influência da infecção e do tratamento com SLO sobre a indução (**Figura 28C**). Na resposta imune as citocinas são reguladas por retroalimentação negativa com outras citocinas, sendo a IL-10 neste contexto uma citocina anti-inflamatória muito importante. A IL-10 regula a produção de TNF- α , IL-1 e IL-6 em vários tipos de células, principalmente através de inibição (122,123). Os efeitos favoráveis sobre a recuperação do músculo depois de um dano no tecido relacionados com os níveis de IL-10 têm sido reportados em várias pesquisas (122,124,125), o que demonstra a importância do seu papel como citocina reguladora do processo inflamatório no músculo.

A indução do gene de iNOS foi observada como resultado da infecção e do tratamento com SLO (**Figura 29F**), apesar de que isso não se refletiu na quantificação de NO (**Figura 30**). A quantificação de NO neste ensaio apresentou valores similares aos apresentados na infecção inicial de miotubos (2-3 μ M) (**Figura 26**), que corresponde à concentração fisiológica que permite processos de sinalização no músculo (74). Isto permite estabelecer que as funções essenciais da enzima iNOS e do NO já previamente discutidas, persistem apesar dos estímulos que sejam exercidos sobre as células musculares no contexto da infecção por *L. (L.) amazonensis*.

A expressão do gene *Ama2*, usado para quantificar a presença dos amastigotas dentro das células, reflete a presença do parasito na cultura celular (**Figura 29A**). Porém, a expressão de *UbH* esteve influenciada tanto pela infecção quanto pelo tratamento com SLO, havendo uma diferença significativa entre as células infectadas e as tratadas e infectadas (**Figura 29B**), o qual indica que o tratamento com SLO pode estar favorecendo o processo de entrada do parasito nas células musculares. Por outro lado, a indução do gene *Lyst* foi influenciada pela infecção e pelo tratamento com SLO (**Figura 29E**). A importância deste gene reside no fato de que sua

estimulação em células infectadas funciona como um mecanismo de resposta imune para limitar a multiplicação do parasito, reduzindo o volume do vacúolo parasitóforo (66). Por tanto, se as células tratadas com SLO e infectadas estão apresentando uma indução maior do gene *Lyst*, é um indicador que dá suporte à ideia de que o SLO pode favorecer a entrada do parasito, já que as células precisam gerar uma resposta imune maior no caso do *Lyst* para poder controlar a infecção.

A comparação dos níveis observados nesta pesquisa da indução e produção de citocinas, NO e outros mecanismos como a expressão de *Lyst* com respeito ao reportado na literatura (66,74,116,117,123) indica que a infecção por *L. (L.) amazonensis* está induzindo uma resposta imune nas células musculares, mas a ativação dos genes e a produção dos compostos é influenciada pelos mecanismos de evasão do parasito e pelos efeitos inflamatórios no tecido. Informação adicional que suporta esta ideia é que o músculo funciona como um órgão endócrino e como um sensor de estresse através de receptores de membrana como os TLRs. Por isso, o músculo tem a capacidade de gerar uma resposta imune independente da resposta do sistema imune frente aos antígenos microbianos (revisado por 74).

Na introdução foi descrita a importância da formação das caveolas durante o processo de reparo da membrana celular no músculo (80), e os relatos que associam a formação de caveolas com o processo de invasão de *Leishmania* (78). Tomando como base estes conhecimentos prévios sobre a biologia da infecção do parasito e o funcionamento da membrana plasmática do músculo, foi usado o SLO como tratamento para produzir orifícios na membrana das células musculares e posteriormente realizar a infecção. Como descrito previamente nos resultados, o tratamento com SLO pode favorecer o processo de entrada do parasito nas células musculares (**Figura 29**). Assim, a hipótese estabelecida é que similar como ocorre na infecção por *Leishmania* nos macrófagos (78,95,96), ou também na infecção por *Trypanosoma cruzi* (126,127), a participação dos microdomínios de lipídeos e da caveolina como componentes estruturais e fatores envolvidos no reparo da membrana plasmática das células musculares esqueléticas são muito importantes para a internalização da *Leishmania* no músculo.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- *Leishmania (L.) amazonensis* tem a capacidade de infectar e proliferar em fibras musculares *in vivo* de camundongos C57BL/6.
- *Leishmania (L.) amazonensis* tem a capacidade de infectar e proliferar no interior dos mioblastos (linhagem de células C2C12). Além disso, consegue sobreviver no ambiente ácido do vacúolo, como acontece nos macrófagos.
- *Leishmania (L.) amazonensis* tem a capacidade de infectar, sobreviver e proliferar dentro de SkMCs.
- A infecção por *L. (L.) amazonensis* em SkMCs induz uma resposta imune nas células com a produção das citocinas IL-6 e IL-10 e dos genes *Lyst* e *iNOS*.
- Os parasitos de *L. (L.) amazonensis* que são internalizados pelas células musculares se mantem viáveis dentro do vacúolo parasitóforo após 72 h de infecção.

REFERÊNCIAS*

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
2. WHO. Leishmaniasis. 2015. p. Fact sheet No 375.
3. Pearson R, Jeronimo S, Souza A. Leishmaniasis. In: Gillespie S, Pearson R, editors. *Principles and practice of clinical parasitology*. Inglaterra: John Wiley & Sons LTD; 2001. p. 670.
4. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:S7–16.
5. Jeronimo SMB, Duggal P, Braz RFS, Cheng C, Monteiro GRG, Nascimento ET, et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *Scand J Infect Dis*. 2004;36(6–7):443–9.
6. WHO. Status of endemicity of Leishmaniasis. WHO; 2013.
7. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011;15(8):e525–32.
8. Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Curr Med Chem*. 2012;19(10):1443–74.
9. Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Pereira LI a, Pelli De Oliveira M a., Ribeiro-Dias F, et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Heal*. 2010;15(1):68–76.
10. Weniger B, Vonthron-Sénécheau C, Kaiser M, Brun R, Anton R. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine*. 2006;13(3):176–80.
11. Kunert O, Swamy RC, Kaiser M, Presser A, Buzzi S, Appa Rao a. VN, et al. Antiplasmodial and leishmanicidal activity of biflavonoids from Indian *Selaginella bryopteris*. *Phytochem Lett*. 2008;1(4):171–4.
12. Graziose R, Rojas-Silva P, Rathinasabapathy T, Dekock C, Grace MH, Poulev A, et al. Antiparasitic compounds from *Cornus florida* L. with activities against *Plasmodium falciparum* and *Leishmania tarentolae*. *J Ethnopharmacol*. 2012;142(2):456–61.
13. Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH, Pimenta PFP, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: How to teach using animations. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):8–11.
14. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol*. 2002;18(8):332–4.

15. Uezato H, Kato H, Kayo S, Hagiwara K, Bhutto AM, Katakura K, et al. The attachment and entry of *Leishmania* (Leishmania) major into macrophages: Observation by scanning electron microscope. *J Dermatol.* 2005;32:534–40.
16. Antoine J, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 1998;7(10):392–401.
17. Real F, Florentino PTV, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PST, Goto H, et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. *Cell Microbiol.* 2014;16(10):1549–64.
18. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv Parasitol.* 1999;44:1–39.
19. Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa E a., Cupolillo E, Floeter-Winter L, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003;97(3):291–6.
20. Schubach TMP, Figueiredo FB, Pereira S a., Madeira MF, Santos IB, Andrade M V., et al. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: First report of natural infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2004;98(3):165–7.
21. Rosypal a. C, Cortés-Vecino J a., Gennari SM, Dubey JP, Tidwell RR, Lindsay DS. Serological survey of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* in dogs from urban areas of Brazil and Colombia. *Vet Parasitol.* 2007;149(3–4):172–7.
22. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(8):604–15.
23. Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania* – Host-cell Interaction: *Parasitol Today.* 2000;16(7):292–7.
24. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:8.
25. Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine J-C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J Cell Sci.* 2004;117(2):315–25.
26. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* 2012;28(8):335–44.
27. Farah FS, Samra S a, Nuwayri-Salti N. The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. *Immunology.* 1975;29(4):755–64.

28. Mauel J. Macrophage-Parasite interactions in *Leishmania* infections. *J Leukoc Biol.* 1990;47:187–93.
29. Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J Exp Med.* 2000;191(12):2121–9.
30. Belle EA. Cultivation of *Leishmania donovani* in human amnion epithelial cell tissue cultures: A preliminary report. *Can Med Assoc J.* 1958;79:726–8.
31. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003;11(5):210–4.
32. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In Vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* (80-). 2008;321(2008):970–4.
33. Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, et al. Intracellular Survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 2002;70(2):826–35.
34. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002;169:898–905.
35. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(16):6748–53.
36. Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000222.
37. Bosetto MC, Giorgio S. *Leishmania amazonensis*: Multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. *Exp Parasitol.* 2007;116(3):306–10.
38. Brandonisio O, Spinelli R, Pepe M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect.* 2004;6:1402–9.
39. da Silva MFL, Floeter-Winter LM. Arginase in *Leishmania*. In: Santos AL, Branquinha MH, DÁvila-Levy CM, Kneipp LF, Sodré KL, editors. *Proteins and proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. New York: Springer Science +Business Media Dordrecht; 2014. p. 381.
40. Abbas AK, Lichtman A, Pillai S. *Cellular and Molecular immunology*. eighth. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2015. 535 p.
41. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived

- macrophages. Vol. 206, Biochemical and biophysical research communications. 1995. p. 667–73.
42. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol.* 1998;160(11):5347–54.
 43. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002;24(3):113–8.
 44. Bidri M, Vouldoukis I, Mossalayi DM, Debré P, Guillosson J-J, Mazier D, et al. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 1997;19:475–83.
 45. Rodríguez NE, Wilson ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res.* 2014;59(1–3):129–41.
 46. Amezcua Vesely MC, Bermejo DA, Montes CL, Acosta-Rodríguez E V., Gruppi A. B-cell response during protozoan parasite infections. *J Parasitol Res.* 2012;2012:8.
 47. O’Garra A, Chang R, Go N, Hastings R, Haughton G, Howard M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol.* 1992;22:711–7.
 48. Ronet C, Voigt H, Himmelrich H, Doucey M-A, Hauyon-La Torre Y, Revaz-Breton M, et al. *Leishmania* major-Specific B cells are necessary for Th2 cell development and susceptibility to *L. major* LV39 in BALB/c mice. *J Immunol.* 2008;180(7):4825–35.
 49. Gonzaga WFKM, Xavier V, Vivanco BC, Lopes JD, Xander P. B-1 cells contribute to susceptibility in experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Parasitology.* 2015;142(12):1506–15.
 50. Geraldo MM, Costa CR, Barbosa FMC, Vivanco BC, Gonzaga WFKM, Novaes e Brito RR, et al. In vivo and in vitro phagocytosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes by B-1 cells. *Parasite Immunol.* 2016;38(6):365–76.
 51. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. Histology: The Lives and Deaths of Cells in Tissues. In: *Molecular biology of the cell.* sixth. New York: Garland Science; 2015. p. 1464.
 52. Chang KP. *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.* 1978;27(6):1084–96.
 53. Dedet JP, Ryter A, Vogt E, Hosli P, da Silva LP. Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. *Ann Trop Med Parasitol.* 1983 Mar;77(1):35–44.
 54. Schwartzman JD, Pearson RD. The interaction of *leishmania donovani* promastigotes

- and human fibroblasts in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(5):850–5.
55. Hespanhol RC, Soeiro M de NC, Meuser MB, Meirelles M de NSL, Côrte-Real S. The Expression of Mannose Receptors in Skin Fibroblast and Their Involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* Invasion. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(1):35–44.
 56. Frothingham TE, Lehtimäki E. *Leishmania* in primary cultures of human amniotic cells. *Am J Trop Med Hyg.* 1967;16(5):658–64.
 57. Pessotti JH, Zaverucha Do Valle T, Corte-Real S, Gonçalves Da Costa SC. Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the Vero cell line. *Parasite.* 2004;11:99–102.
 58. Gurung P, Kanneganti T-D. Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol.* 2015;17(9):1286–94.
 59. Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol.* 2009;47:412–23.
 60. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-Mediated Innate Host Defense Against Protozoan Parasites. *Crit Rev Microbiol.* 2002;28(3):187–248.
 61. Chandel HS, Pandey SP, Roy S, Doyen N, Saha B. TLR-CD40 cross-talk in anti-leishmanial immune response. *Front Immunol.* 2014;5:1–5.
 62. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol.* 2013;82:155–84.
 63. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol Rev.* 2015;265(1):156–71.
 64. Lima-Junior DS, Costa DL, Carregaro V, Cunha LD, Silva ALN, Mineo TWP, et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. *Nat Med.* 2013;19(7):909–15.
 65. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 2008;213:377–87.
 66. Wilson J, Huynh C, Kennedy KA, Ward DM, Kaplan J, Aderem A, et al. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog.* 2008;4(10):e1000179.
 67. Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;213(1):159–79.
 68. Shi X, Garry DJ. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 2006;20(13):1692–708.
 69. Silva DPM, Carvalho RF. Cellular and molecular mechanisms that control muscular development and growth. *Rev Bras Zootec.* 2007;36:21–31.

70. Bentzinger FC, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: Molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(2):a008342.
71. Morgan JE, Partridge TA. Cell in focus: Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(8):1151–6.
72. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological Rev.* 2008;88:1379–406.
73. Pedersen BK, Febbraio M a. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* Nature Publishing Group; 2012;8:457–65.
74. Welc SS, Clanton TL. The regulation of interleukin-6 implicates skeletal muscle as an integrative stress sensor and endocrine organ. *Exp Physiol.* 2013;98(2):359–71.
75. Iizuka K, Machida T, Hirafuji M. Skeletal muscle is an endocrine organ. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(2):125–31.
76. Schnyder S, Handschin C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone.* 2015;80:115–25.
77. Pedersen BK. Edward F. Adolph distinguished lecture: Muscle as an endocrine organ: IL-6 and other myokines. *J Appl Physiol.* 2009;107(4):1006–14.
78. Rodríguez NE, Gaur U, Wilson ME. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8(7):1106–20.
79. Hernández-Deviez DJ, Howes MT, Laval SH, Bushby K, Hancock JF, Parton RG. Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *J Biol Chem.* 2008;283(10):6476–88.
80. Corrotte M, Almeida PE, Tam C, Castro-Gomes T, Fernandes MC, Millis B a., et al. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife.* 2013;2:e00926.
81. Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva a, Aktories K, et al. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3185–90.
82. Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit A. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun.* 1985;47(1):52–60.
83. Gan L, Miller FW. State of the art: What we know about infectious agents and myositis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23:585–94.
84. Crum-Cianflone NF. Bacterial, fungal, parasitic, and viral myositis. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):473–94.
85. Vamvakidis CD, Koutinas a F, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania*

- infantum). *Vet Rec.* 2000;146(24):698–703.
86. Paciello O, Oliva G, Gradoni L, Manna L, Manzillo VF, Wojcik S, et al. Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul Disord.* Elsevier B.V.; 2009;19(2):124–30.
 87. Gomes AAD, Laurenti MD, Ferraro GC, de Camargo MHB, Costa DC, Machado GF, et al. Subclinical muscle injuries in dogs infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi. *Brazilian J Vet Pathol.* 2012;5(3):108–15.
 88. Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Peña T. Detection of *Leishmania* spp. and associated inflammation in ocular-associated smooth and striated muscles in dogs with patent leishmaniasis. *Vet Ophthalmol.* 2010;13(3):139–43.
 89. Paciello O, Wojcik S, Gradoni L, Oliva G, Trapani F, Iovane V, et al. Syrian hamster infected with *Leishmania infantum*: a new experimental model for inflammatory myopathies. *Muscle Nerve.* 2010;41(3):355–61.
 90. López-Peña M, Alemañ N, Muñoz F, Fondevila D, Suárez ML, Goicoa A, et al. Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Vet Scand.* 2009;51:20.
 91. Alves GBB, Pinho F a., Silva SMMS, Cruz MSP, Costa FAL. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Brazilian J Med Biol Res.* 2010;43(3):310–5.
 92. Pinto AJW, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MSM, Tafuri WL, et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand.* 2011;53:67.
 93. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(4):485–9.
 94. Silva-Almeida M, Carvalho LOP, Abreu-Silva a. L, D’Escoffier LN, Calabrese KS. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection: Muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. *Exp Parasitol.* 2010;124(3):315–8.
 95. Forestier CL, Machu C, Loussert C, Pescher P, Spath GF. Imaging host cell-leishmania interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe.* 2011;9:319–30.
 96. Rodriguez NE, Chang HK, Wilson ME. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect Immun.* 2004;72(4):2111–22.
 97. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4):577–80.
 98. Pasut A, Jones AE, Rudnicki M a. Isolation and culture of individual myofibers and their

- satellite cells from adult skeletal muscle. *J Vis Exp*. 2013;73:e50074.
99. Herbst A, Banser P, Velasquez CD, Mays CE, Sim VL, Westaway D, et al. Infectious prions accumulate to high levels in non proliferative C2C12 myotubes. *PLoS Pathog*. 2013;9(11):e1003755.
 100. de Almeida Marques-da-Silva E, de Oliveira JC, Figueiredo AB, de Souza Lima Júnior D, Carneiro CM, Rangel Fietto JL, et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect*. 2008;10(8):850–7.
 101. Swierzy IJ, Lüder CGK. Withdrawal of skeletal muscle cells from cell cycle progression triggers differentiation of *Toxoplasma gondii* towards the bradyzoite stage. *Cell Microbiol*. 2015;17(1):2–17.
 102. Rasmusson B, Descoteaux A. Contribution of electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania* – macrophage interactions. *Microsc Microanal*. Instituto De Biociencias; 2004;10:656–61.
 103. Krolenko SA, Adamyan SY, Belyaeva TN, Mozhenok TP. Acridine orange accumulation in acid organelles of normal and vacuolated frog skeletal muscle fibres. *Cell Biol Int*. 2006;30(11):933–9.
 104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($-\Delta\Delta C(T)$) method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 105. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQUE guidelines: Minimum information for publication of quantitative Relat-Time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22.
 106. Ravenscroft G, Nowak KJ, Jackaman C, Clément S, Lyons MA, Gallagher S, et al. Dissociated Flexor Digitorum Brevis myofiber culture system- A more mature muscle culture system. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2007;64(10):727–38.
 107. Tanaka K, Sato K, Yoshida T, Fukuda T, Hanamura K, Kojima N, et al. Evidence for cell density affecting C2C12 myogenesis: Possible regulation of myogenesis by cell-cell communication. *Muscle and Nerve*. 2011;44:968–77.
 108. Engler AJ, Griffin MA, Sen S, Bönnemann CG, Sweeney HL, Discher DE. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: Pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol*. 2004;166(6):877–87.
 109. Takács AC, Swierzy IJ, Lüder CGK. Interferon- γ restricts *Toxoplasma gondii* development in murine Skeletal Muscle Cells via nitric oxide production and immunity-related GTPases. *PLoS One*. 2012;7(9):e45440.
 110. Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immunity*. 1990;58(3):779–87.

111. Rendt K. Inflammatory myopathies: Narrowing the differential diagnosis. *Cleve Clin J Med*. 2001;68(6):505–19.
112. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:47–95.
113. Powers SK, Ji LL, Kavazis AN, Jackson MJ. Reactive oxygen species: Impact on skeletal muscle. *Compr Physiol*. 2011;1:941–69.
114. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:345–53.
115. Langen J. RC, Schols J. AMW, Kelders M. MCJ, Wouters M. EF, Janssen-Heininger W. YM. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kB. *FASEB*. 2001;15:1169–80.
116. Podbregar M, Lainscak M, Prelovsek O, Mars T. Cytokine response of cultured Skeletal Muscle Cells stimulated with proinflammatory factors depends on differentiation stage. *Sci World J*. 2013;2013.
117. Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines stimulate interleukin-6 expression in C2C12 myoblasts: Role of the Jun NH2-terminal kinase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285:R1153–64.
118. Pedersen BK. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(3):392–6.
119. Frost R a, Nystrom GJ, Lang CH. Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290:R773–84.
120. Luo G, Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, Hasselgren P-O. IL-1B stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284:R1249–1254.
121. Chevrel G, Granet C, Miossec P. Contribution of tumour necrosis factor alpha and interleukin (IL) 1B to IL6 production, NF-kappaB nuclear translocation, and class I MHC expression in muscle cells: In vitro regulation with specific cytokine inhibitors. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(9):1257–62.
122. Batista MLJ, Rosa JC, Lopes RD, Lira FS, Martins EJ, Yamashita AS, et al. Exercise training changes IL-10/TNF-alfa ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine*. Elsevier Ltd; 2010;49:102–8.
123. Peake JM, Della Gatta P, Suzuki K, Nieman DC. Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: Regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:8–25.
124. Lopes RD, Batista Jr. ML, Rosa JC, de Lira FS, Martins Jr. E, Shimura AY, et al.

- Changes in the production of IL-10 and TNF-alpha in skeletal muscle of rats with heart failure secondary to acute myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(3):293–300.
125. Della Gatta PA, Garnham AP, Peake JM, Cameron-Smith D. Effect of exercise training on skeletal muscle cytokine expression in the elderly. *Brain Behav Immun.* Elsevier Inc.; 2014;39:80–6.
 126. Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, Andrews NW. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med.* 2011;208(5):909–21.
 127. Barrias ES, de Carvalho TMU, De Souza W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. *Front Immunol.* 2013;4:1–10.

APÊNDICES

A - Associação entre o número de núcleos e o comprimento do miotubo em miotubos infectados com *L. (L.) amazonensis* por 72 h (Correlação de Spearman $p < 0,05$).

B - Associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo em mioblastos infectados com *L. (L.) amazonensis* por 72 h (Correlação de Spearman $p < 0,05$).

C - Associação entre o número de parasitos por vacúolo e o tamanho do vacúolo parasitóforo em miotubos infectados com *L. (L.) amazonensis* por 72 h (Correlação de Spearman $p < 0,05$).

D - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com *L. (L.) amazonensis* por 72 h com microscopia confocal. As células foram infectas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo.

E - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com *L. (L.) amazonensis* por 72 h com microscopia confocal. As células foram infectas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo.

F - Imagens representativas de imunofluorescência da infecção de SkMCs (Miotubos) com *L. (L.) amazonensis* por 72 h com microscopia confocal. As células foram infectas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo.

ANEXOS

A - Vídeo de SkMCs em cultura realizando contração espontânea. As células foram cultivadas até o dia 12 como descrito nos materiais e métodos, e prévio à infecção foram filmadas para registrar a contração espontânea dos miotubos.

B - Vídeo de SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* realizando contração espontânea. As células foram infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo, a multiplicação do parasito e a contração espontânea dos miotubos.

C - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. As células foram infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo. Esta sequência de imagens corresponde aos cortes longitudinais realizados na célula observada no apêndice D.

D - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. As células foram infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo. Esta sequência de imagens corresponde aos cortes longitudinais realizados na célula observada no apêndice E.

E - Vídeo de microscopia confocal de SkMCs infectadas com *L. (L.) amazonensis* por 72 h. As células foram infectadas com promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) amazonensis* overnight, lavadas e incubadas até 72 h para observar a formação do vacúolo parasitóforo e a multiplicação do parasito. Imagens com marcação de anticorpos para os parasitos com anti-*Leishmania* (verde) e para o núcleo com Dapi (azul). As setas indicam a localização do vacúolo parasitóforo. Esta sequência de imagens corresponde aos cortes longitudinais realizados na célula observada no apêndice F.