UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

PEDRO HENRIQUE GALLO FRANCISCO

EFEITO DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS CO-CULTIVADOS COM *Leishmania amazonensis* E BACTÉRIAS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PARASITÁRIA

EFFECT OF THE INTERACTION OF MACROPHAGES CO-CULTIVATED WITH *Leishmania amazonensis* AND BACTERIA IN THE CONTROL OF PARASITARY INFECTION

CAMPINAS
2023

PEDRO HENRIQUE GALLO FRANCISCO

EFEITO DA INTERAÇÃO DE MACRÓFAGOS CO-CULTIVADOS COM *Leishmania amazonensis* E BACTÉRIAS NO CONTROLE DA INFECÇÃO PARASITÁRIA

EFFECT OF THE INTERACTION OF MACROPHAGES CO-CULTIVATED WITH *Leishmania amazonensis* AND BACTERIA IN THE CONTROL OF PARASITARY INFECTION

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

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the master's degree in Animal Biology, in Anthropogenic Relations, Environment and Parasitology.

Orientadora: SELMA GIORGIO

Coorientador: MARCELO BROCCHI

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO PEDRO HENRIQUE GALLO FRANCISCO, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. SELMA GIORGIO.

CAMPINAS

2023

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

G137e

Gallo-Francisco, Pedro Henrique, 1996-
Efeito da interação de macrófagos co-cultivados com *Leishmania amazonensis* e bactérias no controle da infecção parasitária / Pedro Henrique Gallo Francisco. – Campinas, SP: [s.n.], 2023.

Orientador: Selma Giorgio.
Coorientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Macrófagos. 3. Coinfecção. 4. Vesículas extracelulares. 5. Citocinas. 6. *Pseudomonas aeruginosa*. 7. *Staphylococcus aureus*. I. Giorgio, Selma, 1962-. II. Brocchi, Marcelo, 1967-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effect of the interaction of macrophages co-cultivated with *Leishmania amazonensis* and bacteria in the control of parasitary infection
Palavras-chave em inglês:
Leishmania amazonensis
Macrophages
Coinfection
Extracellular vesicles
Cytokines
Pseudomonas aeruginosa
Staphylococcus aureus
Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia
Titulação: Mestre em Biologia Animal
Banca examinadora:
Selma Giorgio [Orientador]
Danilo Ciccone Miguel
Fausto Bruno dos Reis Almeida
Data de defesa: 08-03-2023
Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0001-8419-2051
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/4197943615221183

Campinas, 08 de março de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) Selma Giorgio (orientadora)

Prof.(a) Dr.(a) Danilo Ciccone Miguel

Prof.(a) Dr.(a) Fausto Bruno dos Reis Almeida

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

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

In memorian, José Gallo, Maria da Conceição Francisco e Antônio Francisco, falecidos avós, e todos os que se foram durante a pandemia, que permanecerão eternamente nos corações de toda a família.

Agradecimentos

À Deus, por iluminar os caminhos desta trajetória.

Agradeço à toda minha família, em especial meus pais Elizabeth Cristina Gallo Francisco e Eduardo José Francisco e à minha irmã, Amanda Gallo Francisco, pela presença constante, pelo reconhecimento e incentivo para que a realização e conclusão deste trabalho fosse possível.

Aos amigos que prestigiaram o tempo todo para o sucesso deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Prof.ª Dr.ª Selma Giorgio, por ter sido a base do que veio a ser a minha construção profissional, pelas oportunidades e ensinamentos, confiança, inspiração, aprendizados e conhecimentos adquiridos durante todo o tempo de permanência no Laboratório de Leishmanioses (LabLeish), do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Marcelo Brocchi por todo o suporte e ensinamentos obtidos, pela paciência e oportunidade de aprender a explorar o universo da microbiologia, no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Bacteriana (LGBMB), do IB da UNICAMP.

Agradeço à Prof.ª Dr.ª Francisca Janaína Soares Rocha do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), por todos os conselhos e aprendizados durante esses anos de colaboração com o laboratório.

Aos antigos colegas do LabLeish, Nahiara Esteves Zorgi, Luis Augusto Visani de Luna, Fernanda Negrão e Gabriela Guimarães Carvalho, por todos os ensinamentos, e aos atuais, Guilherme Augusto Sanches Roque, Marina Flóro e Silva, Analilde Ferreira Alves, Diullia de Andrade Machado, Leonardo Fernandes Geres, Elena Sartori, Júlia Miralha e Beatriz Silva Costa, pela amizade e cooperatividade no laboratório e pelos momentos de descontração.

Aos colegas do LGBMB, Tamires, Aline, Diana Carolina, Genesy, Yéssica, Marco Túlio, Isabela Carolina, Mateus e Pâmela Thalita pelo acolhimento no laboratório, aprendizados adquiridos e amizade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, processo nº 88882.435392/2019-1; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos nº 405581/2018-1 e 370491/2019-0; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº

2018/23302-6 e 2019/11061-7; e Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão – FAEPEX, processo nº 2513/2021.

Aos antigos funcionários do Laboratório de Doenças Tropicais, Sandra Soares Martins, Ana Cristina Alves de Almeida, Evandro Luis Rodrigues Pedro e Carla Cristina Judice Maria pelos treinamentos técnicos e por auxiliarem e zelarem pela manutenção do laboratório; e às atuais funcionárias, Juliana Almeida Leite e Karen Linares Ferrari por continuarem prestando toda a assistência necessária.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Dr. Nilson Branco e Camilo Zupirolli Janeri, pelo excelente suporte técnico proporcionado para os animais de experimentação.

Aos professores da UNICAMP, em especial do Departamento de Parasitologia do IB, Drs. Silmara Marques Allegretti, Marlene Tiduko Ueta, Danilo Ciccone Miguel, Patrícia Jacqueline Thyssen, Adriano Cappellazzo Coelho, Fernanda Janku Cabral e Fernanda Ramos Gadelha pela ampla participação da minha formação acadêmica.

Ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), juntamente com Felipe Franco da Rocha e Janine Schincariol Sabino, pela excelente prestação de serviço e colaborações com as análises de citometria de fluxo, e pelos aprendizados.

Ao Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida e seu grupo de pesquisa, do Laboratório de Glicobioquímica e Doenças Infecciosas, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), pela colaboração a extração de vesículas, e por todos os ensinamentos.

À Prof.ª Dr.ª Eneida de Paula e Erika Ferraresso dos Anjos, do Laboratório de Biomembranas, pelas colaborações com a utilização dos Equipamentos Multiusuários oferecidos no IB da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, e à aluna Natália Scanavachia da Silva, do Laboratório de Regeneração Nervosa, pela colaboração com as microscopias eletrônicas de transmissão, realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do IB da UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada, e à aluna Cecília Costa Fagundes, do Laboratório de Estudos da Dor, do IB da UNICAMP, pela colaboração com os ensaios imunoenzimáticos.

À Comissão de Pós-Graduação da Biologia Animal (CPG-BA), Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PRPG), à Pró-Reitoria de Pesquisa (PRP) e a todos os funcionários da

Biblioteca e do IB da UNICAMP, pelo suporte oferecido.
À UNICAMP, pelo acolhimento durante todos esses anos.

“A tarefa não é ver o que nunca foi visto antes, mas pensar o que nunca foi pensado antes sobre o que se vê todos os dias” – Erwin Schrödinger

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas, causadas pelo protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* spp., parasita principalmente de macrófagos. As formas da doença variam desde lesões cutâneas simples que podem ser autorresolutivas, até a forma visceral que, quando não tratada, pode ser fatal. No Brasil, as principais espécies envolvidas na leishmaniose cutânea localizada (LCL) são *L. braziliensis* e *L. amazonensis.* A úlcera típica da LCL é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele, onde coinfecções secundárias causadas por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são observadas com frequência em clínica. O papel da coinfecção secundária na evolução e desfecho da LCL não foi comprovado, mas o conjunto de sinais e sintomas resultantes do processo pode prejudicar o quadro clínico dos hospedeiros infectados, requerendo tratamento específico. Este trabalho teve como objetivo, analisar a influência da presença de vesículas de membrana externa (OMVs) de *P. aeruginosa* ATCC 27853, ou de vesículas extracelulares (EVs) de *S. aureus* ATCC 25923, frequentemente reportadas durante a LCL, em macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis,* e se a carga parasitária, produção de óxido nítrico (NO) e de citocinas são alteradas. As análises das vesículas das bactérias estudadas, por microscopia eletrônica de transmissão e nanorastreamento, são consistentes com os achados da literatura, acerca de seu diâmetro e concentração. Os resultados mostraram reduções significativas na porcentagem de macrófagos infectados (13,29% - 80,6%), número de amastigotas/macrófago infectado, Índice de Infecção (IF) e número de macrófagos viáveis (29,11% - 77,88%), nas co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as vesículas de ambas as bactérias. Foram observadas alterações morfológicas nas culturas de macrófagos expostas as vesículas, sem infecção pelo parasita, quando comparado com o controle saudável, sem exposição as vesículas. As quantificações de NO, IL-6 e IL-4 revelaram uma produção diminuída, enquanto as citocinas IL-1β e TNF-α revelaram uma produção aumentada, nas co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* e expostas as vesículas de ambas as bactérias. Esses dados sugerem um possível efeito de modulação negativa da resposta celular mediada por NO, IL-6 e IL- 4, e uma regulação positiva para a resposta

inflamatória, quando as vesículas entram em contato com macrófagos previamente infectados com o parasita, sugerindo um possível papel nas reduções nos parâmetros mencionados anteriormente. Dados reportados na literatura, demonstraram que vesículas de bactérias são imunogênicas e medeiam a resposta inflamatória por receptores *Toll-like* (TLR), ativando a via dos inflamassomos NLRP3 e das caspases, desencadeando disfunção mitocondrial por proteínas apoptóticas. Conclusivamente, os dados mostram que o modelo de infecção de macrófagos com *L. amazonensis* e exposição as vesículas, mimetiza e reproduz uma interação entre hospedeiro-parasita-bactéria, pois são altamente imunogênicas em células hospedeiras, podem ativar a via TLR, e serem utilizadas como importantes alvos para plataformas vacinais futuramente.

Palavras-chave: *L. amazonensis;* macrófagos; coinfecção secundária; *P. aeruginosa; S. aureus;* vesículas extracelulares; óxido nítrico; citocinas.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases caused by the protozoan belonging to the genus *Leishmania* spp., parasite mainly of macrophages. The forms of the disease range from simple cutaneous lesions that can be self-resolving, to the visceral form that, if left untreated, can be fatal. In Brazil, the main species involved in localized cutaneous leishmaniasis (LCL) are *L. braziliensis* and *L. amazonensis.* The typical LCL ulcer is painless and is usually located in exposed areas of the skin, where secondary coinfections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are frequently observed in the clinic. The role of secondary coinfection in the evolution and outcome of LCL has not been proven, but the set of signs and symptoms resulting from the process can impair the clinical status of infected hosts, requiring specific treatment. This work aimed to analyze the influence of the presence of outer membrane vesicles (OMVs) of *P. aeruginosa* ATCC 27853, or extracellular vesicles (EVs) of *S. aureus* ATCC 25923, frequently reported during LCL, in previously infected macrophages with *L. amazonensis*, and if the parasite load, production of nitric oxide (NO) and cytokines are altered. The analyzes of the vesicles of the studied bacteria, by transmission electron microscopy and nanotracking analysis, are consistent with the findings in the literature, regarding their diameter and concentration. The results showed significant reductions in the percentage of infected macrophages (13.29% - 80.6%), number of amastigotes/infected macrophage, Infection Index (IF) and number of viable macrophages (29.11% - 77.88%), in the co-cultures of macrophages infected with *L. amazonensis* and exposed to the vesicles of both bacteria. Morphological changes were observed in the cultures of macrophages exposed to the vesicles, without parasite infection, when compared with the healthy control, without exposure to the vesicles. The quantifications of NO, IL-6 and IL-4 revealed a decreased production, while the cytokines IL-1β and TNF-α revealed an increased production, in the co-cultures of macrophages infected with *L. amazonensis* and exposed to the vesicles of both bacteria. These data suggest a possible effect of negative modulation of cellular response mediated by NO, IL-6 and IL-4, and a positive regulation for the inflammatory response, when vesicles come into contact with macrophages previously infected with the parasite, suggesting a possible role in reductions in the parameters mentioned above. Data reported in the literature demonstrated that bacterial vesicles are

immunogenic and mediate the inflammatory response by Toll-like receptors (TLR), activating the NLRP3 inflammasome pathway and caspases, triggering mitochondrial dysfunction by apoptotic proteins. Conclusively, the data show that the model of macrophage infection with *L. amazonensis* and exposure to vesicles, mimics and reproduces a host-parasite-bacteria interaction, as they are highly immunogenic in host cells, can activate the TLR pathway, and can be used as important targets for vaccine platforms in the future.

Key words: *L. amazonensis;* macrophages; secondary coinfection; *P. aeruginosa; S. aureus;* extracellular vesicles; nitric oxide; cytokines.

Lista de ilustrações

Figura 1. Representação esquemática do sistema *Transwell* (A) evidenciando o compartimento superior contendo a membrana com microporos de 0,4 µm de tamanho, e o compartimento inferior; e fotografia de um inserto *transwell* contendo meio de cultura (B)……..……... 41

Figura 2. Representação esquemática dos ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias *P.a.* ou *S.a* em sistema *transwell*……...……... 41

Figura 3. Representação esquemática dos ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não, as POMVs ou SEVs….. 45

Figura 4. Imagens de placas de Petri com bactérias *P.a.* (A) e *S.a.* (B) estriadas em meio de cultura LB ágar. Pode-se observar a presença de colônias isoladas após 18 h em estufa……..……..…… 50

Figura 5. Quantidade média de *P.a.* (A) e *S.a.* (B), em UFC/mL, em função de intervalos de 30 minutos……..……... 50

Figura 6: Fotomicrografias de culturas de macrófagos da linhagem murina RAW 264.7……... 51

Figura 7: Quantidade média de bactérias intracelulares, em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *P.a.* …….…….. 52

Figura 8: Quantidade média de bactérias intracelulares, em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 da bactéria *P.a.* ……...…..……..… 53

Figura 9. Quantificação dos macrófagos aderentes e viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *P.a.* Contagem de macrófagos RAW 264.7 em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x……. 54

Figura 10. Quantificação dos macrófagos viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 da bactéria *P.a.* Contagem de células RAW 264.7 aderidas em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x…….....….. 55

Figura 11. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *P.a.* nas proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 durante 1 h. Coloração com Giemsa……..……..… 56

Figura 12: Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com P.a. nas proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 durante 1 h. Coloração com Giemsa…...……... 57

Figura 13. Quantidade média de bactérias intracelulares, em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *S.a.*……...…… 59

Figura 14. Quantificação dos macrófagos viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *S.a.* Contagem de macrófagos RAW 264.7 aderidos em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x…….. 60

Figura 15. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *S.a.* nas proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 durante 1 h. Coloração com Giemsa...…...…….. 61

Figura 16: Fotomicrografias de promastigotas de *L. amazonensis* corados com Giemsa……...……... 62

Figura 17. (A) Porcentagem média de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell*; (B) Aumento médio na porcentagem de macrófagos infectados em sistema *transwell*, em porcentagem relativa ao controle, sem exposição as bactérias……...……... 64

Figura 18. Número de amastigotas/macrófago infectado com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell*…...…..……..…… 65

Figura 19. Índice de Infecção (IF) dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell*……..……..... 65

Figura 20. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas celulares

saudáveis; infectadas com *L. amazonensis* sem exposição as bactérias no sistema *transwell*; ou infectadas com *L. amazonensis* e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* no sistema *transwell*..……..……... 69

Figura 21. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell.* Coloração com Giemsa.…….…..... 73

Figura 22. Colônias de bactérias em meio de cultura LB ágar, evidenciando as contaminações das co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* durante 24 h, e expostos as bactérias *P.a.* (A) ou *S.a.* (B) no sistema *transwell*….. 74

Figura 23. Caracterização das POMVs (A e B) e SEVs (C e D) por NTA..…… 76

Figura 24. Captura das POMVs (A) e SEVs (B) observadas sob microscopia de espalhamento de luz a laser acoplado ao NTA……...…….. 77

Figura 25: Quantificação de proteína total das POMVs e SEVs por Bradford…...… 77

Figura 26: MET das POMVs (A) e SEVs (B) ……..…… 79

Figura 27. (A): Porcentagem média de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs; (B) Porcentagem média de macrófagos infectados, em porcentagem relativa ao controle…..……...……... 81

Figura 28. Número de amastigotas/macrófago infectado com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs.……..…...……... 82

Figura 29. IF (Índice de Infecção) das co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs……..……... 83

Figura 30. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas de macrófagos sem e com exposição as POMVs ou SEVs.……...……..… 85

Figura 31. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 sem e com exposição as POMVs ou SEVs, corados com Giemsa.…….…… 87

Figura 32. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas celulares

saudáveis ou infectadas com *L. amazonensis,* sem exposição as POMVs ou SEVs……...… 88

Figura 33. Contagem de macrófagos RAW 264.7 viáveis em 20 campos, nas co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs.…….. 90

Figura 34. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs. Coloração com Giemsa...… 92

Figura 35: Curva de calibração do Método de Griess……..……..…… 93

Figura 36. (A): Concentração de nitrito em µM, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos ou não POMVs ou SEVs; e (B): das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas ou não POMVs ou SEVs.……..… 96

Figura 37. Concentração de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-4 (C) e IL-1β (D) em pg/mL, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos ou não POMVs ou SEVs, sem infecção pelo parasita.……..……..……...… 98

Figura 38. Concentração de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-4 (C) e IL-1β (D) em pg/mL, nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não POMVs ou SEVs.……..…….……. 100

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC: Coleção de Cultura Tipo Americana

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

BSA: Albumina do Soro Bovino

CBA: Matriz de Esferas Citométricas

CCL2: ligante 2 da quimiocina de motivo C-C

CD4: Grupamento de diferenciação 4

CD8: Grupamento de diferenciação 8

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CXCL2: Ligante 2 da Quimiocina de Motivo C-X-C

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EVs: Vesículas Extracelulares

H_2O_2: Peróxido de hidrogênio

H_2SO_4: ácido sulfúrico

h: hora

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IFN-γ: interferon gama

IL-1: interleucina-1

IL-2: interleucina-2

IL-4: interleucina-4

IL-6: interleucina-6

IL-10: interleucina-10

IL-17A: interleucina-17A

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

kV: Quilovolt

LB: Luria-Bertani

LC: Leishmaniose Cutânea

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LCD: Leishmaniose Cutâneo-difusa

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LPS: lipopolissacarídeo

LV: Leishmaniose Visceral

M: Molar

MAPK: Proteína Kinase Ativada por Mitógeno

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFI: Intensidade Média de Fluorescência

MIP-1α: Proteína Inflamatória de Macrófago-1α

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

MV: Vesículas de Membrana

NF-kB: Fator de transcrição nuclear-Kappa B

NLRC: *nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors containing* CARD – *Caspase Activation and Recruitment Domain*

NLRP: *nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors, pyrin domain-containing protein*

nm: nanômetro

NO: óxido nítrico

NO_2^-: nitrito

NTA: Analisador de Partículas por Nanorastreamento

OMS: Organização Mundial da Saúde

OMVs: Vesículas de Membrana Externa

P.a.: Pseudomonas aeruginosa

PAMP: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PE: Ficoeritrina

PES: poliestireno

POMVs: Vesículas de Membrana Externa de *P. aeruginosa*

rpm: rotações por minuto

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute-1640*

RNA: Ácido Ribonucleico

S.a.: Staphylococcus aureus

SEVs: Vesículas Extracelulares de *S. aureus*

SFB: Soro Fetal Bovino

TGF-β: Fator Transformador de Crescimento-β

Th1: T-helper 1

Th2: T-*helper* 2

Th17: T-*helper* 17

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF-α: Fator de Necrose Tumoral-α

TSB: caldo de soja tríptico

UI: Unidade Internacional

µL: microlitro

Lista de símbolos

≅: Aproximadamente igual

ºC: Graus Celsius

%: Porcentagem

Sumário

1. Introdução……..… 23
1.1 Ciclo de vida e distribuição de *Leishmania* spp…… 23
1.2 Relevância do ambiente oxidativo……..… 25
1.3 Patogenia, resposta imune e tratamento das leishmanioses……. 26
1.4 Infecções secundárias causadas por bactérias…… 27
1.5 Vesículas de membrana de bactérias……... 32
2. Justificativa……...…. 35
3. Objetivos……...…. 36
3.1 Objetivo geral…….. 36
3.2 Objetivos específicos……. 36
4. Material e métodos…….. 36
4.1 Bactérias…….. 36
4.2 Curvas de crescimento das bactérias *P.a.* e *S.a.*…….… 37
4.3 Células e condições de cultivo……. 37
4.4 Ensaios de invasão das bactérias *P.a.* ou *S.a.* em macrófagos murinos RAW 264.7……... 38
4.5 Parasitas…….. 39
4.6 Ensaio das bactérias *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell* e macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis*…….…….. 39
4.7 Extração das vesículas das bactérias *P.a.* e *S.a*…….. 42
4.8 NTA (*Nanoparticle tracking analysis*) das POMVs e SEVs……. 43
4.9 Ensaio de Bradford…… 43
4.10 Ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs……... 43
4.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das POMVs e SEVs……... 46
4.12 *Cytometric Bead Array* (CBA)…… 47
4.13 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para quantificação de IL-1β……... 47
4.14 Quantificação de NO_2^- (nitrito)……..……... 48
4.15 Análise estatística…… 49
5. Resultados……. 49
5.1 Curvas de crescimento de *P.a.* e *S.a*……. 49

5.2 Ensaios de invasão de P.a. em macrófagos murinos RAW 264.7……... 50
5.3 Viabilidade e morfologia dos macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *P.a*…….... 53
5.4 Ensaios de invasão de *S.a.* em macrófagos murinos RAW 264.7…… 58
5.5 Viabilidade e morfologia dos macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *S.a*…….…… 59
5.6 *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell* e macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis*……. 61
5.7 Viabilidade e morfologia dos macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell*…….. 66
5.8 Extração e isolamento de POMVs e SEVs……... 74
5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de POMVs e SEVs……... 77
5.10 Macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs……. 79
5.11 Viabilidade e morfologia dos macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs…….....… 83
5.12 Quantificação de NO_2^- (nitrito) nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs……... 93
5.13 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs…….. 97
6. Discussão…… 101
7. Conclusão……... 118
8. Referências……. 120
Anexo 1 – Certificado de aprovação do uso de animais pelo CEUA/UNICAMP…. 140
Anexo 2 – Direitos autorais…….…….. 142

1. Introdução

1.1 Ciclo de vida e distribuição de *Leishmania* spp.

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, que representam um importante problema de saúde pública no mundo (OMS, 2021). Existem cerca de 20 espécies de protozoários parasitas do gênero *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) que são responsáveis por causar um amplo espectro de condições clínicas. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença e compreende lesões cutâneas, variando em gravidade desde lesões ulcerativas únicas que podem ser autorresolutivas (leishmaniose cutânea localizada, LCL), ou evoluir para lesões crônicas e, em casos menos frequentes, as lesões se tornam difusas pela pele (leishmaniose cutâneo-difusa, LCD) e mucosas (leishmaniose mucocutânea, LMC), com intensa destruição tecidual, disseminação metastática comprometendo as membranas mucosas do nariz, boca e garganta (Carvalho *et al.,* 1994; Scorza; Carvalho; Wilson, 2017; Christensen *et al.,* 2019). A leishmaniose visceral (LV), forma mais severa da doença, pode ser fatal se não tratada (OMS, 2021). Ambas as formas são endêmicas em regiões tropicais e subtropicais de 98 países (Torres-Guerrero *et al.,* 2017; OMS, 2021).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LC está distribuída no Mediterrâneo, África, Ásia, Oriente Médio e em muitos países da América Central e do Sul. Segundo a OMS, estima-se cerca de 600.000 – 1 milhão de novos casos de LC, e para LV são estimados cerca de 50.000 – 90.000 novos casos, ambos anualmente, embora haja uma subnotificação de casos (OMS, 2021; Singh- Phulgenda *et al.,* 2022). Estima-se que cerca de 1 bilhão de indivíduos estejam sob risco de se infectar com *Leishmania* spp. em áreas endêmicas (OMS, 2021). Nos últimos anos, houve um aumento dos casos de leishmaniose em várias regiões do mundo, fato associado tanto à maior exposição aos vetores de flebotomíneos quanto ao surgimento de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV- positivos) (Aruleba *et al.,* 2020; Mohammed *et al.,* 2020). Por outro lado, existe uma relação direta entre o número de indivíduos com a doença e a falta de recursos de contenção, o comprometimento do sistema imunológico, desnutrição e condições de moradia precárias (Torres-Guerrero *et al.,* 2017; Burza; Croft; Boelaert, 2018).

Os vetores que transmitem as leishmanioses são insetos flebotomíneos fêmeas (Diptera: Psychodidae), hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* sp. no Velho Mundo, e *Lutzomyia* sp. no Novo Mundo (Burza; Croft; Boelaert, 2018). O parasita possui um ciclo de vida heteroxeno dimórfico, constituído por uma forma promastigota flagelada, alongada e móvel, sendo encontrada no tubo digestivo dos flebotomíneos; e uma forma amastigota, que possui formato oval, e é encontrada no interior da célula do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes do parasita, são fixadas no intestino do vetor flebotomíneo fêmea, e a inoculação ocorre através do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado não infectado, dando início a infecção. As lesões geralmente aparecem no local da picada do vetor flebotomíneo, em regiões expostas do corpo do hospedeiro. As formas promastigotas geralmente invadem células do sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos e neutrófilos que fagocitam os parasitas. Após a internalização, o fagossomo e o lisossomo desses fagócitos se fundem, formando o fagolisossomo, ou vacúolo parasitóforo e, em seguida, os parasitas se transformam em formas amastigotas (Bates, 2018).

No interior da célula hospedeira, o parasita prolifera intensamente, provocando a lise da célula, onde no fluído extracelular, infecta outras células e, através de mecanismos de escape, permanece no hospedeiro. Assim, em outro repasto sanguíneo, o vetor flebotomíneo não infectado ingere as formas amastigotas, que se transformam e maturam em promastigotas metacíclicos no intestino médio, onde o parasita sofre sucessivas replicações por fissão binária. No próximo repasto sanguíneo, o flebótomo fêmea infectado inocula as promastigotas metacíclicas em um hospedeiro não infectado, e o ciclo de vida do parasita se completa (Alemayehu & Alemayehu, 2017).

Diferentes espécies do parasita estão associadas com diferentes manifestações da doença, onde a combinação de fatores do parasita e características do hospedeiro, como o balanço e a regulação das respostas imune pró e anti-inflamatória do hospedeiro e a biologia do vetor, podem influenciar no desfecho da doença (Kevric; Cappel; Keeling, 2015).

As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LC no Novo Mundo são *L. amazonensis, L. braziliensis, L. mexicana* e *L. guyanensis,* enquanto no Velho Mundo as espécies que causam LC são *L. major, L. tropica* e *L. aethiopica*. A úlcera típica de LCL é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele,

podem medir de alguns milímetros até alguns centímetros, com base eritematosa, bordas bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras (Pace, 2014; Solomon *et al.,* 2016).

L. amazonensis, espécie utilizada nesse trabalho, provoca LCL em hospedeiros que respondem ao tratamento ou podem curar-se espontaneamente (Scorza; Carvalho; Wilson, 2017; Burza; Croft; Boelaert, 2018), e se não controlada pelo hospedeiro ou pelo tratamento antimonial, por exemplo, o parasita pode se disseminar de um local para outro, caracterizando LCD (Carvalho *et al.,* 1994; Silveira *et al.,* 2009; Burza; Croft; Boelaert, 2018; Herrera *et al.,* 2020), condição raramente notificada. Em linhagens murinas suscetíveis, as lesões são caracterizadas por um grande número de amastigotas em divisão e migração de células inflamatórias (Araújo; Giorgio, 2015). Na tentativa de avaliar o prognóstico dessas lesões é necessário o conhecimento do microambiente tissular.

1.2 Relevância do ambiente oxidativo

A modificação do microambiente lesional por fatores bióticos (infecções secundárias) e abióticos (por exemplo, temperatura e concentração de oxigênio) alteram a resposta de macrófagos a infecção intracelular com o parasita (Arrais-Silva *et al.,* 2006; Hartley *et al.,* 2014). Adicionalmente, o tratamento com oxigenação hiperbárica (HBO) exerceu uma toxicidade direta para as formas de *L. amazonensis,* promovendo um ambiente oxidativo (Arrais-Silva *et al.,* 2006). De fato, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e outros laboratórios, demonstraram que o microambiente em que macrófagos infectados se encontram é crucial para o estabelecimento ou controle da infecção (Degrossoli *et al.*, 2007; Degrossoli *et al.*, 2011; Hartley *et al.,* 2014; Araújo; Giorgio, 2015). Por exemplo, quando macrófagos foram submetidos ao tratamento com HBO, houve um controle do número de amastigotas de *L. amazonensis*, o que pode estar relacionado à produção de radicais livres de oxigênio (Degrossoli *et al.*, 2007; Degrossoli *et al.*, 2011). Foi relatada uma redução no número de células infectadas e na carga parasitária, quando macrófagos infectados com o parasita foram tratados com HBO (Arrais-Silva *et al.,* 2005). Ainda, um efeito adjuvante da HBO foi observado em macrófagos infectados com *L. amazonensis,* que apresentaram uma redução expressiva na infecção quando associado os tratamentos da HBO e antimonial pentavalente, quando comparado ao tratamento individual (HBO ou antimonial pentavalente)

(Ayres *et al.,* 2011). Resultados semelhantes foram observados, em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, infectados com *L. tropica* e tratados com HBO (Koru *et al.,* 2012). Em relato de caso, um homem de 30 anos do Oriente Médio, apresentando quadro de lesão ulcerativa, mostrou progressão significativa na carga parasitária quando submetido ao tratamento com HBO em associação com antimonial pentavalente (Olszański *et al.,* 2017), confirmando os resultados observados por Ayres e colaboradores (2011). Esses resultados indicam que a exposição dos macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo,* a diferentes microambientes induz a plasticidade dessas células (Giorgio, 2013), e a indução de uma resposta protetiva.

1.3 Patogenia, resposta imune e tratamento das leishmanioses

A patogenia das leishmanioses está ligada principalmente com a polarização da resposta imune do hospedeiro contra o parasita, mas também outros fatores como predisposição genética. No estágio inicial da infecção, as formas promastigotas metacíclicas do parasita, circulam na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, e imediatamente, os neutrófilos ou macrófagos realizam o reconhecimento e apresentação dos antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T CD4+. Fenotipicamente, esses linfócitos podem expressar diferentes citocinas, separando-os em duas principais subpopulações, do tipo Th1 (*T helper 1*) ou Th2 (De Oliveira *et al.*, 2011; Hartley *et al.,* 2014). Nas leishmanioses, o perfil de ativação do tipo Th1 pode favorecer o hospedeiro eliminando os parasitas intracelulares, e este padrão de resposta Th1 leva à diferenciação de células que secretam citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 (interleucina-2), IFN-γ (interferon gama), IL-12 e TNF-α (*Tumor Necrosis Factor*-α), e as quimiocinas CCL2 (ligante 2 da quimiocina de motivo C-C), CXCL9 (ligante 2 da quimiocina de motivo CXC) e CXCL10 (De Oliveira *et al.,* 2011; Hartley *et al.,* 2014).

Entretanto, quando há polarização da resposta imune para o tipo Th2, as citocinas IL-4, IL-10, TGF-β (*Transforming Growth Factor*-β), e as quimiocinas CCL3 e CCL7 produzidas, podem levar à persistência parasitária e à cronicidade da doença, dependendo da espécie do parasita (De Oliveira *et al.,* 2011; Hartley *et al.,* 2014; Marques-da-Silva *et al.,* 2018). A evolução para a cura autorresolutiva é resultado de um perfil de ativação predominantemente do tipo Th1 durante as leishmanioses. Por outro lado, a resposta do tipo Th2 caracteriza-se pela inibição da

expansão da população de linfócitos, levando à um estado de tolerância do hospedeiro ao parasita, que perpetua para um quadro crônico da doença no indivíduo (Neves, 2011). Nestes casos, muitas vezes os tratamentos convencionais são eficientes, e a evasão ao tratamento pode ocorrer entre os pacientes com baixa parasitemia. Além disso, dependendo do perfil de resposta do hospedeiro, a presença das citocinas do tipo Th2 secretadas não são efetivas contra o parasita, podendo inibir a ação de citocinas da resposta do tipo Th1 (Nabavi *et al.,* 2018).

Para o tratamento das leishmanioses em seres humanos no Brasil, o fármaco de primeira escolha é o antimoniato de meglumina (Glucantime®), e vem sendo utilizado em pacientes que estejam apresentando as manifestações clínicas da doença (McGwire; Satoskar, 2014). Entretanto, efeitos adversos são observados, incluindo febre, mialgia, náusea, vômito, erupções cutâneas, inflamação no local de injeção, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, em conjunto com intervenção terapêutica prolongada e relato de casos de resistência em certos países endêmicos, atestam para a necessidade de desenvolvimento de novos tratamentos menos tóxicos (Masmoudi *et al.,* 2005; Beheshti, 2007). Como alternativa para os casos de resistência relatados, a miltefosina foi introduzida no esquema terapêutico de alguns países da ásia e do oriente (Dorlo *et al.,* 2012). A pentamidina, paramomicina e anfotericina B lipossomal, são fármacos que podem ser utilizados para o tratamento das demais formas clínicas das leishmanioses, e tem diferentes mecanismos de ação e alvo contra o parasita (McGwire; Satoskar, 2014).

1.4 Infecções secundárias causadas por bactérias

Um problema prático que pode prejudicar a condição clínica dos hospedeiros infectados com *L. amazonensis* ou *L. aethiopica*, são as infecções secundárias causadas por bactérias oportunistas ou patogênicas (Ziaei; Sadeghian; Hejazi, 2008; Endris *et al.,* 2014; Lopes *et al.,* 2016; Salgado *et al.,* 2016; Gimblet *et al.,* 2017). Estas coinfecções causadas por bactérias durante a LCL, são amplamente reportadas em seres humanos e em cães (Carvalho *et al.,* 1994; Ciaramella *et al.,* 1997; Kirby *et al.,* 2009; Mylonakis *et al.,* 2014; Salgado *et al.,* 2016; Scorza; Carvalho; Wilson, 2017; Torres-Guerreiro *et al.,* 2017; Christensen *et al.,* 2019; Lappan *et al.,* 2019; Parin *et al.,* 2020), podendo ser associada a um tempo prolongado de hospitalização, maior suscetibilidade a infecções nosocomiais,

e até morte (Van der Vliet *et al.,* 2006; Velozo *et al.,* 2006).

Essas coinfecções causadas por bactérias, podem causar dor local e produzir exsudato inflamatório que recobre total ou parcialmente a úlcera (Gonçalves *et al.,* 2009). Adicionalmente, a coinfecção secundária e o uso de produtos tópicos podem causar eczema na pele, ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (Grimaldi; Tesh, 1993; Ziaie; Sadeghian, 2008).

A prevalência das infecções secundárias bacterianas durante a LCL em humanos, pode variar entre 18% e 81%, assim como o número de pacientes envolvidos em cada estudo (entre 25 a 1.255 pacientes) (el-Safi *et al.,* 1991; Vera *et al.,* 2001; Ziaei; Sadeghian; Hejazi, 2008; Gonçalves *et al.,* 2009; Sadeghian *et al.,* 2011), o que pode estar associado ao amplo espectro de lesões cutâneas observadas nas LCLs, as condições clínicas (leve, moderada ou severa), diferenças no material biológico utilizado para o estudo (sangue, exsudato, pele, mucosas, urina, fezes) e metodologia de identificação dos espécimes (série bioquímica ou meios seletivos para bactérias fastidiosas, PCR ou sequenciamento de material genético de micro-organismos não-fastidiosos) (Vera *et al.,* 2001; Isaac-Márquez & Lezama-Dávila, 2003; Gonçalves *et al.,* 2009; Sadeghian *et al.,* 2011; Doudi; Setorki; Narimani, 2012; Salgado *et al.,* 2016; Gimblet *et al.,* 2017).

Sendo assim, o dano tecidual causado pela úlcera leishmaniótica em hospedeiros infectados, pode ser uma porta de entrada para o desenvolvimento de infecções bacterianas, facilitando a penetração desses micro-organismos através de enzimas que lisam a barreira epidérmica, e subsequentemente, colonizam o tecido (Gimblet *et al.,* 2017). As lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* geralmente apresentam uma diversidade diminuída de bactérias, em especial, as aeróbias, quando comparado com a diversidade da pele saudável (Salgado *et al.,* 2016; Gimblet *et al.,* 2017). Uma microbiota disbiótica (resultado do desequilíbrio da microflora autóctona) foi observada por Gimblet e cols. (2017), com uma predominância das bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* nas lesões cutâneas de pacientes humanos infectados com *L. braziliensis.* Interessantemente, apesar de serem comumente encontradas espécies comensais do gênero *Staphylococcus, Streptococcus* ou *Bacteroides* na flora da pele saudável de humanos, proporções significativamente menores das espécies anaeróbias *Pseudomonas, Proteus, Escherichia coli* e *Klebsiella* são reportadas em feridas crônicas de pacientes diabéticos (Han *et al.,* 2011).

Em estudo de triagem com 84 pacientes apresentando lesão cutânea única induzida por *L. braziliensis,* a espécie *Corynebacterium diphtheriae* foi identificada na lesão de 8,3% dos pacientes avaliados, e apesar do risco da ocorrência de difteria, o papel desta bactéria durante estas coinfecções não foi elucidado (Vera *et al.,* 2002). Posteriormente, foram identificadas as espécies *Proteus* sp. (8,3%), *P. aeruginosa* (*P.a.*) (7,1%), *Klebsiella* sp. (7,1%), *Enterobacter* sp. (13,1%) e *S. aureus* (*S.a.*) (83%), sendo a última bactéria, a espécie mais encontrada entre os pacientes avaliados (Vera *et al.,* 2006). Em trabalho de Gonçalves e cols. (2009), foi estudada a flora bacteriana de 37 pacientes com diagnóstico definido de LCL. As espécies *S.a., S. saprophyticus, P.a.* e *K. pneumoniae,* foram as mais detectadas nas úlceras leishmanióticas (Gonçalves *et al.,* 2009). Outros estudos mostraram que *S.a.* é o micro-organismo mais frequentemente isolado das lesões ulceradas, e pode exibir diferentes perfis de resistência a antibióticos utilizados em clínica (Isaac-Márquez & Lezama-Dávila, 2003; Antonio *et al.,* 2017). Em trabalho de Isaac-Márquez & Lezama-Dávila (2003), foram avaliadas úlceras de Chiclero causadas por *L. mexicana,* sendo reportado um perfil de resistência de *S.a.* à diferentes classes de antibióticos, como ampicilina, penicilina, cefixima e eritromicina, enquanto no trabalho de Antonio e cols. (2017), foi reportada resistência dessa espécie de bactéria aos aminoglicosídeos clindamicina e gentamicina.

A espécie *S. pyogenes,* exibiu resistência aos antibióticos trimetropim/sulfametoxazol, lomefloxacina, vancomicina e eritromicina (Isaac-Márquez & Lezama-Dávila, 2003). Decerto, estudos sugerem que os pacientes com lesões ulceradas na pele são mais propensos a infecção secundária, do que pacientes com lesões não-ulcerativas (Ziaei; Sadeghian, 2008; Salgado *et al.,* 2016), devido à intensa destruição da epiderme observada em lesões ulceradas, consistindo como um importante fator predisponente para as infecções secundárias bacterianas ocorrerem (Ziaei; Sadeghian; Hejazi, 2008). O tratamento específico para as infecções secundárias causadas por bactérias durante a LCL, requer administração de antibióticos de amplo espectro para Gram-negativas e Gram-positivas, antes ou concomitante ao tratamento com antimônio pentavalente (Glucantime®), com ressalvas para a necessidade deste esquema terapêutico ser repetido até três vezes, caso as lesões cutâneas não mostrem sinais de cicatrização (Isaac-Márquez & Lezama- Dávila, 2003).

Em geral, os pacientes respondem satisfatoriamente ao esquema terapêutico com antimonial pentavalente em associação com antibióticos (Vera *et al.,* 2001; Isaac-Márquez & Lezama-Dávila, 2003; Ziaei; Sadeghian, 2008; Layegh *et al.,* 2015). Em um estudo de caso, um paciente com LMC apresentando um quadro de comprometimento nasal, labial, no palato e com coinfecção confirmada para as bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Pseudomonas,* resultou em broncopneumonia, sepse e óbito, após tentativas de tratamento com anfotericina B lipossomal em associação com amoxicilina, ciprofloxacina, vancomicina e imipenem (Velozo *et al.,* 2006). Embora o fenômeno das coinfecções secundárias causadas por bactérias durante a LCL em humanos, apresentarem limitações éticas e muitos controles como os vistos em modelos experimentais murinos não serem implementados, estes últimos modelos têm constituído maior relevância para a concepção de hipóteses acerca do papel das bactérias durante este fenômeno.

As infecções secundárias com bactérias anaeróbicas e aeróbicas foram inicialmente reportadas por el-On; Sneier; Elias (1992) e Giorgio e cols. (1998), nos modelos murinos infectados com *L. major* e *L. amazonensis*, respectivamente. Foram identificadas as bactérias *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus, E. coli, Klebsiella* spp., *Pasteurella multocida, Proteus vulgaris, P.a.* e *S.a.* em lesões da pata de camundongos infectados com *L. major* (el-On; Sneier; Elias, 1992), enquanto a presença de *Clostridium* sp. na lesão murina causada por *L. amazonensis*, foi relacionada com estágios finais de infecção, cujas áreas necróticas centrais das lesões dos camundongos evidenciaram a produção de um característico odor de fermentação anaeróbia (Giorgio *et al.,* 1998). Achados recentes, sugeriram que o aumento na abundância de bactérias da classe Clostridia em amostras fecais de camundongos infectados com *L. major*, pode estar relacionado com diferenças metabólicas e polarização da resposta mediada por citocinas, observada nesses camundongos (Lamour *et al.,* 2015).

A influência da presença de bactérias durante as leishmanioses tem sido avaliada para determinar fenótipos agudo ou crônico, e para análise dos mecanismos imunes implicados na resistência e suscetibilidade tanto ao parasita, quanto às bactérias. Estudos recentes indicaram que a coinfecção bactéria-*Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor flebotomíneo infectado com *L. donovani*, onde o vetor expõe e deposita bactérias de própria microbiota e do hospedeiro, na pele de camundongos (Dey *et al.,* 2018). De maneira interessante, a

adição de bactérias no momento, ou sequencialmente à inoculação do parasita contribui para a gravidade da lesão, como observado por Lamour e cols. (2015). Quando foi inoculada a bactéria *P. vulgaris* ou *Klebsiella* sp. (Lamour *et al.,* 2015), ou *Staphylococcus* (Borbón *et al.,* 2019), juntamente com *L. major* em camundongos normais, ou bactérias em lesões de LCL, quase nenhuma eliminação da bactéria foi observada, enquanto o inóculo somente da bactéria em camundongos não infectados foi rapidamente eliminada do local de inoculação.

De maneira similar ao que foi observado em pacientes com LCL, relatos prévios foram confirmados por Gimblet e cols. (2017), de que a assembleia bacteriana em lesões de camundongos e na pele saudável é diferente, e que a esta diversidade é menor nas lesões (Salgado *et al.,* 2016), criando uma disbiose microbiana, ou seja, um desequilíbrio na comunidade microbiana comparada com a pele normal. Nesse sentido, os dados produzidos em modelos experimentais murinos, nos permitem fazer análises mais acuradas e menos empíricas, uma vez que os animais são mantidos em ambientes controlados, o número de indivíduos é definido e os fenótipos podem ser selecionados.

Em recente revisão (Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022), foi explorada a seguinte hipótese: ocorre facilitação seletiva, que contribui para o aumento na abundância de algumas espécies de bactérias nas lesões de LCL, resultando em disbiose, ou seja, na diminuição da diversidade da microbiota da pele dos hospedeiros infectados. O fenômeno de facilitação indireta, ocorreria principalmente quando o parasita danifica a barreira mecânica da pele do hospedeiro infectado com *L. amazonensis* ou *L. aethiopica,* criando um ponto de entrada/saída para outros micro-organismos. Este mecanismo de facilitação pode ocorrer através de alterações no microambiente da lesão, de normóxico para hipóxico, no pH e nas populações de células inflamatórias. Ainda, durante o fenômeno de disbiose e a infecção bacteriana, sugerimos uma interação competitiva ou neutra por recursos do hospedeiro ocorrendo nas lesões e a seleção da virulência tanto dos parasitas quanto das bactérias. Fato apoiado pelos estudos em modelos murinos, demonstrando que a adição de bactérias juntamente com a inoculação do parasita contribui para a gravidade da lesão, como mencionado (Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022).

1.5 Vesículas de membrana de bactérias

As coinfecções secundárias causadas por bactérias durante a LCL, pode resultar em uma disbiose (desregulação) da microbiota normal da pele, aumentando em quantidade determinadas espécies de bactérias, enquanto outras, são encontradas em menores proporções (Han *et al.,* 2011; Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022). Adicionalmente, em recente levantamento, foi verificado que as bactérias *S.a.* e *P.a.,* são encontradas com maior frequência em lesões leishmanióticas de humanos ou camundongos (Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022) e, portanto, devem ser investigadas com precaução. Desta forma, muitos trabalhos têm utilizado vesículas de membrana (*membrane vesicles* – MVs) de bactérias, como ferramentas essenciais para investigar tanto a virulência bacteriana, transferência horizontal de genes, transporte de metabólitos e comunicação entre células, quanto para estudar a regulação de vias inflamatórias e apoptóticas da célula hospedeira, por exemplo (Lee *et al.,* 2009; Gurung *et al.,* 2011; Bitto *et al.,* 2017; Furuyama & Sircili, 2021; Augustyniak; Olszak; Drulis-Kawa, 2022).

As bactérias podem secretar uma variedade de MVs (quanto aos mecanismos de biogênese) e têm ganhado mais atenção, pois tem sido relatada sua produção e liberação tanto por procariotos como por eucariotos (El Andaloussi *et al.,* 2013), sendo assim, a sua caracterização físico-química tem sido empregue cada vez mais (Choi *et al.,* 2011; Avila-Calderón *et al.,* 2015). A membrana externa bacteriana protege-a contra danos durante a infecção, garantindo ao mesmo tempo acesso ao ambiente. A produção de MVs tem sido observada naturalmente (Biller *et al.,* 2014; Soler *et al.,* 2014), mas também *in vitro* (Schooling & Beveridge, 2006; Park *et al.,* 2015; Murphy *et al.,* 2008; Deo *et al.,* 2020), bem como em tecidos e fluídos de hospedeiros infectados por bactérias (Namork & Brandtzaeg, 2002; Unal; Schaar; Riesbeck, 2011), podendo exibir funções patofisiológicas (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015). Estas estruturas são partículas nanométricas, podendo-se apresentar em formato esférico ou irregular e variam entre 20 e 400 nanômetros (nm) de diâmetro (Toyofuku; Nomura; Eberl, 2019; Bitto *et al.,* 2021).

Uma das primeiras evidências das MVs bacterianas foram reportadas há mais de 50 anos, como pequenos grânulos na superfície da parede celular abaulada, que podem ser formadas pela evaginação da membrana externa em Gram-negativas (*outer membrane vesicle* – OMV) (Siqueira *et al.,* 2014), ou a partir do conteúdo citoplasmático de bactérias Gram-positivas (*extracellular vesicle* – EV) (Toyofuku;

Nomura; Eberl, 2019), que não possuem membrana externa (Bladen & Waters, 1963; Bayer & Anderson, 1965; Chatterjee & Das 1967; Bitto *et al.,* 2021). Uma grande variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas ou não, secretam MVs em resposta à diferentes estímulos físico-químico-biológicos, como por exemplo, durante estresse nutricional, variação de temperatura, presença de antibióticos, alívio de estresse, comunicação intraespécies (transportando metabólitos e material genético), e interespécies durante competição por espaço e nutrientes, através da secreção de toxinas (Gurung *et al.,* 2011; Bitto *et al.,* 2017; Furuyama & Sircili, 2021).

Desde então, diversos trabalhos utilizam MVs purificadas, como forma de mimetizar a presença da bactéria estudada, já que são descritas por carregar em seu interior LPS (lipopolissacarídeo), glicerofosfolipídios, proteínas da membrana externa (*outer membrane protein* – OMP), lipídeo A, DNA, RNA, exotoxinas e proteases (Schwechheimer & Kuehn, 2015), que podem ser apresentadas a células competentes do sistema imune, desencadear a ativação de sinais e estimular a resposta imune celular e humoral, mostrando-se como importantes estruturas com papéis imunoestimulatório e imunomodulador para serem utilizadas futuramente como promissores candidatos vacinais (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015). Um dos principais focos neste campo, tem sido identificar como as vesículas bacterianas promovem a invasão de tecidos e colonização, e como induzem as respostas imunes.

As OMVs são capazes de ativar a piroptose, apoptose, inflamação e forte resposta humoral (Murphy *et al.,* 2008; Ellis; Leiman; Kuehn, 2010; Mowat *et al.,* 2011; Park *et al.,* 2013; Zhao *et al.,* 2013; Khaledi *et al.,* 2016; Abadi *et al.,* 2018; Deo *et al.,* 2020; Bittel *et al.,* 2021; Hadadi-Fishani *et al.,* 2021). Foi demonstrado que as OMVs derivadas de *Helicobacter pylori* e *P.a.,* induzem a produção de IL-8 (Mowat *et al.,* 2011; Khaledi *et al.,* 2016; Abadi *et al.,* 2018), e as de *Salmonella enterica* estimulam células dendríticas a secretarem IL-12 e TNF-α (Murphy *et al.,* 2008), citocinas essas, importantes para a indução de uma resposta protetora mediada por INF-γ. Essa resposta inflamatória pode estar ligada uma regulação positiva de muitas citocinas e quimiocinas, incluindo CCL2, CXCL1, TNF-α, IL-1β, IFN-γ e IL-6 (Park *et al.,* 2013). As OMVs de *P.a.* provocam uma resposta inflamatória mais severa, comparada com a resposta inflamatória induzida por LPS purificado, mas ambos participam nas respostas mediadas por citocinas (Ellis;

Leiman; Kuehn, 2010), adicionalmente, foi observada a participação de receptores *Toll-like* (TLRs), e secreção de níveis elevados das citocinas inflamatórias IL- 1β e IL-6 em células alveolares humana (Zhao *et al.,* 2013), e altos títulos de anticorpos IgG1 (Hadadi-Fishani *et al.,* 2021), demonstrando o potencial imunoestimulatório das OMVs dessa bactéria. Ainda, as OMVs de *P.a.* podem carregar e transportar para outras bactérias, DNA cromossomal, que codifica para proteínas relacionadas com fatores de virulência, resposta ao estresse, e resistência a antibióticos (Bitto *et al.,* 2017).

Foi demonstrado que OMVs de *Neisseria gonorrhoeae, E. coli* e *P.a.* induzem apoptose mitocondrial, através da participação de TLRs e secreção de proteínas apoptóticas por macrófagos murinos, que rompem as membranas mitocondrial e da célula hospedeira (Deo *et al.,* 2020). Como consequência deste processo, os receptores TLRs participam na ativação das caspases e do inflamassomo NLRP3 (*nucleotide-binding and oligomerization domain- like receptors, pyrin domain-containing protein 3*), com alta produção das citocinas inflamatórias IL-1β e TNF-α. Esse processo resultou na apoptose de macrófagos derivados da medula de camundongos, mostrando como as OMVs podem desempenhar importante papel no processo inflamatório e apoptótico (Deo *et al.,* 2020). A secreção de IL-1β de maneira caspase dependente e ativação da piroptose, foi observada em macrófagos murinos expostos as OMVs de *S. typhimurium, Shigella flexneri* e *P.a.* (Santos *et al.,* 2018).

A utilização de EVs de bactérias Gram-positivas de importância médica tem sido realizada nos últimos anos, e a elucidação de seu papel na patogênese das infecções, está sendo investigada. Por exemplo, foi demonstrada a produção e secreção de EVs nas bactérias *B. anthracis* (Rivera *et al.,* 2010), *B. subtilis* e *S.a.* (Lee *et al.,* 2009; Gurung *et al.,* 2011), sendo que as EVs da última bactéria, são capazes de induzir apoptose *in vitro* e *in vivo* (Gurung *et al.,* 2011), e que a entrega dos componentes associados a virulência bacteriana para o citoplasma da célula hospedeira, é um pré-requisito crucial para a citotoxicidade. Interessantemente, análises proteômicas das EVs de *S.a.,* revelaram um conteúdo rico em β-lactamases, hemolisinas, proteína ligante à penicilina e enterotoxina estafilocócica, que são importantes componentes de virulência que podem implicar diretamente na regulação de vias inflamatórias e apoptóticas, e na patogênese (Lee *et al.,* 2009; Lee, 2012).

Contudo, apesar dos efeitos deletérios que as MVs podem predispor uma célula, ou o hospedeiro, muitas pesquisas das últimas décadas têm demonstrado a aplicação de MVs como ferramentas poderosas para o fornecimento de diversos antígenos como plataformas vacinais. A indução de anticorpos e respostas de proteção já foram observadas contra diferentes OMVs contendo antígenos de *Bordetella pertussis* (Zurita *et al.,* 2019)*, Brucella melitensis* (Avila- Calderón *et al.,* 2012), *N. meningitidis* (Gerritzen *et al.,* 2019) e *S.a.* (Irene *et al.,* 2019). O antígeno em si, ou muitas das moléculas que compõem as OMVs utilizadas como sistema de entrega de antígeno, pode agir como um componente ativador efetivo de TLR, devidamente considerado como um dos fornecedores chave para a resposta imune efetiva induzida por OMVs.

Esses dados são importantes para auxiliar na compreensão dos mecanismos que induzem o carreamento e entrega de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP – *pathogen-associated molecular patterns*) para o citosol da célula hospedeira, com o intuito de ativar uma resposta inflamatória e protetiva pelas células hospedeiras. Para orquestrar respostas imunes ideais, deve-se reconhecer as OMVs ou EVs com PAMPs imunoestimulatórios, que são considerados como um sinal crítico para infecções que representam uma séria ameaça para o hospedeiro.

2. Justificativa

As leishmanioses são doenças negligenciadas e o prognóstico de lesões cutâneas é fundamental para o tratamento, e muitas vezes de difícil definição. Um problema prático que piora a situação dos hospedeiros infectados pelo parasita, e representa um fator adicional de morbidade, são as coinfecções causadas por bactérias, que colonizam lesões leishmanióticas (Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022), requerendo assim, tratamento específico contra infecções nosocomiais. A análise da influência da presença de OMVs ou EVs de bactérias oportunistas e/ou patogênicas, durante a infecção com *L. amazonensis,* auxiliará na compreensão da dinâmica lesional através de quantificações de mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO) e citocinas, pela célula hospedeira, e definir os possíveis efeitos para esta relação entre parasita-hospedeiro, ou seja, a suscetibilidade ou resistência do parasita ao hospedeiro.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi analisar se o inóculo de vesículas de membrana das bactérias *P.a.* ATCC 27853 (POMVs) ou *S.a.* ATCC 25923 (SEVs), alteram o perfil fenotípico, como produção de NO e citocinas, de macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis.*

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o cultivo das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923;
- Extrair, isolar e quantificar vesículas das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923;
- Avaliar a viabilidade de macrófagos expostos as vesículas das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923;
- Avaliação da infecção de macrófagos com *L. amazonensis* e expostos as vesículas das bactérias *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923;
- Quantificar NO nos sobrenadantes das co- culturas celulares;
- Quantificar as citocinas IL-10, IL-17A, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-4, IL-2 e IL-1β nos sobrenadantes das co-culturas celulares.

4. Material e métodos

4.1 Bactérias

A bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa* ATCC® (*American Type for Culture Collection* – Manassas, VA, EUA) 27853 (*P.a.*), e a Gram-positiva *S. aureus* ATCC® 25923 (*S.a.*) foram cultivadas em meio de cultura Luria-Bertani (LB) ágar para o inóculo e LB caldo para o pré-inóculo (Sambrook; Russell, 2001; Kępa *et al.,* 2018; Nassar; Hazzah; Bakr, 2019). A formulação do meio de cultura LB caldo foi feita com triptona, extrato de levedura (Acumedia®, Lansing, MI, EUA), e cloreto de sódio (Synth®, Diadema, SP, BRA); e para o LB ágar, foi adicionado a todos estes componentes, ágar bacteriológico a 1,5% (Oxoid®, Basingstoke, NH, GBR) (Sambrook; Russell, 2001). Para estocagem, as bactérias foram mantidas em

biofreezer (New Brunswick Scientific™ Innova® 44R – Eppendorf™, Hamburgo, GER) a -80 °C, em criotubos com LB caldo e 20% de glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para a realização do inóculo, as bactérias foram retiradas do *biofreezer* e estriadas pela técnica de esgotamento em LB ágar, para obtenção de colônias isoladas, e então foram incubadas em estufa bacteriológica SL - 101 (Solab®, Piracicaba, SP, BRA), a 37 ºC, durante 18 h. Para o pré-inóculo, uma colônia isolada de bactérias em LB ágar é transferida para o LB caldo com alça bacteriológica, para promover o crescimento por dispersão em agitador (New Brunswick Scientific™ Innova® 44R – Eppendorf™, Hamburgo, GER) a 150rpm, 37 ºC, durante 18 h (Kępa *et al.,* 2018; Nassar; Hazzah; Bakr, 2019).

4.2 Curvas de crescimento das bactérias *P.a.* e *S.a.*

Para a realização das curvas de crescimento dessas bactérias, o pré-inóculo bacteriano foi cultivado *overnight* em 3 mL de meio de cultura LB caldo. Logo após, transferiu-se uma alíquota de 500 µL do pré-inóculo, para um frasco contendo 50 mL de meio LB caldo, atingindo uma proporção de 1:100. Esse inóculo foi mantido em agitador a 150rpm, 37 ºC, e os sobrenadantes das culturas bacterianas foram lidos em leitor espectrofotômetro BioPhotometer 6131 (Hamburgo, GER), até que a densidade ótica $(D.O.)_{600nm}$ de 0,6 desejada fosse atingida. Para observar o crescimento da cultura de bactérias em função do tempo, foram realizadas diluições seriadas a partir da retirada de alíquotas de 100 µL da cultura a cada 30 minutos e plaqueamento pela técnica de gotejamento em meio LB ágar. As placas foram incubadas durante 18 h em estufa a 37 ºC para que a leitura dos resultados fosse feita. A média ± desvio padrão foram calculados a partir das triplicatas realizadas no experimento. Foram realizados três experimentos independentes.

4.3 Células e condições de cultivo

Macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 ATCC® TIB-71, foram obtidos do Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ. Estes macrófagos foram cultivados em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Vitrocell Embriolife, Campinas, SP, BRA), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 10mM HEPES (Calbiochem®, San Diego, CA, EUA), em estufa (Shel Lab – Cornelius, OR, EUA) a 37 °C, 5% CO_2, 21%

O_2 e N_2 balanceado (Colhone *et al.,* 2004; Degrossoli *et al.*, 2007). Esta linhagem de células foi isolada de camundongos da linhagem BALB/c machos e imortalizadas por vírus de leucemia Abelson (Raschke *et al.,* 1978).

4.4 Ensaios de invasão das bactérias *P.a.* ou *S.a.* em macrófagos murinos RAW 264.7

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos descritos por Elsinghorst (1994), e Lima e cols. (2015). Em nosso trabalho, fizemos uma adaptação de ambos os protocolos para as respectivas bactérias e macrófagos utilizados nos experimentos (Elsinghorst, 1994; Lima *et al.,* 2015).

As bactérias *P.a.* e *S.a.* foram cultivadas em meio de cultura LB ágar (inóculo) e LB caldo (pré-inóculo). Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI-1640 completo. As culturas celulares foram mantidas *overnight* em placas de 24 poços (contendo 2 x 10^5 macrófagos/poço) em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado. O meio foi retirado e descartado, a cultura foi lavada com PBS três vezes, para remoção de *debris* e adicionou-se o meio de cultura RPMI-1640 com 10% de SFB sem antibiótico, com o intuito de não promover a morte das bactérias, nas seguintes proporções de macrófago/bactérias: 1:5, 1:10 ou 1:20, além do controle positivo contendo macrófagos sem infecção. As culturas celulares foram incubadas com as bactérias *P.a.* ou *S.a.* durante 1 h, em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado; logo após o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados com PBS três vezes.

Em seguida, adicionou-se aos poços meio RPMI-1640 com 10% SFB e 100 µg/mL de gentamicina, para eliminação das bactérias extracelulares seguida pela incubação por 1 h em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado. Após 1 h o meio de cultura com antibiótico foi retirado e os poços foram então lavados novamente com PBS três vezes, para posterior adição de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, USA) 0,1% durante 5 minutos, sob agitação leve, para a lise dos macrófagos com bactérias internalizadas. Para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) das células lisadas, foram realizadas diluições seriadas entre 10^{-1} e 10^{-4}, a partir de uma alíquota de 100 µL dos poços e homogeneizada em tubo contendo 900 µL de solução salina 0,85%, seguido pelo plaqueamento pela técnica de gotejamento em triplicata, em meio de cultura LB ágar. As placas foram incubadas durante 18 h em estufa a 37 ºC para posterior

leitura dos resultados.

Lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro (Perfecta, São Paulo, SP, BRA) inseridas nos poços da placa, foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para visualização da aparência morfológica dos macrófagos com bactérias internalizadas sob microscópio óptico. Adicionalmente, foi realizada a quantificação de macrófagos íntegros e aderentes em 20 campos representativos e aleatórios, para avaliar se houve diminuições expressivas na quantidade de células que foram submetidas as diferentes proporções testadas (Barbosa *et al.,* 2015). Foram considerados macrófagos íntegros aqueles com o núcleo e citoplasma preservados morfologicamente. Foram realizados três experimentos independentes.

Todas as observações foram feitas em aumento de 1000x do microscópio óptico Zeiss® Primo Star (Oberkochen, GER). As capturas das fotomicrografias foram feitas em câmera Axiocam® ERc5s, *software* Axiovision Rel. 4.8, Zeiss acoplada ao microscópio.

4.5 Parasitas

Promastigotas de *L. amazonensis* cepa M2269 (MHOM/BR/73/M2269) foram mantidos *in vitro* em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 50 µg/mL de gentamicina, 2mM L-glutamina e 10mM HEPES. Os parasitas foram mantidos em frascos de cultivo celular de 25cm² ou 75 cm², em estufa a 26 ºC. Para a manutenção *in vivo* dos parasitas *L. amazonensis,* foram feitas infecções em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c de seis semanas de idade, obtidas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 5904-1/2021, conforme padronizado no laboratório (Araújo; Giorgio, 2015).

4.6 Ensaio das bactérias *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell* e macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis*

As bactérias foram cultivadas como descrito acima. Os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placa de 24 poços (contendo 2 x 10^5 macrófagos/poço) com lamínulas estéreis, em meio RPMI-1640 com 10% de SFB, sem gentamicina, para não promover a morte das bactérias. As culturas celulares foram mantidas *overnight* em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado, para adesão dos

macrófagos. Logo em seguida, o meio foi retirado e descartado e os poços da placa foram lavados com PBS uma vez para remoção dos *debris.* Posteriormente, promastigotas de *L. amazonensis* em meio RPMI-1640 com 10% de SFB, sem gentamicina, foram inoculadas com as seguintes proporções de macrófago/parasitas: 1:10 e 1:20, além do controle positivo contendo macrófagos sem infecção.

As culturas de macrófagos infectadas com os parasitas foram incubadas durante 24 h, em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado. Em seguida, os poços da placa foram lavados com PBS uma vez para remoção dos parasitas restantes. As bactérias foram adicionadas nos insertos do sistema *transwell* após atingirem a $D.O._{600nm}$ 0,6. Foram adicionadas 4 x 10^6 UFC/mL da bactéria *P.a.*, e 10^6 UFC/mL da bactéria *S.a.*, e logo em seguida, os insertos foram colocados nos poços contendo macrófagos previamente infectados com o parasita. A placa foi incubada por mais 24 h com as bactérias nos insertos *transwell* em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado, para o estabelecimento das interações independente de contato físico entre macrófagos previamente infectados pelo parasita e bactérias. Após as 24 h de incubação com as bactérias, os insertos contendo bactérias foram descartados, e os sobrenadantes foram coletados e mantidos em *freezer* a -20 ºC para quantificação de NO e citocinas *a posteriori*. Uma alíquota dos sobrenadantes do compartimento inferior, contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis,* foi utilizada para plaqueamento em LB ágar, para verificar se houve contaminação durante o experimento. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37 ºC durante 18 h. As lamínulas nos poços da placa foram fixadas com metanol, e coradas com Giemsa para visualização da aparência morfológica dos macrófagos infectados com *L. amazonensis,* sob microscópio óptico.

Os macrófagos íntegros e aderentes foram contabilizados em 20 campos representativos e aleatórios, para aferição da viabilidade. Paralelamente, foram feitas as contagens de 200 macrófagos, e destes, a quantidade de infectados com *L. amazonensis*, bem como o número de amastigotas intracelulares. A porcentagem de macrófagos infectados, foi calculada em relação ao total contabilizado, 200; e a quantidade de formas amastigotas por macrófago infectado, foi feita dividindo-se o total quantificado destas formas intracelulares, pelo total de macrófagos infectados. O Índice de Infecção (IF) é o produto entre a porcentagem de macrófagos infectados, e o número de amastigotas/macrófago infectado. Todas as contagens

foram feitas em aumento de 1000x no microscópio óptico. Foram realizados três experimentos independentes com o sistema *transwell*. A Figura 1A e 1B é uma representação esquemática do sistema *transwell*. A Figura 2 ilustra o desenho experimental destes ensaios.

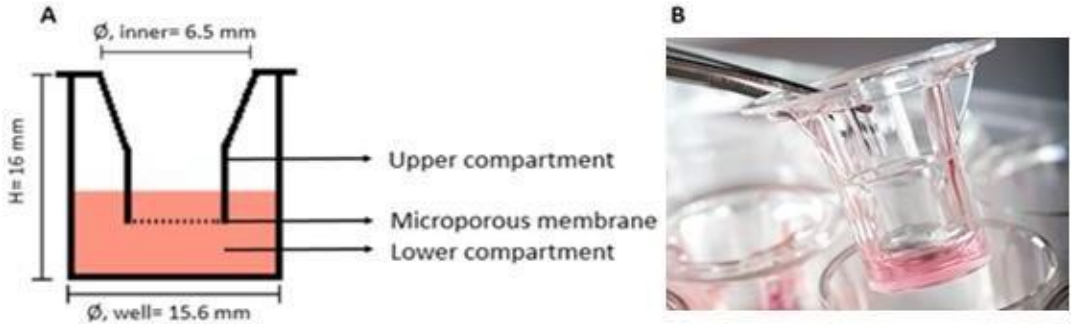

Figura 1. Representação esquemática do sistema *Transwell* (A) evidenciando o compartimento superior contendo a membrana com microporos de 0,4 µm de tamanho, e o compartimento inferior; e fotografia de um inserto *transwell* contendo meio de cultura (B). Fonte (A): Conteúdo reproduzido de Gallo-Francisco PH & Giorgio S, 2019; Fonte (B): Conteúdo reproduzido de Corning®, 2007.

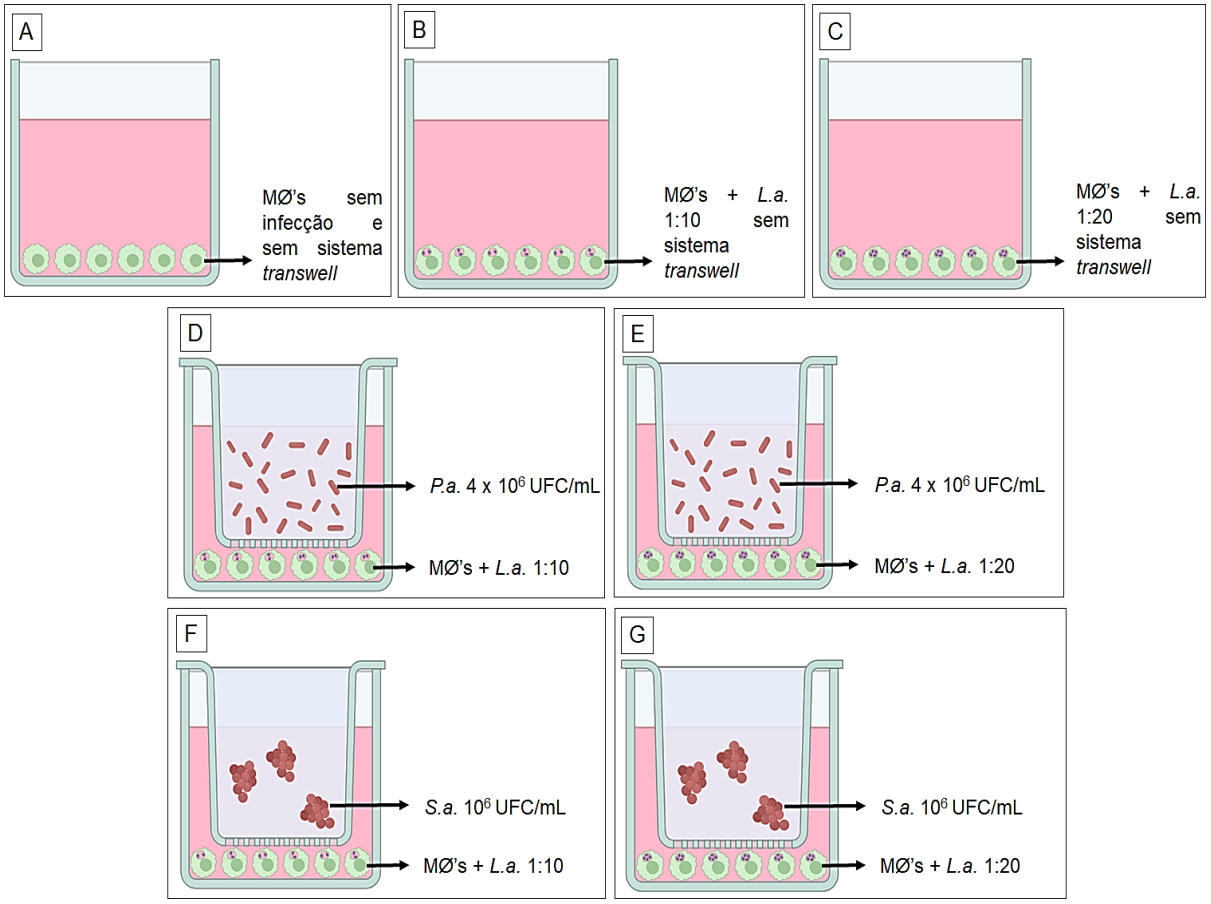

Figura 2. Representação esquemática dos ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias *P.a.* ou *S.a* em sistema *transwell.* (A)

Macrófagos sem infecção e sem sistema *transwell*; (B e C) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 (B) ou 1:20 (C), sem sistema *transwell*; (D e E) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 (D) ou 1:20 (E), e expostos a bactéria *P.a.* com 4 x 10^6 UFC/mL em sistema *transwell;* (F e G) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 (F) ou 1:20 (G), e expostos a bactéria *S.a.* com 10^6 UFC/mL em sistema *transwell.* As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. Nota: os macrófagos RAW 264.7, parasitas *L. amazonensis* e as bactérias *P.a.* ou *S.a.,* são representações esquemáticas sem proporção de tamanho.

4.7 Extração de vesículas das bactérias *P.a.* e *S.a.*

A extração das vesículas de bactérias, foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido anteriormente (Batista *et al.,* 2020). Primeiramente, as bactérias *P.a.* e *S.a.* foram estriadas por esgotamento em uma placa contendo meio de cultura LB ágar, e foram incubadas em estufa a 37 ºC por 18 h. O pré-inóculo bacteriano foi expandido *overnight* em 3 mL de meio de cultura LB caldo. Logo após uma alíquota de 500 µL do pré-inóculo foi transferida para um frasco contendo 500 mL de meio LB caldo, atingindo uma proporção de 1:1000. Esse inóculo foi mantido em agitador a 150rpm, 37 ºC, durante 20 h, para que a fase de crescimento das bactérias atingisse o final da fase estacionária e o início da fase de declínio, fases estas, onde geralmente observa-se uma alta produção de vesículas (Furuyama & Sircili, 2021).

Após o crescimento de 20 h, o inóculo bacteriano foi transferido para frascos de centrífuga estéreis, com capacidade de 250 mL. As co-culturas foram centrifugadas a 10.000rpm, durante 45 minutos, 4 ºC. Os *pellets* foram descartados. O sobrenadante foi recuperado e esterilizado em sistema de filtração a vácuo, com membrana de diálise de 0,45 µm e depois em filtros de 0,22 µm PTFE. Durante a filtração, o restante dos sobrenadantes foram incubados a 4 ºC. O sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração em filtros Amicon com uma membrana para diálise de 100 kDa (Millipore, Burlington, MA, EUA). Um total de 3 mL das vesículas concentradas foi coletado e recuperado em PBS pH 7.4, em tubo Falcon de 15 mL. As vesículas foram centrifugadas em velocidade máxima (15.000 rpm), durante 10 minutos, a 4 ºC. Logo após este volume foi filtrado novamente, em filtro de 0,22 µm. As vesículas em suspensão foram ultracentrifugadas a 60.000rpm (=308.448 x g), durante 1 h 30 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e ressuspendido em

500 µL de PBS. A esterilidade das vesículas foi testada através do plaqueamento de uma alíquota em placa com meio LB ágar. Logo após a verificação de esterilidade ser confirmada, as vesículas foram armazenadas em *biofreezer* a -80 ºC, aliquotadas separadamente.

4.8 NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) das POMVs e SEVs

As vesículas foram analisadas quanto ao seu diâmetro e quantidade, por NTA – *Nanoparticle Tracking Analysis* -, ou analisador de partículas por nanorastreamento, utilizando o NanoSight® NS300 (Malvern Instruments, UK) equipado com captura de vídeo rápida e *software* de rastreamento de partículas. As POMVs e SEVs purificadas foram diluídas separadamente em 1 mL de PBS, desagregadas usando uma seringa de 1 mL e agulha (29G × ½''), e cada amostra foi então injetada no cubículo da bomba de seringa do NanoSight® NS300, para as análises de amostra em fluxo constante. As configurações de dispersão e captura de fluorescência (como configurações de foco, câmera e ganho) foram otimizadas para tornar os rastros de partículas visíveis e, em seguida, as medições foram feitas em condições de temperatura controlada a 25 ºC, obtidas em triplicata e analisadas usando o *software* NanoSight NS300 Ver. 3.2.16 (Malvern Instruments, UK). Os dados sobre os tamanhos de partículas são expressos como as médias calculadas ± desvio padrão da distribuição de tamanhos.

4.9 Ensaio de Bradford

A proteína total das vesículas das POMVs e SEVs foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como padrão para a realização da curva de calibração do ensaio (Bradford, 1976; Zorgi *et al.,* 2020). Em seguida, as alíquotas de vesículas ressuspendidas foram mantidas em *biofreezer* a -80 ºC.

4.10 Ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs

Para a realização dos experimentos, os macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em uma placa de 24 poços (contendo 2 x 10^5 macrófagos/poço) com lamínulas redondas estéreis, em 1 mL de meio RPMI-1640 completo. As culturas celulares foram incubadas *overnight* em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2

balanceado, para a adesão dos macrófagos. Logo em seguida, o meio de cultura foi retirado e descartado e os poços da placa foram lavados com PBS uma vez para remoção de *debri* celular. Em seguida, as culturas celulares foram incubadas durante 24 h com *L. amazonensis,* utilizando a proporção de macrófago/parasitas em 1:10, logo depois a placa foi incubada em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os poços da placa foram lavados com PBS uma vez para remoção dos parasitas restantes, depois, as vesículas foram inoculadas nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (proporção entre macrófago/vesículas) nos poços contendo macrófagos infectados pelo parasita, ou nos poços contendo macrófagos sem infecção (situação controle). Os poços com macrófagos saudáveis, sem infecção, ou com macrófagos infectados pelo parasita, receberam meio de cultura RPMI-1640 completo. A placa foi incubada com as POMVs ou SEVs por mais 24 h em estufa a 37 ºC, 5% de CO_2, 21% O_2 e N_2 balanceado. O desenho experimental com as situações testadas, estão esquematizados na Figura 3.

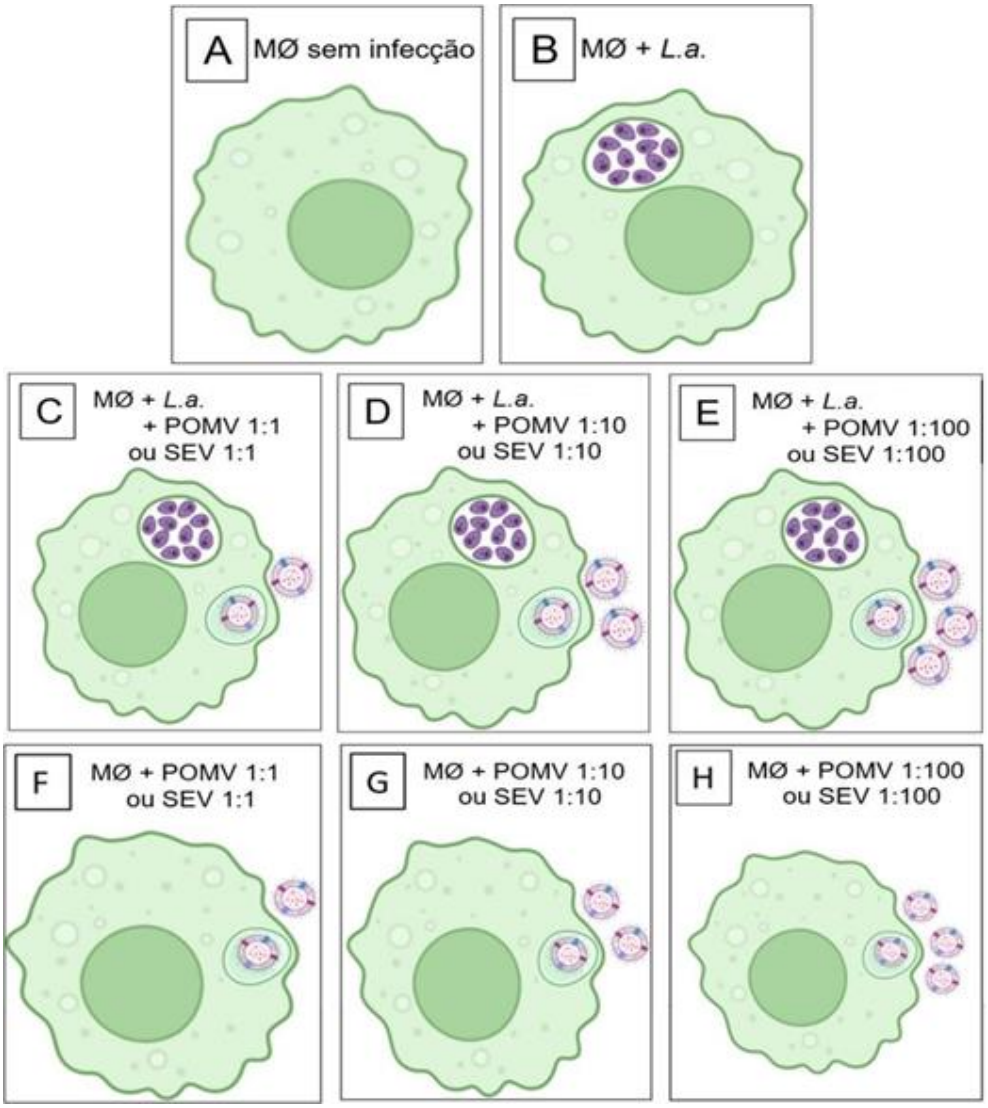

Figura 3. Representação esquemática dos ensaios de macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não, as POMVs ou SEVs. (A): Macrófagos sem infecção; (B): Macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as POMVs ou SEVs; (C): Macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:1; (D): Macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:10; (E): Macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:100. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. (F): Macrófagos expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:1; (G): Macrófagos expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:10; (H): Macrófagos expostos as POMVs ou SEVs na proporção 1:100. As culturas de macrófagos foram expostas as POMVs ou SEVs por 24 h. Nota: os macrófagos RAW 264.7, parasitas *L. amazonensis,* POMVs e SEVs, são representações esquemáticas, sem proporção de tamanho.

Após as 24 h de incubação, os sobrenadantes das co-culturas celulares foram coletados, transferidos para tubos eppendorf e mantidos em *freezer* a -20 ºC

para quantificação de NO e citocinas *a posteriori*. Uma alíquota desses sobrenadantes foi utilizada para plaqueamento em LB ágar, para verificar se houve contaminação dos sobrenadantes das co-culturas. As lamínulas nos poços da placa foram fixadas com metanol durante 10 minutos, e coradas com Giemsa, para visualização da aparência morfológica dos macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis;* ou dos macrófagos que receberam vesículas ou não. As análises foram feitas sob microscópio óptico comum.

As contagens para aferição da quantidade de macrófagos aderentes em 20 campos, porcentagem média de macrófagos infectados, número de amastigotas por macrófago infectado e o Índice de Infecção (IF) foram feitas como descrito no item 4.6 da metodologia. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

4.11 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das POMVs e SEVs

As vesículas em suspensão armazenadas em *biofreezer* a -80 ºC foram retiradas e colocadas em banho de gelo. Um pedaço de papel parafilm foi cortado e colocado dentro de uma placa de Petri de 100mm. A parte interna do papel parafilm foi colocada com a face para cima na placa de Petri. As vesículas ressuspensas em PBS, foram homogeneizadas em vórtex por ≅10 segundos, depois, foram retirados 20 µL das amostras e pipetadas sob o papel parafilm como uma gota. Com uma pinça estéril, a grade de cobre (300-mesh) para microscopia eletrônica foi colocada em cima da gota de amostra contendo vesículas, durante 5 minutos em temperatura ambiente. Logo após o excesso de amostra das grades foi retirado, utilizando papel filtro. Foram pipetados 100 µL da solução de acetato de uranila 2%, e colocados como uma gota no papel parafilm da placa de Petri. Com uma pinça, a grade foi colocada sob a gota de acetato de uranila 2%. A amostra foi incubada em temperatura ambiente na ausência de luz (devido à fotossensibilidade do acetato de uranila) durante 4 minutos, para fazer a contrastação negativa com as amostras. O excesso de acetato de uranila foi retirado das grades com o auxílio de papel filtro. As grades com as amostras já contrastadas foram colocadas dentro da placa de Petri e protegidas da incidência de luz, por ≅12 h, antes da visualização das amostras no MET ser feita.

As vesículas foram observadas no MET Tecnai G2 Spirit BioTWIN – FEI Company® (Hillsboro, OR, EUA) operando entre 60 e 80kV, e em aumento de

68.000x. As observações no MET foram feitas em colaboração com o Laboratório de Regeneração Nervosa do IB da UNICAMP.

4.12 *Cytometric Bead Array* (CBA)

O *Kit Cytometric Bead Array* (CBA) *Mouse* Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA), é otimizado para a análise das citocinas IL-10, IL-17A, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-4 e IL-2 de camundongo, para amostras de sobrenadante de cultura celular, soro ou plasma, que podem estar presentes nos sobrenadantes das culturas celulares (Figura 3). O *kit* CBA tem como fundamento microesferas (*beads*) conjugadas com anticorpos específicos para cada citocina a ser quantificada, e com intensidades de fluorescência (MFI – *Median Fluorescence Intensity*) diferentes, e utiliza como reagente de detecção uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE), e um anticorpo específico para cada citocina, que emite uma intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de citocinas ligadas nos anticorpos secundários de detecção.

Os procedimentos seguiram as recomendações do fabricante (BD Biosciences), e foram utilizados 50 µL dos sobrenadantes das co-culturas celulares para a realização das análises. Logo em seguida, as amostras foram levadas ao citômetro de fluxo FACSCanto™II (BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA), para aquisição das leituras nos canais APC e APC-Cy™7. Para cada amostra processada foram adquiridos no mínimo 2100 eventos. O cálculo dos níveis de citocinas foi realizado com a utilização do *software* FCAP Array 1.0.1 (BD Biosciences®, San Jose, CA, EUA). Os limites mínimos de detecção para cada citocina foram: 0.1 pg/mL (picogramas/mililitro) (IL-2); 0.03 pg/mL (IL-4); 1.4 pg/mL (IL-6); 0.5 pg/mL (IFN-γ); 0.9 pg/mL (TNF-α); 0.8 pg/mL (IL-17A); 16.8 pg/mL (IL-10) (Zorgi *et al.*, 2020).

4.13 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para quantificação de IL-1β

O *kit Mouse* IL-1β/IL-1F2 *DuoSet* ELISA (R&D *Systems* Inc., Minneapolis, MN, EUA), é otimizado para a quantificação de IL-1β de camundongo, para amostras de sobrenadante de cultura celular, soro ou plasma que podem estar presentes nos sobrenadantes das culturas celulares (Figura 3). O limite de detecção do ensaio foi entre 15,6 e 1000 pg/mL.

Uma microplaca de 96 poços *High Binding,* com fundo plano (R&D

Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA) foi incubada *overnight* em temperatura ambiente, com um anticorpo policlonal para IL-1β (50 µL/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com tampão (0,01 M de fosfato, 0,05 M de NaCl, 0,1% de Tween 20, pH 7,2), em Microplate Washer Biochrom® Asys Atlantis (Cambridge, UK), e os locais de ligação adicionais na superfície da placa foram bloqueados por incubação dos poços com BSA a 1%, durante 1 h 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os poços da placa foram lavados novamente, os sobrenadantes das culturas celulares e curva padrão foram adicionados (50 µL/poço) em duplicata, e incubados em temperatura ambiente durante 2 h. Após lavagem dos poços três vezes, o anticorpo policlonal biotinilado anti-IL-1β foi adicionado (50 µL/poço). Foi feita outra incubação a temperatura ambiente durante 2 h. Logo depois os poços foram lavados e foram adicionados 50 µL de Estreptoavidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*) diluída 1:2000, durante 20 minutos na ausência de luz em temperatura ambiente, as placas foram então lavadas, e adicionou-se o mesmo volume de Solução de Substrato (H_2O_2 + 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine – TMB), e a placa foi incubada por mais 20 minutos na ausência da luz, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de Solução *Stop* (H_2SO_4 – ácido sulfúrico), e a placa foi homogeneizada gentilmente para garantir a mistura. Em seguida, a densidade óptica foi medida em leitor de microplacas Biochrom® Asys UVM 340 (Cambridge, UK), e o *software* MikroWin® 200 (Cambridge, UK) foi utilizado para obtenção dos valores de absorbância. A concentração de IL-1β nas amostras, foi obtida utilizando os valores de D.O. da curva padrão como valores de referência, e expressos em pg/mL. Esta curva foi ajustada utilizando o modelo polinomial quadrático, para fazer a interpolação dos valores de concentração desta citocina (Herman, Scherer, Shan, 2008).

4.14 Quantificação de NO_2^- (nitrito)

A concentração de nitrito nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada pelo método colorimétrico de Griess (Griess, 1858; Degrossoli *et al.,* 2011). Uma curva de calibração com $NaNO_2^-$ (nitrito de sódio) (Synth, Diadema, SP, BRA) foi realizada, para obtenção de valores de referência de absorbância de acordo com as concentrações de nitrito pré-estabelecidas. Em uma placa de 96 poços com fundo plano (Corning® Inc., NY, EUA), foram adicionados 50 µL dos

sobrenadantes das cculturas celulares, em 50 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 0,1% de α-naftiletilenodiamina, preparado no momento da reação) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada reação da amostra foi determinada em leitor espectrofotômetro Bio-Tek®, Synergy HT (NY, EUA), com comprimento de onda a 540 nm. O *software* KC4® Ver. 3.4 Rev.16 foi utilizado para obtenção dos valores de absorbância. A concentração de nitrito das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão contendo nitrito de sódio em concentrações conhecidas.

4.15 Análise estatística

Para a análise dos dados, foram calculadas a média ± desvio padrão e realizada a análise de variância (ANOVA) entre as situações experimentais, no *software* GraphPad Prism® Ver. 9.0.2 (San Diego, CA, EUA). A significância estatística foi verificada pelo teste *t-Student* com correção de Welch, quando aplicável, e considerada aceitável quando $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1 Curvas de crescimento de *P.a.* e *S.a.*

Inicialmente, avaliamos a curva de crescimento das bactérias *P.a.* e *S.a.*, com o objetivo de verificar o tempo necessário para as bactérias atingirem a $D.O._{600nm}$ 0,6, correspondente ao início da fase logarítmica de crescimento. A Figura 4A ilustra uma placa contendo meio de cultura LB ágar com a bactéria *P.a.*, e a Figura 4B ilustra uma placa contendo a bactéria *S.a.,* ambas evidenciando colônias isoladas. Na Figura 5A podemos observar a curva de crescimento da bactéria *P.a.* (Figura 4A), com a quantidade média de bactérias em UFC/mL, em função do tempo. A fase *lag* da curva foi relativamente longa, o que provavelmente reflete o tempo que a bactéria levou para se adaptar ao meio de cultura e para iniciar a fase logarítmica. Foram quantificadas 3×10^8 UFC/mL ($D.O._{600nm}$ 0,6) no tempo de 240 minutos, sugerindo o início da fase logarítmica da bactéria *P.a.* (Figura 5A).

A Figura 5B ilustra a curva de crescimento da bactéria *S.a.* Observamos que a bactéria permaneceu em sua fase *lag* durante ≅90 minutos, e em seguida, a média de UFC/mL prosseguiu aumentando. Foram quantificadas 5×10^7 UFC/mL ($D.O._{600nm}$ 0,6) no tempo de 120 minutos, sugerindo o início da fase logarítmica da

bactéria *S.a.*

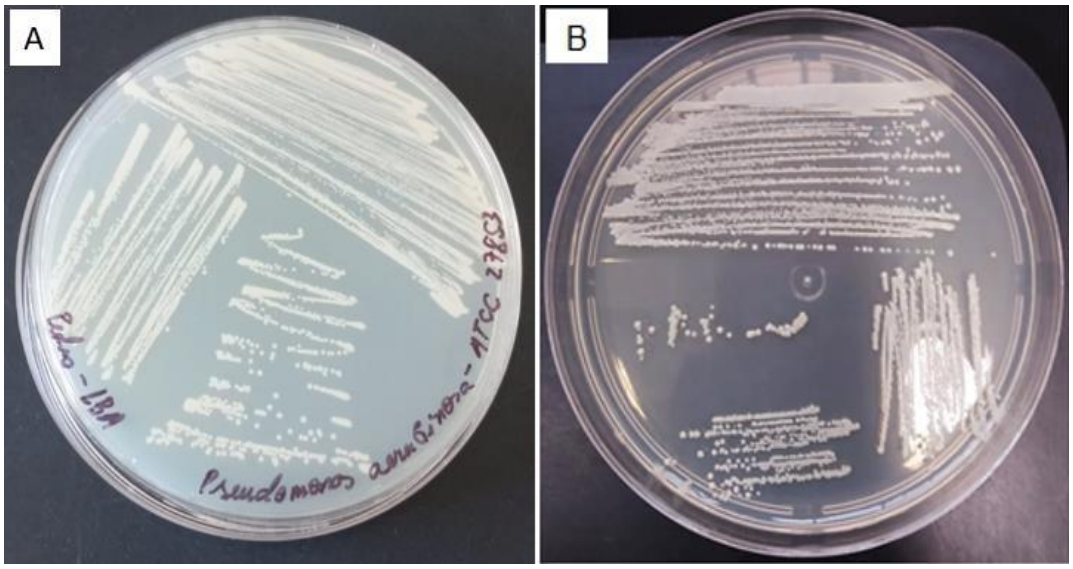

Figura 4. Imagens de placas de Petri com bactérias *P.a.* (A) e *S.a.* (B) estriadas em meio de cultura LB ágar. Pode-se observar a presença de colônias isoladas após 18 h em estufa.

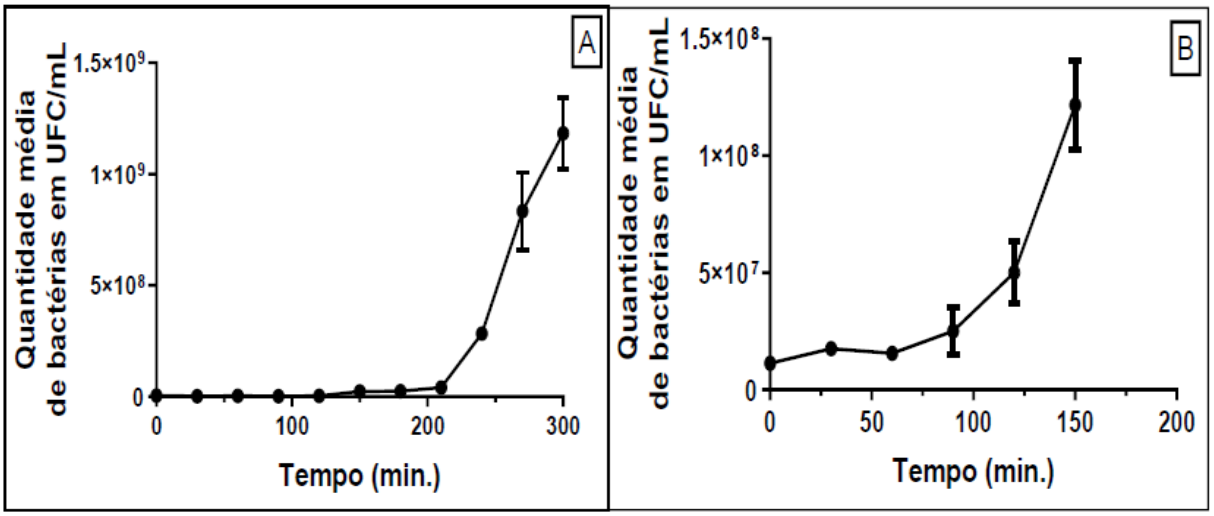

Figura 5. Quantidade média de *P.a.* (A) e *S.a.* (B), em UFC/mL, em função de intervalos de 30 minutos. Média ± desvio padrão das quantificações expressos em UFC/mL. Os dados são representativos de pelo menos três ensaios independentes.

5.2 Ensaios de invasão de *P.a.* em macrófagos murinos RAW 264.7

A primeira etapa para a realização destes ensaios de invasão de bactérias em macrófagos murinos RAW 264.7, foi estabelecer o cultivo dos macrófagos no laboratório. Estas culturas celulares foram observadas continuadamente quanto a sua confluência e morfologia sob microscópio invertido (Figura 6).

No trabalho de Elsinghorst (1994), foi descrito um protocolo de invasão de bactérias utilizando diferentes linhagens celulares, como células provenientes do fígado, rim, colo do útero, cólon e ileocecal (Elsinghorst, 1994). No trabalho de Lima e cols. (2015), foram realizados ensaios de invasão em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c infectados com a mesma cepa de *P.a.* que estamos utilizando neste trabalho (Lima *et al.,* 2015).

Inicialmente testamos as proporções 1:5, 1:10 e 1:20 nos ensaios de invasão com a bactéria *P.a.,* com o objetivo de selecionar a proporção de macrófago/bactérias nos insertos dos futuros ensaios com o sistema *transwell.* Na Figura 7 observa-se a quantificação do número de bactérias intracelulares após a lise dos macrófagos. As culturas de macrófagos expostas a proporção 1:5 tiveram uma quantidade significativamente menor (1.888 UFC/mL) de bactérias intracelulares, quando comparadas com as culturas celulares expostas a proporção 1:10 (5.888 UFC/mL). Não houve diferenças significativas entre as proporções 1:10 e 1:20, com 5.888 UFC/mL e 6.611 UFC/mL, respectivamente (Figura 7).

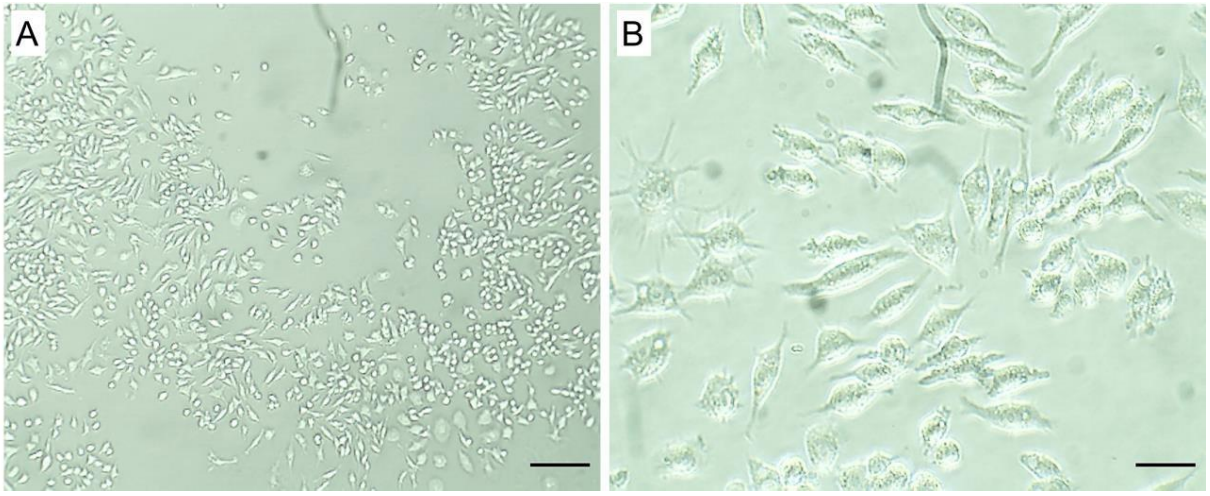

Figura 6. Fotomicrografias de culturas de macrófagos da linhagem murina RAW 264.7. Fotomicrografias capturadas em aumento de 10x (A), e de 40x (B) do microscópio invertido (Motic® AE31E) com câmera acoplada (Moticam 10+ (10MP)) (Hong Kong, CHN). Barra de escala= 10 µm.

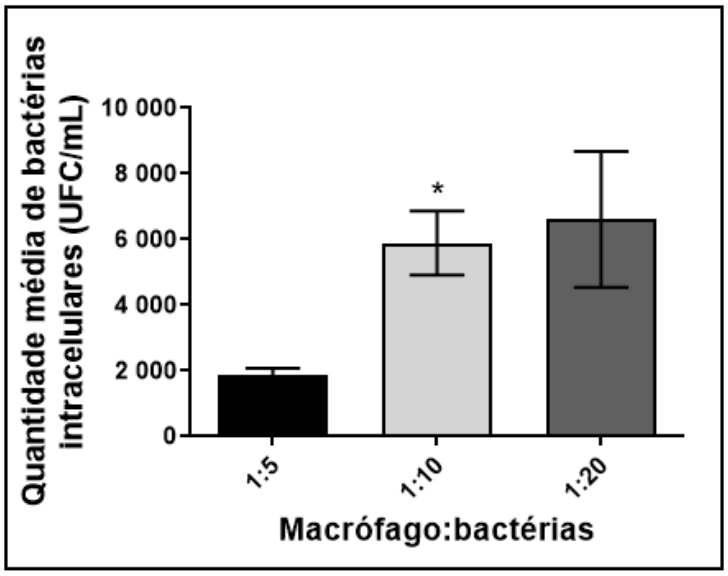

Figura 7. Quantidade média de bactérias intracelulares em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *P.a.* Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a proporção 1:5 e 1:10 da bactéria *P.a.*

Em outro ensaio de invasão, testamos as proporções 1:20, 1:50 e 1:100 com o objetivo de avaliar se os macrófagos RAW 264.7 sustentariam maiores quantidades de bactérias, durante 1 h de incubação; e se esses macrófagos modificariam expressivamente a sua estrutura morfológica. Observamos que as culturas de macrófagos expostas a proporção 1:50 apresentaram a maior quantidade de bactérias, com 25.333 UFC/mL, enquanto na proporção 1:100, o número de bactérias recuperadas da lise, foi 23.777 UFC/mL (Figura 8). A proporção 1:20 apresentou a menor quantidade de bactérias intracelulares recuperadas do lisado dos macrófagos, com 18.222 UFC/mL (Figura 8). Os dados revelam que a proporção 1:20 da bactéria *P.a.,* foi a proporção ideal para se utilizar nos insertos *transwell,* e macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis.*

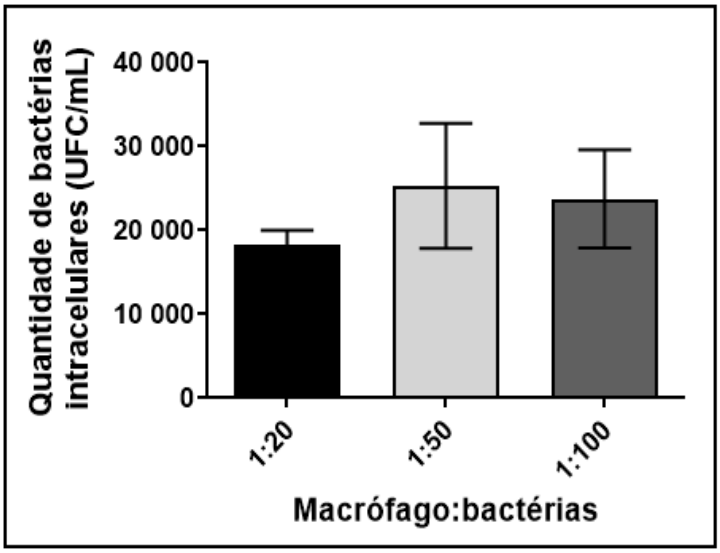

Figura 8. Quantidade média de bactérias intracelulares, em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 da bactéria *P.a.* Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado.

5.3 Viabilidade e morfologia dos macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *P.a.*

Com o objetivo de avaliar a viabilidade das culturas de macrófagos realizamos a contagem de macrófagos aderentes em 20 campos das lamínulas (Figura 9) (Barbosa *et al.,* 2015). Essa quantificação realizada com o propósito de investigar se há diferença ou não, na quantidade de macrófagos expostos as proporções testadas, quando comparados com o controle positivo (macrófagos sem infecção). Foram considerados macrófagos viáveis aqueles com o núcleo e o citoplasma estruturalmente preservados. Pôde-se observar que não houve diferenças expressivas e significativas na quantidade de macrófagos, tanto entre o controle positivo (não expostos as bactérias) e as demais proporções, quanto entre as proporções testadas. As proporções 1:5, 1:10 e 1:20, tiveram uma redução na quantidade de macrófagos em 13,56%, 0,64% e 4,62%, respectivamente, em relação ao controle positivo (Figura 9), porém não exibiram diferenças significativas.

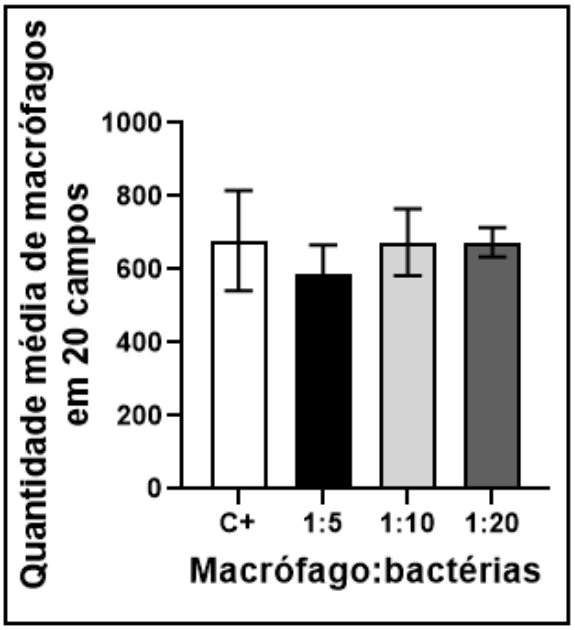

Figura 9. Quantificação dos macrófagos aderentes e viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *P.a.* Contagem de macrófagos RAW 264.7 em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado.

Também foi avaliada a viabilidade das culturas de macrófagos infectadas nas proporções 1:20, 1:50 e 1:100, observamos que o controle positivo apresentou uma quantidade significativamente maior de macrófagos, quando comparada com as demais situações experimentais (Figura 10). Culturas infectadas nas proporções 1:20, 1:50 e 1:100, tiveram uma redução significativa na quantidade de macrófagos em 61,23%, 51,26% e 50,17%, respectivamente, em relação ao controle positivo (Figura 10).

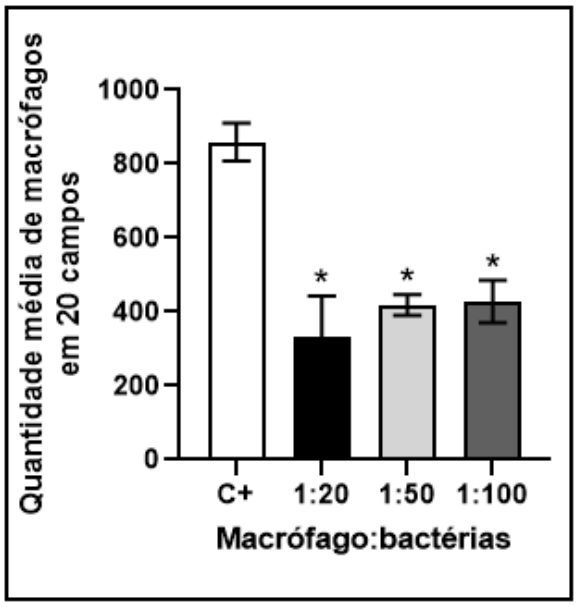

Figura 10. Quantificação dos macrófagos viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 da bactéria *P.a.* Contagem de células RAW 264.7 aderidas em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferenças significativas entre a situação controle e os tratamentos.

Células infectadas com *P.a.* foram coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico, com o objetivo de avaliar a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7. Desta forma, foi possível analisar a aparência morfológica dos macrófagos infectados e dos macrófagos não infectados (controle positivo). Na Figura 11A (situação controle), é possível notar que há menos vacúolos nos macrófagos não infectados, com a integridade celular mais preservada em relação aos macrófagos expostos as proporções 1:5 (Figura 11B), 1:10 (Figura 11C) e 1:20 (Figura 11D) da bactéria *P.a.* Os prolongamentos citoplasmáticos (pseudópodes), estão evidentes em todas as fotomicrografias dos macrófagos (Figura 11A – Figura 11D). Pode-se observar a presença de bactérias no interior dos vacúolos (setas) desses macrófagos expostos as proporções 1:5 (Figura 11B), 1:10 (Figura 11C) e 1:20 (Figura 11D). É evidente a presença de macrófagos vacuolizados sem bactérias (Figura 11B, 11C e 11D), sugerindo que possivelmente a invasão das bactérias ocorreu, mas foram eliminadas pelos macrófagos. Os dados obtidos com a contagem de macrófagos em 20 campos (Figura 9), consistem com as observações feitas ao microscópio óptico, com uma quantidade de macrófagos semelhante entre as situações experimentais observadas (controle positivo, e proporções 1:5, 1:10 e

1:20 testadas).

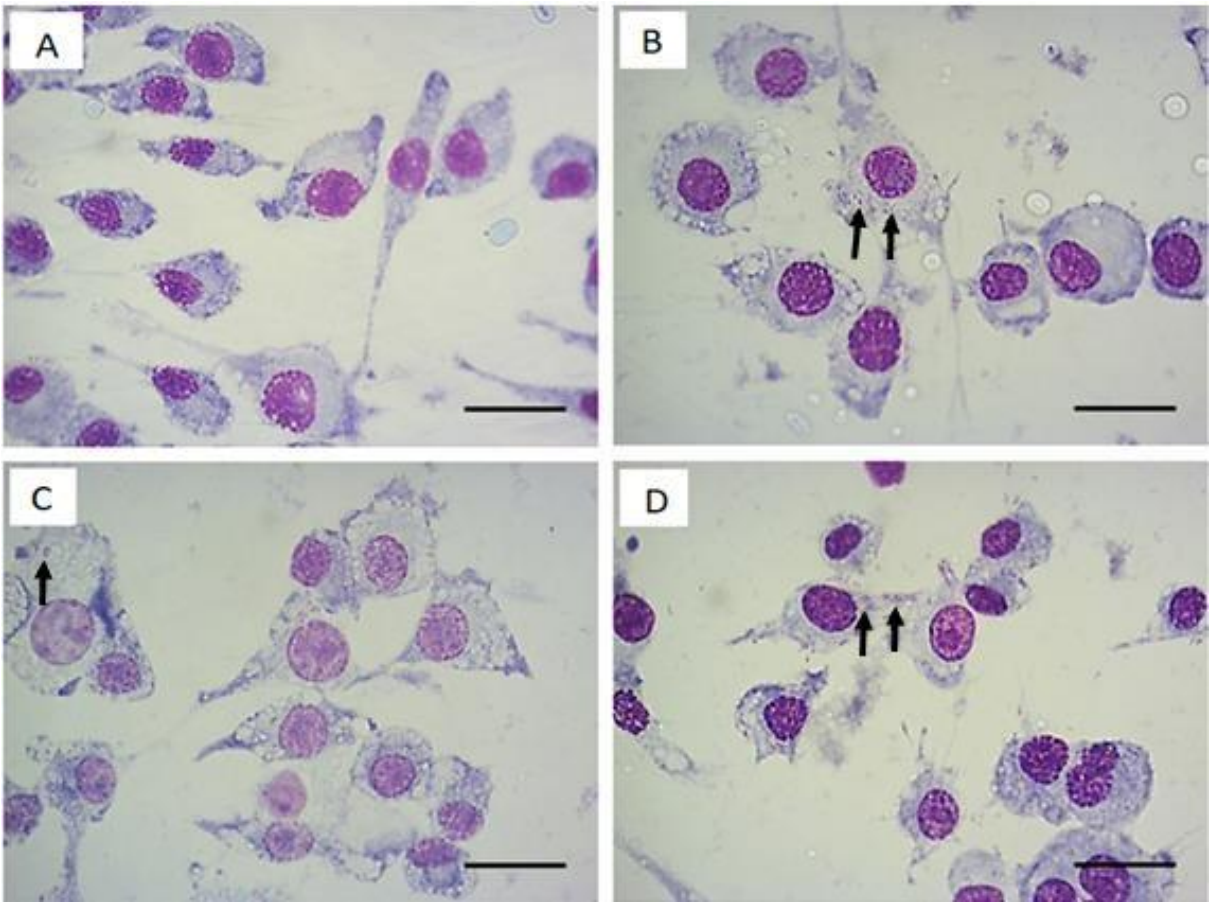

Figura 11. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *P.a.* nas proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 durante 1 h. Coloração com Giemsa. Macrófagos não infectados como controle positivo (A) e macrófagos infectados nas proporções 1:5 (B), 1:10 (C) e 1:20 (D) com *P.a.* Macrófagos representativos de três experimentos independentes são mostrados. As setas indicam bactérias internalizadas. Fotomicrografias capturadas em aumento de 1000x. Barras de escala= 10 µm.

No ensaio de invasão onde as proporções 1:20, 1:50 e 1:100 foram testadas, pôde-se observar a presença reduzida de bactérias no meio intracelular (setas) (Figura 12B e 12C), com dano celular mais evidenciado pela rugosidade desses macrófagos. Na Figura 12D, o dano causado pela proporção 1:100, é mais visível do que nas proporções 1:20 e 1:50, e as bactérias intracelulares não puderam ser visualizadas. Após a última etapa de lavagem dos poços com o tampão, a maioria das bactérias são eliminadas juntamente com o PBS (Figura 12D).

A diminuição da quantidade macrófagos íntegros também foi observada nessas culturas que receberam os inóculos bacterianos (Figura 12B, 12C e 12D), enquanto no controle positivo, a integridade dos macrófagos está preservada (Figura

12A). Quando comparadas com o controle positivo, as proporções 1:20, 1:50 e 1:100, tiveram uma redução na quantidade de macrófagos em 61,23%, 51,26% e 50,17%, respectivamente (Figura 10).

Os dados obtidos com a contagem de macrófagos em 20 campos (Figura 10), consistem com as observações feitas ao microscópio óptico, com uma quantidade superior de macrófagos na situação controle, em comparação com as proporções 1:20, 1:50 e 1:100.

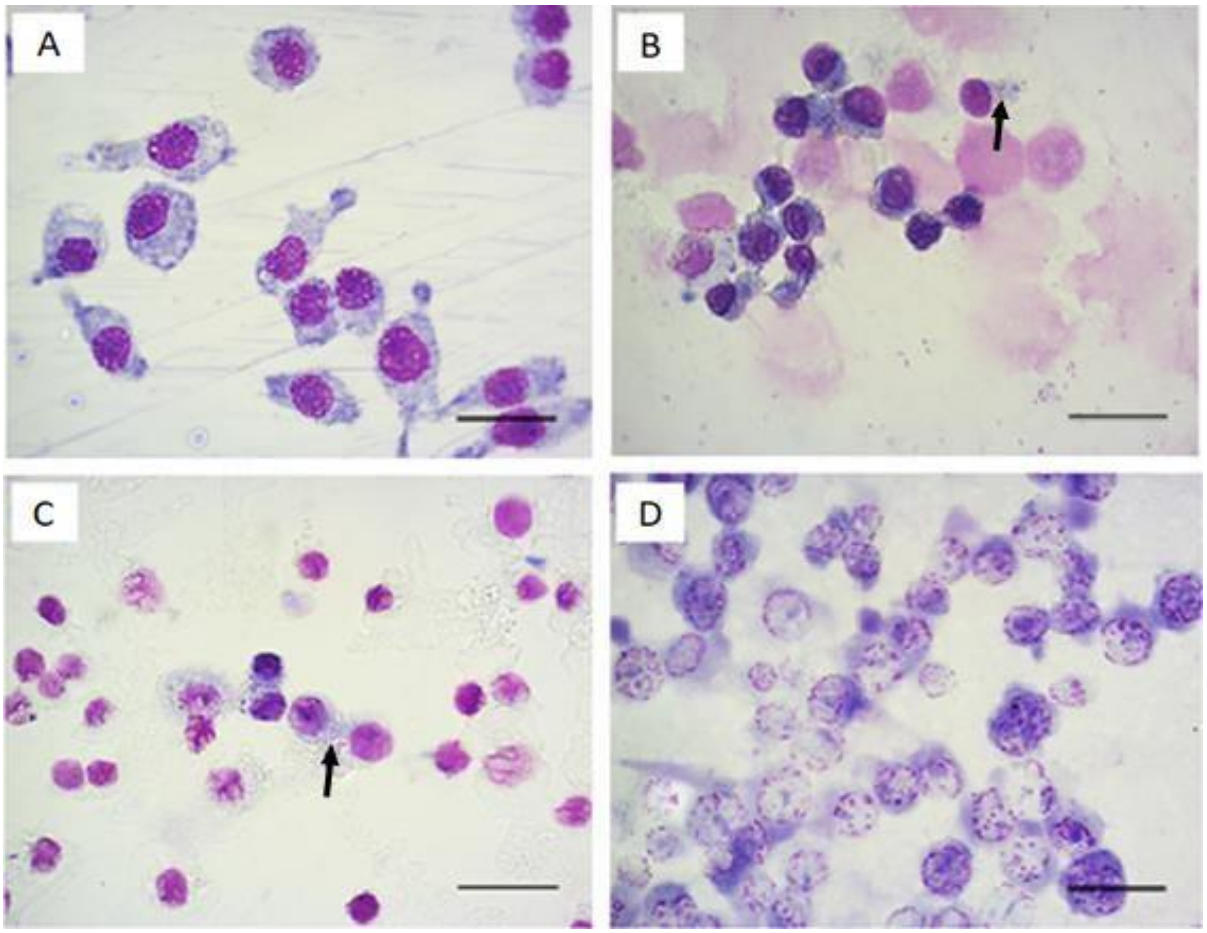

Figura 12. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com P.a. nas proporções 1:20, 1:50 ou 1:100 durante 1 h. Coloração com Giemsa. Macrófagos não infectados como controle positivo (A) e macrófagos infectados nas proporções 1:20 (B), 1:50 (C) e 1:100 (D) com *P.a.* Macrófagos representativos de três experimentos independentes são mostrados. As setas indicam bactérias internalizadas. Fotomicrografias capturadas em aumento de 1000x. Barras de escala= 10 µm.

Os dados mostram que o protocolo de Elsinghorst (1994) e Lima e cols. (2015) foi satisfatório, sendo que a proporção 1:20 foi a ideal para se utilizar nos futuros ensaios de interação celular independente de contato (sistema *transwell*), e

macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis.* Em relação ao tempo em que essas bactérias permaneceram em contato com os macrófagos nesses ensaios *in vitro*, testamos períodos entre 1 h e 24 h, para avaliar se ocorrerão diferenças expressivas na quantidade de bactérias em UFC/mL, e se a quantidade de macrófagos irá variar, bem como a aparência estrutural.

5.4 Ensaios de invasão de *S.a.* em macrófagos murinos RAW 264.7

As etapas utilizadas nos ensaios com *S.a.*, seguem os mesmos procedimentos descritos para os ensaios de invasão com *P.a.* O principal objetivo da realização destes ensaios com essa bactéria, foi padronizar a proporção de macrófago/bactérias ideal, assim como o tempo de cultivo das culturas celulares, antes de serem testadas no sistema *transwell*, com macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis.*

A Figura 13 ilustra a quantidade média de bactérias intracelulares, recuperadas do lisado dos macrófagos infectados. Apesar de não haver significância estatística entre as proporções testadas nesse primeiro ensaio, a proporção 1:5 exibiu uma tendência de diminuição na quantidade média de UFC/mL, com 5,3 x 10^4 UFC/mL. A proporção 1:20 exibiu uma quantidade média de UFC/mL, relativamente próxima da encontrada na proporção 1:5, com 6,5 x 10^4 UFC/mL; enquanto a proporção 1:10 exibiu 7,5 x 10^4 UFC/mL (Figura 13).

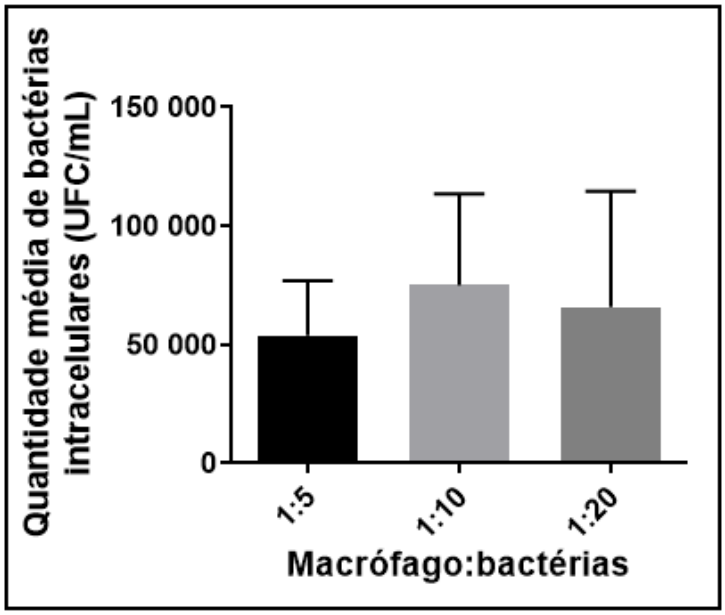

Figura 13. Quantidade média de bactérias intracelulares, em UFC/mL, obtidas após lise dos macrófagos RAW 264.7 expostos durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *S.a.* Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado.

5.5 Viabilidade e morfologia dos macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *S.a.*

Os dados referentes a contagem de macrófagos em 20 campos, estão mostrados na Figura 14. Foram considerados macrófagos viáveis aqueles com o núcleo e o citoplasma estruturalmente preservados. Os dados obtidos mostram que houve um aumento significativo na quantidade dos macrófagos expostos as proporções 1:5, 1:10 e 1:20, com 35,70%, 39,76% e 27,92%, respectivamente mais macrófagos viáveis, quando comparados com o controle positivo – sem infecção (Figura 14).

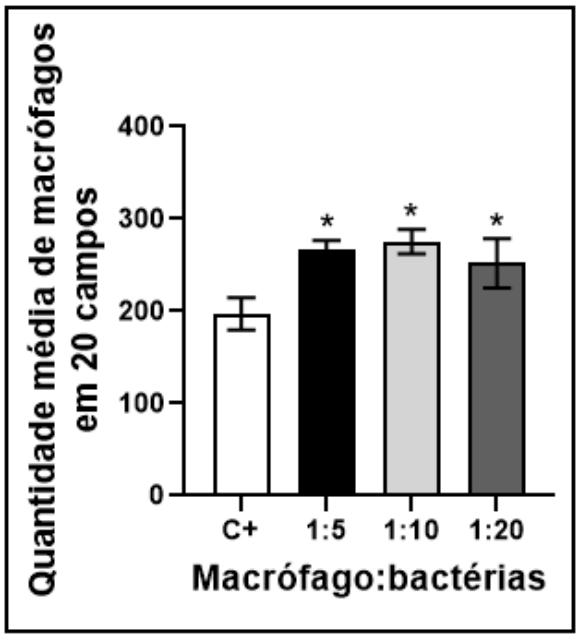

Figura 14. Quantificação dos macrófagos viáveis, após exposição durante 1 h as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 da bactéria *S.a.* Contagem de macrófagos RAW 264.7 aderidos em 20 campos representativos, sob microscópio óptico em aumento de 1000x. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferenças significativas entre a situação controle e os tratamentos.

Com o objetivo de avaliar a morfologia dos macrófagos RAW 264.7 infectados com *S.a.* durante 1 h, as lamínulas foram coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico (Figura 15). Foi possível analisar a aparência morfológica dos macrófagos infectados e dos macrófagos não infectados. Na Figura 15A (situação controle), é possível notar que há menos vacúolos nessas culturas de macrófagos não infectados, com a integridade celular mais preservada em relação aos macrófagos expostos as proporções 1:5 (Figura 15B), 1:10 (Figura 15C) e 1:20 de *S.a.* (Figura 15D).

A análise morfológica do controle positivo revelou que a integridade celular foi preservada em comparação com as outras condições experimentais (Figura 15A), embora o número de macrófagos contabilizados em 20 campos da situação controle, tenha mostrado uma redução neste ensaio (Figura 14). A presença de bactérias internalizadas no vacúolo dos macrófagos é evidente (Figura 15B – Figura 15D). Nas culturas celulares que receberam a proporção 1:20 da bactéria *S.a.*, pudemos observar um conteúdo citoplasmático pouco evidente, conferido pela integridade (Figura 15D), sugerindo que uma alta proliferação dessas

bactérias ocorreu nessas culturas, fazendo com que os macrófagos fossem lisados ou perdessem a sua integridade estrutural.

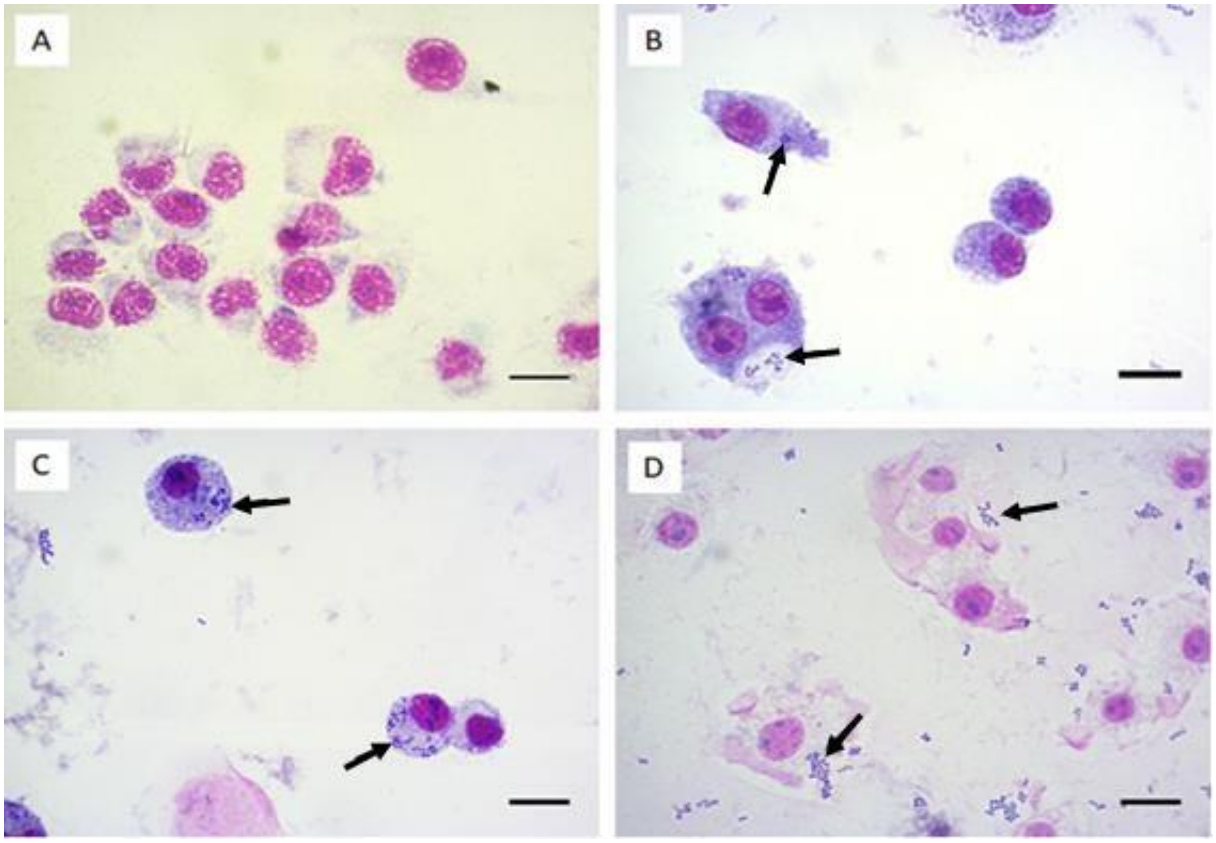

Figura 15. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *S.a.* nas proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 durante 1 h. Coloração com Giemsa. Macrófagos não infectados como controle positivo (A) e macrófagos infectados nas proporções 1:20 (B), 1:50 (C) e 1:100 (D) com *S.a.* Macrófagos representativos de três experimentos independentes são mostrados. As setas indicam bactérias internalizadas. Fotomicrografias capturadas em aumento de 1000x. Barras de escala= 10 µm.

5.6 *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell* e macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis*

O principal objetivo da realização desses ensaios, foi investigar a influência da presença (independente de contato físico) das bactérias *P.a.* ou *S.a.*, em macrófagos murinos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* (Figura 16). Neste trabalho, mimetizamos *in vitro,* o que deve ocorrer em áreas expostas de lesões leishmanióticas da forma cutânea, com infecções secundárias com bactérias (Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022). Nestes ensaios foram adicionados os patógenos de maneira sequencial, ou seja, foram inoculadas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 16) antes da adição das bactérias nos suportes *transwell*, para

inicialmente ocorrer a invasão efetiva dos parasitas nos macrófagos RAW 264.7. O sistema *transwell* com bactérias, estabelece uma interação independente de contato físico, entre macrófagos infectados com *L. amazonensis* no compartimento inferior, e bactérias inseridas no compartimento superior do sistema (Figura 2). São mostrados dados referentes a um experimento representativo de três independentes.

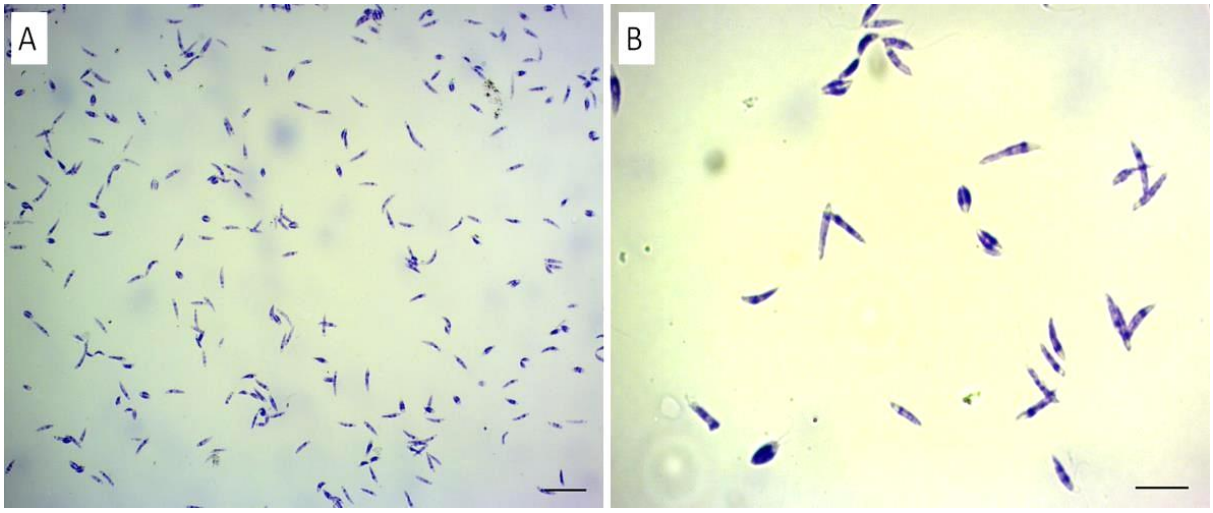

Figura 16. Fotomicrografias de promastigotas de *L. amazonensis* corados com Giemsa. O cultivo do parasito foi estabelecido no laboratório e a manutenção da cultura foi realizada regularmente. Fotomicrografias capturadas em aumentos de 400x (A) e 1000x (B). Barras de escala= 20 µm (A) e 10 µm (B).

Na Figura 17A observa-se a porcentagem média de macrófagos infectados, em relação à quantidade total de macrófagos contabilizados, 200. A porcentagem de macrófagos infectados, em porcentagem relativa aos controles, infectados com o parasita nas proporções 1:10 ou 1:20 e sem exposição as bactérias nos insertos *transwell*, foi calculada considerando estes controles como 100% de infecção (Figura 17B). O Índice de Infecção (IF) foi calculado como descrito no item 4.6 da metodologia. Diferenças significativamente menores foram encontradas, entre a porcentagem média de macrófagos infectados (Figura 17A), porcentagem de infecção em porcentagem relativa aos controles (Figura 17B), quantidade média de amastigotas/macrófago infectado (Figura 18), e IF das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:20 (controle), sem exposição as bactérias nos insertos (65,17% macrófagos infectados e 3,89 amastigotas/macrófago infectado), e co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção e expostas a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell*

(76,67% macrófagos infectados e 4,61 amastigotas/macrófago infectado) (Figuras 17 - 19).

As co-culturas celulares infectadas com o parasita na proporção 1:10 (controle) e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell,* exibiram um aumento médio de macrófagos infectados em porcentagem relativa, em 38,24% e 34,69%, respectivamente, em relação ao seu controle (considerado como 100% de infecção) (Figura 17B). As co-culturas celulares infectadas com o parasita na proporção 1:20 (controle) e expostas as mesmas bactérias nos insertos, exibiram um aumento médio de macrófagos infectados em porcentagem relativa, em 20,94% e 17,73%, respectivamente, em relação ao seu controle (considerado como 100% de infecção) (Figura 17B).

Foram encontradas diferenças significativamente maiores na quantidade de amastigotas/macrófago infectado e no IF, entre as co-culturas que receberam os parasitas *L. amazonensis* na proporção 1:20 (3,89 amastigotas/macrófago infectado), e co-culturas de macrófagos infectados com o parasita na proporção 1:10 (2,88 amastigotas/macrófago infectado) (Figuras 18 e 19), fato associado provavelmente devido à maior quantidade de parasitas inoculados nas primeiras co-culturas celulares. De maneira semelhante, o número de amastigotas/macrófago infectado e o IF foi significativamente maior nas co-culturas infectadas com o parasita na proporção 1:20 e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* (com 3,94 e 4,61 amastigotas/macrófago infectado, respectivamente), em relação ao número de amastigotas/macrófago infectado das co-culturas que receberam parasitas na proporção 1:10 e expostas as mesmas bactérias nos insertos *transwell* (com 2,39 e 2,72 amastigotas/macrófago infectado, respectivamente) (Figura 18 e 19). As co-culturas celulares que receberam parasitas na proporção 1:20, e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell,* exibiram diferenças significativas no IF, em relação as co-culturas de macrófagos infectados com o parasita na proporção 1:20, sem exposição as bactérias nos insertos (controle) (Figura 19).

A translocação bacteriana através dos microporos de 0,4 µm do sistema *transwell* ocorreu, o que possibilitou a proliferação de ambas as bactérias no meio de cultura RPMI-1640, sem os antibióticos penicilina/estreptomicina, utilizados rotineiramente no cultivo dos macrófagos RAW 264.7. De maneira similar a este efeito observado, o intuito da realização dos ensaios *in vitro* foi de auxiliar a compreender e mimetizar o que ocorre nas lesões cutâneas de hospedeiros

infectados por esta espécie do parasita, e apresentam quadros de coinfecções secundárias causadas por bactérias oportunísticas/patogênicas. O fenômeno das coinfecções secundárias será explorado no item 6.0 Discussão.

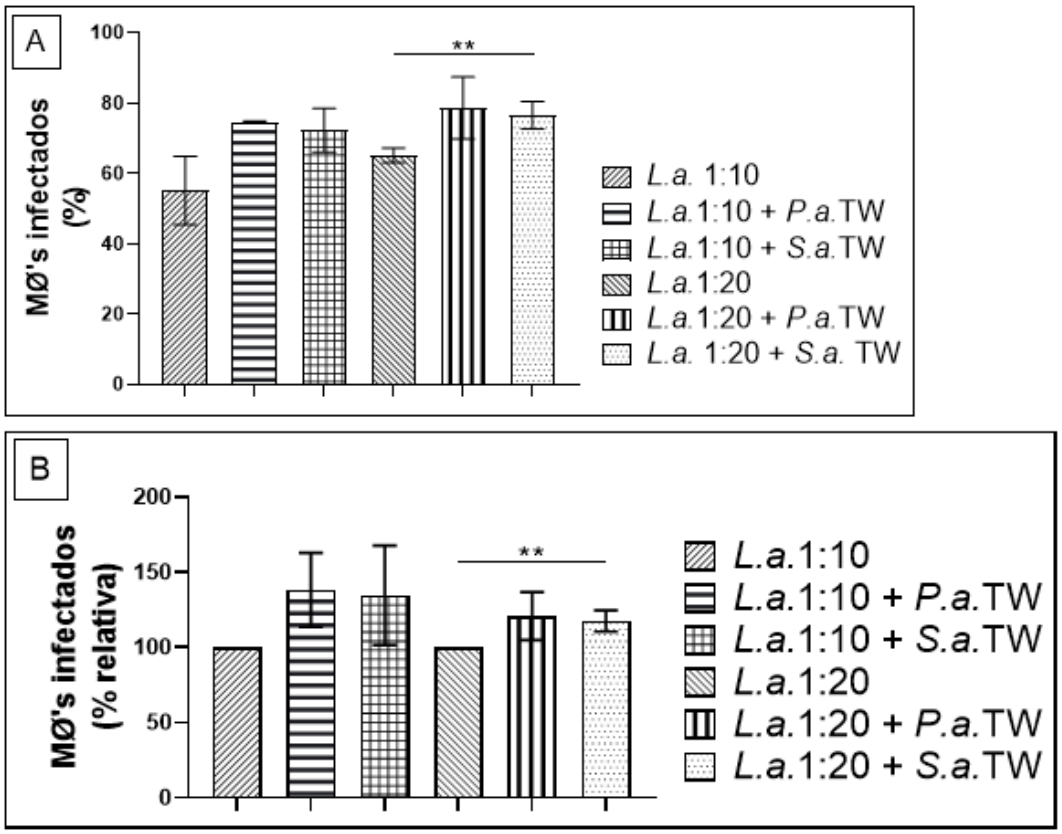

Figura 17. (A) Porcentagem média de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell*; (B) Aumento médio na porcentagem de macrófagos infectados em sistema *transwell*, em porcentagem relativa ao controle, sem exposição as bactérias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.* 1:10= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:10 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:10 + *S.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:20 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20 + *S.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell.* As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

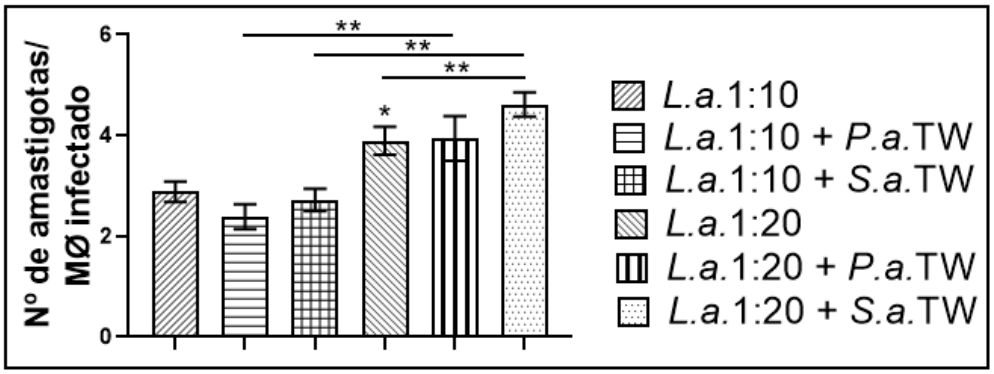

Figura 18. Número de amastigotas/macrófago infectado com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell*. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.* 1:10= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:10 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:10 + *S.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:20 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *P.a.,* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20 + *S.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell.* As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre as co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e co-culturas infectadas com o parasita na proporção 1:20; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

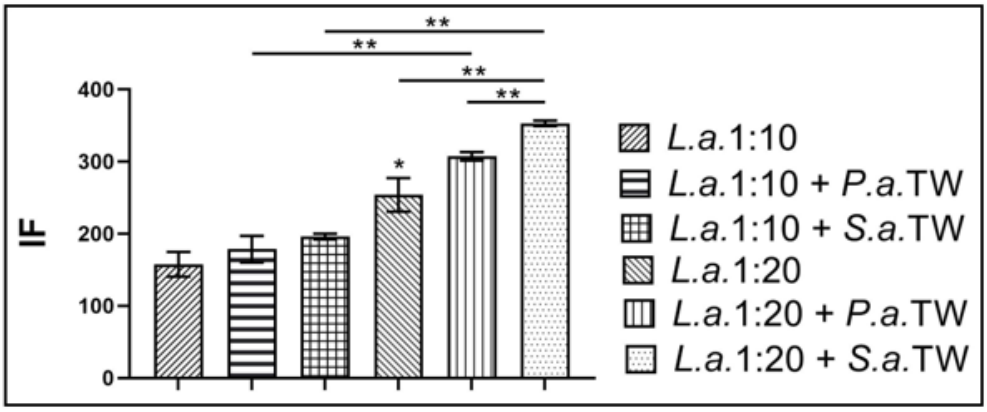

Figura 19. Índice de Infecção (IF) dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell.* Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.* 1:10= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:10 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:10 + *S.a.*= macrófagos infectados com *L.*

amazonensis na proporção 1:10 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; *L.a.* 1:20 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *P.a.,* nos insertos *transwell; L.a.* 1:20 + *S.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell*. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste *t-Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre as co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e co-culturas infectadas com o parasita na proporção 1:20; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

5.7 Viabilidade e morfologia dos macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell*

Foi realizada a quantificação de macrófagos aderentes em 20 campos, com o intuito de avaliar a viabilidade dessas co-culturas (Figura 20). Esta quantificação foi realizada com o propósito de investigar se há diferença na quantidade de macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20 e expostos as bactérias nos insertos *transwell,* quando comparados com os respectivos controles, contendo somente macrófagos infectados com o parasita nas proporções 1:10 ou 1:20, sem exposição as bactérias nos insertos (Figura 20). Foram considerados macrófagos viáveis aqueles com o núcleo e o citoplasma estruturalmente preservados.

Diferenças significativas foram encontradas na quantidade de macrófagos viáveis, entre a situação controle contendo macrófagos saudáveis não infectados, nem receberam bactérias nos insertos, com uma quantidade média de 485,67 macrófagos viáveis, e o restante de todas as co-culturas celulares, contendo infecção com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20, sem exposição as bactérias nos insertos; e entre co-culturas de macrófagos infectadas com as mesmas proporções do parasita, e expostos as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* (Figura 20A). Foram observadas diminuições significativas na quantidade de macrófagos em porcentagem relativa, entre o controle contendo macrófagos sem infecção pelo parasita e sem exposição as bactérias nos insertos (considerados como 100% de macrófagos viáveis), e co-culturas infectadas com o parasita nas proporções 1:10 e 1:20, ambas sem exposição as bactérias nos insertos *transwell*, com 48,04% e 62,18% menos macrófagos, respectivamente (Figura 20B). Foi

observada uma diminuição significativa, na quantidade de macrófagos em porcentagem relativa (Figura 20B), entre as co-culturas celulares infectadas com o parasita na proporção 1:10, e co-culturas infectadas com o parasita na proporção 1:20, ambas sem bactérias nos insertos (Figura 20B).

Foram encontradas diferenças significativamente maiores na quantidade de macrófagos viáveis, entre co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos (com 252,67 macrófagos viáveis) (Figura 20A), e co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção e expostas a bactéria *P.a.* nos insertos (com 126,33 macrófagos viáveis); e entre as co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção e expostas a bactéria *S.a.* nos insertos (com 191,33 macrófagos viáveis) (Figura 20A). Diferenças significativas na quantidade de macrófagos viáveis foram encontradas, entre as co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostas a bactéria *P.a.*, e co-culturas de macrófagos infectadas utilizando a mesma proporção de parasitas e expostas a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell* (Figura 20A). Os dados sugerem, que a quantidade de macrófagos viáveis obtidas das co-culturas celulares infectadas pelo parasita na proporção 1:10 e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.*, representam uma diminuição de 49,33% e 23,65%, respectivamente, em relação ao seu controle, contendo macrófagos infectados com o parasita na proporção 1:10, sem exposição das bactérias nos insertos (considerados como 100% de macrófagos viáveis) (Figura 20C).

Observamos quantificações de macrófagos viáveis que diferiram significativamente entre as co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as bactérias nos insertos (com 183,67 macrófagos viáveis), e co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção e expostas a bactéria *P.a.* (125,33 macrófagos viáveis) (Figura 20A). Diferenças significativas foram encontradas entre co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostas a bactéria *P.a.*, e co-culturas de macrófagos infectadas utilizando a mesma proporção de parasitas e expostas a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell* (158,33 macrófagos viáveis) (Figura 20A). Os dados sugerem, que a quantidade de macrófagos viáveis obtidas das co-culturas celulares infectadas pelo parasita na proporção 1:20 e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.*, representam uma diminuição de 31,72% e 13,5%,

respectivamente, em relação ao seu controle, contendo macrófagos infectados com o parasita na proporção 1:20, sem exposição das bactérias nos insertos (considerados como 100% de macrófagos viáveis) (Figura 20C).

Os dados sugerem que macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20 e expostos a bactéria *P.a.* (Figuras 21C e 21F), exibiram uma viabilidade menor quando comparada com as co-culturas celulares infectadas pelo parasita nas mesmas proporções e expostas a bactéria S.a. nos insertos (Figuras 21D e 21G), indicando para um possível efeito na ação que as bactérias Gram-negativas *P.a.* tiveram sob os macrófagos previamente infectados pelo parasita, provavelmente em decorrência de fatores de virulência desta bactéria que contribuem para uma alta toxicidade na matriz extracelular, ativação de vias apoptóticas e consequentemente culminando na diminuição da viabilidade (Figuras 20A, 20C e 21).

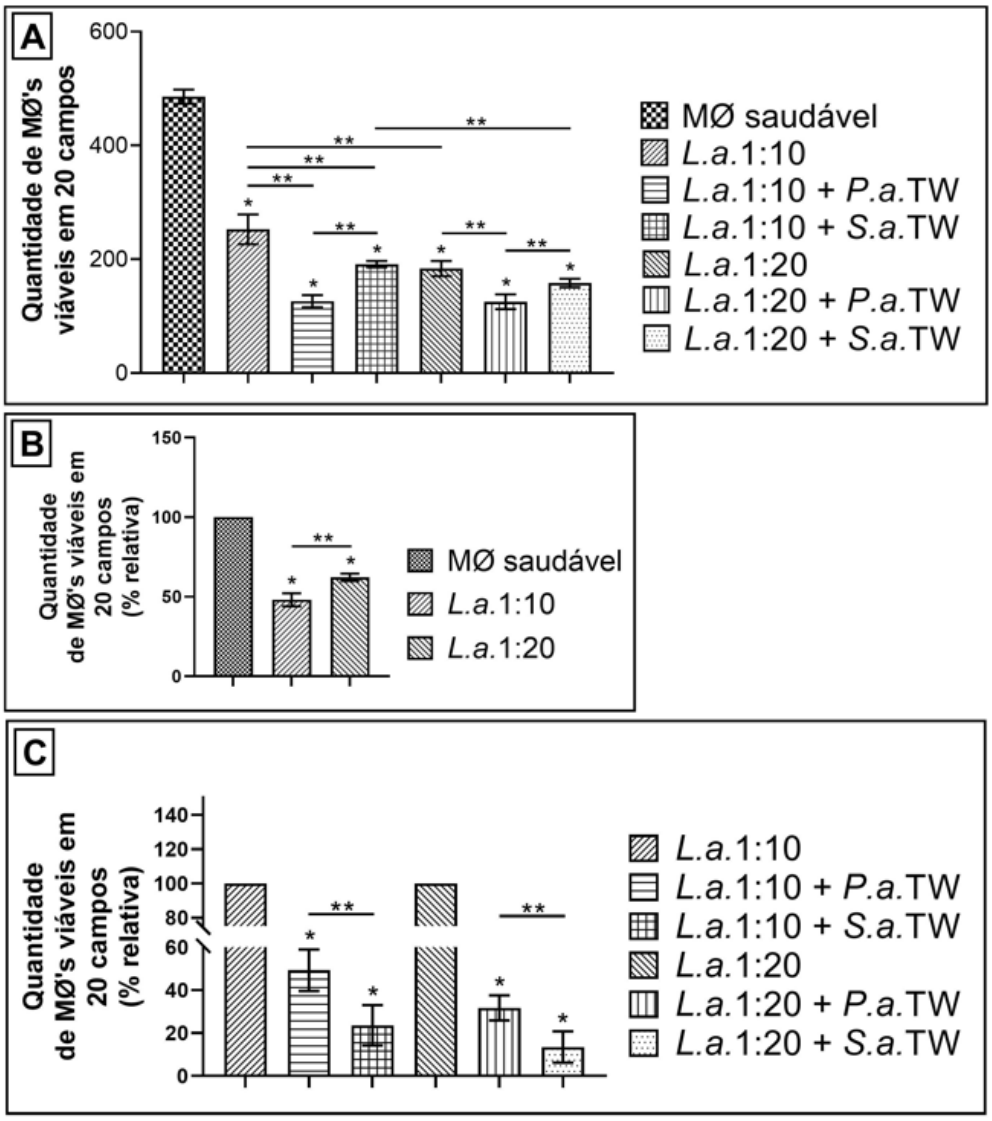

Figura 20. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas celulares saudáveis; infectadas com *L. amazonensis* sem exposição as bactérias no sistema *transwell*; ou infectadas com *L. amazonensis* e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* no sistema *transwell*. (A): Quantidade de macrófagos viáveis em 20 campos; (B): Quantidade de macrófagos viáveis em 20 campos, calculados em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos saudáveis, não infectados com *L. amazonensis,* nem expostos as bactérias nos insertos *transwell*; (C): Quantidade de macrófagos viáveis em 20 campos, calculados em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos infectados com o parasita e expostos as bactérias nos insertos *transwell*. As contagens foram feitas em 20 campos representativos e aleatórios, sob microscópio óptico em aumento de 1000x. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. (A e B): MØ saudável= macrófagos não infectados com *L. amazonensis*, e sem bactérias nos insertos *transwell;* (A, B e C): *L.a.* 1:10= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; (A e C): *L.a.* 1:10 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell;* (A e C): *L.a.* 1:10 + *S.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell;*

(A, B e C): *L.a.* 1:20= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; (A e C): *L.a.* 1:20 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *P.a.,* nos insertos *transwell;* (A e C): *L.a.* 1:20 + *S.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell.* As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t- *Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle contendo macrófagos saudáveis e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Os macrófagos em campos representativos foram fotografados para evidenciação de sua estrutura morfológica e das formas amastigotas intracelulares (Figura 21). Na Figura 21A pode-se observar a aparência morfológica da situação controle, contendo macrófagos não infectados pelo parasita, nem expostos as bactérias nos insertos, com o núcleo e citoplasma bem conservados. A quantidade dos macrófagos viáveis nessas culturas celulares foi significativamente maior, quando comparada com o restante das co-culturas (Figura 20A).

As co-culturas infectadas com o parasita na proporção 1:10, sem exposição as bactérias nos insertos *transwell* os macrófagos exibiram uma morfologia comprometida e formas amastigotas intracelulares (Figura 21B), quando comparada com a morfologia das culturas celulares da situação controle (Figura 21A). As Figuras 21C e 21D, ilustram as co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, e posteriormente expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.,* respectivamente, nos insertos *transwell*. As co-culturas celulares da Figura 21D exibiram uma estrutura morfológica mais preservada em relação as co-culturas de macrófagos da Figura 21C, onde nessas últimas, foi observada uma diminuição significativa na quantidade de macrófagos, em relação ao seu controle infectado com o parasita na proporção 1:10 (Figuras 20A e 20C).

Na Figura 21E, pôde-se constatar que a aparência morfológica das co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita na proporção 1:20, sem exposição as bactérias nos insertos *transwell*, evidenciou formas amastigotas, com muitas células com o núcleo e citoplasma danificados, possivelmente devido a uma maior quantidade de parasitas inoculados nessas co-culturas celulares. As Figuras 21F e 21G ilustram as co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:20, e expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell,*

respectivamente. Pode-se observar uma maior quantidade da bactéria *P.a.* nas co-culturas celulares (Figuras 21C e 21F), quando comparado com a quantidade de bactérias *S.a.* (Figuras 21D, 21G e 22), onde constatamos que nestas últimas, a quantidade de macrófagos viáveis foi significativamente maior, quando comparado com a quantidade de macrófagos viáveis das co-culturas celulares expostas a bactéria *P.a.* nos insertos (Figuras 20A e 20C). Essa diminuição na quantidade de macrófagos viáveis nas últimas co-culturas, deve-se possivelmente ao fato da maior quantidade de bactérias que translocaram para o compartimento inferior, contendo macrófagos previamente comprometidos pela infecção com o parasita, e provavelmente devido as bactérias *P.a.* conhecidamente exibirem uma maior produção de biofilme, um importante fator de virulência.

Houve a migração dessas bactérias dos insertos *transwell* com microporos de 0,4 µm de tamanho, para os compartimentos inferiores do sistema, correspondente as co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* e posteriormente expostas as bactérias *P.a.* (Figuras 21C e 21F) ou *S.a.* (Figuras 21D e 21G), o que pode ter alterado a dinâmica da infecção destas co-culturas celulares, ou seja, o controle ou a suscetibilidade à infecção. Os dados sugerem e indicam para um aumento na porcentagem de macrófagos infectados (Figura 17), e um aumento no número de amastigotas/macrófago infectado e no IF, especialmente nas co-culturas celulares infectadas com o parasita na proporção 1:20 e expostas a bactéria *S.a.* nos insertos (Figuras 18 e 19). A translocação bacteriana através dos insertos *transwell,* foi evidenciada a partir de uma alíquota dos sobrenadantes das co-culturas celulares contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20, e expostos as bactérias *P.a.* ou *S.a.*, estes sobrenadantes foram distribuídos pela técnica de gotejamento em meio de cultura LB ágar, seguido pela incubação em estufa a 37 ºC durante 18 h, para posterior confirmação da presença de contaminação do experimento e/ou proveniente do sistema *transwell* (Figura 22).

Após a evidenciação das bactérias *P.a.* e *S.a.* pela turbidez do meio de cultura*,* e pelo crescimento de colônias em meio de cultura LB ágar, foram feitas as quantificações de UFC/mL. Uma média de 5,66 x 10^4 UFC/mL (Figura 22A) foi quantificada dos sobrenadantes das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20 e posteriormente expostas a bactéria *P.a.* nos insertos (Figuras 21C e 21F); e uma média de 3,66 x 10^4 UFC/mL foi

quantificada dos sobrenadantes das co-culturas celulares infectadas com o parasita nas proporções 1:10 ou 1:20 e expostas a bactéria *S.a*. nos insertos (Figuras 21D e 21G). As possíveis causas dessa translocação bacteriana pelos microporos dos insertos *transwell* ter ocorrido será explorada no item 6.0 Discussão. Essas translocações das bactérias através dos microporos do sistema *transwell,* nos impossibilitou de continuar as análises da presença independente de contato físico, das bactérias *P.a.* ou *S.a.*, em co-culturas de macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis.*

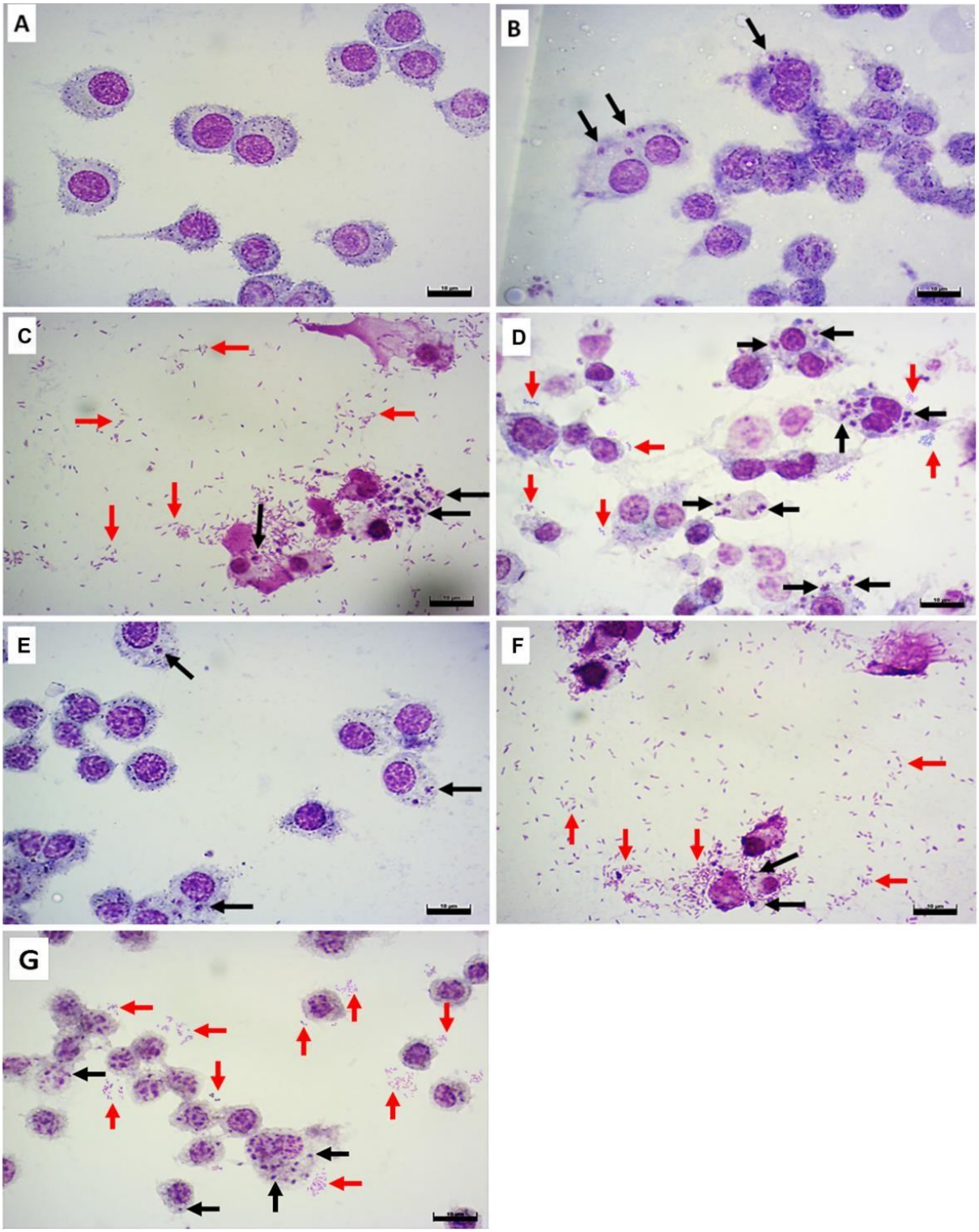

Figura 21. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as bactérias no sistema *transwell.* Coloração com Giemsa. (A): MØ saudável= macrófagos não infectados com *L. amazonensis*, nem receberam bactérias nos insertos *transwell;* (B): *L.a.* 1:10= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10, sem exposição as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; (C): *L.a.* 1:10 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *P.a.* nos insertos *transwell;* (D): *L.a.* 1:10 + *S.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell;* (E): *L.a.* 1:20= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20, sem exposição as

bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell*; (F): *L.a.* 1:20 + *P.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *P.a.,* nos insertos *transwell;* (G): *L.a.* 1:20 + *S.a.* TW= macrófagos infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:20 e expostos a bactéria *S.a.* nos insertos *transwell.* As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos insertos *transwell* por mais 24 h. As setas pretas indicam parasitos internalizados nos macrófagos RAW 264.7, e as setas vermelhas evidenciam as bactérias *P.a.* ou *S.a.* que translocaram através da membrana de 0,4 µm do sistema *transwell*. Fotomicrografias capturadas em campos representativos e aleatórios, em aumento de 1000x, de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barras de escala= 10 µm.

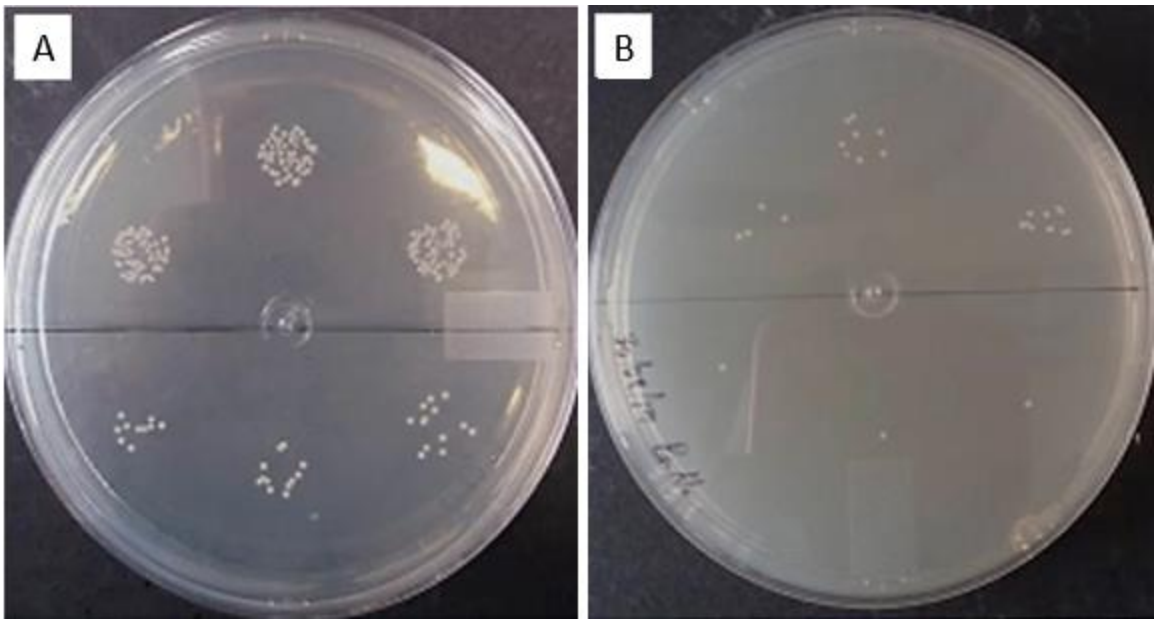

Figura 22. Colônias de bactérias em meio de cultura LB ágar, evidenciando as contaminações das co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* durante 24 h, e expostos as bactérias *P.a.* (A) ou *S.a.* (B) no sistema *transwell.* Após a inserção das bactérias no sistema *transwell,* as co-culturas contendo macrófagos RAW 264.7 previamente infectados com *L. amazonensis* foram incubadas para o estabelecimento de interação independente de contato físico por mais 24 h, logo após, constatou-se translocação bacteriana do compartimento superior para o inferior do sistema *transwell*, e os plaqueamentos dos sobrenadantes das co-culturas contendo *P.a.* ou *S.a.* nos insertos, foram realizados pela técnica de gotejamento.

5.8 Extração e isolamento de POMVs e SEVs

Durante a realização dos experimentos utilizando os suportes *transwell*, as bactérias *P.a.* ou *S.a.* foram inseridas nos insertos *transwell* e incubadas durante 24 h, juntamente com os macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20. Logo após a incubação, as bactérias dos suportes *transwell* translocaram através da membrana (poliestireno – PES) com microporos

de 0,4 µm de tamanho. *A priori,* esta translocação foi observada através da turbidez que os sobrenadantes das co-culturas celulares apresentaram depois da incubação das bactérias nos insertos *transwell,* sendo posteriormente evidenciadas pelas fotomicrografias capturadas (Figura 21), e pelo plaqueamento dos sobrenadantes em meio de cultura LB ágar (Figura 22).

Considerando esta migração das bactérias através dos microporos dos insertos *transwell*, para os compartimentos inferiores, a alternativa para mimetizar a presença das bactérias nas co-culturas de macrófagos murinos RAW 264.7 previamente infectados com *L. amazonensis*, foi a utilização das vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles* – OMVs) da bactéria *P.a.* (POMVs), e as vesículas extracelulares (*Extracellular Vesicles* – EVs) da bactéria *S.a.* (SEVs). As POMVs e SEVs foram isoladas e analisadas por NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*: análise de rastreamento de nanopartículas), para caracterização das mesmas quanto ao seu diâmetro e concentração em suspensão. Os dados obtidos para POMVs e SEVs são apresentados na Figura 23.

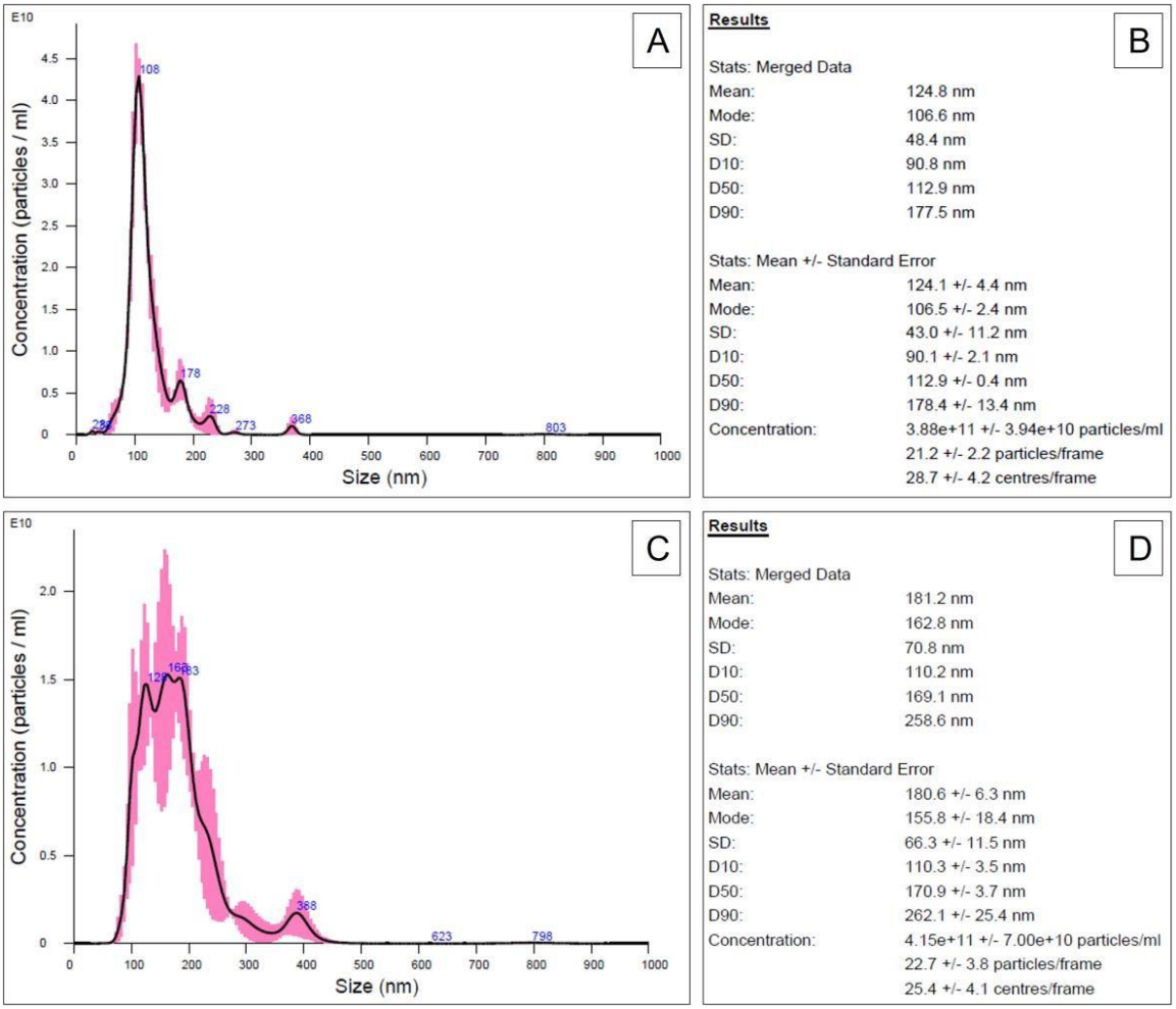

Figura 23. Caracterização das POMVs (A e B) e SEVs (C e D) por NTA. A análise de rastreamento de nanopartículas (*nanoparticle tracking analysis* – NTA) detecta nanopartículas em solução, combinando microscopia de espalhamento de luz a laser com uma câmera de dispositivo de carga acoplada para visualização das partículas, desta forma, foi possível caracterizar as vesículas quanto ao diâmetro (em nanômetros) e quantidade de partículas/mL.

As análises de NTA das POMVs revelaram que o diâmetro médio foi de 124,1 nm e uma quantidade média de 3,88 x 10^{11} partículas/mL (Figura 23A, Figura 23B e Figura 24A); e as SEVs revelaram um diâmetro médio de 180,6 nm e uma quantidade média de 4,15 x 10^{11} partículas/mL (Figura 23C, Figura 23D e Figura 24B). Após o isolamento das POMVs e SEVs, a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (Figura 25), utilizando albumina do soro bovino (BSA) como proteína padrão para calibragem do ensaio. A concentração média de proteínas totais das SEVs foi de 30,86 µg/mL, e das POMVs foi de 0,53 µg/mL (Figura 25).

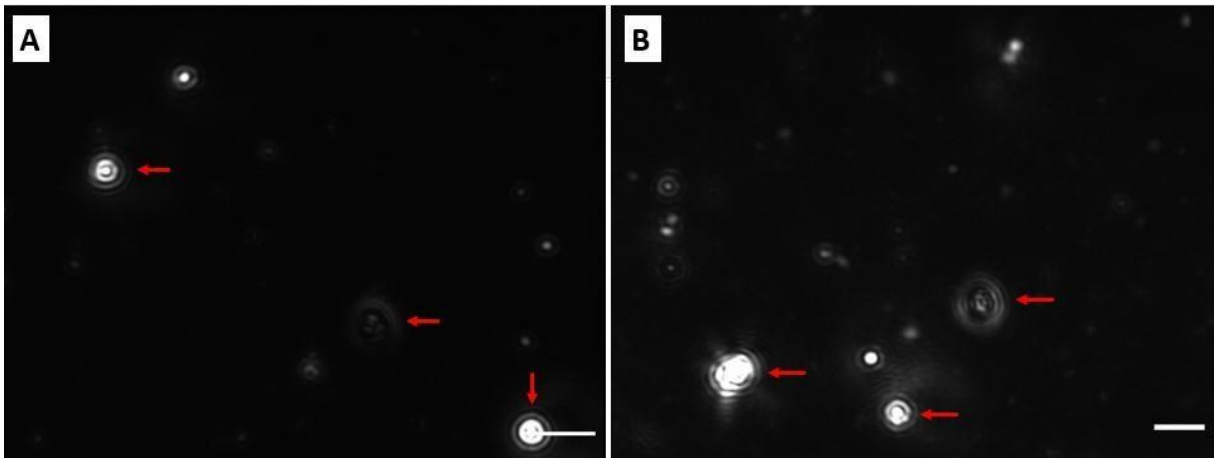

Figura 24. Captura das POMVs (A) e SEVs (B) observadas sob microscopia de espalhamento de luz a laser acoplado ao NTA. As setas vermelhas indicam a presença das vesículas de ambas as bactérias em suspensão líquida, visualizadas em movimento browniano durante as determinações de diâmetro e quantidade das nanopartículas. Barras de escala= 100 nm.

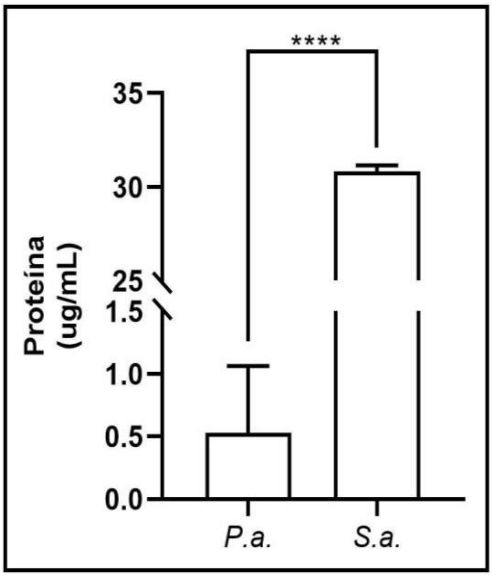

Figura 25. Quantificação de proteína total das POMVs e SEVs por Bradford. O padrão de proteína utilizado foi BSA, para a realização da curva de calibração do ensaio. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três ensaios independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. ****p≤ 0,0001.

5.9 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de POMVs e SEVs

As POMVs e as SEVs foram observadas por MET, com o objetivo de evidenciar a sua estrutura morfológica, bem como comprovar o seu diâmetro, em nanômetros, como já havíamos observado pelas análises por NTA (Figuras 23 e 24), onde foi possível conferir que as amostras mantiveram sua integridade estrutural

durante o processo de extração (Figura 24). Nas Figuras 26A e 26B é possível observar as POMVs e SEVs, respectivamente, em aumento de 68.000x. A contrastação negativa da amostra foi feita acetato de uranila a 2%.

A partir das fotomicrografias das POMVs e SEVs, pode-se observar que algumas vesículas exibiram uma contrastação mais intensa, possivelmente indicando para uma maior concentração dos componentes destas bactérias, incluindo DNA e RNA como importantes fatores de virulência, mas também LPS presente na parede de bactérias Gram-negativas como *P.a.,* e ácidos teicóicos, hemolisinas e modulinas presentes em bactérias Gram-positivas como *S.a.* Após as confirmações quanto ao diâmetro das vesículas, através de análises em NTA e em MET, as POMVs e as SEVs foram inoculadas nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, nos macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis* na proporção 1:10.

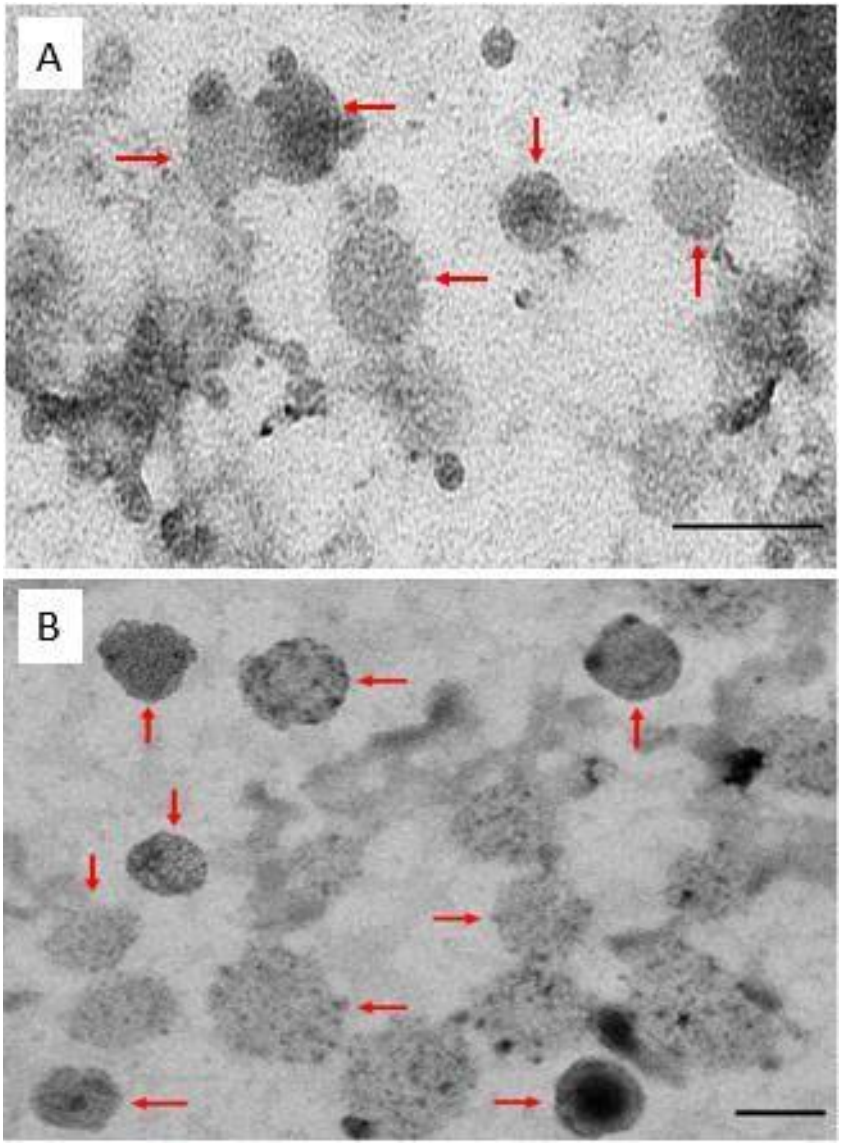

Figura 26. MET das POMVs (A) e SEVs (B). As setas vermelhas indicam vesículas contrastadas negativamente com acetato de uranila a 2%, e visualizadas em aumento de 68.000X do MET Tecnai G2 Spirit BioTWIN. Barras de escala= 100 nm.

5.10 Macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs

O principal objetivo desses ensaios, foi investigar a influência da exposição das POMVs ou SEVs, em macrófagos RAW 264.7 previamente infectados com *L. amazonensis.* No modelo *in vitro* que estamos utilizando, a infecção dos macrófagos com *L. amazonensis* foi estabelecida após 24 h de incubação, seguida pela exposição as POMVs ou SEVs, para análises da infecção e investigações acerca da modulação da resposta celular, ou seja, produção de mediadores inflamatórios, como NO ou citocinas. Os macrófagos infectados com *L.*

amazonensis, entram em contato somente com fatores de virulência isolados das bactérias, sem que haja o contato direto das bactérias com os macrófagos e consequentemente, a destruição da monocamada de células como havia sido observado anteriormente.

Na Figura 27A observa-se a porcentagem média de macrófagos infectados, em relação à quantidade total de macrófagos contabilizados, 200. Foram observadas diferenças significativamente maiores entre a porcentagem média de macrófagos infectados da situação controle, contendo parasitas *L. amazonensis* sem exposição as POMVs ou SEVs (50% macrófagos infectados), e o restante de todas as co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e posteriormente expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (30,67%, 43,17%, 33,33% macrófagos infectados, respectivamente); ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (41,33%, 41,5% e 9,67% macrófagos infectados, respectivamente) (Figura 27A). Foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 27A).

Concluímos que houve uma diminuição significativa na porcentagem de macrófagos infectados em todos os tratamentos testados. Essa diminuição pode ser interpretada como porcentagem relativa média, quando se assume como 100% de macrófagos infectados as co-culturas celulares que receberam parasitas, sem exposição as POMVs ou SEVs (Figura 27B). Foram encontradas diferenças significativas na porcentagem de macrófagos infectados, em porcentagem relativa, entre a situação controle, e o restante de todas as co-culturas celulares infectadas com o parasita e posteriormente expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100; e entre os tratamentos (Figura 27B).

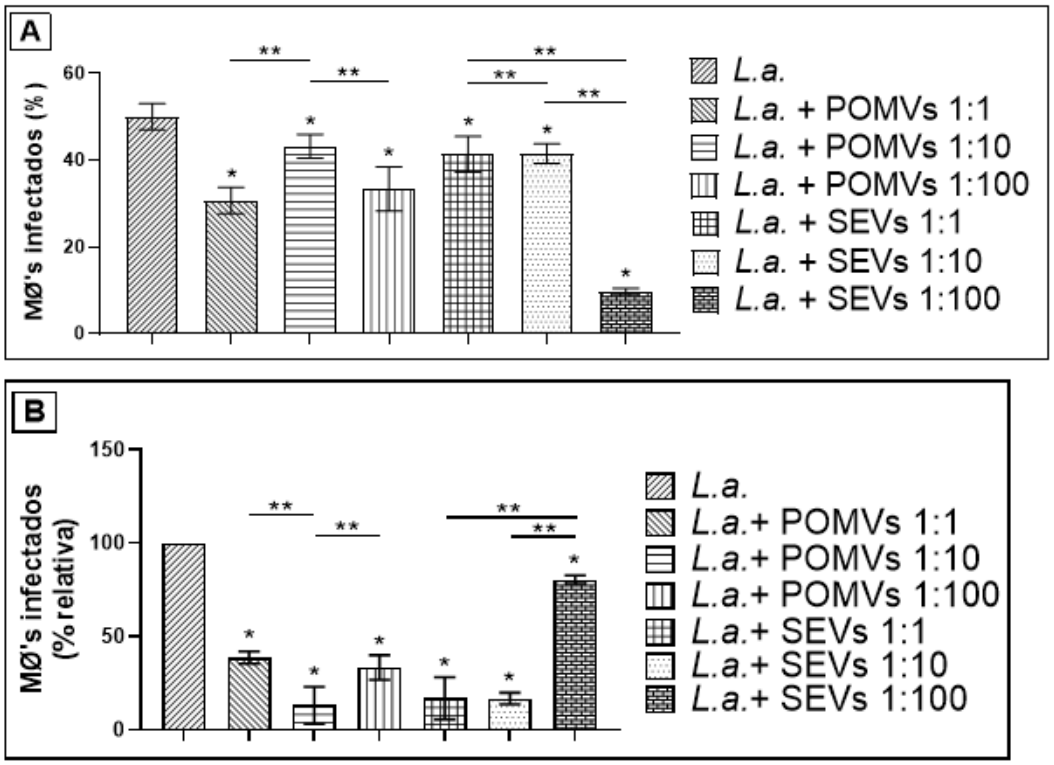

Figura 27. (A): Porcentagem média de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs; (B) Porcentagem média de macrófagos infectados, em porcentagem relativa ao controle. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs; *L.a.* + POMVs 1:1; *L.a.* + POMVs 1:10; ou *L.a.* + POMVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; *L.a.* + SEVs 1:1; *L.a.* + SEVs 1:10; ou *L.a.* + SEVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Após a quantificação das formas amastigotas intracelulares, foi possível observar diferenças significativamente maiores entre as co-culturas do controle, contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis* (1,70 amastigotas/macrófago infectado), sem exposição as POMVs ou SEVs, e as seguintes situações experimentais: co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as POMVs nas proporções 1:10 e 1:100 (1,47 e 1,38 amastigotas/macrófago, respectivamente); e co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as SEVs na proporção 1:10 (1,54 amastigotas/macrófago infectado) (Figura 28). Foram

encontradas diferenças significativamente maiores entre as co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:1 (1,63 amastigotas/macrófago), e as seguintes situações experimentais: co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as POMVs nas proporções 1:10 e 1:100 (1,47 e 1,38 amastigotas/macrófago, respectivamente) (Figura 28).

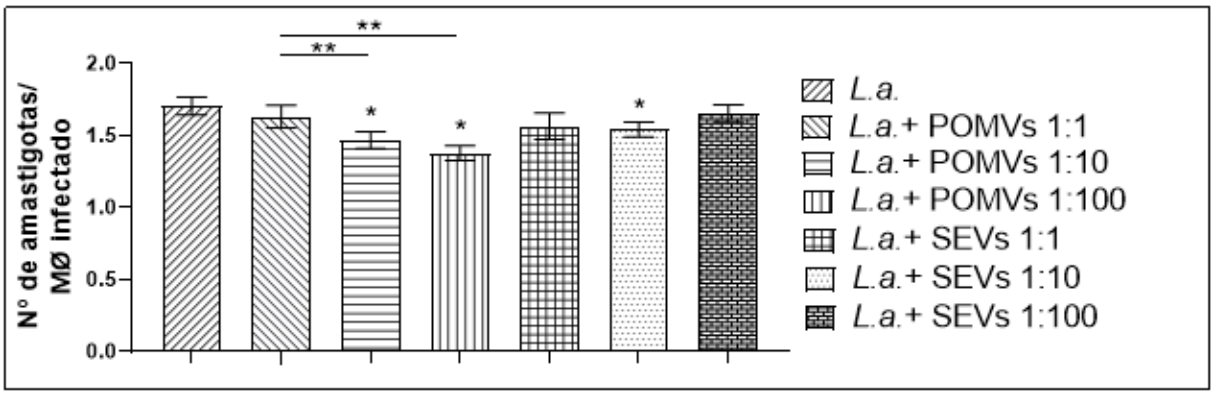

Figura 28. Número de amastigotas/macrófago infectado com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs; *L.a.* + POMVs 1:1; *L.a.* + POMVs 1:10; ou *L.a.* + POMVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; *L.a.* + SEVs 1:1; *L.a.* + SEVs 1:10; ou *L.a.* + SEVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Com relação ao IF (Índice de Infecção) (Figura 29), produto entre a porcentagem de macrófagos infectados (Figura 27) e o número de amastigotas/macrófago infectado (Figura 28), foram encontradas diferenças significativamente maiores entre as co-culturas do controle, contendo macrófagos infectados com o parasita, sem exposição as POMVs ou SEVs, e o restante das situações experimentais, com exceção das co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as SEVs na proporção 1:1 (Figura 29). Os dados sugerem uma tendência de diminuição na carga parasitária das co-culturas infectadas pelo parasita e expostas as POMVs ou SEVs, quando comparadas com o controle (Figura 28). Em compensação, a esta tendência de diminuição da carga parasitária,

não se pode excluir o fato de a quantidade de macrófagos viáveis diminuir nas co-culturas celulares que receberam POMVS ou SEVs. Dados discutidos no tópico 5.2.

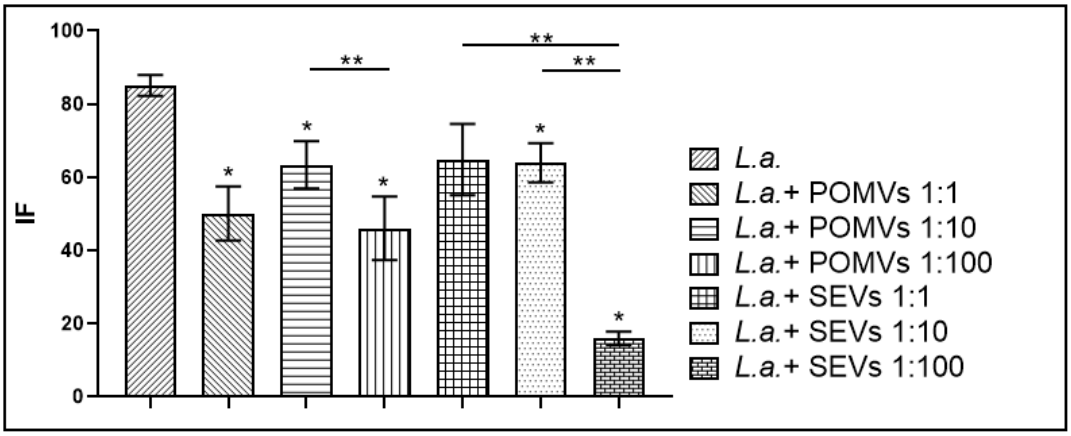

Figura 29. IF (Índice de Infecção) das co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs; *L.a.* + POMVs 1:1; *L.a.* + POMVs 1:10; ou *L.a.* + POMVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; *L.a.* + SEVs 1:1; *L.a.* + SEVs 1:10; ou *L.a.* + SEVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

5.11 Viabilidade e morfologia dos macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs

Foi realizada a quantificação de macrófagos aderentes em 20 campos, com o intuito de avaliar a viabilidade das co-culturas (Figura 30 - Figura 34). Esta quantificação foi realizada com o propósito de investigar se há diferenças na quantidade de macrófagos viáveis, expostos as diferentes situações experimentais (Figura 3), quando comparados com os respectivos controles, contendo macrófagos saudáveis, sem infecção com *L. amazonensis* e sem exposição as POMVs ou SEVs (Figura 30), ou macrófagos infectados pelo parasita, sem exposição as POMVs ou SEVs (Figura 32). Foram considerados macrófagos viáveis aqueles com o núcleo e o citoplasma estruturalmente preservados.

Diferenças significativas foram encontradas entre a quantidade média de

macrófagos viáveis do controle saudável, contendo macrófagos sem infecção com *L. amazonensis* e sem exposição as POMVs ou SEVs, com uma média de 531 macrófagos viáveis, e as seguintes situações experimentais: culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:1 ou 1:100, com quantidades médias de 458 e 616 macrófagos viáveis, respectivamente (Figura 30A). Foram encontradas diferenças significativas entre a quantidade média de macrófagos viáveis das culturas celulares expostas as POMVs na proporção 1:1, e culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:10 ou 1:100 (com 570,67 e 616 macrófagos viáveis em média, respectivamente) (Figura 30A). Também foram encontradas diferenças significativas entre a quantidade de macrófagos viáveis das culturas celulares expostas as POMVs na proporção 1:10, e culturas celulares expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 30A).

A quantidade de macrófagos viáveis diferiu significativamente entre as culturas celulares expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, e culturas de macrófagos expostas as SEVs nas mesmas proporções (Figura 30A). A quantidade de macrófagos viáveis, indica para um grau de representatividade, em porcentagem relativa ao controle saudável, contendo culturas de macrófagos sem infecção pelo parasita e sem exposição as POMVs ou SEVs, considerado como 100% de viabilidade (Figura 30B), comparados com culturas de macrófagos expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100. Foram observadas diferenças significativas na quantidade de macrófagos viáveis em porcentagem relativa, entre o controle saudável e as seguintes situações experimentais: culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (com 86,31%, 107,54% e 116,16%, respectivamente, de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) (Figura 30B). Foram encontradas diferenças significativas na quantidade de macrófagos viáveis em porcentagem relativa, entre o controle saudável, e culturas celulares expostas as SEVs na proporção 1:100 (com 103,71% de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) (Figura 30B).

Foram encontradas diferenças significativas na quantidade de macrófagos viáveis em porcentagem relativa, entre culturas de macrófagos expostas as POMVs na proporção 1:1 e as seguintes situações experimentais: culturas celulares expostas as POMVs nas proporções 1:10 ou 1:100 (107,54% e 116,16%, respectivamente, de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) (Figura 30B). Também foram encontradas diferenças significativas na quantidade de

macrófagos viáveis em porcentagem relativa, entre culturas celulares expostas as POMVs na proporção 1:10 (com 107,54% de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) e culturas de macrófagos expostas as SEVs na proporção 1:10 (94,58% de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) (Figura 30B). Foram encontradas diferenças significativas na quantidade de macrófagos viáveis, entre as culturas celulares expostas as SEVs na proporção 1:10 (94,58% de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) e as culturas de macrófagos expostas as SEVs na proporção 1:100 (103,71% de macrófagos viáveis em relação ao controle saudável) (Figura 30B).

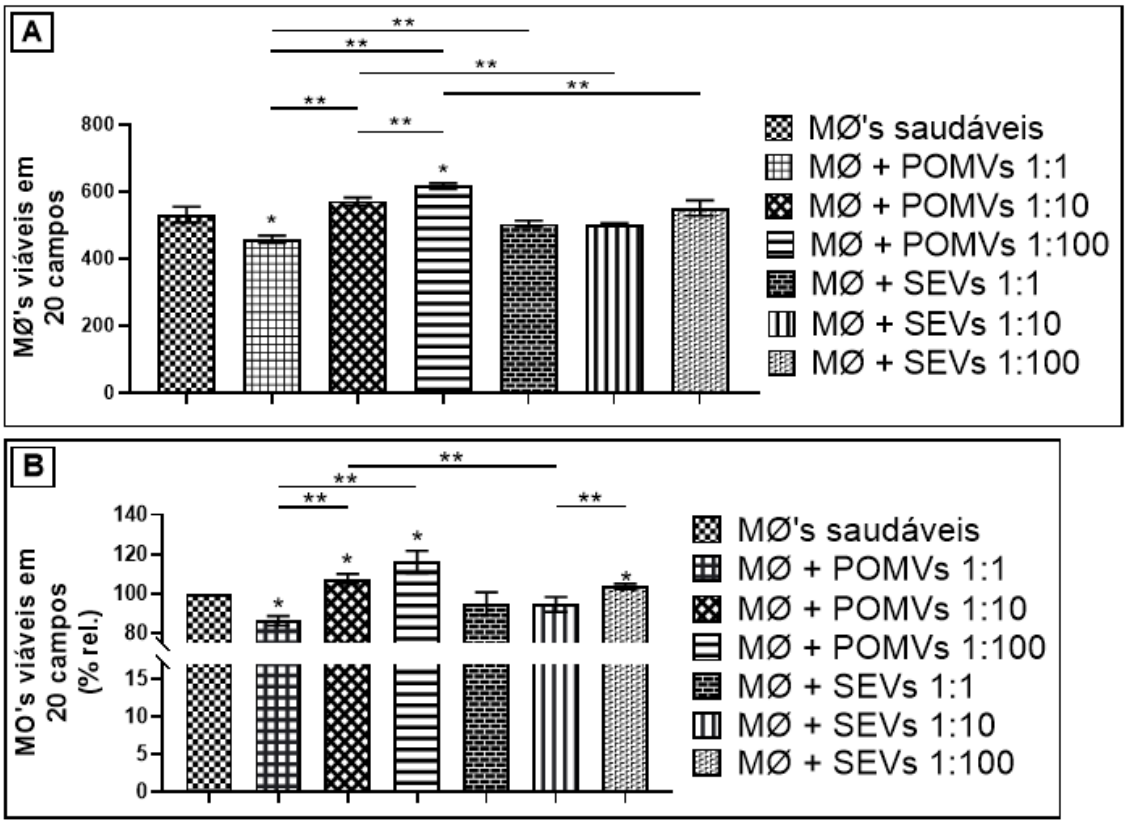

Figura 30. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas de macrófagos sem e com exposição as POMVs ou SEVs. (A): Quantidade de macrófagos viáveis; (B): Quantidade de macrófagos viáveis, calculados em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos saudáveis, não infectados com *L. amazonensis* nem expostos as POMVs ou SEVs. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. MØ's saudáveis= macrófagos não infectados com *L. amazonensis*, nem expostos as POMVs ou SEVs, como controle do restante das situações experimentais; MØ + POMVs 1:1; MØ + POMVs 1:10; ou MØ + POMVs 1:100= macrófagos expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; MØ + SEVs 1:1; MØ + SEVs 1:10; ou MØ's + SEVs 1:100= macrófagos expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100,

respectivamente. As culturas de macrófagos foram expostas as POMVs ou SEVs durante 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos não infectados pelo parasita nem expostos as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Os macrófagos em campos representativos foram fotografados com o objetivo de evidenciar a sua estrutura morfológica e para investigar se houve modificações estruturais após os tratamentos com POMVs ou SEVs, sem infecção pelo parasita (Figura 31). Na Figura 31A pode-se observar a aparência morfológica dos macrófagos saudáveis, que não infectados pelo parasita, nem expostos as POMVs ou SEVs, com o núcleo e citoplasma bem conservados. As Figuras 31B, 31C e 31D ilustram culturas de macrófagos expostas a POMVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente, e revelaram uma estrutura morfológica comprometida, com debridamento citoplasmático evidente, principalmente nas culturas celulares expostas as POMVs nas proporções 1:1 e 1:100 (Figuras 31B e 31D, respectivamente). As culturas celulares expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100 (Figuras 31E, 31F e 31G, respectivamente), também exibiram modificações estruturais, além de uma evidente diminuição no volume dos macrófagos expostos a essas vesículas.

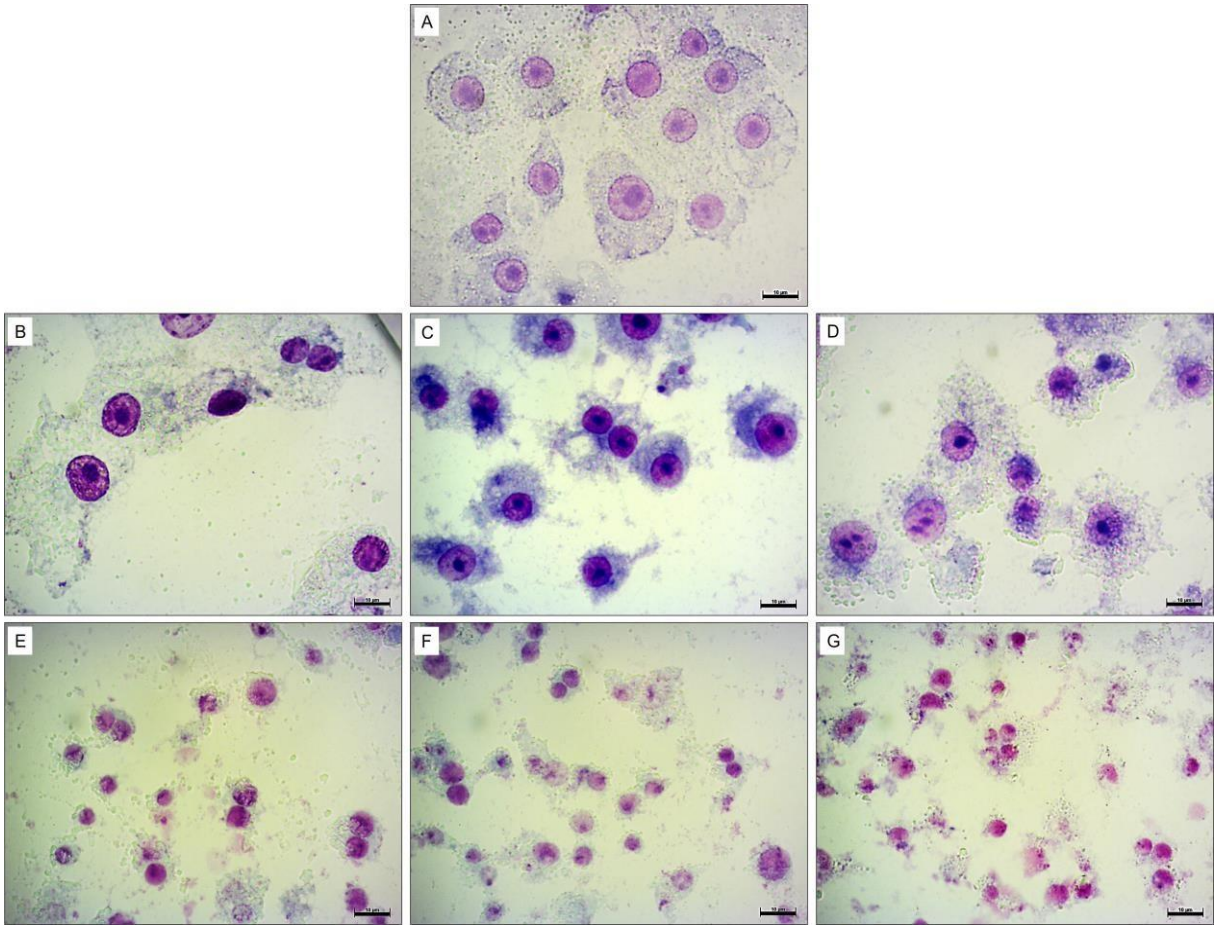

Figura 31. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 sem e com exposição as POMVs ou SEVs, corados com Giemsa. (A): Macrófagos não expostos as POMVs ou SEVs, como controle positivo do restante das situações experimentais; (B, C e D): macrófagos expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente; (E, F e G): macrófagos expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente. As culturas de macrófagos foram expostas as POMVs ou SEVs durante 24 h. Fotomicrografias capturadas em campos representativos e aleatórios, em aumento de 1000x, de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barras de escala= 10 µm.

Foram observadas diferenças significativas entre a quantidade de macrófagos viáveis do controle saudável, contendo macrófagos sem infecção pelo parasita, e sem exposição as POMVs ou SEVs, e co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs (com quantidades médias de 531 *versus* 455,67 macrófagos viáveis, respectivamente) (Figura 32A). Se considerados como 100% de viabilidade, a quantidade de macrófagos viáveis do controle saudável, obtemos uma representatividade média de 85,88% (uma diminuição significativa de 14,12% de macrófagos viáveis), das co-culturas infectadas com *L. amazonensis* (Figura 32B), sugerindo uma significativa redução na viabilidade das co-culturas celulares infectadas pelo parasita, e

submetidas ao ambiente inflamatório e oxidativo.

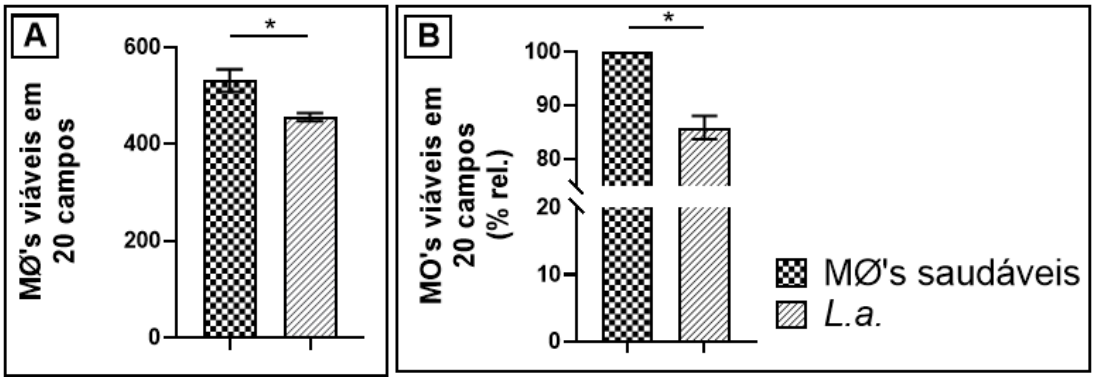

Figura 32. Contagem de macrófagos viáveis em 20 campos, das culturas celulares saudáveis ou infectadas com *L. amazonensis,* sem exposição as POMVs ou SEVs. (A): Quantidade de macrófagos viáveis; (B): Quantidade de macrófagos viáveis, calculados em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos saudáveis, não infectados com *L. amazonensis* nem expostos as POMVs ou SEVs. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. MØ's saudáveis= macrófagos não infectados com *L. amazonensis*, nem expostos as POMVs ou SEVs, como controle; *L.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, sem exposição as POMVs ou SEVs. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos não infectados pelo parasita e não expostos as POMVs ou SEVs e co-culturas celulares infectadas pelo parasita.

Foi realizada a quantificação de macrófagos aderentes em 20 campos, das situações experimentais (Figura 3) contendo co-culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis,* sem exposição as POMVs ou SEVs, e co-culturas celulares infectadas com o parasita expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (Figuras 33 e 34). A quantidade média de macrófagos viáveis (Figura 33A) indica para um grau de representatividade em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs, considerados como 100% de viabilidade, comparados com culturas de macrófagos infectadas pelo parasita e expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100.

Foram encontradas diferenças significativas na quantidade média de macrófagos viáveis (Figura 33A), entre a situação controle, contendo co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* (com uma quantidade média de 455,67 macrófagos viáveis) e o restante dos tratamentos testados, sugerindo um possível

efeito direto da presença dos fatores de virulência das POMVs ou SEVs, sobre a viabilidade dos macrófagos previamente infectados com o parasita.

Diferenças significativas foram observadas na quantidade média de macrófagos viáveis, entre as co-culturas celulares contendo infecção pelo parasita e exposição as POMVs na proporção 1:1, e co-culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (com quantidades médias de 355 e 165,33 macrófagos viáveis) (Figura 33A). Estas diferenças significativas indicam para um grau de representatividade de 77,88% e 36,27%, se considerados como 100% de viabilidade os macrófagos das co-culturas infectadas com o parasita, sem exposição as vesículas (Figura 33B). Foram observadas diferenças significativamente maiores na quantidade média de macrófagos viáveis, entre as co-culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as POMVs na proporção 1:10, e co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (com quantidades médias de 326,67 e 165,33 macrófagos viáveis, respectivamente) (Figura 33A). Se considerados como 100% de viabilidade as co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita, sem exposição as vesículas, estas diferenças significativas indicam para um grau de representatividade de 71,69% e 36,27%, respectivamente (Figura 33B). Os dados sugerem um possível efeito dose-dependente, entre a diminuição na quantidade de macrófagos viáveis e o aumento da proporção de POMVs testadas (Figura 33).

Diferenças estatisticamente maiores, foram encontradas na quantidade média de macrófagos viáveis, entre as co-culturas celulares expostas as seguintes proporções de POMVs *versus* SEVs, respectivamente: 1:1 (355 *versus* 142,33 macrófagos viáveis em média); 1:10 (326,67 *versus* 138,67 macrófagos viáveis em média); e 1:100 (165,33 *versus* 132,67 macrófagos viáveis em média) (Figura 33A). Estas diferenças significativas, respectivamente indicam para um grau de representatividade de 77,88% *versus* 31,23%; 71,69% *versus* 30,43%; e 36,27% *versus* 29,11%, se considerados como 100% de viabilidade os macrófagos das co-culturas infectadas com o parasita, sem exposição as POMVs ou SEVs (Figura 33B).

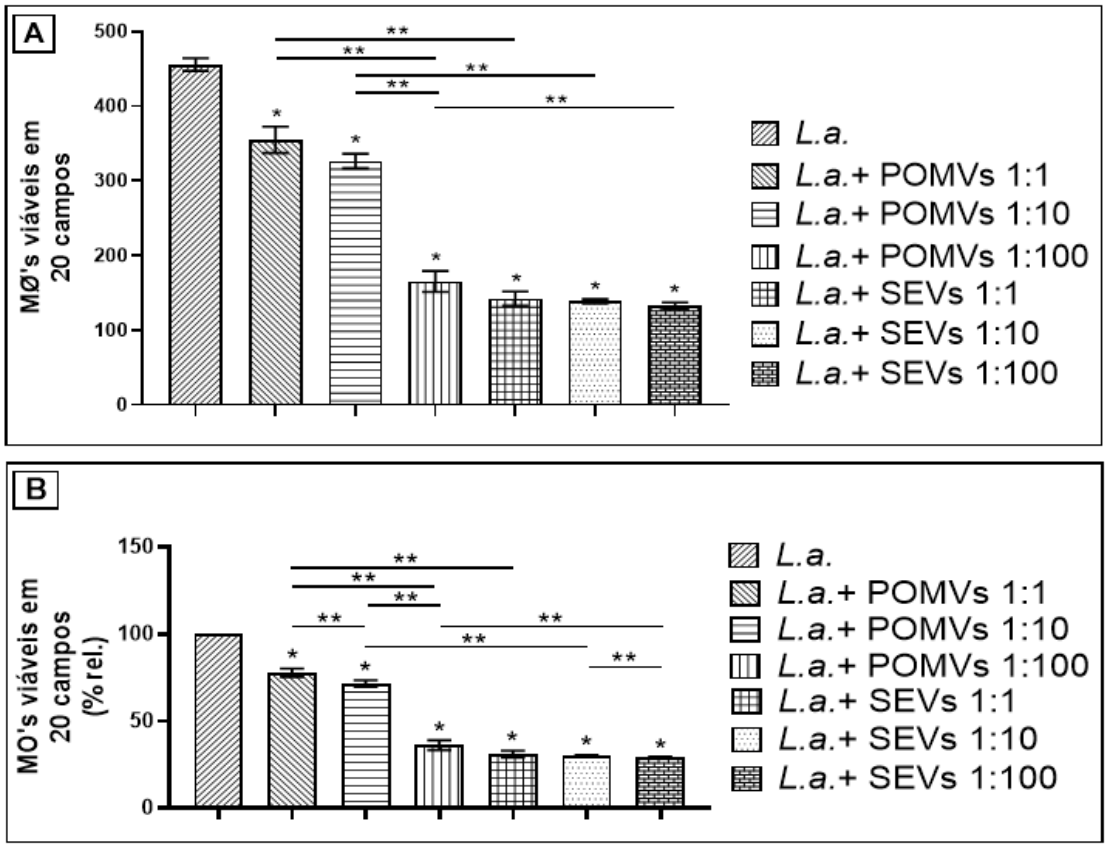

Figura 33. Contagem de macrófagos RAW 264.7 viáveis em 20 campos, nas co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs. (A): Quantidade de macrófagos viáveis; (B): Quantidade de macrófagos viáveis, calculados em porcentagem relativa ao controle, contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis,* e expostos as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. *L.a.*= macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs; *L.a.* + POMVs 1:1; *L.a.* + POMVs 1:10; ou *L.a.* + POMVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; *L.a.* + SEVs 1:1; *L.a.* + SEVs 1:10; ou *L.a.* + SEVs 1:100= macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Os macrófagos em campos representativos foram fotografados para evidenciação de sua estrutura morfológica e das formas amastigotas encontradas nas co-culturas celulares infectadas pelo parasita *L. amazonensis*, e co-culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (Figura 34). Na Figura 34A foi possível observar a presença das

formas amastigotas de *L. amazonensis*, e nessas co-culturas celulares, o número de macrófagos viáveis foi significativamente maior comparado com a quantidade de macrófagos viáveis do restante das situações experimentais, contendo infecção com o parasita e exposição as POMVs ou SEVs (Figura 33).

Nas Figuras 34B - 34D, as co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente; nessas co-culturas celulares é possível observar a morfologia celular está com aspecto inflamatório, com o citoesqueleto prejudicado pela presença das formas amastigotas intracelulares, juntamente com as POMVs. Nas co-culturas celulares das Figuras 34B e 34C, foi possível observar aumento no tamanho dos vacúolos parasitóforos, comparados com os vacúolos da Figura 34A, sugerindo uma possível tentativa de os macrófagos realizarem a hidrólise dos fatores de virulência tanto do parasita, como das POMVs, contendo alta carga de componentes imunogênicos e imunoestimulatórios. Macrófagos da Figura 34D apresentaram a menor viabilidade (inferida pela contagem de macrófagos viáveis em 20 campos representativos), quando comparada com a quantidade de macrófagos viáveis das Figuras 34A e 34C, sugerindo que maiores proporções de POMVs podem promover a ativação de vias apoptóticas e/ou de inflamassomos que ativam a expressão de componentes citotóxicos para a célula (Figura 33).

As Figuras 34E - 34G, representam co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, respectivamente. Nestas fotomicrografias é possível observar as formas amastigotas íntegras no interior dos macrófagos, porém, são as co-culturas que apresentaram a menor quantidade de macrófagos viáveis, quando comparada com o controle, somente contendo infecção pelo parasita, sem exposição as POMVs ou SEVs (Figura 33), o que sugere que a presença das SEVs nessas co-culturas celulares, compromete significativamente a viabilidade celular. Considerando os dados obtidos com a quantificação de proteína total pelo método de Bradford, das POMVs e SEVs (Figura 25), do qual, a maior concentração de proteína total foi encontrada para as SEVs, portanto, as co-culturas expostas as SEVs contendo fatores de virulência com propriedades imunogênicas e/ou imunoestimulatórias, promoveu uma diminuição significativa na quantidade de macrófagos viáveis, se comparado com a quantidade de macrófagos viáveis das co-culturas celulares expostas as POMVs nas mesmas proporções (Figura 33).

Os dados de quantificação de proteína total por Bradford (Figura 25), sugerem para um possível efeito direto das SEVs contendo uma concentração (em µg/mL) de proteínas maior, quando comparada com a concentração de proteínas obtida das POMVs, e podem ser considerados para explicação parcial da diminuição na quantidade de macrófagos viáveis (Figura 33), das co-culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as SEVs, quando comparado com a quantidade de macrófagos viáveis das co-culturas infectadas pelo parasita e expostas as POMVs. A estas diminuições observadas na quantidade de macrófagos viáveis das co-culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as SEVs, não se pode atribuir única e exclusivamente a diferença significativa na concentração de proteína total (Figura 25) entre as POMVs e SEVs estudadas, mas também deve-se considerar o conteúdo no interior das SEVs, contendo fatores de virulência que podem contribuir para o comprometimento das viabilidades das culturas celulares.

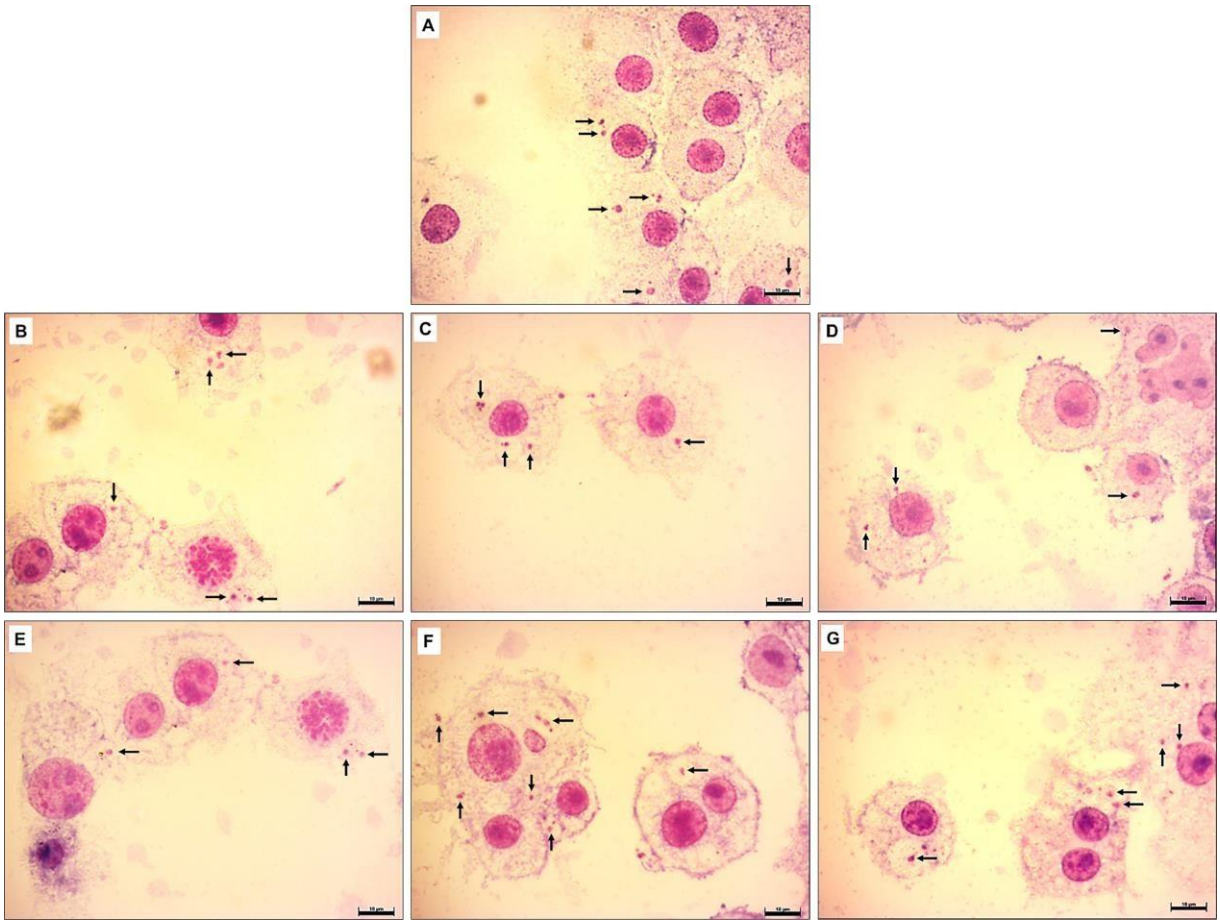

Figura 34. Fotomicrografias de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não as POMVs ou SEVs. Coloração com Giemsa. (A): macrófagos infectados com *L. amazonensis*, como controle positivo do restante das situações experimentais; (B, C e D): macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente; (E, F

e G): macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. Fotomicrografias capturadas em campos representativos e aleatórios, em aumento de 1000x, de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barras de escala= 10 µm.

5.12 Quantificação de NO_2^- (nitrito) nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs

A quantificação de nitrito nos sobrenadantes das culturas celulares, foi realizada através do ensaio colorimétrico de Griess, com o intuito de avaliar a produção deste mediador inflamatório cujo papel está relacionado com uma resposta celular microbicida, durante a exposição as diferentes situações experimentais que os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos (Figura 3). Uma curva de calibração do ensaio (Figura 35) foi realizada, para a obtenção de valores de referência de absorbância (D.O.= 540 nm), de acordo com as concentrações de nitrito pré-estabelecidas.

Após a realização dos ensaios de infecção de macrófagos RAW 264.7 com *L. amazonensis* e a posterior exposição as POMVs ou SEVs, os sobrenadantes das co-culturas celulares foram armazenados em *freezer* a -20 ºC. Uma alíquota dos sobrenadantes das culturas celulares, foi retirada e plaqueada pela técnica de gotejamento em meios de cultura LB ágar, com o intuito de verificar se houve contaminação durante a realização do experimento. Após a confirmação de esterilidade dos sobrenadantes das culturas celulares, foram utilizados filtros de seringa de 0,22 µm (PVDF) para remoção de *debris* celulares.

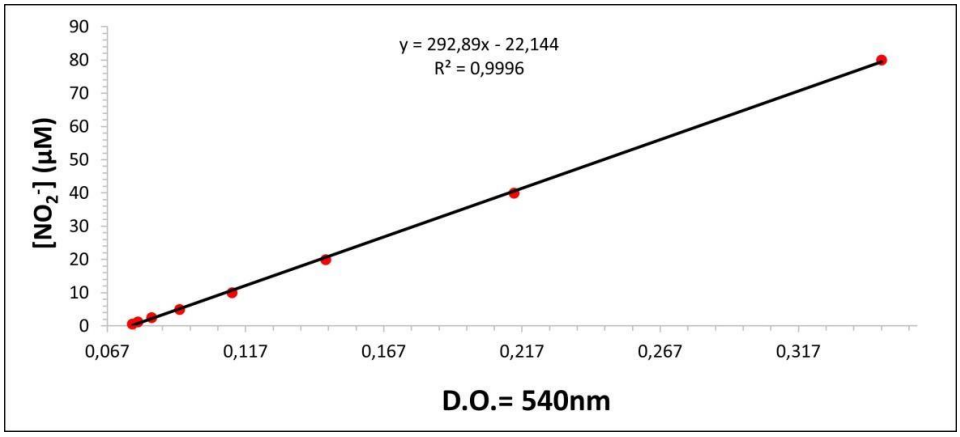

Figura 35. Curva de calibração do Método de Griess. Os valores de referência de absorbância (em

vermelho) foram plotados em relação as concentrações pré-estabelecidas de nitrito em µM, e são mostrados como uma média representativa de três ensaios realizados independentemente em triplicata. Uma linha de tendência linear (em preto) foi traçada para obtenção da equação da reta.

Tanto as culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e posteriormente expostas as POMVs ou SEVs (Figura 34), quanto as culturas de macrófagos somente expostas as vesículas das bactérias (Figura 33), mostraram produção de nitrito após 24 h de incubação com essas vesículas de membrana, extraídas das bactérias *P.a.* ou *S.a.* (Figura 36). Culturas de macrófagos foram estimuladas durante 12 h com LPS 100 ng/mL (lipopolissacarídeo extraído da cepa O111:B4 de *E. coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)), com o intuito de avaliar se macrófagos estimulados com este importante componente de parede celular bacteriana Gram-negativa, são capazes de produzir nitrito como um sinalizador inflamatório, comparado com culturas de macrófagos saudáveis (controle). Foram encontradas diferenças significativas entre culturas de macrófagos expostas as POMVs na proporção 1:100 (com uma concentração média de nitrito em 0,121 µM), e as seguintes situações experimentais: macrófagos expostos as POMVs nas proporções 1:10 e 1:1 (com concentrações médias de nitrito em 0,090 e 0,084 µM, respectivamente); macrófagos estimulados com LPS 100 ng/mL (com uma produção média de nitrito em 0,082 µM); e macrófagos saudáveis, sem exposição as POMVs ou SEVs (com uma concentração média de nitrito em 0,083 µM) (Figura 36A).

Foram encontradas ainda, diferenças significativamente menores, entre a produção média de nitrito, das culturas celulares estimuladas com LPS 100 ng/mL e culturas de macrófagos expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 36A), sugerindo um conteúdo altamente inflamatório das POMVs. Com relação as culturas celulares expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, não foram encontradas diferenças significativas com as culturas de macrófagos saudáveis (controle) (Figura 36A), exibindo concentrações médias de nitrito, muito semelhantes com as do controle saudável. Por outro lado, foram observadas diferenças significativamente maiores entre as concentrações médias de nitrito, das culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:10 e 1:100 (com 0,090 e 0,121 µM, respectivamente) e as culturas celulares expostas as SEVs nas mesmas proporções (com 0,082 e 0,086 µM, respectivamente) (Figura 36A).

Foi verificada uma diferença significativamente maior na concentração de

nitrito, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10 – situação controle do restante -, com uma média de 0,120 µM, e o restante das culturas celulares, contendo infecção com a mesma proporção de parasitas e expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 (Figura 36B). Diferenças significativamente menores foram observadas na produção de nitrito das culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, e expostas as POMVs na proporção 1:100 (com uma média de 0,080 µM), e culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção, e expostas as POMVs nas proporções 1:1 e 1:10 (com uma média 0,101 µM em ambas as culturas) (Figura 36B). Por outro lado, foram observadas diferenças significativamente menores na produção de nitrito das culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, e expostas as SEVs na proporção 1:1 (com uma média de 0,078 µM), e culturas de macrófagos infectadas com a mesma proporção de parasitas, e expostas as SEVs nas proporções 1:10 e 1:100 (com uma média de 0,081 e 0,083 µM, respectivamente) (Figura 36B). A produção média de nitrito das culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, e expostas as POMVs na proporção 1:1, e das culturas de macrófagos infectadas com o parasita na mesma proporção, e expostas as SEVs na mesma proporção, foi comparada com o intuito de avaliar o motivo da produção de nitrito ser significativamente maior nas primeiras co- culturas celulares (Figura 36B).

Essas diferenças significativamente maiores foram constatadas entre as culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* na proporção 1:10, e expostas as POMVs na proporção 1:10, e culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as SEVs nas mesmas proporções (Figura 36B), sugerindo que a exposição as POMVs na proporção 1:10 induziu uma resposta inflamatória mais acentuada, quando comparada com a situação experimental que recebeu SEVs na mesma proporção. A alta produção significativa de nitrito nas culturas celulares expostas as POMVs na proporção 1:10, sem infecção pelo parasita, foi significativamente maior, quando comparada com as culturas de macrófagos expostas as SEVs na mesma proporção, das quais exibiram uma produção diminuída deste radical (Figura 36A).

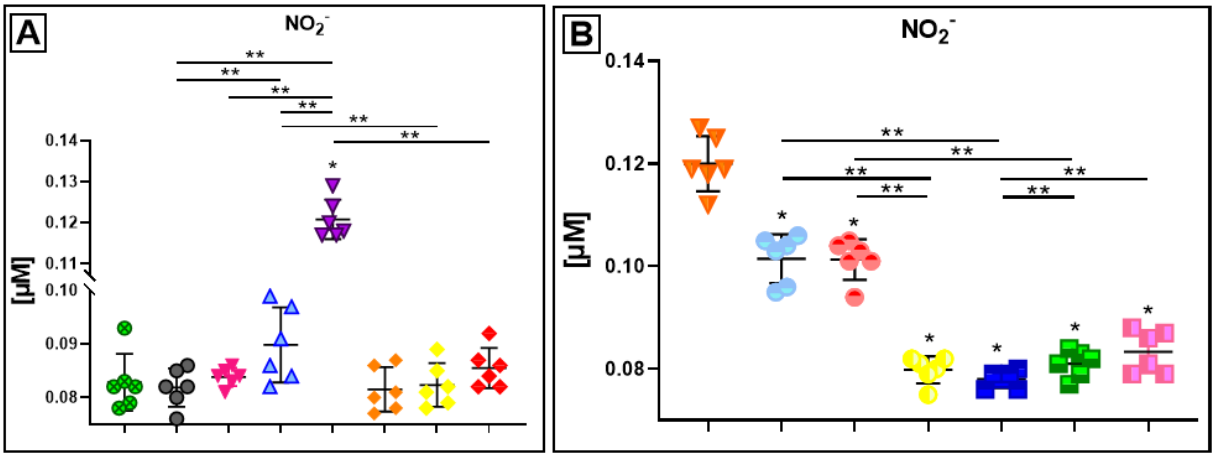

Figura 36. (A): Concentração de nitrito em µM, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos ou não POMVs ou SEVs; e (B): das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas ou não POMVs ou SEVs. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três ensaios independentes realizados em triplicata. (A): ⊗ = MØ's saudáveis: macrófagos sem infecção com *L. amazonensis* e sem exposição as POMVs ou SEVs, como controle do restante das situações experimentais; ● = MØ + LPS 100 ng/mL: macrófagos estimulados com LPS a 100ng/mL durante 12 h, sem infecção pelo parasita e sem exposição as POMVs ou SEVs; ▼ = MØ + POMVs 1:1: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:1; △ = MØ + POMVs 1:10: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:10; ▼ = MØ + POMVs 1:100: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:100; ◆ = MØ + SEVs 1:1: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:1; ◆ = MØ + SEVs 1:10: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:10; ◆ = MØ's + SEVs 1:100: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:100. As culturas de macrófagos foram expostas as POMVs ou SEVs durante 24 h. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos não infectados pelo parasita e não expostos as POMVs ou SEVs e o tratamento; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos. (B): ▼ = *L.a.*: macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs, como controle positivo do restante das situações experimentais; ● = *L.a.* + POMVs 1:1: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:1; ● = *L.a.* + POMVs 1:10: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:10; ◐ = *L.a.*+ POMVs 1:100: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:100; ■ = *L.a.* + SEVs 1:1: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:1; ■ = *L.a.* + SEVs 1:10: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:10; ■ =*L.a.* + SEVs 1:100: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:100. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos;

**p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

5.13 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs ou SEVs

Em paralelo com as quantificações de nitrito nos sobrenadantes das culturas celulares, quantificamos as citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-10 e IL-1β), que podem estar envolvidas na resposta celular, das diferentes situações experimentais a que os macrófagos RAW 264.7 foram submetidos. Primeiramente analisamos macrófagos saudáveis incubados com POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 e as culturas celulares foram incubadas durante 24 h.

Os níveis das citocinas IL-10, IL-17A, IFN-γ e IL-2 analisados por citometria de fluxo, exibiram MFIs (Intensidade Média de Fluorescência) abaixo do detectável pela curva de calibração, portanto, os valores em pg/mL foram iguais a zero para todas as culturas celulares. Quanto aos níveis de TNF-α (Figura 37A) e IL-6 (Figura 37B) nos sobrenadantes das culturas celulares expostas as POMVs ou SEVs, não foram observadas diferenças significativas quando comparadas com o controle saudável sem exposição as estas vesículas, mas apesar disso, altos níveis destas citocinas inflamatórias foram verificados, quando comparadas com os níveis da citocina IL-4 (Figura 37C), por exemplo. Foram encontradas diferenças significativas na produção de IL-4 entre o controle saudável sem exposição as vesículas, e culturas celulares expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 e 1:100 (Figura 37C). Diferenças significativamente menores foram observadas nos níveis de IL-4 das culturas celulares expostas as SEVs na proporção 1:10, e culturas de macrófagos expostas as SEVs na proporção 1:100 (Figura 37C).

Foram encontradas diferenças significativamente menores na produção de IL-1β entre o controle saudável, e culturas de macrófagos expostas as SEVs na proporção 1:1 (Figura 37D). Com relação ao restante das culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100; ou expostas as SEVs nas proporções 1:10 ou 1:100, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas, notamos uma produção média moderadamente elevada nas culturas celulares saudáveis, sem exposição a estas vesículas, sugerindo que de alguma forma, a exposição as POMVs ou SEVs nas proporções mencionadas, regulou a

expressão e secreção de IL-1β (Figura 37D).

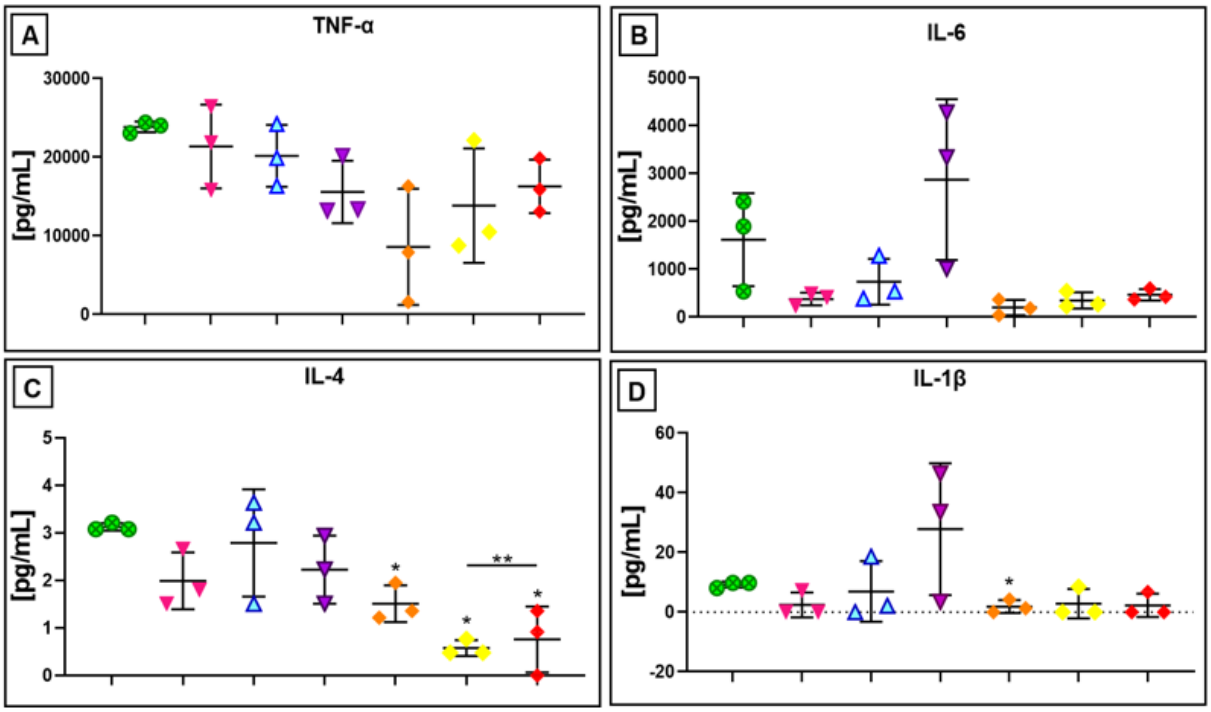

Figura 37. Concentração de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-4 (C) e IL-1β (D) em pg/mL, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos ou não POMVs ou SEVs, sem infecção pelo parasita. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três ensaios independentes realizados em triplicata. ⊗ = MØ's saudáveis: macrófagos sem infecção com *L. amazonensis* e sem exposição as POMVs ou SEVs, como controle do restante das situações experimentais; ▼= MØ + POMVs 1:1: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:1; △= MØ + POMVs 1:10: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:10; ▼= MØ + POMVs 1:100: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as POMVs na proporção 1:100; ◆= MØ + SEVs 1:1: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:1; ◆= MØ + SEVs 1:10: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:10; ◆= MØ's + SEVs 1:100: macrófagos sem infecção pelo parasita e expostos as SEVs na proporção 1:100. As culturas de macrófagos foram expostas as POMVs ou SEVs durante 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos não infectados pelo parasita e não expostos as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

Então, analisamos os níveis de citocinas das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs ou SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100. Quanto aos níveis de TNF-α, foram encontradas diferenças significativas entre o controle, contendo macrófagos infectados com *L. amazonensis*

sem exposição as vesículas, e culturas celulares infectadas e expostas as POMVs nas proporções 1:1 e 1:100 (Figura 38A). Quando comparado com as concentrações de TNF-α das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, o controle evidenciou uma expressão significativamente elevada, ≅20 vezes maior (Figura 38A).

Diferenças significativamente maiores foram encontradas na produção de TNF-α das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs na proporção 1:1, e as seguintes situações experimentais: co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as SEVs na proporção 1:1; e co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 38A). Também foram encontradas diferenças significativamente maiores na produção de TNF-α das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs na proporção 1:10 e as seguintes situações experimentais: macrófagos infectados e expostos as SEVs na proporção 1:10; e co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 38A).

Os níveis de IL-6 das co-culturas de macrófagos da situação controle, contendo infecção, sem exposição as vesículas, foram significativamente maiores, quando comparado com o restante das co-culturas celulares (Figura 38B). Foram observadas diferenças significativas na produção de IL-6 entre co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:1, e as seguintes situações experimentais: co-culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as SEVs na proporção 1:1; e co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 38B). Observamos diferenças significativas na produção de IL-6 entre co-culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs na proporção 1:10, e as seguintes situações experimentais: co-culturas celulares infectadas com o parasita e expostas as SEVs na proporção 1:10; e culturas de macrófagos infectadas com o parasita e expostas as POMVs na proporção 1:100 (Figura 38B).

Foram encontradas diferenças significativamente maiores na produção de IL-4 e IL-1β entre macrófagos infectados, sem exposição as vesículas de bactérias e as seguintes situações experimentais: co-culturas celulares infectadas e expostas as POMVs na proporção 1:100; macrófagos infectados e expostos as SEVs na proporção 1:10; e co-culturas celulares infectadas e expostas as SEVs na proporção

1:100 (Figuras 38C e 38D). Foram encontradas ainda, diferenças significativamente maiores entre o nível de IL-1β das co-culturas apenas infectadas, e co-culturas celulares infectadas e expostas as SEVs na proporção 1:1 (Figura 38D).

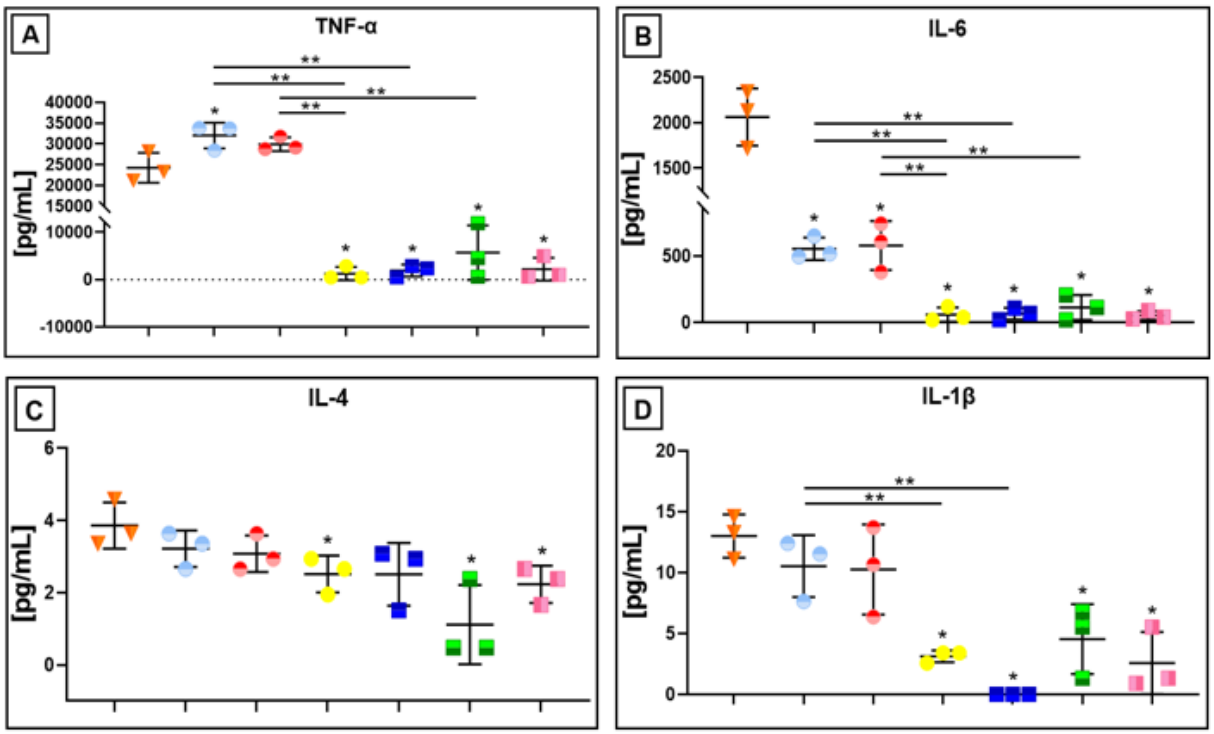

Figura 38. Concentração de TNF-α (A), IL-6 (B), IL-4 (C) e IL-1β (D) em pg/mL, nos sobrenadantes das co-culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e expostos ou não POMVs ou SEVs. Os dados são mostrados como média ± desvio padrão e representam os resultados de três ensaios independentes realizados em triplicata. ▼ = *L.a.*: macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sem exposição as POMVs ou SEVs, como controle positivo do restante das situações experimentais; ● = *L.a.* + POMVs 1:1: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:1; ● = *L.a.* + POMVs 1:10: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:10; ● = *L.a.*+ POMVs 1:100: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as POMVs na proporção 1:100; ■ = *L.a.* + SEVs 1:1: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:1; ■ = *L.a.* + SEVs 1:10: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:10; ■ =*L.a.* + SEVs 1:100: macrófagos infectados com *L. amazonensis* e expostos as SEVs na proporção 1:100. As co-culturas de macrófagos foram infectadas com *L. amazonensis* durante 24 h, e logo após, foram expostas as POMVs ou SEVs por mais 24 h. A significância estatística foi calculada utilizando o teste t-*Student* não-pareado. *p≤ 0,05= diferença significativa entre a situação controle, contendo macrófagos infectados pelo parasita sem exposição as POMVs ou SEVs e os tratamentos; **p< 0,005= diferenças significativas entre os tratamentos.

6. Discussão

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar se o inóculo das bactérias em sistema *transwell,* altera a dinâmica de macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis* (Figura 2), como forma de mimetizar uma coinfecção secundária causada por bactérias oportunísticas (neste trabalho utilizamos *P.a.* e *S.a.*) Essas bactérias são identificadas com alta frequência em lesões leishmanióticas com áreas expostas de pacientes humanos (Vera *et al.,* 2001; Fontes *et al.,* 2005; Salgado *et al.,* 2016), cães (Parin *et al.,* 2020) e nos modelos experimentais murinos (Potter *et al.,* 1983; Yehia *et al.,* 2017; Borbón *et al.,* 2019), com LC (revisado por Gallo-Francisco; Brocchi; Giorgio, 2022). As bactérias causam uma disbiose, ou seja, um desequilíbrio no ambiente lesional, quando comparada com a microbiota da pele saudável e de pacientes não infectados (Salgado *et al.,* 2016), causando efeitos que podem agravar a condição dos hospedeiros infectados.

Para isso, primeiramente, o cultivo das bactérias *P.a.* e *S.a.* foi estabelecido no laboratório em meio de cultura LB ágar com o objetivo de obtenção de colônias isoladas, e em meio LB caldo para inóculo (Sambrook; Russell, 2001).

A bactéria *P.a.* (Figura 4A) é um bacilo Gram-negativo reto não esporulante, não fermentador, móvel monotríquio, possui fímbria como importante mediador de adesão as células hospedeiras e um patógeno extracelular oportunístico. É uma das bactérias mais ubiquitárias, sendo encontrada tanto no solo como na água, em alimentos e frequentemente associada a infecções nosocomiais (Ochoa *et al.,* 2013; Gajdács *et al.,* 2021). Macroscopicamente, a bactéria *P.a.* possui crescimento de colônias iridescentes irregulares e forma uma camada de aspecto mucóide denominada como biofilme (De *et al.,* 2010). Produz um odor semelhante a uva e alguns pigmentos hidrossolúveis, como a piocianina, pioverdina, piomelanina e piorrubina, que outorga as cores azul, verde, marrom e vermelho, respectivamente, em diferentes intensidades dependendo da estirpe e do meio de cultura utilizados, características estas que são de grande importância na identificação de rotina (Huang *et al.,* 2013; Ochoa *et al.,* 2013; Gajdács *et al.,* 2021).

Classificada como um coco Gram-positivo, a bactéria *S.a.* (Figura 4B) é comensal da microbiota das fossas nasais, garganta, trato intestinal e pele de indivíduos saudáveis, e frequentemente associada a infecções pós-cirúrgicas ou oportunísticas em feridas (Ziaei; Sadeghian, 2008). Microscopicamente, é possível observar colônias em formato de cocos esféricos arranjados em forma de cachos de

uva, e macroscopicamente, apresentam colônias caracteristicamente grandes, lisas, com bordas elevadas e com uma coloração amarelo-dourada (Jardeleza *et al.,* 2011; Zajmi *et al.,* 2015). É uma bactéria não móvel, não esporulante, fermentadora do manitol, capaz de produzir biofilme, são frequentemente beta-hemolíticas, anaeróbia facultativa podendo obter energia através de metabolismo aeróbio ou por fermentação de açúcares contidos nos meios de cultura (Todd, 2014; Rasheed; Hussein, 2021).

As curvas de crescimento (Figura 5) foram conduzidas com o objetivo de analisar o tempo necessário para que a $D.O._{600nm}$ 0,6 fosse atingida. Comparamos nossos resultados com os dados da literatura em relação ao crescimento de *P.a.* Em nosso trabalho, quantificamos uma média de 3 x 10^8 UFC/mL ($D.O._{600nm}$ 0,6) (Figura 5A), após incubação dessas bactérias durante 4 h em meio de cultura LB caldo.

Dados da literatura revelaram uma quantidade ≅100 vezes menor se comparada com a quantidade obtida em nosso trabalho, com 3,8 x 10^6 UFC/mL, após 3 h de cultivo desta bactéria em meio peptonado (Huang *et al.,* 2013). Em outro estudo foram observadas quantidades consistentes com as obtidas em nosso trabalho (Figura 5A), com 10 x 10^8 UFC/mL contabilizadas após 4 h de cultivo em meio de digestão da caseína de soja (Naik; Mahajan, 2013). Com relação ao tempo para *P.a.* atingir a $D.O._{600nm}$ 0,6, constatamos um tempo igual ao observado em nosso trabalho (Figura 5A), quando essa bactéria foi cultivada em meio Mueller-Hinton (MH) (Bellemare *et al.,* 2008). Apesar da utilização de diferentes meios de cultura, os trabalhos de Huang e cols. (2013), Naik & Mahajan (2013), e Bellamare e cols. (2008), utilizaram a mesma cepa de *P.a.* que o nosso trabalho, em condições de cultivo semelhantes às nossas.

Em nosso trabalho, quantificamos uma média de 5 x 10^7 UFC/mL ($D.O._{600nm}$ 0,6) (Figura 5B), após 2 h de incubação da bactéria *S.a.* em meio de cultura LB caldo. Dados consistentes com os nossos achados, foram reportados por Romeo e cols. (2018), com quantidades médias de 1 x 10^8 UFC/mL ($D.O._{600nm}$ 0,6), após 14 h de incubação dessas bactérias em meio de cultura MH caldo. Em trabalho de Qiao e cols. (2021), foi observado um tempo de 12 h de incubação em meio de cultura LB caldo para que a bactéria atingisse a $D.O._{600nm}$ 0,6, porém, o último tempo quantificado pelos autores foi de 6 h ($D.O._{600nm}$ 0,5), com ≅5,8 x 10^6 UFC/mL. Interessantemente, Fan e outros (2019) observaram um tempo de 4 h para a bactéria atingir a $D.O._{600nm}$ 0,6, com ≅4,5 x 10^6 UFC/mL (≅10 vezes menos quando

comparado com as quantificações do nosso trabalho), quando as culturas foram incubadas em meio de cultura TSB (*tryptic soy broth*). Outros trabalhos observaram tempos iguais (Feng *et al.,* 2009) ou semelhantes – ≅1h30 (Yu *et al.,* 2008; Wang *et al.,* 2016), para a bactéria atingir a $D.O._{600nm}$ 0,6, sendo que os meios de cultura utilizados foram o MH caldo (Yu *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2009), Todd-Hewitt caldo (THB), ou BHI (*brain heart infusion*) (Wang *et al.,* 2016). Os trabalhos utilizaram a mesma bactéria que utilizamos em nosso trabalho, como cepa de referência (Yu *et al.,* 2008; Feng *et al.,* 2009; Wang *et al.,* 2016; Romeo *et al.,* 2018; Fan *et al.,* 2019; Qiao *et al.,* 2021). Com os dados obtidos em nosso trabalho, concluímos que ambas as bactérias podem exibir variações em seus respectivos perfis de crescimento, em UFC/mL, dependendo principalmente, do meio de cultura utilizado e do tempo de incubação.

Após a realização das curvas de crescimento para investigação do tempo necessário para ambas as bactérias atingirem a $D.O._{600nm}$ 0,6, utilizamos estas D.O. como parâmetro de início da fase logarítmica e para investigar a quantidade de bactérias (em UFC/mL) a serem inoculadas nos ensaios de invasão (Figuras 7 - 15), nos macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 (Figura 6). Posteriormente, prosseguimos para os ensaios de invasão das bactérias *P.a.* ou *S.a.* nos macrófagos murinos RAW 264.7, cujo objetivo foi padronizar a proporção de macrófago/bactérias ideal, assim como o tempo de co-cultivo, antes de serem testadas no sistema *transwell*, com culturas celulares previamente infectados com *L. amazonensis.* Inicialmente testamos as seguintes proporções de macrófago/bactérias: 1:5, 1:10 e 1:20 (correspondentes aos inóculos 1×10^6, 2×10^6 e 4×10^6 UFC/mL, respectivamente) nos ensaios de invasão com as bactérias *P.a.* e *S.a.* em macrófagos RAW 264.7.

O estudo de Elsinghorst (1994) descreveu um protocolo de invasão de bactérias em macrófagos, onde células epiteliais humanas foram infectadas com a enterobactéria *S. typhi*. No trabalho de Lima e cols. (2015), foram realizados ensaios de invasão em macrófagos peritoneais murinos, infectados com a mesma cepa de *P.a.* que estamos utilizamos. Para a realização dos ensaios de invasão, nos baseamos principalmente nesses dois estudos, e adaptamos para os nossos objetivos (Elsinghorst, 1994; Lima *et al.,* 2015). Na Figura 7 observa-se a quantidade de bactérias intracelulares, em UFC/mL, após a lise dos macrófagos. Na literatura foi possível encontrar variações nas proporções de macrófago/bactérias testadas e

cepas utilizadas, além de isolados clínicos de pacientes com infecção ocular, no ouvido médio (Mittal *et al.,* 2016) e trato urinário. No estudo de Lima e cols. (2015) os autores infectaram macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c nas proporções 1:2 ou 1:20 durante 90 minutos, com a mesma cepa de *P.a.* que utilizamos, e após a lise das culturas celulares, ≅8 x 10^2 UFC/mL e 10^3 UFC/mL de bactérias intracelulares foram contabilizadas, respectivamente, consistentes com a quantidade de bactérias intracelulares dos nossos achados, com macrófagos RAW 264.7 infectados com a mesma bactéria nas proporções 1:5 e 1:20, durante 1 h (Figura 7).

Em outro ensaio de invasão, testamos as proporções 1:20, 1:50 e 1:100 com o objetivo de avaliar se os macrófagos RAW 264.7 sustentariam maiores quantidades de bactérias, durante 1 h de incubação, e se as culturas celulares modificariam expressivamente a sua estrutura morfológica. Um estudo realizado com isolados clínicos de *P.a.* de pacientes com otite média, realizou ensaios de invasão em macrófagos humanos e em macrófagos de camundongos C57BL/6 (Mittal *et al.,* 2016). As proporções 1:25, 1:50 e 1:100 testadas neste estudo, exibiram 2,4 x 10^4 UFC/mL, 3 x 10^4 UFC/mL e 6 x 10^4 UFC/mL de bactérias intracelulares, respectivamente (Mittal *et al.,* 2016), enquanto em nossas quantificações, foram contabilizadas 1,8 x 10^4 UFC/mL, 2,5 x 10^4 UFC/mL e 2,3 x 10^4 UFC/mL de bactérias intracelulares (Figura 8), nas proporções 1:20, 1:50 e 1:100, respectivamente, consistentes com os achados de Mittal e cols. (2016).

Com relação aos ensaios de invasão com a bactéria *S.a.* ATCC 25923 em macrófagos RAW 264.7 (Figuras 13 - 15), os dados não revelaram diferenças significativas na quantidade de bactérias intracelulares em UFC/mL (Figura 13), entre as proporções 1:5, 1:10 ou 1:20 testadas. Após a realização da contagem de macrófagos viáveis (Figura 14), os dados revelaram diferenças significativas, entre o controle saudável e as proporções 1:5, 1:10 e 1:20 da bactéria *S.a.* No estudo de Paillard e cols. (2002), macrófagos da linhagem humana THP-1 foram infectados com a mesma cepa que utilizamos, na proporção 1:20, nos tempos de 1, 5 e 24 h. Após estes tempos, ≅1,5 x 10^5 UFC/mL, 1,5 x 10^7 UFC/mL e 1,7 x 10^8 UFC/mL, respectivamente, foram recuperadas do lisado desses macrófagos (Paillard *et al.,* 2002). Em nosso trabalho, foram recuperadas 5,4 x 10^4 UFC/mL, 7,5 x 10^4 e 6,6 x 10^4 UFC/mL, do lisado das culturas celulares expostas as proporções testadas, após 1 h de incubação com macrófagos murinos RAW 264.7. Em trabalho de Nguyen e

cols. (2006), os macrófagos THP-1 foram infectados com a mesma cepa de *S.a.* na proporção 1:2, durante 5 h. A quantidade de bactérias recuperadas do lisado dessas culturas foi 4,7 x 10^5 UFC/mL (Nguyen *et al.,* 2006), o que corresponde a 8 vezes mais bactérias, quando comparado com a quantidade de bactérias intracelulares observadas em nosso trabalho, contendo culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos a proporção 1:5 da mesma bactéria (Figura 13).

As variações observadas entre os resultados obtidos em nosso trabalho e os da literatura, podem ocorrer provavelmente, devido a fatores como diferenças na utilização da linhagem celular, diferenças de inóculos (Paillard *et al.,* 2002; Nguyen *et al.,* 2006), e do reconhecimento espécie-específico por células humanas, que facilita a invasão e replicação dessa bactéria no hospedeiro (explorado por Strobel *et al.,* 2016 e Mrochen *et al.,* 2020).

Em relação a viabilidade dos macrófagos expostos a bactéria *P.a.*, no estudo de Lima e cols. (2015), ≅250 e 150 macrófagos viáveis foram contabilizados nas culturas celulares expostas as proporções 1:2 ou 1:20, respectivamente (Lima *et al.,* 2015), enquanto em nosso trabalho, foram contabilizados 586 e 674 macrófagos viáveis nas culturas celulares expostas as proporções 1:5 ou 1:20, respectivamente (Figura 9). A viabilidade de macrófagos sem infecção não foi mostrada neste estudo, mas as fotomicrografias destas culturas, sugerem que a quantidade de células não foi afetada, quando comparada com a quantidade de macrófagos expostos a bactéria nas proporções 1:2 ou 1:20, com uma redução evidente (Lima *et al.,* 2015). Além disso, a aparência morfológica das culturas celulares expostas as proporções 1:2 ou 1:20 (Lima *et al.,* 2015), consistem com a morfologia observada nas nossas culturas de macrófagos expostas as proporções 1:5 ou 1:20 (Figura 11). Em outro estudo, foi avaliada a citotoxicidade de diferentes linhagens de células epiteliais brônquicas, expostas a diferentes cepas de *P.a.,* durante 5 h (Torres *et al.,* 2017). Quando os autores inocularam a cepa PA14 da bactéria *P.a.* com as células epiteliais brônquicas da linhagem CFBE na proporção 1:50, ≅10% dessas células foram marcadas como inviáveis por iodeto de propídeo (PI) (sendo células com a permeabilidade comprometidas) (Torres *et al.,* 2017), em nosso trabalho quantificamos 51,27% de macrófagos RAW 264.7 inviáveis (em relação ao controle saudável, sem infecção pela bactéria), quando expostos a proporção 1:50 de *P.a.* ATCC 27853 durante 1 h. Os dados da quantidade de macrófagos viáveis (Figuras 9 e 10), não consistem com os dados obtidos por Torres e cols. (2017), e apesar desta

variação entre os dados, deve-se considerar a linhagem de células epiteliais brônquicas e a diferença na cepa PA14 da mesma bactéria utilizada pelos autores, diferindo da linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 e a cepa ATCC 27853 da bactéria *P.a.* que utilizamos.

Garai e cols. (2019) avaliaram o efeito da exposição de *P.a.* das cepas PAO1 em macrófagos murinos da linhagem J774, e submeteram essas células a diferentes tempos de infecção. Os autores infectaram os macrófagos J774 na proporção 1:10 com esta bactéria, e observaram uma integridade celular conservada após 1 h de incubação, enquanto nas culturas infectadas durante 3 h, a homogeneidade da integridade celular foi menor (Garai *et al.,* 2019), consistes com as nossas observações, contendo culturas celulares infectadas com a bactéria nas proporções 1:10 ou 1:100 (Figuras 15C e 15D, respectivamente). O protocolo para invasão de *P.a.* PAO1 nos macrófagos J774, se assemelha com o protocolo utilizado em nosso trabalho e no trabalho de Lima e cols. (2015). Apesar das diferentes cepas utilizadas entre o estudo de Garai e cols. (2019) e o nosso, o tempo que esses macrófagos permaneceram íntegros podem ser reflexo dos diferentes perfis de virulência exibidos pelas estirpes. No estudo de Holban e cols. (2013), alterações expressivas foram observadas em células de linhagem humana HeLa, expostas a isolados clínicos da bactéria *P.a.* Os ensaios revelaram um dano celular evidente, e algumas bactérias no meio extracelular (Holban *et al.,* 2013), como observado em nosso trabalho (Figura 12). Os dados mostraram que o protocolo adaptado de Elsinghorst (1994) e Lima e cols. (2015) atenderam aos objetivos propostos com a realização dos ensaios de invasão deste trabalho, e a proporção de macrófago/bactérias definida, foi a de 1:20, como apresentado no tópico 5.3 do item Resultados.

Com relação a viabilidade dos macrófagos expostos a bactéria *S.a.*, no estudo conduzido por Koziel e cols. (2009), foi analisada a aparência morfológica de macrófagos RAW 264.7, expostos a cepa Newman na proporção 1:5 durante 2 h. As culturas de macrófagos do estudo dos autores mostraram-se similares com as nossas culturas celulares (Figura 15), infectadas com a proporção 1:5 durante 1 h. A porcentagem média de macrófagos RAW 264.7 viáveis, marcados como PI positivos, apresentaram uma média de 5,5 ± 4,8%, enquanto a porcentagem média dos macrófagos expostos as diferentes proporções testadas em nosso trabalho, apresentaram uma variação entre 27,92% e 39,76% macrófagos viáveis (Figuras 14

e 15).

Os ensaios conduzidos com o sistema *transwell,* teve como principal objetivo avaliar se o co-cultivo de macrófagos RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis,* e posteriormente expostos as bactérias *P.a.* ou *S.a.* em sistema *transwell* (Figuras 1 e 2), alteravam a dinâmica da infecção, através de análises quantitativas de porcentagem de infecção, número de amastigotas/macrófago infectado, IF, quantidade de macrófagos viáveis em 20 campos, e a morfologia das co-culturas celulares (Figuras 17 - 21). Dados reportados na literatura até o momento, não avaliaram a infecção com *L. amazonensis,* e exposição a bactérias de maneira sequencial, como realizamos em nosso trabalho. Sendo assim, as situações experimentais que darão efeito comparativo, são as de culturas de macrófagos infectadas com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20, sem a exposição as bactérias (Figuras 21B e 21E). A porcentagem de macrófagos infectados nessas co-culturas foi de 55,17% e 65,17% (Figura 17); e 2,88 e 3,89 amastigotas/macrófago infectado (Figura 18), respectivamente.

Dados reportados na literatura, revelaram variação quando comparados com os parâmetros analisados em nosso trabalho. No estudo de Nadaes e cols. (2020), os autores infectaram a mesma linhagem de macrófagos que utilizamos em nosso trabalho, com uma cepa diferente de *L. amazonensis* durante 24 h, e após este tempo, as culturas de macrófagos exibiram uma porcentagem média de infecção de 23%, e 1,9 amastigotas/macrófagos infectado; enquanto no tempo 48 h, as culturas exibiram uma porcentagem de infecção de 10% e 1,3 amastigotas/macrófago infectado. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados na proporção 1:3 com amastigotas isoladas de lesões ativas destes animais, exibiu uma porcentagem de infecção de ≅96%, e em média 6 amastigotas/macrófago infectado, entre os tempos de 24, 48 e 72 h (Ayres; Marcuci; Giorgio, 2007).

No estudo de Garcia e cols. (2017), os autores utilizaram a mesma linhagem de macrófagos que utilizamos em nosso trabalho, e uma cepa diferente de *L. amazonensis*, e realizaram infecção das culturas celulares na proporção 1:10 durante 48 h. Os achados deste estudo revelaram uma porcentagem média de macrófagos infectados de ≅60% e 2,4 amastigotas/macrófago infectado (Garcia *et al.,* 2017). Estes resultados sugerem, que apesar da utilização de uma cepa diferente de *L. amazonensis,* os autores obtiveram uma porcentagem média e

quantidade média de amastigotas/macrófago infectado, semelhante da encontrada em nossas quantificações, contendo culturas celulares infectadas com a mesma espécie do parasita na proporção 1:10 (Garcia *et al.,* 2017). Estes dados foram suportados por Neris e cols. (2020), onde os autores utilizaram as mesmas linhagens e cepas de macrófagos e parasitas, que utilizamos em nosso trabalho. Os dados dos autores, revelaram uma porcentagem média de macrófagos infectados de 53 ± 2,5%, e 4,5 ± 0,02 amastigotas/macrófago infectado no tempo de 24 h de infecção; e 25 ± 4,5% de macrófagos infectados e 3,2 ± 1,1 amastigotas/macrófago infectado, no tempo de 48 h de infecção (Neris *et al.,* 2020). Os dados obtidos por Garcia e cols. (2017); e Neris e cols. (2020), são consistentes com os dados obtidos em nosso trabalho (Figuras 17 e 18).

Posteriormente, a viabilidade das culturas de macrófagos foi verificada através da contagem dos mesmos (Figuras 20 e 21). Dados reportados na literatura, demonstraram que pode haver uma diminuição na viabilidade de macrófagos infectados com as espécies *L. amazonensis* ou *L. major,* dado pelo aumento de proteínas relacionadas com a via autofágica de macrófagos peritoneais de camundongos CBA, após 24 h de infecção destas culturas celulares (Dias *et al.,* 2018). As fotomicrografias reportadas por Holzmuller e cols. (2002) apresentaram uma morfologia semelhante da encontrada em nosso trabalho, nas culturas controle (contendo macrófagos sem infecção), e culturas de macrófagos infectadas com o parasita nas proporções 1:10 ou 1:20 (Figuras 21A, 21B e 21E). Diminuições significativas na quantidade de macrófagos viáveis das co-culturas infectadas com *L. amazonensis* nas proporções 1:10 ou 1:20, e expostas a bactéria *P.a.* ou *S.a.* foram observadas, e o motivo desta diminuição pode ser explicado pela migração e a subsequente presença destas bactérias em contato com os macrófagos infectados com *L. amazonensis.* Este evento pode ter diminuído a viabilidade dos macrófagos (Figuras 21C, 21D, 21F e 21G).

Após a realização dos ensaios conduzidos com o sistema *transwell*, foi constatado que estas bactérias migraram do compartimento superior para o compartimento inferior, através do microporos PES de 0,4 µm de tamanho da membrana dos insertos, evidentemente, de maneira inesperada. Fato evidenciado tanto pelo plaqueamento dos sobrenadantes das co-culturas celulares do compartimento inferior (Figura 22), quanto pelas fotomicrografias dos macrófagos infectados com o parasita, onde foi possível observar as bactérias baciliformes

Gram-negativas (correspondentes a espécie *P.a.*), e os cocos Gram-positivos (correspondentes a espécie *S.a.*) (Figura 21). O intuito da utilização do sistema *transwell,* foi estabelecer um co-cultivo das bactérias entre o compartimento superior e o inferior, desta forma, as bactérias estabeleceriam uma comunicação independente de contato físico com os macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis,* no compartimento inferior. O tamanho de ambas as bactérias em que utilizamos, são maiores do que os microporos de 0,4 µm de tamanho dos insertos que utilizamos, sendo *P.a.* com cerca de 1,5 e 3,0 µm de comprimento por 0,5 e 0,7 µm de altura (De *et al.,* 2010; Gaveau *et al.,* 2017); e *S.a.* com diâmetro entre 0,5 e 1,0 µm (Jardeleza *et al.,* 2011; Zajmi *et al.,* 2015).

No trabalho Hasegawa e cols. (2003), foi demonstrado que cepas das bactérias *Serratia marcescens, K. pneumoniae, E. coli, B. subtilis, Listeria monocytogenes*, 4 cepas de *P.a.* incluindo a ATCC 27853 e *S.a.* ATCC 25923, sendo as duas últimas cepas, as mesmas que utilizamos em nosso trabalho, podem translocar através de membranas porosas de 0,22 µm, 0,3 µm e 0,45 µm de tamanho, sob condições convencionais de filtragem a vácuo, das culturas bacterianas em suspensão em meio de cultura. Os autores demonstraram que o tempo mínimo para as bactérias *P.a.* ATCC 27853 e *S.a.* ATCC 25923 translocarem através da membrana porosa de 0,45 µm, foi 10 h e 96 h, respectivamente (Hasegawa *et al.,* 2003), e o tempo necessário para essa passagem ocorrer, foi aumentando conforme o tamanho dos microporos diminuíram, provavelmente refletido pela resposta da célula bacteriana ao tamanho dos microporos menor do que o tamanho comum da bactéria e a espessura da membrana do filtro. Dados semelhantes reportados por Gaveau e cols. (2017), demonstraram que a translocação de *E. coli* CIP 54124*, P.a.* CIP 103467*,* e *S.a.* CIP 53154 pode ocorrer através de membranas porosas de 0,4 µm de tamanho por 20 µm de espessura, durante procedimentos de filtração a vácuo das culturas bacterianas. As análises de microscopia eletrônica de varredura empregada pelos autores, evidenciaram as bactérias no momento da translocação através das membranas porosas (Hasegawa *et al.,* 2003; Gaveau *et al.,* 2017).

As bactérias *P.a.* e *S. marcescens* são conhecidas pela produção de proteinases, exoenzimas presentes no biofilme e que podem estar envolvidas na destruição de estruturas poliméricas, são possivelmente, protease alcalina ou elastases A e B (Zhu *et al.,* 2021); ou ainda, lipases PagL, LipA, EstA, peptidases

PepA, PasP, MucD, e metaloproteinase LasA, envolvidas na patogenicidade de *P.a.* (Couto *et al.,* 2015), e que provavelmente, permitem a passagem das bactérias através de membranas porosas (Hasegawa *et al.,* 2003). Novos estudos são necessários para elucidação das moléculas responsáveis pela destruição dessas estruturas poliméricas.

No trabalho de Gaveau e cols. (2017), foi proposto um modelo de transferência das bactérias através das membranas porosas, assumindo que a seletividade da membrana sob as bactérias é controlada principalmente, por um mecanismo de deformação substancial do alongamento celular, permitindo que bactéria penetre dentro dos microporos cilíndricos de diâmetro de 0,4 µm de tamanho, e então, migre através do filtro. Esse modelo proposto compara a força motriz fornecida pelo processo de filtração (devido ao gradiente de pressão sob a membrana) e a força necessária para alongar o envelope bacteriano que define a entrada da bactéria dentro do poro, propondo desta forma, uma explicação para o mecanismo de plasticidade das bactérias (Gaveau *et al.,* 2017).

De acordo com os resultados obtidos com as nossas condições experimentais (Figuras 1, 2, 17 - 22), sugerimos as seguintes possíveis variáveis para explicar a translocação das bactérias *P.a.* e *S.a.* pelos microporos de 0,4 µm de tamanho do sistema *transwell*: o meio de cultura RPMI-1640 suplementado com SFB, fornece um ambiente nutritivo que pode ter viabilizado a disseminação e crescimento das bactérias sob a monocamada de macrófagos RAW 264.7 previamente infectados com *L. amazonensis*; as bactérias foram inoculadas no sistema *transwell* em sua fase logarítmica de crescimento ($D.O._{600nm}$ 0,6), o que pode ter facilitado a sua proliferação no meio de cultura dos macrófagos; as bactérias foram capazes de proliferar sob os macrófagos infectados com o parasita, resultando no efeito observado nos nossos ensaios (Figuras 21 e 22). De acordo com os mecanismos propostos pelos autores (Gaveau *et al.,* 2003; Hasegawa *et al.,* 2017) para explicar a translocação bacteriana, há um possível envolvimento conjunto de fenômenos e processos físico-químico-biológicos, tais como as hipóteses das proteinases de bactérias presentes no biofilme bacteriano (Couto *et al.,* 2015), que podem estar envolvidas na degradação de polímeros, e o mecanismo de deformação e alongamento da bactéria.

Posto isto, como alternativa para avaliar a influência da presença de bactérias durante a infecção de macrófagos com *L. amazonensis,* optamos por

utilizar as POMVs e SEVs, como forma de mimetizar a presença destes micro-organismos nas co-culturas celulares. Desta forma, as POMVs e SEVs foram isoladas, purificadas e caracterizadas quanto ao seu diâmetro e concentração, em quantidade de partículas/mL. Os ensaios de macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 infectados com *L. amazonensis* e inoculados com as POMVs ou SEVs foram conduzidos, e posteriormente, não observamos contaminações por bactérias nas culturas celulares, com a utilização destas estruturas bacterianas (Figuras 32 e 34). As POMVs e SEVs utilizadas nesse trabalho, representam um sistema de secreção bacteriana extremamente sofisticado, que permite que as bactérias transportem uma ampla variedade de compostos ou estruturas e, portanto, facilitam a rápida adaptação das populações microbianas a mudanças nas condições ambientais ou proteção contra fatores adversos (Toyofuku; Nomura; Eberl, 2019).

Dados reportados na literatura, mostraram variações nos diâmetros de POMVs (Siqueira *et al.,* 2014; Couto *et al.,* 2015; Bitto *et al.,* 2021; Augustyniak; Olszak; Drulis-Kawa, 2022). Em nosso trabalho, o diâmetro médio das POMVs obtidas foi 124,1 nm (Figuras 23A, 24A e 26A). Diferenças foram notadas no tamanho das OMVs de isolados clínicos de *P.a.,* apresentando um diâmetro de ≅50 nm (Siqueira *et al.,* 2014), e as vesículas da cepa PAO1 da mesma bactéria, apresentaram um diâmetro variando entre 25 – 85 nm (Couto *et al.,* 2015; Pérez-Cruz *et al.,* 2015; Metruccio *et al.,* 2016; Hadadi-Fishani *et al.,* 2021; Augustyniak; Olszak; Drulis-Kawa, 2022). Dados semelhantes com os achados do nosso trabalho (Figura 23A) foram encontrados, com diâmetros das OMVs de ≅150 nm da cepa PAO9505 (Bitto *et al.,* 2021), e 180 nm da cepa PAO1 (Ayed *et al.,* 2019; Zhang *et al.,* 2020; Paulsson *et al.,* 2021) de *P.a.* Com relação à concentração de vesículas em suspensão, em nosso trabalho, foram quantificadas 3,88 x 10^{11} partículas/mL (Figura 23A), em outros estudos utilizando diferentes cepas, foram quantificadas ≅5,9 x 10^{9} OMVs/mL (Zhang *et al.,* 2020), 5 x 10^{8} OMVs/mL (Paulsson *et al.,* 2021), e 8 x 10^{9} OMVs/mL de *P.a.* (Bitto *et al.,* 2021).

Os dados da literatura apresentaram variações quando comparado com os obtidos em nosso trabalho. O diâmetro médio das SEVs obtidas em nosso trabalho foi 180,6 nm (Figuras 23B, 24B e 26B); no trabalho de Gurung e cols. (2011), foi utilizada a mesma cepa de *S.a.* e meio de cultura (ATCC 25923 e LB caldo, respectivamente), e o tamanho das vesículas obtidas pelos autores atingiram tamanho médio semelhante do encontrado em nosso trabalho (Figura 23B), de 130

nm. O primeiro relato de secreção de EVs por *S.a.* foi reportado com a cepa ATCC 14458, e as vesículas desta cepa apresentaram um tamanho médio de 100 nm (Lee *et al.,* 2009), dados confirmados posteriormente por Hong e cols. (2011), utilizando a mesma cepa. No estudo de Luz e cols. (2022), observou-se o mesmo diâmetro do observado por Lee e cols. (2009) e Hong e cols. (2011), com a cepa HG003 de *S.a.* A cepa JE2 da mesma bactéria, exibiu a produção de EVs com um diâmetro médio de 90 nm (Wang *et al.,* 2018). Foi demonstrado experimentalmente, que o meio de cultura utilizado pode influenciar na distribuição de tamanhos das EVs produzidas por *S.a.* MSSA476 (Askarian *et al.,* 2018). Neste estudo, os autores observaram que as bactérias cultivadas em meio LB exibiram EVs duas vezes maiores (46,6 ± 5,9 nm) do que as EVs obtidas do cultivo em meio de cultura BHI (24,4 ± 2,8 nm) (Askarian *et al.,* 2018). A quantidade de SEVs encontrada em nosso trabalho, coincide com dados de Luz e cols. (2022), onde as EVS da cepa HG003 de *S.a.,* revelaram uma quantidade de 1,3 x 10^{11} partículas/mL, enquanto em nosso trabalho, quantificamos 4,15 x 10^{11} partículas/mL (Figura 23B). No estudo de Wang e cols. (2018) foram quantificadas 1,5 x 10^{6} partículas/mL da cepa JE2 da mesma bactéria.

Com base nas comparações dos dados da literatura com os dados obtidos em nosso trabalho, sugerimos que as condições de cultivo a que as bactérias foram submetidas, interfere diretamente no perfil de produção de vesículas e concentração de proteínas (Figura 25), podendo-se destacar como o principal fator destas variações, a utilização de diferentes cepas de bactérias (isolados clínicos ou cepas de coleções), estágio de proliferação (inicial, logarítmico, estacionário ou em declínio), utilização de diferentes meios de culturas (BHI, LB, MH, TSA, TSB), temperatura e pH, adição de antibióticos (Siqueira *et al.,* 2014; Wang *et al.,* 2018; Hadadi-Fishani *et al.,* 2021), tamanho das vesículas que atravessam o filtro seletivamente durante o processo de isolamento, utilização de mutantes hipervesiculados ou deficientes em síntese de proteínas. Segundo Bitto e cols. (2021), a concentração de proteínas das vesículas inferida pelo método de Bradford, varia significativamente entre os ensaios de proteína utilizados (Lowry, BCA (*bicinchoninic acid assay*), ou Qubit), e mesmo em um mesmo ensaio podem ocorrer variações nas quantificações de proteínas de vesículas produzidas por diferentes espécies bacterianas.

Os dados de nosso trabalho mostraram, que quando culturas de macrófagos RAW 264.7 incubadas com POMVs ou SEVs durante 24 h, sem

infecção pelo parasita, a viabilidade não foi prejudicada, com exceção das culturas de macrófagos expostas as POMVs na proporção 1:1, que exibiram uma quantidade de macrófagos significativamente menor (Figura 30). Apesar da viabilidade não ter sido prejudicada, a estrutura morfológica das culturas celulares expostas as POMVs ou SEVs foi alterada consideravelmente (Figura 32), quando comparada com a morfologia de macrófagos sem infecção pelo parasita e sem exposição a essas vesículas (Figura 32A). Às alterações morfológicas observadas (Figura 32), sugerimos que os PAMPs contidos no interior dessas vesículas, tenham interagido com os receptores de superfície dos macrófagos (como TLRs), que desencadeiam um comprometimento da homeostase celular e resposta inflamatória como consequência (Figuras 36 e 37) (Askarian *et al.,* 2018; Bittel *et al.,* 2021). Foi demonstrado que OMVs de *N. gonorrhoeae,* incubadas com macrófagos derivados da medula óssea de camundongos da linhagem C57BL/6, induzem a alterações morfológicas, após 32 h de incubação com esta bactéria Gram-negativa (Deo *et al.,* 2020). No trabalho de Deo e cols. (2020), foi evidenciada uma diminuição na viabilidade das culturas celulares através da intensidade de marcadores específicos para caspases-3/7 ativas (*CellTracker Green*), DNA danificado (DRAQ7) e para o potencial de membrana mitocondrial comprometido (TMRM - *tetramethylrhodamine methyl ester*). Em outro estudo conduzido com macrófagos da linhagem J774A.1 incubados com EVs de *Rhodococcus equi* durante 1 h*,* foram evidenciadas alterações morfológicas destas culturas celulares, quando comparadas com as culturas do controle, sem exposição as vesículas (Xu *et al.,* 2022).

Os monócitos e macrófagos são células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear) conhecidos por modular a resposta imune do hospedeiro contra infecções através da fagocitose, apresentação de antígeno, e produção de mediadores inflamatórios, como NO e citocinas (Kaparakis-Liaskos & Ferrero, 2015; Xue *et al.,* 2018). Culturas celulares têm mostrado altas concentrações de iNOS (óxido nítrico sintase) e citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF-α, IL-8, IL-6, and MIP-1α (*Macrophage Inflammatory Protein*-1α), que servem para promover a inflamação e recrutar mais células do sistema imune até o sítio da infecção/injúria. A família da IL-1 é um contribuinte significante para a inflamação e modulação do perfil de resposta, e a sua maturação e secreção é mediada por complexos multiproteicos denominados como inflamassomos, que são encontrados no citosol de células mieloides (Martinon; Burns; Tschopp*,* 2002). As vesículas bacterianas são

conhecidas por se ligarem a células de mamíferos e serem rapidamente internalizadas, entregando PAMPs tanto para a superfície celular, como para os receptores citosólicos (Ellis; Leiman; Kuehn, 2010). Existem muitas classes de inflamassomos, incluindo subconjuntos NLRP1, NLRP3 e NLRC4 (NLR contendo domínio CARD – *Caspase Activation and Recruitment Domain*), dos quais o NLRP3 é o mais estudado (He; Hara; Núñez, 2016).

Em estudo de Xu e cols. (2022), macrófagos J774A.1 incubados com EVs de *R. equi*, foi demonstrado que a internalização dessas vesículas desencadeia uma resposta inflamatória mediada pelas vias TLR2, NF-kB (*Nuclear transcription Factor-Kappa B*), e MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*), devido aos componentes imunoestimulatórios que as vesículas dessa bactéria exerceram nas culturas celulares (Xu *et al.,* 2022). No estudo de Deo e cols. (2020), foi demonstrado que OMVs de *N. gonorrhoeae, E. coli* e *P.a.,* incubadas com os macrófagos derivados da medula, induzem regulação positiva de proteínas apoptóticas BAX (BCL-2 (*B Cell Lymphoma 2*) *associated X Protein*) e BAK (*BCL-2 Antagonistic Killer*). Como consequência, essas proteínas desencadeiam uma disfunção mitocondrial, ativação das caspases-3/7 e inflamassoma NLRP3, alta produção das citocinas inflamatórias IL-1β e TNF-α e apoptose destes macrófagos (Deo *et al.,* 2020). Dados consistentes com os achados de Xu e cols. (2022), e Deo e cols. (2020), foram observados com linhagens de células epiteliais brônquicas humanas e OMVs de *P.a.* cepa PA14 (Bomberger *et al.,* 2009). De acordo com o modelo proposto por estes autores, as OMVs dessa cepa de *P.a.* se difundem com a membrana da célula hospedeira, e liberam fatores de virulência de maneira dependente da via dos filamentos de actina, e por consequência, são capazes de induzir alta citotoxicidade conferida por Cif (*Cycle Inhibiting Factor*), fosfatase alcalina e β-lactamase, após 24 h de incubação com essas vesículas (Bomberger *et al.,* 2009).

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos RAW 264.7 expostos as POMVs ou SEVs durante 24 h, sem infecção pelo parasita, foram coletados e armazenados para as quantificações de nitrito e citocinas (Figuras 36 - 38). A produção de nitrito das culturas celulares expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 durante 24 h, exibiram concentrações médias de 0,084 µM, 0,090 µM e 0,121 µM, respectivamente (Figura 36A). Dados reportados na literatura sugerem que o NO pode ser regulado por citocinas, dependendo de sua concentração (Xue *et al.,* 2018). Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura reportando

quantificação de nitrito em culturas celulares expostas a POMVs ou SEVs, para efeito comparativo. Dados da literatura demonstraram que o inóculo de *P.a.* PAO1 em macrófagos alveolares da linhagem MH-S, induziu uma produção de ≅38 µM deste mediador inflamatório nas culturas infectadas com esta bactéria na proporção 1:10 (Li *et al.,* 2015). Em outro estudo, foi reportada a produção de nitrito em culturas de macrófagos RAW 264.7 expostas a 50 µg/mL de OMVs de *Porphyromonas gengivalis* W83 durante 12 h (Imayoshi; Cho; Kaminishi, 2011). Após este tempo de incubação das culturas celulares com estas vesículas, a concentração de nitrito foi de ≅5 pmol (picomol). A partir dos resultados obtidos por estes estudos, podemos concluir que culturas celulares expostas a bactérias inteiras (Li *et al.,* 2015), ou mesmo OMVs produzidas por Gram-negativas (Imayoshi; Cho; Kaminishi (2011), são capazes de induzir uma resposta celular mediada por iNOS, como um possível mecanismo efetor para combater infecção ou exposição a produtos microbianos, com potencial imunogênico e imunoestimulatório (Ellis *et al.,* 2010; Couto *et al.,* 2015).

Com relação à produção de nitrito das culturas celulares expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 durante 24 h, nossos resultados exibiram concentrações médias de 0,082 µM, 0,082 µM e 0,086 µM, respectivamente, (Figura 36A). Dados da literatura demonstraram que as EVs de *S.a.* podem carregar e transportar importantes fatores de sobrevivência e virulência bacteriana, como β-lactamases, toxinas e proteínas associadas à adesão bacteriana às células hospedeiras, que podem desencadear a produção de citocinas e promover inflamação tecidual (Gómez-Chávez *et al.,* 2021). Foi demonstrado que as enzimas catalase e superóxido dismutase presentes nas EVs de *S. epidermidis* ATCC12228 podem participar da atenuação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Gómez-Chávez *et al.,* 2021), bem como a regulação negativa deste importante mediador microbicida, por citocinas (Xue *et al.,* 2018). Nossos dados mostram conclusivamente, que a produção de nitrito tanto pelas culturas de macrófagos RAW 264.7 expostas as SEVs, quanto pelas culturas expostas as POMVs, houve uma baixa produção deste mediador (Figura 36A). A resposta inflamatória dessas culturas celulares pode ter ocorrido através de outros mecanismos efetores, como produção de citocinas (Figura 37), como demonstrado por outros trabalhos da literatura (Gurung *et al.,* 2011; Holban *et al.,* 2013; Askarian *et al.,* 2018; Wang *et al.,* 2018).

As culturas de macrófagos expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 durante 24 h, sem infecção prévia pelo parasita (Figuras 32B - 32D e 37), revelaram concentrações médias de 21.362,2 pg/mL, 20.171 pg/mL e 15.576,8 pg/mL, respectivamente, da citocina TNF-α (Figura 37A); e 2,41 pg/mL, 6,93 pg/mL e 27,80 pg/mL, respectivamente, da citocina IL-1β (Figura 37D). As culturas celulares expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100 durante 24 h, sem infecção prévia pelo parasita (Figuras 32E - 32G e 37), exibiram concentrações médias de 8.599 pg/mL, 13.828,7 pg/mL e 16.291,6 pg/mL, respectivamente, da citocina TNF-α (Figura 37A); e 1,86 pg/mL, 2,84 pg/mL e 2,65 pg/mL, respectivamente, da citocina IL-1β (Figura 37D). Nossos dados não são consistentes com os reportados por Deo e cols. (2020), com concentrações médias de ≅460 pg/mL de TNF-α, e ≅180 pg/mL de IL-1β. Este fato pode estar associado provavelmente, devido às diferentes variáveis empregadas pelos autores, como a utilização de macrófagos derivados da medula de camundongos, e POMVs da cepa K (Deo *et al.,* 2020). Outros trabalhos apresentaram variações na produção de citocinas, quando foram utilizadas linhagens de macrófagos J774A.1, e EVs da bactéria Gram-positiva *R. equis* (Xu *et al.,* 2022).

Com relação as co-culturas de macrófagos RAW 264.7 incubadas com as POMVs e SEVs durante 24 h com macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis,* os dados sugerem uma interferência na porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas/macrófago infectado, IF, viabilidade e na estrutura morfológica das células (Figuras 27 - 29, 33, 34, respectivamente). Os fatores de virulência dessas vesículas, podem induzir uma resposta celular inflamatória exacerbada, ativando vias apoptóticas de macrófagos infectados pelo parasita. Em conclusão, nossos dados mostram que as POMVs ou SEVs incubadas em co-culturas de macrófagos RAW 264.7 previamente infectadas com *L. amazonensis,* levou a reduções significativas no número de amastigotas e IF (Figuras 28 e 29, respectivamente), sugerimos que o mecanismo leishmanicida pode não ter sido iNOs-dependente (Figura 36B), mas sim, através de outros mecanismos efetores relacionados a TNF-α, IL-6 e IL-1β (Figura 38).

Em nosso trabalho, as concentrações de nitrito das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, exibiram concentrações médias de 0,101 µM, 0,101 µM e 0,080 µM, respectivamente (Figura 36B). As concentrações médias de produção de nitrito das

co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as SEVs nas proporções 1:1, 1:10 ou 1:100, foi de 0,078 µM, 0,081 µM e 0,083 µM, respectivamente, (Figura 36B). Apesar das concentrações significativamente maiores de nitrito das co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs nas proporções 1:10 ou 1:100, quando comparados com as concentrações de nitrito das co-culturas de macrófagos infectadas pelo parasita e expostas as SEVs nas mesmas proporções, constatamos que estas co-culturas celulares exibiram uma baixa produção deste mediador, e que provavelmente houve uma influência direta da presença das vesículas nessas co-culturas (Figura 36B). Fato suportado pelas co-culturas infectadas pelo parasita, sem exposição as vesículas, que exibiram níveis significativamente maiores, quando comparados com os níveis de nitrito das co-culturas que foram infectadas pelo parasita e expostas as vesículas em diferentes proporções (Figura 36B).

No estudo de Neris e cols. (2020) foi reportada a produção de nitrito em co-culturas de macrófagos apenas infectadas com *L. amazonensis,* ou estimuladas com LPS 100 ng/mL, sem exposição a vesículas de bactérias. Em trabalho de Linares e outros (2000), culturas de macrófagos peritoneais estimuladas antes ou depois da infecção por *L. amazonensis* com LPS 10 ng/mL ou IFN-γ 100 U/mL, exibiram produção de nitrito. Dados semelhantes foram obtidos por Degrossoli e cols. (2007) em macrófagos da linhagem da J774 estimulados com LPS ou IFN-γ. Como discutido anteriormente, não há dados reportados na literatura de infecção de co-culturas celulares com o parasita e exposição as POMVs ou SEVs, como realizamos em nossos ensaios. De fato, nossos dados de produção de citocinas (Figura 38), mostram que essas culturas celulares infectadas pelo parasita e expostas as vesículas, exibiram um perfil inflamatório mediado por citocinas. Em relação à produção de citocinas, observamos um perfil inflamatório, suportado pela concentração de TNF-α, IL-6 e IL-1β (Figura 38A, 38B e 38D, respectivamente), especialmente nas co-culturas celulares infectadas com *L. amazonensis* e expostas as POMVs nas proporções 1:1 ou 1:10 (Figura 38).

Concluímos que há uma possível polarização da resposta de macrófagos infectados para um perfil inflamatório do tipo M1, induzido pela presença das POMVs ou SEVs. E apontam para uma influência na dinâmica de infecção desses macrófagos infectados com *L. amazonensis.* Evidentemente, as POMVs e SEVs exercem um papel na ativação tanto de macrófagos não infectados, quanto de

macrófagos infectados pelo parasita, pois estas estruturas conhecidamente carregam e entregam o seu conteúdo imunogênico para o interior da célula hospedeira (Bitto *et al.,* 2017). Essas vesículas podem servir futuramente como importantes candidatos vacinais, desde que a sua caracterização físico-química-biológica seja feita, bem como a seleção de componentes imunoestimulatórios e imunogênicos, para a geração de uma imunidade de memória efetora.

Prospecções futuras incluem a investigação do conteúdo no interior das POMVs (Choi *et al.,* 2011; Couto *et al.,* 2015), SEVs (Lee *et al.,* 2009), EVs de *L. amazonensis* e de macrófagos, através de técnicas como MALDI-ToF-MS (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass Spectrometry*), que podem auxiliar nas investigações acerca da composição de vesículas de membrana, como importantes alvos para utilização de plataformas vacinais (Gurung *et al.,* 2011; Askarian *et al.,* 2018; Irene *et al.,* 2019).

7. Conclusão

Portanto, com base nos dados coletados, pode-se concluir que:

- O cultivo das bactérias *P.a.* ATCC 27853 e *S.a.* ATCC 25923 foi satisfatoriamente estabelecido nos meios de cultura LB ágar e LB caldo;
- Foram realizadas as curvas de proliferação das bactérias *P.a.* e *S.a.*, e o tempo para ambas atingirem a $D.O._{600nm}$ 0,6 foi determinado;
- Os ensaios de invasão das bactérias *P.a.* ou *S.a.*, em macrófagos murinos RAW 264.7 foram conduzidos, e a proporção de macrófago:bactérias foi determinada satisfatoriamente;
- A translocação das bactérias *P.a.* e *S.a.*, durante a realização dos ensaios de infecção de macrófagos RAW 264.7 com *L. amazonensis* em sistema *transwell*, foi confirmada após plaqueamento dos sobrenadantes das co-culturas celulares e a visualização das bactérias sob o microscópio;
- Foi realizado o isolamento e purificação de POMVs e SEVs. Os dados do tamanho e quantidade das vesículas são consistentes com os dados reportados na literatura;
- Os tamanhos das POMVs e SEVs foram confirmados por microscopia eletrônica de transmissão, e são consistentes com tamanhos de POMVs e SEVs reportados na literatura;

- Os ensaios de exposição as POMVs e SEVs em macrófagos previamente infectados com *L. amazonensis*, demonstraram que houve diminuição significativa na porcentagem de macrófagos infectados;
- Os dados sugerem que houve uma diminuição significativa na quantidade de macrófagos viáveis, nas situações experimentais com culturas celulares infectadas com o parasita, e posteriormente expostas as POMVs ou SEVs;
- Os dados são sugestivos para um possível envolvimento das vias dos inflamassomas (NLRP) e da cascata das caspases, na diminuição da viabilidade dos macrófagos expostos as vesículas de POMVs ou SEVs;
- As vesículas são capazes de desencadear produção da citocina inflamatória IL-1β e TNF-α (inflamatórias).

8 Referências

Abadi AH, Mahdavi M, Khaledi A, Esmaeili SA, Esmaeili D, Sahebkar A. Study of serum bactericidal and splenic activity of Total-OMP-CagA combination from *Brucella abortus* and *Helicobacter pylori* in BALB/c mouse model. *Microb Pathog,* 121: 100 - 5, 2018.

Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. *Health Sci J,* 11(4): 519, 2017.

Antonio LF, Lyra MR, Saheki MN, Schubach AO, Miranda L, Madeira MF, Lourenço M, Fagundes A, Ribeiro É, Barreto L, Pimentel M. Effect of secondary infection on epithelialisation and total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(9): 640 - 46, 2017.

Araújo AP, Giorgio S. Immunohistochemical evidence of stress and inflammatory markers in mouse models of cutaneous leishmaniosis. *Arch Dermatol Res,* 307(8): 671 - 82, 2015.

Arrais-Silva WW, Collhone MC, Ayres DC, de Souza Souto PC, Giorgio, S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Int,* 54(1): 1 - 7, 2005.

Arrais-Silva WW, Pinto EF, Rossi-Bergmann B, Giorgio S. Hyperbaric oxygen therapy reduces the size of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissue lesions in mice. *Acta Trop,* 98(2), 130 - 36, 2006.

Aruleba RT, Carter KC, Brombacher F, Hurdayal R. Can We Harness Immune Responses to Improve Drug Treatment in Leishmaniasis? *Microorganisms*, 8(7): 1069, 2020.

Askarian F, Lapek JD Jr, Dongre M, Tsai CM, Kumaraswamy M, Kousha A, Valderrama JA, Ludviksen JA, Cavanagh JP, Uchiyama S, Mollnes TE, Gonzalez DJ, Wai SN, Nizet V, Johannessen M. *Staphylococcus aureus* Membrane-Derived Vesicles Promote Bacterial Virulence and Confer Protective Immunity in Murine Infection Models. *Front Microbiol,* 9: 262, 2018.

Augustyniak D, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of *Pseudomonas aeruginosa* Provide Passive Resistance but Not Sensitization to LPS-Specific Phages. *Viruses,* 14(1): 121, 2022.

Avila-Calderón ED, Lopez-Merino A, Jain N, Peralta H, López-Villegas EO, Sriranganathan N, Boyle SM, Witonsky S, Contreras-Rodríguez A. Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. *Clin Dev Immunol,* 2012: 352493, 2012.

Avila-Calderón ED, Araiza-Villanueva MG, Cancino-Diaz JC, López-Villegas EO, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A. Roles of bacterial membrane vesicles. *Arch Microbiol,* 197(1): 1 - 10, 2015.

Ayed Z, Cuvillier L, Dobhal G, Goreham RV. Electroporation of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* with gold nanoparticles. *SN Appl Sci,* 1: 1600, 2019.

Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis. Mem Inst Oswaldo Cruz,* 102(2): 215 - 20, 2007.

Ayres DC, Fedele TA, Marcucci MC, Giorgio S. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. *Rev Inst Med Trop S Paulo,* 53(6): 329 - 34, 2011.

Barbosa AM, Costa SS, Rocha JR, Montanari CA, Giorgio S. Evaluation of the leishmanicidal and cytotoxic effects of inhibitors for microorganism metabolic pathway enzymes. *Biomed Pharmacother*, 74: 95 - 100, 2015.

Bates PA. Revising Leishmania’s life cycle. *Nat Microbiol,* 3(5): 529 - 30, 2018.

Batista JH, Leal FC, Fukuda TTH, Alcoforado Diniz J, Almeida F, Pupo MT, da Silva Neto JF. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. *Environ Microbiol*, 22(6): 2432 - 42, 2020.

Bayer ME, Anderson TF. The surface structure of *Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A,* 54(6): 1592 – 9, 1965.

Beheshti M. Therapeutic and Adverse Effects of Glucantime Used for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Shiraz E-Med J*, 8(4): 155 - 61, 2007.

Bellemare A, Vernoux N, Morisset D, Bourbonnais Y. Human pre-elafin inhibits a *Pseudomonas aeruginosa*-secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(2): 483 - 90, 2008.

Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science,* 343(6167): 183 - 86, 2014.

Bittel M, Reichert P, Sarfati I, Dressel A, Leikam S, Uderhardt S, Stolzer I, Phu TA, Ng M, Vu NK, Tenzer S, Distler U, Wirtz S, Rothhammer V, Neurath MF, Raffai RL, Günther C, Momma S. Visualizing transfer of microbial biomolecules by outer membrane vesicles in microbe-host-communication in vivo. *J Extracell Vesicles*, 10(12): e12159, 2021.

Bitto NJ, Chapman R, Pidot S, Costin A, Lo C, Choi J, D'Cruze T, Reynolds EC, Dashper SG, Turnbull L, Whitchurch CB, Stinear TP, Stacey KJ, Ferrero RL. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep,* 7: 7072, 2017.

Bitto, N. J., Zavan, L., Johnston, E. L., Stinear, T. P., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. Considerations for the Analysis of Bacterial Membrane Vesicles: Methods of Vesicle Production and Quantification Can Influence Biological and Experimental Outcomes. *Microbiol Spectr,* 9(3): e0127321, 2021.

Bladen HA, Waters JF. Electron microscopic study of some strain of Bacteroides. *J Bacteriol,* 86(6): 1339 - 44, 1963.

Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA, Ye S, O'Toole GA, Stanton BA. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog,* 5(4): e1000382, 2009.

Borbón TY, Scorza BM, Clay GM, Lima Nobre de Queiroz F, Sariol AJ, Bowen JL, Chen Y, Zhanbolat B, Parlet CP, Valadares DG, Cassel SL, Nauseef WM, Horswill AR, Sutterwala FS, Wilson ME. Coinfection with *Leishmania major* and

Staphylococcus aureus enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A. *PLoS Negl Trop Dis,* 13(5): e0007247, 2019.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* 72(1-2): 248 - 54, 1976.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet,* 392(10151): 951 - 70, 2018.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop,* 56(4): 315 - 25, 1994.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec,* 141(21): 539 - 43, 1997.

Chatterjee SN, Das J. Electron microscopic observations on the excretion of cell-wall material by Vibrio cholerae. *J Gen Microbiol,* 49(1): 1 - 11, 1967.

Choi DS, Kim DK, Choi SJ, Lee J, Choi JP, Rho S, Park SH, Kim YK, Hwang D, Gho YS. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa. Proteomics.* 11(16): 3424 - 9, 2011.

Christensen SM, Belew AT, El-Sayed NM, TafuriWL, Silveira FT, Mosser DM. Host and parasite responses in human diffuse cutaneous Leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis,* 13(3): e0007152, 2019.

Colhone MC, Arrais-Silva WW, Picoli C, Giorgio S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis. J Parasitol,* 90(3): 510 - 5, 2004.

Corning. Transwell permeable supports – Instructions for Use. Patent number 5,026,649. Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001, USA. Printed in USA, 2007. Disponível em: <http://www.corning.com/catalog/cls/documents/protocols/Transwell_InstructionManual.pdf>.

Couto N, Schooling SR, Dutcher JR, Barber J. Proteome Profiles of Outer Membrane Vesicles and Extracellular Matrix of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Proteome Res*, 14(10): 4207-22, 2015.

De D, Mandal SM, Gauri SS, Bhattacharya R, Ram S, Roy SK. Antibacterial effect of lanthanum calcium manganate (La0.67Ca0.33MnO3) nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J Biomed Nanotechnol*, 6(2): 138 - 144, 2010.

De Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e Dor. *Rev Bras Anestesiol*, 61(2): 255 - 65, 2011.

Degrossoli A, Bosetto MC, Lima CB, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis. Immunol Lett,* 114(2): 119 - 25, 2007.

Degrossoli A, Giorgio S. Functional alterations in macrophages after hypoxia selection. *Exp Biol Med (Maywood),* 232(1): 88 - 95, 2007.

Degrossoli, A; Arrais-Silva, WW; Colhone, MC; Gadelha, FR; Joazeiro, PP; Giorgio, S. The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. *Scand J Immunol,* 74(2): 165 - 75, 2011.

Deo P, Chow SH, Han ML, Speir M, Huang C, Schittenhelm RB, Dhital S, Emery J, Li J, Kile BT, Vince JE, Lawlor KE, Naderer T. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation. *Nat Microbiol,* 5: 1418 - 27, 2020.

Dey R, Joshi AB, Oliveira F, Pereira L, Guimarães-Costa AB, Serafim TD, de Castro W, Coutinho-Abreu IV, Bhattacharya P, Townsend S, Aslan H, Perkins A, Karmakar S, Ismail N, Karetnick M, Meneses C, Duncan R, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Kamhawi S. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1β. *Cell Host Microbe,* 23(1): 134 - 43.e6, 2018.

Dias BRS, de Souza CS, Almeida NJ, Lima JGB, Fukutani KF, Dos Santos TBS, França-Cost J, Brodskyn CI, de Menezes JPB, Colombo MI, Veras PST. Autophagic

Induction Greatly Enhances *Leishmania major* Intracellular Survival Compared to *Leishmania amazonensis* in CBA/j-Infected Macrophages. *Front Microbiol,* 9: 1890, 2018.

Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*, 67(11): 2576 - 97, 2012.

Doudi M, Setorki M, Narimani M. Bacterial superinfection in Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. *Med Sc Monit,* 18(9): BR356 - 61, 2012.

El Andaloussi S, Maeger I, Breakefield XO, Wood MJA. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5): 348 - 58, 2013.

Ellis TN, Leiman SA, Kuehn MJ. Naturally produced outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* elicit a potent innate immune response via combined sensing of both lipopolysaccharide and protein components. *Infect Immun*, 78(9): 3822 - 31, 2010.

el-On J, Sneier R, Elias E. *Leishmania major*: bacterial contamination of cutaneous lesions in experimental animals. *Isr J Med Sci,* 28(12): 847 - 51, 1992.

el-Safi SH, Peters W, el-Toam B, el-Kadarow A, Evans DA. Studies on the leishmaniases in the Sudan. 2. Clinical and parasitological studies on cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(4): 457 - 64, 1991.

Elsinghorst EA. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol,* 236: 405 - 20, 1994.

Endris M, Takele Y, Woldeyohannes D, Tiruneh M, Mohammed R, Moges F, Lynen L, Jacobs J, van Griensven J, Diro E. Bacterial sepsis in patients with visceral leishmaniasis in Northwest Ethiopia. *BioMed Res Int,* 2014, 1 - 7, 2014.

Edrissian GH, Mohammadi M, Kanani A, Afshar A, Hafezi R, Ghorbani M, Gharagozloo AR. Bacterial infections in suspected cutaneous leishmaniasis lesions. *Bull World Health Organ,* 68(4): 473 - 77, 1990.

Fan Q, Yan C, Shi C, Xu Y, Ma Y, Zhang C, Peng X, Xia X. Inhibitory Effect of Coenzyme Q0 on the Growth of *Staphylococcus aureus. Foodborne Pathog Dis,* 16(5): 317 - 24, 2019.

Feng H, Xiang H, Zhang J, Liu G, Guo N, Wang X, Wu X, Deng X, Yu L. Genome-wide transcriptional profiling of the response of *Staphylococcus aureus* to cryptotanshinone. *J Biomed Biotechnol,* 2009: 617509, 2009.

Fontes CO, Carvalho MAR, Nicoli JR, Hamdan JS, Mayrink W, Genaro O, Carmo LS, Farias LM. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Micro-Organisms Recovered From Cutaneous Lesions of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *J Med Microbiol,* 54(11): 1071 - 76, 2005.

Furuyama N, Sircili MP. Outer Membrane Vesicles (OMVs) Produced by Gram-Negative Bacteria: Structure, Functions, Biogenesis, and Vaccine Application. *Biomed Res Int*, 2021: 1490732, 2021.

Gajdács M, Baráth Z, Kárpáti K, Szabó D, Usai D, Zanetti S, Donadu MG. No Correlation between Biofilm Formation, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a Laboratory-Based In Vitro Study. *Antibiotics (Basel),* 10(9): 1134, 2021.

Gallo-Francisco, PH; Giorgio, S. A cell-culturing system for the study of interaction between macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Trop Pathol*, 48(2): 99 - 108, 2019.

Gallo-Francisco PH, Brocchi M, Giorgio S. *Leishmania* and its relationships with bacteria. *Fut Microbiol,* 17(3): 199 - 218, 2022.

Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard A-B. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants. *PLoS Pathog,* 15(6): e1007812, 2019.

Garcia AR, Amaral ACF, Azevedo MMB, Corte-Real S, Lopes RC, Alviano CS, Pinheiro AS, Vermelho AB, Rodrigues IA. Cytotoxicity and anti-*Leishmania*

amazonensis activity of *Citrus sinensis* leaf extracts. *Pharm Biol*, 55(1): 1780 -1786, 2017.

Gaveau A, Coetisier C, Roques C, Bacchin P, Dague E, Causserand C. Bacteria transfer by deformation through microfiltration membrane. *J Membr Sci*, 523, 446 - 55, 2017.

Gerritzen, M., Salverda, M., Martens, D. E., Wijffels, R. H., & Stork, M. Spontaneously released *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicles as vaccine platform: production and purification. *Vaccine,* 37(47): 6978 - 86, 2019.

Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Zuben FJV, Yamada A, Augusto O. *In Vivo* Formation of Electron Paramagnetic Resonance-Detectable Nitric Oxide and of Nitrotyrosine Is Not Impaired during Murine Leishmaniasis. *Infec Immun,* 66(2), 807 - 14, 1998.

Giorgio S. Macrophages: plastic solutions to environmental heterogeneity. *Inflamm Res,* 62(9): 835 - 43, 2013.

Gimblet C, Meisel JS, Loesche MA, Cole SD, Horwinski J, Novais FO, Misic AM, Bradley CW, Beiting DP, Rankin SC, Carvalho LP, Carvalho EM, Phillip S, Grice EA. Cutaneous Leishmaniasis Induces a Transmissible Dysbiotic Skin Microbiota that Promotes Skin Inflammation. *Cell Host Microbe,* 22(1): 13 - 24.e4, 2017.

Gómez-Chávez F, Cedillo-Peláez C, Zapi-Colín LA, Gutiérrez-González G, Martínez-Torres I, Peralta H, Chavez-Galan L, Avila-Calderón ED, Contreras-Rodríguez A, Bartolo-Aguilar Y, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Diaz ME, Cancino-Diaz JC. The Extracellular Vesicles from the Commensal *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 Strain Regulate Skin Inflammation in the Imiquimod-Induced Psoriasis Murine Model. *Int J Mol Sci*, 22(23): 13029, 2021.

Gonçalves EGR, Filho SAR, de Oliveira EG, Pareira ALN, Silva AR, Costa JML. Bacterial infection in cutaneous leishmaniasis: bacterial pattern and sensitivity to antibiotics. *Rev Soc Bras Med Trop,* 42(2), 219 - 21, 2009.

Griess, P. Preliminary notice of the reaction of nitrous acid with picramic acid and aminonitrophenol. *Annalen der Chemie und Pharmacie,* 106: 123 - 25, 1858.

Grimaldi G Jr, Tesh RB. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev,* 6(3): 230 - 50, 1993.

Gurung M, Moon DC, Choi CW, Lee JH, Bae YC, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim SI, Lee JC. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS ONE,* 6(11): e27958, 2011.

Hadadi-Fishani M, Najar-Peerayeh S, Siadat SD, Sekhavati M, Mobarez AM. Isolation and immunogenicity of extracted outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* under antibiotics treatment conditions. *Iran J Microbiol*, 13(6): 824 - 31, 2021.

Han A, Zenilman JM, Melendez JH, Shirtliff ME, Agostinho A, James G, Stewart PS, Mongodin EF, Rao D, Rickard AH, Lazarus GS. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound repair regen, 19*(5): 532 - 41, 2011.

Hartley MA, Drexler S, Ronet C, Beverley SM, Fasel N. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. *Trends Parasitol,* 30(8): 412 - 22, 2014.

Hasegawa H, Naganuma K, Nakagawa Y, Matsuyama T. Membrana filter (pore size, 0.22-0.45 µm; Thickness, 150 µm) passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. *FEMS Microbiol Lett,* 233(1), 41 - 6, 2003.

He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci,* 41(12): 1012 - 21, 2016.

Herman RA, Scherer PN, Shan G. Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves. *J Immunol Methods*, 339(2):245 -58, 2008.

Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, Niño S, Páez L, Ramírez A, Vega L, Velandia V, Vera M, Zúñiga MF, Bottin MJ, Ramírez JD. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. *Sci Data,* 7(1): 110, 2020.

Holban A-M, Cotar AI, Chifiruic MC, Bleotu C, Banu O, Lazar V. Variation of virulence profiles in some *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* stains isolated from different clinical patients. *Afri J Microbiol Res,* 27: 3453 - 60, 2013.

Holzmuller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect Immun*, 70(7): 3727 - 35, 2002.

Hong SW, Kim MR, Lee EY, Kim JH, Kim YS, Jeon SG, Yang JM, Lee BJ, Pyun BY, Gho YS, Kim YK. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation. *Allergy,* 66(3): 351 - 9, 2011.

Huang Z, Hu Y, Shou L, Song M. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7. *BMC Microbiol*, 13: 87, 2013.

Imayoshi R, Cho T, Kaminishi H. NO production in RAW 264 cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* extracellular vesicles. *Oral Dis*, 17(1):83 - 9, 2011.

Irene C, Fantappiè L, Caproni E, Zerbini F, Anesi A, Tomasi M, Zanella I, Stupia S, Prete S, Valensin S, König E, Frattini L, Gagliardi A, Isaac SJ, Grandi A, Guella G, Grandi G. Bacterial outer membrane vesicles engineered with lipidated antigens as a platform for *Staphylococcus aureus* vaccine. *Proc Natl Acad Sc,* 116(43): 21780 - 8, 2019.

Isaac-Márquez AP, Lezama-Dávila CM. Detection of pathogenic bacteria in skin lesions of patients with chiclero's ulcer: reluctant response to antimonial treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 98(8): 1093 - 95, 2003.

Jardeleza C, Foreman A, Baker L, Paramasivan S, Field J, Tan LW, Wormald P-J. The effects of nitric oxide on *Staphylococcus aureus* biofilm growth and its implications in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol*, 1(6): 438 - 44, 2011.

Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol,* 15(6): 375 - 87, 2015.

Karvonen A, Jokela J, Laine AL. Importance of Sequence and Timing in Parasite Coinfections. *Trends Parasitol*, 35(2): 109 - 18, 2019.

Kępa M, Miklasińska-Majdanik M, Wojtyczka RD, Idzik D, Korzeniowski K, Smoleń-Dzirba J, Wąsik TJ. Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *Biomed Res Int,* 2018: 7413504, 9 pgs., 2018.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New world and old world *Leishmania* infections – a practical review. *Dermatol Clin,* 33(3): 579 - 93, 2015.

Kirby AC, Beattie L, Maroof A, Rooijen NV, Kaye PM. SIGNR1-negative red pulp macrophages protect against acute Streptococcal sepsis after *Leishmania donovani*-induced loss of marginal zone macrophages. *Am J Pathol,* 175(3): 1107 - 15, 2009.

Koru Ö, Özkoç S, Şimșek K, Mert G, Ay H, Töz S, Tanyüskel M. *In vitro* efficacy of hyperbaric oxygen therapy against *Leishmania tropica* promastigotes and amastigotes. *Turk J Med Sci,* 42(4): Article 21, 2012.

Khaledi A, Khademi F, Esmaeili D, Esmaeili SA, Ros- tami H. The role of HPaA protein as candidate vaccine against *Helicobacter pylori. Der Pharma Chemica,* 8(3): 235 - 37, 2016.

Koziel J, Maciag-Gudowska A, Mikolajczyk T, Bzowska M, Sturdevant DE, Whitney AR, Shaw LN, DeLeo FR, Potempa J. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. *PloS ONE,* 4(4): e5210, 2009.

Lamour SD, Veselkov KA, Posma JM, Giraud E, Rogers ME, Croft S, Marchesi JR, Holmes E, Seifert K, Saric J. Metabolic, immune, and gut microbial signals mount a systems response to *Leishmania major* infection. *J Proteome Res,* 14(1): 318 - 29, 2015.

Lappan R, Classon C, Kumar S, Singh OP, de Almeida RV, Chakravarty J, Kumari P, Kansal S, Sundar S, Blackwell JM. Meta-taxonomic analysis of prokaryotic and eukaryotic gut flora in stool samples from visceral leishmaniasis cases and endemic controls in Bihar State India. *PLoS Negl Trop Dis,* 13(9): e0007444, 2019.

Layegh P, Ghazvini K, Moghiman T, Hadian F, Zabolinejad N, Pezeshkpour F. Bacterial contamination in cutaneous leishmaniasis: its effect on the lesions' healing course. *Indian J Dermatol*, *60*(2): 211, 2015.

Lee EY, Choi DY, Kim DK, Kim JW, Park JO, Kim S, Kim SH, Desiderio DM, Kim YK, Kim KP, Gho YS. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24): 5425 - 36, 2009.

Lee JC. *Staphylococcus aureus* Membrane Vesicles and Its Potential Role in Bacterial Pathogenesis. *J Bacteriol Virol,* 42(3): 181 - 8, 2012.

Lewis MD, Paun A, Romano A, Langston H, Langner CA, Moore IN, Bock KW, Francisco AF, Brenchley JM, Sacks DL. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria and is delayed by antibiotic prophylaxis. *PLoS Pathog,* 16(4): e1008456, 2020.

Li X, Ye Y, Zhou X, Huang C, Wu M. Atg7 enhances host defense against infection via downregulation of superoxide but upregulation of nitric oxide. *J Immunol,* 194(3): 1112 - 21, 2015.

Lima FL, Joazeiro PP, Lancelloti M, Hollanda LM, Lima BA, Linares E, Augusto O, Brocchi M, Giorgio S. Effects of hyperbaric oxygen on *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to imipenem and macrophages. *Future Microbiol,* 10(2): 179 - 89, 2015.

Linares E, Augusto O, Barão SC, Giorgio S. *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J Parasitol,* 86(1): 78 - 82, 2000.

Lopes MEM, Carneiro MBH, dos Santos LM, Vieira LQ. Indigenous microbiota and leishmaniais. *Parasite Immunol,* 38: 37 - 44, 2016.

Luz BSR, de Rezende Rodovalho V, Nicolas A, Chabelskaya S, Jardin J, Briard-Bion V, Le Loir Y, de Carvalho Azevedo VA, Guédon É. Impact of Environmental Conditions on the Protein Content of *Staphylococcus aureus* and Its Derived Extracellular Vesicles. *Microorganisms,* 10(9): 1808, 2022.

Marques-da-Silva C, Chaves MM, Thorstenberg ML, Figliuolo VR, Vieira FS, Chave SP, Meyer-Fernandes JR, Rossi-Bergmann B, Savio LEB, Coutinho-Silva R. Intralesional Uridine-5'-Triphosphate (Utp) Treatment Induced Resistance to *Leishmania amazonensis* Infection by Boosting Th1 Immune Responses And Reactive Oxygen Species Production. *Purinergic Signal,* 14(2): 201 - 11, 2018.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Mol Cell,* 10(2), 417–426, 2002.

Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M, Souissi A, Turki H, Boudaya S, Bouassida S, Zahaf A. Glucantime injection: benefit versus toxicity. *Med Mal Infect*, 35(1): 42 - 5, 2005.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM,* 107(1), 7 - 14, 2014.

Metruccio MM, Evans DJ, Gabriel MM, Kadurugamuwa JL, Fleiszig SM. *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Vesicles Triggered by Human Mucosal Fluid and Lysozyme Can Prime Host Tissue Surfaces for Bacterial Adhesion. *Front Microbiol,* 7: 871, 2016.

Mittal R, Lisi CV, Kumari H, Grati M, Blackwelder P, Yan D, Jain C, Mathee K, Weckwerth PH, Liu XZ. Otopathogenic *Pseudomonas aeruginosa* Enters and Survives Inside Macrophages. *Front Microbiol*, 7: 1828, 2016.

Mohammed R, Fikre H, Schuster A, Mekonnen T, van Griensven J, Diro E. Multiple Relapses of Visceral Leishmaniasis in HIV Co-Infected Patients: A Case Series from Ethiopia. *Curr Ther Res Clin Exp,* 92: 100583, 2020.

Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, Wright EA, Ledson MJ, Walshaw MJ, Brockhurst MA, Winstanley C. *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med*, 183(12): 1674 - 9, 2011.

Mrochen DM, Fernandes de Oliveira LM, Raafat D, Holtfreter S. *Staphylococcus aureus* Host Tropism and Its Implications for Murine Infection Models. *Int J Mol Sci*, 21(19): 7061, 2020.

Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, Sethi S. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med,* 177(8): 853 - 60, 2008.

Mylonakis ME, Soubasis N, Balakrishnan N, Theodorou K, Kasabalis D, Saridomichelakis M, Koutinas CK, Koutinas AF, Breitschwerdt EB. Molecular identification of *Bartonella* species in dogs with leishmaniosis (*Leishmania infantum*) with or without cytological evidence of arthritis. *Vet Microbiol,* 174(1 - 2): 272 - 75, 2014.

Nabavi NS, Pezeshkpoor F, Valizadeh N, Ghezeldasht A, Rezaee SA. Increased Th17 functions are accompanied by T regs activities in lupoid leishmaniasis. *Parasite Immunol,* 40(1), 2018.

Nadaes NR, Silva da Costa L, Santana RC, LaRocque-de-Freitas IF, Vivarini ÁC, Soares DC, Wardini AB, Gazos Lopes U, Saraiva EM, Freire-de-Lima CG, Decote-Ricardo D, Pinto-da-Silva LH. DH82 Canine and RAW264.7 Murine Macrophage Cell Lines Display Distinct Activation Profiles Upon Interaction With *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis. Front Cell Infect Microbiol,* 10: 247, 2020.

Naik V, Mahajan G. Quorum sensing: a non-conventional target for antibiotic discovery. *Nat Prod Commun*, 8(10):1455 - 58, 2013.

Namork E, Brandtzaeg P. Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet,* 360(9347): 1741, 2002.

Nassar MSM, Hazzah WA, Bakr WMK. Evaluation of antibiotic susceptibility test results: how guilty a laboratory could be? *J Egpyt Public Health Assoc*, 94(1): 4, 2019.

Neris DM, Ortolani LG, de Castro CA, Correia RO, Rodolpho JMA, Camillo L, Nogueira CT, de Sousa CP, Anibal FF. In Vitro Modulator Effect of Total Extract from the Endophytic Paenibacillus polymyxa RNC-D in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and Macrophages. *Int J Microbiol*, 2020: 8895308, 2020.

Neves DP. Parasitologia humana. 12. ed. São Paulo, SP: Ed. Atheneu, pgs. 41 - 69, 2011.

Nguyen HA, Grellet J, Paillard D, Dubois V, Quentin C, Saux M-C. Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: a study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J Antimicrob Chemother,* 57(5): 883 - 90, 2006.

Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila LB, López-Martínez B, Jiménez-Tapia Y, Giono S, Eslava C, Hernández-Castro R, Xicohtencatl-Cortes J. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation. *Bol Med Hosp Infant Mex,* 70(2): 133 - 44, 2013.

Olszański R, Siermontowski P, Juszczak D, Dąbrowiecki Z, Pedrycz A. A Case of Cutaneous Leishmaniasis Treated with Hyperbaric Oxygen Therapy. *Pol Hyperb Res*, 57(4): 39 - 41, 2017.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Leishmaniasis (2021). Disponível em: <www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>.

Pace D. Leishmaniasis. *J Infect,* 69 Suppl 1, S10 - S18, 2014.

Paillard D, Grellet J, Dubois V, Saux MC, Quentin C. Discrepancy between uptake and intracellular activity of moxifloxacin in a *Staphylococcus aureus*-human THP-1 monocytic cell model. *Antimicrob Agents Chemother,* 46(2): 288 - 93, 2002.

Parin U, Erbas G, Ural K, Savasan S, Yuksel HT, Balat G, Þukru K. Investigation of bacterial and fungal agents from cutaneous lesions in canine Leishmaniasis. *Indian J Anim Res,* 54(1): 96 - 100, 2020.

Park KS, Lee J, Jang SC, Kim SR, Jang MH, Lötvall J, Kim YK, Gho YS. Pulmonary inflammation induced by bacteria-free outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa. Am J Respir Cell Mol Biol,* 49(4): 637 - 45, 2013.

Park AJ, Murphy K, Surette MD, Bandoro C, Krieger JR, Taylor P, Khursigara CM. Tracking the Dynamic Relationship between Cellular Systems and Extracellular Subproteomes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Proteome Res,* 14(11): 4524 - 37, 2015.

Paulsson M, Kragh KN, Su YC, Sandblad L, Singh B, Bjarnsholt T, Riesbeck K. Peptidoglycan-Binding Anchor Is a *Pseudomonas aeruginosa* OmpA Family Lipoprotein With Importance for Outer Membrane Vesicles, Biofilms, and the Periplasmic Shape. *Front Microbiol,* 12: 639582, 2021.

Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, Mercade E. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS ONE,* 10(1): e0116896, 2015.

Potter ME, Chapman WL Jr, Hanson WL, Blue JL. Leishmania braziliensis: effects of bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Pasteurella multocida*) on the developing cutaneous leishmaniasis lesion in the golden hamster. *Exp Parasitol,* 56(1): 107 - 118, 1983.

Qiao Z, Chen J, Zhou Q, Wang X, Shan Y, Yi Y, Liu B, Zhou Y, Lü X. Purification, characterization, and mode of action of a novel bacteriocin BM173 from *Lactobacillus crustorum* MN047 and its effect on biofilm formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus. J Dairy Sci,* 104(2): 1474 - 83, 2021.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus*. Cell,* 15(1): 261 - 7, 1978.

Rasheed NA, Hussein NR. *Staphylococcus aureus:* An Overview of Discovery, Characteristics, Epidemiology, Virulence Factors and Antimicrobial Sensitivity. *Eur J Mol Clin Med,* 8(3): 1160 - 83, 2021.

Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A, Casadevall A. *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sc USA,* 107(44): 19002 - 7, 2010.

Romeo L, Lanza Cariccio V, Iori R, Rollin P, Bramanti P, Mazzon E. The α-Cyclodextrin/Moringin Complex: A New Promising Antimicrobial Agent against *Staphylococcus aureus*. *Molecules,* 23(9): 2097, 2018.

Sadeghian G, Ziaei H, Bidabadi LS, Baghbaderani AZ. Decreased effect of glucantime in cutaneous Leishmaniasis complicated with secondary bacterial infection. *Indian J Dermatol,* 56(1): 37 - 9, 2011.

Salgado VR, de Queiroz ATL, Sanabani SS, Oliveira CI, Carvalho EM, Costa JML, Barral-Netto M, Barral A.The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 111(4): 241 - 51, 2016.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. 3rd ed. Vols 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001, 2100 pp. Cold Spring Harbor, NY.

Santos JC, Dick MS, Lagrange B, Degrandi D, Pfeffer K, Yamamoto M, Meunier E, Pelczar P, Henry T, Broz P. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J,* 37(6): e98089, 2018.

Schooling SR, Beveridge TJ. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol,* 188(16): 5945 - 57, 2006.

Schwechheimer C, Kuehn MJ. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol,* 13(10): 605 - 19, 2015.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci,* 18(6): 1296, 2017.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol,* 31(8): 423 - 31, 2009.

Singh-Phulgenda S, Rashan S, Harriss E, Dahal P, Naylor C, Brack M, Guerin PJ, Maguire BJ. Infectious diseases data observatory (IDDO) visceral leishmaniasis library of clinical therapeutic studies: A protocol for a living systematic review of clinical studies. *Wellcome Open Res*, 7: 155, 2022.

Siqueira VL, Cardoso RF, Caleffi-Ferracioli KR, Scodro RBL, Fernandez MA, Fiorini A, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. *Antimicrob Agents Chemother,* 58(7): 3957 - 67, 2014.

Soler N, Krupovic M, Marguet E, Forterre P. Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME J,* 9(4): 793 - 96, 2015.

Solomon M, Greenberger S, Baum S, Pavlotsky F, Barzilai A, Schwartz E. Unusual forms of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major. J Eur Acad Dermatol Venereol,* 30(7): 1171 - 75: 2016.

Strobel M, Pförtner H, Tuchscherr L, Völker U, Schmidt F, Kramko N, Schnittler HJ, Fraunholz MJ, Löffler B, Peters G, Niemann S. Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain. *Clin Microbiol Infect,* 22(9): 799 - 809, 2016.

Todd ECD. *Staphylococcus aureus. In* Encyclopedia of Food Safety – Volume 1: “History, Science and Methods” (Elsevier Inc, ed.) pp. 530 - 534, Elsevier, San Diego, CA, 2014.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Res,* 6: 750, 2017.

Torres IM, Demirdjian S, Vargas J, Goodale BC, Berwin B. Acidosis increases the susceptibility of respiratory epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*-induced cytotoxicity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,* 313(1): L126 - L137, 2017.

Toyofuku M, Nomura N, Eberl L. Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol,* 17(1): 13 - 24, 2019.

Unal CM, Schaar V, Riesbeck K. Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin Immunopathol*, 33(5): 395 - 408, 2011.

Van Der Vliet D, Le Guern AS, Freitag S, Gounod N, Therby A, Darie H, Buffet PA. *Pseudomonas aeruginosa* otochondritis complicating localized cutaneous leishmaniasis: prevention of mutilation by early antibiotic therapy. *Am J Trop Med Hyg,* 75(2): 270 - 72, 2006.

Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, da Motta, JOC, Costa IMC, Sampaio RNR. Fatal mucosal leishmaniasis in a child. *An Bras Dermatol,* 81(3): 255 - 59, 2006.

Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AVde, Ciuffo IA, Santos CG. Avaliação

da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop,* 34(3): 233 - 7, 2001.

Vera LA, Macêdo Vde O, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG, Santos JB. Cutaneous leishmaniotic ulcers with *Corynebacterium diphtheriae. Rev Soc Bras Med Trop,* 35(4): 311 - 3, 2002.

Vera LA, Macedo JLS, Ciuffo IA, Santos CG, Santos JB. Antimicrobial susceptibility of aerobic bacteria isolated from leishmaniotic ulcers in Corte de Pedra, BA. *Rev Soc Bras Med Trop*, 39(1): 47 - 50, 2006.

Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J. SLPW: A Virulent Bacteriophage Targeting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus In vitro* and *In vivo. Front Microbiol,* 7: 934, 2016.

Wang X, Thompson CD, Weidenmaier C, Lee JC. Release of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles and their application as a vaccine platform. *Nat Commun,* 9(1): 1379, 2018.

Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun HM. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105(2): 463 - 69, 2009.

Xu Z, Hao X, Li M, Luo H. *Rhodococcus equi*-Derived Extracellular Vesicles Promoting Inflammatory Response in Macrophage through TLR2- NF-κB/MAPK Pathways. *Int J Mol Sci,* 23(17): 9742, 2022.

Xue Q, Yan Y, Zhang R, Xiong H. Regulation of iNOS on Immune Cells and Its Role in Diseases. *Int J Mol Sci,* 19(12): 3805, 2018.

Yehia HM, Al-Olayan EM, El-Khadragy MF, Metwally DM. In Vitro and In Vivo Control of Secondary Bacterial Infection Caused by *Leishmania major. Int J Environ Res Public Health,* 14(7): 777, 2017.

Yu L, Xiang H, Fan J, Wang D, Yang F, Guo N, Jin Q, Deng X. Global transcriptional response of *Staphylococcus aureus* to Rhein, a Natural Plant Product. *J Biotechnol,* 135: 304 - 8, 2008.

Zajmi A, Mohd Hashim N, Noordin MI, Khalifa SAM, Ramli F, Ali HM, El-Seedi HR. Ultrastructural Study on the Antibacterial Activity of Artonin E versus *Streptomycin* against *Staphylococcus aureus* Strains. *PLOS ONE*, 10(6): e0128157, 2015.

Zélé F, Magalhães S, Kéfi S, Duncan AB. Ecology and evolution of facilitation among symbionts. *Nat Comm,* 9(1): 4869, 2018.

Zhang L, Zhao SQ, Zhang J, Sun Y, Xie YL, Liu YB, Ma CC, Jiang BG, Liao XY, Li WF, Cheng XJ, Wang ZL. Proteomic Analysis of Vesicle-Producing *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Exposed to X-Ray Irradiation. *Front Microbiol*, 11: 558233, 2020.

Zhao K, Deng X, He C, Yue B, Wu M. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Infect Immun*, 81(12): 4509 - 18, 2013.

Zhu Y, Ge X, Xie D, Wang S, Chen F, Pan S. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Secrete LasB Elastase to Induce Hemorrhagic Diffuse Alveolar Damage in Mice. *J Inflamm Res*, 14: 3767 - 80, 2021.

Ziaei H, Sadeghian G, Hejazi SH. Distribution Frequency of Pathogenic Bacteria Isolated from Cutaneus Leishmaniasis Lesions. *Korean J Parasitol,* 46(3): 191 - 93, 2008.

Ziaei H, Sadeghian G. Isolation of bacteria causing secondary bacterial infection in the lesions of cutaneous Leishmaniasis. *Indian J Dermatol,* 53(3): 129 - 31, 2008.

Zorgi NE, Arruda LV, Paladine I, Roque G, Araújo TF, Brocchi M, Barral M, Sanchiz Á, Requena JM, Abánades DR, Giorgio S. *Leishmania infantum* transfected with toxic plasmid induces protection in mice infected with wild type *L. infantum* or *L. amazonensis. Mol Immunol,* 127: 95 - 106, 2020.

Zurita ME, Wilk MM, Carriquiriborde F, Bartel E, Moreno G, Misiak A, Mills KHG, Hozbor D. A Pertussis Outer Membrane Vesicle-Based Vaccine Induces Lung-Resident Memory CD4 T Cells and Protection Against *Bordetella pertussis,* Including Pertactin Deficient Strains. *Front Cell Infect Microbiol,* 9: 125, 2019.

Anexo 1- Certificado de aprovação do uso de animais pelo CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO CEUA nº 264/2021

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Pesquisa de bactérias em lesões leishmanióticas murinas**, registrada com o nº **5904-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. SELMA GIORGIO e Marina Flóro e Silva, Guilherme Augusto Sanches Roque**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal** (**CONCEA)**, **tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas** - **CEUA/UNICAMP,** em reunião de **18/11/2021**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	11/12/2021 a 11/12/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	18/11/2021 a 11/12/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / Balb/c
No. de animais:	50
Idade/Peso:	6.00 Semanas / 25.00 Gramas
Sexo:	50 Fêmeas
Origem:	CEMIB Unicamp
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotérios da Parasitologia, DBA, IB/UNICAMP

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

Campinas, **30 de novembro de 2021**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro	Rosangela dos Santos
Presidente	Secretária Executiva

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

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 382B05B7 CA37406A A4E9FDBF 4828CC4A

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO**, **PRESIDENTE CEUA/UNICAMP**, em 03/12/2021, às 07:03 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS**, **SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 02/12/2021, às 14:29 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
382B05B7 CA37406A A4E9FDBF 4828CC4A

UNICAMP
SIGAD

Anexo 2 – Direitos Autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Efeito da interação de macrófagos co-cultivados com *Leishmania amazonensis* e bactérias no controle da infecção parasitária,** não infringem os dispositivos da Lei nº. 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 06 de janeiro de 2023.

Assinatura: _____

Nome do(a) autor(a): **Pedro Henrique Gallo Francisco**

RG nº 45.703.959-0

Assinatura: _____

Nome do(a) orientador(a): **Selma Giorgio**

RG nº 12.944.441-8

Assinatura: _____

Nome do(a) coorientador(a): **Marcelo Brocchi**

RG nº 18.425.191-6