

# Modulação da sobrevivência de macrófagos de medula óssea por amastigotas de *Leishmania amazonensis*: A influência da infecção intracelular na senescência macrofágica

**Palavras-Chave:** Senescência Celular, Macrófago, *Leishmania*.

**Autores:**

Jamile Dias Pereira da Silva – Instituto de Biologia, Unicamp.  
Virlânio Alves de Oliveira Filho – Instituto de Biologia, Unicamp.  
Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel – Instituto de Biologia, Unicamp.

---

## INTRODUÇÃO:

A leishmaniose é uma doença tropical de populações negligenciadas causada por mais de 20 espécies de tripanossomatídeos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Essa parasitose é transmitida por flebotomíneos fêmeas hematófagas pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* que, uma vez infectadas, transmitem o parasito para o hospedeiro mamífero no repasto sanguíneo (1). As manifestações clínicas conhecidas são a leishmaniose cutânea e a visceral, podendo evoluir para formas autolimitantes graves. No Brasil, as espécies mais prevalentes são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, principais causadoras da forma clínica cutânea (2).

O ciclo de vida do parasita ocorre em dois tipos de hospedeiros: vertebrado e invertebrado. O vetor flebotomíneo ingere amastigotas de *Leishmania* ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado já infectado. Essas amastigotas - com formato arredondado, portando flagelo interno – ocupam o tubo digestivo do vetor e se diferenciam nas formas promastigotas procíclicas replicantes fusiformes com flagelo evidente. Aderidas ao epitélio intestinal do inseto, essas formas se multiplicam por divisão binária e, após migrarem para a parte mais anterior do intestino do vetor, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que são infectantes. Será no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos que as formas promastigotas se diferenciarão em amastigotas e multiplicar-se-ão binariamente, lisando a membrana celular, infectando outras células (3).

Os macrófagos são células do sistema imune inato envolvidas no processo de defesa do hospedeiro contra a infecção do parasito e têm como principal função a fagocitose dos patógenos invasores (4). A relação *Leishmania*-macrófago é estabelecida por inúmeros fatores de virulência que possibilitam ao parasito se beneficiar do fagolisossomo, obtendo também nutrientes disponíveis na célula para se replicar. Desta forma, o parasito induz efeitos no metabolismo da célula hospedeira que permitem sua sobrevivência e crescimento dentro do vacúolo parasitóforo (5).

As células do sistema imunológico hospedeiras também passam por processos de envelhecimento que alteram sua fisiologia, tornando-as senescentes. Os macrófagos, quando ativados em uma lesão, apresentam características de uma célula senescente, aumentando o estresse fisiológico relacionado à progressão da doença

(6-7). Desta forma, em um primeiro momento, o projeto tem como propósito avaliar se macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* sobrevivem por mais tempo em comparação a macrófagos não infectados a partir da análise das taxas de infecção e sobrevivência da célula hospedeira e dos parasitos. Nesse sentido, espera-se compreender melhor as implicações da infecção por *Leishmania* em macrófagos, analisando-os sob diferentes condições, como variadas MOIs, diferentes tempos de infecção em meios de cultura com composições pré-estabelecidas.

## **METODOLOGIA:**

### **Cultivo e viabilidade celular em células hospedeiras**

Para obtenção de macrófagos, foram extraídas células precursoras de macrófagos da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos fêmeas BALB/c conforme protocolo de rotina realizado no laboratório (8), o qual foi aprovado junto à CEUA-UNICAMP [n. 6384-1/2024]. As células precursoras extraídas foram cultivadas em meio R2030, com fator de diferenciação para macrófagos, em placas de Petri e armazenadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. Após este período, foram montadas 6 placas de 96 poços, referentes aos diferentes tempos de cultivo (24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h). 5x10<sup>4</sup> de células diferenciadas foram cultivadas em triplicata e suplementadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino (FBS a 0, 5, 10 e 20%) em meio RPMI. As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e foram retiradas após seus respectivos tempos de cultivo para realização do teste de MTT e, posteriormente, serem lidas no espectrofotômetro. Os dados de absorbância gerados foram utilizados para escolher, dentre os grupos de interesse, os tempos de cultivo (48h, 96h e 144h) mais adequados na presença de 10% de FBS na qual as células macrofágicas estivessem mais viáveis para as infecções *in vitro* com *L. amazonensis*.

### **Infecções *in vitro***

Macrófagos primários foram novamente adquiridos de camundongos BALB/c. 4x10<sup>5</sup> foram plaqueados em 3 placas de 24 poços, contendo lamínulas, com 4 diferentes multiplicidades de infecção (MOIs), em triplicatas, sendo MOI = 0, o grupo controle. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para adesão das células. Foram adicionados nos poços formas promastigotas metacíclicos de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) na quarta passagem com MOIs = 1, 10 e 20. Após o tempo de incubação em estufa a 34 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi retirado e cada poço foi lavado com PBS 1X aquecido. As lamínulas foram fixadas em metanol e posteriormente coradas com o kit INSTANT PROV. Imagens foram obtidas com auxílio do microscópio EVOS no aumento de 40X e foram estabelecidos parâmetros de contagem para analisar o número de macrófagos totais, número de macrófagos infectados e número de amastigotas. Os dados obtidos foram analisados no GraphPrism 8. O experimento de viabilidade foi feito novamente em 48, 96 e 144 h, mas apenas avaliando MOI 0, 1 e 20 para gerar novos dados comparativos. Em cada condição de MOI foi cultivado 1 poço a mais para que, após o tempo de infecção, fosse realizado contagem adicional na câmara de Neubauer dos macrófagos ainda aderentes na placa, utilizando a tripsina para soltura celular. Para isso, o meio foi retirado, os poços foram lavados com PBS 1X aquecido e 100 µL de tripsina foi adicionado, após descolamento foram adicionados a cada poço 100 µL de meio RPMI. 10 µL foi retirado de cada amostra e levado à câmara para contagem.

## Extração de mRNA e proteínas

Foi feita a extração de RNA de culturas infectadas com Trizol® (Invitrogen) a partir de infecções *in vitro* cultivadas em placas de 6 poços com MOI = 0 como grupo controle e MOI = 1 e 20 como grupos comparativos. As placas foram incubadas na estufa a 34 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 96 h e, após o tempo de incubação, o sobrenadante foi retirado e 1 mL de Trizol® (Invitrogen) foi adicionado em cada poço. Após 5 min, os poços foram raspados com auxílio do rodinho para coletar as células aderidas e as amostras foram adicionadas a eppendorfs de 5 mL e depois incubadas com 200 µL de clorofórmio gelado/ mL de Trizol por 3 min. Os eppendorfs foram devidamente identificados e estocados a -80 °C para realização da síntese de DNA complementar a partir do RNA tratado com DNase em experimentos futuros.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em relação aos ensaios de cultivo de macrófagos não infectados, após a aplicação do MTT e leitura das placas no espectrofotômetro, as densidades ópticas (DO) obtidas foram organizadas (**Tabela 1**) considerando que, ao entrar em contato com células metabolicamente ativas, o MTT é reduzido e convertido em formazan, de cor azul-violeta, agindo como um marcador de viabilidade celular. Os valores de DO gerados pelo espectrofotômetro indicam a quantidade do reagente reduzido que existe no interior das células. Células com maior DO estão metabolicamente mais viáveis em relação àquelas com menor DO (9).

| % FBS | DO + DP      |              |              |              |              |              |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|       | 24h          | 48h          | 72h          | 96h          | 120h         | 144h         |
| 0     | 0,096 ± 0,02 | 0,317 ± 0,01 | 0,170 ± 0,00 | 0,081 ± 0,02 | 0,130 ± 0,04 | 0,129 ± 0,04 |
| 5     | 0,104 ± 0,01 | 0,316 ± 0,01 | 0,203 ± 0,02 | 0,102 ± 0,01 | 0,149 ± 0,01 | 0,108 ± 0,01 |
| 10    | 0,089 ± 0,00 | 0,303 ± 0,01 | 0,178 ± 0,02 | 0,089 ± 0,02 | 0,153 ± 0,01 | 0,126 ± 0,01 |
| 20    | 0,097 ± 0,01 | 0,309 ± 0,02 | 0,137 ± 0,01 | 0,072 ± 0,01 | 0,133 ± 0,01 | 0,068 ± 0,01 |

Tabela 1 – Densidades ópticas calculadas a partir dos comprimentos de onda de referência e teste de 650 e 600 nm para culturas celulares.

As DOs não apresentam diferenças significativas, o que pode ser observado nos valores obtidos em meio RPMI sem suplemento (0%) e 20% de FBS, por exemplo. Com isso, a concentração de FBS e o tempo de cultivo não são parâmetros essenciais para a viabilidade celular, o que permite afunilar os grupos de interesse e fixar os próximos ensaios em apenas uma concentração (FBS 10%). Para os ensaios de infecção *in vitro*, escolheu-se os tempos de 48, 96 e 144h, tempos de cultivo representativos que permitem acompanhar a progressão da infecção (**Figura 1**).

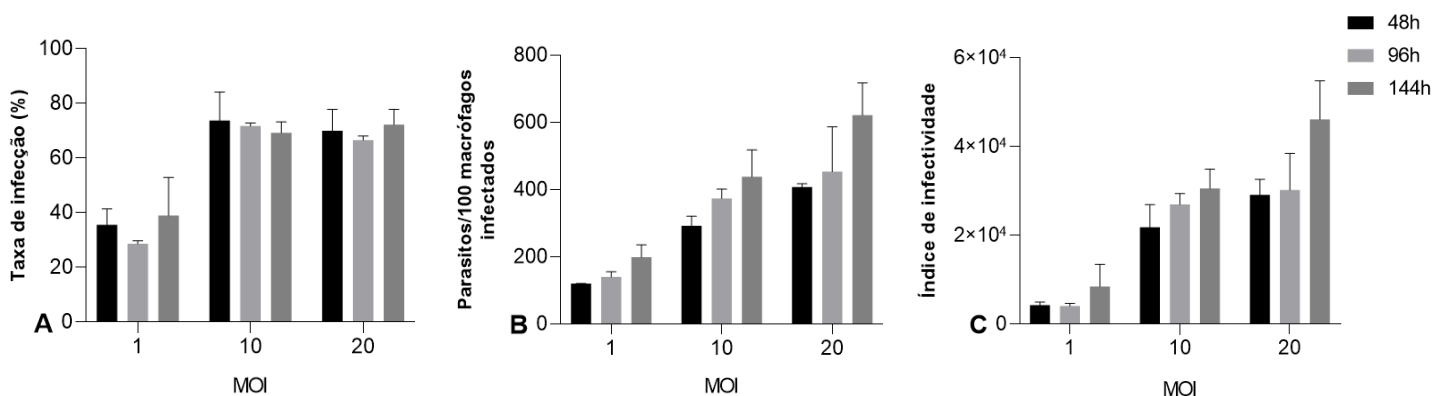


Figura 1 – Perfil das infecções *in vitro* em MOI 1, 10 e 20. Macrófagos primários de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e incubados por 48, 96 e 144h. As infecções foram contadas quanto ao número de amastigotas e células infectadas para obtenção dos gráficos (1A) taxa de infecção, (1B) parasitos a cada 100 macrófagos e (1C) índice de infectividade.

A taxa de infecção (**Figura 1A**) aumentou entre MOI = 1 e os MOIs = 10 e 20, mas não mostrou alteração significativa entre os MOIs = 10 e 20. No entanto, como esperado, a proporção de parasito a cada 100 macrófagos infectados (**Figura 1B**) e o índice de infectividade (**Figura 1C**) aumentaram significativamente ao longo do tempo, o que pode significar que, embora o número de macrófagos infectados não esteja aumentando (**Figura 3A**), há incremento na carga parasitária e infectividade à medida que amastigotas de *L. amazonensis* presentes nos vacúolos parasitóforos se multiplicam durante o desenvolvimento da infecção em relação ao controle (**Figura 2**).

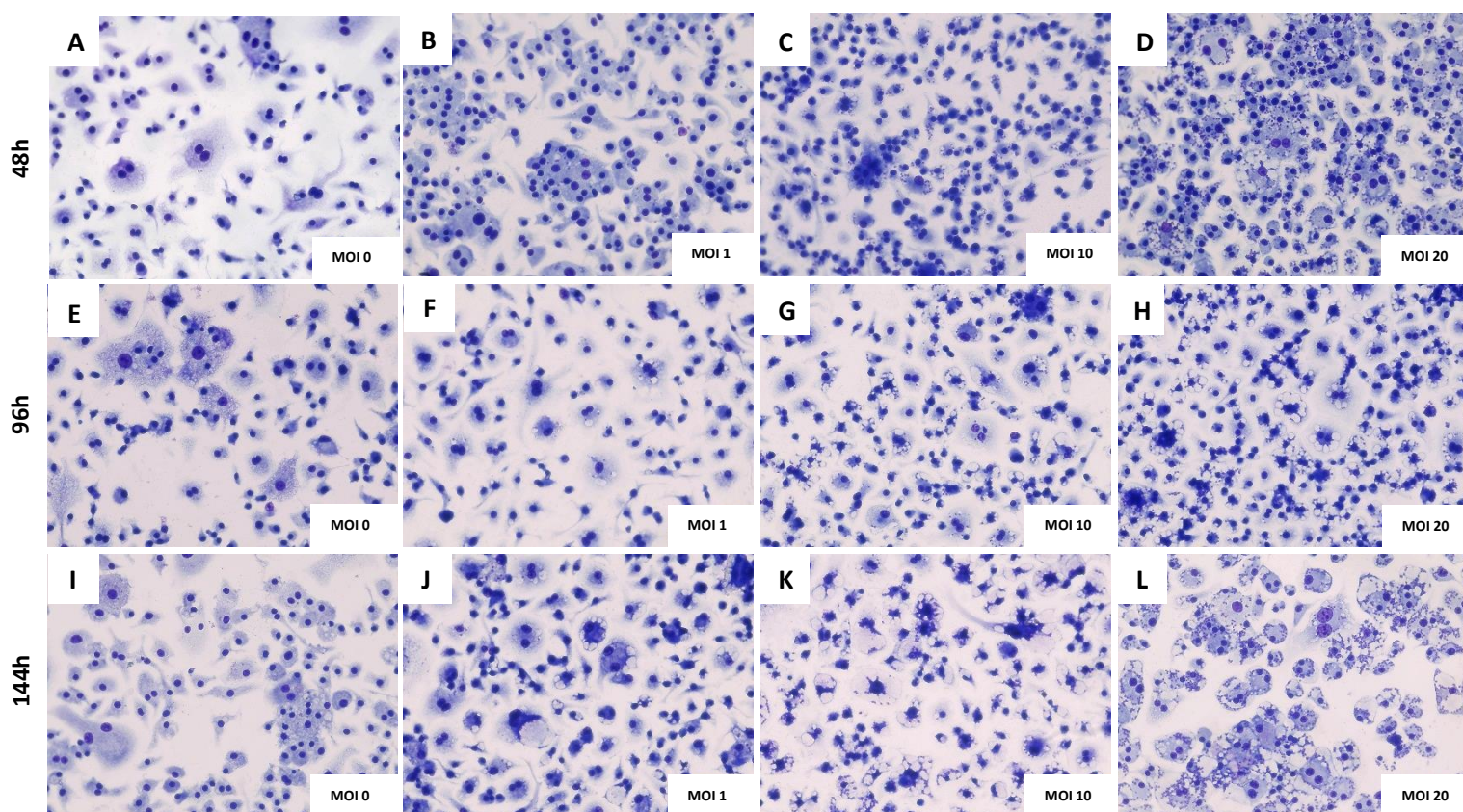


Figura 2 – Infecções *in vitro* de macrófagos murinos com promastigotas de *L. amazonensis* em MOI 0, 1, 10 e 20 por 48, 96 e 144h. Fotografias obtidas a partir de microscopia óptica após infecção de macrófagos oriundos de camundongos BALB/c, sendo 2A, 2E e 2I os grupos controle, ou seja, não infectados

A partir da diferença do número de macrófagos totais em relação ao número de macrófagos não infectados, foi possível gerar um delta para cada condição de tempo e selecionar os grupos que seriam utilizados para extração de mRNA e proteínas. Há aumento no número de macrófagos totais com MOI = 20 para todas as condições de tempo em relação ao grupo controle e, por outro lado, há redução no número de macrófagos no MOI = 1 (Figura 3B). Este aumento presente no maior MOI permite especular que a infecção por *L. amazonensis* está gerando certa sobrevida sobre as células macrofágicas infectadas, hipótese inicial do projeto.



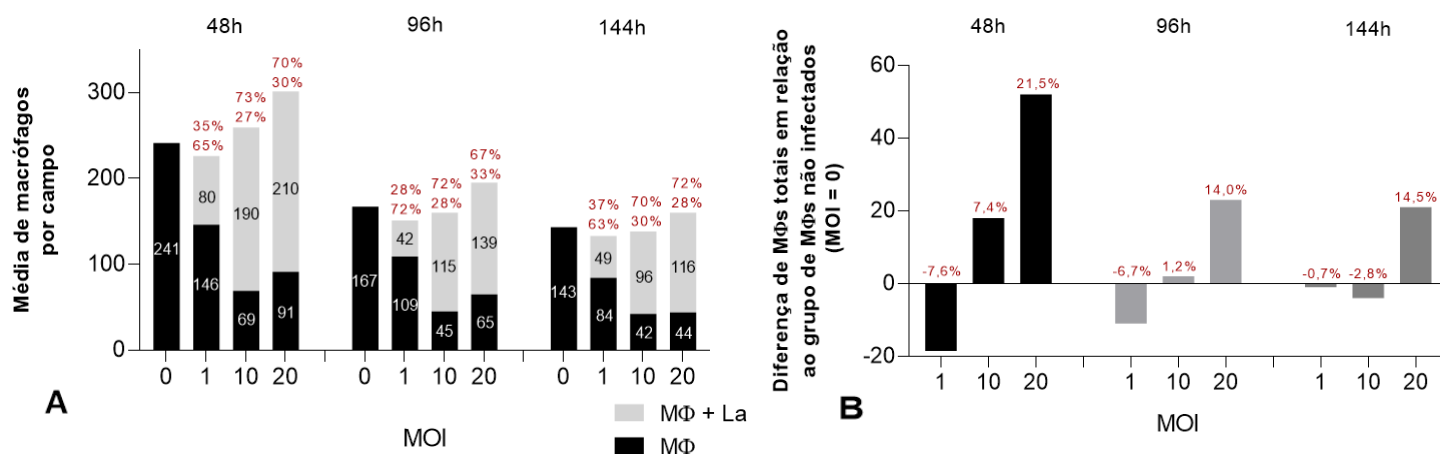


Figura 3 – (3A) Média do número de macrófagos nas infecções *in vitro* em MOI 0, 1, 10 e 20 contados por campo. Contagem de macrófagos totais (porção escura + porção clara da barra), macrófagos não infectados (porção escura) e macrófagos infectados em cada MOI (porção clara). Cada condição de tempo gerou 12 campos por MOI e os números demonstrados em cada barra do gráfico representam a média desses 12 campos. (3B) Diferença entre o número de macrófagos totais em relação ao número de macrófagos não infectados no grupo controle (MOI = 0). Em vermelho estão representadas as porcentagens de redução ou aumento do número de macrófagos em relação ao grupo controle em cada condição de tempo.

## CONCLUSÕES

Nos ensaios com diferentes tempos de infecção, observou-se que para MOI = 20, há aumento do número de macrófagos totais da cultura em comparação ao grupo controle (MOI = 0). Por outro lado, há redução no número de macrófagos totais para menor MOI (1), o que sugere que infecções com MOI elevada podem estar promovendo sobrevida nas células hospedeiras infectadas, indicando possíveis mecanismos existentes na relação *Leishmania*-macrófago capazes de criar um ambiente permissivo à replicação e propagação dos parasitos, ou seja, capaz de aumentar a viabilidade parasitária dentro da célula hospedeira. Tais conclusões permitem definir os principais grupos de interesse para ensaios posteriores de análise de proteínas, especialmente envolvidas em processos de senescência e apoptose, com enfoque para os MOI = 0, 1 e 20 e 96 h como tempo de infecção ideal. Ensaios em andamento estão sendo realizados para se obter os perfis de expressão de marcadores moleculares de interesse e de abundância de proteínas envolvidas com senescência celular nas culturas infectadas.

## BIBLIOGRAFIA

- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. *The Lancet*, v. 392, n. 10151, p. 951–970, set. 2018.
- AKHOUNDI, M. et al. Correction: a historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1, 2 jun. 2016
- MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and veterinary entomology*, v. 27, n. 2, p. 123–147, 27 ago. 2012.
- DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Current opinion in microbiology*, v. 26, p. 32–40, 1 ago. 2015.
- FERREIRA, C.; ESTAQUIER, J.; SILVESTRE, R. Immune-metabolic interactions between Leishmania and macrophage host. *Current opinion in microbiology*, v. 63, p. 231–237, 1 out. 2021.
- PRATTICCHIZZO, F. et al. Senescence associated macrophages and “macroph-aging”: are they pieces of the same puzzle?. *Aging*, v. 8, n. 12, p. 3159–3160, 7 dez. 2016
- WANG, L. et al. Macrophage senescence in health and diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1 jan. 2024.
- PRATTICCHIZZO, F. et al. Senescence associated macrophages and “macroph-aging”: are they pieces of the same puzzle?. *Aging*, v. 8, n. 12, p. 3159–3160, 7 dez. 2016 OLIVEIRA FILHO, V. A. et al. In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of Beauvericin. *Journal of Natural Products*, v. 87, n. 12, p. 2829–2838, 2024.
- GHASEMI, M. et al. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021.