



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE
FAGOCÍTICA E SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS
DE CAMUNDONGOS CBA/J POR
Leishmania amazonensis

JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

Salvador - Bahia - Brasil

2009



004092

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

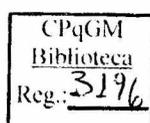
**EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE
FAGOCÍTICA E SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS
DE CAMUNDONGOS CBA/J POR
*Leishmania amazonensis***

JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

Orientadora: Patrícia Sampaio Tavares Veras

**Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental**

**Salvador – Bahia – Brasil
2009**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L732c Lima, José Geraldo Bomfim
Efeito da autofagia sobre a capacidade fagocítica e sobre a infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por *Leishmania amazonensis* [manuscrito] / José Geraldo Bomfim Lima. - 2009.
87 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2009.

Orientador: Prof. Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Patologia e Biointervenção.

1. Autofagia. 2. Macrófago. 3. *L. amazonensis*. 4. Fagocitose. I. Título.

CDU 576:616.993.161

10/11/2009
10/11/2009
10/11/2009

10/11/2009
10/11/2009

10/11/2009

“EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA E SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA/J POR *Leishmania amazonensis*.”

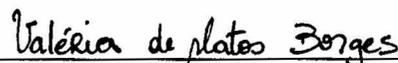
JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

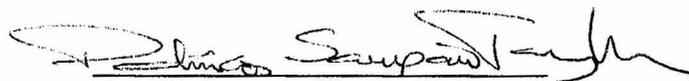
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Rogério Pacheco de Almeida
Professor adjunto
UFS



Dr^a Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dr^a. Patrícia Sampaio Tavares-Veras
Pesquisadora titular
CPqGM/FIOCRUZ

Fontes de Financiamento:

FAPESB – 5742/06
CAPES – Bolsa de Mestrado

**A meus pais, Dona Ovives e Seu Geraldão,
por todo amor e dedicação.**

Obrigado pelo constante incentivo e credibilidade.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Patrícia S. T. Veras pela oportunidade, credibilidade e confiança, por todos os ensinamentos, pela formação científica e pela valorosa orientação.

A Christiana de Freitas Vinhas, com quem desenvolvi este trabalho, pelo excelente convívio e pela dedicação ao projeto.

A Dr. Marcus André V. dos Santos pela atenção, auxílio na interpretação da análise de microscopia eletrônica e disponibilização da estrutura do LBP.

A Adriana Lanfredi Rangel e Alene Vanessa A. dos Santos pelo auxílio com o processamento do material para análise ultra-estrutural.

A Micely Hermida pelo auxílio na utilização do microscópio de fluorescência.

A Dr. Luis Freitas, Valderes Souza, Ivana Nunes, Cleusa Rodrigues, Claudia Dias, Gilberto Bomfim, Juliana Perrone, Taís Almeida, Marcus Welby, Tânia Regina, Luis Fábio, Rodrigo Araújo, Antonio Petersen, Luana Palma, Carlos Eduardo, Niara Almeida, Sírio Melo, pela amizade e por toda ajuda no dia a dia do laboratório.

Aos demais amigos e colegas do LPBI por toda contribuição na realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA e todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram com esse trabalho.

A turma de mestrado de 2007.1 pela convivência e amizade.

Aos amigos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

A minha família, em especial, aos meus tios Silvio e Zenaide pela oportunidade e apoio.

A meu irmão, pelo apoio e companheirismo.

A Maria Verônica, namorada e companheira, por todo amor, carinho, atenção e paciência.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Considerações Gerais.....	14
1.1.1 O Parasito.....	16
1.1.2 O modelo murino de leishmaniose tegumentar.....	17
1.1.3 Interação macrófago- <i>Leishmania</i>	20
1.1.4 Fagocitose e patógenos intracelulares.....	21
1.1.5 Autofagia.....	26
1.2 Justificativa.....	31
1.3 Objetivos.....	33
1.3.1 Objetivo geral.....	33
1.3.2 Objetivos específicos.....	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Animais.....	34
2.2 Parasitos.....	34
2.3 Obtenção e cultivo de macrófagos.....	35
2.3.1 Macrófagos peritoneais inflamatórios.....	35
2.3.2 Macrófagos peritoneais residentes.....	36
2.3.3 Macrófagos derivados de medula óssea.....	36

2.4	Indução fisiológica ou farmacológica de autofagia em macrófagos.....	37
2.5	Avaliação do efeito da autofagia sobre o curso da infecção de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J por <i>L. amazonensis</i>	38
2.6	Avaliação do efeito da autofagia sobre a carga parasitária de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J infectados.....	39
2.7	Avaliação do efeito da autofagia sobre a fagocitose em macrófagos murinos.....	40
2.8	Avaliação ultra-estrutural de macrófagos em autofagia.....	40
2.9	Avaliação do efeito da reversão da autofagia sobre a fagocitose de partículas por macrófagos.....	41
2.10	Avaliação da co-localização de zimosan com taças de actina em macrófagos em autofagia.....	42
2.11	Análise estatística.....	43
3	RESULTADOS	44
3.1	Efeito da indução de autofagia sobre o curso da infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por <i>L. amazonensis</i>	44
3.2	Efeito da indução de autofagia sobre a capacidade fagocítica do macrófago murino.....	48
3.3	Efeito da reversão da autofagia sobre a capacidade fagocítica do macrófago.....	61

3.4 Efeito da indução de autofagia sobre a interação de partículas de zimosan a taças de actina em macrófagos induzidos a autofagia.....	64
4 DISCUSSÃO.....	68
5 CONCLUSÃO.....	76
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

BMM ϕ – Macrófago derivado de medula óssea

CR – Receptor de complemento

DMEM – “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EBSS – “Earl's Balanced Salt Solution”

Hepes – N-2hidroxetilpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico

H&E – Hematoxilina-eosina

IFN- γ – Interferon- γ

Fc γ R – Receptor Fc

IL – Interleucina

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LCM – Leishmaniose cutâneo-mucosa

Lev – Levedo

LPG – Lipofosfoglicano

LV – Leishmaniose visceral

LSH – Leishmania

mTOR – “mamalian Target Of Rapamycin”

M ϕ – Macrófago

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleótideo fosfato oxidase

PAMPs – Padrões bioquímicos moleculares associados a patógenos

PRPs – Receptores reconhecedores de padrões

PI3K – Fosfatidilinositol 3-fosfato cinase

ROI – Radicais intermediários de oxigênio

SD – Desvio padrão

SE – Erro padrão

SRs – Receptores *scavenger*

TGF- β – Fator transformador do crescimento- β

Th1 – Células T “helper” 1

Th2 – Células T “helper” 2

TLR – Receptor “Toll-like”

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

Zim – Zimosan

RESUMO

EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA E SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA/J POR *Leishmania amazonensis*. **JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA**. A autofagia vem sendo alvo de estudos que demonstram sua participação em infecções por diversos patógenos intracelulares. A depender do patógeno, a autofagia pode facilitar a sobrevivência intracelular do patógeno ou pode funcionar como controle da infecção pela célula hospedeira. Pouco se sabe sobre a participação da autofagia na infecção por *Leishmania*. Foi demonstrado que o vacúolo parasitóforo induzido por *L. mexicana* adquire nutrientes citosólicos por microautofagia. Além disso, recentemente foi demonstrado que a indução de autofagia promove aumento da carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos infectados. Esses dados sugerem a participação do processo autofágico no estabelecimento da infecção por *Leishmania*, como um mecanismo que favorece a sobrevivência intracelular do parasito. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar a influência da autofagia na infecção, *in vitro*, de macrófagos de camundongos CBA/J por *L. amazonensis*. Macrófagos foram induzidos à autofagia por duas formas, fisiológica ou farmacológica, após ou antes da infecção por *L. amazonensis* ou exposição a partículas de levedo ou zimosan. O percentual de infecção e de fagocitose foi estimado. Os resultados mostram que a indução de autofagia, após a infecção, não altera o percentual de macrófagos infectados, mas promove o aumento na carga parasitária de macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Além disso, a prévia indução de autofagia promove a inibição da capacidade fagocítica do macrófago murino. Estudos adicionais serão realizados no intuito de esclarecer os mecanismos pelos quais a indução de autofagia favorece a infecção por *L. amazonensis* e altera a capacidade fagocítica do macrófago murino.

Palavras-chave: autofagia, macrófago, *L. amazonensis*, fagocitose.

ABSTRACT

EFFECT OF AUTOPHAGY ON PHAGOCYtic CAPACITY AND ON CBA/J MICE MACROPHAGES INFECTION BY *Leishmania amazonensis*. **JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA**. Recently, studies to delineate the participation of autophagy in intracellular pathogen infections have been performed. Dependent on pathogen infection, autophagy can facilitate microorganism intracellular survival or can control pathogen infection by host cell. Few works evaluated the role of autophagy in *Leishmania* infection. Recently, it was demonstrated that *L. mexicana*-induced parasitophorous vacuoles acquire cytosolic nutrients by microautophagy. Additionally, it was also demonstrated that autophagy promotes enhancement of *L. amazonensis* burden on infected cells. Taken together, these data suggest the involvement of autophagic process on *Leishmania* infection, as a mechanism that favors parasite survival. The present work intent to determine the influence of autophagy in *L. amazonensis* infection of CBA/J macrophages *in vitro*. Autophagy was induced after and before *L. amazonensis* infection or particle addition to macrophage cultures. The percentage of infection and particle phagocytosis was estimated. The results show that autophagy induction after infection does not influence the percentage of *L. amazonensis*-infected cells, but enhances *L. amazonensis* burden on infected cells. In addition, previous autophagy induction inhibited macrophage phagocytic capacity. Further studies will be performed to understand the mechanisms involved in autophagy effect on *L. amazonensis* infection and on macrophage phagocytic capacity.

Keywords: autophagy, macrophage, *L. amazonensis*, phagocytosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma doença endêmica causada por protozoários digenéticos do gênero *Leishmania*, estando presente em 88 países dos cinco continentes – África, Ásia, Europa (Velho Mundo) e Américas do Norte e do Sul (Novo Mundo) – atingindo 12 milhões de pessoas. Estima-se que, anualmente, ocorram 1,5-2 milhões de novos casos de leishmaniose, porém somente 600.000 são oficialmente declarados. No Brasil, a leishmaniose tegumentar é uma das afecções dermatológicas que merece atenção, com reflexos no campo social e econômico. No período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de incidência de leishmaniose tegumentar de 18,5 casos/100.000 habitantes. As regiões Norte e Nordeste contribuem com o maior número de casos registrados no período (BRASIL, 2007).

A gravidade da leishmaniose, sua distribuição mundial e sua alta incidência levaram à Organização Mundial de Saúde a incluí-la entre as seis principais doenças infecciosas do mundo. A leishmaniose pode se apresentar em diferentes formas clínicas. A leishmaniose tegumentar que pode se apresentar como leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) apresentam envolvimento de pele ou mucosas. A forma visceral da doença, a leishmaniose visceral (LV), acomete principalmente órgãos internos (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

A LCL e a LCM constituem o pólo reativo da doença, enquanto a LCD representa o pólo anérgico. Os pacientes com LCL apresentam úlcera localizada,

com bordas elevadas e fundo plano em áreas mais expostas do corpo e que tende a curar espontaneamente ou pode apresentar curso indolente. Após a cura, aparece uma cicatriz disforme no local da lesão. Com menos frequência, as lesões podem aumentar de tamanho, tornando-se nodulares com ou sem ulcerações (GRIMALDI, 1982). Indivíduos portadores de LCM, por sua vez, apresentam lesão em sítios de mucosa (nasal, palato e lábio superior), o que pode ocorrer a partir ou não de uma lesão cutânea primária (LIEW & O'DONNELL, 1993). Em pacientes com LCD, as lesões evoluem formando pápulas, nódulos ou infiltrações, e podem disseminar para todo o corpo (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Parasitas que causam LCL e LCM no Novo Mundo são agrupados nos complexos *braziliensis* e *mexicana* (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). *L. braziliensis* é o agente responsável pelas formas mais graves de LCL (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995) e também pode causar LCM. *L. mexicana* e *L. amazonensis* são associadas aos casos de LCD. No Brasil, a ocorrência de lesões localizadas de pele e, menos frequentemente, de lesões cutâneo-mucosas estão relacionadas à *L. amazonensis* (BARRAL *et al.*, 1991). Independente do agente infeccioso, pacientes com LCL ou LCM apresentam lesões caracterizadas por presença de resposta inflamatória intensa e poucos parasitos (COUTINHO *et al.*, 1987). De forma distinta, a lesão presente em indivíduos com LCD apresenta infiltração predominantemente monomórfica de macrófagos intensamente parasitados, sem a ocorrência de ulcerações (BITTENCOURT *et al.*, 1990; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

1.1.1 O PARASITO

O gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) compreende espécies de parasitos digenéticos (heteroxenos), pertencentes à Família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901; WOODCOCK, 1906), Ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963). A ordem Kinetoplastida caracteriza-se por apresentar uma mitocôndria única associada à porção basal do flagelo (o cinetoplasto) rica em DNA mitocondrial, o kDNA (RODGERS *et al.*, 1990).

Atualmente, as espécies de *Leishmania* do Novo Mundo que infectam o homem são classificadas em complexos fenotípicos, agrupados em dois subgêneros, cada um engloba várias espécies (LAINSON *et al.*, 1987):

a) Subgênero *Viannia* (que inclui os complexos *braziliensis* e *guyanensis*) – os parasitos apresentam desenvolvimento pobre em meio de cultivo convencional, infecção com desenvolvimento lento ou visceralizante em hamsters experimentalmente infectados.

b) Subgênero *Leishmania* (que inclui os complexos *mexicana*, *infantum* e *amazonensis*) – os parasitos crescem facilmente em cultura, provocam grandes lesões nodulares em hamsters, com metástases para as extremidades.

O ciclo de vida desses protozoários apresenta dois estágios em hospedeiros distintos, o flebótomo vetor (Diptera: Phlebotominae) e o hospedeiro vertebrado (principalmente mamíferos). O ciclo tem início quando flebátomos fêmeas (*Lutzomyia* spp., *Phlebotomus* spp.), ao se alimentarem de sangue de um

indivíduo infectado, ingerem macrófagos parasitados. Os parasitos se diferenciam a partir de formas amastigotas, no interior de macrófagos, em formas promastigotas no trato digestivo do inseto vetor, onde se desenvolvem aderidos à parede do intestino. Ao se transformarem na forma infectiva, metacíclica, as promastigotas sofrem modificações na superfície celular e se dissociam da parede do intestino do inseto. Em seguida, as promastigotas migram para o aparelho bucal do inseto. Quando o inseto se alimenta, estas formas são injetadas na pele do hospedeiro mamífero. As formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos hospedeiros, onde se transformam em formas amastigotas, completando o ciclo (BRASIL, 2007).

1.1.2 O MODELO MURINO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O desenvolvimento da infecção é determinado pelas características genéticas do hospedeiro e a espécie de *Leishmania*. Diversos modelos são utilizados para se estudar as relações entre *Leishmania* spp., hospedeiros mamíferos e insetos vetores. O modelo murino é um sistema de estudo experimental eficaz e utiliza camundongos isogênicos que apresentam distintos padrões de resposta à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*.

O modelo murino vem sendo amplamente utilizado nos estudos de resposta imune à infecção por *Leishmania*, principalmente pela infecção de diferentes linhagens de camundongos isogênicos por *L. major*, pois reproduz em muitos aspectos o modelo humano da leishmaniose tegumentar. Diversos estudos têm demonstrado que a imunidade protetora contra o parasito está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imune mediada por células enquanto

uma resposta humoral tem pouca importância na resolução das lesões (LIEW & O'DONNELL, 1993; McSORLEY *et al.*, 1996; SCOTT & FARRELL, 1998).

Um considerável espectro de manifestações da leishmaniose pode ser produzido a depender da espécie do parasito e da linhagem de camundongo utilizada. Linhagens como C3H/He, C57BL/6, C57BL/10, ATL e CBA/J são resistentes à infecção por *L. major* e são susceptíveis à infecção por parasitos do complexo *mexicana*, como *L. mexicana* e *L. amazonensis* (BEHIN *et al.*, 1979; MITCHELL *et al.*, 1981). *L. amazonensis* induz uma variação maior no espectro da doença a depender da linhagem de camundongo e da cepa utilizada. A maioria das linhagens investigadas são susceptíveis, desenvolvendo doenças crônicas, como os camundongos das linhagens C57BL/6, C57BL/10 e C3H/HeN (AFONSO *et al.*, 1993; BARRAL *et al.*, 1983; GRIMALDI *et al.*, 1980), ou doenças graves que levam à morte dos animais, como os camundongos da linhagem BALB/c (ANDRADE *et al.*, 1984).

Diversos trabalhos demonstraram a participação das células T CD4⁺ nas formas clínicas da doença, caracterizando-as como as principais células da resposta imune celular (HEINZEL *et al.*, 1988; SHANKAR & TITUS, 1995; KEMP, 1997). A resistência de linhagens de camundongos infectados com *L. major* correlaciona-se com a indução de sub-populações CD4⁺ Th1 produtoras de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2). Por outro lado, a susceptibilidade de linhagens infectadas com *L. major* correlaciona-se com a indução de sub-populações CD4⁺ Th2 produtoras de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (MOSMANN *et al.*, 1986).

Células T CD4⁺ da sub-população Th2 não são capazes de conferir proteção à infecção por *Leishmania*. Elas produzem citocinas que promovem a

progressão da doença. A IL-4, a IL-10 e o fator transformador do crescimento- β (TGF- β) funcionam como citocinas que inibem a ativação de macrófagos e apresentam um importante papel na progressão da doença (LIEW *et al.*, 1989; BOGDAN *et al.* 1991; DING *et al.*, 1990).

Em nosso laboratório, Lemos de Souza e colaboradores (2000) demonstraram que a resposta imune de camundongos CBA/J infectados com *L. major* ou *L. amazonensis* correlaciona-se com o perfil morfológico da resposta tecidual. Na infecção por *L. major*, esses camundongos apresentam níveis elevados de IFN- γ , evidenciando uma resposta do tipo Th1. Por outro lado, quando infectados por *L. amazonensis*, os camundongos CBA/J produzem níveis elevados de IL-4, caracterizando uma resposta do tipo Th2. Estes dados enfatizam o papel do parasito na determinação do tipo de resposta imuno-inflamatória, pois camundongos com o mesmo perfil genético são resistentes ou susceptíveis a duas espécies distintas de *Leishmania*.

Macrófagos desempenham papel importante no controle da infecção por *Leishmania*, atuam nas fases indutora e efetora da resposta imune. Macrófagos, além de serem as principais células hospedeiras do parasito, são células apresentadoras de antígenos para linfócitos T específicos. Além disso, podem liberar citocinas associadas à resposta Th1 (IL-12, TNF- α) ou Th2 (IL-10, TGF- β) (WANG *et al.*, 1994). O controle da infecção está correlacionado com a capacidade dos macrófagos em destruir os parasitos intracelulares. Entretanto, o parasito desenvolveu mecanismos que lhe permitiu modular o ambiente intracelular e inativar a resposta do macrófago.

1.1.3 INTERAÇÃO MACRÓFAGO-LEISHMANIA

A infecção de macrófagos por *Leishmania sp.* ocorre pela ligação de moléculas de superfície do parasito a receptores da membrana da célula hospedeira. O lipofosfoglicano (LPG) e o gp63 são as principais moléculas de superfície de promastigotas de *Leishmania* e participam no reconhecimento e internalização de *Leishmania* pelos macrófagos (BRITTINGHAM *et al.*, 1995; TURCO *et al.*, 1992). Foi demonstrado que na dependência do comprimento da molécula do LPG, há um bloqueio efetivo da lise pelo sistema complemento, por evitar a ligação dos componentes líticos com a membrana do parasito (SACKS *et al.*, 1990).

O gp63 constitui uma glicoproteína com atividade proteolítica capaz de se ligar ao receptor de complemento expresso na superfície de macrófagos, impedindo a fixação do complemento e favorecendo o estabelecimento da infecção nessas células (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). As moléculas do sistema complemento são capazes de promover a opsonização do parasito, promovendo a sua adesão aos receptores do complemento CR1 e CR3 na superfície dos macrófagos (BLACKWELL *et al.*, 1985). Além disso, *Leishmania* também pode ser internalizada pela ligação com outros receptores, como os receptores Fc (RUSSELL *et al.*, 1989) e os receptores de manose (RUSSELL *et al.*, 1986). O envolvimento de vários receptores na fagocitose da forma promastigota favorece sua internalização pelo macrófago.

Leishmania são protozoários que se desenvolvem e completam seu ciclo de vida predominantemente em macrófagos. Após reconhecimento pelo macrófago, o parasito é internalizado e no interior dos macrófagos, as formas

promastigotas sofrem transformações moleculares e estruturais dando origem às formas amastigotas, obrigatoriamente intracelulares e imóveis, mas capazes de viver e se multiplicar em compartimentos fagolisossomais (ALEXANDER *et al.*, 1992). A morfologia e a maturação de compartimentos contendo o parasito, conhecidos como vacúolos parasitóforos, variam dependendo da espécie de *Leishmania*. Os grandes vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. mexicana* são bem diferentes dos vacúolos menores individuais induzidos por *L. major* ou *L. donovani*. Entretanto, existem características comuns entre esses vacúolos parasitóforos, são ácidos, contêm enzimas lisossomais e apresentam marcadores de endossomo tardio e lisossomo, incluindo Rab7, macrosialina, LAMP-1, LAMP-2 e ATPase vacuolar (ANTOINE *et al.*, 1998).

A capacidade dos parasitos em alterar funções na célula hospedeira e influenciar a resposta imune é o que permite o estabelecimento da infecção. Este processo se dá devido ao fato do parasito conseguir modular mecanismos básicos de controle da infecção pelas células hospedeiras já no contato inicial entre os dois, como a fagocitose.

1.1.4 FAGOCITOSE E PATÓGENOS INTRACELULARES

A fagocitose é o processo pelo qual células podem ingerir e digerir material particulado. Em eucariotos unicelulares é o mecanismo primário de obtenção de alimento. Já em metazoários, a fagocitose deixou de ser apenas para nutrição e passou a ser um mecanismo de internalização, destruição e remoção de partículas estranhas. Em mamíferos, é um mecanismo envolvido no remodelamento tecidual durante o desenvolvimento, na inflamação, na remoção

de células senescentes e é o principal mecanismo celular de defesa contra a infecção por microorganismos (PAUL, 2003).

Durante a resposta imune inata, o reconhecimento de diferentes patógenos é mediado por uma série de moléculas de superfície e citoplasmáticas agrupadas como receptores reconhecedores de padrões (do inglês, *pattern-recognition receptors* – PRRs). Macrófagos e células dendríticas expressam na superfície da membrana uma variedade de PRRs envolvidos no reconhecimento e indução da resposta imune. Esses receptores reconhecem distintos padrões bioquímicos moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs) e compõem um grupo de receptores com especificidade geneticamente determinada, e são altamente conservados entre os diferentes organismos. Dentre os receptores envolvidos no reconhecimento destes padrões moleculares estão incluídos o receptor manose, o CD14, receptores do tipo *toll* (TLRs), receptores *scavenger* (SRs), receptores de superfície celular para a porção Fc de imunoglobulinas (Fc γ R) e para o componente C3b do complemento (CR3) (UNDERHILL & OZINSKY, 2002; STUART & EZEKOWITZ, 2005).

A fagocitose é um processo celular complexo que envolve uma série de eventos organizados divididos em etapas distintas e complementares, que pode ser classicamente dividida em quatro fases: o reconhecimento, a interação dos receptores com os ligantes (ligação), o englobamento e a internalização. A fagocitose de qualquer partícula consiste num conjunto de eventos que envolvem sinalização, reorganização do citoesqueleto e remodelamento da membrana plasmática para que haja a formação do fagossomo (Fig. 1) (PAUL, 2003).

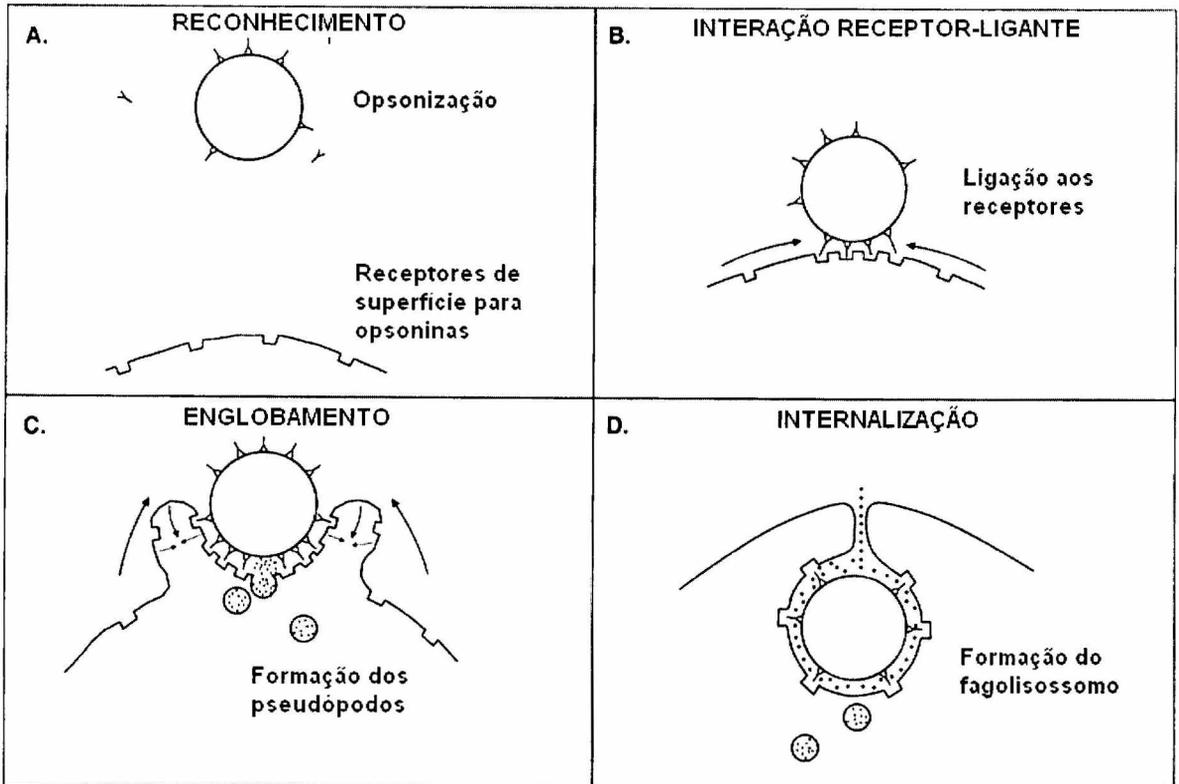


Figura 1: Etapas da fagocitose. A fagocitose se inicia com o reconhecimento por receptores fagocíticos do alvo fagocítico. Este pode estar ou não opsonizado (A). Em seguida, ocorre a interação receptor-ligante que desencadeia modificações da membrana plasmática e no citoesqueleto de actina (B). No englobamento, os pseudópodos envolvem a partícula ou microorganismo (C) e posteriormente, ocorre a internalização do alvo fagocítico a partir da fusão da membrana plasmática e formação do fagossomo (D) (Modificado de PAUL, 1999).

A etapa de reconhecimento pode se realizar diretamente, através dos receptores da superfície celular ou indiretamente, através da opsonização. Em seguida, ocorre a interação receptor-ligante, que desencadeia mudanças na membrana plasmática e no citoesqueleto, como a polimerização de actina e formação dos pseudópodos. Na região de contato com a partícula ou o microorganismo forma-se a taça fagocítica e inicia-se a extensão da membrana. A etapa de englobamento consiste na formação de pseudópodos que envolvem a partícula ou microorganismo. Por fim, a membrana plasmática do fagócito se funde, o que resulta na formação do fagossomo e internalização da partícula ou

microorganismo. Após os eventos envolvidos na internalização, ocorre em geral a degradação das partículas ingeridas, como microorganismos, células senescentes e partículas estranhas ao organismo (PAUL, 2003; SWANSON, 2008).

Em resposta à fagocitose, as células fagocíticas aumentam o consumo de oxigênio (STAFFORD *et al.*, 2002). Os radicais intermediários do oxigênio (ROI) são importantes moléculas microbicidas produzidas por células fagocíticas, como macrófagos e neutrófilos (DINAUER, 1993; SEGAL, 1996). Os ROI são um grupo de moléculas produzidas em processos metabólicos, principalmente a partir da redução do oxigênio molecular (O_2). O complexo de enzimas responsável pela indução da explosão respiratória é conhecido como oxidase da explosão respiratória ou NADPH oxidase (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase). Durante a fagocitose, ocorre a montagem da NADPH oxidase na membrana do fagossomo em formação com subsequente liberação de ROI. Em organismos superiores, os ROI são componentes-chave na resposta imune inata, e, em mamíferos, a NADPH oxidase tem participação na produção de ROI pelas células fagocíticas ativadas e, conseqüentemente, na morte de microorganismos (BOGDAN, 2007).

Em paralelo a montagem da NADPH oxidase na membrana do fagossomo com subsequente liberação de ROI, ocorre a maturação do fagossomo. Esta maturação é realizada a partir de fusões do fagossomo com vesículas da via endocítica, levando por fim a formação do fagolisossomo. Este novo compartimento é um microambiente ácido devido a ação de próton ATPases e apresenta alta capacidade hidrolítica devido à presença de enzimas lisossomais, as quais atuam na degradação da partícula ou microorganismo fagocitado (STUART & EZEKOWITZ, 2005; KINCHEN & RAVICHANDRAN, 2008). No

interior dos fagolisossomos, os patógenos intracelulares sofrem degradação por ação conjunta das enzimas hidrolíticas e dos ROI.

Ao longo do processo evolutivo, alguns microorganismos desenvolveram estratégias que inibem a ação desses mecanismos microbicidas dos fagócitos. Tais mecanismos permitem a sobrevivência de patógenos dentro de compartimentos fagolisossomais, modificação do compartimento impedindo a fusão com lisossomos ou escape do fagossomo antes da fusão com lisossomos (ALBERTS *et al.*, 2004).

Microorganismos como protozoários do gênero *Leishmania* e a bactéria *Coxiella burnetii* conseguem sobreviver dentro de fagolisossomos por resistir à ambientes ácidos e a ação das enzimas hidrolíticas (SCIANIMANICO *et al.*, 1999; MAURIN *et al.*, 1992). Já *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, consegue modular a maturação do fagossomo e evitar que haja a fusão com lisossomos, permanecendo em um compartimento com características de endossomo primário (RUSSELL, 2001). Por fim, patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri* secretam enzimas que degradam a parede do fagossomo, o que promove o rompimento da membrana e liberação das bactérias no citoplasma. Dessa maneira, esses patógenos evitam a fusão do fagossomo com o lisossomo e ganham acesso ao citoplasma da célula onde se multiplicam (GOETZ *et al.*, 2001). Essas estratégias permitem que patógenos intracelulares modulem os mecanismos microbicidas da célula hospedeira durante o processo fagocítico.

Recentemente foi demonstrado que a via fagocítica se comunica com a via autofágica, e que essa comunicação reforça os mecanismos microbicidas envolvidos na resposta imune inata. Foi evidenciada a conexão entre a fagocitose e a autofagia a partir da correlação do processo autofágico com a sinalização

mediada pelo reconhecimento de PAMPs via TLRs. Sanjuan e colaboradores (2007) mostraram que o reconhecimento via TLR2 promove rápido recrutamento de elementos da via autofágica para o fagossomo, o que resulta em um processo de fusão com lisossomo mais rápido quando comparado com uma fagocitose sem estimulação do TLR2. Adicionalmente, foi mostrado que há desencadeamento do processo autofágico em resposta a sinalização via TLR4 e TLR7 (XU *et al.*, 2007; DELGADO *et al.*, 2008). Esses estudos mostram que, em células infectadas por *M. tuberculosis*, a indução de autofagia a partir do reconhecimento e estímulo de TLR4 e TLR7 promove a fusão dos fagossomos das bactérias com autofagossomos e a redução da viabilidade dos bacilos. Esse reconhecimento sinaliza para o desenvolvimento de uma possível estratégia terapêutica para o combate a infecção de microrganismos intracelulares a partir da modulação da autofagia via TLRs. O que sugere a autofagia como um processo celular complementar a fagocitose durante a resposta da imunidade inata a infecção por patógenos intracelulares.

1.1.5 AUTOFAGIA

A autofagia é uma importante via de degradação de macromoléculas intracelulares em células animais. Foi, originalmente, descrita como um mecanismo importante para manutenção da homeostase celular (MORTIMORE & SCHWORER, 1977). Ela consiste em um processo fisiológico natural que possui importância fundamental para a renovação celular e aquisição de energia em condições de estresse (KLIONSKY & EMR, 2000). A degradação de proteínas e

organelas celulares é um processo conservado evolutivamente e ocorre pela integração da via autofágica com lisossomos (KLIONSKY & OHSUMI, 1999).

Aspectos morfológicos de células em autofagia foram, inicialmente, caracterizados em células de mamíferos. Por outro lado, estudos da genética de levedo *Saccharomyces cerevisiae* permitiram a identificação de genes e moléculas envolvidos na via autofágica (MEIJER & CODOGNO, 2004). Em mamíferos foram descritas microautofagia, macroautofagia, conhecida como autofagia, e autofagia mediada por chaperonas, como as principais vias autofágicas (CUERVO, 2004).

A autofagia ocorre naturalmente em células, porém pode ser induzida em resposta a situações diferentes de estresse, como baixa concentração de nutrientes, alteração do volume celular, estresse oxidativo, acúmulo de proteína citoplasmática, sinalização hormonal, irradiação, tratamento xenobiótico e elevação de temperatura (MEIJER & CODOGNO, 2004). O processo autofágico em resposta às baixas concentrações de nutrientes (*Starvation*) vem sendo amplamente estudado devido à sua importância fisiológica, visto que aminoácidos disponibilizados no processo autofágico são utilizados no metabolismo da célula (van SLUIJTERS *et al.*, 2000).

O processo autofágico ocorre de maneira ordenada (Fig. 2). Inicialmente, uma porção do citoplasma e algumas organelas, como retículo endoplasmático, mitocôndria e peroxissomos são seqüestrados por uma camada dupla de membrana, originando o autofagossomo. A origem dessa membrana dupla é desconhecida, mas evidências indicam que essa estrutura origina-se de regiões do retículo endoplasmático sem ribossomos (DUNN, 1990a). Posteriormente, o autofagossomo funde-se com lisossomos, perde a membrana interna e torna-se ácido devido à aquisição de proteínas e enzimas lisossomais. Essa organela é

chamada de autofagolisossomo ou autolisossomo, onde o material seqüestrado é degradado (DUNN, 1990b). Todas as etapas envolvidas no processo autofágico são dependentes de ATP (KIM & KLIONSKY, 2000) e da sinalização de moléculas que modulam a atividade e expressão de genes relacionados à autofagia (MEIJER & CODOGNO, 2004).

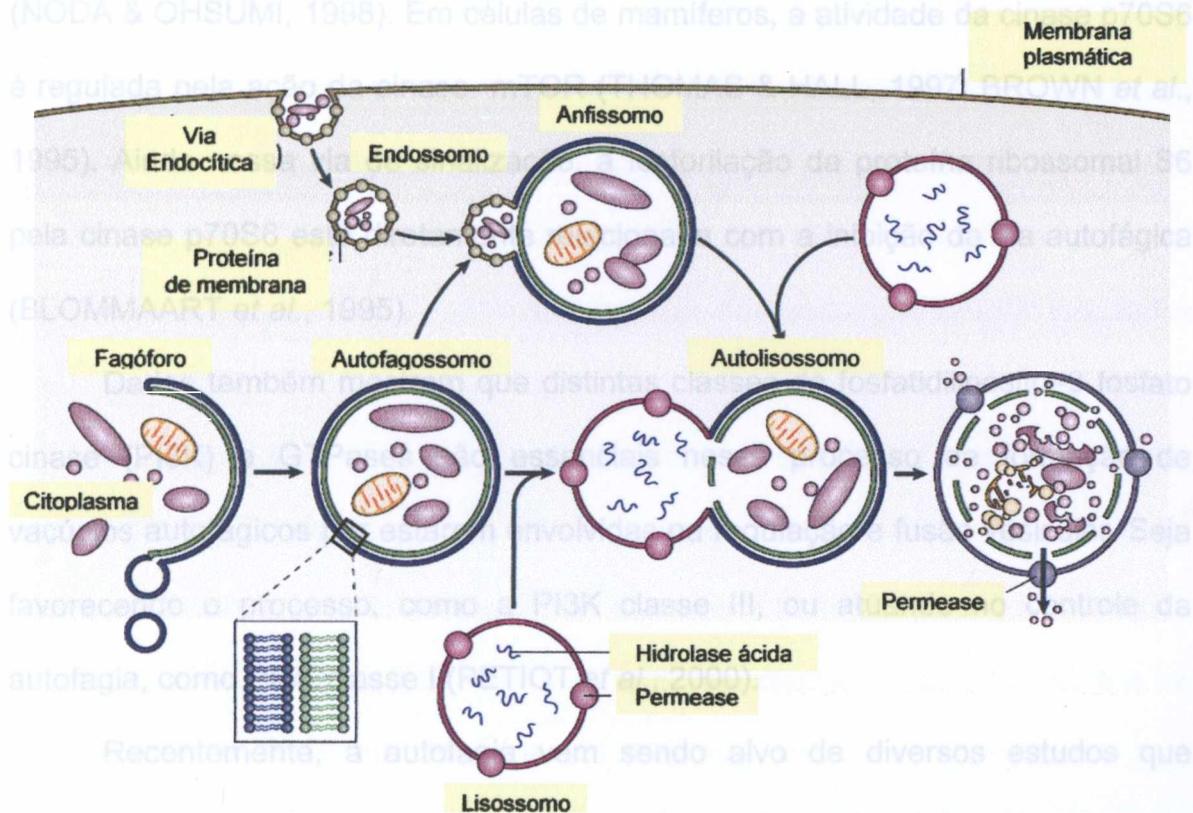


Figura 2: Via autofágica. A autofagia se inicia com o seqüestro de porção do citoplasma e/ou organelas por um compartimento denominado de fagóforo. Posteriormente, há a formação do autofagossomo, que é uma vesícula que caracteristicamente possui dupla membrana. Em seguida ocorre a maturação do autofagossomo. Este pode primariamente se fundir com endossomos (anfissomo) ou pode se fundir direto com lisossomos e formar o autolisossomo. No interior do autolisossomo o material seqüestrado é degradado (Modificado de KLIONSKY, 2007).

Foi demonstrado que a cinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin kinase) exerce um papel importante na sinalização da autofagia em células eucarióticas. mTOR participa da via de sinalização envolvidas no crescimento e

metabolismo de células, sendo regulada por fatores de crescimento, nutrientes, energia e estresse (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). A primeira evidência para a função da mTOR no controle da autofagia foi obtida em hepatócitos de ratos, quando o efeito da rapamicina – droga que inibe a função da cinase mTOR – induziu à autofagia em presença de aminoácidos (BLOMMAART *et al.*, 1995). Posteriormente, a mesma estimulação da autofagia foi observada em levedo (NODA & OHSUMI, 1998). Em células de mamíferos, a atividade da cinase p70S6 é regulada pela ação da cinase mTOR (THOMAS & HALL, 1997; BROWN *et al.*, 1995). Ainda nessa via de sinalização, a fosforilação da proteína ribossomal S6 pela cinase p70S6 está diretamente relacionada com a inibição da via autofágica (BLOMMAART *et al.*, 1995).

Dados também mostram que distintas classes de fosfatidilinositol-3 fosfato cinase (PI3K) e GTPases são essenciais nesse processo de formação de vacúolos autofágicos por estarem envolvidas na regulação e fusão vesicular. Seja favorecendo o processo, como a PI3K classe III, ou atuando no controle da autofagia, como PI3K classe I (PETIOT *et al.*, 2000).

Recentemente, a autofagia vem sendo alvo de diversos estudos que demonstram sua participação no controle ou favorecimento da infecção por alguns patógenos intracelulares. Alguns microorganismos intracelulares interagem com a via autofágica na célula hospedeira e desenvolvem estratégias distintas de sobrevivência. *Porphyromonas gingivalis* e *Brucella abortus*, por exemplo, induzem a formação de autofagossomos, o que favorece sua sobrevivência em células infectadas (KIRKEGAARD *et al.*, 2004). *Coxiella burnetti*, apesar de não induzir vacúolos autofágicos, tem sua sobrevivência e replicação favorecidas mediante indução de autofagia (GUTIERREZ *et al.*, 2005). De forma distinta,

cepas virulentas de *Legionella pneumophila* promovem um atraso na formação de autofagolisossomos em macrófagos infectados, favorecendo o estabelecimento da infecção (KIRKEGAARD *et al.*, 2004). Alternativamente, em macrófagos humanos, a indução de autofagia inibe a sobrevivência de cepas avirulentas e virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* (GUTIERREZ *et al.*, 2004).

Pouco se sabe sobre a interferência da autofagia na infecção por *Leishmania*. Evidências indicam que o vacúolo parasitóforo induzido por *L. mexicana*, espécie do mesmo complexo que *L. amazonensis*, adquire nutrientes citosólicos por microautofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1999). E recentemente, Pinheiro e colaboradores (2009) demonstraram que a indução de autofagia promove aumento da carga parasitária em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*. Estes dados sugerem a participação do processo autofágico na infecção por *Leishmania*, o que indica que a via autofágica pode estar sendo ativada durante a infecção, o que viria a favorecer a sobrevivência do parasito no interior de macrófagos infectados. Dessa maneira, a partir do acesso ao conteúdo citoplasmático através da interação com a via autofágica, o parasito passa a ter uma permanente fonte de nutrientes que vem a favorecer sua multiplicação com conseqüente estabelecimento e disseminação da infecção (como discutido por GUTIERREZ *et al.*, 2005). Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel da autofagia na infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por *L. amazonensis*.

1.2 JUSTIFICATIVA

Para compreensão dos mecanismos que controla a infecção por *Leishmania* a elucidação dos eventos que ocorrem durante interação parasito célula-hospedeira é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas estratégias que auxiliem no controle da doença. Dessa maneira, estudos que visem abordar aspectos ainda pouco explorados da interação macrófago-*Leishmania* tornam-se ferramentas que irão somar novos conhecimentos nesta área.

Em estudo anterior, Schaible e colaboradores (1999) sugerem que o vacúolo parasitóforo induzido por *L. mexicana* adquire nutrientes citosólicos por microautofagia. Esse dado correlacionou pela primeira vez a participação do processo autofágico com a infecção por *Leishmania*, o que sugere que o processo autofágico pode interagir positivamente com o parasito. Recentemente, Pinheiro e colaboradores (2009) demonstraram que a indução de autofagia promove aumento da carga parasitária em macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*.

A autofagia vem sendo descrita como um mecanismo do sistema imune inato e adaptativo envolvido na infecção por diversos microorganismos intracelulares, sendo protetor ou favorecendo o estabelecimento da infecção a depender do parasito (LEVINE & DERETIC, 2007). Nesse contexto, a infecção por alguns microorganismos pode ser favorecida ou não pela indução de autofagia em células previamente infectadas. O processo autofágico ao mesmo instante que inibe a sobrevivência intracelular de *M. tuberculosis*, é capaz de favorecer a multiplicação de *C. burnetii* dentro de vacúolos parasitóforos que adquirem características autofágicas (GUTIERREZ *et al.*, 2004; GUTIERREZ *et*

al., 2005). O que torna evidente que a interação positiva ou negativa do processo autofágico com comportamentos induzidos pelos microorganismos intracelulares depende das características inerentes a maneira do patógeno interagir com a célula-hospedeira.

Já que *L. mexicana* interage com a via autofágica e é espécie do mesmo complexo que *L. amazonensis*, é possível que similarmente, o vacúolo por ela induzido interaja com a via autofágica e adquira nutrientes citosólicos que favoreçam sua sobrevivência intracelular. Além disso, o vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* é semelhante em tamanho e em constituição ao de *C. Burnetii* (VERAS *et al.*; 1995; VERAS *et al.*; 1994; RUSSELL *et al.*; 1992). Assim, como ocorre com *C. burnetii*, o vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* pode estar conectando-se com a via autofágica, o que favoreceria o estabelecimento da infecção. Além disso, foi demonstrado recentemente que *L. amazonensis* se beneficia da indução de autofagia (PINHEIRO *et al.*, 2009). Dessa forma, foi estabelecida a hipótese de que a indução de autofagia favoreceria a sobrevivência intracelular do parasito em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J infectados por *L. amazonensis*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da autofagia na infecção, *in vitro*, de macrófagos de camundongos CBA/J por *L. amazonensis*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da indução de autofagia sobre o curso da infecção de macrófagos de camundongos CBA/J por *L. amazonensis*.
- Avaliar o efeito da autofagia sobre a fagocitose de *L. amazonensis* por macrófagos de camundongos CBA/J.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens CBA/J, BALB/c e C57BL/6, fêmeas ou machos, com 6 a 10 semanas de idade, obtidos e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ-BA (Protocolo número 112 do CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais). Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada e água acidificada e permaneceram sob condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade.

2.2 PARASITOS

Os parasitos da espécie *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br88/Ba-125) utilizados neste trabalho foram cedidos pelo Laboratório de Imunologia e Parasitologia e mantidos no Laboratório de Patologia e Biointervenção - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ-BA.

Os parasitos foram mantidos por passagens sucessivas em animais (camundongos da linhagem C57BL/6) para a manutenção da virulência e infectividade. Antes da sua utilização nos experimentos, os parasitos foram isolados dos linfonodos poplíteos desses camundongos e mantidos em cultura axênica por, no máximo, sete passagens, em meio Schneider completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO) e gentamicina (SIGMA) na concentração de 50 µg/mL.

As promastigotas foram cultivadas em estufa BOD a 24°C. O crescimento das culturas de promastigotas foi acompanhado diariamente, pela contagem em câmara de Neubauer. Promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram utilizadas para a infecção.

2.3 OBTENÇÃO E CULTIVO DE MACRÓFAGOS

2.3.1 MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFLAMATÓRIOS

Ascite foi induzida em camundongos CBA/J por injeção intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato a 3% (SIGMA), maturado por pelo menos 30 dias. Após 4 dias da injeção de tioglicolato, os animais foram submetidos a eutanásia e os macrófagos peritoneais de exsudado inflamatório foram obtidos através de lavagens da cavidade peritoneal dos camundongos com uma solução gelada (4°C) de salina com heparina sódica (DISOTRON) em uma concentração de 20 UI/mL. Em seguida, após centrifugação de 100Xg a 4°C por 10 minutos, houve quantificação do número de células obtidas por contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, foi feito o plaqueamento das células, em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 macrófagos por poço em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) completo [DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 2 g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 25mM de HEPES (SIGMA), 1mM de glutamina (SIGMA) e 0,2% de ciprofloxacina (CLARIS)]. As culturas foram mantidas por 18 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

2.3.2 MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES

Macrófagos peritoneais residentes foram obtidos a partir de lavagens da cavidade peritoneal dos camundongos com uma solução gelada (4°C) de salina com heparina sódica (DISOTRON) em uma concentração de 20 UI/mL. Em seguida, os macrófagos foram contados e plaqueados em meio DMEM completo na concentração de 2×10^5 por poço, em placas de 24 poços e cultivados por 18 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

2.3.3 MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA

Camundongos foram submetidos à eutanásia e tiveram as patas traseiras removidas. Após retirada e limpeza do fêmur e da tíbia do camundongo, as duas epífises foram seccionadas e com a seringa de 10 mL, conectada a uma agulha de 21g ou 22g foi injetado meio RPMI completo [RPMI suplementado com 20mM de HEPES, 2 g/L de bicarbonato, 20% de soro bovino fetal inativado (GIBCO), 1mM de glutamina (SIGMA) e 0,2% de ciprofloxacina (CLARIS)] para retirar a medula óssea. As células foram armazenadas em tubos de 50 mL, homogeneizadas e centrifugadas a 225Xg por 5 minutos a 4°C. Foram então ressuspensas em RPMI completo e passadas na seringa conectada a uma agulha de 19g, em volume final de 10 mL por placa. Após 24 horas, foram recuperados os precursores de macrófagos derivados de medula óssea (BMMΦ), lavando as placas com o próprio meio de cultura e transferindo o sobrenadante contendo células precursoras para um tubo de 50 mL. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 225Xg a 4°C, após desprezar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo com 30% de sobrenadante de células L929, em volume final de 10 mL por placa. No 4º dia de cultura, foi adicionado mais 5 mL de meio RPMI completo com 30% de sobrenadante de L929 (somando

15 mL por placa). No 5º dia de cultivo, foi coletado o meio de cultura envelhecido. Em seguida, foi feita uma lavagem rápida, a fim de retirar as células não aderentes. Na placa contendo os macrófagos aderidos, foi adicionado 5 mL de PBS-EDTA 5mM (SIGMA) gelado (4°C) e mantidos em gelo por 10 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas com jatos vigorosos de PBS-EDTA 5 mM gelado (4°C), sempre colocando o lavado em tubo de 50 mL. Por fim, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 225xg a 4°C e ressuspensas em DMEM completo, contadas e plaqueadas em DMEM completo na concentração de 2×10^5 por poço, em placas de 24 poços e cultivadas por 18 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

2.4 INDUÇÃO FISIOLÓGICA OU FARMACOLÓGICA DE AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS

Para indução de autofagia os macrófagos foram incubados em meio pobre em nutrientes EBSS – Earl's Balanced Salt Solution - SIGMA – em estufa suplementada com 5% de CO₂ para indução de autofagia por privação de aminoácidos (*Starvation*), descrita como indução fisiológica de autofagia (MUNAFO & COLOMBO, 2001). Para indução farmacológica de autofagia, macrófagos foram incubados em meio rico em nutrientes (DMEM completo) em presença de 50 µg/mL de rapamicina (SIGMA), droga que inibe a atividade da cinase mTOR (NODA & OHSUMI, 1998) e induz o processo autofágico mesmo em presença de nutrientes.

Em alguns ensaios macrófagos foram incubados em meio pobre em nutrientes EBSS e induzido à autofagia fisiológica, mas em presença de

wortmanina 100 nM (SIGMA), droga que inibe a atividade de PI3K e, conseqüentemente, a maturação dos autofagossomos em autofagolisossomos (ESKELINEN, *et al.*, 2002; BLOMMAART *et al.*, 1997).

2.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS CBA/J POR *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito da indução de autofagia em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J infectados, *in vitro*, por *L. amazonensis*, macrófagos foram infectados com promastigotas em fase estacionária na proporção de 10 parasitos por célula (10:1) e reincubados por 6 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas com solução salina para retirada das promastigotas não internalizadas. Em seguida, macrófagos foram induzidos à autofagia fisiológica e farmacológica (como descrito no item 2.4). Em paralelo, um grupo induzido à autofagia fisiológica foi incubado em presença de wortmanina (como descrito no item 2.4). Nestes experimentos, macrófagos incubados em meio DMEM completo durante todo o curso da infecção foram considerados como grupo controle. Em seguida, 1 hora e meia, 3 horas e 6 horas após a indução de autofagia, as células foram fixadas, coradas por H&E e ao menos 400 células foram contadas ao microscópio óptico. Foram determinados o percentual de células infectadas e o número de parasitos por macrófago.

2.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DE *L. amazonensis* EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS CBA/J INFECTADOS

O efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J infectados por *L. amazonensis* foi avaliado. Macrófagos foram infectados com promastigotas em fase estacionária na proporção de 10 parasitos por célula (10:1) e reincubados por 6 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas com solução salina para retirada das promastigotas não internalizadas. Em seguida, macrófagos foram induzidos a autofagia fisiológica e farmacológica (como descrito no item 2.4). Em paralelo, um grupo foi induzido à autofagia fisiológica em presença de wortmanina. Nestes experimentos, após a infecção macrófagos foram reincubados em meio DMEM completo e utilizados como grupo controle não tratado. Em seguida, 1 hora e meia, 3 horas e 6 horas após a indução de autofagia, as células tiveram o meio trocado por meio Schneider completo e foram reincubadas em estufa BOD a 24°C. Após 3 dias de cultura foi determinada a carga parasitária a partir de contagem das promastigotas em câmara de Neubauer (adaptado de RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004).

2.7 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A FAGOCITOSE EM MACRÓFAGOS MURINOS

Para avaliar o efeito *in vitro* da indução de autofagia sobre a capacidade fagocítica de macrófagos murinos, as células foram induzidas à autofagia fisiológica e farmacológica (como descrito no item 2.4) e incubadas por 2 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Células controle foram incubadas durante as 2 horas apenas em meio DMEM completo. Em seguida, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária na proporção de 10 parasitos por célula (10:1), ou expostas a levedo morto (*Sarccharomyces cerevisiae* - SIGMA) na proporção de 10 partículas por macrófago (10:1), por 15, 30 e 60 minutos. Após a infecção ou adição de partículas, as células foram fixadas, coradas por H&E e ao menos 400 células foram contadas ao microscópio óptico. Foi determinado o percentual de fagocitose e o número de parasitos ou partículas por macrófago.

2.8 AVALIAÇÃO ULTRA-ESTRUTURAL DE MACRÓFAGOS EM AUTOFAGIA

Para avaliar aspecto ultra-estrutural de macrófagos induzidos à autofagia, antes ou após a infecção, ou exposição a partículas de levedo, os macrófagos foram distribuídos em placas de 6 poços na concentração de 2×10^6 por poço. Ao final dos experimentos, as células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM ao abrigo da luz por 40 minutos em temperatura ambiente. A seguir,

as células foram lavadas no mesmo tampão e desidratados em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%) por 10 minutos. As amostras foram emblocadas em resina epoxi Polybed (POLYSCIENCES). Após polimerização, cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo e coletados em grades de cobre de malha 400. Os cortes contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109 a 80 kV), e foi feita a análise ultra-estrutural dos macrófagos em autofagia.

2.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REVERSÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A FAGOCITOSE DE PARTÍCULAS POR MACRÓFAGOS

Para avaliar o efeito da reversão de autofagia sobre a capacidade fagocítica de macrófagos expostos *in vitro* a levedo, macrófagos peritoneais inflamatórios foram induzidos à autofagia fisiológica (como descrito no item 2.4) e incubados por 2 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. O grupo controle foi incubado em meio DMEM completo durante todo o experimento a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram incubadas em presença de levedo morto (*S. cerevisiae*) na proporção de 10 partículas por macrófago (10:1) por 1 hora. Após esse período, um grupo de macrófagos que estava em meio pobre em nutrientes foi reincubado em meio rico em nutrientes, e um segundo grupo mantido durante todo o experimento em meio pobre em nutrientes. Após o período de 1 hora adicional de incubação, as células foram fixadas, coradas por H&E e ao menos 400 células foram contadas ao microscópio óptico. Foi determinado o percentual de fagocitose e o número de partículas por macrófago.

2.10 AVALIAÇÃO DA CO-LOCALIZAÇÃO DE ZIMOSAN COM TAÇAS DE ACTINA EM MACRÓFAGOS MURINO EM AUTOFAGIA

Foi feita avaliação da co-localização de partículas de zimosan com taças de actina em macrófagos submetidos à autofagia. Macrófagos peritoneais inflamatórios foram induzidos à autofagia fisiológica ou farmacológica (como descrito no item 2.4) e incubadas por 2 horas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂. Em paralelo, como controle positivo, um grupo foi incubado em DMEM completo por 2 horas, mas em presença de wortmanina 100nM. A wortmanina promove inibição da atividade de PI3K, o que impede a etapa de internalização no processo fagocítico, contudo não inibe a etapa de ligação da partícula com a célula (PAUL, 2003; ARAKI *et al.*, 1996). Neste grupo teremos a interação da partícula com a célula sem que haja fagocitose. Células controle foram incubadas durante as 2 horas apenas em meio DMEM completo. Logo em seguida foi feita a adição de zimosan-FITC (SIGMA) na proporção de 10 partículas por macrófago (10:1), e as placas foram centrifugadas a 4°C por 5 minutos a 500Xg e incubadas a 4°C por 10 minutos. Esse procedimento permite que ocorra a interação sem haver internalização das partículas. Após esse período, foi feita a lavagem para retirada de partículas não aderidas, e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (SIGMA) por 20 minutos. As células então foram coradas com DAPI (VECTARSHIELD), que marca núcleo em azul, e com faloidina 0,16 µg/mL (SIGMA) que marca actina polimerizada em vermelho. Em seguida, as células foram analisadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX51) acoplado a um sistema de câmera (Olympus Q-Colors). Foram fotografados 5 campos de cada grupo e as imagens foram montadas utilizando

o programa Image-Pro Plus 6.0. A avaliação da co-localização foi feita por contagem de pelo menos 600 células nos 5 campos fotografados utilizando o Image-Pro Plus 6.0. Foi determinado o percentual células marcadas em vermelho que co-localizaram com zimosan-FITC em verde. Que podemos inferir como etapa da fagocitose de ligação da partícula com a célula. Etapa na qual as taças de actina já foram formadas (PAUL, 2003).

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e a análise estatística foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.00 - GraphPad Software Incorporate. Os gráficos em barra representam as médias \pm SD (desvio padrão) ou SE (erro padrão) dos grupos dentro de um experimento ou do conjunto de experimentos, respectivamente. Todos os experimentos foram feitos pelo menos em triplicata e repetidos quatro vezes. Para comparação entre os grupos foi utilizado One-way ANOVA e o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA SOBRE O CURSO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS CBA/J POR *L. amazonensis*

Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 6 horas. Em seguida foi feita a lavagem das células para retirada dos parasitos não internalizados e foi feita a indução de autofagia. Macrófagos foram reincubados em meio EBSS para indução fisiológica de autofagia em ausência (*Starvation*) ou presença de wortmanina (Wortmanina). Em paralelo, outro grupo foi induzido farmacologicamente à autofagia (Rapamicina). E o grupo controle foi reincubado apenas em meio DMEM completo (Controle). Posteriormente, em diferentes momentos (Fig. 3), as células foram fixadas e o percentual de células infectadas e o número de parasitos por célula foi determinado. Além disso, em um segundo instante as células ao invés de serem fixadas tiveram o meio de cultura trocado por meio Schneider completo e foram reincubadas. Após três dias, foi feita a contagem dos parasitos liberados no meio de cultura para determinar a carga parasitária.

Em todos os tempos avaliados, após a indução de autofagia, não foi observada alteração no percentual de macrófagos infectados (Fig. 3A, $p > 0,05$) e no número de parasitos por célula (Fig. 3B, $p > 0,05$) em células infectadas por *L. amazonensis*. Entretanto, a indução fisiológica de autofagia em macrófagos infectados por *L. amazonensis* promoveu aumento da carga parasitária (Fig. 4). A partir de três horas após a indução de autofagia, houve aumento de 60% da carga parasitária em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, a indução

farmacológica promoveu redução acentuada da carga parasitária (Fig. 4, $p < 0,05$). A adição de wortmanina em células em autofagia fisiológica reverteu discretamente o efeito induzido pela incubação em meio pobre em nutrientes, e promoveu no tempo de 6 horas redução de 30% na carga parasitária (Fig. 4, $p < 0,05$).

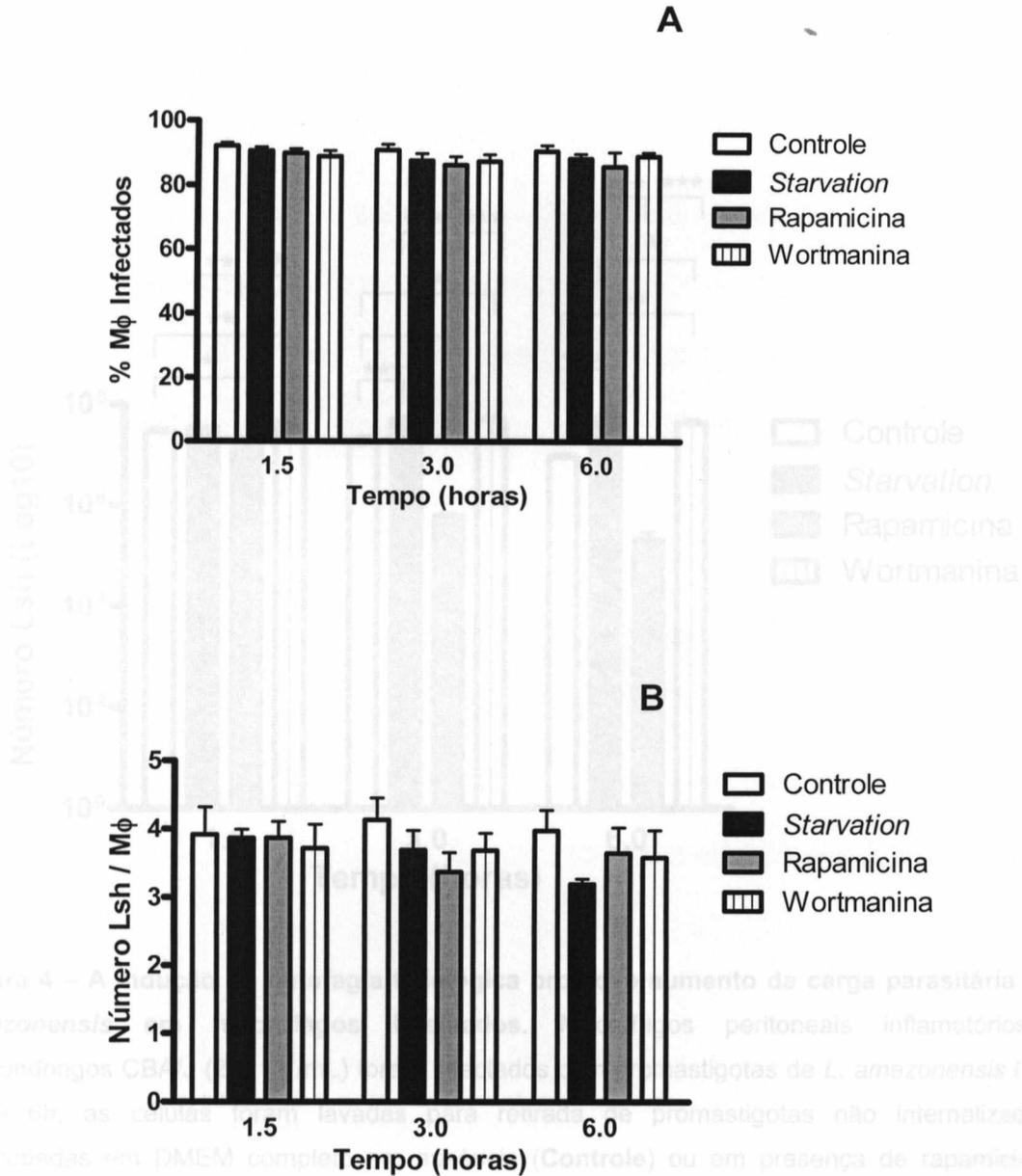


Figura 3 – A indução de autofagia não altera o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (10:1). Após 6h, as células foram lavadas para retirada de promastigotas não internalizadas e reincubadas em DMEM completo em ausência (**Controle**) ou em presença de rapamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para indução farmacológica de autofagia (**Rapamicina**). Em paralelo, células foram incubadas em meio EBSS para indução de autofagia fisiológica em ausência (**Starvation**) ou em presença de wortmanina 100 nM (**Wortmanina**). Diferentes momentos após fixação, foram determinados o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (**A**) e o número de parasitos por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, $p > 0,05$).

2.2 EFEITO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCITICA DO MACRÓFAGO MURINO

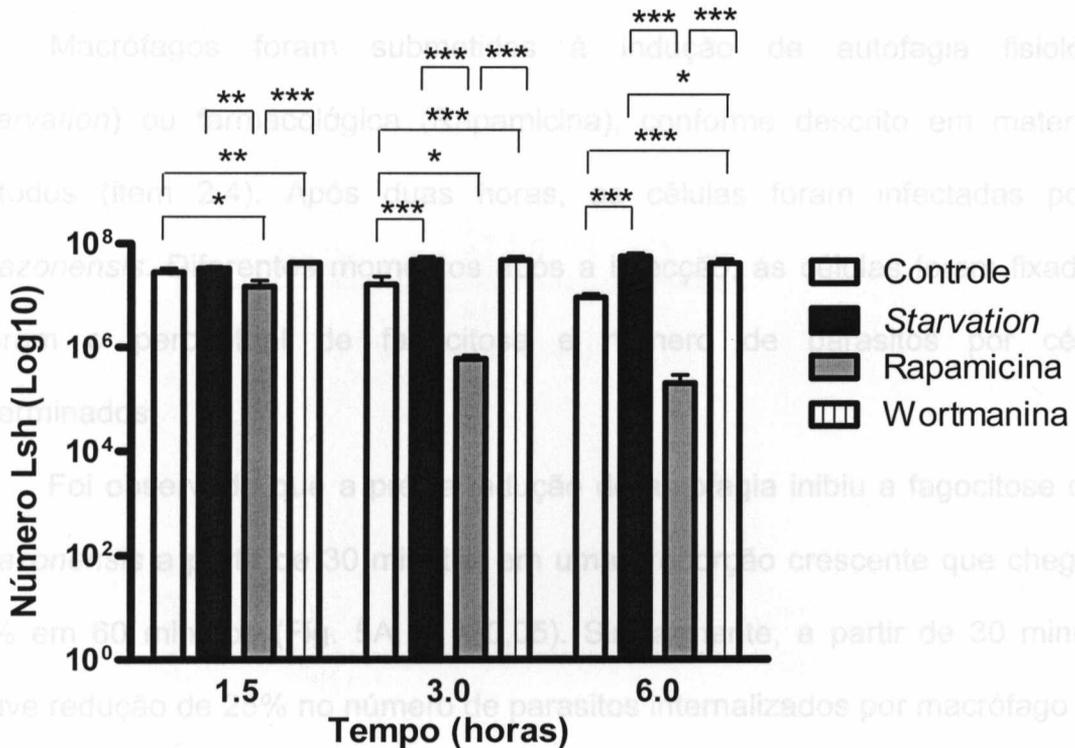


Figura 4 – A indução de autofagia fisiológica promove aumento da carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos infectados. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J (2×10^5 /mL) foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (10:1). Após 6h, as células foram lavadas para retirada de promastigotas não internalizadas e reincubadas em DMEM completo em ausência (**Controle**) ou em presença de rapamicina 50 μ g/mL para indução farmacológica de autofagia (**Rapamicina**). Em paralelo, células foram incubadas em meio EBSS para indução de autofagia fisiológica em ausência (**Starvation**) ou em presença de wortmanina 100nM (**Wortmanina**). Diferentes momentos após a indução de autofagia as células tiveram o meio de cultura trocado por meio Schneider completo e foram reincubadas. Após três dias de cultura foi feita a contagem dos parasitos e determinada a carga parasitária. As barras correspondem à média de um experimento realizado em quintuplicata \pm SD (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2 EFEITO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA DO MACRÓFAGO MURINO

Macrófagos foram submetidos à indução de autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (Rapamicina), conforme descrito em material e métodos (item 2.4). Após duas horas, as células foram infectadas por *L. amazonensis*. Diferentes momentos após a infecção, as células foram fixadas e tiveram o percentual de fagocitose e número de parasitos por células determinados.

Foi observado que a prévia indução de autofagia inibiu a fagocitose de *L. amazonensis* a partir de 30 minutos em uma proporção crescente que chegou a 50% em 60 minutos (Fig. 5A, $p < 0,05$). Similarmente, a partir de 30 minutos, houve redução de 25% no número de parasitos internalizados por macrófago (Fig. 5B, $p < 0,05$).

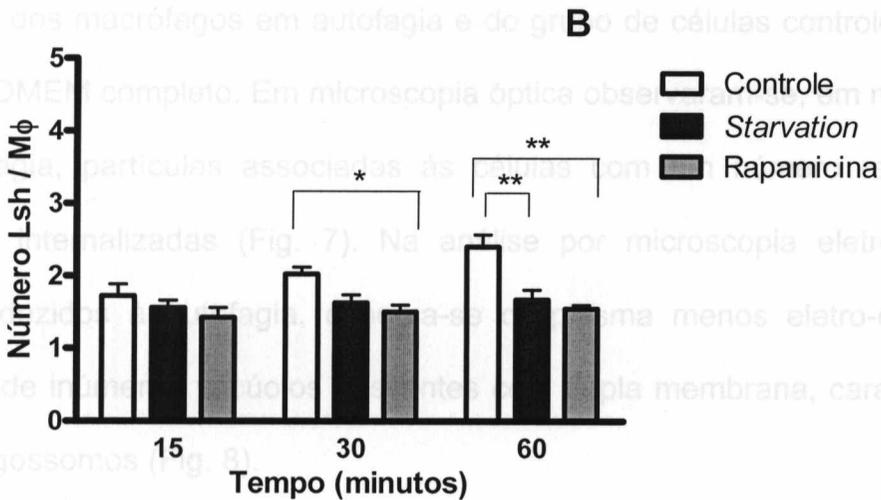
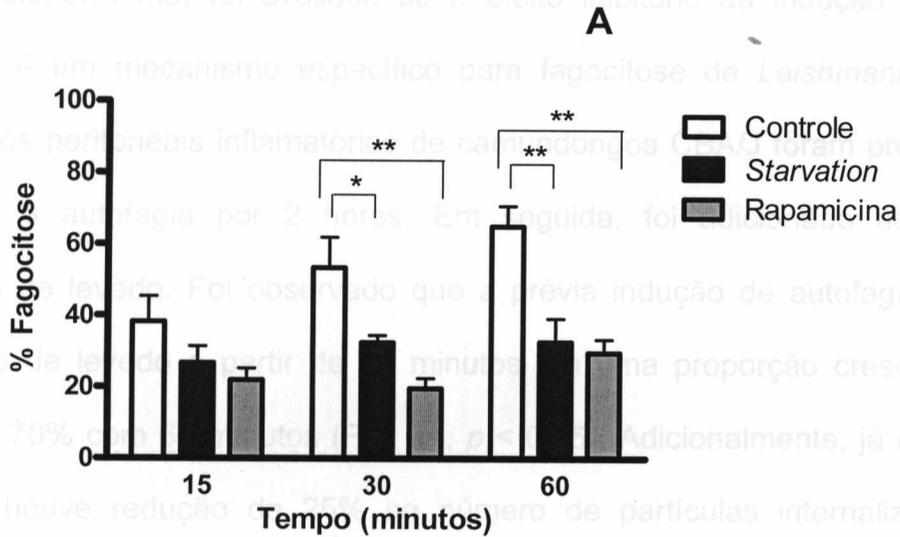


Figura 5 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de *L. amazonensis* por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J (2×10^5 /mL) foram incubados em meio EBSS para indução fisiológica de autofagia (**Starvation**), ou incubados em DMEM completo em ausência (**Controle**) ou presença de rapamicina 50 μ g/mL para indução farmacológica de autofagia (**Rapamicina**). Duas horas após, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10:1). Em diferentes tempos após a infecção, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A) e o número de parasitos por macrófago (B). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Posteriormente, foi avaliado se o efeito inibitório da indução prévia de autofagia é um mecanismo específico para fagocitose de *Leishmania*. Assim, macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J foram previamente induzidos à autofagia por 2 horas. Em seguida, foi adicionado às culturas partículas de levedo. Foi observado que a prévia indução de autofagia inibiu a fagocitose de levedo a partir de 15 minutos em uma proporção crescente que chegou a 70% com 60 minutos (Fig. 6A, $p < 0,05$). Adicionalmente, já em tempo precoce, houve redução de 25% no número de partículas internalizadas por macrófago (Fig. 6B, $p < 0,05$).

Foram feitas análises morfológicas tanto em microscopia óptica quanto eletrônica dos macrófagos em autofagia e do grupo de células controle incubado em meio DMEM completo. Em microscopia óptica observaram-se, em macrófagos em autofagia, partículas associadas às células com um número reduzido de partículas internalizadas (Fig. 7). Na análise por microscopia eletrônica, nos grupos induzidos à autofagia, observa-se citoplasma menos eletro-denso e a presença de inúmeros vacúolos nascentes com dupla membrana, características de autofagossomos (Fig. 8).

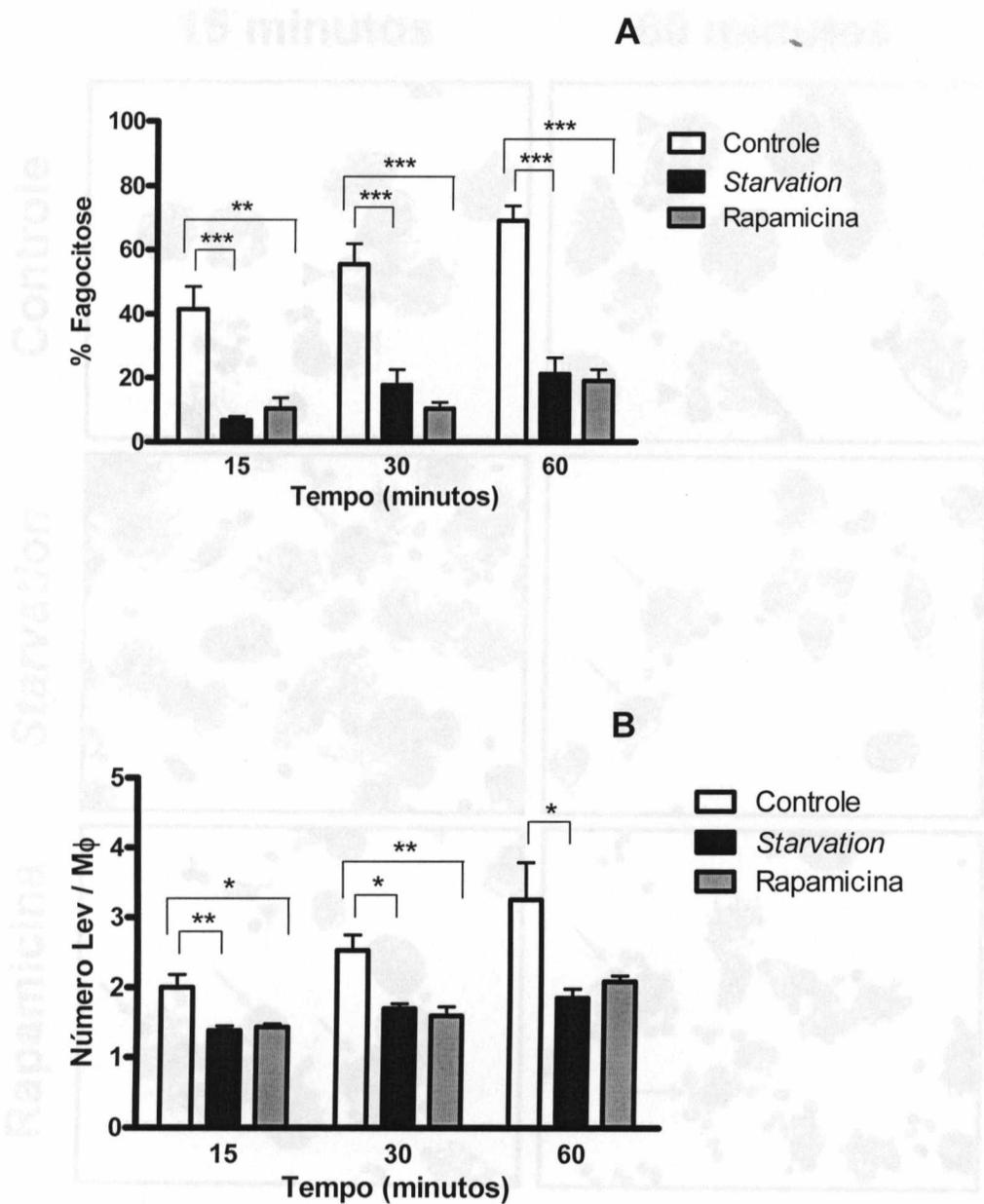


Figura 6 – Análise por microscopia óptica de macrófagos induzidos à autofagia. Macrófagos

Figura 6 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J (2×10^5 /mL) foram induzidos a autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Em diferentes tempos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

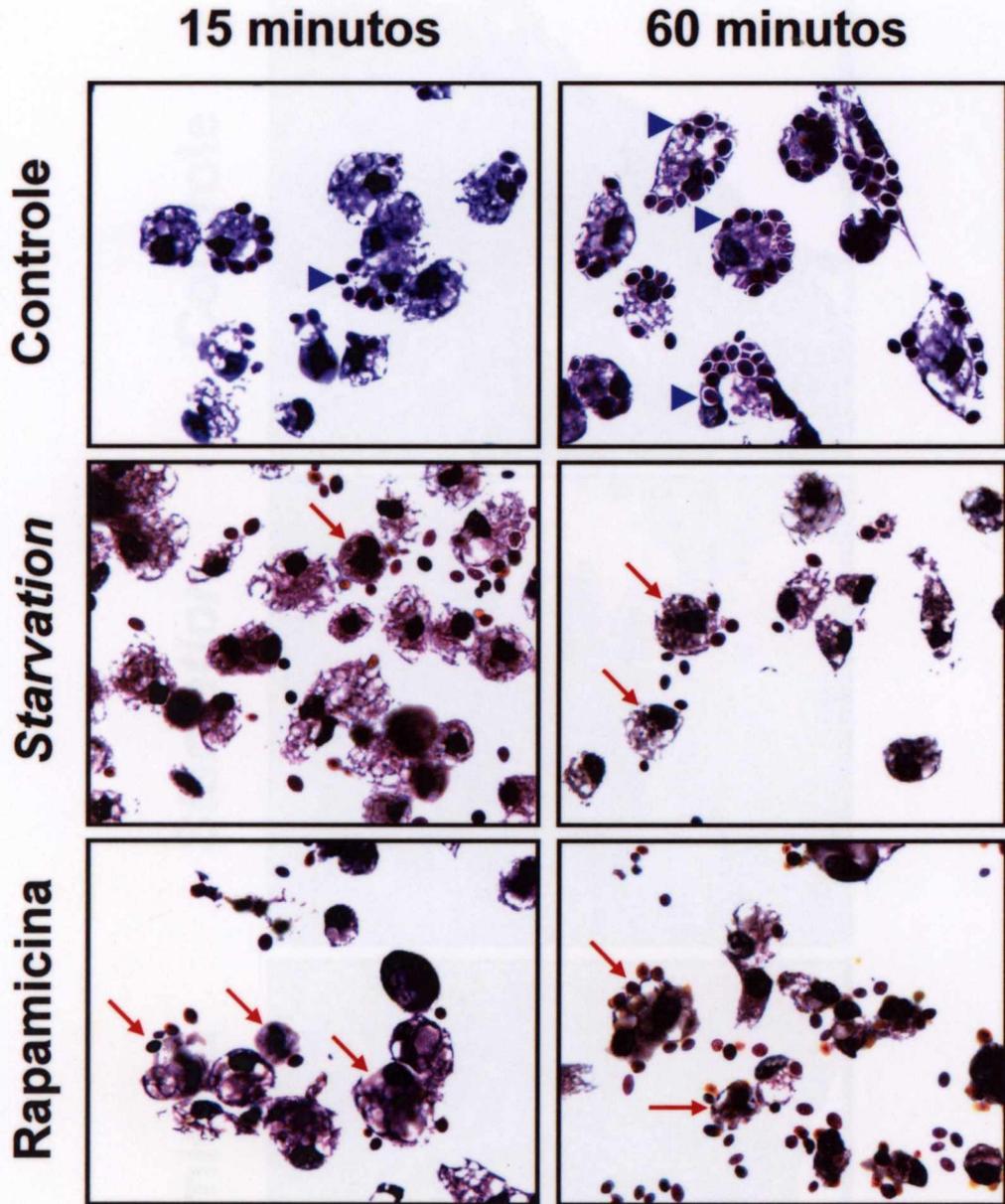


Figura 7 – Análise por microscopia óptica de macrófagos induzidos à autofagia. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1) por diferentes tempos. Em seguida, as células foram fixadas e coradas por H&E e o aspecto da cultura avaliado por microscopia óptica. As setas vermelhas indicam macrófagos que tem partículas de levedo associadas à superfície celular. Observa-se no grupo controle partículas de levedo no interior de vacúolos (cabeças de setas azuis). As imagens estão em aumento de 500x. Resultado ilustrativo de um experimento.

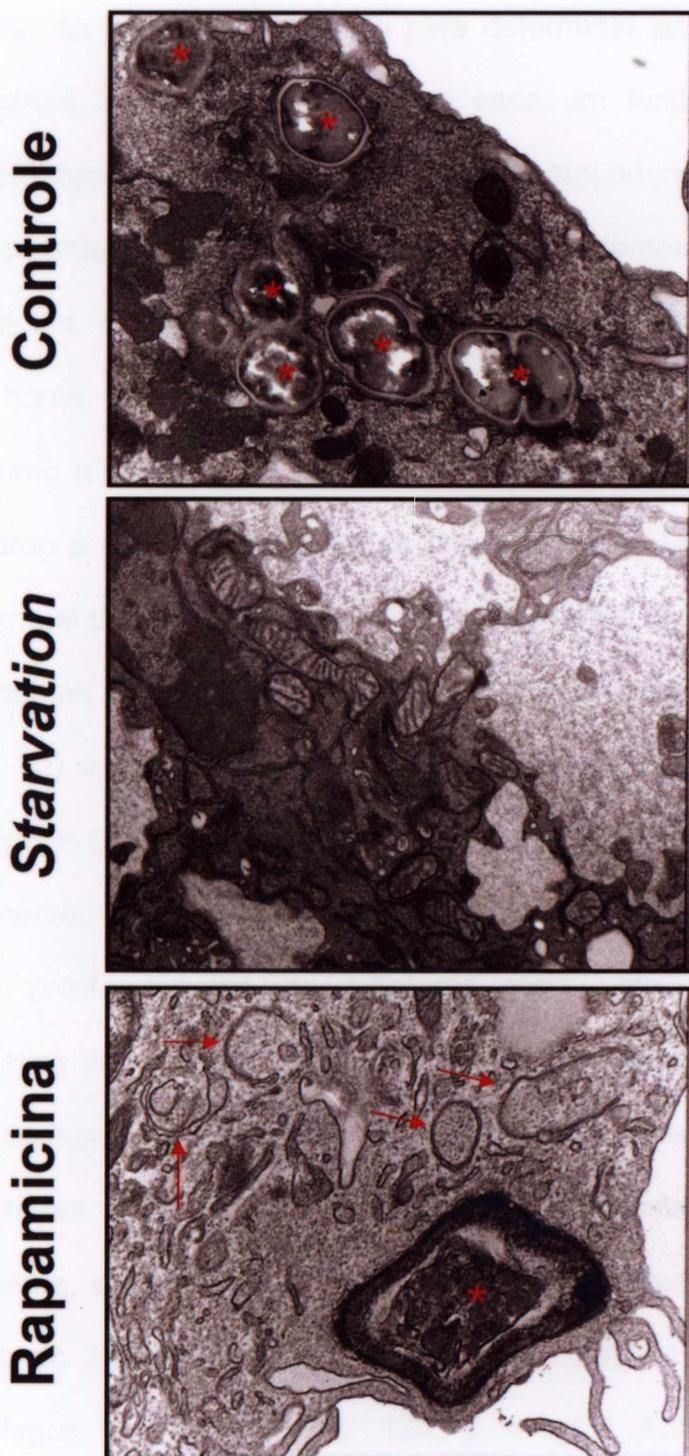


Figura 8 – Análise ultra-estrutural de macrófagos induzidos à autofagia. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J (2×10^5 /mL) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1) por 30 minutos. Em seguida, as células foram fixadas e o aspecto intracelular avaliado por microscopia eletrônica. Resultado ilustrativo de um experimento. Os asteriscos indicam partículas de levedo e as setas autofagossomos nascentes. As imagens estão em aumento de 20.000x.

Em seguida, foi feita uma avaliação para determinar se o efeito induzido pela autofagia sobre a capacidade fagocítica seria um fenômeno restrito ao modelo do macrófago peritoneal inflamatório de camundongos da linhagem CBA/J. Primeiramente, macrófagos peritoneais residentes e macrófagos derivados de medula, de camundongos CBA/J, foram previamente induzidos à autofagia por 2 horas. Em seguida, às culturas foram expostas a partículas de levedo. Assim como no modelo do macrófago peritoneal inflamatório, a indução de autofagia alterou a capacidade fagocítica desses tipos celulares. Há redução de 80% do percentual de fagocitose e de 40% do número de levedo por célula em macrófagos residentes (Fig. 9, $p < 0,05$), enquanto que em macrófagos derivados de medula (Fig. 10) a redução é de 60 e 20% respectivamente, em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$).

Posteriormente, foi avaliado se redução da capacidade fagocítica promovida pela prévia indução de autofagia seria uma peculiaridade do *background* genético do camundongo CBA/J. Para isso, macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c e C57BL/6 foram previamente induzidos à autofagia por 2 horas. Em seguida, às culturas foram expostas a partículas de levedo. Similarmente, a autofagia promoveu a redução da capacidade fagocítica, havendo redução de 25% em macrófagos de BALB/c (Fig. 11B, $p < 0,05$) e de 30% em macrófagos de C57BL/6 (Fig. 12A, $p < 0,05$). Em ambos os tipos celulares o número de partículas por célula foi 15% menor do que no grupo controle (Fig. 11B e 12B, $p < 0,05$).

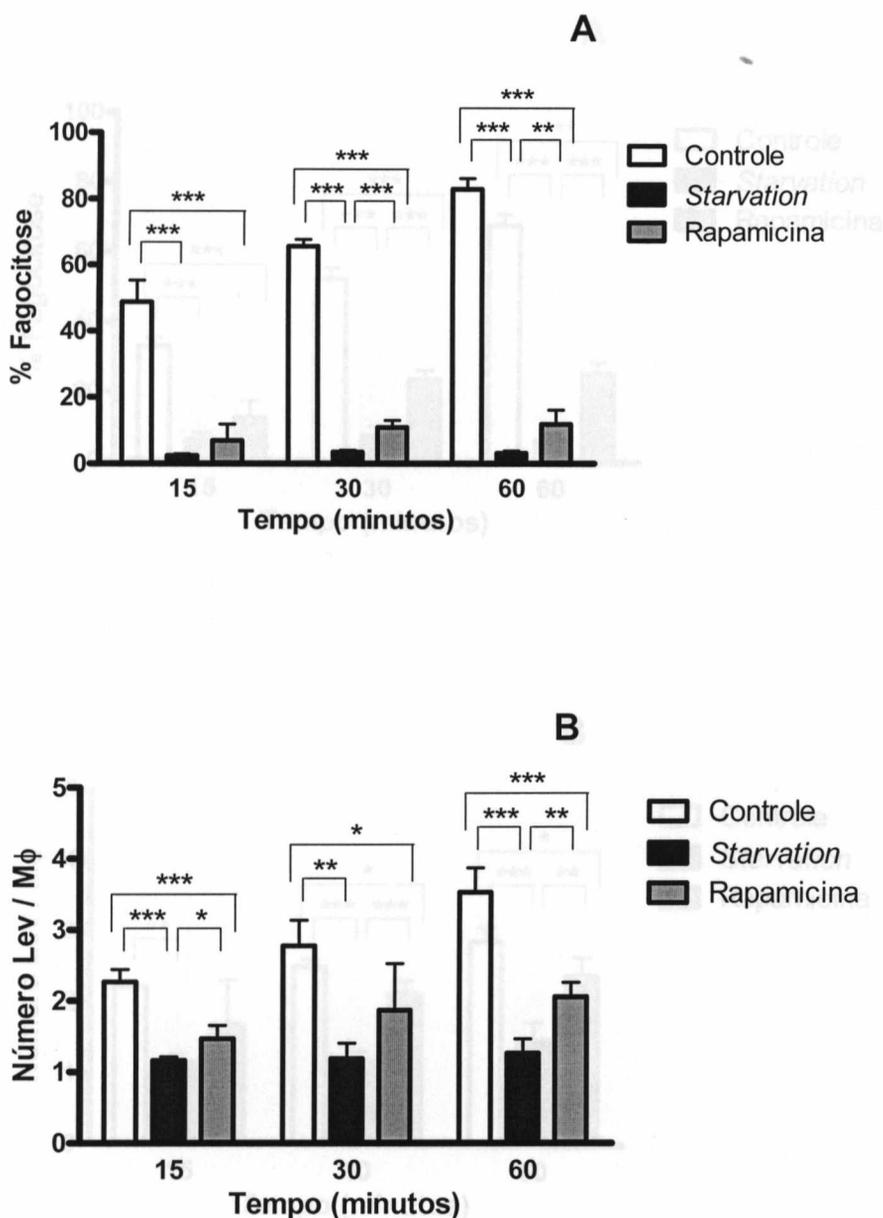


Figura 9 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos peritoneais residentes de camundongos CBA/J. Macrófagos peritoneais residentes de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Em diferentes tempos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de um experimento realizado em quintuplicata \pm SD (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

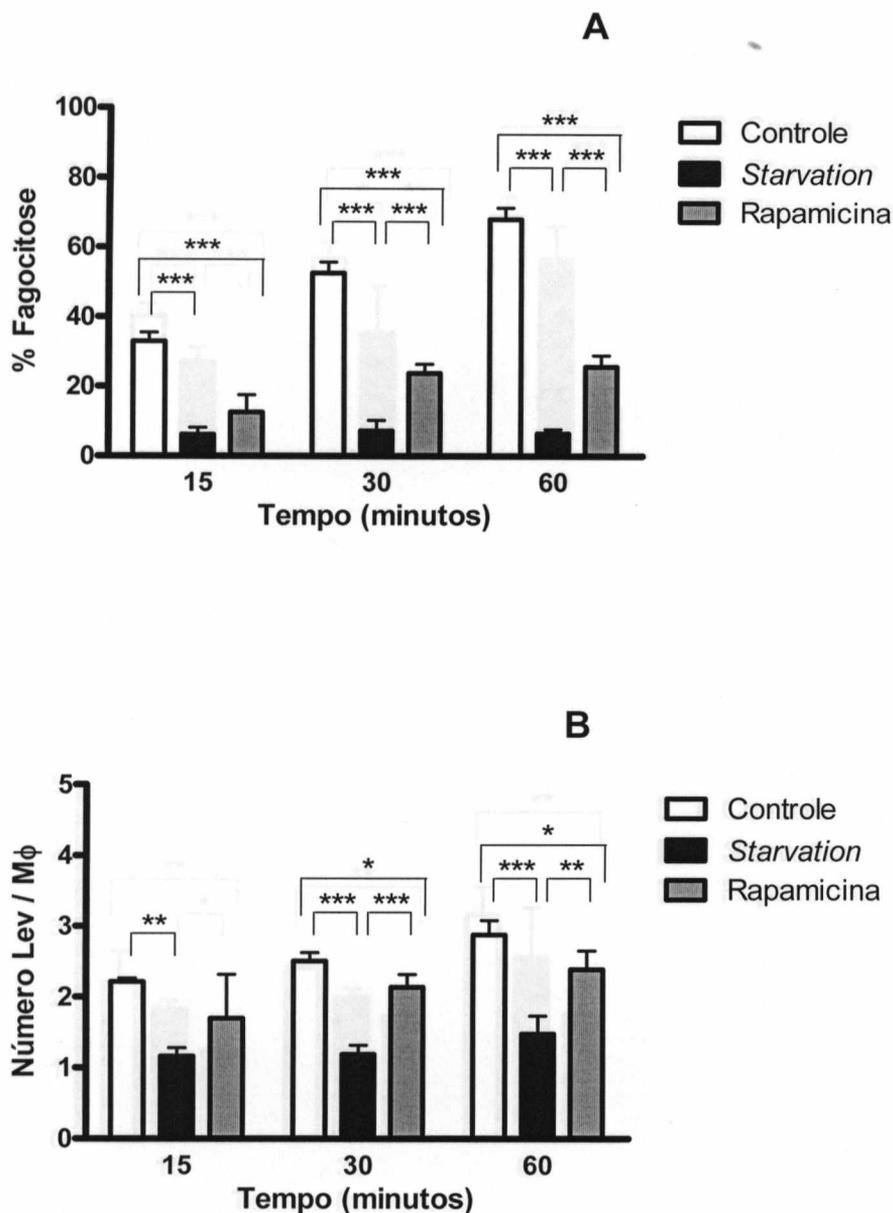


Figura 10 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos derivados de medula óssea de camundongos CBA/J. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Em diferentes tempos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de um experimento realizado em quintuplicata \pm SD (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

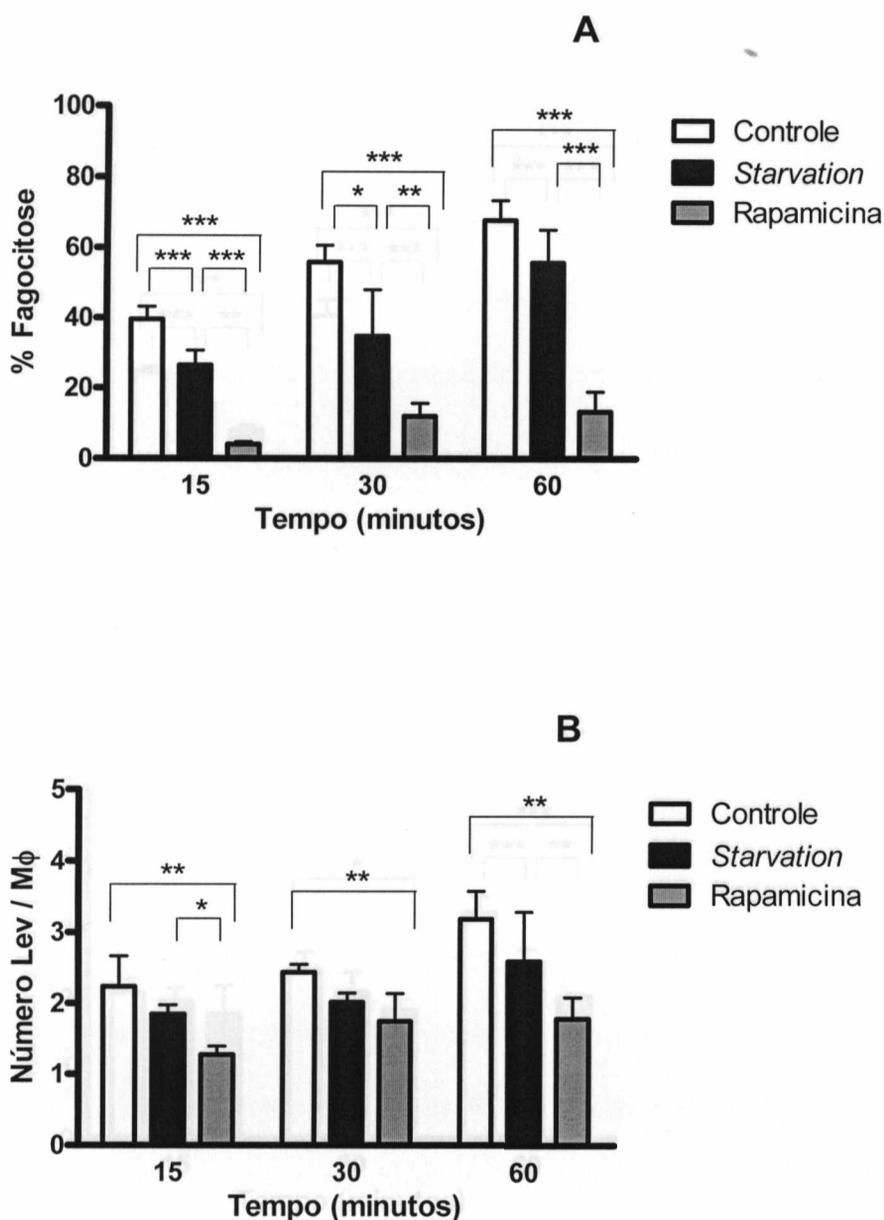


Figura 11 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c (2×10^5 /mL) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Em diferentes tempos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de um experimento realizado em quintuplicata \pm SD (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

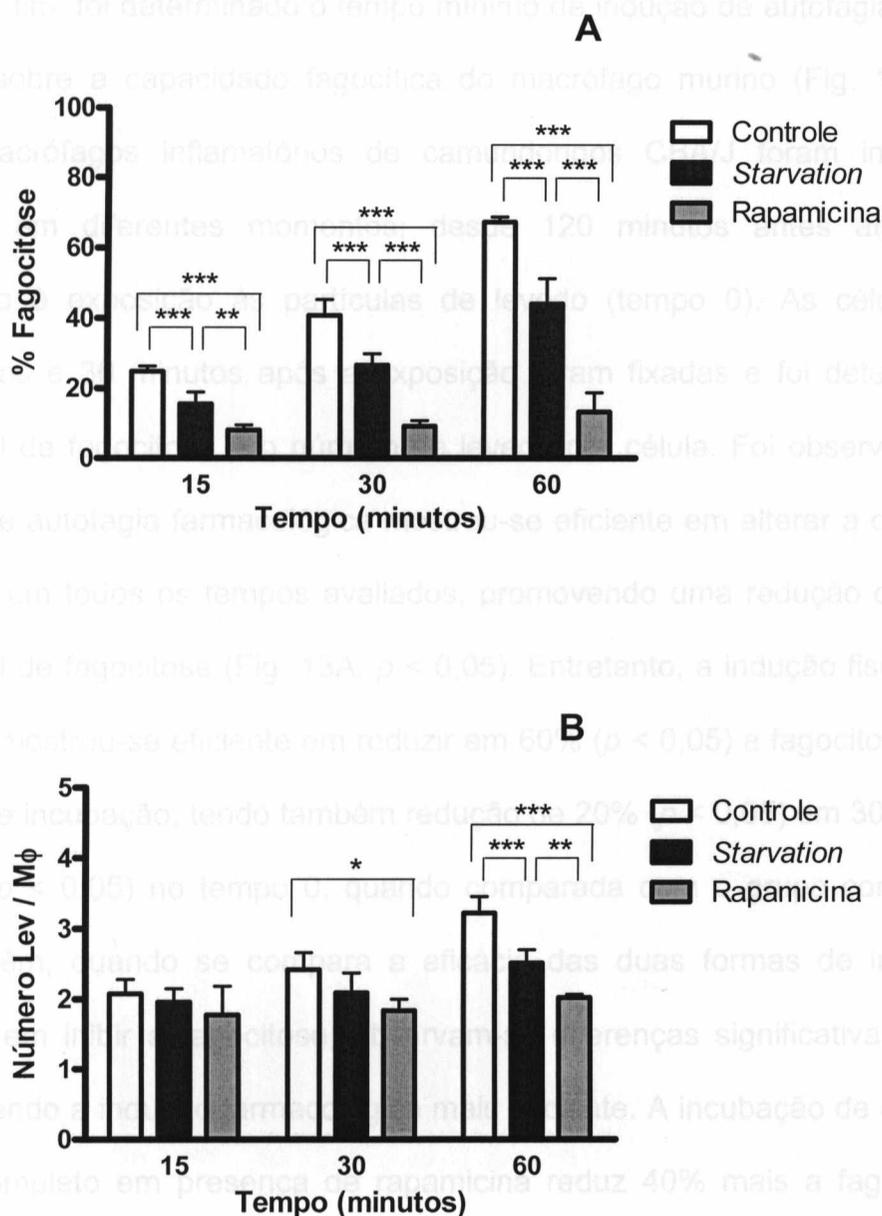


Figura 12 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos C57BL/6 ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (**Starvation**) ou farmacológica (**Rapamicina**) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (**Controle**). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Em diferentes tempos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de um experimento realizado em quintuplicata \pm SD (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Por fim, foi determinado o tempo mínimo de indução de autofagia capaz de interferir sobre a capacidade fagocítica do macrófago murino (Fig. 13). Dessa forma, macrófagos inflamatórios de camundongos CBA/J foram induzidos à autofagia em diferentes momentos, desde 120 minutos antes até indução simultânea à exposição às partículas de levedo (tempo 0). As células foram reincubadas e 30 minutos após a exposição foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose e o número de levedo por célula. Foi observado que a indução de autofagia farmacológica mostrou-se eficiente em alterar a capacidade fagocítica em todos os tempos avaliados, promovendo uma redução de 60% no percentual de fagocitose (Fig. 13A, $p < 0,05$). Entretanto, a indução fisiológica de autofagia mostrou-se eficiente em reduzir em 60% ($p < 0,05$) a fagocitose em 120 minutos de incubação, tendo também redução de 20% ($p < 0,05$) em 30 minutos e de 25% ($p < 0,05$) no tempo 0, quando comparada com o grupo controle (Fig. 13A). Porém, quando se compara a eficácia das duas formas de indução de autofagia em inibir a fagocitose, observam-se diferenças significativas entre os grupos, sendo a indução farmacológica mais eficiente. A incubação de células em DMEM completo em presença de rapamicina reduz 40% mais a fagocitose de levedo do que a indução fisiológica de autofagia em todos os tempos avaliados (Fig. 13A, $p < 0,05$). Adicionalmente, ambas as formas de indução de autofagia mostraram-se eficientes em reduzir o número de levedo por célula. Em todos os tempos analisados a redução da fagocitose variou de 20 a 30% na indução de autofagia farmacológica e na fisiológica (Fig. 13B, $p < 0,05$).

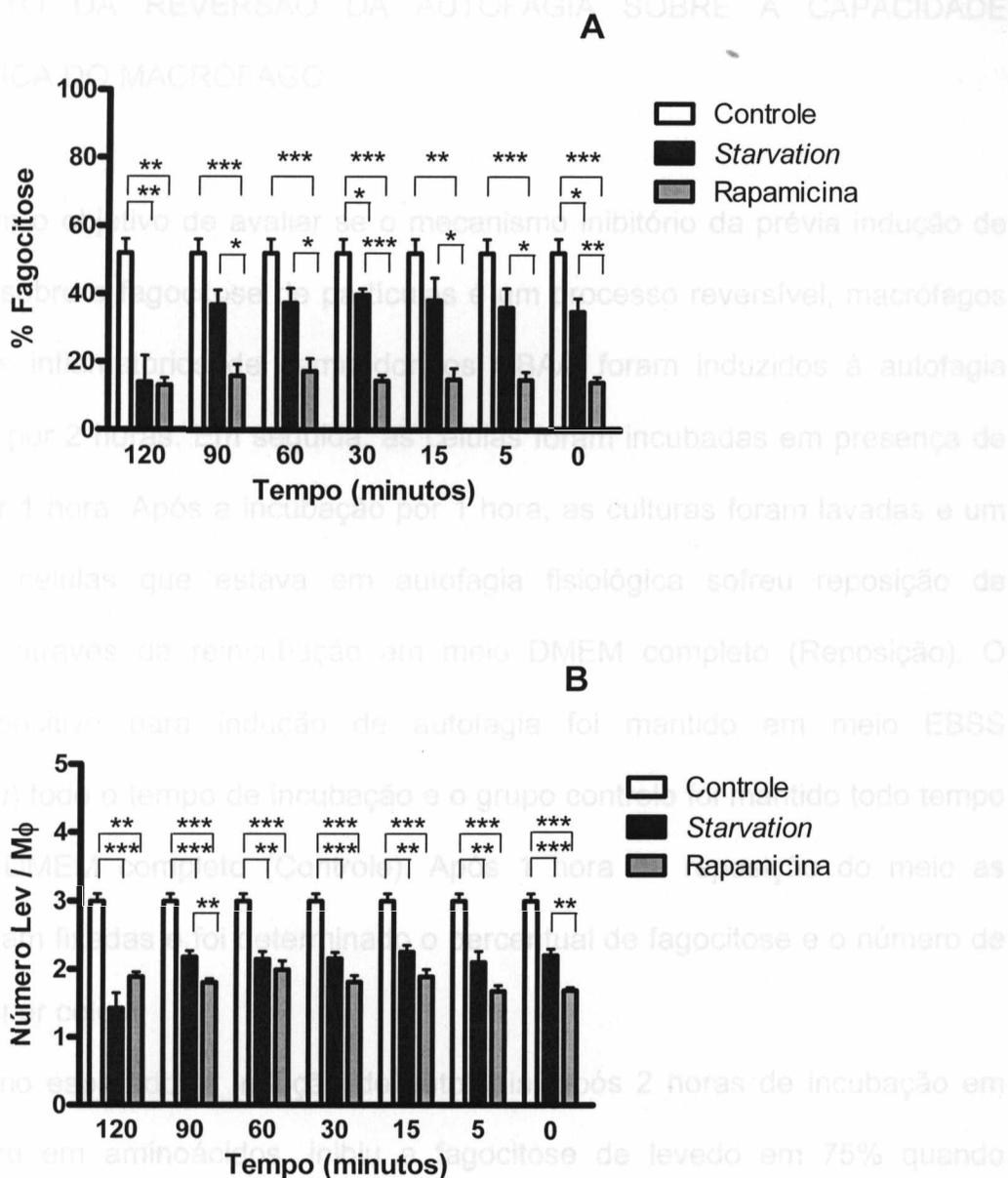


Figura 13 – A indução prévia de autofagia inibe a fagocitose de levedo por macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J independente do tempo de indução de autofagia. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J (2×10^5 /mL) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (*Rapamicina*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*). A indução prévia de autofagia foi feita em diferentes momentos, desde 120 minutos antes até o mesmo instante em que as células foram incubadas em presença de levedo (10:1). Trinta minutos após a adição de levedo, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.3 EFEITO DA REVERSÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA DO MACRÓFAGO

Com o objetivo de avaliar se o mecanismo inibitório da prévia indução de autofagia sobre a fagocitose de partículas é um processo reversível, macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J foram induzidos à autofagia fisiológica por 2 horas. Em seguida, as células foram incubadas em presença de levedo por 1 hora. Após a incubação por 1 hora, as culturas foram lavadas e um grupo de células que estava em autofagia fisiológica sofreu reposição de nutrientes através da reincubação em meio DMEM completo (Reposição). O controle positivo para indução de autofagia foi mantido em meio EBSS (*Starvation*) todo o tempo de incubação e o grupo controle foi mantido todo tempo em meio DMEM completo (Controle). Após 1 hora da reposição do meio as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose e o número de partículas por célula.

Como esperado, a indução de autofagia, após 2 horas de incubação em meio pobre em aminoácidos, inibiu a fagocitose de levedo em 75% quando comparada com o grupo controle (Fig. 14A, $p < 0,05$). Quando os macrófagos foram reincubados em meio rico em nutrientes, 45% das células fagocitaram levedo em comparação com 80% das células controle, mas apresentaram, em relação às células em autofagia durante todo o período de incubação, 50% a mais no percentual de fagocitose (Fig. 14A, $p < 0,05$). Similarmente, o número de partículas internalizadas em células em autofagia foi de 1,6 e passou para 3 partículas por macrófago, após a reposição em meio rico em nutrientes para esta cultura de células (Fig. 14B, $p < 0,05$). Essa recuperação foi parcial, pois as

células controle fagocitaram, em média, 4,5 partículas por macrófago. Entretanto, esta diferença no percentual de fagocitose não foi significativamente diferente no grupo de células que permaneceu todo tempo em autofagia (Fig. 12B – $p > 0,05$).

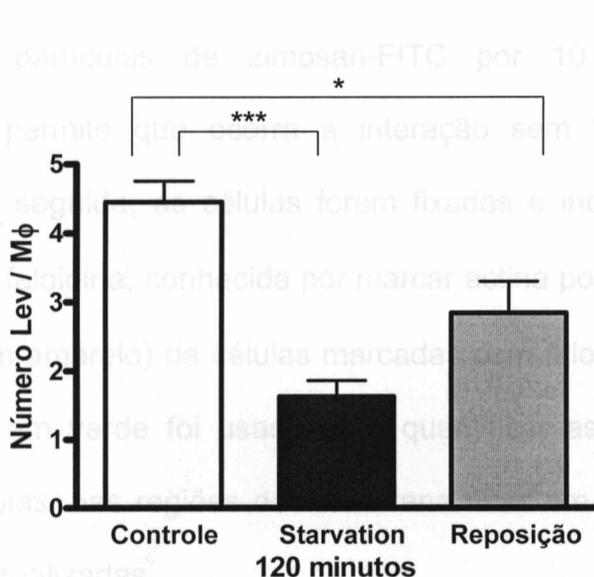
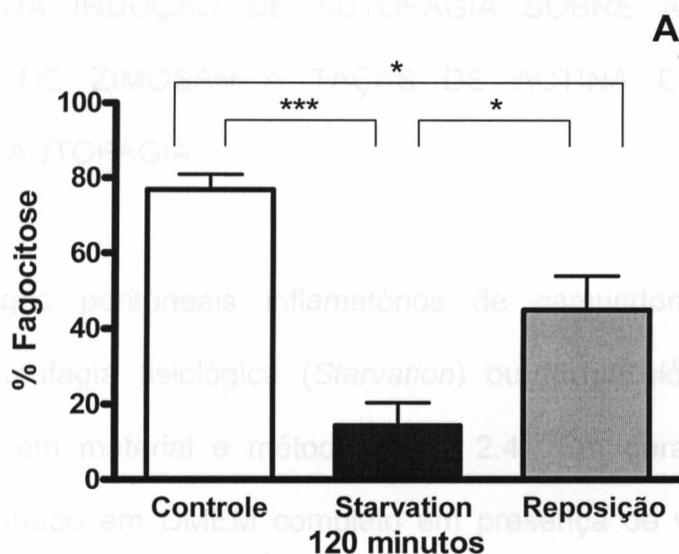


Figura 14 – A inibição da fagocitose de partículas pela autofagia é um mecanismo reversível. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) como descrito na figura 5. O grupo controle foi incubado em DMEM completo (**Controle**). Duas horas após, as células foram incubadas em presença de levedo (10:1) por uma hora adicional. Em um grupo de células induzidas à autofagia fisiológica, os nutrientes foram repostos no meio de cultivo (**Reposição**) e um outro grupo foi mantido sob privação de aminoácidos. Após uma hora, as células foram fixadas e foi determinado o percentual de fagocitose de levedo (**A**) e o número de levedo por macrófago (**B**). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

3.4 EFEITO DA INDUÇÃO DE AUTOFAGIA SOBRE A INTERAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ZIMOSAN A TAÇAS DE ACTINA EM MACRÓFAGOS INDUZIDOS A AUTOFAGIA

Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J foram induzidos à autofagia fisiológica (*Starvation*) ou farmacológica (Rapamicina), como descrito em material e métodos (item 2.4). Em paralelo, um grupo de células foi incubado em DMEM completo em presença de wortmanina 100nM, conhecida por inibir a fagocitose (Wortmanina). O grupo controle foi incubado em DMEM completo (Controle). Após 2 horas, as células foram incubadas em presença de partículas de zimosan-FITC por 10 minutos a 4°C. Esse procedimento permite que ocorra a interação sem haver internalização das partículas. Em seguida, as células foram fixadas e incubadas em presença de 0,16 µg/mL de faloidina, conhecida por marcar actina polimerizada (Fig. 15). A co-localização (em amarelo) de células marcadas com faloidina em vermelho com o zimosan-FITC em verde foi usado para quantificar as partículas que estavam ligadas as células, nas regiões da membrana ricas em actina polimerizada, sem terem sido internalizadas.

Como esperado as células em autofagia apresentaram redução da fagocitose, entretanto, a indução de autofagia não promoveu diferença no percentual de co-localização (Fig. 16A). Foi observado um percentual de co-localização de 30% no grupo de células induzidas à autofagia fisiológica, de 12% em macrófagos induzidos à autofagia farmacológica em comparação ao grupo de células controle em que a co-localização foi de 25%, não havendo diferenças significativas entre os grupos analisados (Fig.14B – $p > 0,05$). Similarmente, não

foram evidenciadas diferenças significativas em relação ao número de partículas co-localizadas por célula entre os grupos analisados (Fig.16B, $p > 0,05$).

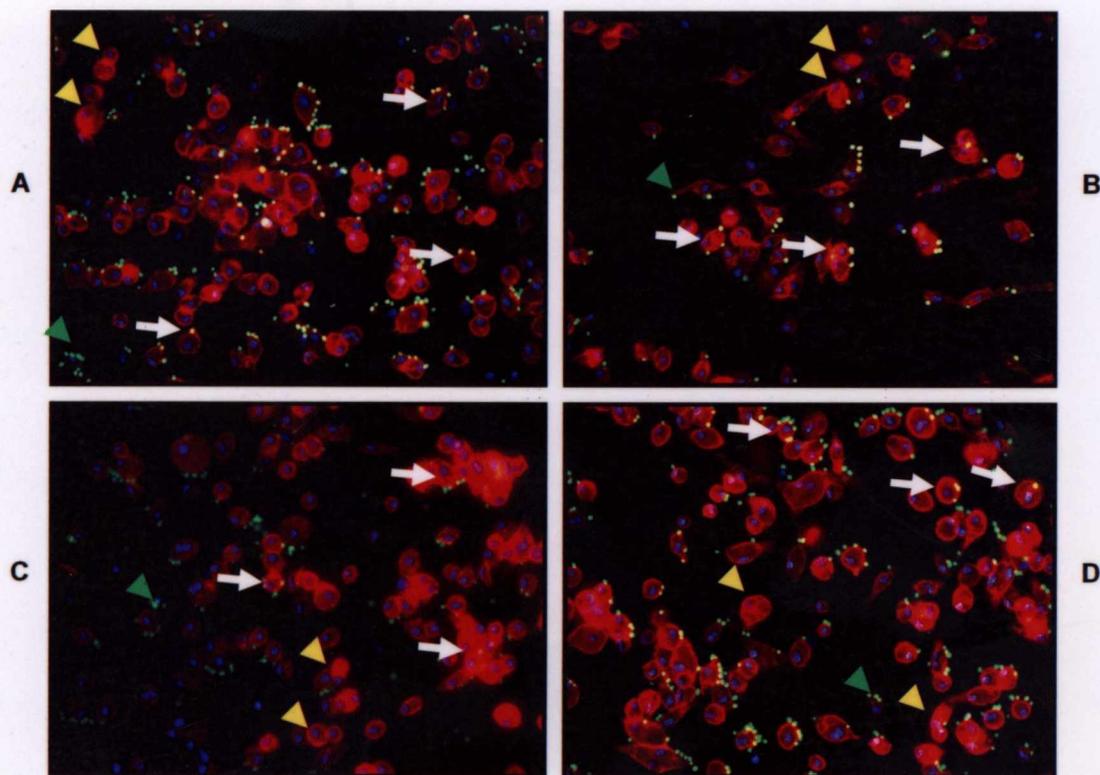


Figura 15 – Avaliação do efeito da indução prévia de autofagia sobre a co-localização de zimosan com células marcadas com faloidina. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos a autofagia fisiológica (*Starvation*) (B) ou farmacológica (*Rapamicina*) (C) como descrito na figura 5. Em paralelo, um grupo foi incubado em DMEM completo em presença de wortmanina 100nM (*Wortmanina*) (D). O grupo controle foi incubado em DMEM completo (*Controle*) (A). Duas horas após, as células foram incubadas por 10 minutos a 4°C em presença de zimosan-FITC (**VERDE**, cabeça de seta verde) (10:1) para promover a interação sem haver internalização das partículas. Em seguida, os macrófagos foram fixados e o núcleo marcado com DAPI (**AZUL**), e os filamentos de actina polimerizada marcados com faloidina $0,16 \mu\text{g}/\text{mL}$ (**VERMELHO**, cabeça de seta amarela). Foi então determinado o percentual de interação das células com as partículas. **AMARELO** (seta branca) demonstra a co-localização entre a partícula e as células com actina polimerizada marcada. As imagens estão em aumento de 400x. Resultado ilustrativo de um experimento.

4 DISCUSSÃO

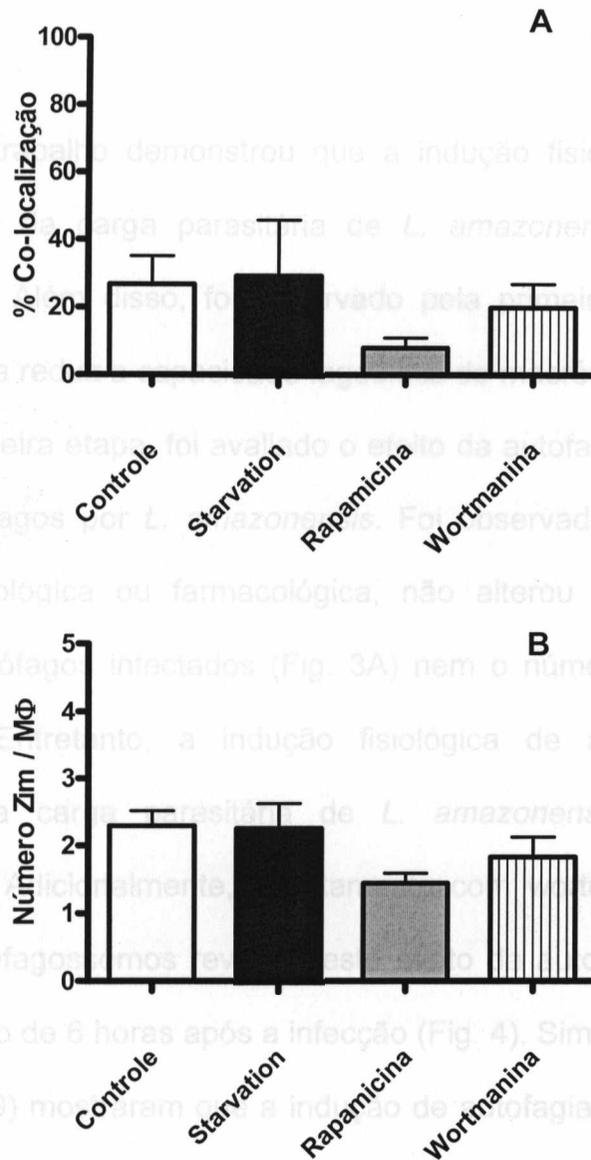


Figura 16 – A indução prévia de autofagia não altera a ligação de partículas. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J ($2 \times 10^5/\text{mL}$) foram induzidos à autofagia fisiológica (**Starvation**) ou farmacológica (**Rapamicina**) como descrito na figura 5. Em paralelo, um grupo foi incubado em DMEM completo em presença de wortmanina 100nM para inibir a internalização sem alterar a ligação de partículas (**Wortmanina**). O grupo controle foi incubado em DMEM completo (**Controle**). Duas horas após, as células foram incubadas por 10 minutos a 4°C em presença de zimosan-FITC (10:1) para ocorrer a interação sem haver internalização das partículas. Em seguida, as células foram fixadas, foi feita a marcação das células como descrito na figura 15. Posteriormente, foi determinado o percentual de co-localização de células marcadas com faloidina em vermelho com as partículas de zimosan-FITC marcadas em verde (**A**) e o número de partículas co-localizadas com células marcadas (**B**). As barras correspondem à média de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata \pm SE (ANOVA, $p > 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou que a indução fisiológica de autofagia promoveu aumento da carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos infectados, *in vitro*. Além disso, foi observado pela primeira vez que a prévia indução de autofagia reduz a capacidade fagocítica do macrófago murino.

Em uma primeira etapa, foi avaliado o efeito da autofagia sobre o curso da infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Foi observado que a indução de autofagia, seja fisiológica ou farmacológica, não alterou significativamente o percentual de macrófagos infectados (Fig. 3A) nem o número de parasitos por célula (Fig. 3B). Entretanto, a indução fisiológica de autofagia aumentou significativamente a carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos infectados (Fig. 4). Adicionalmente, o tratamento com wortmanina, que inibe a maturação dos autofagossomos reverteu este efeito da autofagia sobre a carga parasitária, no tempo de 6 horas após a infecção (Fig. 4). Similarmente, Pinheiro e colaboradores (2009) mostraram que a indução de autofagia favorece a infecção de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*. Também demonstraram que o tratamento com wortmanina ou 3-metiladenina, anula o favorecimento da infecção pela autofagia (PINHEIRO *et al.*, 2009). Estes dados mostram que o efeito induzido pela autofagia após o estabelecimento da infecção por *L. amazonensis*, neste e no nosso modelo, é dependente do estímulo autofágico.

Pinheiro e colaboradores (2009) demonstraram que a indução fisiológica de autofagia não altera a infecção de macrófagos peritoneais inflamatórios de BALB/c por *L. major*, outra espécie de *Leishmania*. E adicionalmente, também

demonstraram que este efeito da autofagia sobre a infecção por *L. amazonensis* é restrita a macrófagos peritoneais inflamatórios da linhagem BALB/c, pois este efeito não ocorre em macrófagos de C57BL/6. Schaible e colaboradores (1999) demonstraram que na infecção por *L. mexicana* a sobrevivência intracelular do parasito pode ser favorecida pela autofagia. Em conjunto, esses dados apontam a autofagia como um mecanismo que a depender da espécie da *Leishmania* e do modelo experimental, pode favorecer ou não a infecção. Adicionalmente, os dados sugerem que apenas *Leishmania* do complexo mexicana se beneficie da interação com a via autofagia. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de elucidar o papel do processo autofágico na infecção por *Leishmania*.

Em contraste ao favorecimento da indução fisiológica de autofagia em nosso e no trabalho desenvolvido por Pinheiro e colaboradores (2009), neste presente estudo a indução farmacológica de autofagia promoveu redução da carga parasitária de *L. amazonensis* (Fig. 4). Este efeito dependente da indução farmacológica de autofagia pode ser devido, em nosso modelo, ao fato de uma ação direta da rapamicina sobre o parasito. Não existem dados da literatura que sustentem esta hipótese. A realização de estudos ultra-estruturais mais detalhados serão conduzidos com o objetivo de testar esta hipótese e avaliar os efeitos da rapamicina sobre o parasito.

Similarmente ao efeito induzido pela autofagia na infecção de *L. amazonensis* em macrófagos de CBA/J por nós observado (Fig. 4) e de BALB/c por outros autores (PINHEIRO *et al.*, 2009), foi recentemente demonstrado que a indução de autofagia favoreceu a infecção por *C. burnetii* (GUTIERREZ *et al.*, 2005). Os autores sugerem que o favorecimento da proliferação intracelular de *C. burnetii* em células em autofagia depende da fusão entre o autofagossomo e o

vacúolo parasitóforo, pois o tratamento com wortmanina reverteu este efeito (GUTIERREZ *et al.*, 2005). Gutierrez e colaboradores (2005) sugerem que para determinados patógenos a interação dos vacúolos parasitóforos por eles induzidos com a via autofágica pode constituir-se em uma fonte permanente de nutrientes. Contrariamente a este dado, na infecção de macrófagos humanos por uma outra bactéria, *M. tuberculosis*, a fusão do fagossomo contendo o bacilo com autofagossomos reduziu a proliferação do patógeno (GUTIERREZ *et al.*, 2004). Esse dado evidencia que alternativamente ao que ocorre com *C. burnetii*, a fusão do vacúolo parasitóforo com a via autofágica pode ser um mecanismo protetor à infecção por *M. tuberculosis*. Em conjunto esses dados mostram que a depender do microrganismo a autofagia pode ser favorável ou não à sobrevivência intracelular do patógeno.

Em nosso estudo foi feita uma análise ultra-estrutural para evidenciar as alterações morfológicas induzidas pela autofagia em macrófagos peritoneais inflamatórios previamente infectados por *L. amazonensis*. Os resultados mostraram que os macrófagos induzidos à autofagia, tanto fisiológica quanto farmacológica, apresentaram características autofágicas como a formação de figuras de mielina, vacúolos com dupla membrana e com porções de organelas (dado não mostrado). Este dado corrobora que os macrófagos se encontravam em um processo autofágico (dado não mostrado). Entretanto, a presença de parasitos em vacúolos com dupla membrana, característico de um autofagossomo não foi observada (dado não mostrado). Similarmente, em trabalho recente Pinheiro e colaboradores (2009) não evidenciaram a co-localização de *L. amazonensis* e vacúolos autofágicos em macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c previamente infectados e induzidos à autofagia. Schaible e

colaboradores (1999) sugerem que, em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *L. mexicana*, o favorecimento da sobrevivência intracelular, induzida pela autofagia, se deve ao acesso a nutrientes no vacúolo parasitóforo por microautofagia. Similarmente ao nosso estudo e o de Pinheiro (2009), Schaible e colaboradores (1999) não observaram alterações nas características morfológicas dos vacúolos parasitóforos pela microscopia eletrônica e de fluorescência. Em conjunto, os dados disponíveis até o presente momento (SCHAIBLE *et al.*, 1999; PINHEIRO *et al.*, 2008) sugerem que a autofagia parece ser favorável à infecção por *L. amazonensis*, por um mecanismo que independe da aquisição de características autofágicas pelos vacúolos parasitóforos. Mais estudos serão necessários para elucidar o mecanismo pelo qual a autofagia favorece a infecção por *L. amazonensis*.

Em uma segunda etapa foi avaliada a influência da indução prévia de autofagia sobre a infecção por *L. amazonensis*. Os resultados mostram que a prévia indução de autofagia, seja fisiológica ou farmacológica, promove redução da capacidade de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA/J em fagocitar *L. amazonensis* (Fig. 5). Em contraste, resultados anteriores mostraram que a prévia indução de autofagia não alterou a fagocitose de *C. burnetti* nem de *Staphylococcus aureus* mortos (GUTIERREZ *et al.*, 2005; ROMANO *et al.*, 2009). Entretanto, nesses estudos foram utilizadas células CHO - célula de linhagem não macrofágica. É possível que estes resultados, aparentemente contraditórios aos nossos, se justifiquem pelos distintos tipos celulares utilizados em cada trabalho. É possível que a indução da autofagia só altere a capacidade fagocítica em fagócitos profissionais.

Após a indução de autofagia, macrófagos foram incubados com partículas

de levedo utilizadas em ensaios de fagocitose. Os resultados foram similares aos encontrados para fagocitose de *L. amazonensis* (Fig. 5 e 6), o que mostrou que a alteração da capacidade fagocítica do macrófago não é um mecanismo específico para *Leishmania*. Dessa forma, os resultados indicam que o efeito inibitório da autofagia ocorre sobre a capacidade fagocítica do macrófago e não está relacionada com a natureza da partícula em questão.

Paralelamente, os aspectos ultra-estruturais dos macrófagos inflamatórios induzidos à autofagia antes da exposição a partículas de levedo, foram analisados. Os resultados mostraram que as células que foram induzidas à autofagia possuem o citoplasma menos eletro-denso e observa-se também a formação de inúmeros vacúolos nascentes com dupla membrana, características de autofagossomos. Além disso, as células se apresentam mais vacuolizadas em comparação com o grupo controle com a presença de figuras de mielina e autofagossomos maduros contendo vestígios de organelas (Fig. 8). Como demonstrado anteriormente por Eskelinen (2005) estas características evidenciam que, em nosso sistema, os macrófagos encontram-se em autofagia. Este dado reforça nossa hipótese de que a alteração da capacidade fagocítica dos macrófagos está relacionada à indução de autofagia.

A alteração da capacidade fagocítica promovida pela prévia indução de autofagia é um mecanismo inerente à biologia do macrófago. Foi observada redução da capacidade fagocítica em outros tipos celulares macrofágicos (Fig. 9 e 10) e em macrófagos de *backgrounds* genéticos diferentes (Fig. 11 e 12). Além disso, demonstramos que ao cessar a autofagia o macrófago recupera a capacidade fagocítica, o que reforça que a inibição da fagocitose é dependente do estímulo autofágico (Fig. 14). Adicionalmente, foi observado que a alteração da

capacidade fagocítica do macrófago murino ocorre logo em seguida a indução de autofagia, o que indica ser um efeito precoce (Fig. 13). Estes dados sugerem que há uma comunicação entre as vias autofágica e fagocítica. Possivelmente, a existência de uma conexão entre as duas vias pode ser mediada por proteínas que participem tanto do processo autofágico quanto do fagocítico. Alternativamente, a indução de autofagia anterior à adição de partículas, desencadeie alguma via de sinalização que acabe por comprometer a regulação da fagocitose em alguma de suas etapas.

Ao se avaliar a influência da autofagia sobre a ligação de partículas com os macrófagos, foi observado que a indução de autofagia não altera o percentual de células que interagiram com zimosan (Fig. 15 e 16). Este dado corrobora observações feitas ao microscópio óptico, que em culturas de células submetidas à autofagia e, posteriormente, expostas a levedo, foram observadas partículas aderidas aos macrófagos sem que houvesse internalização (Fig. 7). Apesar do englobamento ter sido inibido, estas observações mostram que a capacidade de ligação e reconhecimento de partículas se manteve inalterada (Fig. 15 e 16). Estes dados indicam que o efeito da autofagia sobre a fagocitose ocorre em etapas posteriores ao *binding* (ligação) (PAUL, 2003).

Uma possível explicação para a alteração da capacidade fagocítica em decorrência da prévia indução de autofagia pode estar relacionada à atividade da PI3K. Esta enzima está envolvida diretamente na cascata sinalização das duas vias. Sua atividade é fundamental durante o processo de fagocitose de partículas por viabilizar o rearranjo do citoesqueleto e, conseqüentemente, o remodelamento da membrana durante o englobamento e a internalização (LINDMO & STENMARK 2006; GILLOOLY *et al.*, 2008). Distintas classes de PI3K estão

envolvidas na via fagocítica e na via autofágica. Na fagocitose PI3K classe I está relacionada com a formação inicial de fagossomos, enquanto que PI3K classe III está envolvida no processo de maturação fagossomal (VIEIRA *et al.*, 2001). Por outro lado, na autofagia, PI3K classe III está relacionada com a formação dos autofagossomos e PI3K classe I envolvida na inibição da via autofágica pela ativação indireta da mTOR (PETIOT *et al.*, 2000). Dessa maneira, é possível que, em nossos experimentos de indução prévia de autofagia, as PI3K sejam recrutadas para a formação dos autofagossomos. A enzima recrutada estaria envolvida na sinalização que regula a autofagia. Como consequência, PI3K recrutada para participar do processo autofágico ficaria indisponível para mediar o processo de formação do fagossomo, e assim, inibição da fagocitose. Estudos complementares devem ser realizados para comprovação dessa hipótese e com o intuito de elucidar se existe conexão entre as vias autofágica e fagocítica e o possível papel da PI3K neste processo.

Alternativamente, a cinase mTOR poderia mediar a conexão entre a autofagia e a fagocitose. É descrito que a indução de autofagia, tanto fisiológica quanto farmacológica, envolve o bloqueio da atividade da cinase mTOR, enzima central para ativação do processo autofágico (BLOMMAART *et al.*, 1995; NODA & OHSUMI, 1998). Entretanto, não há dados que correlacionem a atividade de mTOR ao processo de fagocitose. Por outro lado, estudos mostraram que a regulação desta enzima se relaciona a uma série de processos envolvidos desenvolvimento e homeostase celular (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). Pouco se sabe a respeito da comunicação entre a via autofágica e a via fagocítica. Entretanto, muito recentemente, Shui e colaboradores (2008) sugeriram uma conexão entre estas duas vias a partir de análise da proteômica da membrana do

fagossomo. Foi identificado nesta membrana a presença de LC3-II, um marcador específico de autofagossomos (KABEYA *et al.*, 2000). Este dado reforça a existência de uma ligação que envolva a participação de proteínas que possam ter participação entre as duas vias.

Em conjunto, nossos dados apontam para a existência de uma comunicação entre a via fagocítica e autofágica. Estudos serão conduzidos para determinar os mecanismos envolvidos neste processo.

5 CONCLUSÃO

→ A indução de autofagia reduz a capacidade fagocítica do macrófago murino.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, L.C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, **61**: 2952-2959, 1993.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. *Biologia Celular e Molecular da Célula*. **4.ed.** – **Porto Alegre: Artmed**, 2004. Cap. 25: 1459.
- ALEXANDER, J. & RUSSELLI, D. The interactions of *Leishmania* species with macrophages. **Adv. Parasitology**. **31**: 175-254, 1992.
- ANDRADE, Z.A.; REED, S.G.; ROTERS, S.B.; & SADIGURSKY, M. Immunopathology of experimental cutaneous Leishmaniasis. **American Journal of Pathology**. **114(1)**: 137-48, 1984.
- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiology**. **6**: 392-401, 1998.
- ARAKI, N.; JOHNSON, M.T.; SWANSON, J.A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **J Cell Biol.** **135(5)**:1249-60, 1996.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, R.G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JUNIOR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**. **44**: 536-546, 1991.

BARRAL, A.; PETERSEN, E.A.; SACKS, D.L.; NEVA, F.A. Late metastatic Leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**: 277-285, 1983.

BEHIN, R.; MAUEL, J.; SORDAT, B. *Leishmania tropica*: pathogenicity and *in vitro* macrophage function in strains of inbred mice. **Exp. Parasitol.**, **48**: 81-91, 1979.

BITTENCOURT, A.L.; FREITAS, L.A.R.; POMPEU, M.M.L. VIEIRA, M.L.; BARRAL, A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** **85**: 53-59, 1990.

BITTENCOURT, A.L. & BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: _____. Doerr, W. & Seifert, G. (eds.) **Tropical Pathology**, Berlin: Springer-Verlag, p.597-651, 1995.

BLACKWELL, J.M.; EZEKOWITZ, R.A.; ROBERTS, M.B.; CHANNON, J.Y.; SIM, R.B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J Exp Med**, **162**: 324-331, 1985.

BLOMMAART, E.F.; KRAUSE, U.; SCHELLENS, J.P.; VREELING-SINDELÁROVÁ, H.; MEIJER, A.J. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. **Eur J Biochem.** **243(1-2)**:240-6, 1997.

BLOMMAART, E.F.; LUIKEN, J.J.; BLOMMAART, P.J.; VAN WOERKOM, G.M.; MEIJER, A.J. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry.** **270(5)**: 2320-6, 1995.

BOGDAN, C. Oxidative burst without phagocytes: the role of respiratory proteins. **Nat Immunol**, **8**: 1029-31. 2007.

BOGDAN, C.; STENGER, S.; ROLLINGHOFF, M.; SOLBACH, W. Cytokine interactions in experimental cutaneous leishmaniasis. Interleukin 4 synergizes with interferon- γ to activate murine macrophages for killing of *Leishmania major* amastigotes. **European Journal of Immunology**. **21**: 327-333, 1991.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W. R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P.; MOSSER, D.M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol**. **155**: 3102-3111, 1995.

BROWN, E.J.; BEAL, P.A.; KEITH, C.T.; CHEN, J.; SHIN, T.B.; SCHREIBER, S.L. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. **Nature**. **377(6548)**: 441-6, 1995.

COUTINHO, S.G.; PIRMEZ, C.; MENDONÇA, S.C.F.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R.C.C. Pathogenesis and immunopathology of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. **82(1)**: 214-218, 1987.

CUERVO, A.M. Autophagy: many paths to the same end. **Molecular Cell Biochemistry**. **263(1-2)**: 55-72, 2004.

DELGADO, M.A.; ELMAOUED, R.A.; DAVIS, A.S.; KYEI, G.; DERETIC, V. Toll-like receptors control autophagy. **EMBO J**. **27(7)**:1110-21, 2008.

DINAUER, M.C. The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. **Crit Rev Clin Lab Sci**, **30**: 329-369, 1993.

DING, A.; NATHAN, C.F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D.J.; SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. **The Journal of Immunology**. **145(3)**: 940-944, 1990.

DUNN, W.A.JR. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. **Journal Cell Biology**. **110(6)**: 1923-33, 1990a.

DUNN, W.A.JR. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. **Journal Cell Biology**. **110(6)**: 1935-45, 1990b.

ESKELINEN, E.L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. **Autophagy**. **(1)**:1-10, 2005.

ESKELINEN, E.L.; PRESCOTT, A.R.; COOPER, J.; BRACHMANN, S.M.; WANG, L.; TANG, X.; BACKER, J.M.; LUCOCQ, J.M. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. **Traffic**. **3(12)**:878-93, 2002.

GILLOOLY, D.J.; SIMONSEN, A.; STENMARK, H. Phosphoinositides and phagocytosis. **J Cell Biol**. **155(1)**:15-7, 2001.

GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmanioses Tegumentares: Aspectos clínicos e imunopatológicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. **77**: 195-215, 1982.

GRIMALDI JUNIOR, G.; MORIEARTY, P.L.; HOFF, R. *Leishmania mexicana*: immunology and histopathology in C3H mice. **Exp Parasitol**, **50**: 45-56, 1980.

GOETZ, M.; BUBERT, A.; WANG, G.; CHICO-CALERO, I.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; BECK, M.; SLAGHUIS, J.; SZALAY, A.A.; GOEBEL, W. Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **9;98(21)**: 12221-6, 2001.

GOMES, I.N.; CALABRICH, A.F.; TAVARES, R. DA S.; WIETZERBIN, J.; DE FREITAS, L.A.; TAVARES VERAS, P.S. Differential properties of CBA/j mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**. **5(4)**: 251-60, 2003.

GUTIERREZ, M.G.; MASTER, S.S.; SINGH, S.B.; TAYLOR, G.A.; COLOMBO, M.I.; DERETIC, V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. **Cell**. **119 (6)**: 753-66, 2004.

GUTIERREZ, M.G.; VAZQUEZ, C.L.; MUNAFO, D.B.; ZOPPNINO, F.C.; BERON, W.; RABINOVITCH, M.; COLOMBO, M.I. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. **Cellular Microbiology**. **7(7)**: 981-93, 2005.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; LOCKSLEY, R.M. *Leishmania major*: Analysis of lymphocyte and macrophage cellular phenotypes during infection of susceptible and resistant mice. **Experimental Parasitology**. **65**: 258-268, 1988.

HONIGBERG, B.M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **Journal Protozoology**. **10**: 20-63, 1963.

KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.; UENO, T.; YAMAMOTO, A.; KIRISAKO, T.; NODA, T.; KOMINAMI, E.; OHSUMI, Y.; YOSHIMORI, T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**. **19(21)**:5720-8, 2000.

KEMP, M. Regulator and effector functions of T-cell subsets in human *Leishmania* infections. **APMIS. Sup.** **68, 105**: 05-33, 1997.

KINCHEN, J.M. & RAVICHANDRAN, K.S. Phagosome maturation: going through the acid test. **Nat Rev Mol Cell Biol**. **9(10)**:781-95, 2008.

KIM, J. & KLIONSKY, D.J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. **Annual Review Biochemistry**. **69**: 303-42, 2000.

KIRKEGAARD, K.; TAYLOR, M.P.; JACKSON, W.T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. **Nat Ver Microbiol. Apr** **2(4)**: 301-14, 2004.

KLIONSKY, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. **Nat Rev Mol Cell Biol**. **8(11)**:931-7, 2007.

KLIONSKY, D.J. & EMR, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**. **290(5497)17**: 17-21, 2000.

KLIONSKY, D. J. & OHSUMI, Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. **Annual Review of Cell and Development Biology**. **15**: 1-32, 1999.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Transactions R. Soc. Tropical Medicine Higiene**. **81(4)**: 702-703, 1987.

LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENÇÃO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T.M.; VERAS, P.S.T.; FREITAS, L.A.R. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**. **2(15)**: 1807-15, 2000.

LEVINE, B. & DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**. **7(10)**:767-77, 2007.

LIEW, F.Y. & O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. **32**: 161-259, 1993.

LIEW, F.Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **The Journal of Immunology**. **145**: 4306-4310, 1990.

LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; LELCHUCK, R.; CHAN, W. L.; ZILTENER, H. Macrophage activation by interferon gamma from host-protective T-cells is inhibited by interleukin IL-3 and IL-4 produced by disease promoting T-cells in leishmaniasis. **European Journal of Immunology**. **19**: 1227-1232, 1989.

LINDMO, K. & STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **J Cell Sci**. **119(Pt 4)**:605-14, 2006.

MAURIN, M.; BENOLIEL, A.M.; BONGRAND, P.; RAOULT, D. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. **Infect Immun.** **60(12)**: 5013-6, 1992.

McSORLEY, S.; PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y. Immunology of murine Leishmaniasis. **Clinics in Dermatology.** **14**: 451-464, 1996.

MEIJER, A.J. & CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.** **36(12)**: 2445-62, 2004.

MITCHELL, G.F.; CURTIS, J.M.; HANDMAN, E. Resistance to cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. **Aust. J. Exp. Biol. Med., Sci.**, **59**: 555-565, 1981.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology.** **136**: 2348-2357, 1986.

MORTIMORE, G.E. & SCHWORER, C.M. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. **Nature.** **270(5633)**: 174-6, 1977.

MUNAFO, D.B. & COLOMBO, M.I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. **Journal of Cell Science.** **114(Pt 20)**: 3619-29, 2001.

NODA, T. & OHSUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. **Journal of Biological Chemistry.** **273(7)**: 3963-6, 1998.

PAUL, WILLIAN E. Fundamental Immunology. **New York: Lippincott: Raven Press**, 2003. Fifth Edition. 1589 p.

PETIOT, A.; OGIER-DENIS, E.; BLOMMAART, E.F.; MEIJER, A.J.; CODOGNO, P. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. **Journal Biological Chemistry**. **275(2)**: 992-8, 2000.

PINHEIRO, R.O.; NUNES, M.P.; PINHEIRO, C.S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P.T.; TAKIYA, C.M.; CÔRTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; DOSREIS, G.A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect**. **11(2)**:181-90, 2009.

RIBEIRO-GOMES, F.L.; OTERO, A.C.; GOMES, N.A.; MONIZ-DE-SOUZA, M.C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A.C.; CALICH, V.L.; COUTINHO, S.G.; LOPES, M.F.; DOSREIS, G.A. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*. **172(7)**: 4454-62, 2004.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Abstr. **Experimental Parasitology**. **71(3)**: 267-275, 1990.

ROMANO, P.S.; ARBOIT, M.A.; VÁZQUEZ, C.L.; COLOMBO, M.I. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. **Autophagy**. **5(1)**:6-18, 2009.

RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nat Rev Mol Cell Biol**. **2(8)**:569-77, 2001.

RUSSELL, D.G.; TALAMAS-ROHANA, P.; ZELECHOWSKI, J. Antibodies raised against synthetic peptides from the Arg-Gly-Asp-containing region of the *Leishmania* surface protein gp63 cross-react with human C3 and interfere with gp63-mediated binding to macrophages. **Infect Immun**, **57**: 630-632, 1989.

RUSSELL, D.G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **J Immunol**, **136**: 2613-2620, 1986.

RUSSELL, D.G.; XU, S.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal of Cell Science**. Dec; **103 (Pt 4)**: 1193-210, 1992.

SACKS, D.L.; BRODIN, T.N.; TURCO, S.J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** **42**: 225-233, 1990.

SANJUAN, M.A.; DILLON, C.P.; TAIT, S.W.; MOSHIACH, S.; DORSEY, F.; CONNELL, S.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; CLEVELAND, J.L.; WITHOFF, S.; GREEN, D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. **Nature**. **20;450(7173)**:1253-7, 2007.

SCIANIMANICO, S.; DESROSIERS, M.; DERMINE, J.F.; MÉRESSE, S.; DESCOTEAUX, A.; DESJARDINS, M. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. **Cell Microbiol**, **1(1)**:19-32, 1999.

SCHAIBLE, U.E.; SCHLESINGER, P.H.; STEINBERG, T.H.; MANGEL, W.F.; KOBAYASHI, T.; RUSSELL, D.G. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. **Journal of Cell Science**.**112 (Pt 5)**: 681-93, 1999.

SCOTT, P. & FARRELL, J.P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. In:____. LIEW, F.Y. & COX, F.E. (Eds.). Immunology of intracellular parasitism. **Chemistry Immunology**. **70**: 60-80, 1998.

SEGAL, A.W. The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. **Mol Med Today**, **2**: 129-135, 1996.

SHANKAR, A.H. & TITUS, R.G. T cell and non-T cell compartments can independently determine resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**. **181**: 845-855, 1995.

STAFFORD, J.L.; NEUMANN, N.F.; BELOSEVIC, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Crit Rev Microbiol**, **28**: 187-248, 2002.

STUART, L.M. & EZEKOWITZ R.A. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, **22**:539-50, 2005.

SWANSON, J.A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nat Rev Mol Cell Biol**. **9(8)**:639-49, 2008.

THOMAS, G. & HALL, M.N. TOR signalling and control of cell growth. **Current Opinion in Cell Biology**. Dec **9(6)**: 782-7, 1997.

TURCO, S.J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annu. Rev. Microbiol.**, **46**: 65-94, 1992.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol**. **20**:825-52, 2002.

VAN SLUIJTERS, D.A.; DUBBELHUIS, P.F.; BLOMMAART, E.F.; MEIJER, A.J. Amino-acid-dependent signal transduction. **Biochemical Journal**. **351 Pt 3**: 545-50, 2000.

VERAS, P.S.; MOULIA, C.; DAUGUET, C.; TUNIS, C.T.; THIBON, M.; RABINOVITCH, M. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. **Infection and Immunity**. **63(9)**: 3502-6, 1995.

VERAS, P.S.; DE CHASTELLIER, C.; MOREAU, M.F.; VILLIERS, V.; THIBON, M.; MATTEI, D.; RABINOVITCH, M. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Cell Science. 107 (Pt 11):** 3065-76, 1994.

VIEIRA, O.V.; BOTELHO, R.J.; RAMEH, L.; BRACHMANN, S.M.; MATSUO, T.; DAVIDSON, H.W.; SCHREIBER, A.; BACKER, J.M.; CANTLEY, L.C.; GRINSTEIN, S. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. **Journal Cell Biology. 155(1):** 19-25, 2001.

WANG, Z.E.; REINNER, S.L.; ZHENG, S.; DALTON, D.K.; LOCKSLEY, R.M. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **Journal of experimental Medicine. 179:** 1367-1371, 1994.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell. 124(3):** 471-84, 2006.

XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K.E.; EISSA, N.T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity. 27(1):**135-44, 2007.