



FIOCRUZ

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A
ENDOCITOSE E A ADESÃO CELULAR EM MACRÓFAGO
MURINO *IN VITRO***

JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

**Salvador – Bahia
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**ESTUDO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A
ENDOCITOSE E A ADESÃO CELULAR EM MACRÓFAGO
MURINO *IN VITRO***

JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

Orientadora: Patrícia Sampaio Tavares Veras

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia
2015**

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

Lima, José Geraldo Bomfim
L732e Estudo do efeito da autofagia sobre a endocitose e a adesão celular em
macrófago murino *in vitro*. / José Geraldo Bomfim Lima. - 2015.
116 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dr^a. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Patologia e
Biointervenção.

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. Autofagia. 2. Endocitose. 3. Adesão Celular. 4. Macrófago. I. Título.

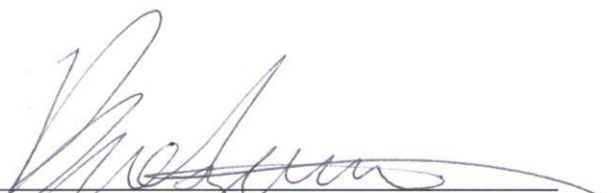
CDU 576

Título da Tese: "ESTUDO DO EFEITO DA AUTOFAGIA SOBRE A ENDOCITOSE E A ADESÃO CELULAR IN VITRO".


JOSÉ GERALDO BOMFIM LIMA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



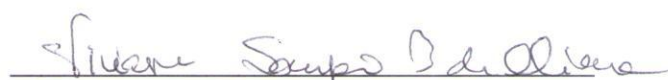
Dr. Bruno da Rocha Azevedo
Pesquisador Jovem Talento
UFRJ



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
CPqGM/Fiocruz



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
CPqGM/Fiocruz



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira
Pesquisadora
CPqGM/Fiocruz



Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora Titular
CPqGM/Fiocruz

“Escrever é sobretudo uma questão de trabalho. Há um dom que lhe é dado mas se não trabalhar muito de nada lhe serve. É tudo conquistado penosamente. Aliás, quando está a sair com facilidade, eu desconfio logo. Aquilo que vem muito depressa não pode ser bom.”

António Lobo Antunes

Fontes de Financiamento:

CNPq – Bolsa de Doutorado
CAPES/COFECUB – Bolsa de Doutorado Sanduíche

**A minha esposa, Bárbara N. R. R. Soares,
por todo amor e parceria.**

Obrigado pelo constante incentivo e encorajamento.

AGRADECIMENTOS

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

A Beatriz Dias, Camila Victoria e Djalma Carvalho pelo auxílio, contribuição com a execução dos experimentos e a toda ajuda que possibilitou a realização dessa tese.

A Juliana Perrone pelo apoio e disponibilidade para discussão e revisão dessa tese.

A Dr. Luiz A. R. Freitas, Rodrigo Araújo, Antonio Petersen, Luana Palma, Carlos Eduardo, Niara Almeida, Lairton Borja, Isaac Queiroz, Deborah Fraga, Manuela Solcà pela amizade, ajuda e convivência no dia a dia do laboratório.

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

Aos membros da banca examinadora que aceitaram o desafio de poder contribuir para a minha formação científica e para o aperfeiçoamento do trabalho.

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

A Adriana Lanfredi Rangel e Claudio Pereira Filgueira pelo auxílio com o processamento do material para análise ultra-estrutural e todo o suporte para a utilização da Plataforma de Microscopia.

A Liliane Monteiro Cunha e Rafaela Silva pelo auxílio na utilização da Plataforma de Citometria.

A Biblioteca pelo suporte, em especial a Dona Fiscina Sampaio pela revisão técnica da tese.

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

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

A meu irmão, Thiago, pelo companheirismo e encorajamento.

A meus pais, Seu Geraldão e Dona Ovives, por toda credibilidade e valorosos ensinamentos.

A Bárbara, esposa e amiga, por todo amor, compreensão e paciência ao longo dessa jornada.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ENDOCITOSE	16
1.1.1 A Via Endocítica.....	16
1.1.2 Tipos de Endocitose.....	19
1.1.3 Endocitose e a Adesão/Migração Celular.....	24
1.2 AUTOFAGIA	28
1.2.1 A Via Autofágica.....	28
1.2.2 Regulação da Via Autofágica.....	31
1.2.3 Interação da Autofagia com a Endocitose.....	36
2 JUSTIFICATIVA	40
3 HIPÓTESE	43
4 OBJETIVOS	43
4.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
5 CAPÍTULOS	44
5.1 CAPÍTULO I – A indução de autofagia altera a adesão celular em macrófagos sem alterar a endocitose.....	44

5.2 CAPÍTULO II – A indução de autofagia inibe a fagocitose em macrófagos murino.....	66
6 DISCUSSÃO GERAL.....	78
7 CONCLUSÕES.....	87
8 PERSPECTIVAS.....	88
9 ANEXO.....	89
9.1 MANUSCRITO – <i>Encapsulation of Living Leishmania Promastigotes in Artificial Lipid Vacuoles.....</i>	89
9.2 ARTIGOS PRODUZIDOS EM COLABORAÇÃO DURANTE O DOUTORADO.....	102
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LIMA, José Geraldo Bomfim. Estudo do efeito da autofagia sobre a endocitose e a adesão celular em macrófago murino *in vitro*. 99 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A influência da autofagia em processos celulares que participam da homeostase celular, como a endocitose e a adesão celular, até o momento, foi pouco estudada. A endocitose consiste na internalização de material extracelular, quando as vesículas endocíticas são menores que 500nm é chamada de endocitose em microescala e quando as vesículas formadas são maiores que essa medida trata-se de endocitose em macroescala. Foi demonstrado que a conexão da via endocítica com a via autofágica é fundamental para a degradação de material citosólico e, subsequente, produção de energia e disponibilização de substrato para o metabolismo celular. Estudos controversos da literatura mostraram que a autofagia pode favorecer ou não interferir com a endocitose em macroescala. Além disso, alguns trabalhos demonstraram que o processo autofágico foi capaz de reduzir a reciclagem de integrinas para a membrana plasmática por alterar a endocitose em microescala envolvida na internalização desse tipo de proteína, reduzindo a capacidade de adesão e, conseqüentemente, a migração celular. Assim, em conjunto, esses achados evidenciam que a autofagia pode interagir e interferir com eventos celulares dependentes da participação da membrana plasmática como a endocitose e a adesão celular.

OBJETIVO: No presente estudo, hipotetizamos que a prévia indução de autofagia em macrófagos é capaz de reduzir a endocitose em micro e macroescala, além de reduzir a capacidade de adesão celular. Desta forma, o objetivo desse estudo foi determinar o efeito da indução de autofagia, *in vitro*, sobre a endocitose e a adesão de macrófagos murino.

MATERIAL E MÉTODOS: Macrófagos foram induzidos à autofagia por privação de nutrientes (*starvation*) ou pelo tratamento com um indutor farmacológico, a rapamicina, seguida da exposição a macromoléculas ou grandes partículas de diferentes naturezas. Além disso, após indução de autofagia, macrófagos em suspensão foram incubados em superfícies como o vidro ou uma matriz de colágeno e fibronectina para avaliação da capacidade de adesão. Os percentuais de endocitose em microescala, em macroescala e de adesão foram estimados.

RESULTADOS: Mostramos que a indução de autofagia promoveu redução da capacidade fagocítica em cerca de 60% no percentual de macrófagos que internalizam grandes partículas, como levedo, sendo um mecanismo precoce e reversível. Ao passo que a indução de autofagia por privação de aminoácidos ou farmacológica não interferiu na endocitose em microescala. A indução de autofagia não alterou a endocitose de transferrina (endocitose mediada por receptores) e endocitose de BSA (endocitose de fase fluida). Em contraste, a indução de autofagia promoveu redução em aproximadamente 70% da quantidade de macrófagos que aderem a matriz de colágeno e fibronectina. Uma possível explicação para a redução da endocitose em macroescala pode estar relacionada à autofagia diminuir a disponibilidade de grandes extensões de membrana necessárias à internalização de partículas maiores que 500nm. Alternativamente, a indução de autofagia pode estar levando a célula a uma indisponibilidade de receptores na membrana plasmática que justificaria a redução da capacidade fagocítica e de adesão do

macrófago murino. CONCLUSÕES: A indução de autofagia diminui a capacidade fagocítica e a capacidade de adesão do macrófago murino.

Palavras-chave: Autofagia, Endocitose, Adesão Celular, Macrófago.

LIMA, José Geraldo Bomfim. Autophagy effect on endocytosis and cell adhesion *in vitro*. . 99 f. il. Thesis (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The influence of autophagy on cellular processes that participate in cellular homeostasis, such as endocytosis and cell adhesion has been poorly evaluated. Endocytosis consists in the internalization of extracellular material and includes microscale endocytosis, when endocytic vesicles are smaller than 500nm, and macroscale endocytosis, when the formed vesicles are larger than this measure. It has been shown that the connection between the endocytic and the autophagic pathways is essential for degradation of cytosolic material and, subsequently, power generation and provision of substrate for cellular metabolism. Controversial studies showed that autophagy can improve or do not interfere with macroscale endocytosis. Furthermore, some studies demonstrated that the autophagic process reduced integrin recycling to the plasma membrane through the modulation of microscale endocytosis involved in the internalization of this protein, reducing cell adhesion and migration. Taken together, these findings show that autophagy can interact and interfere with cellular events that depend on plasma membrane participation, such as endocytosis and cell adhesion.

OBJECTIVES: In the present study, we hypothesized that prior autophagy induction in macrophage reduces micro and macroscale endocytosis, as well as cell adhesion. Thus, the aim of this study was to determine the effect of autophagy induction, *in vitro*, on endocytosis and adhesion of murine macrophages.

MATERIAL AND METHODS: Autophagy by nutrient deprivation (starvation) or by treatment with an inducer drug, rapamycin, was induced in macrophages, followed by exposure to macromolecules or large particles of different natures. Furthermore, after autophagic induction, macrophages were plated on different surfaces like glass or collagen-fibronectin matrix to evaluate cell adhesiveness. After that, the percentage of endocytosis in micro and macroscale and adhesion were determined.

RESULTS: We showed that autophagy induction decreases phagocytic ability to 60% in macrophages that internalized large particles like yeast. This is a reversible mechanism that occurs at early stages after autophagy induction. On the other hand, autophagy by amino acid deprivation or pharmacological induction does not interfere with the microscale endocytosis. The autophagy induction doesn't alter transferrin endocytosis (receptor-mediated endocytosis) and BSA endocytosis (fluid-phase endocytosis). By contrast, the autophagy induction leads to a reduction of approximately 70% in macrophages adhesion on a collagen-fibronectin matrix. The reduction of macroscale endocytosis may be related to the decreased availability of large areas of membrane required for internalization of particles larger than 500nm caused by autophagy. Alternatively, autophagy induction may be leading to receptors unavailability in plasm membrane, which would explain the reduction of the phagocytic and adhesion ability.

CONCLUSIONS: autophagy induction reduces the phagocytic ability and the macrophage adhesion.

Keywords: Autophagy, Endocytosis, Cell Adhesion, Macrophage.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATG	Proteínas relacionadas à autofagia
<i>ATG</i>	Genes relacionados à autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BMM Φ	Macrófago derivado de medula óssea
CR	Receptor para frações do complemento
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”
EBSS	“Earl's Balanced Salt Solution”
ECM	Matriz Extracelular do inglês “Extracellular Matrix”
EE	Endossomo Inicial do inglês “Early Endosome”
HEPES	N-2hidroxitillpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico
H&E	Hematoxilina-eosina
FA	Adesão Focal do inglês “Focal Adhesion”
Fc γ R	Receptor para porção Fc de imunoglobulinas gama
LC3	“Microtubule-associated protein 1 light chain 3”
LE	Endossomo Tardio do inglês “Late Endosome”
mTOR	“mamalian Target of Rapamycin”
mTORC1	“mammalian Target of Rapamycin Complex-1”
M Φ	Macrófago
PAMPs	Padrões bioquímicos moleculares associados a patógenos
PRPs	Receptores reconhedores de padrões bioquímicos moleculares associados a patógenos
PI3K	Fosfatidilinositol 3-fosfato cinase
RE	Endossomo de Reciclagem do inglês “Recycle Endosome”
SD	Desvio padrão

SE	Erro padrão
SRs	“Scavenger Receptors”
TLR	Receptor do tipo Toll
ULK1	“Uncoordinated-51-like kinase 1”
VPS34	Fosfatidilinositol 3-fosfato cinase classe III do inglês “phosphatidylinositide 3-kinase class III”
Zim	Zimosan

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via Endocítica.....	19
Figura 2. Etapas da Fagocitose.....	23
Figura 3. Via Autofágica.....	31
Figura 4. Regulação da Via Autofágica.....	32
Figura 5. Visão Geral da Via Autofágica e das Organelas que Podem Contribuir para a Biogênese dos Autofagossomos.....	34
Figura 6. Regulação da Autofagia por mTOR.....	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENDOCITOSE

1.1.1 A Via Endocítica

A membrana plasmática constitui a interface de delimitação e comunicação do citoplasma com o ambiente externo, sendo a célula capaz de identificar e responder às diversas modificações bioquímicas do meio extracelular. Desta forma, as células regulam a sua composição interna e podem interferir no ambiente ao seu redor (DOHERTY e McMAHON, 2009) por diferentes vias. A célula pode trocar materiais e substratos dos meios intra e extracelular através de vesículas originárias da membrana. A aquisição desses materiais pode se fazer pela via endocítica, enquanto que a eliminação de componentes intracelulares em compartimentos vesiculares para o meio externo pode ser feito pela via exocítica (WILLINGHAM e PASTAN, 1984).

A endocitose é o termo geral para a internalização de fluidos, solutos, macromoléculas, componentes de membrana e partículas pela invaginação da membrana e a formação de vesículas e vacúolos através da fissão da membrana plasmática dando origem aos endossomos (GRUENBERG, 2001; HELENIUS *et al.*, 1983). Em células de metazoários, o material endocitado inclui um espectro de nutrientes e os seus carreadores, como o binômio receptor-ligante, fluidos, solutos, lipídeos, proteínas de membrana, componentes da matriz extracelular, *debris* celulares, bactérias, vírus, entre outros. Desta forma, os endossomos realizam a triagem, o processamento, a reciclagem, o armazenamento e a degradação de substâncias ingeridas pelas células por endocitose (HOUTARI e

HELENIUS, 2011).

A via endocítica se inicia quando materiais de diferentes naturezas são endocitados e são entregues a endossomos iniciais (EE). Essa via de internalização em EE e a reciclagem de volta para a membrana plasmática caracteriza-se como a principal via de tráfego de membrana em células de mamíferos (SCOTT *et al.*, 2014; STEINMAN *et al.*, 1983). EE funcionam como uma espécie de estação de triagem ao assegurar que componentes da membrana que são reaproveitados sejam segregados do material endocitado. Os EE contendo proteínas plasmáticas solúveis juntamente com receptores de superfície podem seguir a rota de reciclagem de volta à membrana plasmática através dos endossomos de reciclagem (RE). Alternativamente, o material endocitado em EE pode ser direcionado para degradação nos lisossomos (GRANT e DONALDSON, 2009; GOLDSTEIN *et al.*, 1985). Os EE que seguem a rota de maturação da via endocítica irão se converter em endossomos tardios (LE) a partir da associação com proteínas do citosol pela face citosólica de suas membranas, além de sofrerem alterações concomitantes como a aquisição de hidrolases e a acidificação do meio do lúmen endossomal (RINK *et al.*, 2005; MAXFIELD e YAMASHIRO, 1987). As alterações tanto na porção citosólica da membrana quanto no interior dos EE que dão origem aos LE, consistem em processos que regulam muitas das funções dos compartimentos da via endocítica, incluindo desacoplamento receptor-ligante, correto transporte dos LE na direção dos lisossomos e atividade de enzimas lisossomais (HOUTARI e HELENIUS, 2011).

Durante o processo de maturação da via endocítica, tanto os EE quanto os LE se comunicam com o Aparelho de Golgi através de um intercâmbio bidirecional de vesículas (PFEFFER, 2009). Essa comunicação permite a chegada de

hidrolases ácidas que conferem uma identidade de compartimento inicial de degradação aos EE, que é reforçada durante a sua maturação em LE. Uma vez formados, os LE, ricos de hidrolases ácidas, com bombas de próton em suas membranas que tornam o ambiente ácido, passam a exibir uma atividade degradativa mais intensa que aquela apresentada pelos EE. Estes compartimentos amadurecem a LE e, posteriormente, completam o processo de maturação da via endocítica ao fusionarem-se com os lisossomos dando origem aos endolisossomos (Figura 1) (TJELLE *et al.*, 1996). Por fim, os substratos gerados, a partir da degradação do material endocitado, por ação de permeases na membrana dos endolisossomos, serão liberados no citosol para serem utilizados pelas células para geração de energia e em todas as atividades do metabolismo celular (SCOTT *et al.*, 2014; MELLMAN, 1996).

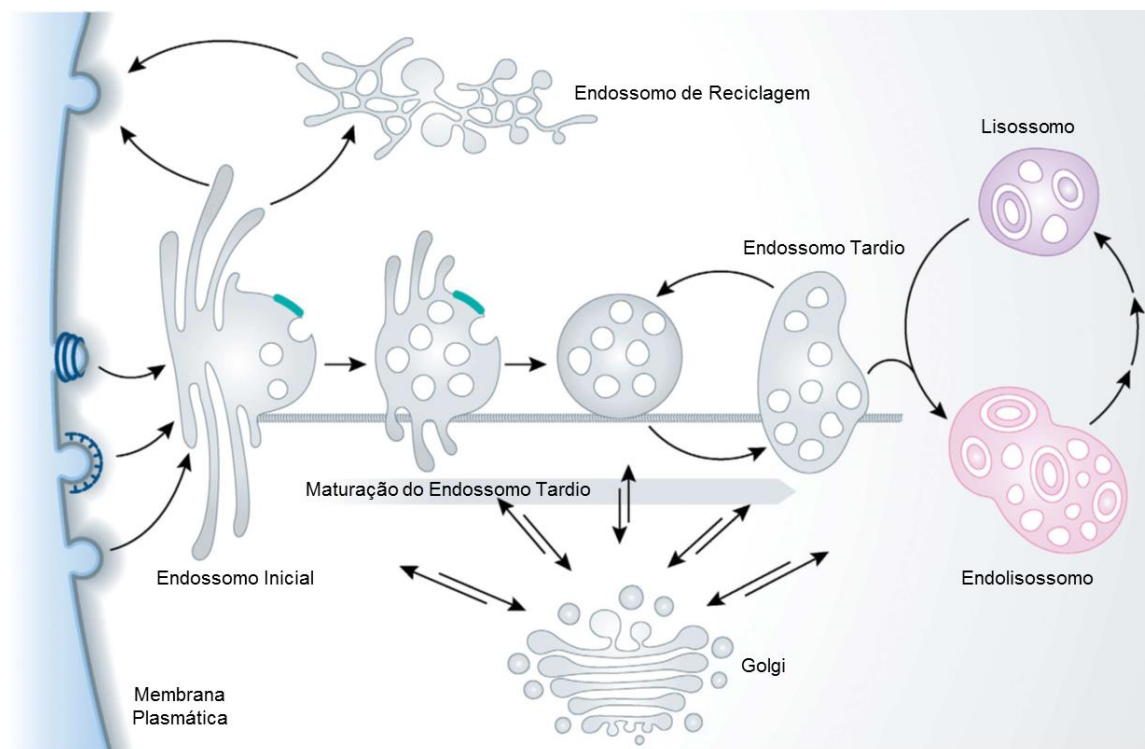


Figura 1: Via Endocítica. As vesículas endocíticas primárias entregam os seus conteúdos e sua membrana para o Endossomo Inicial (EE) na periferia do citoplasma. Depois de um período de cerca de 8-15 minutos durante o qual EE acumulam material pode acontecer a reciclagem para a membrana plasmática via Endossomos de Reciclagem, ou pode haver a conversão de EE em Endossomo Tardio (LE). Assim, alguns EE podem se mover em direção ao interior da célula formando LE nascentes. LE carregam um subconjunto selecionado de material endocitado do EE, que se combina com a rota das hidrolases lisossomais recém-sintetizadas e componentes da membrana da via secretora. Os LE também podem passar por reações de fusão homotípicas e crescerem em tamanho, e o seu papel como sistema de alimentação é entregar esta mistura de componentes endocitados e de secreção para os lisossomos. Para serem capazes de fazê-lo, os LE continuam a sofrer um processo de maturação e fusionam-se com lisossomos gerando uma organela híbrida transitória, o endolisossomo, onde ocorre uma degradação ativa e o material degradado é liberado para o citosol para ser utilizado no metabolismo celular (Modificado de HOUTARI & HELENIUS, 2011).

1.1.2 Tipos de Endocitose

A endocitose pode ser dividida de maneira simplificada em dois grupos distintos de acordo com o tamanho das invaginações de membrana e vesículas endocíticas formadas: endocitose em microescala e endocitose em macroescala. Desta forma, a endocitose em microescala consiste na internalização de vesículas menores do que 500 nm via receptor dependente de clatrina, bem como pelas

menos compreendidas vias de endocitose que independem de clatrina (BENMERAH e LAMAZE, 2007; MAYOR e PAGANO, 2007; CONNER e SCHMID, 2003; JOHANNES *et al.*, 2015; HOWES *et al.*, 2010). A endocitose em macroescala compreende a internalização de vesículas maiores do que 500 nm, englobando dois processos: a fagocitose e a macropinocitose. Ao longo do texto que se segue, apenas será abordado a endocitose dependente de clatrina, a macropinocitose e a fagocitose já que são o foco do presente estudo.

Endocitose dependente de clatrina. Nesta endocitose dependente da participação de clatrina, uma grande variedade de receptores transmembrana e os seus ligantes são empacotados em vesículas recobertas com clatrina com o auxílio de proteínas adaptadoras. Estas proteínas juntamente com as proteínas acessórias coordenam a nucleação da clatrina, uma proteína de revestimento, em locais da membrana plasmática que estão destinados à internalização. A nucleação de clatrina em curva estabiliza a deformação da membrana plasmática e auxilia a formação e constrição da vesícula para o interior da célula formando uma espécie de pescoço que mantém a vesícula presa à membrana (BRODSKY *et al.*, 2001; KIRCHHAUSEN, 1999; GOLDSTEIN *et al.*, 1979). Em seguida, a dinamina, uma proteína GTPase de cisão de membrana, forma um polímero helicoidal em torno deste pescoço e, mediante a hidrólise de GTP, medeia a fissão da vesícula recoberta por clatrina da membrana plasmática, liberando no interior da célula uma vesícula endocítica com conteúdo específico. Depois da liberação da vesícula no citoplasma o revestimento de clatrina é liberado e a vesícula é direcionada ao EE, e pode seguir ou não na rota de maturação da via endocítica (BENMERAH e LAMAZE, 2007; DAUTRY-VARSAT, 1986). Esta é uma forma de endocitose que caracteriza-se por ter especificidade, pois o material que

é internalizado depende da interação de ligantes com receptores específicos. Estudos morfológicos indicam que a clatrina é capaz de revestir vesículas com diâmetro de 100-200nm, restringindo esse processo à internalização de pequenas vesículas (MCMAHON e BOUCROT, 2011).

Endocitose em grande escala. A macropinocitose e a fagocitose diferem em sua natureza de indução e em seus mecanismos, mas estes processos compartilham várias semelhanças, como a necessidade de remodelamento da membrana plasmática durante a internalização de material extracelular. Além disso, ambos têm cinética lenta em relação à endocitose em microescala e estudos têm demonstrado localização de proteínas reguladoras específicas em taças fagocíticas e em macropinosomos (SWANSON, 2008). Porém, macropinocitose e a fagocitose utilizam moléculas semelhantes como a PI3K (fosfatidilinositol 3-fosfato cinase) e outros efetores para polimerização de actina e remodelamento do citoesqueleto, que é fundamental para a mobilização de grandes extensões da membrana plasmática (ARAKI *et al.*, 1996; KUMARI *et al.*, 2010).

A macropinocitose descreve uma forma de internalização de maior escala que frequentemente envolve projeções a partir da membrana que, subsequentemente, se fundem com a própria membrana plasmática. Este processo resulta na captação de fluidos e componentes extracelulares contidos no interior dessas projeções membranares que irão formar os macropinosomos (SWANSON e WATTS, 1995) que podem variar de 0,2 a 10 μm de diâmetro. O tamanho e a forma desses compartimentos são independentes dos ligantes e sua formação pode ser estimulada, por exemplo, por agentes químicos e patógenos (KERR e TEASDALE, 2009).

O outro tipo de endocitose em grande escala, a fagocitose é definida como um processo de ingestão pelas células de partículas de grandes dimensões (maiores que 0,5 μm). Diferente da macropinocitose, a fagocitose é um processo específico, pois compreende a internalização de partículas que são reconhecidas por receptores de diversas naturezas (FLANNAGAN *et al.*, 2012; EZEKOWITZ *et al.*, 1990; ANDERSON *et al.*, 1990; GRIFFIN *et al.*, 1975). Em eucariotos unicelulares é o mecanismo primário de obtenção de alimento e em metazoários, a fagocitose é um mecanismo envolvido na destruição e remoção de partículas estranhas. Em mamíferos, a fagocitose é um mecanismo que participa do remodelamento tecidual durante o desenvolvimento, na inflamação, na remoção de células senescentes, além de ser um importante mecanismo celular de defesa contra a infecção por microrganismos (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). Esses receptores são altamente conservados entre os diferentes organismos, apresentando especificidade geneticamente determinada. Macrófagos e células dendríticas expressam na membrana plasmática uma variedade desses PRRs que podem estar envolvidos no reconhecimento e indução da resposta imune, pois reconhecem distintos padrões bioquímicos moleculares associados a patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* – PAMPs). Dentre os receptores envolvidos no reconhecimento destes PAMPs, estão incluídos, por exemplo: 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 e OZINSKY, 2002; STUART e EZEKOWITZ, 2005).

A fagocitose é um processo celular complexo que envolve uma série de eventos organizados divididos em etapas distintas e complementares, classicamente dividida em 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 (Figura 2) (PAUL, 2003; JAUMOUILLE e GRINSTEIN, 2011).

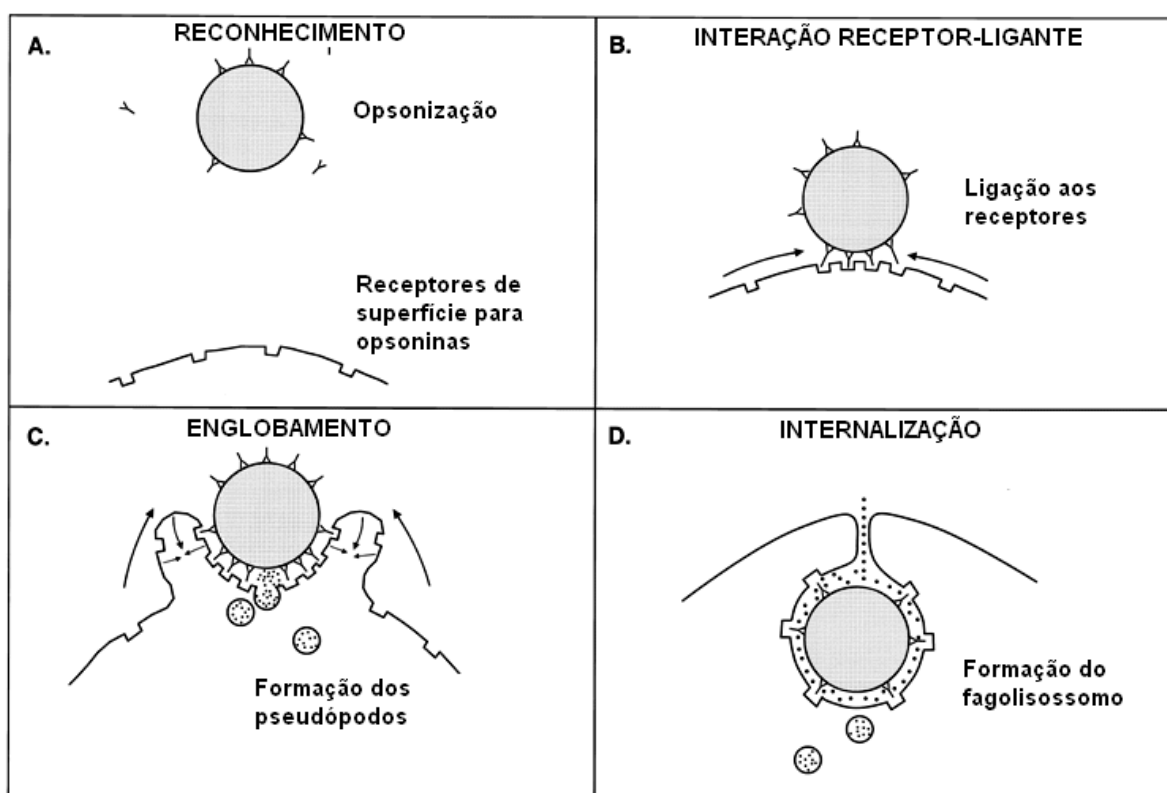


Figura 2: Etapas da fagocitose. A fagocitose inicia-se com o reconhecimento por receptores fagocíticos do alvo fagocítico, que pode estar ou não opsonizado (A). Em seguida, ocorre a interação receptor-ligante que desencadeia modificações da membrana plasmática e no citoesqueleto de actina (B). No englobamento, 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 por interação direta dos receptores da superfície celular ou, indiretamente, através do reconhecimento de proteínas solúveis do soro que ligam-se às partículas, opsonizando-as. Em seguida à interação receptor-ligante, mudanças na membrana plasmática e no citoesqueleto, como a polimerização de actina e formação dos pseudópodos, são desencadeadas. Uma taça fagocítica forma-se na região de contato com a partícula ou o microrganismo e, em seguida, inicia-se a extensão da membrana. A etapa de englobamento consiste na formação de pseudópodos que envolvem a partícula ou o microrganismo. Por fim, as porções da membrana plasmática nas extremidades dos pseudópodos fusionam-se, o que resulta na formação do fagossomo e internalização do material externo. Após os eventos envolvidos na internalização, os fagossomos, contendo o material endocitado, podem se fundir com lisossomos dando origem ao compartimento denominado fagolisossomo, no interior do qual, em geral, ocorre a degradação das partículas ingeridas como: microrganismos, células senescentes e partículas estranhas ao organismo (FREEMAN e GRINSTEIN, 2014; SWANSON, 2008; KINCHEN e RAVICHANDRAN, 2008; DESJARDINS *et al.*, 1994; FAIRN e GRINSTEIN, 2012).

1.1.3 A Endocitose e a Adesão/Migração Celular

Dentre todos os processos celulares que têm interação com a endocitose, destacamos a adesão celular, um mecanismo fundamental para a homeostasia da célula, que depende da interação com a via endocítica para que possa ocorrer (CASWELL e NORMAN, 2006). O processo de adesão celular, seja com outra célula ou com o substrato, compartilha com a via fagocítica proteínas de

membrana que podem servir ao mesmo tempo como receptores de reconhecimento e de adesão (DUPUY e CARON, 2008).

As interações célula-matriz ocorrem através da ligação entre integrinas, que são glicoproteínas da membrana plasmática, e a matriz extracelular (ECM). A adesão celular à ECM mediada por integrinas é um processo crítico para o adequado crescimento e sobrevivência das células (WOLFENSON *et al.*, 2013; MEREDITH *et al.*, 1993).

As integrinas são consideradas como uma das principais famílias de receptores de adesão celular. As células possuem um repertório de 24 integrinas distintas que se ligam aos diferentes componentes da ECM e formam as adesões focais (SPRINGER e WANG, 2004). Elas são moléculas heterodiméricas que contêm uma subunidade α e uma β que estão ligadas de maneira não covalente. Ambas as subunidades são proteínas transmembrana do tipo I que possuem grandes domínios extracelulares e pequenos domínios citoplasmáticos. A porção citosólica das integrinas é responsável pela coordenação ou remodelamento do citoesqueleto e pelos processos de sinalização, enquanto que a porção das integrinas localizada na face extracelular, interage tanto com macromoléculas da ECM como com contra-receptores nas superfícies das células adjacentes (HUMPHRIES *et al.*, 2006). A adesão focal (FA) ou contato focal é uma área restrita da membrana plasmática em que as integrinas agrupam-se para interagir com a ECM. A formação da FA envolve, além da participação de integrinas, o recrutamento de várias proteínas cinases que transduzem a sinalização a partir da ECM para reorganização dos filamentos de actina que auxiliam na movimentação e migração celular (MITRA *et al.*, 2005).

Para que a adesão e migração celulares ocorram é fundamental o aumento

da expressão de integrinas na superfície celular que envolve a translocação de moléculas armazenadas em grânulos citoplasmáticos localizados na periferia da membrana plasmática. Além disso, é importante que ocorra a endocitose mediada por receptores do tipo integrinas e direcionamento destas proteínas para EE e, em seguida, encaminhamento para RE para serem redirecionadas para a membrana plasmática (MARITZEN *et al.*, 2015). Assim, existem evidências que essa recirculação de vesículas é fundamental para a manutenção da quantidade necessária de integrinas na superfície celular. Quando internalizadas pela via endocítica, as integrinas encontram um ambiente ligeiramente ácido no interior do EE, onde há liberação de fragmentos de ligantes das integrinas, assegurando a recirculação de moléculas livres para a membrana plasmática. Além disso, a via endocítica contribui com a regulação da expressão de integrinas na superfície celular, através da detecção e remoção da membrana plasmática de integrinas não funcionais (RIDLEY *et al.*, 2003; CASWELL e NORMAN, 2006).

A migração de células envolve a interação e adesão da célula ao substrato pode ser dividido em diferentes etapas: protrusão do lamelipódio ou filopódio na parte anterior da célula, adesão da área de protrusão ao substrato por complexos focais, contração do complexo actina-miosina citoplasmática e liberação de estruturas chamadas de contatos focais na parte posterior da célula. Assim, a quantidade de locais de adesão formados, determina a porção da célula envolvida na adesão e movimentação celular (GEIGER *et al.*, 2001). Em macrófagos, essas estruturas de contato podem apresentar-se em duas formas: complexos focais, que são estruturas semelhantes a contatos focais, mas sem fibras de estresse (ALLEN *et al.*, 1997) ou podossomos, que são estruturas circulares distintas restritas à linhagem mielóide (DeFIFE *et al.*, 1999; CORREIA *et al.*, 1999). As

principais proteínas que medeiam os eventos moleculares que culminam em adesão e migração de macrófagos é a actina polimerizada no citoplasma (ALLEN *et al.*, 1998; SHEETZ *et al.*, 1999) e a paxilina (proteína adaptadora de transdução de sinais). Sítios de fosforilação presentes na paxilina permitem uma sinalização altamente coordenada na adesão celular. Em complexos focais, esta proteína associa-se a diversas proteínas de sinalização, incluindo FAK e outras cinases e ativadores e efetores de pequenas GTPases, assim como vinculina (TURNER *et al.*, 1990; TACHIBANA *et al.*, 1995; BROWN *et al.*, 2004). A demonstração que a degradação de paxilina em macrófagos derivados de medula óssea leva à adesão e migração deficientes indica que paxilina exerce papel importante no controle da migração celular (ST-PIERRE *et al.*, 2013).

No contexto da adesão e migração celular, a indução de autofagia seria um mecanismo capaz de reduzir a expressão de integrinas na superfície celular, pois existem evidências que em resposta à autofagia ocorre redução da reciclagem dessas glicoproteínas para a membrana plasmática com, subsequente redução da capacidade celular de aderir e migrar (TULOUP-MINGUEZ *et al.*, 2013). Esses autores mostraram que a autofagia leva à alteração da via de reciclagem das integrinas, promovendo degradação dessas moléculas nos lisossomos. Isso resulta em inibição da re-expressão das integrinas na membrana plasmática e redução da capacidade de adesão celular e, conseqüentemente, alteração da migração celular (TULOUP-MINGUEZ *et al.*, 2013).

1.2 AUTOFAGIA

1.2.1 A Via Autofágica

A autofagia é um dos principais processos fisiológicos de ocorrência natural envolvido no metabolismo celular, pois fornece nutriente internamente quando as fontes nutricionais externas estão escassas ou indisponíveis. Desta forma, esse processo conservado evolutivamente foi originalmente descrito como um mecanismo fundamental na manutenção da homeostase e renovação celular através da degradação de macromoléculas intracelulares em células animais (MORTIMORE e SCHWORER, 1977; KLIONSKY e OHSUMI, 1999).

Existem a autofagia constitutiva, na ausência de estresse, e aquela que é desencadeada em resposta ao estresse. A constitutiva tem uma função de “limpeza” para as células, eliminando os componentes alterados que poderiam tornar-se tóxicos e/ou perigosos como: agregados proteicos, lipídios oxidados, organelas danificadas e, até mesmo, patógenos intracelulares (RABINOWITZ e WHITE, 2010). A autofagia também pode ser induzida em resposta a situações diferentes de estresse como, por exemplo: alteração do volume celular, estresse oxidativo, acúmulo de proteína citoplasmática, sinalização hormonal, irradiação, tratamento xenobiótico e elevação de temperatura (MEIJER e CODOGNO, 2004; KLIONSKY e EMR, 2000).

Um dos estímulos para desencadeamento do processo autofágico é a exposição em meio com baixa concentração de nutrientes (*starvation*). Esse tipo de autofagia não seletiva é amplamente estudada devido a sua importância

fisiológica, visto que aminoácidos disponibilizados no processo autofágico são utilizados para manutenção do metabolismo celular (van SLUIJTERS *et al.*, 2000). Um outro tipo de autofagia é a seletiva que ocorre em situações específicas, promovendo a degradação regulada de proteínas e de organelas como: mitocôndrias (mitofagia), ribossomos (ribofagia), retículo endoplasmático (reticulofagia), peroxissomos (perofagia), lipídios (lipofagia) e microrganismos (xenofagia) (RABINOWITZ e WHITE, 2010).

Independente de ser seletiva ou não seletiva, a autofagia induz alterações intracelulares que indicam a sua ocorrência. Os aspectos morfológicos de células em autofagia foram caracterizados em células de mamíferos (ESKELINEN, 2005). Além disso, estudos da genética de levedo *Saccharomyces cerevisiae* permitiram a identificação e descrição de genes relacionados à autofagia, com seguida caracterização de genes ortólogos em células de mamífero. Desta forma, a infinidade de genes *ATG* (*autophagy-related genes*) que são expressos durante o processo autofágico codifica a transcrição de proteínas que regulam, de maneira coordenada, o desenvolvimento da via autofágica (MEIJER e CODOGNO, 2004; MIZUSHIMA *et al.*, 2011).

Em mamíferos, a autofagia foi classificada em autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia que é conhecida classicamente como autofagia (CUERVO, 2004). A autofagia mediada por chaperonas, que não tem a participação de autofagossomos, é a via onde substratos citoplasmáticos são reconhecidos por chaperonas Hsc70 e são translocados diretamente para o lúmen do lisossomo para degradação. Por outro lado, a microautofagia consiste no engolfamento direto de pequenas porções de citoplasma pela membrana lisossomal. Em contrapartida, a macroautofagia é o tipo de processo autofágico

em que os substratos são sequestrados dentro de vesículas citosólicas de dupla membrana denominadas autofagossomos. Esse tipo de autofagia é altamente conservada desde leveduras até células de mamíferos, tanto morfológica quanto no que diz respeito aos constituintes proteicos que compõem a maquinaria molecular que desencadeia a via autofágica (CUERVO, 2004; FENG *et al.*, 2014; MIZUSHIMA *et al.*, 2011). A macroautofagia é o foco do presente trabalho e será tratada como autofagia ao longo do texto.

O fluxo do processo autofágico coordenado pela ação de, pelo menos, 30 produtos de genes *ATG* (*autophagy-related protein*), ocorre de maneira ordenada, podendo ser dividido em três fases complementares (Figura 3). Inicialmente, ocorre o sequestro, ou seja, etapa em que os componentes celulares são capturados por uma estrutura em dupla membrana que formará o autofagossomo. Em seguida, ocorre o transporte do autofagossomo até o lisossomo, podendo o autofagossomo fundir-se com vesículas da via endocítica e dar origem ao anfissomo (STRØMHAUG e SEGLEN, 1993). Por fim, ocorre a maturação desse compartimento, que envolve a fusão das vesículas e a formação do autolisossomo. Nessa etapa, acontece a mistura do conteúdo autofagosomal com as hidrolases lisossomais, onde o material sequestrado é degradado por essas enzimas e os produtos da degradação são liberados no citosol através de permeases na membrana lisossomal, ficando disponíveis para vias sintéticas e metabólicas nas células (SHIBUTANI e YOSHIMORI, 2014; HAMASAKI e YOSHIMORI, 2010;).

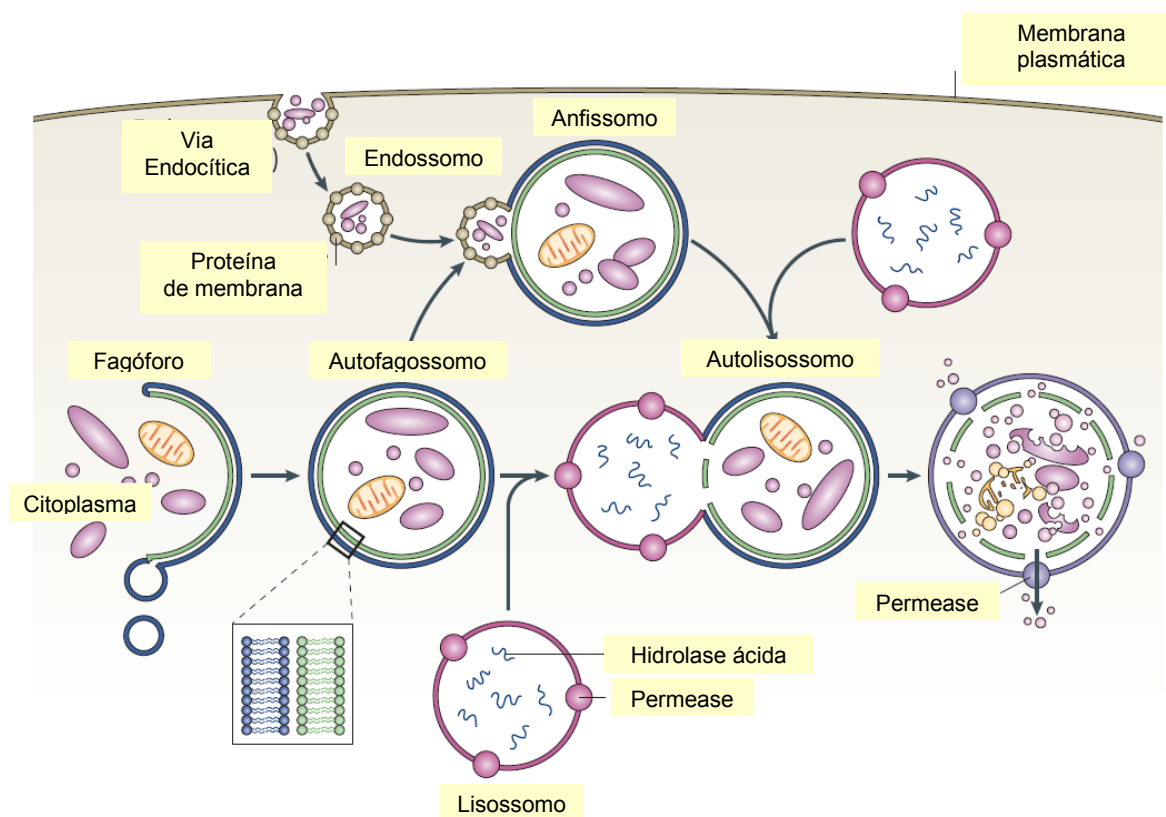


Figura 3: Via autofágica. A autofagia inicia-se com o sequestro de porção do citoplasma e/ou organelas por um compartimento denominado de fagóforo. Posteriormente, pode haver formação do autofagossomo, que é uma vesícula que caracteristicamente possui dupla membrana. Este compartimento pode fundir-se com vesículas da via endocítica, dando origem ao anfissomo. Em seguida, na rota de maturação, o autofagossomo ou o anfissomo funde-se com lisossomos e dão origem ao autolisossomo. No interior do autolisossomo o material sequestrado é degradado (Modificado de KLIONSKY, 2007).

1.2.2 Regulação da Via Autofágica

O passo inicial da autofagia, que envolve o sequestro de material citoplasmático, pode ser dividido em três etapas: iniciação, alongamento e fechamento do autofagossomo (Figura 4). A iniciação depende do recrutamento de múltiplos complexos proteicos em um conjunto de membrana em forma de taça denominado fagóforo. Esta estrutura apresenta dupla membrana que, ao ser formada, sequestra material citoplasmático. Em seguida, o fagóforo alonga-se e, finalmente, fecha-se formando o autofagossomo (LAMB *et al.*, 2013; KLIONSKY, 2007).

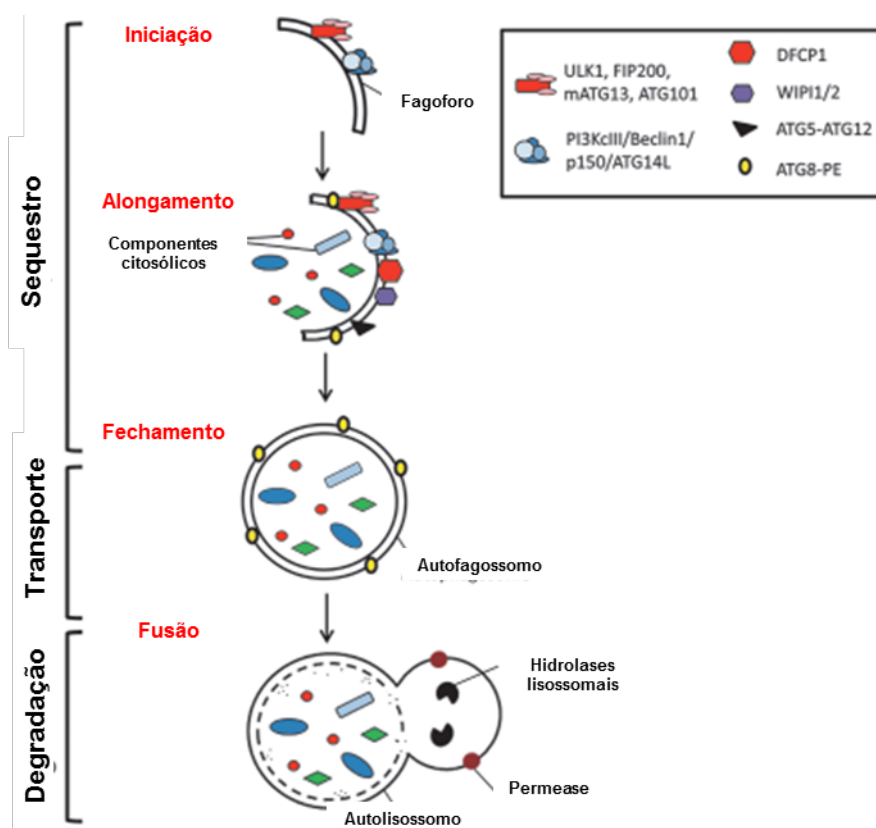


Figura 4: Regulação da via autofágica. A autofagia pode ser dividida em três fases: o sequestro de componentes celulares que podem formar o autofagossomo, o transporte do autofagossomo para o lisossomo, e a degradação. O processo inicial de sequestro é dividido em três fases: a iniciação, o alongamento e o fechamento, que são dependentes do recrutamento sequencial de proteínas ATG e montagem de membrana. O complexo ULK1 (ULK1, mATG13, FIP200 e ATG101) está envolvido na fase mais precoce da iniciação da autofagia. O complexo PI3K classe III constituído por Beclin1, PIKcIII (VPS34), ATG14L e p150 é igualmente recrutado para formação inicial dos autofagossomos. Outros fatores são recrutados para a membrana formada durante o alongamento do fagóforo, incluindo efetores de PI3P (WIPI1/2 e DFCP1), o conjugado Atg5/ATG12 e ATG8-PE (LC3/PE), que coordenados agem para promover o fechamento do autofagossomo (Modificado de GALLAGHER e CHAN, 2013).

A origem da membrana dupla que dá origem ao fagóforo é motivo de discussão e ainda hoje permanece foco de diversos estudos (LAMB *et al.*, 2013; HAMASAKI e YOSHIMORI, 2010), evidenciando a complexidade desse processo. Em um estudo pioneiro, foi sugerido que a membrana dupla seria originada de regiões do retículo endoplasmático sem ribossomos (DUNN, 1990). Por outro lado, estudos mais atuais evidenciaram que o fagóforo é originado a partir da doação de membrana de várias fontes, como: mitocôndria, retículo

endoplasmático, aparelho de Golgi, endossomos e, até mesmo, da membrana plasmática (Figura 5) (LAMB *et al.*, 2013).

Os eventos moleculares vêm sendo estudados de forma aprofundada em células de mamífero. Todas as etapas envolvidas no processo autofágico são dependentes de ATP e dos complexos proteicos ULK1, Beclin1/VPS34 e LC3 que representam os três principais complexos reguladores essenciais para a via autofágica (KIM e KLIONSKY, 2000; CODOGNO *et al.*, 2012). Primeiramente, a iniciação do autofagossomo depende do recrutamento do complexo ULK1 (*uncoordinated-51-like kinase 1*), que compreende ULK1, mATG13, FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein 200 kDa*) e ATG101. Em seguida, um segundo complexo é recrutado e contém a PI3K de classe III (*phosphoinositide 3-kinase*) / VPS34, juntamente com as subunidades reguladoras Beclin1, ATG14L e p150/VPS15. A ativação do complexo Beclin1/VPS34 resulta na produção de PI3P (*phosphatidylinositol 3-phosphate*) que gera um sinal lipídico e recruta outros efetores da via autofágica. Para o alongamento do fagóforo e englobamento do material sequestrado é necessário o recrutamento e ação conjunta dos complexos Atg5/Atg12 e LC3/PE (*microtubule-associated protein 1 light chain 3 / phosphatidylethanolamine*). LC3 é modificado a LC3-II e a geração e aumento de LC3-II no fagóforo guia processos essenciais durante a formação do autofagossomo, incluindo a ligação de receptores autofágicos, o alongamento da membrana e, finalmente, o fechamento da membrana do fagóforo. LC3-II permanece sobre a membrana dos autofagossomos formados, até a fusão com lisossomos, sendo comumente usado como marcador de compartimentos autofágicos e possibilitando monitoramento dessa via de degradação (Figura 4)

(FENG *et al.*, 2014; SHIBUTANI e YOSHIMORI, 2014; YANG e KLIONSKY, 2010; KABEYA *et al.*, 2000).

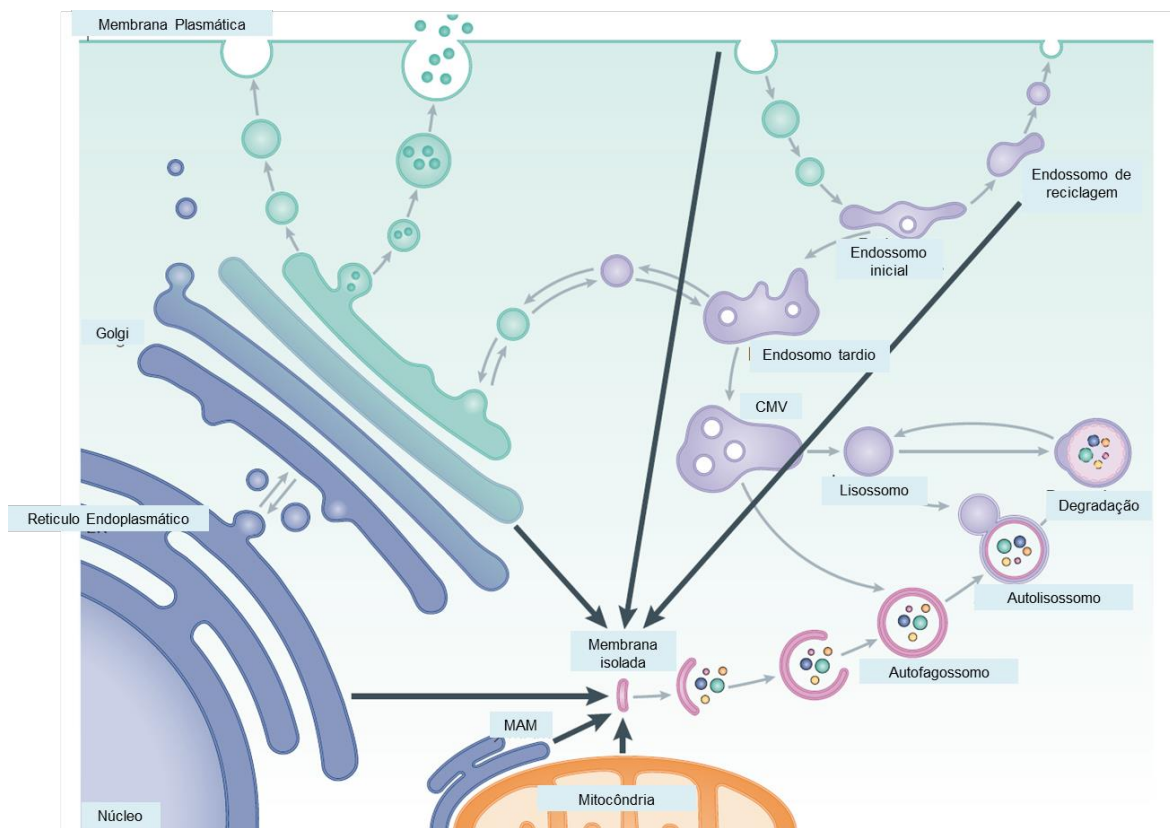


Figura 5: Visão geral da via autofágica e das organelas que podem contribuir para a biogênese dos autofagossomos. A membrana autofagossomal pode originar-se do retículo endoplasmático, das mitocôndrias, das membranas associadas a mitocôndrias (MAM), do Golgi, da membrana plasmática e dos endossomos de reciclagem. Ocorre formação e nucleação da membrana isolada que origina o fagóforo e, subsequente, expansão da membrana e sequestro do material citoplasmático em autofagossomos (Modificado de LAMB, 2013).

A via autofágica é um processo altamente regulado e a molécula central intracelular para integrar sinais relacionados com a autofagia é a mTOR (*mamalian Target Of Rapamycin kinase*). Esta proteína participa da via de sinalização envolvida no crescimento e metabolismo das células, sendo regulada por fatores de crescimento, nutrientes, energia e estresse (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). A primeira evidência de que mTOR tem papel no controle da autofagia

foi obtida em hepatócitos de ratos, quando o efeito da droga que inibe a função da cinase mTOR, rapamicina, induziu à autofagia em presença de aminoácidos (BLOMMAART *et al.*, 1995). Posteriormente, o mesmo efeito da rapamicina em induzir a autofagia foi observado em levedo (NODA e OHSUMI, 1998). Na presença de nutrientes e fatores de crescimento, mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex-1*) promove o crescimento celular e atividade metabólica enquanto suprime o complexo ULK1 e, conseqüentemente, a autofagia (Figura 6). Em *starvation* ou estresse, inúmeras vias de sinalização irão inativar a ação de mTORC1, e isto tanto suprime o crescimento das células reduzindo a demanda energética quanto induz a via autofágica, o que pode permitir a adaptação ao estresse e, conseqüentemente, à sobrevivência celular (EFEYAN e SABATINI, 2010; YANG e KLIONSKY, 2010).

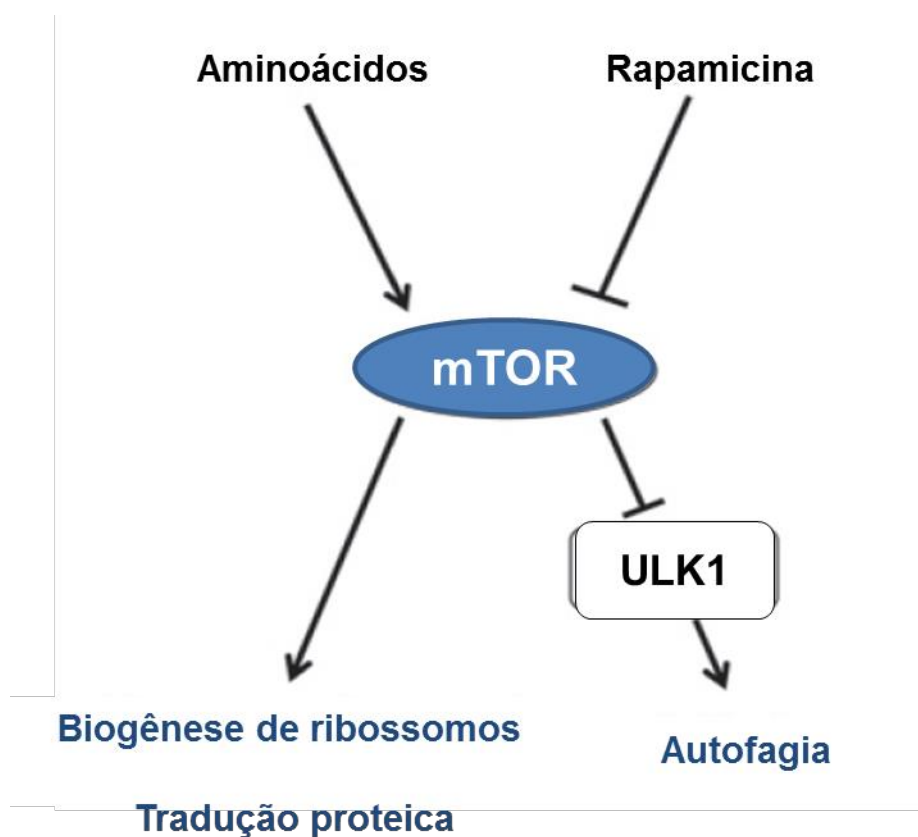


Figura 6: Regulação da autofagia por mTOR. A autofagia é controlada a partir da mTOR que é uma cinase central sensível a nutrientes que leva em células de mamífero à indução de autofagia e aumento da disponibilidade de aminoácidos. Assim, sob altas concentrações de aminoácidos, mTOR inibe a função do complexo ULK1, reprimindo assim a via autofágica e promovendo a síntese de proteínas e o crescimento celular. Em *starvation* ou o tratamento com rapamicina há inibição da atividade de mTOR, o que leva à ativação de ULK1 que induz a sinalização para desencadeamento do processo autofágico (Modificado de GALLAGHER e CHAN, 2013).

1.2.3 Interação da Autofagia com a Endocitose

O eficiente fluxo da via autofágica depende de uma via endocítica funcional já que os autofagossomos fusionam com lisossomos, onde ocorre degradação dos materiais sequestrados pela ação de hidrolases lisossomais, presença de próton ATPases vacuolares em suas membranas, responsáveis pela acidificação, além da presença de permeases que promovem o transporte dos substratos de volta para o citoplasma (SINGH e CUERVO, 2011). Além disso, evidências

mostraram que existe conexão entre a autofagia e a endocitose em uma etapa inicial, logo após a formação do autofagossomo, caracterizando um ponto de convergência no curso normal das duas vias, revelando uma interdependência entre esses dois processos celulares (LIU *et al.*, 1997; JING e TANG, 1999; STRØMHAUG e SEGLEN, 1993). Também foi demonstrado que a fusão de autofagossomos com EE funcionais é necessário para que a autofagia ocorra (RAZI *et al.*, 2009; TOOZE e RAZI, 2009). Foi, adicionalmente, relatado a ocorrência de um tipo de microautofagia endossomal onde proteínas citosólicas são degradadas em LE (SAHU *et al.*, 2011). Assim, a conexão entre a autofagia e a endocitose apresenta-se com um processo fundamental para a homeostasia celular.

A interação entre a via endocítica e a via autofágica não se restringe apenas como um processo de importância para a geração de energia e substrato para o metabolismo celular, mas está também intimamente ligado à eliminação de microrganismos intracelulares em alguns modelos de infecção e interação de patógenos e células-hospedeira. 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 já no contato inicial do patógeno com a célula hospedeira. 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 induzido por *Mycobacterium tuberculosis*, o que resulta em um processo de fusão com lisossomo mais rápido quando comparado com fagocitose sem estimulação do TLR2. Adicionalmente, foi

mostrado que há desencadeamento do processo autofágico em resposta à sinalização via TLR4 e TLR7 (XU *et al.*, 2007; DELGADO *et al.*, 2008). Esses estudos demonstram 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. Além disso, Bonilla e colaboradores (2013) apresentaram evidências que a autofagia regula a fagocitose através da modulação da expressão de receptores *scavenger*. Eles demonstraram que o aumento da fagocitose em macrófagos *ATG7-knockout*, que apresentam a via autofágica deficiente, é através do aumento da expressão do receptor *scavenger*, MARCO (*macrophage receptor with collagenous*) e MRS1 (*macrophage scavenger receptor 1*). Esses dados sugerem que a autofagia funciona como um processo celular complementar à fagocitose durante a resposta da imunidade inata. Desta forma, a interação da via autofágica com a via endocítica, através do processo fagocítico, torna-se importante para debelar a infecção por patógenos intracelulares.

Além da interação com a via fagocítica durante o processo de infecção por patógenos intracelulares, vários estudos têm evidenciado o papel da autofagia durante a resposta imunoinflamatória à infecção por diversos microrganismos. O processo autofágico participa na proteção de organismos em resposta a patógenos (RUBINSZTEIN, 2012; BAUCKMAN *et al.*, 2015), facilitando a degradação intracelular de bactérias, vírus e protozoários patogênicos.

Nesse contexto, estudos demonstraram que a autofagia pode participar tanto no controle como no favorecimento da infecção causada por patógenos intracelulares. Alguns microrganismos intracelulares interagem com a via autofágica na célula hospedeira e desenvolvem estratégias distintas de

sobrevivência. Bactérias como *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). Adicionalmente, a indução de autofagia em macrófagos humanos inibe a sobrevivência de cepas avirulentas e virulentas de *M. tuberculosis* (GUTIERREZ *et al.*, 2004). Na infecção por protozoários, por exemplo, foi demonstrado que a via autofágica do hospedeiro é essencial para a invasão e estabelecimento intracelular do *Trypanosoma cruzi* (ROMANO *et al.*, 2009). *Toxoplasma gondii* inibe a via autofágica do hospedeiro para favorecer a sua sobrevivência (LEE *et al.*, 2013). Por outro lado, a infecção por *L. amazonenses* induz a via autofágica na célula hospedeira favorecendo a do parasito (CYRINO *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que o vacúolo parasitóforo induzido por *L. mexicana* pode adquirir nutrientes citosólicos por microautofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1999) e que a indução de autofagia promove aumento da carga parasitária em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (PINHEIRO *et al.*, 2009). Esses dados enfatizam que a via autofágica exerce um papel variável na relação patógenos/célula-hospedeira a depender do modelo de infecção estudado. Isso ressalta ainda mais a importância da via autofágica para as células, abrindo a perspectiva para o entendimento da autofagia não apenas como uma via de geração de energia.

2 JUSTIFICATIVA

Desde o início dos anos 2000 a autofagia vem sendo alvo de investigação em diversas frentes de pesquisa. A maioria dos trabalhos vem estudando o papel da via autofágica na infecção de células hospedeiras por diversos patógenos, discutindo seu papel como mecanismo capaz de favorecer ou inibir a sobrevivência destes microrganismos intracelulares (LEVINE e DERETIC, 2007; SCHMID e MÜNZ, 2007; GOMES e DIKIC, 2014).

Em nosso laboratório trabalhamos com o modelo de interação parasito / célula hospedeira no contexto da infecção de macrófagos por *Leishmania*. Ao buscar relacionar a via autofágica com a infecção por *Leishmania*, dados da literatura apontam que o processo autofágico poderia ser benéfico à sobrevivência intracelular do parasito *Leishmania*. Foi demonstrado que o vacúolo parasitóforo induzido por *L. mexicana* pode se beneficiar da comunicação com a via autofágica tendo acesso a nutrientes citoplasmáticos (SCHAIBLE *et al.*, 1999). Adicionalmente, outro estudo demonstrou que a indução de autofagia promove aumento da carga parasitária em macrófagos infectados por *L. amazonensis* (PINHEIRO *et al.*, 2009). Além disso, estudos demonstraram que a infecção por *Leishmania* estimula a indução do processo autofágico em macrófagos favorecendo a sobrevivência intracelular do parasito (JARAMILLO *et al.*, 2011; CYRINO *et al.*, 2012). Diante deste contexto, resolvemos em estudo inicial avaliar a influência da autofagia sobre a infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. Verificamos que a ativação da via autofágica após o estabelecimento da infecção não favoreceu nem inibiu a sobrevivência intracelular do parasito. Por outro lado, quando induzimos a autofagia previamente à adição do parasito, observamos

redução do percentual de células infectadas. Em experimentos posteriores demonstramos que o mecanismo pelo qual a prévia indução de autofagia causava redução importante da infecção por *L. amazonensis* era em razão de reduzir sua internalização. Ou seja, a indução do processo autofágico foi capaz de reduzir a capacidade fagocítica do macrófago, o que apontou para uma clara relação da via autofágica com a via endocítica.

Anteriormente havia sido demonstrado que existe um ponto de convergência comum entre via autofágica com a via endocítica (LIOU et al., 1997; JING & TANG, 1999; STROMHAUG & SEGLEN, 1993). Além disso, foi demonstrado que o processo autofágico depende da via endocítica para seu pleno funcionamento (SINGH & CUERVO, 2011; RAZI *et al.*, 2009; TOOZE & RAZI, 2009) e que a via autofágica interage com a via fagocítica (MARTINET *et al.*, 2009; ZANG *et al.*, 2011). A partir desses dados e dos nossos resultados preliminares, nos questionamos se a autofagia causaria de forma generalizada em macrófagos a redução do processo de endocitose em micro e macroescala.

A endocitose é um processo celular envolvido na captação de nutrientes e entrada de patógenos. Existem evidências que esse processo seja capaz de influenciar outros processos celulares como adesão e migração celulares, sinalização, transmissão sináptica, apresentação de antígenos, polaridade celular, mitose, além de crescimento e diferenciação celulares (DOHERTY e McMAHON, 2009). Além disso, foi demonstrado que a via autofágica tem influência na via endocítica que medeia a internalização de integrinas ocasionando a diminuição da adesão celular e, conseqüentemente, reduzindo a capacidade de migração celular (TULOUP-MINGUEZ *et al.*, 2013). Dessa forma, nos questionamos adicionalmente se a autofagia poderia influenciar negativamente a adesão celular.

Com isso, estabelecemos a hipótese que a indução de autofagia reduziria a capacidade endocítica em micro e macroescala e influenciaria negativamente a adesão celular.

3 HIPÓTESE

A indução de autofagia fisiológica ou farmacológica reduz a capacidade endocítica e de adesão do macrófago murino.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, *in vitro*, a influência da autofagia sobre a capacidade endocítica e a adesão do macrófago murino.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a influência da autofagia sobre a endocitose de transferrina e a endocitose de BSA em macrófagos de camundongos CBA.
- Analisar o efeito da autofagia sobre a adesão celular de macrófagos de camundongos CBA em vidro e em uma matriz de colágeno e fibronectina.
- Avaliar o efeito da autofagia sobre a fagocitose de promastigotas de *L. amazonensis*, levedo, bolas de látex e zimosan por macrófagos de camundongos CBA.

5 CAPÍTULOS

5.1 CAPÍTULO I

A indução de autofagia altera a adesão
celular em macrófagos sem alterar a endocitose

Resumo de resultados: Este capítulo demonstra que a indução de autofagia reduz a capacidade de adesão do macrófago murino. Essa redução da adesão celular é dependente do tipo de substrato. Além disso, observamos também que a prévia indução de autofagia não alterou a capacidade de endocitose mediada por receptor ou endocitose de fase fluida do macrófago.

INTRODUÇÃO

A via endocítica é responsável pela degradação de substâncias exógenas internalizadas por endocitose ou fagocitose, enquanto que a via autofágica é responsável por degradar constituintes citoplasmáticos a partir da indução de autofagia [1]. Desta forma, a capacidade de adquirir nutrientes e conseguir degradar o material extra e intracelular nos lisossomos são importantes para geração de energia para a sobrevivência das células eucarióticas. Neste contexto, as vias endocítica e autofágica são essenciais para a homeostase celular [2,3].

Diferentes linhas de evidências dão suporte a hipótese de que existe uma inter-relação entre as vias endocítica e autofágica. Evidências bioquímicas e morfológicas mostram que a endocitose de fase fluida e a autofagia são vias que correm em paralelo podendo convergir para a formação de autofagossomos [4-6]. Além disso, um estudo recente demonstrou que a via autofágica interage com a via endocítica durante a captação de integrinas promovendo a redução da reciclagem destas moléculas para a membrana plasmática, reduzindo a adesão e, conseqüentemente, a capacidade de migração celular [7]. Em conjunto, estes estudos demonstram evidências de que a via autofágica pode interagir e influenciar eventos como a endocitose em microescala, a adesão e a migração das células.

A migração celular requer a formação de protrusões membranares, que por sua vez requerem a polarização da membrana plasmática e a formação de FA. FA são áreas discretas da membrana em que as integrinas estão agrupadas para interagir com a ECM [8]. Estes sítios de adesão contém integrinas, que são receptores transmembranares que reconhecem e se ligam a moléculas da ECM.

A adesão celular depende da ligação das integrinas com a ECM e determina a capacidade das células para migrar [9,10]. A redistribuição das integrinas durante a migração celular é controlada pela internalização e reciclagem por endocitose mediada por clatrina e macropinocitose. Desta forma, as integrinas liberam-se de seus ligantes e são redirecionadas para a membrana plasmática para formar novos locais de adesão exigidos para a orientação e motilidade celular [11]. Assim, a adesão a ECM é fundamental na diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celulares. Neste contexto, as interações célula-célula e célula-matriz são importantes para o comportamento das células e a homeostase do tecido [12]. Contudo, apenas alguns estudos focaram a relação entre a via autofágica e a capacidade de adesão celular.

Neste capítulo tivemos o objetivo de avaliar se a indução de autofagia é capaz de influenciar processos que se originam a partir da membrana plasmática, incluindo a endocitose em microescala e a adesão celular. Os resultados mostraram que a incubação de macrófagos em condições de privação de aminoácidos inibe a capacidade de adesão dos macrófagos, mas não altera a endocitose de fase fluida e a endocitose mediada por clatrina.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerações Éticas

Camundongos da linhagem CBA, com 6-8 semanas de idade, foram obtidos no biotério do CPqGM-FIOCRUZ/BA onde foram mantidos em condições sem agentes patogênicos. A manipulação dos animais foi realizada de acordo com as Diretrizes para Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O Comitê de Ética para Utilização Animal (CEUA) do CPqGM aprovou todos os procedimentos que envolveram animais.

Cultura de Macrófagos

Macrófagos peritoneais inflamatórios foram obtidos a partir da indução de ascite prévia induzida por injeção intraperitoneal de tioglicolato. Posteriormente, as células foram obtidas e cultivadas em placas de 24 poços contendo lâminas de vidro (13 mm) em uma concentração de 2×10^5 macrófagos/poço em 1 mL de meio DMEM completo, como descrito anteriormente [13], ou foram cultivadas em tubos de polipropileno de 14 mL - tubo de fundo redondo (BD Bioscience, Durham-NC-EUA) em uma concentração de 2×10^6 macrófagos/tubo em 2 mL de meio DMEM completo (cultura em suspensão) e foram cultivadas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO₂.

Indução de Autofagia

Para induzir a autofagia fisiológica (*starvation*), os macrófagos foram incubados em EBSS (Earl's Balanced Salt Solution) (Sigma, St Louis-MO-EUA)

meio pobre em nutrientes, como anteriormente descrito [14]. Para a indução farmacológica de autofagia, os macrófagos foram incubados em meio rico em nutrientes (DMEM completo) na presença de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rapamicina (Sigma), uma droga que inibe a atividade da cinase mTOR e é capaz de induzir autofagia mesmo na presença de nutrientes [15]. Tanto a autofagia fisiológica quanto a farmacológica foram induzidas 2 horas antes dos ensaios e as células foram cultivadas a 37°C em estufa suplementada com 5% de CO_2 .

Avaliação do Efeito da Autofagia Sobre a Endocitose

Para avaliar os efeitos, *in vitro*, da prévia indução de autofagia sobre a capacidade endocítica de macrófagos murinos, células ($10^6/\text{mL}$) foram incubadas em suspensão e induzidas à autofagia como descrito acima. Em seguida, as células foram incubadas com 300 nM de transferrina-*Texas Red* (TF) (Molecular Probes), ou 300 nM de albumina-FITC (BSA) (Molecular Probes). Após 30 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , macrófagos foram fixados em paraformaldeído 4% durante 15 minutos, lavados três vezes com solução salina, centrifugados a 300 x g durante 10 minutos e ressuspensos em 100 μL de PBS 1X. O percentual de células que endocitaram TF ou BSA e a média da intensidade de fluorescência por célula (MFI) foram determinados por citometria de fluxo (FACSAria II, BD Bioscience). A análise de citometria foi realizada utilizando o *software* FlowJo 7,6. Além disso, para confirmar a endocitose das partículas, foi realizado cytospin da cultura de macrófagos a 28 x g durante 5 minutos (Shandon Cytospin 4, Thermo), seguido por marcação com DAPI (Vectashield, Burlingame-CA-EUA) e, em seguida, a visualização utilizando microscopia confocal (Leica SP8 usando LAS AF Lite).

Avaliação do Efeito da Autofagia Sobre a Adesão Celular

Macrófagos foram incubados em suspensão e induzidos a autofagia como descrito acima. Para a avaliação da adesão celular em diferentes superfícies, os macrófagos foram incubados a 37°C por 1 hora em estufa suplementada com 5 % de CO₂ em placas de 96 poços previamente revestidas com uma solução de colágeno do tipo I a 300 µg/mL (Sigma) e fibronectina a 10 µg/mL (Sigma) em uma concentração de 2x10⁵ células em 200 µL [16]. Em outro ensaio, as células foram incubadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm) em uma concentração de 2x10⁵/mL. Em seguida, as células foram fixadas com glutaraldeído a 1% (Sigma) durante 10 minutos e, posteriormente, coradas por H&E para a visualização microscópio ótico com objetiva de 20X (Olympus BX53). Por fim, 3 imagens foram feitas por poço para determinar o número de células aderentes por área (mm²).

Avaliação da Superfície Celular de Células em Autofagia

Para avaliar o aspecto da superfície celular de macrófagos induzidos à autofagia, macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços sobre lamínula redonda de vidro (13mm) na concentração de 2x10⁵ células/poço e foram induzidos à autofagia como descrito acima durante duas horas. Depois disso, as células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (Sigma), 2% de paraformaldeído (Sigma) em tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (Sigma) e lavadas três vezes com o mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (Polysciences, Warrington-PA-EUA), 0,8% de ferrocianeto de potássio (Sigma) e cloreto de cálcio 10 mM (Sigma) em tampão de cacodilato 0,1 M, lavou-se três vezes com o mesmo tampão, e as amostras foram desidratadas

em séries de etanol e secas pelo método de ponto crítico (Pontos Críticos de secador 030, Leica). As lamínulas de vidro foram montadas em *stubs* JEOL, recobertas com 30 nm de ouro no Denton Vacuum DeskIV e observadas usando o microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 6390LV em 12KV). Por fim, 10 imagens por grupo de células foram realizadas como auxílio do *software* ImageJ 7.6.1 para determinar a área ocupada por macrófago (mm^2).

Análise Estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism, versão 7.00 - GraphPad Software Incorporate. A maioria dos gráficos representa um experimento representativo de um conjunto de experimentos ou a mediana de um conjunto de experimentos. Em uma ocasião é representado o resultado de um experimento realizado uma única vez. Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn para comparação entre os grupos em experimentos realizados utilizando cinco replicas ou menos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, inicialmente foi testado o efeito da indução de autofagia sobre a endocitose em microescala. Tanto a endocitose mediada por receptores de TF ou endocitose de fase fluida de BSA não foram alteradas em macrófagos induzidos à autofagia fisiológica ou farmacológica em comparação com as células do grupo controle incubadas em meio DMEM completo. O percentual de células que endocitou TF (Controle 45,5%, *Starvation* 38,4%, Rapamicina 43,8%), bem como o percentual de células que endocitou BSA (Controle 99,1%, *Starvation* 96,8 %, Rapamicina 97,4%) não foi modificado (Fig. 1A). Além disso, a MFI de células que endocitaram TF (Controle 21,2, *Starvation* 19,0, Rapamicina 20,6), do mesmo modo, a MFI de células que endocitaram BSA (Controle 110,0, *Starvation* 81,6, Rapamicina 81,8) não foram alteradas após a indução de autofagia (Fig. 1B). Em conjunto, estes resultados mostraram que a indução prévia de autofagia não inibe a endocitose em microescala, sugerindo que a autofagia não afeta a internalização de macromoléculas em fase fluida e mediada por clatrina.

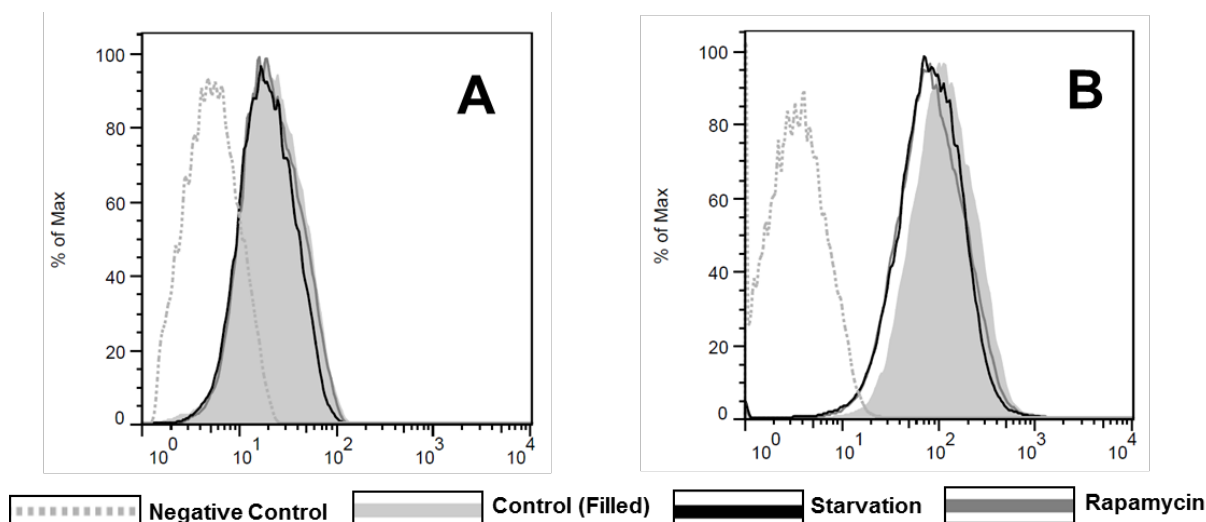


FIGURA 1. A prévia indução de autofagia não inibe a capacidade endocítica do macrófago murino. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA (10^6 /mL) foram incubados em suspensão em EBSS, meio pobre de nutrientes utilizado para a indução fisiológica de autofagia (*Starvation*), ou incubados em meio DMEM completo rico em nutrientes na presença de rapamicina (50 μ g/mL) (Rapamicina) para induzir autofagia farmacológica, como descrito em Materiais e Métodos. O grupo controle foi incubada em suspensão em meio DMEM completo (Controle). Após duas horas, as células foram incubadas com 300 nM transferrina-*Texas Red* (TF) ou 300 nM de albumina-FITC (BSA) durante 30 minutos. Depois disso, as células foram fixadas e a porcentagem de macrófagos que endocitou TF (**A**) ou BSA (**B**) foi determinada por citometria de fluxo. Este é um experimento representativo de quatro experimentos realizados em sextuplicata. A análise realizada com o *software* FlowJo 7.6.1 (Population Comparison) não indicam diferenças estatísticas entre os grupos. (Desenho Experimental página 62)

Recentemente, Tuloup-Minguez *et al.* (2013) [17] mostraram que a via autofágica interage com a rota envolvida na endocitose mediada por receptores de integrina, pois direciona estas proteínas para a degradação nos lisossomos, reduzindo sua reciclagem para a membrana. Esta descoberta indica que a autofagia é um mecanismo que regula tanto a expressão na superfície celular de integrinas e da capacidade de adesão das células e, por consequência, é capaz de interferir com a migração celular. Como a fagocitose, a adesão celular requer a participação de grandes porções de membrana plasmática, de actina e de receptores de superfície, tais como as integrinas [18,19]. Assim, semelhante ao seu efeito sobre a fagocitose [20], é possível que a prévia indução de autofagia seja capaz de reduzir a capacidade de adesão do macrófago murino.

Para determinar se a autofagia influencia a adesão celular, inicialmente foi testada a capacidade das células induzidas à autofagia por privação de aminoácido e farmacológica em aderir ao vidro. Nenhuma diferença na capacidade de adesão celular ao vidro foi observada entre os grupos (Fig. 2A): o grupo controle apresentou uma média de 60 células aderidas/mm², enquanto o grupo induzido à autofagia por privação de aminoácido apresentou 39 células aderidas/mm² e o grupo induzido à autofagia farmacológica mostrou 59 células aderidas/mm². Em contrapartida, a capacidade de aderir a uma superfície revestida com colágeno e fibronectina foi significativamente menor em 48,5% ($p < 0,05$) nas células previamente incubadas em meio pobre em nutrientes em comparação ao controle. O número médio no grupo *starvation* foi de 166 células aderidas/mm² e o grupo controle apresentou 342 células aderidas/mm²). Por outro lado, não foi observada alteração na adesão do macrófago induzido à autofagia farmacológica (319 células aderidas/mm²) (Fig. 2B).

Ao reavaliar o ensaio de adesão realizado verificamos que precisávamos fazer alguns ajustes experimentais, pois as células do grupo controle e do grupo rapamicina, no momento da adesão, estavam em condições diferentes do de indução de autofagia. Desta forma, alteramos o desenho experimental para que as células tivessem as mesmas condições no instante da indução de autofagia e que estas condições fossem mantidas durante a adesão celular (comparar desenho experimental da figura 2 e da figura 3, páginas 63 e 64).

A capacidade de aderir a uma superfície revestida com colágeno e fibronectina foi significativamente menor em torno de 70% nas células previamente induzidas a autofagia, seja fisiológica ou farmacológica (Fig. 3). O número médio no grupo controle foi de 417 células aderidas/mm², enquanto que 136,5 e 120,8 nos grupos controle e rapamicina respectivamente. Esse resultado indica que a indução de autofagia reduz a capacidade de adesão do macrófago murino em matriz de colágeno e fibronectina.

Similarmente ao dado de Tuloup-Minguez e colaboradores (2013) é possível que a indução de autofagia module negativamente a expressão de integrinas na superfície celular celular, e isto esteja provoncando a redução da capacidade de adesão dos macrófagos. Outros experimentos precisam ser conduzidos para comprovar essa hipótese.

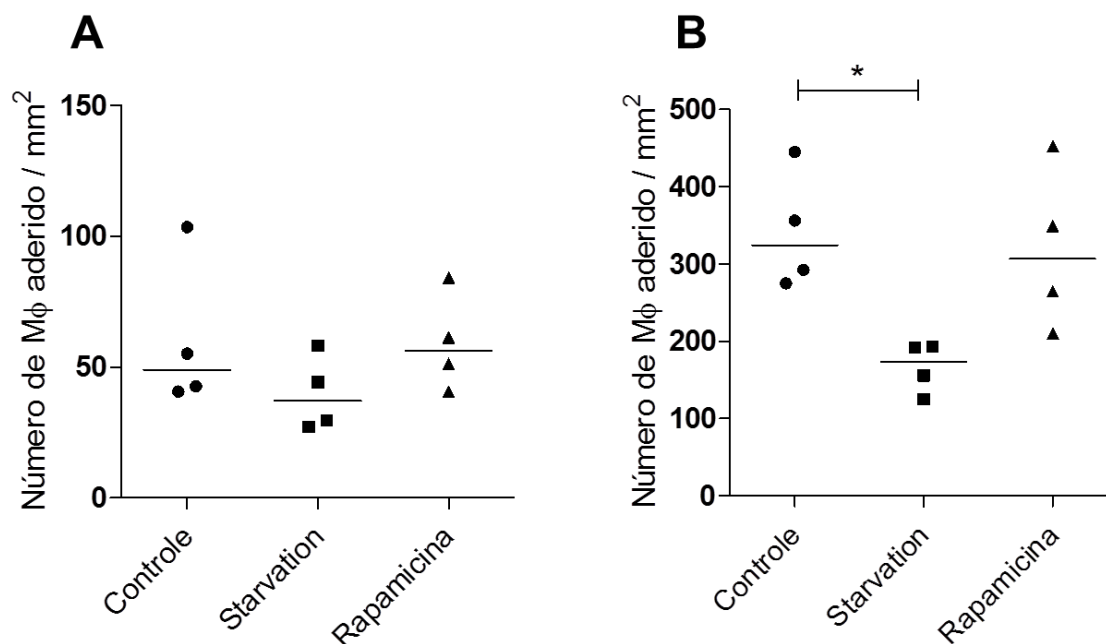


FIGURA 2. Privação de nutrientes altera a adesão celular. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA (10^6 /mL) foram incubados em suspensão em meio pobre em nutrientes (*Starvation*) ou induzidos a autofagia farmacológica (Rapamicina) tal como descrito na Fig. 1. Em paralelo, o grupo controle foi incubado em suspensão em meio DMEM completo (Controle). Após duas horas, 2×10^5 macrófagos foram incubados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm) ou em placas de 96 poços previamente revestidas com uma solução de colágeno do tipo I a $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ e de fibronectina a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ para adesão celular durante 1 hora. Em seguida, as células foram fixadas e o número de macrófagos aderidos ao vidro (**A**) e a matriz de colágeno/fibronectina (**B**) foi determinada por microscopia ótica. O gráfico mostra os pontos correspondentes à média de cada experimento e a mediana de quatro experimentos independentes realizados em sextuplicada. As diferenças entre os grupos em autofagia em comparação ao grupo controle foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis, * $p < 0,05$). (Desenho Experimental página 63)

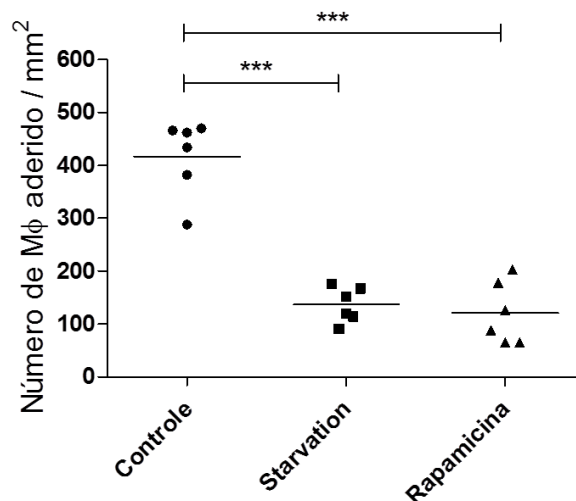


FIGURA 3. Indução de autofagia altera a adesão celular em matriz de colágeno e fibronectina. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA ($10^6/\text{mL}$) foram incubados em suspensão em meio pobre em nutrientes (*Starvation*) ou induzidos a autofagia farmacológica (Rapamicina) tal como descrito na Fig. 1. Em paralelo, o grupo controle foi incubado em suspensão em meio DMEM completo (Controle). Após duas horas, 2×10^5 macrófagos foram incubados em placas de 96 poços previamente revestidas com uma solução de colágeno do tipo I a $300 \mu\text{g}/\text{mL}$ e de fibronectina a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ para adesão celular durante 1 hora. Em seguida, as células foram fixadas e o número de macrófagos aderidos a matriz de colágeno/fibronectina foi determinada por microscopia ótica. O gráfico mostra os pontos correspondentes à média de cada réplica e a mediana de um único experimento realizado em sextuplicada. As diferenças entre os grupos em autofagia em comparação ao grupo controle foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis, *** $p < 0,0001$). (Desenho Experimental página 64)

Posteriormente, com o intuito de avaliar se alterações morfológicas nas superfícies das células de macrófagos poderia explicar a inibição da capacidade de adesão celular pela prévia indução autofágica, foi realizado um ensaio para visualização das células por microscopia eletrônica de varredura. A indução prévia de autofagia não alterou a área total de espraiamento dos macrófagos. Os macrófagos de grupo controle apresentaram uma área média de 74 mm^2 , enquanto o grupo em *starvation* apresentou 80 mm^2 e o grupo de células induzidas à autofagia farmacológica 91 mm^2 (dado não mostrado). A prévia indução de autofagia induziu alteração do aspecto celular, sendo as alterações mais evidentes no grupo *starvation*. A indução fisiológica de autofagia promoveu alterações na superfície de macrófagos que apresentaram membrana de aspecto liso, quando comparada à membrana de células do grupo controle, mesmo na presença de levedo (Fig. 3). Já o grupo em autofagia farmacológica apresentou um padrão mais similar ao grupo controle, mas com redução das projeções de membrana. Esta constatação sugere que a indução de autofagia promove uma redução das projeções da membrana plasmática, o que pode ser o mecanismo responsável pela redução da aderência celular.

Uma possível explicação para a perda de capacidade de adesão em macrófagos em autofagia pode ser a falta de energia disponível necessária para realizar a projeção da membrana e a ligação ao substrato. A falta de energia pode estar influenciando a expressão ou ativação de moléculas de adesão na superfície da célula, o que poderia explicar a diminuição na adesão de células em autofagia. Mais estudos devem ser realizados para determinar o mecanismo envolvido na redução da capacidade de adesão celular causada pela prévia indução de autofagia.

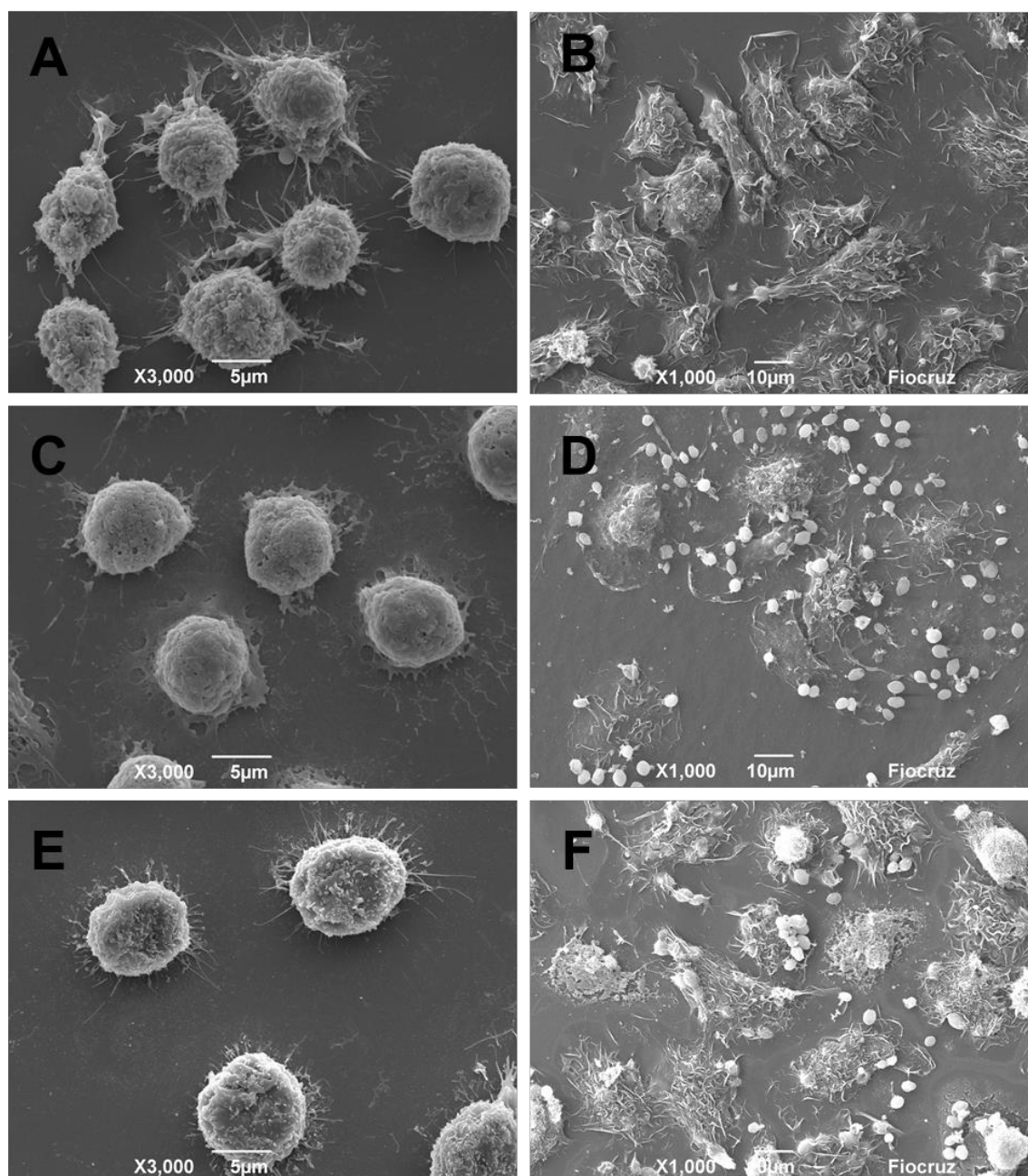


Figura 4. Privação de nutrientes promove alterações morfológicas na superfície celular. Macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos CBA foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm) em uma concentração de 2×10^5 células/poço. Em seguida, os macrófagos foram incubados em meio pobre em nutrientes (*Starvation*) (C e D) ou induzidos a autofagia farmacológica (Rapamicina) (E e F) tal como descrito na Fig. 1. Em paralelo, o grupo de controle foi incubado em meio DMEM completo (Controle) (A e B). Após duas horas, um grupo de células (B / D / F) foi exposto a partículas de levedo (10:1) por uma hora. Em seguida, todos os grupos de células foram fixadas e a morfologia da superfície celular foi avaliada utilizando microscopia eletrônica de varredura. (Desenho Experimental página 65)

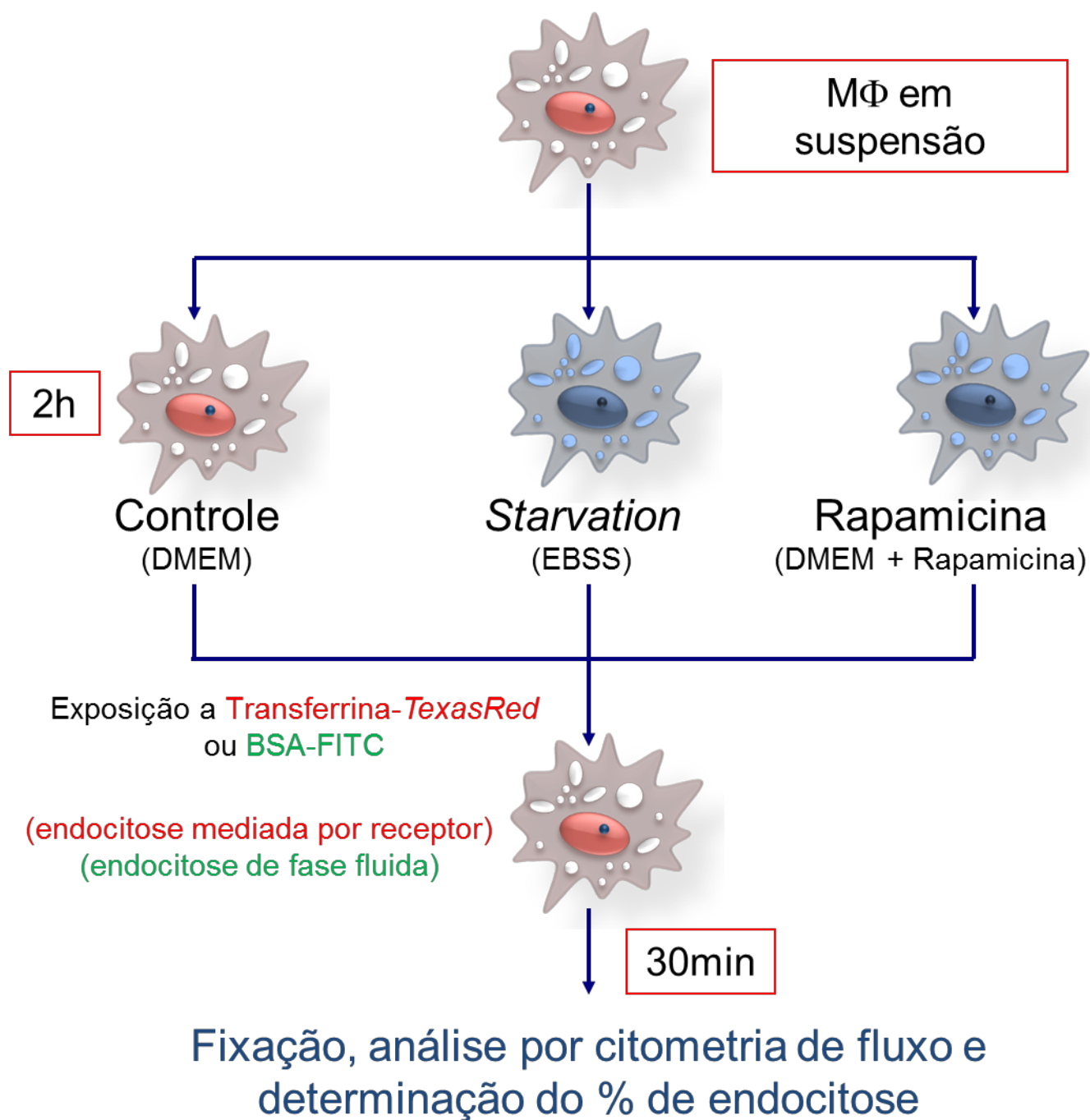
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] W. Liou, H.J. Geuze, M.J.H. Geelen, J.W. Slot, The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles, *J Cell Biol* 136 (1997) 61-70.
- [2] J. Huotari, A. Helenius, Endosome maturation, *EMBO J.* 30 (2011) 3481–3500.
- [3] D.J. Klionsky, S.D. Emr, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science* 290 (2000) 1717-1721.
- [4] Y. Jing, X.M. Tang, The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells, *Cell Research* 9 (1999) 243-253.
- [5] C.A. Lamb, H.C. Dooley, S.A. Tooze, Endocytosis and autophagy: shared machinery for degradation, *Bioessays* 35 (2013) 34–45.
- [6] O. Florey, M. Overholtzer, Autophagy proteins in macroendocytic engulfment, *Trends in Cell Biology* 22 (2012) 374-380.
- [7] V. Tuloup-Minguez, A. Hamaï, A. Greffard, V. Nicolas, P. Codogno, J. Botti, Autophagy modulates cell migration and β 1 integrin membrane recycling, *Cell Cycle* 20 (2013) 3317-3328.
- [8] S.K. Mitra, D.A. Hanson, D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility, *Nat Rev Mol Cell Biol* 1 (2005) 56-68.
- [9] J.D. Humphries, A. Byron, M.J. Humphries, Integrin ligands at a glance, *J Cell Sci* 119 (2006) 3901-3903.
- [10] B.H. Luo, C.V. Carman, T.A. Springer, Structural basis of integrin regulation and signaling, *Annu Rev Immunol* 25 (2007) 619-647.

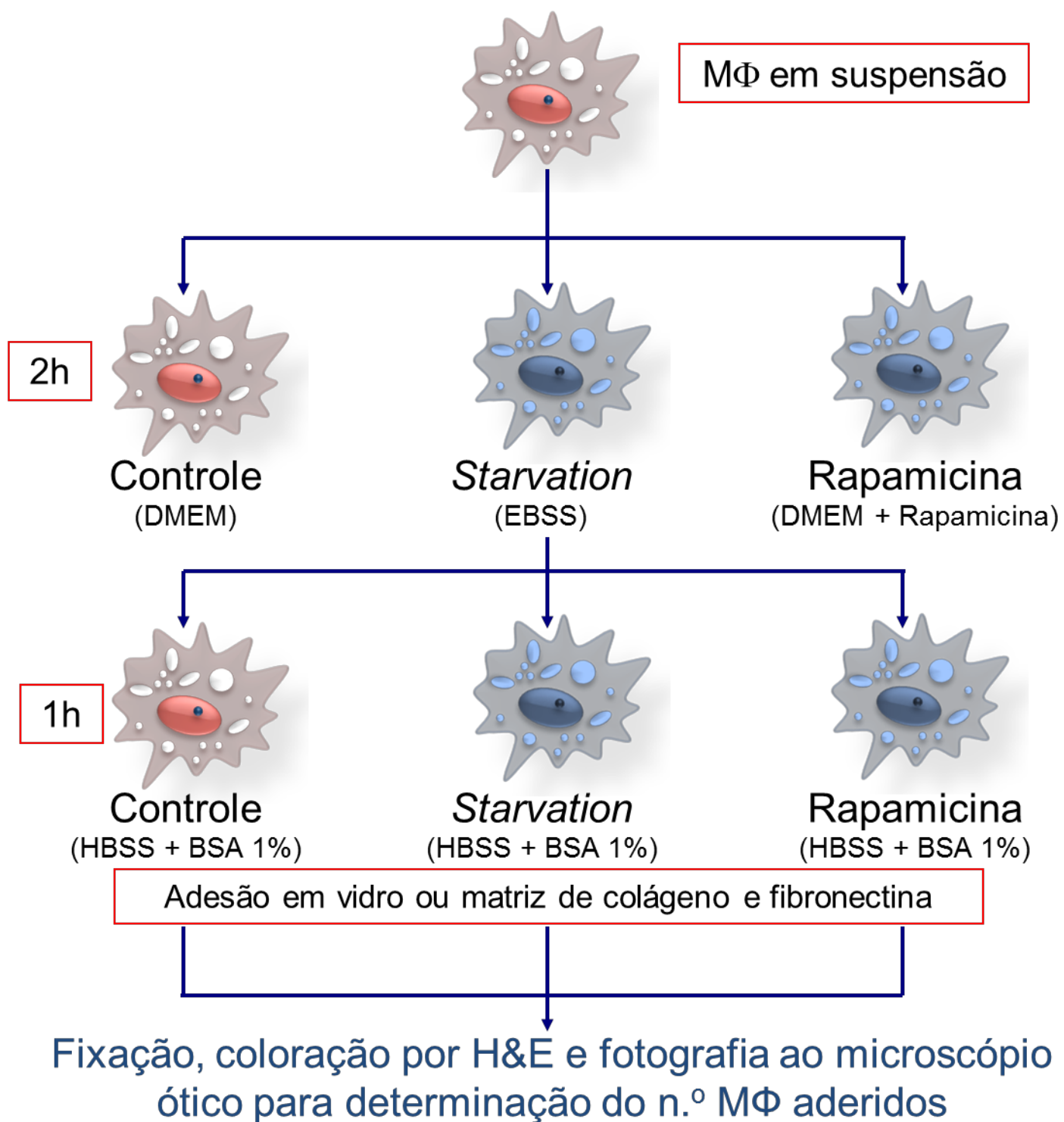
- [11] A.J. Ridley, M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, A.R. Horwitz, Cell migration: integrating signals from front to back, *Science* 302 (2003) 1704-1709.
- [12] A.L. Berrier, K.M. Yamada, Cell-matrix adhesion, *J Cell Physiol* 213 (2007) 565-573.
- [13] I.N. Gomes, A.F. Calabrich, S. Tavares Rda, J. Wietzerbin, L.A. de Freitas, P.S. Veras, Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*, *Microbes Infect* 5 (2003) 251-260.
- [14] D.B. Munafo, M.I. Colombo, A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation, *J Cell Sci* 114 (2001) 3619-3629.
- [15] T. Noda, Y. Ohsumi, Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast, *J Biol Chem* 273 (1998) 3963-3966.
- [16] N.F. Pinheiro Jr, M.D.R. Hermida, M.P. Macedo, J. Mengel, A. Bafica, W.L.C. dos-Santos, *Leishmania* infection impairs β_1 -integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes, *Infect Immun* 74 (2006) 3912-3921.
- [17] V. Tuloup-Minguez, A. Hamaï, A. Greffard, V. Nicolas, P. Codogno, J. Botti, Autophagy modulates cell migration and β_1 integrin membrane recycling, *Autophagy* 1(2013) 27-39.
- [18] S.A. Freeman, S. Grinstein, Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton, *Immunol Rev* 262 (2014) 193-215.
- [19] N. Hogg, I. Patzak, F. Willenbrock, The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function, *Nat Rev Immunol* 11 (2011) 416-426.

- [20] J.G.B. Lima, C.F. Vinhas, I.N. Gomes, C.M. Azevedo, R.R. dos Santos, M. A. Vannier-Santos, P.S.T. Veras, Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages, *Biochem Biophys Res Commun* 405 (2011) 604–609.

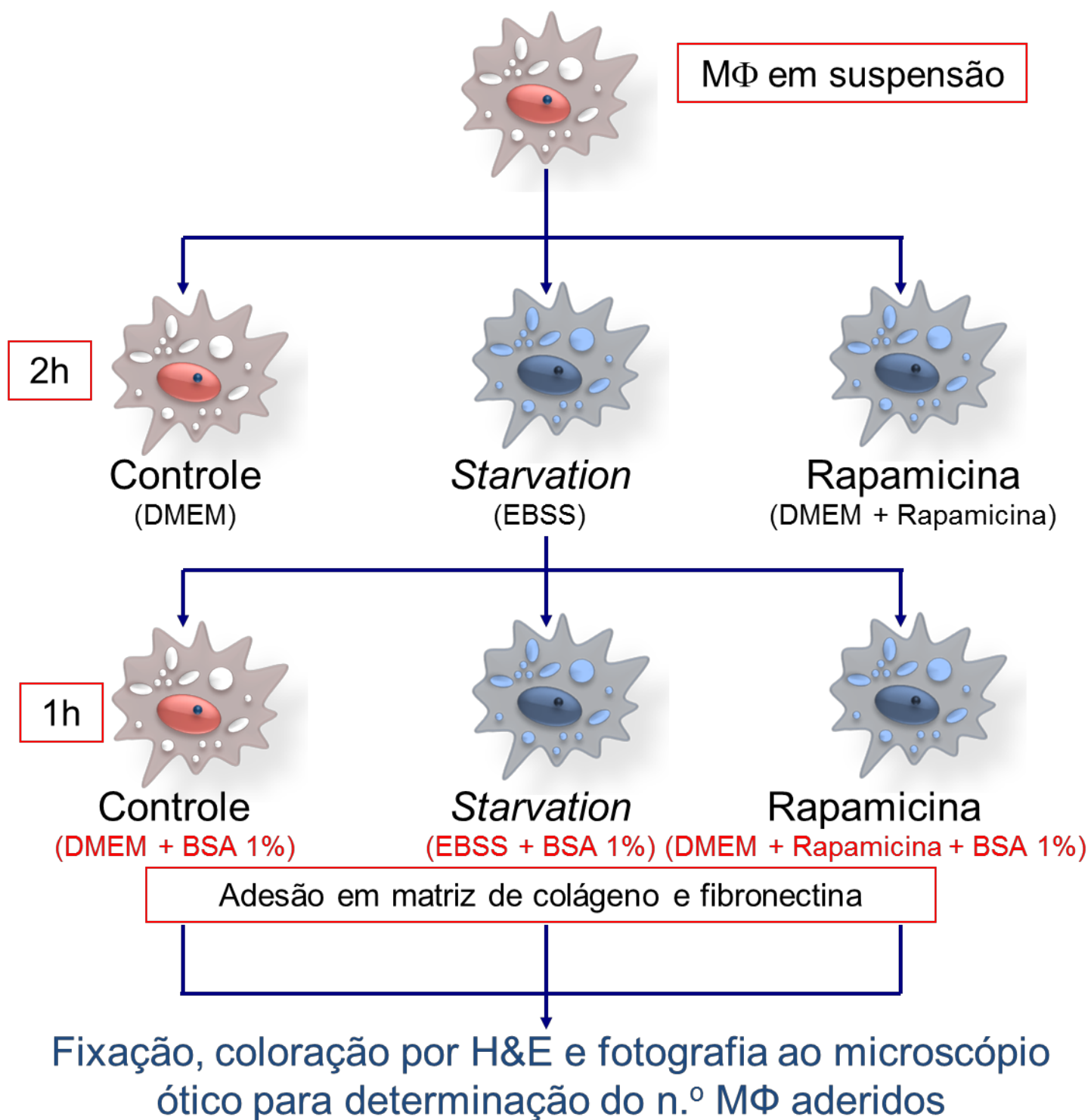
DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 1



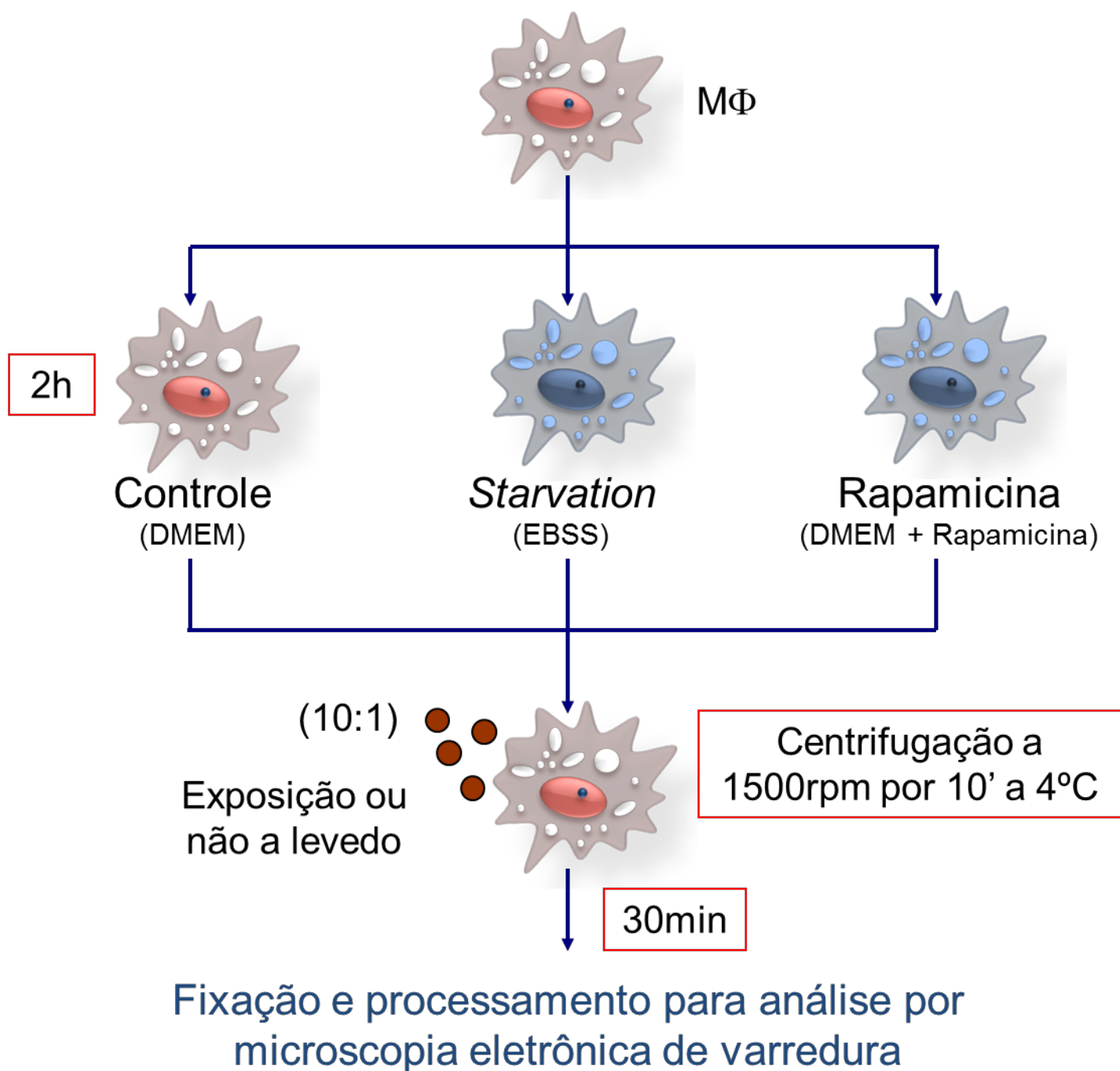
DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 2



DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 3



DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 4



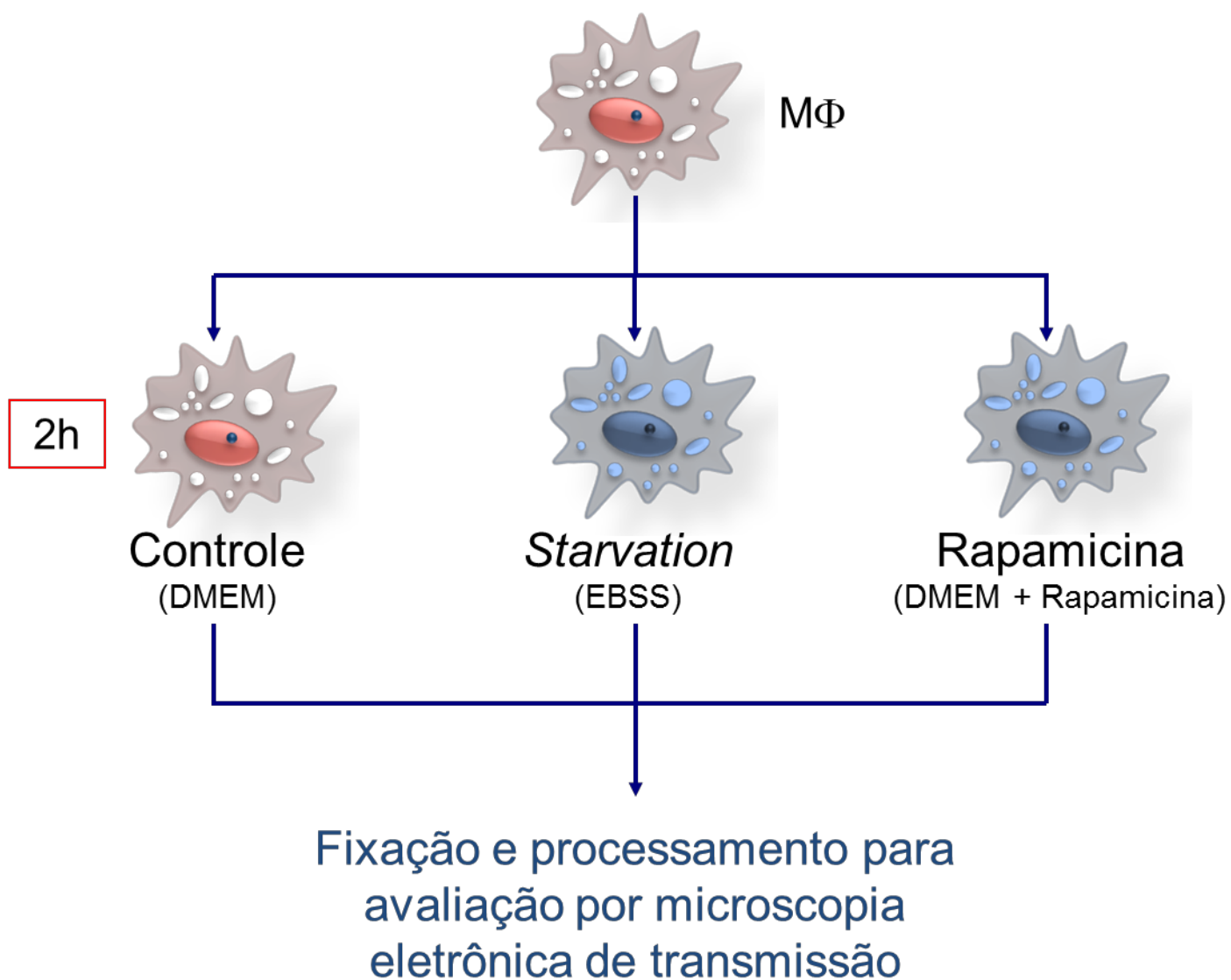
5.2 CAPÍTULO II

A indução de autofagia inibe a fagocitose em macrófagos murino

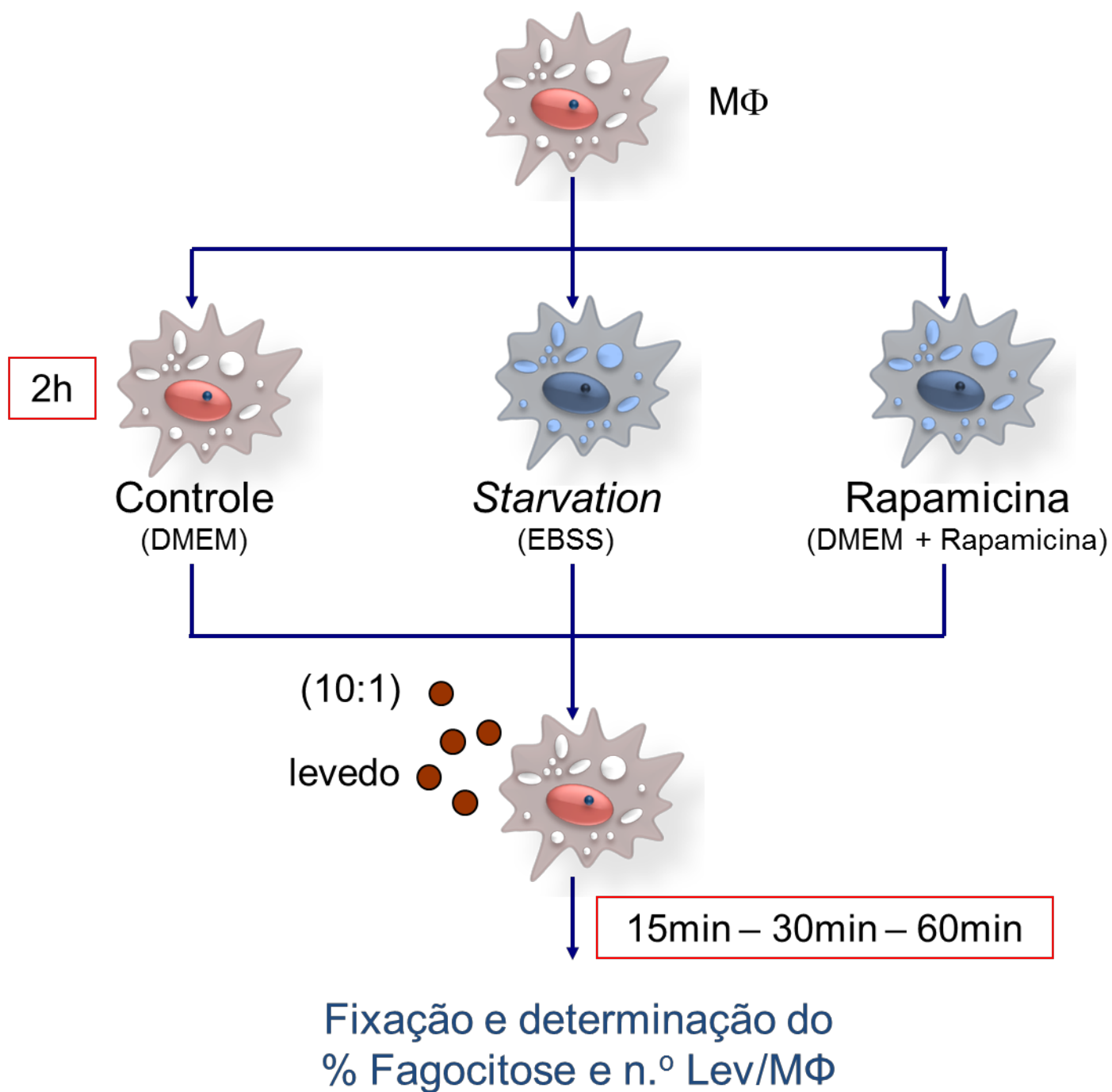
Manuscrito: Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages

Resumo de resultados: Este trabalho demonstra que a prévia indução de autofagia, seja ela fisiológica ou farmacológica, reduz a capacidade fagocítica do macrófago murino. Essa redução da fagocitose é um evento precoce que independe da natureza da partícula a ser fagocitada e do tipo celular. Além disso, trata-se de um evento reversível e que não interfere no reconhecimento das partículas, já que a indução de autofagia não altera o *binding*. O trabalho mostra que a redução da capacidade fagocítica causada pela indução de autofagia relaciona-se à etapa de internalização de partículas.

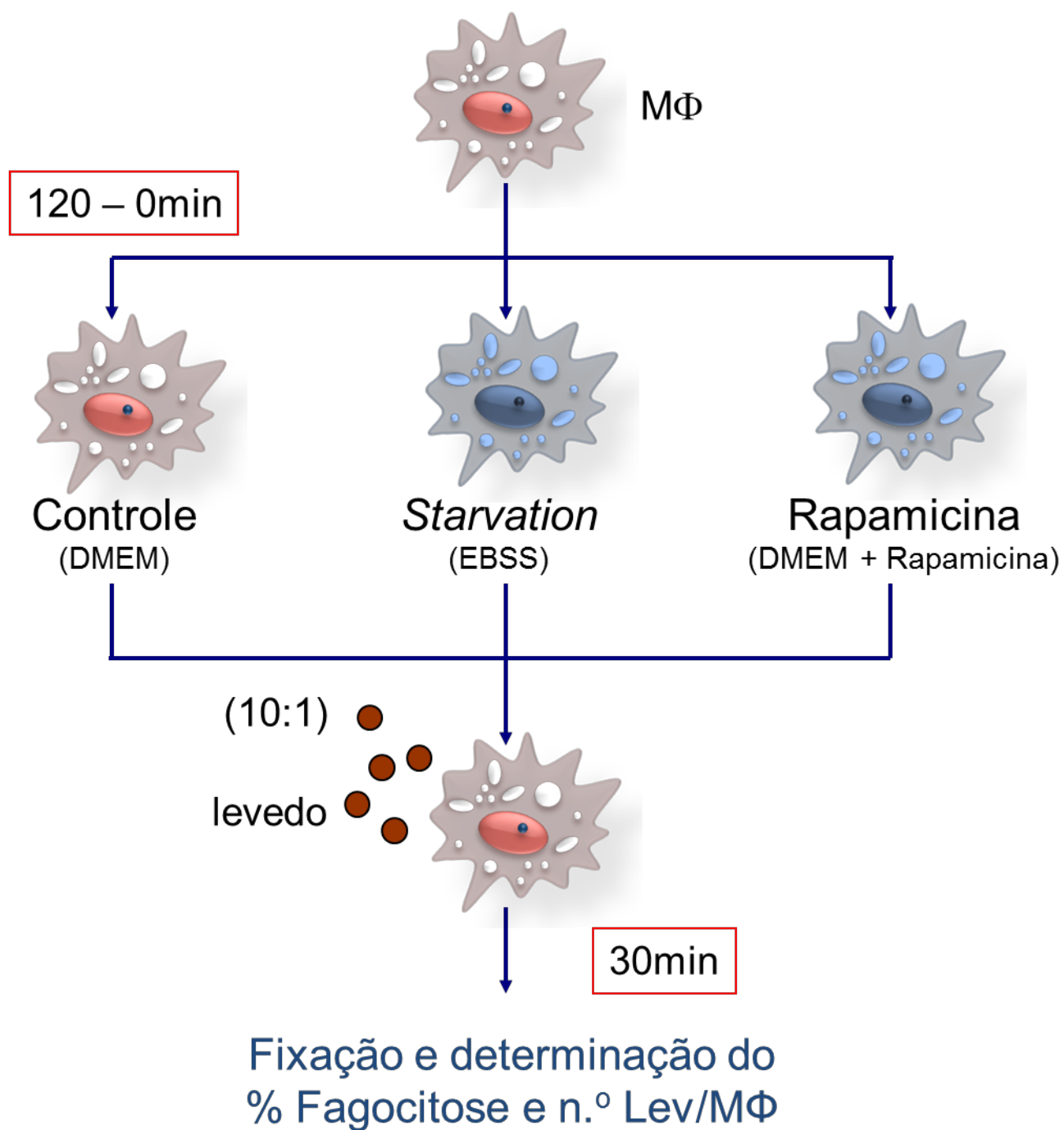
DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 1



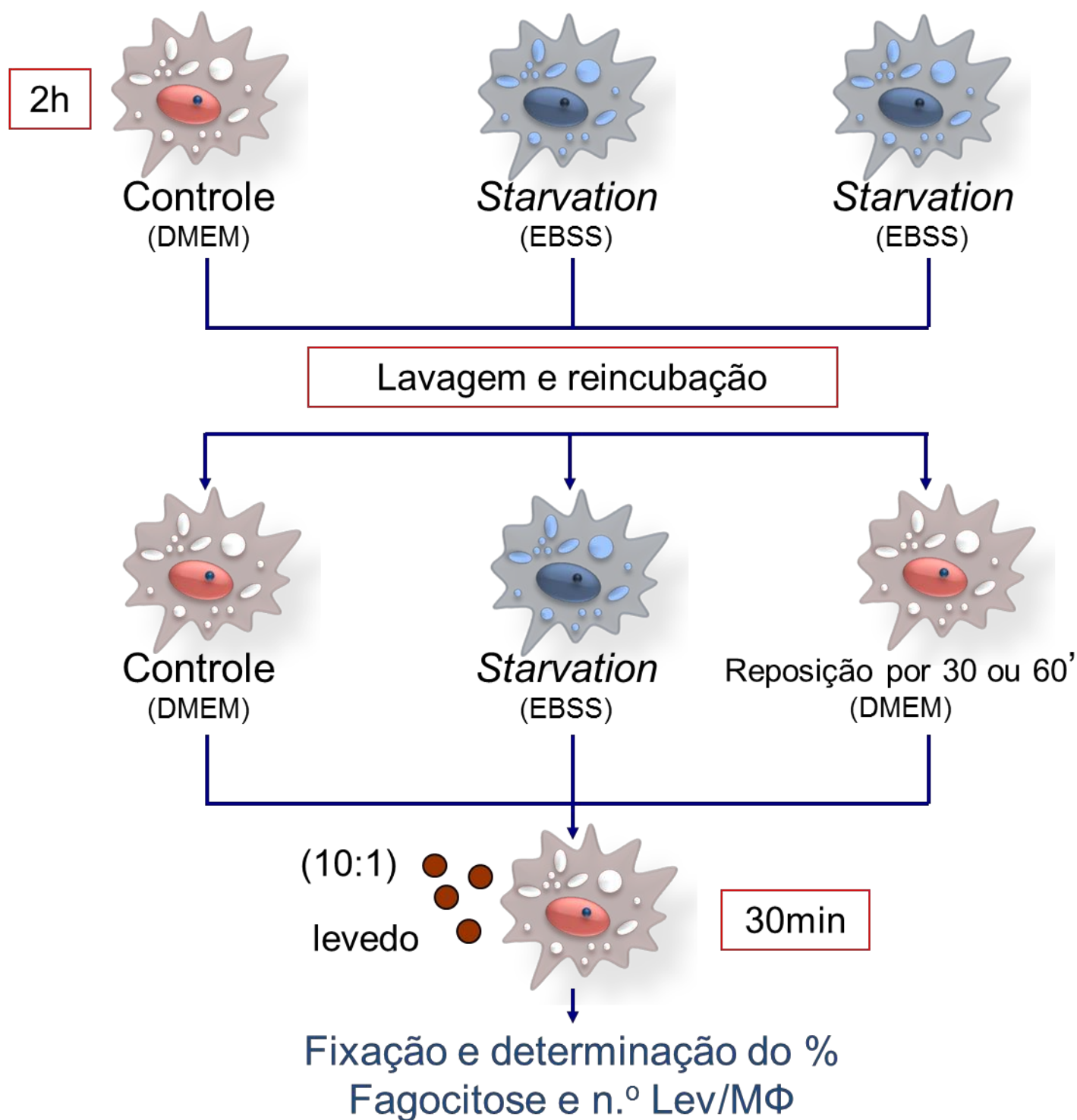
DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 2A E 2B



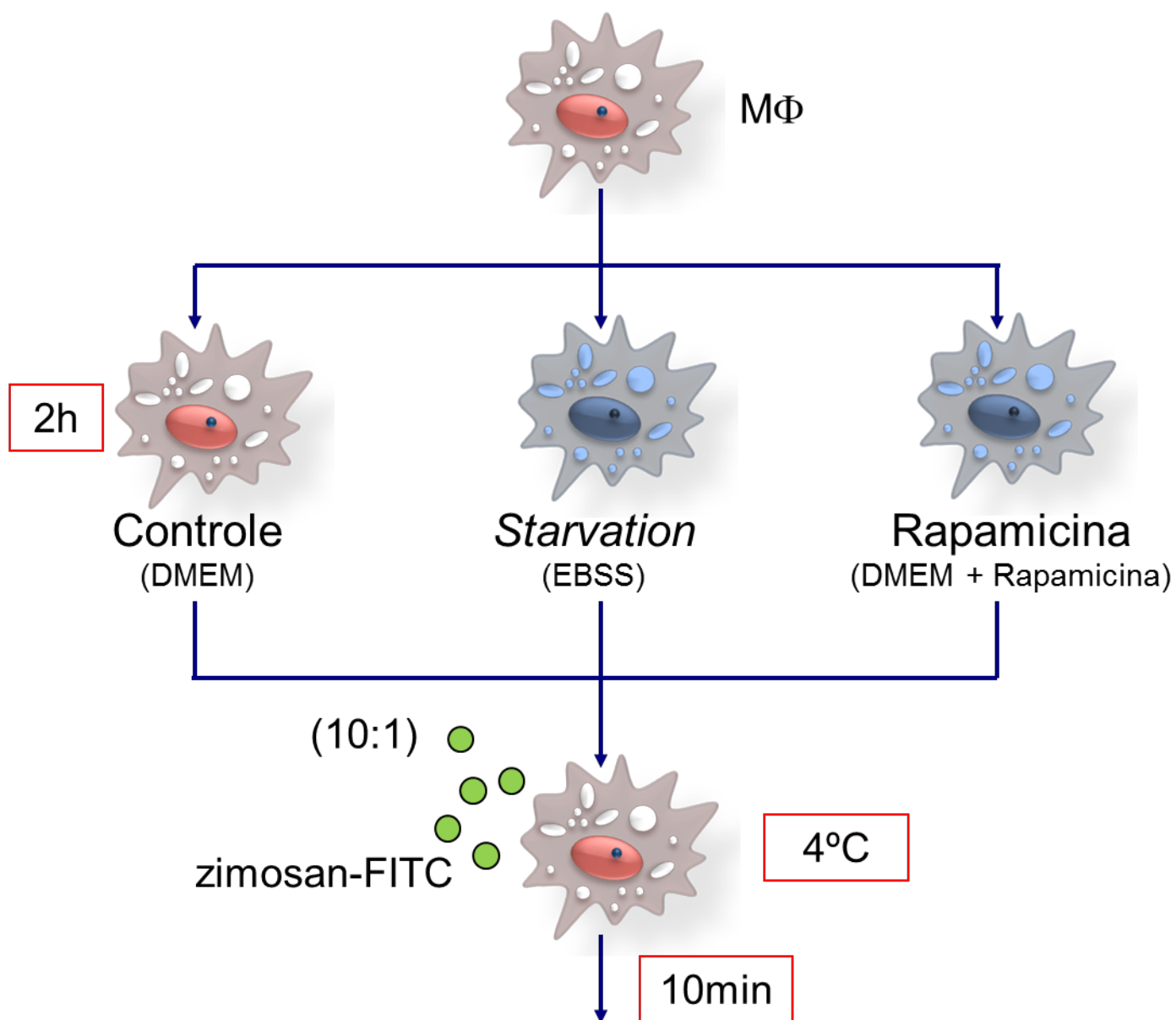
DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 2C E 2D



DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 3



DESENHO EXPERIMENTAL FIGURA 4



Fixação, marcação com faloidina e DAPI, observação ao microscópio de fluorescência para determinar o % de *binding*



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages

José Geraldo Bomfim Lima^a, Christiana de Freitas Vinhas^{a,b}, Ivana Nunes Gomes^a,
Carine Machado Azevedo^c, Ricardo Ribeiro dos Santos^c, Marcos André Vannier-Santos^d,
Patrícia Sampaio Tavares Veras^{a,*}

^a Laboratório de Patologia e Biointervenção, IGM-FIOCRUZ, Bahia, Brazil

^b Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Bahia, Brazil

^c Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, IGM-FIOCRUZ, Bahia, Brazil

^d Laboratório de Biologia Parasitária, IGM-FIOCRUZ, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2011

Available online 24 January 2011

Keywords:

Autophagy
Phagocytosis
Large particles
Starvation
Rapamycin
Macrophage

ABSTRACT

Recent studies have demonstrated that communication takes place between the autophagic and phagocytic pathways, indicating that the convergence of these two pathways plays an important role in the innate immune response against intracellular microbes. The present study investigated the effect of autophagic induction on the phagocytic capacity of murine macrophages. Autophagy induced by physiological and pharmacological means was shown to reduce the phagocytic capacity of murine macrophages, regardless of cell origin or the nature of the phagocytosed particles themselves. This autophagic inhibitory effect on phagocytosis was shown to be an early and reversible event that results in no loss of cell viability. Furthermore, the data presented herein demonstrate that the induction of autophagy does not affect a macrophage's capacity to recognize and bind to particles, indicating that autophagy does not inhibit the particle recognition process, even though particle internalization is suppressed. The findings herein support the notion that phagocytosis and autophagy may be interdependent and complementary processes.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Originally, autophagy was described as a mechanism that maintains cellular homeostasis [1] by way of a natural physiological process that leads to the acquisition of energy in response to stress, as well as being the process responsible for the renewal of cellular organelles [2]. Autophagy leads to the degradation of proteins, sub-cellular domains and organelles, which is an evolutionarily conserved process occurring naturally in eukaryotic cells and is inducible in response to a variety of stress situations [3]. To date, the known autophagic processes are subdivided into different pathways, including chaperone-mediated autophagy, microautophagy and macroautophagy. Both micro- and macroautophagy are intracellular processes involving macromolecular degradation in eukaryotic cells. In the microautophagic process, the transfer of cytosolic components into the lysosomal compartment occurs by direct invagination of the lysosomal membrane, while in the macroautophagic process, cytosolic components are sequestered into an autophagosome prior to fusion with lysosomes [4].

Macroautophagy, also known as the autophagic process, is triggered in response to starvation conditions and regulated by the activity of the serine-threonine kinase, the mammalian target of rapamycin (mTOR). This enzyme is activated under nutrient-rich conditions. By contrast, mTOR activity is blocked by rapamycin, triggering the formation of autophagosomes under nutrient-rich conditions [5]. Furthermore, the autophagic pathway occurs in an orderly manner. Initially, a portion of the cytoplasm and organelles, such as endoplasmic reticulum (ER), mitochondria and peroxisomes, are sequestered by a double-layered membrane which leads to the formation of an autophagosome. Autophagosomes then fuse with lysosomes, losing their inner membranes, and these vesicles become acidic due to the acquisition of proton ATPases in the outer membranes. Subsequently, autophagosomes acquire other proteins, such as lysosomal enzymes, and this organelle is then called an autophagolysosome, or autolysosome, which is where the degradation of sequestered material occurs [6,7]. The origin of the autophagosome double membrane is unknown. Evidence indicates that this structure originates from ribosome-devoid regions of the ER [6]. However, it has been recently suggested that the plasma membrane may contribute to the formation of the autophagosome membrane [8].

The autophagic process has also been described as a mechanism that plays a role in the innate and adaptive immune systems

* Corresponding author. Address: Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador/BA, CEP 40296-710, Brazil. Fax: +55 71 3176 2290.

E-mail address: pveras@bahia.fiocruz.br (P.S.T. Veras).

involved in intracellular infection by microorganisms. This cellular mechanism may protect host cells and promote the establishment of infection, depending on the nature of the pathogen [9–11]. These data suggest that the course of infection depends not only on the initial steps of host cell–pathogen interaction, but also on subsequent events in which pathogen-induced vacuoles interact with autophagic vesicles.

Phagocytosis is the primary mechanism by which unicellular eukaryotes obtain nutrients [12]. In metazoans, phagocytosis is important not only for cell nutrition, but is also involved in internalization, killing and removal of foreign particles. In mammals, it is a mechanism involved in tissue remodeling during organism development, senescent cell removal and inflammation. Additionally, phagocytosis is one of the most important processes involved in the mammalian defense against infection by intracellular microorganisms [12,13].

Recent studies have observed crosstalk between the autophagic and phagocytic pathways [14,15]. Fusion between nascent phagosomes and autophagosomes has been recently described [16]. This phenomenon suggests that autophagy may play a complementary role during phagocytosis. Furthermore, it has recently been demonstrated that in the macrophage cell line J774, the induction of autophagy enhances bacterial uptake prior to phagocytosis [17].

The present study aimed to evaluate possible connections between autophagic and phagocytic pathways by determining the effect of autophagic induction on the phagocytic capacity of murine macrophages. We hypothesized that the induction of autophagy prior to phagocytosis would alter the phagocytic capacity of macrophages.

2. Materials and methods

2.1. Macrophage obtainment and cultivation

All experiments were performed according to the standards of the Ethics Committee on Animal Experimentation at the Oswaldo Cruz Foundation – CPqGM/FIOCRUZ. Thioglycolate-elicited inflammatory peritoneal macrophages from CBA mice were obtained and cultivated in 24-well plates containing 12-mm glass slides at a concentration of 2×10^5 macrophages per well as previously described [18].

2.2. Parasites

The *Leishmania amazonensis* (strain MHOM/Br88/Ba-125) promastigotes used in this study were maintained in axenic culture for up to seven passages, suspended in Schneider's (Gibco) complete medium supplemented with 10% inactivated fetal calf serum and 50 µg/mL of gentamicin (Sigma). All parasites were washed, counted and added to macrophage cultures at a ratio of 10:1.

2.3. Induction of autophagy

To induce physiological autophagy (Starvation), macrophages were incubated in EBSS nutrient-poor medium (Earl's Balanced Salt Solution, Sigma) as previously described [19]. To induce pharmacological autophagy, macrophages were incubated in nutrient-rich medium (complete DMEM) in the presence of 50 µg/mL of rapamycin (Sigma), a drug that inhibits mTOR kinase activity [5].

2.4. Autophagic effect on phagocytosis

To assess the *in vitro* effects of autophagic induction on the phagocytic capacity of murine macrophages, the cells were incubated under autophagic conditions as described above. Next, heat

inactivated yeast particles (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma) or *L. amazonensis* stationary phase promastigotes were added to macrophage cultures at a ratio of 10:1 particles or parasites per cell. Then the macrophage cultures were fixed in ethanol at 99% for 15 min, stained with H&E and a minimum of 400 cells were counted using a bright-field light microscope. The percentage of macrophages that phagocytosed particles or parasites was calculated as the percentage of phagocytosis and the number of particles or parasites per macrophage was quantified. Cell viability was tested using the trypan blue exclusion technique which showed that 95–99% of cells incubated under both physiological and pharmacological autophagic conditions suffered no loss of cell viability.

2.5. Transmission electron microscopy

To evaluate the ultrastructural aspects of the cells incubated under physiological and pharmacological autophagic conditions, macrophage suspensions were distributed in 6-well plates at a concentration of 2×10^6 per well. At the end of the incubation period, the cells were processed as previously described [20]. The samples were embedded in Polybed epoxy resin (Polysciences, Warrington, PA, USA) and after polymerization, ultrathin sections were obtained. The sections were contrasted and then observed using a transmission electron microscope (JEOL JEM 1230 at 80 kV).

2.6. Fluorescence microscopy

Macrophages were incubated in physiological and pharmacological autophagic conditions for 2 h at 37 °C 5% CO₂ and fluorescein isothiocyanate-labeled zymosan particles (FITC-zymosan, Sigma) were added at a ratio of 10 particles per macrophage (10:1). The culture plates were centrifuged (500g) at 4 °C for 5 min and then incubated for 10 min at 4 °C, a temperature at which cells recognize and bind to particles, but under which internalization is infeasible [21] and differentiation between particle binding and particle internalization is observable. After this time period, cultures were washed to remove non-adherent particles and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma) for 20 min. The macrophage cultures were then stained with DAPI (Vectashield, Burlingame, CA, USA), which marks nuclei in blue, and 0.16 µg/mL of rhodamine-phalloidin (Sigma) to observe polymerized actin in fixed cells. Particle binding was identified by colocalization of zymosan-FITC stained in green with actin cups labeled in red, a phenomenon that is quantifiable due to the presence of yellow-colored assemblies in plasma membrane. The percentage of cells displaying colocalization of actin cups with zymosan-FITC was determined by counting at least 600 cells in five fields using Image-Pro Plus 6.0.

2.7. Statistical analysis

The graphs and statistical analyses were done using the program GraphPad Prism, version 5.00 – Incorporate GraphPad Software. The bar graphs represent the means ± SE (standard error) of a set of experiments done at least in triplicate and repeated four times. The one-way ANOVA and Tukey post-test were used for comparison between three or more groups. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results and discussion

In order to evaluate the effect of autophagy on the phagocytic capacity of murine macrophages, cell cultures were incubated under physiological autophagic conditions as described in Section 2. Transmission electron microscopy was performed to evaluate

whether morphological alterations were present in macrophages subjected to starvation conditions. In addition to less electron-dense cytoplasm, numerous double membrane vacuoles characteristic of mature autophagosomes [22] were observed in more than 90% of the cells (Fig. 1A and B), confirming that autophagy was induced in peritoneal inflammatory CBA macrophages.

A reduction in yeast particle phagocytosis by macrophages incubated under autophagic conditions was detected, in comparison to control cells incubated in complete DMEM. Phagocytosis inhibition was detected within 15 min of the exposure of particle to cells which had been previously incubated for 2 h under physiological autophagic conditions. A maximum inhibition level of 70% was obtained at the 60-min interval of cell–particle interaction (Fig. 2A, $p < 0.05$, $n = 4$, ANOVA) and the average number of internalized particles per macrophage was reduced by 40% at a 60-min interval during starvation medium incubation, in comparison to controls (Fig. 2B, $p < 0.05$, $n = 4$, ANOVA). To verify whether this inhibitory effect was related to incubation under starvation conditions, the macrophages were incubated under pharmacological autophagic conditions, i.e. in a nutrient-rich medium in the presence of rapamycin, an mTOR inhibitor. Similar to physiological autophagic induction, pharmacological autophagic induction induced morphological alterations on a cellular level in over 90% of the cells (Fig. 1C), as well as down modulation of the phagocytosis of yeast particles (Fig. 2A and B). These findings indicate that it is the autophagic process itself which triggers an inhibitory effect on the phagocytosis of yeast particles by macrophages, regardless of incubation conditions.

To test whether this inhibitory effect occurs in other phagocytes as well as in inflammatory macrophages from CBA mice, further

experiments were performed using non-inflammatory CBA macrophages and the RAW cell line. The induction of physiological autophagy reduced phagocytosis by 95% (± 0.50) in resident peritoneal cells, by 90% (± 1.63) in bone marrow-derived macrophages, and by 90% (± 7.07) in RAW cells. Similarly, the induction of pharmacological autophagy reduced phagocytosis by 85% (± 5.12) in resident peritoneal cells, by 60% (± 5.31) in bone marrow-derived macrophages, and by 80% (± 10.31) in RAW cells. To further investigate the universal nature of this effect, BALB/c and C57BL/6 inflammatory peritoneal macrophages were submitted to physiological and pharmacological autophagic conditions as described above. Physiological autophagic induction reduced phagocytosis by 18% (± 13.23) in BALB/c and 35% (± 10.44) in C57BL/6 macrophages. Similarly, pharmacological autophagic induction reduced phagocytosis by 80% (± 8.41) in BALB/c and 80% (± 8.30) in C57BL/6 macrophages. Taken together, these data demonstrate that autophagy inhibits particle uptake by macrophages of different origin, suggesting that autophagic induction affects classical phagocytosis by professional phagocytes in a generalized manner.

To determine the length of time necessary for autophagy to inhibit phagocytosis, CBA macrophages were incubated under either physiological or pharmacological autophagic conditions for time intervals ranging from 0 to 120 min. Yeast particles were then added to all cell groups and each macrophage culture was incubated for an additional 30 min. Cultures exposed to pharmacological autophagic conditions exhibited a reduction of approximately 60% in the percentage of phagocytosis in as promptly as 15 min, a level which was maintained at later intervals. By contrast, the cultures incubated in starvation medium presented a gradual reduction in phagocytosis ranging from 25% at time 0 to 60% at

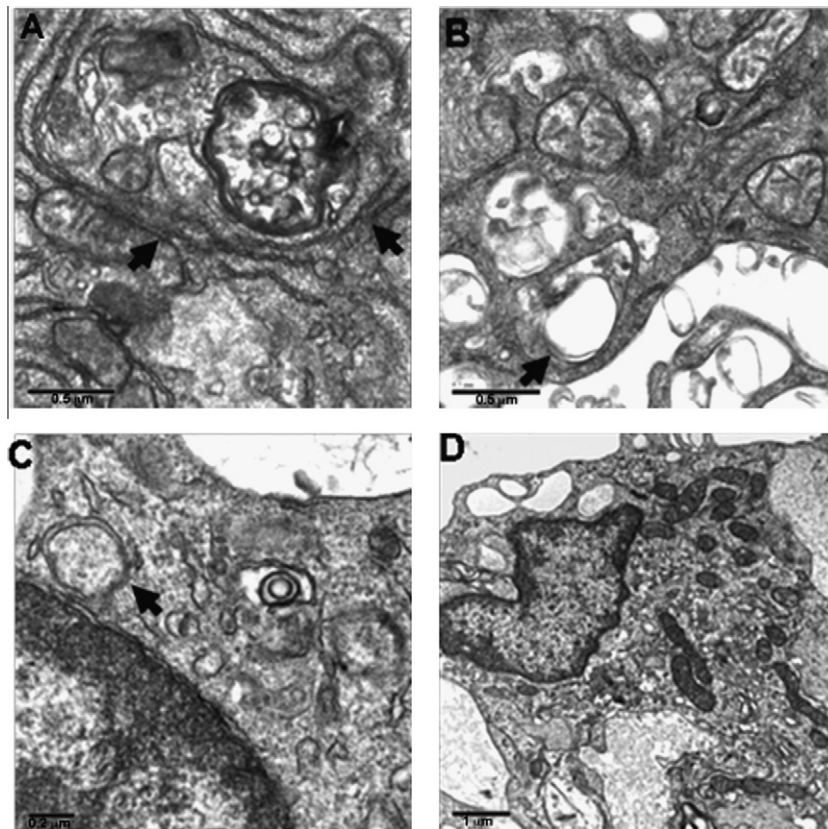


Fig. 1. Autophagic conditions induce morphological alterations in cells as detected by electron microscopy analysis. Inflammatory peritoneal CBA macrophages (2×10^5 /mL) were incubated in EBSS, a nutrient-free medium used for physiological autophagic induction (A, B), or incubated in nutrient-rich DMEM complete medium in the presence of rapamycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C) to induce pharmacological autophagy, as described in Section 2. The control group was incubated in DMEM complete medium (D). Next, cells were fixed and morphology was assessed using electron microscopy. Pictures clearly depicted aspects of cells in the autophagic process (A–C). Arrows represent double membrane vacuoles in the cell cytoplasm.

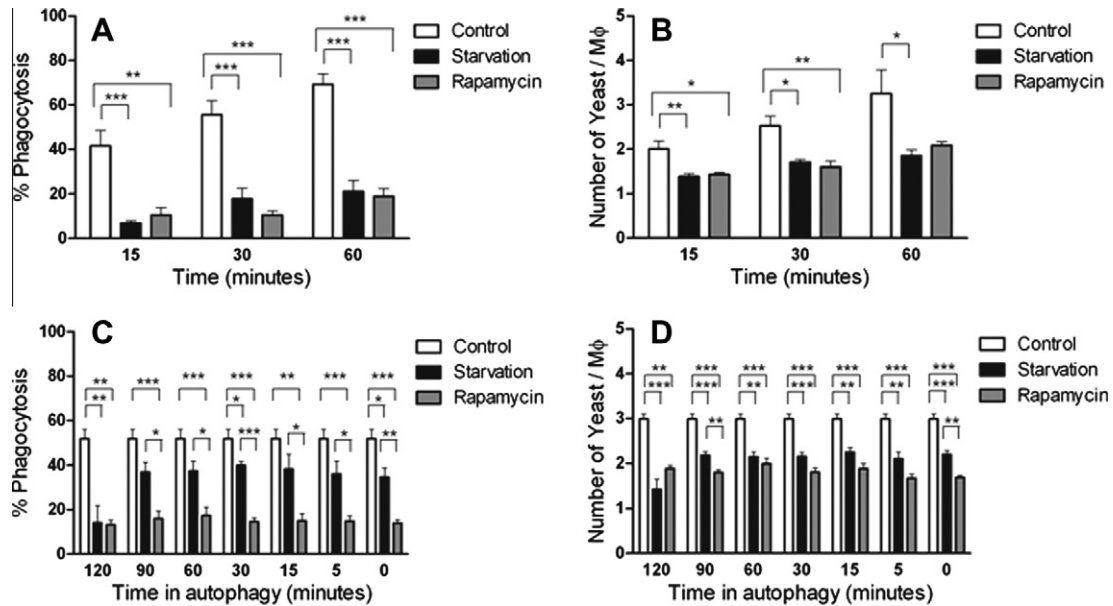


Fig. 2. Prior induction of autophagy inhibits the phagocytic capacity of murine macrophages early after interaction. For quantitative microscopic observations, CBA macrophages (2×10^5 /mL) were incubated in physiological (Starvation) and pharmacological (Rapamycin) autophagic conditions as described in Fig. 1. In parallel, the control group was incubated in DMEM complete medium (Control). Two hours later, macrophages were incubated in the presence of yeast, fixed and stained with H&E. The percentage of yeast phagocytosis (A), as well as the number of yeast particles per macrophage (B) were quantified. To determine the length of time necessary for autophagy to inhibit phagocytosis, cells were further incubated for seven time intervals, ranging from 0 (time 0) to 120 min (0–5–15–30–60–90–120 min). Control cells were incubated in the nutrient-rich DMEM complete medium. Next, yeast particles were added to cultures (10:1) for 30 min, and after fixation the percentage of phagocytosis (C) and the number of particles per macrophage were quantified (D). The bars shown here correspond to the average results of four independent experiments performed in quadruplicate \pm SE and the differences between cultures submitted to autophagic conditions in comparison to control cells were considered significant when $p < 0.05$ (ANOVA, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

120 min, which was similar to the levels obtained in pharmacological autophagic induction (Fig. 2C, $p < 0.05$, $n = 4$, ANOVA). The number of internalized particles per cell was also reduced by 20–30% under both autophagic conditions at all intervals (Fig. 2D, $p < 0.05$, $n = 4$, ANOVA). These data demonstrate that the inhibitory effect on phagocytic capacity occurs at relatively early stages of both types of autophagic induction.

To establish whether autophagy affects phagocytosis directly or indirectly, an assay was conducted to test the reversibility of the autophagic inhibitory effect. CBA macrophages were incubated in nutrient-poor medium for 2 h, then washed and divided into two groups. The first group was kept in the starvation medium, while the second was placed into a nutrient-rich medium, and both groups were further incubated for an additional 30 or 60-min period. All cultures were subsequently incubated in the presence of yeast particles for 30 min and phagocytosis levels were then quantified. As expected, the macrophages cultured in starvation medium throughout the entire incubation period presented a significantly reduced percentage of phagocytosis in comparison to control cells (Fig. 3). By contrast, the cultures initially incubated in nutrient-poor medium and then shifted to a nutrient-rich medium, phagocytosed particle at levels similar to control macrophages incubated only in nutrient-rich medium (Fig. 3A and B, $p < 0.05$, $n = 4$ ANOVA). These data clearly demonstrate that the autophagic inhibitory effect on phagocytosis is completely reversible, thus reinforcing the notion that a direct correlation exists between autophagic induction and the inhibition of phagocytosis by macrophages.

In order to further investigate the correlation between autophagic induction and phagocytosis, we assessed whether this effect is dependent on particle recognition by incubating other inert particles in the experimental autophagic induction model. Macrophages were incubated under autophagic conditions for 2 h and subsequently incubated in the presence of inert particles, such as

zymosan and latex beads, as well as live *L. amazonensis* promastigotes. Autophagic induction was observed to inhibit the phagocytosis of zymosan and latex beads (data not shown). Additionally, phagocytosis of *L. amazonensis* promastigotes and the number of parasites per cell (data not shown) were significantly reduced by exposure to autophagic conditions. These data demonstrate that autophagy affects the phagocytosis of several varieties of large particles, indicating that this effect is not dependent on any specific receptors involved in particle recognition.

To confirm that macrophage receptors do not play a role in the autophagic inhibition of phagocytosis, we tested whether particle opsonization by serum-derived soluble factors has an influence on this inhibitory effect. Yeast particles were incubated in the presence of fetal bovine serum for 30 min, then washed and added to macrophage cultures which were previously incubated in a nutrient-poor medium. These macrophage cultures showed similar reductions in the percentage of phagocytosis of non-opsonized or opsonized yeast particles (data not shown), which further supports the notion that particle–receptor recognition does not play a role in the autophagic inhibitory effect on phagocytosis.

Fluorescence microscopy analysis was performed to provide morphological evidence that autophagy does not influence particle–receptor interaction. Macrophages were incubated under autophagic conditions and then allowed to interact with FITC-zymosan for 10 min at 4 °C to distinguish particle recognition from the internalization step of phagocytosis. After fixation, macrophage cultures were labeled with rhodamine–phalloidin to visualize actin cups, which are involved in the early stages of phagocytosis [13]. When comparing cell cultures incubated under both physiological (Fig. 4B) and pharmacological autophagic conditions (Fig. 4C) to control cultures (Fig. 4A), the percentage of colocalization of zymosan-FITC (stained in green) with actin cups (labeled in red) (Fig. 4D, $p > 0.05$, $n = 4$, ANOVA), as well as the number of particles colocalized with actin cups (Fig. 4E, $p > 0.05$, $n = 4$, ANOVA) were found to

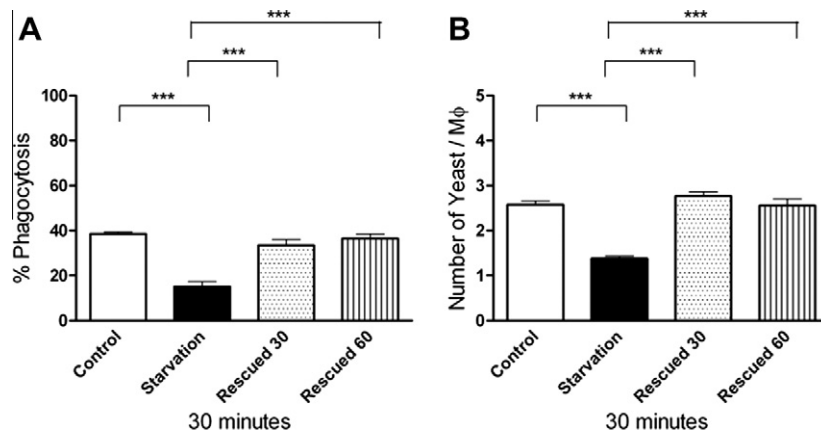


Fig. 3. The autophagic inhibition of phagocytosis is reversible. CBA macrophages (2×10^5 /mL) were incubated in nutrient-poor medium for 2 h, then washed and divided into two groups. The first group remained in the starvation medium, while the second group was placed into a nutrient-rich medium, and both groups were further incubated for an additional 30 and 60 min. All cultures were incubated in the presence of yeast particles (10:1). The control group was incubated in DMEM complete medium (Control) during all the experimental intervals. The percentage of phagocytosis (A) and the number of yeast particles per cell (B) were quantified. The bars here correspond to the average results from four independent experiments performed in quadruplicate \pm SE (ANOVA, *** $p < 0.001$).

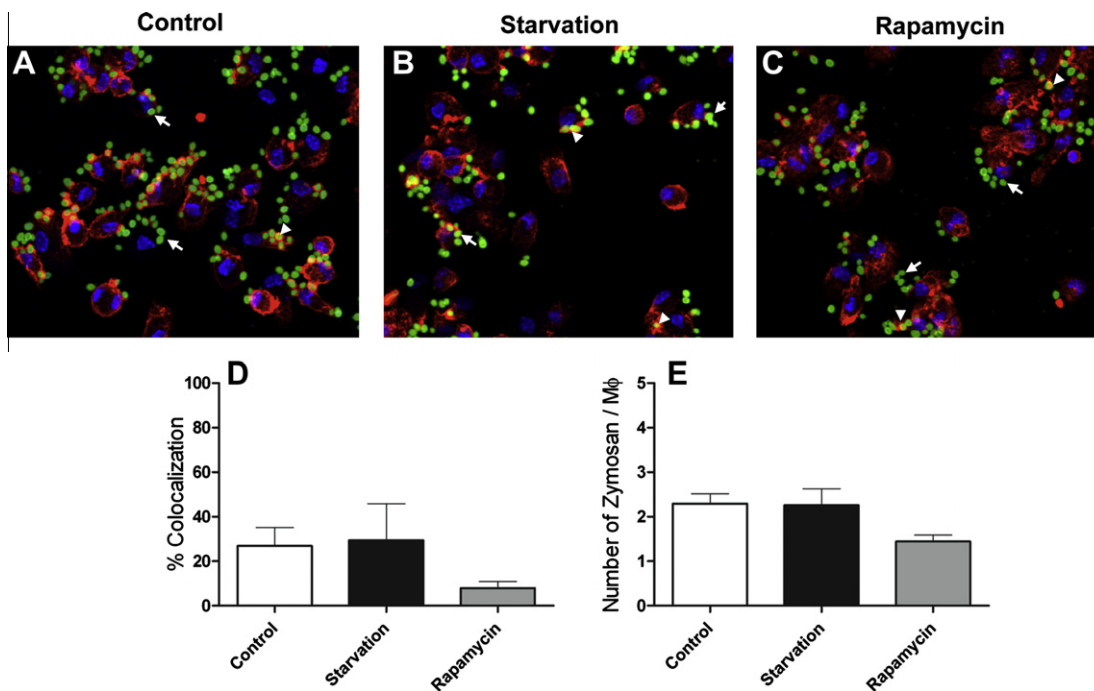


Fig. 4. Prior induction of autophagy inhibited particle internalization but did not alter particle binding to macrophages. CBA macrophages (2×10^5 /mL) were incubated under physiological (Starvation) (B) and pharmacological (Rapamycin) autophagic conditions (C) and in parallel, control cells were incubated in DMEM complete medium (A). Macrophages were allowed to bind to zymosan-FITC (10:1) for 10 min at 4 °C, then fixed and processed for quantitative observation under fluorescence microscopy (A–C). Particle binding was identified by colocalization in yellow (arrow head) of zymosan-FITC stained in green (arrow) with polymerized actin filaments (actin cups) labeled with phalloidin in red. The percentage of colocalization of zymosan-FITC with labeled cells (D) and the number of particles colocalized with actin cups (E) were quantified. The bars shown here correspond to the average results from four independent experiments with control, rapamycin and starvation medium groups, performed in quadruplicate \pm SE, which do not display statistically significant differences among these groups (ANOVA). Original magnification is 600 \times . Blue arrowheads indicate yeast particles associated with macrophage cell surfaces.

be similar among groups. These findings provide evidence that autophagic inhibition of phagocytosis occurs during a downstream step in which recognition and binding have already taken place, leading us to conclude that autophagic induction does not influence particle–receptor interactions during phagocytosis.

The present data is in apparent disagreement with previous findings [17], which showed that in macrophage cell line J774, incubated exclusively in starvation conditions, an enhancement of the phagocytosis of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* occurred. Unlike Martinet et al. (2009) we demonstrated that both

physiological and pharmacological methods of autophagic induction provoke an inhibitory effect on the phagocytosis of large particles, such as latex beads (2 μ m), zymosan, yeast and live *Leishmania* parasites. Further studies must be conducted to determine the precise mechanism involved in the induction of autophagy prior to phagocytosis. Since these two studies possess different methodologies, including the procedure used for quantification, the type and size of particles used and the time intervals of autophagic induction analyzed, it is possible that each study triggers autophagy in a different manner. Additionally, in apparent contrast

with the present results, the prior induction of autophagy was shown to not affect the phagocytosis of live *Coxiella burnetii* [10] or killed *S. aureus* [23]. However, both of these studies employed Chinese hamster ovary (CHO) cells, a non-macrophage cell line, which may indicate that the inhibitory autophagic effect on phagocytosis could be restricted to professional phagocytes.

Different lines of evidence describe the existence of interactions between autophagy and phagocytosis [16]. Using proteomic analysis, the autophagic protein LC3-II was identified in the membranes of latex bead-containing phagosomes [14]. In addition, LC3 recruitment to zymosan-containing phagosomes, as well as IgG bead-containing phagosomes, has been previously described [24]. Recent studies have demonstrated plasma membrane involvement as a membrane donor for the formation of autophagosomes [25,26]. These authors observed the formation of structures suggestive of pre-forming autophagosomes derived from the plasma membrane, requiring the recruitment of proteins from the endocytic pathway [8]. In the present study, one possible explanation for the loss of phagocytic ability in macrophages incubated under autophagic conditions may be the lack of available plasma membrane needed to perform particle internalization. The induction of autophagy may recruit and mobilize part of the plasma membrane for the formation of autophagosomes, thereby preventing the internalization of particles via the phagocytic pathway. Since the autophagic process has been demonstrated to be reversible, it is possible that when an autophagic stimulus is removed, the plasma membrane quickly become available again for the internalization process.

Alternatively, since the ER membrane has reportedly taken part in the biogenesis of both the autophagic [7] and phagocytic [27] pathways, another possible explanation of the inhibitory effect of autophagy on phagocytosis may originate from the insufficient amount of ER cisternal membrane available for both processes simultaneously.

Taken together, the present data clearly show that the induction of autophagy inhibits classical phagocytosis in murine macrophages via a mechanism that does not interfere with particle–receptor interaction. The results support the notion that phagocytosis and autophagy can be interdependent and complementary processes.

Acknowledgments

The authors thank Claudio Pereira Filgueira and Dra. Adriana Lanfredi Rangel for technical support in transmission electron microscopy studies. This work was supported by grants and fellowships from FAPESB (Fundação de Amparo a Pesquisa no estado da Bahia), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento). Veras, P.S.T. holds a CNPq productivity in research Grant (306672/2008-1).

References

[1] G.E. Mortimore, C.M. Schworer, Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver, *Nature* 270 (1977) 174–176.

- [2] D.J. Klionsky, S.D. Emr, Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, *Science* 290 (2000) 1717–1721.
- [3] A.J. Meijer, P. Codogno, Regulation and role of autophagy in mammalian cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36 (2004) 2445–2462.
- [4] V. Todde, M. Veenhuis, I.J. van der Klei, Autophagy: principles and significance in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1792 (2009) 3–13.
- [5] T. Noda, Y. Ohsumi, Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3963–3966.
- [6] W.A. Dunn Jr., Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole, *J. Cell Biol.* 110 (1990) 1935–1945.
- [7] W.A. Dunn Jr., Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole, *J. Cell Biol.* 110 (1990) 1923–1933.
- [8] B. Ravikumar, K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, D.C. Rubinsztein, Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 747–757.
- [9] M.G. Gutierrez, S.S. Master, S.B. Singh, G.A. Taylor, M.I. Colombo, V. Deretic, Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages, *Cell* 119 (2004) 753–766.
- [10] M.G. Gutierrez, C.L. Vazquez, D.B. Munaf, F.C. Zoppino, W. Beron, M. Rabinovitch, M.I. Colombo, Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles, *Cell. Microbiol.* 7 (2005) 981–993.
- [11] B. Levine, V. Deretic, Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 767–777.
- [12] E.J. Brown, H.D. Gresham, Phagocytosis, in: W. Paul (Ed.), *Fundamental Immunology*, Raven Press, Lippincott, New York, 2003, pp. 1105–1126.
- [13] L.M. Stuart, R.A. Ezekowitz, Phagocytosis: elegant complexity, *Immunity* 22 (2005) 539–550.
- [14] W. Shui, L. Sheu, J. Liu, B. Smart, C.J. Petzold, T.Y. Hsieh, A. Pitcher, J.D. Keasling, C.R. Bertozzi, Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 16952–16957.
- [15] Y. Xu, C. Jagannath, X.D. Liu, A. Sharafkhaneh, K.E. Kolodziejska, N.T. Eissa, Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity, *Immunity* 27 (2007) 135–144.
- [16] M.A. Sanjuan, C.P. Dillon, S.W. Tait, S. Moshiah, F. Dorsey, S. Connell, M. Komatsu, K. Tanaka, J.L. Cleveland, S. Withoff, D.R. Green, Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis, *Nature* 450 (2007) 1253–1257.
- [17] W. Martinet, D.M. Schrijvers, J.P. Timmermans, A.G. Herman, G.R. De Meyer, Phagocytosis of bacteria is enhanced in macrophages undergoing nutrient deprivation, *FEBS J.* 276 (2009) 2227–2240.
- [18] I.N. Gomes, A.F. Calabrich, S. Tavares Rda, J. Wietzerbin, L.A. De Freitas, P.S. Veras, Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*, *Microbes Infect.* 5 (2003) 251–260.
- [19] D.B. Munaf, M.I. Colombo, A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation, *J. Cell Sci.* 114 (2001) 3619–3629.
- [20] P.F. Pimenta, M.A. Dos Santos, W. De Souza, Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils, *J. Submicrosc. Cytol.* 19 (1987) 387–395.
- [21] M. Rabinovitch, The dissociation of the attachment and ingestion phases of phagocytosis by macrophages, *Exp. Cell Res.* 46 (1967) 19–28.
- [22] E.L. Eskelinen, Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells, *Autophagy* 1 (2005) 1–10.
- [23] P.S. Romano, M.A. Arboit, C.L. Vazquez, M.I. Colombo, The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell, *Autophagy* 5 (2009) 6–18.
- [24] J. Huang, V. Canadien, G.Y. Lam, B.E. Steinberg, M.C. Dinuer, M.A. Magalhaes, M. Glogauer, S. Grinstein, J.H. Brumell, Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 6226–6231.
- [25] A.M. Cuervo, The plasma membrane brings autophagosomes to life, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 735–737.
- [26] B. Ravikumar, K. Moreau, D.C. Rubinsztein, Plasma membrane helps autophagosomes grow, *Autophagy* 6 (2010) 1184–1186.
- [27] E. Gagnon, S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P.H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J.J. Bergeron, M. Desjardins, Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages, *Cell* 110 (2002) 119–131.

6 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho investigou a influência do processo autofágico sobre a capacidade endocítica em microescala e em macroescala e sobre a capacidade de adesão do macrófago murino, abrindo portas para novas perspectivas sobre o entendimento da relação da autofagia com outros processos celulares.

Ao investigar a influência da autofagia sobre a endocitose em microescala e em macroescala, foi observado que o processo autofágico é capaz de inibir a captura de grandes partículas por fagocitose (Capítulo II), porém não altera a entrada de macromoléculas (Capítulo I) como Tf e BSA, que caracterizam respectivamente a endocitose mediada por clatrina e a endocitose de fase fluida (KUMARI *et al.*, 2010).

A via endocítica leva à internalização de nutrientes e macromoléculas do meio externo para o meio interno. Esse evento ocorre por meio de compartimentos derivados da membrana plasmática que, posteriormente, podem se fundir com os lisossomos para a degradação do material internalizado e consequente produção de energia e substrato metabólico (HUOTARI e HELENIUS, 2011). A via endocítica e a via autofágica atuam de maneira complementar para a disponibilização de substrato para a célula, assim, em sinergia, estas duas vias caminham juntas para a homeostase das células, principalmente em situações de estresse nutricional. Inclusive a maturação dos autofagossomos, na via autofágica, depende do fluxo contínuo da via endocítica disponibilizando compartimentos e o bom funcionamento dos lisossomos (LAMB *et al.*, 2012). Desta forma, nossos dados reforçam a existência de uma comunicação entre a via endocítica em macroescala e a via autofágica. Contudo, estudos precisam ser conduzidos para esclarecer a razão pela qual a prévia

indução de autofagia altera apenas a capacidade fagocítica do macrófago murino e não é capaz de alterar o processo endocítico em microescala. Uma possível explicação para a inibição apenas da capacidade fagocítica pode estar relacionada à diminuição da quantidade e disponibilidade de membrana plasmática para a internalização de grandes partículas em células em autofagia.

Estudos demonstraram o envolvimento da membrana plasmática como um doador e fonte de membrana para a formação dos autofagossomos (CUERVO, 2010; RAVIKUMAR *et al.*, 2010). Além disso, também foi observada a formação de estruturas sugestivas de pré-autofagossomos derivados de membrana oriunda da membrana plasmática, requerendo a participação de proteínas da via endocítica (LAMB *et al.*, 2012). Esses dados indicam que a membrana plasmática está diretamente relacionada com a autofagia. Além disso, é plausível de se hipotetizar que a membrana que participa da formação de vesículas da via endocítica estaria disponível para participar da fase inicial do processo autofágico. No entanto, nossos dados apontam que a internalização de pequenas porções da membrana plasmática em células em autofagia estariam disponíveis para mediar a endocitose de macromoléculas. É provável que em contraste à possível diminuição da disponibilidade de membrana para realizar a fagocitose em células induzidas à autofagia, esta não teria influência na disponibilidade de membrana para endocitose em microescala, pois as vesículas endocíticas requerem apenas pequenas extensões de membrana plasmática para a sua formação (KUMARI *et al.*, 2010). A demonstração de que a inibição da capacidade fagocítica é um efeito completamente reversível em nosso estudo (Capítulo II – Figura 3) reforça a ideia de que a fagocitose é restaurada quando cessa o estímulo da indução de autofagia, sugerindo que a membrana plasmática rapidamente voltaria a ficar

disponível para a internalização de grandes partículas. Desta forma, o efeito inibitório da autofagia sobre a endocitose em macroescala em macrófagos de camundongos não seria dependente de um processo bioquímico e sim por competição por disponibilidade de membrana.

Corroborando com nossos achados, Bonilla e colaboradores (2013) demonstram que em células onde a via autofágica foi inibida houve aumento da fagocitose de bactéria, e isso ocorre devido ao aumento da expressão de receptores *scavenger* na superfície celular. O que sugere que o processo autofágico é capaz de regular a expressão de receptores envolvidos na internalização de patógenos, e isso acabaria por comprometer a capacidade fagocítica das células. Ao contrário do nosso (Capítulo II), outros estudos que utilizaram células CHO, células de linhagem não macrofágica, mostraram que a prévia indução de autofagia não foi capaz de alterar a tomada de grandes partículas (bactérias), incluindo *C. burnetti* e *Staphylococcus aureus* mortos inativados por calor (GUTIERREZ *et al.*, 2005; ROMANO *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que essa aparente controvérsia entre o nosso (Capítulo II) e esses estudos (GUTIERREZ *et al.*, 2005; ROMANO *et al.*, 2009), seja justificada pelos distintos tipos celulares utilizados nos diferentes estudos. Com isso, é possível que a indução da autofagia só altere a capacidade fagocítica em fagócitos profissionais.

Ainda, em contraste aos nossos achados, Martinet e colaboradores (2009) demonstraram que macrófagos J774 induzidos à autofagia fisiológica apresentaram aumento da fagocitose de *Escherichia coli* e *S. aureus* inativados por calor. Essas diferenças podem ser explicadas devido as diferenças no tamanho e na natureza das partículas, pois mostramos que houve a inibição da

internalização de partículas maiores de 5 μm em comparação com as bactérias cujas dimensões não ultrapassam cerca de 1 μm . Em contraste ao nosso estudo, Zang e colaboradores (2011) demonstraram que células de linhagem macrófaga U937 quando induzidas à autofagia apresentaram capacidade aumentada de fagocitar células apoptóticas. Contudo, as diferenças entre esse estudo e o nosso pode ser explicada pelo método de indução de autofagia que no nosso estudo foi por *starvation* ou pela inibição da cinase mTOR por tratamento com rapamicina, e no artigo em questão, consistiu no tratamento das células com oridonina. Esse fármaco é capaz de induzir autofagia por um mecanismo via regulação negativa de RAS (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011). Em conjunto, os poucos estudos revelam que há uma divergência sobre a influência da autofagia sobre a fagocitose, mas todos apontam para existência de uma comunicação entre as duas vias. Novos estudos necessitam ser conduzidos para elucidar os mecanismos envolvidos na conexão existente entre a autofagia e a fagocitose.

Uma possível explicação para a alteração da capacidade fagocítica em decorrência da prévia indução de autofagia pode estar relacionada à atividade da PI3K. Essa enzima é fundamental durante o processo de fagocitose de partículas por viabilizar o rearranjo do citoesqueleto, a emissão de pseudópodes e o remodelamento da membrana durante o englobamento e por ativar a ação da miosina durante a internalização, sendo importante tanto na formação quanto na maturação dos fagossomos (LINDMO e STENMARK, 2006; GILLOOLY *et al.*, 2001; COX *et al.*, 1999; BOHDANOWICZ *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2001; SWANSON *et al.*, 1999). Foi adicionalmente demonstrado que a PI3K está relacionada com a formação de autofagossomos (FENG *et al.*, 2014; SHIBUTANI e YOSHIMORI, 2014; PETIOT *et al.*, 2000). Dessa maneira, é

possível que, em nossos experimentos sobre a influência da indução prévia de autofagia sobre a fagocitose, a PI3K seja recrutada para a formação dos autofagossomos e fique indisponível ou disponível em pequena quantidade para mediar o processo de formação do fagossomo, e assim, ocorreria a redução da capacidade fagocítica do macrófago murino. Desta forma, nossa hipótese é que existe uma competição pela atividade da PI3K entre a fagocitose e a autofagia, mas como a PI3K não participa da via endocítica em microescala, a indução prévia da autofagia não interferiria na endocitose de macromoléculas. Araki e colaboradores (1996) demonstraram que a utilização de inibidores da ação da PI3K inibem a fagocitose e a formação de macropinosomos, mas não exercem influência sobre a endocitose mediada por receptores e não altera a micropinocitose. Adicionalmente, Swanson (2014) discute que a fagocitose de grandes partículas depende da sinalização da PI3K para a mobilização de grandes extensões de actina, e, conseqüentemente, mobilização de grande extensão de membrana plasmática. Desta forma, esses dados da literatura reforçam nossos achados de que a prévia indução de autofagia só teria efeito sobre a internalização de grandes partículas. No entanto, estudos complementares devem ser realizados para comprovação dessa hipótese e com o intuito de elucidar a influência da PI3K como molécula chave na conexão entre as vias autofágica e fagocítica.

Outra proteína da via autofágica que pode estar exercendo um papel negativo sobre a fagocitose é a LC3. Inicialmente descrita como um marcador específico de autofagossomos (KABEYA *et al.*, 2000), foi observada sua presença em fagossomos a partir de um estudo de proteômica que analisou a composição proteica da membrana de fagossomos a partir da captura de bolas de látex (SHUI

et al., 2008). Este dado demonstrou pela primeira vez que há participação de pelo menos uma proteína da via autofágica que participa da via fagocítica induzida por partículas modelo para se estudar fagocitose. Esses achados do estudo de SHUI e colaboradores reforçam a ideia da existência de uma captação de partículas por uma via autofágica, que foi denominada de LAP, ou seja, fagocitose associada à LC3 (do inglês *LC3-associated phagocytosis*). Essa via é ativada a partir do reconhecimento por determinados receptores de membrana com, consequente, formação de vesículas sem dupla membrana, que sofre processo de maturação fagolisossomal mais rápida que a fagocitose (MEHTA *et al.*, 2014). Dados não publicados de nosso laboratório demonstraram que a capacidade fagocítica de células super-expressando LC3 é reduzida. Essa observação suporta a ideia que células super-expressando LC3 podem estar induzindo o processo autofágico e que, como consequência, reduzem a capacidade fagocítica. Esses achados reforçam a hipótese que LC3 possa ser uma das proteínas envolvidas na inibição da fagocitose em células em autofagia.

A fagocitose é um processo diretamente relacionado a eventos que ocorrem na superfície celular, assim a inibição da fagocitose pela indução de autofagia sugere que esta última exerça um papel na dinâmica normal da membrana plasmática. Desta forma, outros processos celulares que dependam da participação e dinâmica da membrana plasmática poderiam ser influenciados pela indução de autofagia. Assim como na fagocitose, a adesão celular é um evento que compartilha a necessidade de mobilização ativa da membrana plasmática, remodelamento do citoesqueleto, além da participação de receptores de superfície, como as integrinas (DUPUY e CARON, 2008; FREEMAN e GRINSTEIN, 2014). Desta forma, foi gerada a hipótese que a indução de

autofagia também poderia ser capaz de alterar a adesão celular. Assim, partimos para avaliar o efeito da autofagia sobre a capacidade das células aderirem a diferentes substratos.

Em nosso estudo, a prévia indução de autofagia não alterou a adesão de macrófagos sobre o vidro (Capítulo I – Figura 2A). Contudo, quando se avaliou a capacidade das células em autofagia aderirem a uma superfície de colágeno e fibronectina, as células em autofagia apresentaram significativa redução no número de células aderidas (Capítulo I – Figura 2B e 3), demonstrando que a dinâmica de adesão é influenciada pela prévia indução de autofagia. Na tentativa de elucidar o que estaria causando esse efeito, ensaios foram conduzidos para determinar se a superfície de células induzidas à autofagia apresentavam diferenças na natureza da ultraestrutura da membrana plasmática. Utilizando microscopia eletrônica de varredura, observamos que o padrão de projeção das membranas de células em autofagia em comparação às células controle não apresentaram diferenças em relação à área celular, mas exibiram, diferentemente do controle, membranas com aspecto liso com redução no de projeções na superfície (Capítulo I – Figura 4). Esses achados sugerem que a alteração da capacidade de adesão destas células pode estar associada à redução na capacidade de emissão projeções da membrana plasmática promovida pela indução de autofagia.

Contrariamente ao nosso achado, Touloup-Minguez e colaboradores (2011) não observaram em células em *starvation* diferença na capacidade de aderir à superfície recoberta com colágeno quando comparadas às células cultivadas em meio rico em nutrientes. Porém, diferentemente dos nossos ensaios, Touloup-Minguez *et al.* (2011) induziram a autofagia nas células apenas durante o período

de desafio à adesão sem que as células já estivessem previamente em *starvation*, o que pode explicar as diferenças encontradas nos dois estudos. Por outro lado, similarmente ao que Touloup-Minguez e colaboradores (2013) demonstraram, é possível que a indução de autofagia module negativamente a expressão de integrinas na superfície celular celular, e isto esteja provocando a redução da capacidade de adesão dos macrófagos.

Outra possível explicação para a perda da capacidade em aderir das células em autofagia pode ser a falta de energia disponível para promover a adesão. A falta de disponibilidade de fonte energética pode estar associada à diminuição da expressão e ativação de moléculas de adesão na superfície celular e a capacidade de mobilizar a membrana plasmática em macrófagos em autofagia. Para elucidarmos tal suposição, poderíamos quantificar a produção de ATP nas culturas de macrófagos induzidos à autofagia e utilizar anticorpo para avaliar a expressão na superfície celular da integrina $\beta 1$ VLA4, que está envolvida no processo de adesão firme ao substrato de fibronectina (PINHEIRO *et al.*, 2006). Outra possibilidade é que poderíamos investigar se a indução de autofagia fisiológica estaria direcionando integrinas $\beta 1$ para degradação nos lisossomos e, conseqüentemente, impedindo a re-expressão destas moléculas na superfície celular, após elas terem sido endocitadas (TOULOUP-MINGUEZ *et al.*, 2013). Adicionalmente, é possível que em células em autofagia, as integrinas não estejam diminuídas em número, mas não estejam agrupadas e reorganizadas em uma área restrita da membrana plasmática formando as FA (MITRA *et al.*, 2005), tornando-se indisponíveis para interagir com a ECM. Uma estratégia interessante para testar essa hipótese seria verificar em células induzidas à autofagia fisiológica e aderidas em superfície recoberta por moléculas da ECM, a marcação

de paxilina, uma proteína adaptadora rica em FA (BROWN e TURNER, 2004; DELORME-WALKER, 2011).

Um aspecto em comum que é fundamental para que tanto a fagocitose quanto a adesão ocorram é a formação dos microdomínios de membrana conhecidos como *lipid rafts* (MULCAHY *et al.*, 2014; MURAI, 2012). Assim, uma possível explicação que traduza a simultânea influência da incubação em meio pobre em nutrientes sobre a fagocitose e a adesão celular é que a indução do processo autofágico cause inibição ou redução da formação de *lipid rafts*. Como consequência dessa inibição, as células perderiam a capacidade de promover o *clustering* de receptores e mobilização do citoesqueleto de actina, que reduziria a sinalização celular para desencadear a fagocitose e a adesão celular. Avaliar a formação destes microdomínios na membrana em células em privação de nutrientes é uma estratégia interessante na tentativa de elucidar o mecanismo envolvido no efeito inibitório da autofagia sobre a fagocitose e a adesão celular.

Em conjunto, os dados apresentados no corpo dessa tese corroboram a nossa hipótese de que a autofagia é capaz de inibir a endocitose em macroescala. No entanto, ao contrário da nossa hipótese, a autofagia não altera a endocitose em microescala. Além disso, a autofagia não foi capaz de interferir com a adesão, apenas a incubação em meio pobre em nutrientes foi capaz de promover redução da capacidade de adesão celular. Esses dados sugerem que as diferenças do efeito da autofagia sobre a endocitose em micro e macroescala parecem estar relacionadas ao tamanho do material a ser endocitado. Adicionalmente, a redução da adesão celular induzida pela privação de nutrientes estaria relacionada à natureza do substrato ao qual a célula interage.

7 CONCLUSÕES

- ❖ A indução de autofagia não interfere na endocitose em microescala de macromoléculas por macrófagos de camundongos *in vitro*.

- ❖ A indução de autofagia promove redução da adesão celular de macrófagos de camundongos *in vitro*.

- ❖ A indução de autofagia reduz a capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos *in vitro*.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliar o papel da PI3K e da LC3 na comunicação da via autofágica com a via fagocítica
- Investigar a influência da autofagia sobre outras formas de endocitose
- Analisar o efeito da autofagia sobre a expressão/ativação de integrinas
- Avaliar o efeito da autofagia sobre expressão de paxilina e a formação de pontos de adesão
- Verificar se a indução da autofagia diminui a formação de *lipid rafts*
- Avaliar a produção de ATP em células induzidas a autofagia

9 ANEXO

9.1 MANUSCRITO

Encapsulation of Living *Leishmania* Promastigotes in Artificial Lipid Vacuoles

Encapsulamento de promastigotas vivas de *Leishmania* em vacúolos lipídicos artificiais

Resumo de resultados: Este trabalho demonstra, pela primeira vez, um método para a criação e estudo de vacúolos parasitóforos artificiais. Essa metodologia permite o controle do tamanho dos vacúolos, o pH e a composição do meio, bem como o número de parasitas internalizados por vacúolo. Além disso, pôde-se monitorar o tempo de sobrevivência das promastigotas dentro dos vacúolos, que chegou até 96 horas. Desta forma, o método lança a oportunidade de estudar e identificar como fatores secretados pelo parasita contribuem para a evolução do vacúolo parasitóforo, além de ser um modelo para se estudar os mecanismos de fusão entre o vacúolo parasitóforo e vesículas intracelulares da célula hospedeira.

Manuscrito referente ao trabalho desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche no Laboratoire d'Adhésion & Inflammation (Inserm U1067 / CNRS UMR7333) sob orientação de Dra. Annie Viallat em Marseille, França. (CAPES-COFECUB Projeto 726/11).

RESEARCH ARTICLE

Encapsulation of Living *Leishmania* Promastigotes in Artificial Lipid Vacuoles

Carlos E. S. Guedes¹, Jose G. B. Lima¹, Emmanuèle Helfer², Patricia S. T. Veras^{1*}, Annie Viallat^{2*}

1 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz, Laboratório de Patologia e Biointervenção, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia, Brazil, **2** Aix-Marseille Université, CNRS, CINaM UMR 7325, 13288, Marseille, France

* pveras@bahia.fiocruz.br (PSTV); viallat@cinam.univ-mrs.fr (AV)



OPEN ACCESS

Citation: Guedes CES, Lima JGB, Helfer E, Veras PST, Viallat A (2015) Encapsulation of Living *Leishmania* Promastigotes in Artificial Lipid Vacuoles. PLoS ONE 10(8): e0134925. doi:10.1371/journal.pone.0134925

Editor: Simona Stäger, INRS - Institut Armand Frappier, CANADA

Received: September 10, 2014

Accepted: July 16, 2015

Published: August 4, 2015

Copyright: © 2015 Guedes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the program Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil (COFECUB) Sv 726/11 and by CAPES.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

After phagocytosis by mammalian macrophages, promastigote forms of *Leishmania* parasites settle inside intracellular parasitophorous vacuoles (PVs) in which they transform into amastigote forms and replicate. Here, using a variant of the ‘inverted emulsion’ method, we succeeded in encapsulating living *L. amazonensis* parasites in giant artificial liposomes that serve as model PVs. We were able to control the size of liposomes, the pH and the composition of their internal volume, and the number of internalized parasites per liposome. *L. amazonensis* promastigotes encapsulated in liposomes filled with RPMI-Dextran solution at pH 7.5 or 6.5 survived up to 96 h at 24°C. At 37°C and pH 5.5, parasites survived 48h. This method paves the way to identifying certain effectors secreted by the parasite and to unraveling specific mechanisms of fusion between the PV and intracellular vesicles of the host cell. This method will also facilitate the study of the temporal evolution of biophysical properties of the PV during its maturation.

Introduction

Obligate intracellular parasites such as *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*, agents of major diseases, are internalized by host cells through an endocytic process [1–4]. During the internalization process, parasites are surrounded by a membrane that originates from the plasma membrane of the host cell. This membrane delimits a vacuole in the host cell, named parasitophorous vacuole (PV), inside which the parasites settle individually or in groups. The PV protects the internalized parasites from the host cell environment. PVs are gradually adapted by the action of specific molecules secreted by the parasites (such as glycoconjugates, lysosomal proteases and ions) in order to create a suitable environment for their survival and their multiplication [5–7]. For instance, *Leishmania* parasites manage to regulate fusion events between their PVs and organelles of the host macrophage. This allows modification of the composition of PV membranes, increase of their size and supply of nutrients to the internalized parasites [8,9]. To identify and understand the role that molecular and biophysical parameters play in PV adaptation, the PV needs to be in controlled physical and biochemical

environments. It is possible, for example, to reconstitute the interactions of PVs with small controlled synthetic vesicles or with vesicles extracted from the host cells. However, the isolation of PVs containing living *Leishmania* parasites from the host cell meets technical difficulties [10–12] that impede their easy manipulation *ex-vivo*.

In this study, we report the first attempt to encapsulate living *Leishmania* into giant liposomes, which are model systems that have previously successfully served as minimal systems to study biological functions [13]. We show that living *Leishmania* parasites (specie *L. amazonensis*) can be encapsulated in artificial giant unilamellar liposomes of controlled size and composition, and remain alive for several days. These artificial PVs containing parasites are suspended in a glucose solution where they can be easily individually handled and submitted to various physical or biochemical environments. They can be put in contact with specific molecules or vesicles and submitted to external forces, various temperatures and pH. The method of liposome preparation is simple and does not require specific costly equipment. It can be easily used in parasitology laboratories. However, it is not a mass production method. Only a few hundreds of liposomes encapsulating parasites are produced during an experiment. The method is thus well adapted to the handling of individual artificial PVs and their observation using optical microscopy.

A standard method used to encapsulate materials within giant liposomes is the electroformation technique [14, 15]. However, it does not enable encapsulation of parasites, which continuously move in the suspension and remain outside the liposomes, which swell from the surface of the electroformation device. Other methods, such as double emulsion and continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) [16,17] have proved to be efficient for encapsulating a variety of particles or cells. However, these methods use centrifugation steps that require an accurate matching of density of parasites and of the medium in which they are suspended. As we found a large density variability among individual *L. amazonensis*, this matching was not possible and the yield of these methods was extremely low.

Here, we prepared artificial PVs encapsulating living *L. amazonensis* parasites in their promastigote form by adapting a new method introduced by Yanagisawa et al. [18] based on the inverted emulsion technique. We first prepared a micro-emulsion made of micro droplets containing parasites in their culture medium in suspension in a continuous lipid-oil solution. The lipids stabilized the droplets by forming a monolayer at their surface, which formed the inner leaflet of the future liposome. Then the micro-emulsion was deposited on the top of an oil phase placed above an aqueous phase. The droplets gently sedimented in oil and then across the lipid-oil-water interface where they became coated by a second lipid monolayer and therefore turned into liposomes. The liposomes further sedimented through the aqueous phase. Each liposome encapsulated one or several parasites suspended in culture medium.

Materials and Methods

Materials

Lipids 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (PE-PEG); 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EPC); 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC); 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine (DOPE) and 1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphor-L-serine (DOPS) were purchased from AVANTI polar lipids Inc. Glucose, Dextran 6,000, citric acid, Schneider's medium, and mineral oil were acquired from Sigma-Aldrich. RPMI culture medium, foetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin (P/S) antibiotics, and calcein AM were purchased from Life Technologies.

Lipid-oil solution

The lipid-oil solution was prepared under N₂ atmosphere, with humidity lower than 10% using a portable inflatable glove bag. We used two types of lipid mixtures to prepare the lipid-oil solution: a neutral EPC and PE-PEG mixture (98:2) and a charged DOPC, DOPE, DOPS mixture (50:25:25). The mixtures were dissolved in chloroform:methanol (9:1) at a total concentration of 100 mM. Then, 80 µl of the lipid solution was further diluted in 300 µl of chloroform:methanol in a 25 ml flask. The solvent was evaporated under primary vacuum for 1 h to obtain a lipid film at the bottom of the flask. Then, 20 ml of mineral oil were added and subjected to vacuum for additional one hour. Finally, the lipid-oil solution was sonicated for 20 min in an ultrasonicator at 40°C to obtain a stable lipid in oil solution at 0.4 mM. The solution was kept at room temperature and was used to prepare liposomes up to two weeks after preparation.

L. amazonensis parasites

L. amazonensis parasites were cultivated in Schneider's medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S at 24°C. When the culture reached the stationary phase, it was washed three times in RPMI medium and re-suspended in different media for encapsulation. *L. amazonensis* parasites were in their flagellar motile promastigote form.

Parasite suspension

We prepared three solutions in which parasites were suspended and encapsulated within giant liposomes: sucrose solution (360 mOsm), RPMI and RPMI-dextran solution. The latter was prepared to match the solution density to the parasite mean density. RPMI-Dextran was prepared by diluting RPMI with 20% volume of deionized water and adding Dextran 6,000 to reach a Dextran concentration of 20% (w/v). Finally, 10% FBS and 1% P/S were added to the solution and the pH was adjusted with citric acid. Lipid membranes are impermeable to ions so the pH was maintained inside liposomes. The final solution osmolality was adjusted to 360–365 mOsm by using an osmometer (Löser). Finally, 10⁶ to 10⁷ parasites were suspended in 50 µl of each of the prepared solutions.

Production of micro-emulsion precursor medium

The micro-emulsion precursor medium was made by emulsifying 50 µl of sucrose, RPMI or RPMI-Dextran containing *L. amazonensis* promastigotes into the lipid-oil solution. The emulsion was produced by 30 successive aspirations and releases of the solution using a 1 ml-micropipette.

Preparation of parasite containing liposomes

Liposomes containing living *L. amazonensis* promastigotes were prepared in homemade PDMS (polydimethylsiloxane) chambers consisting in cylindrical holes (8 mm in diameter) dug in a PDMS sheet (10 mm thick) fixed on a glass slide (see [Fig 1](#)). Immediately before use, the PDMS chambers were sterilized by direct UV exposition for 20 min. Each chamber was then filled with 100 µl of glucose solution (365 mOsm) supplemented with 1% P/S and covered with 100 µl of the lipid-oil solution. After one hour, it was considered that a homogenous lipid monolayer had time to form at the lipid-oil/glucose solution interface. Then, 50 µl of the precursor micro-emulsion containing parasites were added in the oil phase at the top of the chamber. While sedimenting throughout the chamber the micro droplets containing parasites crossed the lipid-oil/glucose solution interface and turned into liposomes before gently settling in the glucose solution at the bottom of the chambers. Liposomes were then collected with a

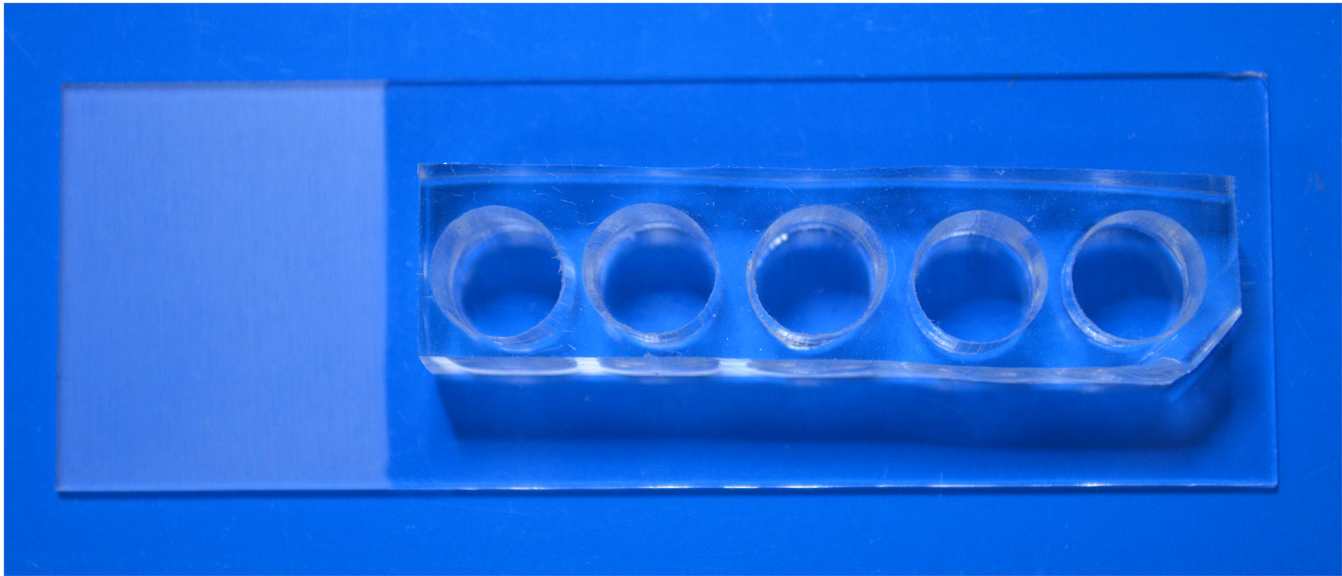


Fig 1. Picture of the homemade PDMS chambers for liposome production. The chamber size is 8 mm in diameter and 10mm in height). PDMS firmly adheres on a glass slide.

doi:10.1371/journal.pone.0134925.g001

micropipette, transferred to culture plates (Multiwell, Becton Dickinson) containing 2 ml of glucose solution and stored in an incubator at the chosen temperature under controlled CO₂ atmosphere.

Quantification of parasite viability

Parasite viability was studied at 24°C, which is the suitable temperature to maintain promastigotes in axenic culture, and at 37°C, temperature at which promastigotes transform into amastigotes. Twice a day, we observed encapsulated parasites to check their flagellum mobility. We also used Calcein AM to label living parasites. 1 μM of calcein was added to 1 mL of the *L. amazonensis*-containing liposomes suspension. After 2 hours, the total number of parasites (from 50 to 90 parasites) and the number of fluorescent parasites were counted in at least 40 liposomes randomly selected.

Microscopy observations

Liposomes were observed with an inverted microscope (OLYMPUS IMT-2) in bright field or phase contrast under magnification of 200, 400 and 600 times. Real time movies were recorded with a CCD camera (COHU). Fluorescence microscopy was performed with an inverted fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti) and pictures were taken using a cooled fluorescence camera (Andor).

Results

Liposomes encapsulating *L. amazonensis*

The process of liposome formation at the lipid-oil/glucose solution interface was observed by optical microscopy. After sedimentation in the lipid-oil solution, parasite-containing micro droplets arrived at the interface between the lipid-oil and the glucose solutions. We observed that some micro droplets remained at the interface where they broke and released their

parasites, but many droplets spontaneously crossed the lipid monolayer, driven by the small difference in molar density. A light tap on the table on which the PDMS chambers were placed helped the emulsion droplets to pass through the interface. During this passage, the lipid monolayer at the interface between the lipid-oil solution and the glucose solution wrapped each crossing micro droplet, which was therefore converted into a liposome. After 20 minutes, hundreds of liposomes had settled at the bottom of the chamber ([S1 Movie](#)). The composition of the two layers of the lipid bilayer of the liposomes is believed to be identical since the same lipid-oil solution was used to prepare the emulsion (which gives the internal lipid layer of the liposomes) and to form the interface between the lipid-oil solution and the glucose solution in the PDMS chambers (which gives the external lipid layer of the liposomes).

We successfully encapsulated *L. amazonensis* promastigotes inside EPC-PE-PEG liposomes containing sucrose, RPMI or RPMI-Dextran solutions. The RPMI-Dextran solution yields the highest encapsulation efficiency because its density matched that of parasites (see [Fig 2](#)). We also encapsulated *L. amazonensis* promastigotes in charged DOPC-DOPE-DOPS liposomes containing RPMI-Dextran solution. In this case, the divalent ions (such as Ca^{2+}) released in the glucose solution after breakage of some liposomes at the interface interacted with the negatively charged lipids of the interface and of the liposome membrane. They mediated an attractive lipid-lipid interaction resulting in aggregation and sequestration of the liposomes at the lipid-oil/glucose solution interface. Addition of 15mM EDTA to the glucose solution enabled the detachment of liposomes from the interface and subsequent sedimentation toward the bottom of the chamber.

The size distribution of liposomes depended on the pipetting speed used to produce micro-emulsion as shown in [Fig 3](#). The average liposome size decreased with the mixing speed. Fast aspiration/release (6 cycles / sec) produced droplets mainly ranging from 10 to 50 μm , each of them containing a few number of parasites. Slow aspiration/release (1 cycle / sec) produced larger droplets (20–70 μm) with dozens of *L. amazonensis* parasites inside them. In all cases, the liposome sizes were in a relevant range to mimic PVs. In the following, we focused on liposomes obtained with a micro-emulsion prepared by 30 successive aspirations and releases of the parasite suspension with a pipetting speed of two aspiration/release per second. These conditions led to liposomes ranging mainly from 21 to 50 μm which satisfactorily mimic PV sizes.

The number of encapsulated parasites per liposome increased with the parasite concentration in RPMI and RPMI-dextran solutions. Typically, we prepared liposomes containing from one to a dozen living promastigotes.

Parasites suspended in RPMI-Dextran solution were distributed within the whole liposome volume and freely swim within the liposome volume. In some cases, we observed an interaction between the flagellum of the parasite and the liposome membrane. We thus observed movements of the membrane induced by the movement of the flagellum. In rare cases, the tip of the parasite flagellum was stuck on the membrane, which, however, did not break.

Parasite survival

In-vivo, *L. amazonensis* promastigote forms transform into the non-motile aflagellated amastigote form inside the PV, where they are able to survive and replicate within the macrophages. The time course of promastigote-to-amastigote differentiation occurs at 37°C and at acidic pH through four phases: signal perception (0–5 h after exposure); movement cessation and aggregation (5–10 h); amastigote morphogenesis (10–24 h); and maturation (24–120 h) [19]. In the present study, we focused on evaluating the viability of parasites within artificial PVs in the initial stages of intracellular parasite forms. It was beyond the scope of this paper to obtain a full transformation of parasites into the amastigote form. Indeed, the *in-vivo* conditions for

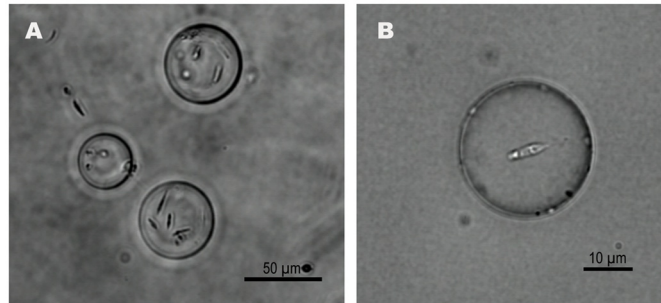


Fig 2. Liposomes encapsulating *L. amazonensis* promastigotes. The liposome membrane is composed of a EPC-PEG lipid mixture. Five million of *L. amazonensis* promastigotes per ml were used for the encapsulation process. (A) Liposomes containing multiple parasites. (B) Liposome with a single parasite with its flagellum at the right part of the parasite. Bright field images.

doi:10.1371/journal.pone.0134925.g002

amastigote transformation are not fully known, for example in terms of required molecules and of dynamics of their supply, of temporal evolution of pH and of PV's size, etc.

The viability of parasites was ascertained by two ways. First, by observing their mobility and the motion of their flagellum. This method probes only the viability of the motile promastigote form. Second, by using Calcein AM which specifically labels living cells, thus both promastigote and amastigotes.

We first observed that isolated parasites incubated in RPMI-Dextran solution in culture chambers remained mobile and therefore alive during at least four days at pH 7.5 at 24°C. Because of the high viscosity of RPMI-Dextran solution, parasites moved more slowly in RPMI-Dextran suspensions than in pure RPMI medium.

As the pH of the PV is known to progressively acidify *in vivo* and decrease to 5.5 within 30 minutes after parasite uptake, we probed the lifetime of parasites in liposomes in RPMI-Dextran solutions first at pH 5.5, 6.5 and 7.5 at 24°C, and also under physiological conditions at pH 5.5 at 37°C. In this latter case, promastigotes are susceptible to start their transformation into amastigotes.

We observed promastigote motion inside artificial liposomes at 24°C. Most *L. amazonensis* promastigotes survived 48 h at pH 5.5 (S2 Movie), and 96 h at pH 6.5 and 7.5 (S3 Movie). When a liposome broke, the encapsulated parasites were released in the glucose solution and were not able to survive more than a few hours. Encapsulation in the liposomes therefore protected the parasites from the outer solution and enabled them to survive for several days.

In order to quantitatively assess the survival rate of parasites within liposomes, we used the membrane-permeant live-cell labeling dye, Calcein AM. Upon entering a living organism, the non-fluorescent dye is converted to green-fluorescent and remains trapped in the organism. When added in the suspension of parasite-containing liposomes, Calcein diffused through the liposome membrane, entered in internalized parasites and became fluorescent in living parasites (Fig 4). Interestingly, we observed that *L. amazonensis* was able to expel fluorescent calcein in the host liposome, which also became fluorescent as shown in Fig 4B.

At 24°C and pH 7.5, the survival percentage of parasites trapped inside liposomes containing RPMI-dextran was 90.2, 87.7 and 86.3% after 24 h, 48 h and 72 h, respectively (Fig 5A). The average number of living parasites per liposome slightly decreases with time, from 2 to 1.7 and 1.5 after 24, 48 and 72h, respectively (Fig 5B).

At 37°C and pH 5.5, the parasites were not mobile after 24h of encapsulation. The survival percentage of parasites trapped inside liposomes containing RPMI-dextran was 86.7% after 24h and 65.4% after 48h (Fig 5C). The average number of living parasites per liposome was 1.3, both after 24 h and 48h (Fig 5D). After 72h, it was not possible to quantify the viability of

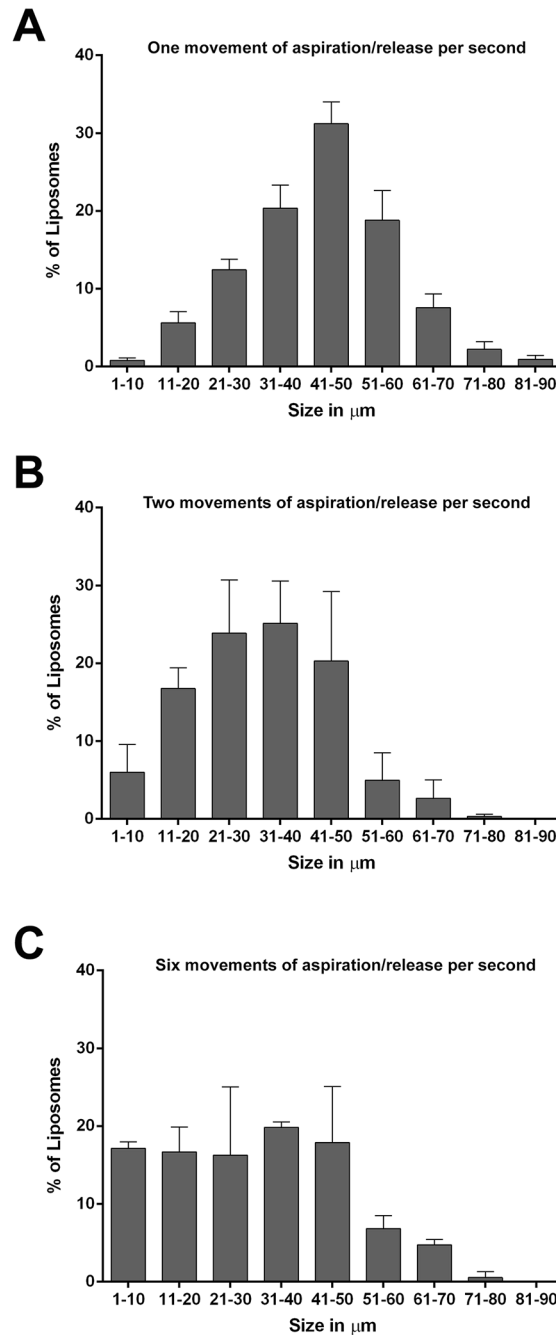


Fig 3. Size distribution of liposomes as function of aspiration/release speed. The microp-emulsions were prepared by 30 aspiration/release cycles of the parasite suspension in a lipid-oil phase using a 1-ml micropipette. (A) one aspiration/release per second; (B) two aspiration/release per second; (C) six aspiration/release per second.

doi:10.1371/journal.pone.0134925.g003

parasites, because most liposomes had lost a large part of their internal volume and had shrunk. The loss of internal volume indicates that water molecules, which are membrane-permeant, diffused out of liposomes. The driving mechanism for this diffusion is the necessity to balance the osmotic pressure between the RPMI-dextran solution inside liposomes and the external glucose solution. The osmotic pressure linearly varies with the total molecular concentration of

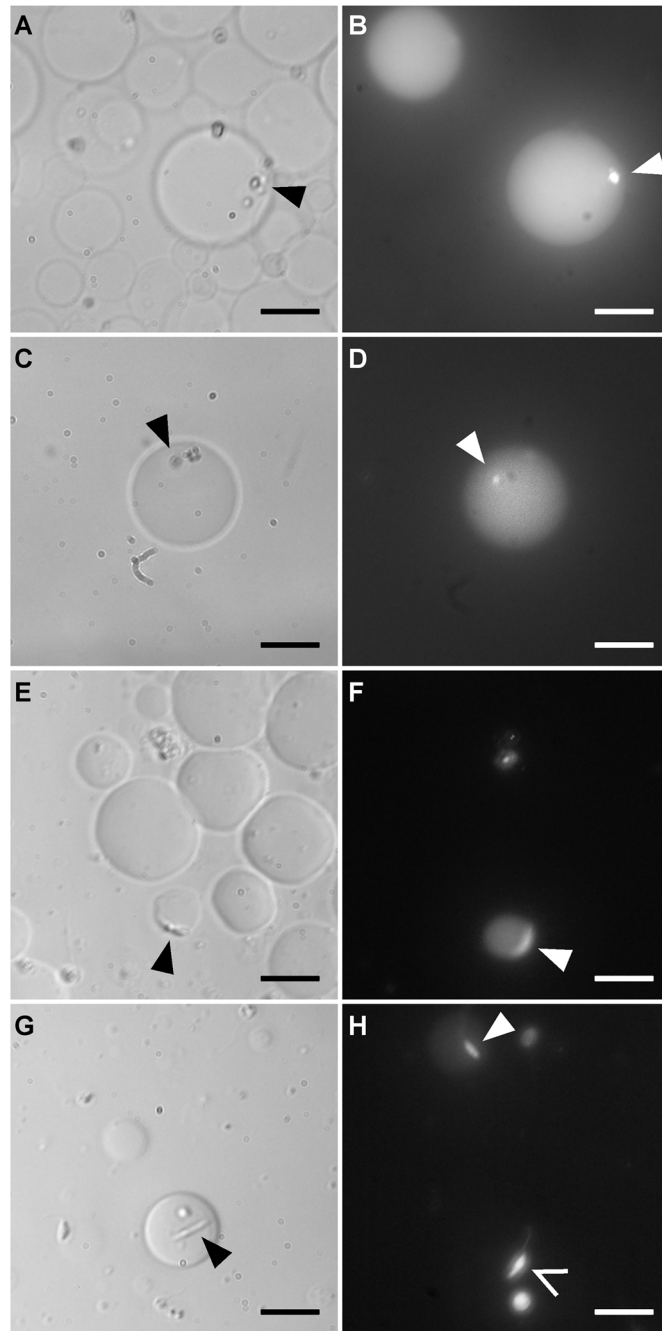


Fig 4. Observation of living *L. amazonensis* in liposomes. Liposomes containing parasites in RPMI-Dextran were incubated with Calcein before observation in phase contrast (left images) and fluorescence microscopy (right images). Liposomes are fluorescent due to the encapsulated living parasites (arrowhead) which expelled fluorescent Calcein after their uptake. (A-B and C-D) after 48h at pH 5.5 at 37°C; A and B: same field; C and D: same field. (E-F, G and H) after 48h at pH 7.5 at 24°C; E and F: same field. Promastigotes present elongated shapes. The empty arrow in H shows a living parasite, whose liposome had just broken. The flagellum is visible. Scale bar: 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0134925.g004

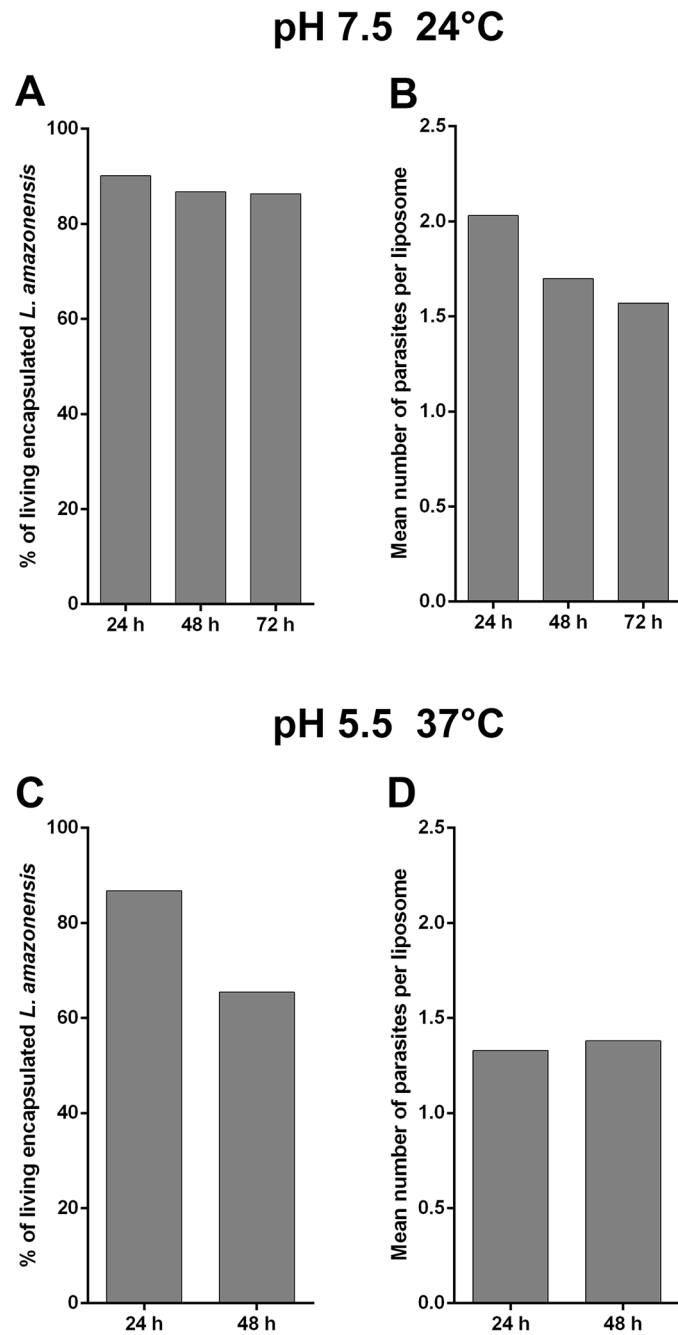


Fig 5. *L. amazonensis* viability in liposomes. Parasites in RPMI-dextran were encapsulated in liposomes and the living parasites were counted as function of time. (A) Average percentage of living encapsulated parasites. (B) Average number of living parasites per liposome after 24, 48 and 72h at pH 7.5 at 24°C. (C,D) Same parameters as in A and B after 24 and 48h at pH 5.5 at 37°C.

doi:10.1371/journal.pone.0134925.g005

solutes in the solution. Therefore, a loss of solute molecules in RPMI-dextran within liposomes induces a diffusion of water out of liposomes in order to keep constant the RPMI-dextran molecular concentration. It therefore suggests that at pH 5.5 at 37°C the encapsulated parasites consume molecules present inside the liposomes. This phenomenon is not seen at 24°C and might indicate the start of promastigote transformation towards the amastigote form.

Parasite lifetime within giant liposomes is therefore well adapted to the study of the intracellular life cycle of *L. amazonensis* since it is comparable to the time required *in vivo* for promastigote-to-amastigote transformation [8].

Discussion

We have successfully produced giant liposomes that encapsulated living parasites. Several questions arise concerning the composition of these liposomes in order to be physiologically more relevant. First, for the sake of simplicity we have used commercial lipids, but the production of parasite-encapsulating liposomes prepared from lipids extracted from macrophage membrane should not raise problems. Indeed, we already produced giant liposomes (without parasites in the first step) made of these lipids (data not shown). It however requires a significant effort to extract large amount of lipids from macrophages. Moreover, this new method enabled us to produce liposomes with charged lipids that are essential components of the plasma membrane. Proteins can also be added to the liposome membranes as shown by Yanagisawa et al. [18], where active potassium channel KcsA was reconstituted in similar liposomes.

Concern around the possible trapping of oil between the two lipid leaflets of the membrane has consistently arisen for the preparation of liposomes by the inverted emulsion method. Indeed, when giant liposomes are prepared using the cDICE method [17], with a centrifugation step [16], or with jetting [20], small amounts of oil can be trapped in the membrane, and this remaining oil accumulates into discrete droplets in the membrane easily observed under phase contrast microscopy. In the present study, small droplets have never been observed in the membrane of parasite-encapsulating liposomes formed using the described variant of the 'inverted emulsion' method.

A quantitative study of the biophysical and biochemical parameters that control the fate of parasites encapsulated in artificial liposomes was beyond the scope of this paper. It would require investigating the role played by numerous parameters such as temperature, pH, nutrient delivery, metabolic waste removal and their coupled dynamics, on amastigote transformation and parasite replication. The experiments presented in this study clearly show that the amount of RPMI encapsulated in an artificial liposome is sufficient to ensure the survival of parasites for 96 hours and that the metabolic waste generated by a parasite during this time does not kill it. Temporal evolution of the surface area and of the tension of the liposome membrane with parasite maturation is accessible by micropipette experiments. Moreover, this approach opens the way to sequentially supply nutrients, ions or membrane proteins into the artificial PV by inducing its fusion with vesicles loaded with suitable molecules. These fusion events might be stimulated using negatively charged artificial PVs and positively charged nano-vesicles. In this case, the presence of residual oil in the liposome membrane might be an advantage since the oil could fill the hydrophobic voids created by the lipid reorganization during membrane fusion [21]. For example, Richmond et al. (20) who enclosed some residual oil in liposome membranes during their preparation, managed to insert functional proteins into the membrane, among which SNARE proteins. Here, SNARE proteins are of particular interest for *Leishmania* parasites since they are involved in intracellular membrane trafficking and may play an active role in the regulation of fusion events between the PV and the intracellular vesicles of the host cell.

Conclusion

We propose a new method to trap living *Leishmania* parasites in artificial lipid vacuoles of tunable size, composition and biophysical properties. The viability of the encapsulated parasites is long enough to enable the study of intravacuolar amastigogenesis and replication. In particular,

our system opens the way to a controlled nutrient delivery to the parasites by fusion events induced between parasite-encapsulating liposomes and artificial vesicles loaded with specific molecular cargoes. We believe that this approach can provide a valuable tool to investigate the minimal elements required for amastigogenesis and replication processes of *Leishmania* intracellular life-stage and to highlight the active role of the parasite in PV maturation.

Supporting Information

S1 Movie. Promastigote *L. amazonensis* encapsulated in liposomes right after encapsulation, at pH 7.5 at 24°C.

(MP4)

S2 Movie. *L. amazonensis* can survive 48 hours inside liposomes. Liposome containing 2 parasites in RPMI-dextran after 48 h at pH 5.5 at 24°C.

(MP4)

S3 Movie. *L. amazonensis* can survive 96 hours inside liposomes. Liposome containing 2 parasites in RPMI-dextran after 96 h at pH 6.5 at 24°C.

(MP4)

Acknowledgments

We thank Renuka Sivalingam for correcting the manuscript. We thank the Plateforme de culture cellulaire de l'Inserm. This work was supported by the program Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Comité Français d'Évaluation de la Coopération Universitaire et Scientifique avec le Brésil (COFECUB) Sv 726/11.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PSTV AV. Performed the experiments: CESG JGBL. Analyzed the data: CESG EH. Contributed reagents/materials/analysis tools: CESG JGBL EH. Wrote the paper: CESG PSTV AV EH.

References

1. Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M. Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* 2000; 2(2):115–26 PMID: [11207568](#)
2. Descoteaux MDaA. Phagocytosis: Microbial Invasion: Microbial Invasion In: Gordon S, editor. Phagocytosis: Microbial Invasion: Microbial Invasion. *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles.* 6: Elsevier; 1999. p. 380.
3. Kierszenbaum F, Knecht E, Budzko DB, Pizzimenti MC. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1974; 112(5):1839–44. PMID: [4361979](#)
4. Nichols BA, O'Connor GR. Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoan *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. *Lab Invest.* 1981; 44(4):324–35. PMID: [7206629](#)
5. Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455:341–52 PMID: [10571023](#)
6. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International journal for parasitology* 2007; 37:1063–75 PMID: [17493624](#)
7. Landfear SM. Nutrient transport and pathogenesis in selected parasitic protozoa. *Eukaryotic cell* 2011; 10:483–93 doi: [10.1128/EC.00287-10](#) PMID: [21216940](#)
8. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 1998; 6(10):392–401. PMID: [9807783](#)

9. Burchmore RJ, Barrett MP. Life in vacuoles—nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol.* 2001; 31(12):1311–20. PMID: [11566299](#)
10. Chakraborty P, Sturgill-Koszycki S, Russell DG. Isolation and characterization of pathogen-containing phagosomes. *Methods Cell Biol.* 1994; 45:261–76. PMID: [7707990](#)
11. Shevchuk O, Steinert M. Isolation of pathogen-containing vacuoles. *Methods Mol Biol.* 2013; 983:419–29. doi: [10.1007/978-1-62703-302-2_23](#) PMID: [23494321](#)
12. Vinet AF, Descoteaux A. Large scale phagosome preparation. *Methods Mol Biol.* 2009; 531:329–46. doi: [10.1007/978-1-59745-396-7_20](#) PMID: [19347326](#)
13. Roux A, Cappello G, Cartaud J, Prost J, Goud B, Bassereau P. A minimal system allowing tabulation with molecular motors pulling on giant liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(8):5394–9. PMID: [11959994](#)
14. Angelova MI, Soléau S, Méléard P, Faucon JF, Bothorel P. Preparation of giant vesicles by external a. c. electric fields. Kinetics and applications. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 1992; 89:127–131
15. Abkarian M, Lartigue C, Viallat A. Motion of phospholipidic vesicles along an inclined plane: sliding and rolling. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2001; 63(4 Pt 1):041906 PMID: [11308876](#)
16. Pautot S, Frisken BJ, Weitz DA. Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir.* 2003; 19(7):10.
17. Abkarian M, Loiseau E, Massiera G. Continuous Droplet Interface Crossing Encapsulation (cDICE) for High Throughput Monodisperse Vesicle Design. *Soft Matter.* 2011; 7:15
18. Yanagisawa M, Iwamoto M, Kato A, Yoshikawa K, Oiki S. Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle: experimental verification with the potassium channel KcsA. *J Am Chem Soc.* 2011; 133(30):11774–9 doi: [10.1021/ja2040859](#) PMID: [21702488](#)
19. Tsigankov P, Gherardini PF, Helmer-Citterich M, Spa GF, Myler PJ, Zilberstein D. Regulation Dynamics of *Leishmania* Differentiation: Deconvoluting Signals and Identifying Phosphorylation Trends. 2014; 13(7):1787–1799
20. Richmond DL, Schmid EM, Martens S, Stachowiak JC, Liska N, Fletcher DA. Forming giant vesicles with controlled membrane composition, asymmetry, and contents. *PNAS* 2011; 108:9431–9436 doi: [10.1073/pnas.1016410108](#) PMID: [21593410](#)
21. Pincet F, Tareste D, Amar MB, Perez E. Spontaneous and reversible switch from amphiphilic to oil-like structures. *Phys Rev Lett.* 2005; 95(21):218101. PMID: [16384186](#)

9.2 ARTIGOS PRODUZIDOS EM COLABORAÇÃO DURANTE O DOUTORADO

PLoS One. 2012 7(11):e49496. doi: 10.1371/journal.pone.0049496. Epub 2012 Nov 13. **17-AAG Kills Intracellular *Leishmania amazonensis* while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages.** Petersen AL, Guedes CE, Versoza CL, **Lima JG**, de Freitas LA, Borges VM, Veras PS.

Microbes Infect. 2013 Jul-Aug;15(8-9):579-91.doi:0.1016/j.micinf.2013.04.005. Epub 2013 Apr 28. **Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*.** Menezes JP, Almeida TF, Petersen AL, Guedes CE, Mota MS, **Lima JG**, Palma LC, Buck GA, Krieger MA, Probst CM, Veras PS.

10 REFERÊNCIAS

ALLEN, W.E.; JONES, G.E.; POLLARD, J.W.; RIDLEY, A.J. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 707–720, 1997.

ALLEN, W.E.; ZICHA, D.; RIDLEY, A.J.; JONES, G.E. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. **J. Cell Biol.**, v. 141, p. 1147–1157, 1998.

ANDERSON, C.L.; SHEN, L.; EICHER, D.M.; WEWERS, M.D.; GILL, J.K. Phagocytosis mediated by three distinct Fcγ receptor classes on human leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 171, p. 1333–1415, 1990.

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.**, v. 135, n. 5, p. 1249–1260, 1996.

BAUCKMAN, K.A.; OWUSU-BOAITEY, N.; MYSOREKAR, I.U. Selective autophagy: Xenophagy. **Methods**, v. 75, p. 120–127, 2015.

BENMERAH, A. & LAMAZE, C. Clathrin-Coated Pits: Vive La Différence? **Traffic**, v. 8, p. 970–982, 2007.

BERRIER, A.L.; YAMADA, K.M. Cell-matrix adhesion. **J. Cell Physiol.**, v. 213, p. 565–573, 2007.

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.**, v. 243, n. 1–2, p. 240–246, 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. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 5, p. 2320-2326, 1995.

BOHDANOWICZ, M.; COSÍO, G.; BACKER, J.M.; GRINSTEIN, S. Class I and class III phosphoinositide 3-kinases are required for actin polymerization that propels phagosomes. **J. Cell Biol.**, v. 191, n. 5, p. 999-1012, 2010.

BONILLA, D.L.; BHATTACHARYA, A.; SHA, Y.; XU, Y.; XIANG, Q.; KAN, A.; JAGANNATH, C.; KOMATSU, M.; EISSA, N.T. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 537-47, 2013.

BRODSKY, F.M.; CHEN, C.Y.; KNUEHL, C.; TOWLER, M.C.; WAKEHAM, D.E. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 517-568, 2001.

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**, v. 377, n. 6548, p. 441-6, 1995.

BROWN, M.C. & TURNER, C.E. Paxillin: adapting to change. **Physiol. Rev.**, v. 84, n. 4, p. 1315-39, 2004.

CASWELL, P.T. & NORMAN, J.C. Integrin trafficking and the control of cell migration. **Traffic**, v. 7, p. 14-21, 2006.

CODOGNO, P.; MEHRPOUR, M.; PROIKAS-CEZANNE, T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 13, p. 7-12, 2012.

CONNER, S. D. & SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37-44, 2003.

CORREIA, I.; CHU, D.; CHOU, Y.H.; GOLDMAN, R.D.; MATSUDAIRA, P. Integrating the actin and vimentin cytoskeletons. adhesion-dependent formation of fimbrin-vimentin complexes in macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 146, p. 831–842, 1999.

COX, D.; TSENG, C.C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 3, p. 1240-7, 1999.

COX, D.; BERG, J.S.; CAMMER, M.; CHINEGWUNDOH, J.O.; DALE, B.M.; CHENEY, R.E.; GREENBERG, S. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. **Nat. Cell Biol.**, v. 4, n. 7, p. 469-77, 2002.

CUERVO, A.M. Autophagy: many paths to the same end. **Mol. Cell Biochem.**, v. 263, n. 1-2, p. 55-72, 2004.

CUERVO, A.M. The plasma membrane brings autophagosomes to life. **Nat. Cell Biol.**, v. 12, p. 735-737, 2010.

CYRINO, L.T.; ARAÚJO, A.P.; JOAZEIRO, P.P.; VICENTE, C.P.; GIORGIO, S. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. **Tissue Cell**, v. 44, n. 6, p. 401-8, 2012.

DAUTRY-VARSAT, A. Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor. **Biochim.**, v. 68, n. 3, p. 375-81, 1986.

DEFIFE, K.M.; JENNEY, C.R.; COLTON, E.; ANDERSON, J.M. Cytoskeletal and adhesive structural polarizations accompany IL-13-induced human macrophage fusion. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 47, p. 65–74, 1999.

DEGTEREV, A. & YUAN, J. Expansion and evolution of cell death programmes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 378-90, 2008.

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

DELORME-WALKER, V.D.; PETERSON, J.R.; CHERNOFF, J.; WATERMAN, C.M.; DANUSER, G.; DERMARDIROSSIAN, C.; BOKOCH, G.M. Pak1 regulates focal adhesion strength, myosin IIA distribution, and actin dynamics to optimize cell migration. **J. Cell Biol.**, v. 193, n. 7, p. 1289-303, 2011.

DESJARDINS, M.; HUBER, L.A.; PARTON, R.G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **J. Cell Biol.**, v. 124, p. 677–88, 1994.

DOHERTY, G.J. & McMAHON, H.T. Mechanisms of endocytosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 857-902, 2009.

DUNN, W.A.JR. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. **J. Cell Biol.**, v. 110, n. 6, p. 1923-33, 1990.

DUPUY, A.G. & CARON, E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. **J. Cell Sci.**, v. 121, n. 11, p. 1773-83, 2008.

EFEYAN, A. & SABATINI, D.M. mTOR and cancer: many loops in one pathway. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 22, n. 2, p. 169-76, 2010.

ESKELINEN, E.L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. **Autophagy**, v. 1, p. 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**, v. 3, n. 12, p. 878-93, 2002.

EZEKOWITZ, R.A.; SASTRY, K.; BAILLY, P.; WARNER, A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1785–94, 1990.

FAIRN, G.D. & GRINSTEIN, S. How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. **Trends Immunol.**, v. 33, n. 8, p. 397-405, 2012.

FENG, Y.; HE, D.; YAO, Z.; KLIONSKY, D.J. The machinery of macroautophagy. **Cell Res.**, v. 24, n. 1, p. 24-41, 2014.

FLANNAGAN, R.S.; JAUMOUILLE, V.; GRINSTEIN, S. The cell biology of phagocytosis. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 7, p. 61-98, 2012.

FREEMAN, S.A. & GRINSTEIN, S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. **Immunol. Rev.**, v. 262, n. 1, p. 193-215, 2014.

GALLAGHER, L.E. & CHAN, E.Y. Early signalling events of autophagy. **Essays Biochem.**, v. 55, p. 1-15, 2013.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A.; PANKOV, R.; YAMADA K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, n. 11, p. 793-805, 2001.

GILLOOLY, D.J.; SIMONSEN, A.; STENMARK, H. Phosphoinositides and phagocytosis. **J. Cell Biol.**, v. 155, n. 1, p. 15-7, 2001.

GOMES, L.C. & DIKIC, I. Autophagy in antimicrobial immunity. **Mol. Cell**, v. 54, n. 2, p. 224-33, 2014.

GOLDSTEIN, J.L.; ANDERSON, R.G.; BROWN, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. **Nature**, v. 279, p. 679–685, 1979.

GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S.; ANDERSON, R.G.; RUSSELL, D.W.; SCHNEIDER, W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 1, p. 1-39, 1985.

GORDY, C. & HE, Y.W. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? **Protein Cell**, v. 3, n. 1, p. 17-27, 2012.

GRANT, B.D. & DONALDSON, J.G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 10, n. 9, p. 597-608, 2009.

GRIFFIN, F.M.; GRIFFIN, J.A.; LEIDER, J.E.; SILVERSTEIN, S.C. 1975. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. **J. Exp. Med.**, v. 142, p. 1263–82, 1975.

GRUENBERG, J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, n. 10, p. 721-30, 2001.

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**, v. 119, n. 6, p. 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. **Cell. Microbiol.**, v. 7, n. 7, p. 981-93, 2005.

HAMASAKI, M. & YOSHIMORI, T. Where do they come from? Insights into autophagosome formation. **FEBS Lett.**, v. 584, n. 7, p. 1296-301, 2010.

HELENIUS, A.; MELLMAN, I.; WALL, D.; Hubbard, A. Endosomes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 8, p. 245–250, 1983.

HOWES, M.T.; MAYOR, S.; PARTON, R.G. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 22, p. 519–527, 2010.

HUMPHRIES, J.D.; BYRON, A.; HUMPHRIES, M.J. Integrin ligands at a glance. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 3901-3, 2006.

HUOTARI, J. & HELENIUS, A. Endosome maturation. **EMBO J.** v. 30, n. 17, p. 3481-500, 2011.

JARAMILLO, M.; GOMEZ, M.A.; LARSSON, O.; SHIO, M.T.; TOPISIROVIC, I.; CONTRERAS, I.; LUXENBURG, R.; ROSENFELD, A.; COLINA, R.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. COSTA-MATTIOLI, M.; SONENBERG, N. Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 4, p. 331-41, 2011.

JAUMOILLÉ, V. & GRINSTEIN, S. Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. **Curr Opin. Cell Biol.**, v. 23, n.1, p. 22-9, 2011.

JING, Y. & TANG, X.M. The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. **Cell Res.**, v. 9, n. 4, p. 243-53, 1999.

JOHANNES, L.; PARTON, R.G.; BASSEREAU, P.; MAYOR, S. Building endocytic pits without clathrin. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 16, n. 5, p. 311-21, 2015.

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.**, v. 19, n. 21, p. 5720-8, 2000.

KERR, M.C. & TEASDALE, R.D. Defining macropinocytosis. **Traffic**, v. 10, n. 4, p. 364-71, 2009.

KESIDOU, E.; LAGOUDAKI, R.; TOULOUMI, O.; POULATSIDOU, K.N.; SIMEONIDOU, C. Autophagy and neurodegenerative disorders. **Neural Regen. Res.**, v. 8, n. 24, p. 2275-83, 2013.

KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 7, p. 546-59, 2005.

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

KIM, J. & KLIONSKY, D.J. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 303-42, 2000.

KIRCHHAUSEN, T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 15, p. 705-732, 1999.

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

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

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

KLIONSKY, D. J. & OHSUMI, Y. Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. **Annu. Rev. Cell Devel. Biol.**, v. 15, p. 1-32, 1999.

KUMARI, S.; MG, S.; MAYOR, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. **Cell Res.**, v. 20, n. 3, p. 256-75, 2010.

LAMB, C.A.; DOOLEY, H.C.; TOOZE, S.A. Endocytosis and autophagy: shared machinery for degradation. **Bioessays**, v. 35, p. 34–45, 2012.

LAMB, C.A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S.A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 14, n. 12, p. 759-74, 2013.

LEE, Y.J.; SONG, H.O.; LEE, Y.H.; RYU, J.S.; AHN, M.H. Proliferation of *Toxoplasma gondii* suppresses host cell autophagy. **Korean J. Parasitol.**, v. 51, n. 3, p. 279-87, 2013.

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

LI, C.Y.; WANG, E.Q.; CHENG, Y.; BAO, J.K. Oridonin: An active diterpenoid targeting cell cycle arrest, apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 43, n. 5, p. 701-4, 2011.

LI, D.; CUI, Q.; CHEN, S.G.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Inactivation of ras and changes of mitochondrial membrane potential contribute to oridonin-induced autophagy in a431 cells. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 105, n. 1, p. 22-33, 2007.

LINDMO, K. & STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **J. Cell Sci.**, v. 119, n. 4, p. 605-14, 2006.

LIU, W.; GEUZE, H.J.; GEELLEN, M.J.; SLOT, J.W. The Autophagic and Endocytic Pathways Converge at the Nascent Autophagic Vacuoles. **J. Cell Biol.**, v. 136, n. 1, p. 61-70, 1997.

MARITZEN, T.; SCHACHTNER, H.; LEGLER, D.F. On the move: endocytic trafficking in cell migration. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 2119–2134, 2015.

MARTINET, W.; SCHRIJVERS, D.M.; TIMMERMANS, J.P.; HERMAN, A.G.; De MEYER, G.R. Phagocytosis of bacteria is enhanced in macrophages undergoing nutrient deprivation. **FEBS J.**, v. 276, p. 2227-2240, 2009.

MAXFIELD, F.R. & YAMASHIRO, D.J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 225, p. 189–198, 1987.

MAYOR, S. & PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 8, p. 603–612, 2007.

MCMAHON, H.T. & BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 12, n. 8, p. 517-33, 2011.

MEHTA, P.; HENAULT, J.; KOLBECK, R.; SANJUAN, M.A. Noncanonical autophagy: one small step for LC3 one giant leap for immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 26, p. 69–75, 2014.

MEIJER, A.J. & CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **Internat. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 12, p. 2445-62, 2004.

MEIJER, A.J. & CODOGNO, P. Autophagy: regulation and role in disease. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v. 46, p. 210-40, 2009.

MELLMAN, I. Endocytosis and molecular sorting. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 12, p. 575–625, 1996.

MENZIES, F.M.; FLEMING A.; RUBINSZTEIN, D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 16, n. 6, p. 345-57, 2015.

MEREDITH, J.E.JR.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. **Mol. Biol. Cell.**, v. 4, n. 9, p. 953-61, 1993.

MITRA, S.K.; HANSON, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 56-68, 2005.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 27, p. 107–132, 2011.

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

MULCAHY, L.A.; PINK, R.C.; CARTER, D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **J. Extracell. Vesicles.**, v. 3, 2014.

MUNAFO, D.B. & COLOMBO, M.I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. **J. Cell Sci.**, v. 114, n. 20, p. 3619-29, 2001.

MURAI, T. The role of lipid rafts in cancer cell adhesion and migration. **Int. J. Cell Biol.**, v. 763283, 2012.

NODA, T. & OHSUMI, Y. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 7, p. 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. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 2, p. 992-8, 2000.

PFEFFER, S.R. Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 3811–3816, 2009.

PINHEIRO JR, N.F.; HERMIDA, M.D.R.; MACEDO, M.P.; MENGEL, J.; BAFICA, A.; dos-SANTOS, W.L.C. Leishmania infection impairs β_1 -integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 3912-3921, 2006.

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. **Micro. Infect.**, v. 11, n. 2, p. 181-90, 2009.

RABINOWITZ, J.D. & WHITE, E. Autophagy and metabolismo. **Science**, v. 3, n. 330, p. 1344-8, 2010.

RAVIKUMAR, B.; MOREAU, K.; RUBINSZTEIN, D.C. Plasma membrane helps autophagosomes grow. **Autophagy**, v. 6, p. 1184-1186, 2010.

RAZI, M.; CHAN, E.Y.; TOOZE, S.A. Early endosomes and endosomal coatomer are required for autophagy. **J. Cell Biol.**, v. 185, p. 305-21, 2009.

RIDLEY, A.J.; SCHWARTZ, M.A.; BURRIDGE, K.; FIRTEL, R.A.; GINSBERG, M.H.; BORISY, G.; PARSONS, J.T.; HORWITZ, A.R. Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, p. 1704-9, 2003.

RINK, J.; GHIGO, E.; KALAIIDZIDIS, Y.; ZERIAL, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. **Cell**, v. 122, p. 735-749, 2005.

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**, v. 5, n. 1, p. 6-18, 2009.

RUBINSZTEIN, D.C.; CODOGNO, P.; LEVINE B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 11, n. 9, p. 709–30, 2012.

SAHU, R.; KAUSHIK, S.; CLEMENT, C.C.; CANNIZZO, E.S.; SCHARF, B.; FOLLENZI, A.; POTOLICCHIO, I.; NIEVES, E.; CUERVO, A.M.; SANTAMBROGIO, L. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. **Dev. Cell.**, v. 20, n. 1, p. 131-9, 2011.

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**, v. 450, n. 7173, p. 1253-7, 2007.

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. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. 5, p. 681-93, 1999.

SCHMID, D. & MÜNZ, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 11-21, 2007.

SCOTT, C.C.; VACCA, F.; GRUENBERG, J. Endosome maturation, transport and functions. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 31, p. 2-10, 2014.

SHEETZ, M.P.; FELSENFELD, D.; GALBRAITH, C.G.; CHOQUET, D. Cell migration as a five-step cycle. **Biochem. Soc. Symp.**, v. 65, p. 233–243, 1999.

SHEN, H.M. & CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**, v. 7, n. 5, p. 457-65, 2011.

SHIBUTANI, S.T. & YOSHIMORI, T. A current perspective of autophagosome biogenesis. **Cell Res.**, v. 24, n. 1, p. 58-68, 2014.

SHUI, W.; SHEU, L.; LIU, J.; SMART, B.; PETZOLD, C.J.; HSIHE, T.Y.; PITCHER, A.; KEASLING, J.D.; BERTOZZI, C.R. Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 105, p. 16952-16957, 2008.

SINGH, R.& CUERVO, A.M. Autophagy in the cellular energetic balance. **Cell Metab.**, v. 13, p. 495–504, 2011.

SPRINGER, T.A. & WANG, J.H. The threedimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. **Adv Prot. Chem.**, v. 68, p. 29-63, 2004.

STEINMAN, R.M.; MELLMAN, I.S.; MULLER, W.A.; COHN, Z.A. Endocytosis and the recyclingof plasma membrane. **J. Cell Biol.**, v. 96, p. 1–27, 1983.

ST-PIERRE, J. & OSTERGAARD, H.L. A role for the protein tyrosine phosphatase CD45 in macrophage adhesion through the regulation of paxillin degradation. **Plos One.** v. 8, n. 7, p. 71531, 2013.

STRØMHAUG, P.E. & SEGLEN, P.O. Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). **Biochem. J.**, v. 291, n. 1, p. 115-21, 1993.

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

SWANSON, J.A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 8, p. 639-49, 2008.

SWANSON, J.A. Phosphoinositides and engulfment. **Cell Microbiol.**, v. 16, n. 10, p. 1473-83, 2014.

SWANSON, J.A.; JOHNSON, M.T.; BENINGO, K.; POST, P.; MOOSEKER M.; ARAKI, N. A contractile activity that closes phagosomes in macrophages. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. 3, p. 307-16, 1999.

SWANSON, J.A. & WATTS, C. Macropinocytosis. **Trends Cell Biol.**, v. 5, p. 424–428, 1995.

TACHIBANA, K.; SATO, T.; D'AVIRRO, N.; MORIMOTO, C. Direct association of 125FAK with paxillin, the focal adhesion-targeting mechanism of 125FAK. **J. Exp. Med.**, v. 182, p. 1089–1099, 1995.

THOMAS, G. & HALL, M.N. TOR signalling and control of cell growth. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 6, p. 782-7, 1997.

TJELLE, T.E.; BRECH, A.; JUVET, L.K.; GRIFFITHS, G.; BERG, T. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. **J. Cell Sci.**, v. 109, n. 12, p. 2905–2914, 1996.

TOOZE, S.A. & RAZI, M. The essential role of early endosomes in autophagy is revealed by loss of COPI function. **Autophagy**, v. 5 p. 874-5, 2009.

TULOUP-MINGUEZ, V.; GREFFARD, A.; CODOGNO, P.; BOTTI, J. Regulation of autophagy by extracellular matrix glycoproteins in HeLa cells. **Autophagy**, v. 7, n. 1, p. 27-39, 2011.

TULOUP-MINGUEZ, V.; HAMAÏ, A.; GREFFARD, A.; NICOLAS, V.; CODOGNO, P.; BOTTI, J. Autophagy modulates cell migration and β 1 integrin membrane recycling. **Cell Cycle**, v. 12, n. 20, p. 3317-28, 2013.

TURNER, C.E.; GLENNEY, J.R.; BURRIDGE, K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. **J. Cell Biol.**, v. 111, p. 1059–1068, 1990.

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

VAN SLUIJTERS, D.A.; DUBBELHUIS, P.F.; BLOMMAART, E.F.; MEIJER, A.J. Amino-acid-dependent signal transduction. **Biochem. J.**, v. 351, n. 3, p. 545-50, 2000.

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. **J. Cell Biol.**, v. 155, n. 1, p. 19-25, 2001.

WILLINGHAM, M.C. & PASTAN, I. Endocytosis and exocytosis: current concepts of vesicle traffic in animal cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 92, p. 51-92, 1984.

WOLFENSON, H.; LAVELIN, I.; GEIGER, B. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. **Dev. Cell.**, v. 24, n. 5, p. 447-58, 2013.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 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**, v. 27, n. 1, p.135-44, 2007.

YANG, Z. & KLIONSKY, D.J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 22, n. 2, p. 124-31, 2010.

ZANG, L.; XU, Q.; YE, Y.; LI, X.; LIU, Y. S. Tashiro, S. Onodera, T. Ikejima, Autophagy enhanced phagocytosis of apoptotic cells by oridonin-treated human histocytic lymphoma U937 cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 518, p. 31-41, 2012.