

UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA EM
ISOLADOS DE *Leishmania amazonensis* OBTIDOS DE
PACIENTES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA NA
MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGO**

Jaqueline França Costa

Salvador – Bahia – Brasil
2009



004475



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**PAPEL DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA EM
ISOLADOS DE *Leishmania amazonensis* OBTIDOS DE
PACIENTES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA NA
MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS**

Jaqueline França Costa

Orientador: Valéria de Matos Borges

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia - Brasil
2009



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

Costa, Jaqueline França
C837p Papel da exposição de fosfatidilserina em isolados de *Leishmania amazonensis* obtidos de pacientes de leishmaniose cutânea difusa na modulação da infecção de macrófagos [manuscrito] / Jaqueline França Costa. - 2009.
81 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Patologia Humana, 2009.
Orientadora: Profª. Drª. Valéria de Matos Borges.

1. Leishmaniose cutânea difusa 2. Leishmaniose amazonensis 3. Mimetismo apoptótico. 4. Fosfatidilserina I.Título.

CDU 616.928.5:591.155

PHH
UTI 3000
C 1-4

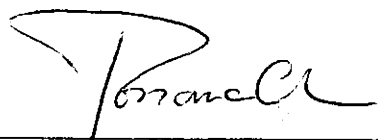
1.1.1.1
C 1-4

"PAPEL DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATILSERINA EM ISOLADOS DE *Leishmania amazonensis* OBTIDOS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA NA MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS"

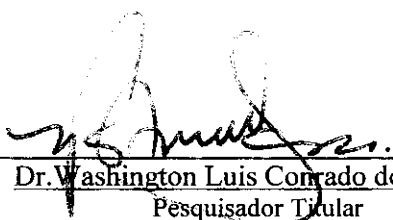
JAQUELINE FRANÇA COSTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

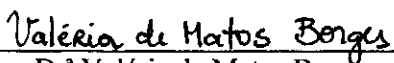
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Rossana Correa Netto de Melo
Professora Colaboradora
UFJF



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Dr^a Valéria de Matos Borges
Tecnologista Nível III
CPqGM/FIOCRUZ

À Norma e Cordeiro,
que em nenhum momento mediram esforços para
realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos
caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores
escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito
são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo
que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei,
sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por
chamá-los de pai e mãe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu refúgio e força, onde sempre encontrei respostas para os meus problemas.

À Dra Valéria Borges, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos, pelas críticas construtivas, pelo incentivo e paciência para com as minhas dificuldades e principalmente pelo exemplo de amor, simplicidade, humildade e respeito para com o próximo.

À Dra Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto pelas sugestões dadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Jackson Costa, pelo acompanhamento dos pacientes com Leishmaniose cutânea difusa e pela colaboração com os dados clínicos dos pacientes.

Ao grupo PS, Dr. Marcello Barcinski, Jéssica, Poliana e especialmente João Luiz pela colaboração e apoio inestimáveis para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de equipe: Deboraci, Théo, e Nívea pelos momentos de aprendizagem constante e pela amizade solidificada ao longo deste trabalho, que certamente se eternizará.

As minhas tias, Dalva e Nilzete, pela amizade, incentivo e apoio em todos os momentos de minha vida.

À família Petersen, Antonio, Carol e Dora por terem me acolhido durante a fase mais difícil dessa caminhada.

Aos meus amigos, Brenna, Nivaldo e Denise por terem sido muitas vezes o motivo dos risos e o consolo do choro.

Aos colegas LIMI-LIP, em especial pela alegria e descontração que tornaram o ambiente de trabalho mais prazeroso.

Aos colegas do Curso de Mestrado em Patologia Experimental, pela cooperação mútua e amizade.

Aos professores da pós-graduação em patologia pela dedicação e empenho que demonstraram no decorrer de suas atividades para com o grupo.

Às secretárias do LIMI-LIP: Elze e Andrezza, pelo apoio administrativo, pela simpatia e amizade.

Aos Técnicos do laboratório, Jorge Tolentino e Natali pelo suporte no laboratório, sem o qual a parte experimental não funcionaria.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM)/FIOCRUZ-BA, onde este trabalho foi realizado, pela disponibilização de recursos e infra-estrutura.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

À todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que conseguisse chegar até aqui e finalizar mais uma etapa de minha vida.

*Existe somente uma idade para a gente ser feliz,
somente uma época na vida de cada pessoa em que
é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para
realizá-las a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.
Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver
apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade
sem medo, nem culpa de sentir prazer. Fase dourada em que
a gente pode criar e recriar a vida, a nossa própria imagem
e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar
todos os sabores e entregar-se a todos os amores sem preconceito
nem pudor. Tempo de entusiasmo e coragem em que todo o desafio
é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição
de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso.
Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE
e tem a duração do instante que passa.*

Autor desconhecido

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE GRÁFICOS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. RESUMO	13
2. ABSTRACT	14
3. INTRODUÇÃO	15
3.1 Características gerais e ciclo da Leishmania	15
3.2 Dados epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana	17
3.3 Leishmaniose Cutânea Difusa	19
3.4 Modelos de susceptibilidade e resistência à Leishmaniose	21
3.5 Resposta intramacrofágica à infecção por Leishmania	24
3.6 Apoptose e parasitismo.....	28
3.6.1 Fenótipo apoptótico	28
3.6.2 Perda da assimetria de membrana durante a apoptose	29
3.6.3 Reconhecimento de Fosfatidilserina.....	30
3.6.4 Conseqüências do reconhecimento de células apoptóticas.....	32
3.6.5 Mimetismo Apoptótico.....	33
4. JUSTIFICATIVA	36
5. HIPÓTESE	37
6. OBJETIVOS	37
Geral	37
Específicos.....	37
7. DESENHO EXPERIMENTAL	38
7. MATERIAL E MÉTODOS	39
7.1 Animais.....	39
7.2 Parasitas.....	39
7.3 Sincronização das culturas de promastigotas de Leishmania.....	40

7.4 Obtenção de macrófagos peritoneais.....	40
7.5 Infecção de macrófagos.....	40
7.6 Purificação de amastigotas intracelulares.....	41
7.7 Avaliação da exposição de PS.....	42
7.8 Determinação do índice de infectividade	42
7.9 Quantificação da síntese de TGF- β_1	43
7.10 Quantificação da produção de óxido nítrico.....	43
7.11 Microscopia de luz	44
7.12 Análise estatística	44
8. RESULTADOS.....	45
8.1 Descrição clínico – patológica.....	45
8.2 Identificação dos isolados de <i>Leishmania amazonensis</i>	48
8.3 Exposição de PS em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> isolados de casos de LCD e LCL.....	49
8.4 Exposição de PS em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> isolados de casos de LCD e LCL.....	51
8.5 Caracterização da infecção de macrófagos <i>in vitro</i> com <i>L. amazonensis</i> isolados de casos de LCD e LCL	52
8.6 Avaliação da produção de TGF- β_1 e óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> isolados de casos de LCD e LCL.....	57
9. DISCUSSÃO.....	59
10. CONCLUSÃO	70
11. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	71
12. ANEXOS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasita	16
Figura 2. Principais espécies de <i>Leishmania</i> e aspectos imunológicos observados na LTA18	
Figura 3. Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea difusa no Brasil.....	19
Figura 4. Mimetismo apoptótico em amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	34
Figura 5. Fotomicrografia de macrófagos de camundongos F1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cinética de exposição de PS em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50
Gráfico 2. Cinética de exposição de PS em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
Gráfico 3. Porcentagem de macrófagos de camundongos F1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	53
Gráfico 4. Índice de infectividade em macrófagos de camundongos F1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	54
Gráfico 5. A Relação entre a porcentagem de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e exposição de PS.....	55
Gráfico 5. B Relação entre o índice de infectividade e exposição de PS.....	55
Gráfico 6. Produção de TGF- β_1 por macrófagos de camundongos F1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	57
Gráfico 7. Produção de NO por macrófagos de camundongos F1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Pacientes com LCD dos quais foram isolados as cepas de <i>Leishmania amazonensis</i> utilizados nesse estudo.....	46
Tabela II. Pacientes com LCL dos quais foram isolados as cepas de <i>Leishmania amazonensis</i> utilizados nesse estudo.....	47
Tabela III. Isolados de <i>Leishmania amazonensis</i> utilizados nesse estudo	49

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
Δ MFI	Diferença entre as médias geométricas de intensidade de fluorescência
Fc γ R	Receptor da porção constante de anticorpos IgG
FITC	Fluoresceína
IFN- γ	Interferon gama
IDRM	Reação Intradérmica de Montenegro
IL	Interleucina
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolissacarídeo
LPG	Lipofosfoglicano
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MCP	Morte Celular Programada
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP	Macrophage Inflammatory protein
NO	Óxido Nítrico
Nramp	Natural resistance-associated Macrophage protein
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PGE	Prostaglandina E
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Iodeto de propídio
PS	Fosfatidilserina
PSpos	Promastigotas que apresentam PS em sua superfície
PSneg	Promastigotas que não apresentam PS em sua superfície
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Esfingomiélin
TGF- β	Fator de crescimento
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
VP	Vacúolo parasitóforo

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
Δ MFI	Diferença entre as médias geométricas de intensidade de fluorescência
Fc γ R	Receptor da porção constante de anticorpos IgG
FITC	Fluoresceína
IFN- γ	Interferon gama
IDRM	Reação Intradérmica de Montenegro
IL	Interleucina
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolissacarídeo
LPG	Lipofosfoglicano
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MCP	Morte Celular Programada
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MIP	Macrophage Inflammatory protein
NO	Óxido Nítrico
Nramp	Natural resistance-associated Macrophage protein
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PGE	Prostaglandina E
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PI	Iodeto de propídio
PS	Fosfatidilserina
PSpos	Promastigotas que apresentam PS em sua superfície
PSneg	Promastigotas que não apresentam PS em sua superfície
SFB	Soro Fetal Bovino
SM	Esfingomielina
TGF- β	Fator de crescimento
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
VP	Vacúolo parasitóforo

RESUMO

PAPEL DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA EM ISOLADOS DE *Leishmania amazonensis* OBTIDOS DE PACIENTES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA NA MODULAÇÃO DA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS. A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é uma manifestação clínica rara das Leishmanioses, caracterizada pela presença de inúmeros macrófagos intensamente parasitados e baixa reação inflamatória. No Brasil, a espécie envolvida em casos de LCD é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Tem sido descrito na literatura a exposição e o reconhecimento de fosfatidilserina (PS) na superfície de células apoptóticas fagocitadas por macrófagos como mecanismo de desativação de macrófagos por uma via dependente de TGF- β_1 e PGE $_2$ (Fadok *et al.* 1998). Foi demonstrado por Barcinski e colaboradores que formas amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS em sua superfície, em um mecanismo chamado “Mimetismo Apoptótico”. Nesse contexto, nosso objetivo foi investigar a exposição de PS na superfície de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD e seu papel durante a infecção de macrófagos. Inicialmente, macrófagos peritoneais de camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) estimulados com tioglicolato foram infectados com os diferentes isolados obtidos de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e LCD. A exposição de PS na superfície das amastigotas purificadas de macrófagos F1 foi determinada por citometria de fluxo. Os isolados obtidos de pacientes com LCD apresentaram maior expressão de PS do que os isolados de pacientes com LCL após 24 horas de infecção. Em seguida, avaliamos se a diferença observada na exposição de PS em amastigotas estaria relacionada à infectividade dos diferentes isolados. Os resultados indicaram que as amastigotas de pacientes com LCD apresentaram maior porcentagem de macrófagos infectados e índice de infecção, quando comparados com amastigotas de pacientes com LCL. Quanto ao mecanismo, o grupo infectado com os isolados de pacientes com LCD não apresentou diferença em relação ao grupo LCL quanto a produção de TGF- β_1 e óxido nítrico, sugerindo que outros mecanismos imunorregulatórios estejam envolvidos. Os resultados em conjunto, sugerem que o aumento na exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com a forma difusa pode representar um mecanismo de adaptação importante para a sobrevivência e estabelecimento da infecção. A elucidação de mecanismos supressores da LCD induzidos por isolados de *L. amazonensis* poderá ampliar o conhecimento sobre a imunorregulação dessa patologia.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose cutânea difusa; 2. *L. amazonensis*; 3. Mimetismo apoptótico; 4. Fosfatidilserina.

ABSTRACT

ROLE OF PHOSPHATIDYLSERINE EXPOSURE IN *Leishmania amazonensis* ISOLATES OBTAINED FROM DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS PATIENTS IN MODULATION OF MACROPHAGE INFECTION. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (LCD) is a rare clinical manifestation of Leishmaniasis, characterized by a number of macrophages heavily parasitized and low inflammatory reaction. In Brazil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* is the main specie involved in LCD cases. It has been described that the exposure and recognition of phosphatidylserine (PS) on the surface of apoptotic cells phagocytosed by macrophages is a macrophage deactivation mechanism dependent on TGF- β_1 and PGE $_2$ (Fadok *et al.* 1998). Moreover, it was demonstrated by Barcinski and colleagues that *L. amazonensis* amastigotes expose PS on its surface, in a mechanism called "Apoptotic Mimicry." In this context, our goal was to investigate the exposure of PS on the surface of *L. amazonensis* isolates obtained from LCD patients and its role during the infection of macrophages. Initially, peritoneal macrophages from F1 mice (BALB/c x C57BL/6) stimulated with thioglycolate were infected with different *L. amazonensis* strains isolated from patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) or LCD. The exposure of PS on the surface of amastigotes was determined by flow cytometry using staining to annexin V and propidium iodide. Isolates from LCD patients showed higher PS exposure than the isolates from LCL patients 24 hours after infection. Then, we evaluated whether the differences of PS exposure in amastigotes would correlate with the infectivity of different isolates. Percentage of infected macrophages and infection index were higher in cultures using amastigotes from LCD patients compared to the ones infected with amastigotes from LCL cases. Furthermore, cultures infected with LCD isolates showed no difference to the LCL isolates regarding TGF- β_1 and nitric oxide production, suggesting that other immunoregulatory mechanisms are involved in this process. These results suggest that the increased exposure of PS in *L. amazonensis* isolates from patients with diffuse form may represent an important mechanism for the establishment of infection. The elucidation of the LCD suppressing mechanisms induced by *L. amazonensis* strains may expand the knowledge about the immune regulation of this disease.

Keywords: 1. Diffuse cutaneous leishmaniasis; 2. *Leishmania amazonensis*; 3. Apoptotic mimicry; 4. Phosphatidylserine.

3 INTRODUÇÃO

3.1 Características Gerais e Ciclo da *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastidae e a família Trypanosomatidae. Estes protozoários caracterizam-se pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, formada de minicírculos e maxicírculos de ácido desoxirribonucléico (DNA) altamente compactado dentro da mitocôndria única da célula (Stuart, 1983).

Existem aproximadamente 21 espécies de Leishmanias agrupadas em dois grandes subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson *et al.*, 1987). As espécies também podem ser classificadas de acordo com a distribuição geográfica das áreas endêmicas como espécies do Velho Mundo (Europa e Ásia) e do Novo Mundo (Américas). Com relação aos vetores, o gênero *Lutzomyia* está associado à transmissão de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, enquanto que o gênero *Phlebotomos*, transmite espécies do Velho Mundo (Lainson *et al.*, 1987).

Durante o seu ciclo de vida, o parasita apresenta duas formas evolutivas: promastigotas, presentes em insetos vetores e amastigotas intracelulares, encontradas em hospedeiros vertebrados (Figura 1). As formas promastigotas são transmitidas por fêmeas de insetos hematófagos da subfamília Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), denominados genericamente de flebotomos. A infecção do inseto ocorre no momento da alimentação, quando ele suga o sangue contendo amastigotas ou macrófagos infectados. No trato digestivo do vetor, ocorre rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se na forma promastigota. Estas formas são afiladas, apresentam flagelo externalizados e são capazes de se multiplicar no intestino.

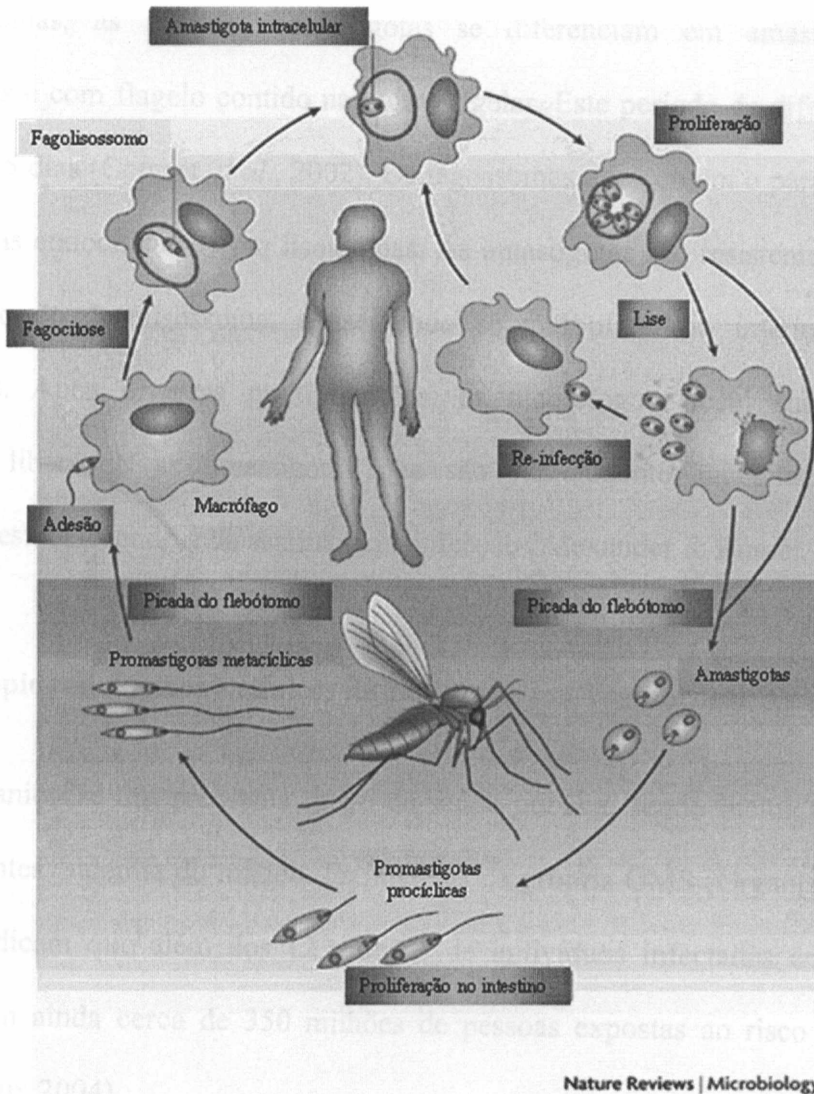


Figura 1. Ciclo de vida do parasita. (Modificado de Chappuis *et al.*, 2007).

Após a digestão do sangue, as promastigotas migram para a região anterior do intestino e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclogênese (Sacks & Perkins, 1984). Durante a metaciclogênese, as promastigotas apresentam redução de tamanho do corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infectivas, passando a ser denominadas de metacíclicas. As formas metacíclicas migram para a probóscide e são transferidas ao hospedeiro vertebrado no momento da picada, durante um novo repasto sanguíneo do inseto. No local da picada, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear presentes na derme. No interior

dos fagossomas, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, células arredondadas e com flagelo contido na bolsa flagelar. Este período de diferenciação pode levar de 2 a 5 dias (Courret *et al.*, 2002). Os fagossomas que contêm o parasita fundem-se com vesículas endocíticas e com lisossomas. As amastigotas são resistentes às enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma, conseguindo se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos. Após diversas multiplicações, os macrófagos ficam superinfectados e rompem-se, liberando as amastigotas que são rapidamente fagocitadas por novos macrófagos, estabelecendo e disseminando a infecção (Alexander & Russel, 1992).

3.2 Dados epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose é um problema grave de saúde pública, sendo incluída entre as seis mais importantes endemia do mundo. Estimativas da própria OMS (Organização Mundial de Saúde) indicam que além dos 12 milhões de indivíduos infectados em mais de 80 países, existem ainda cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (Desjeux 2004).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. Em 2004, foram registrados 28.569 casos, distribuídos em 1.926 municípios brasileiros (Manual de Vigilância Tegumentar Americana, Ministério da Saúde, 2007). A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas (Barral-Netto *et al.*, 1986). No meio do espectro, a leishmaniose cutânea localizada (LCL) representa a manifestação clínica mais freqüente. Nela, as lesões são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização. Os cortes histológicos revelam uma reação inflamatória tecidual do tipo crônico granulomatoso com ausência ou escassez de parasitas. No pólo hiperérgico, a leishmaniose cutânea mucosa (LCM), caracteriza-se por escassez de parasitos na lesão e reação imune exacerbada com intensa destruição tecidual.

E por último, o pólo anérgico conhecido como leishmaniose cutânea difusa (LCD), com presença de inúmeros macrófagos vacuolizados intensamente parasitados (Convit *et al.*, 1972). As principais espécies, suas associações com a doença em humanos e as manifestações clínicas apresentam-se demonstradas na figura 2.

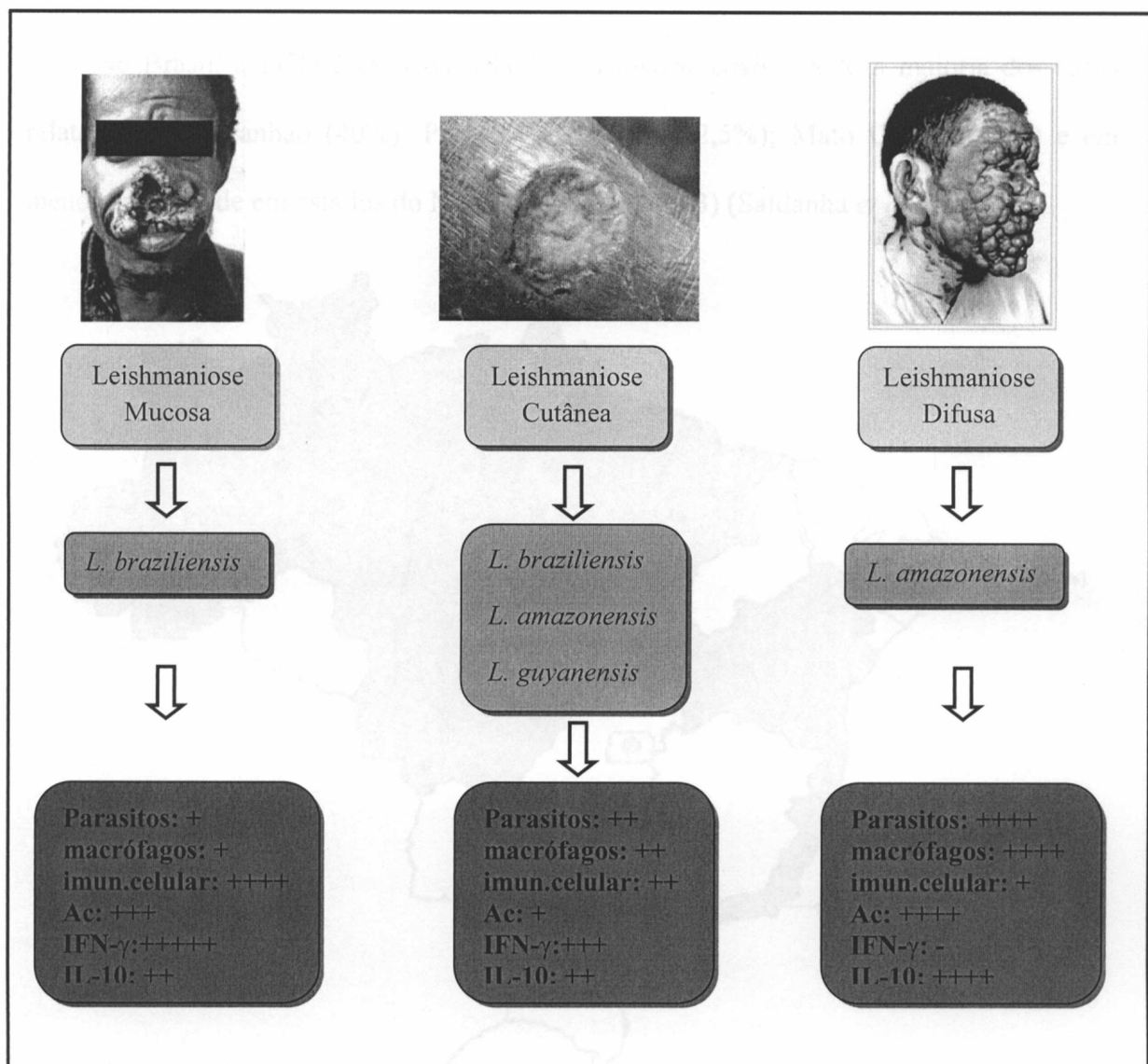


Figura 2. Principais espécies de *Leishmania* e aspectos imunológicos observados na LTA. Ac: Anticorpos; IFN- γ : Interferon gama; IL-10: Interleucina 10; - ausência; + Presença; + leve; ++moderada; +++ intensa; ++++ muito intensa. (Fonte: Manual de Vigilância Tegumentar Americana, Ministério da Saúde, 2007).

Dentro da LTA, as formas clínicas de LCM e LCD são afecções dermatológicas que merecem mais atenção devido à sua capacidade de produzir deformidades. O risco de

ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano e o envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, fazem com que muitos casos sejam considerados como uma doença com características estigmatizantes. (Manual de Vigilância Tegumentar Americana, Ministério da Saúde, 2007).

3.3 Leishmaniose cutânea difusa

No Brasil, a LCD é causada pela *L. (L.) amazonensis*, sendo a maioria dos casos relatados no Maranhão (40%); Pará (20%); Bahia (12,5%); Mato Grosso (10%) e em menor intensidade em estados do Norte do país (Figura 3) (Saldanha *et al.*, 2007).

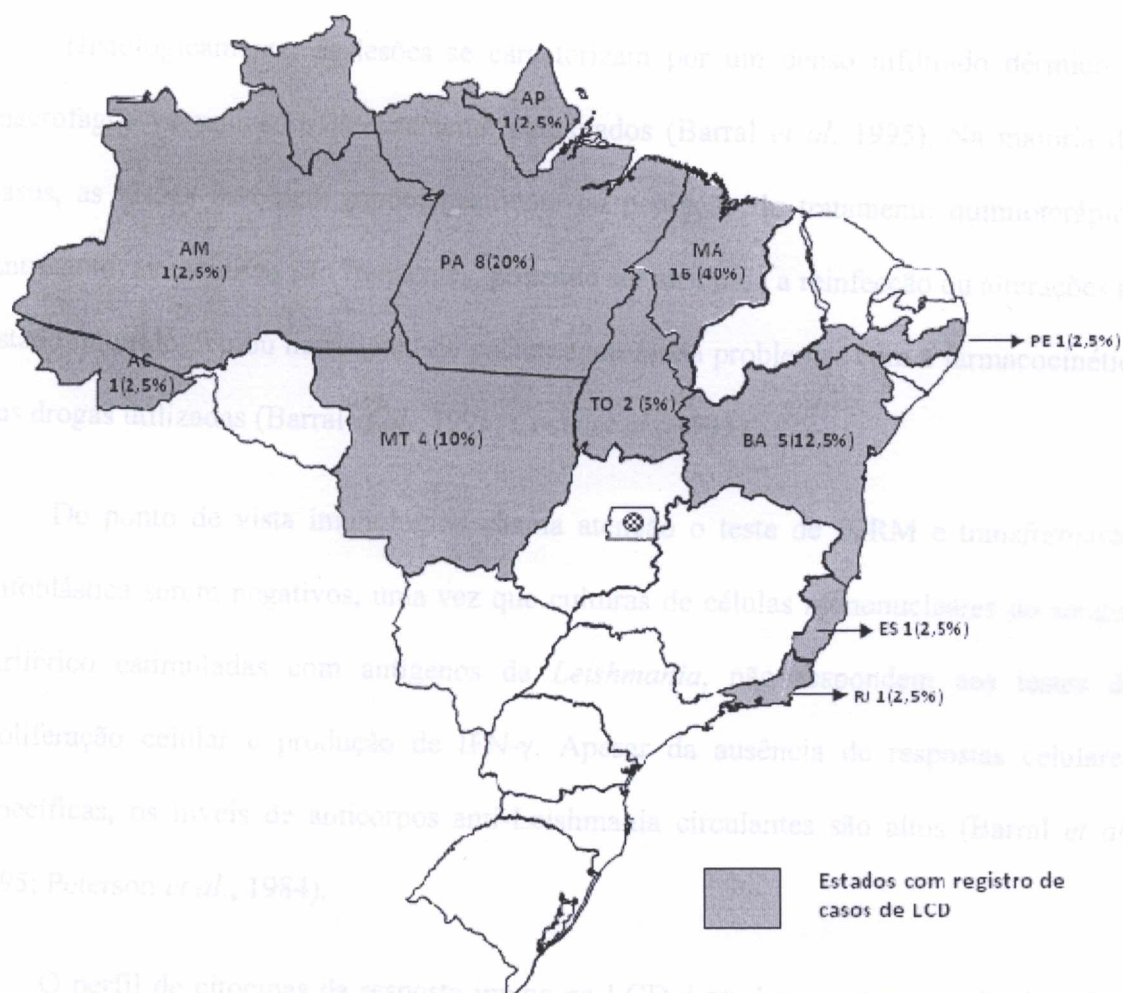


Figura 3. Distribuição geográfica da Leishmaniose cutânea difusa no Brasil. Fonte: Costa *et al.*, 2005.

Constitui uma forma clínica rara, porém grave, caracterizando-se por maciço comprometimento dérmico, de natureza crônica, com recidivas freqüentes e anergia ao teste intradérmico de Montenegro (IDRM) (Convit *et al.*, 1972). A maioria dos casos origina-se de infecção adquirida na infância, apresentando inicialmente lesões únicas e má resposta ao tratamento (Saldanha *et al.*, 2007). As lesões observadas na LCD evoluem de forma lenta com formação de pápulas, nódulos ou infiltrações difusas, de distribuição simétrica na face, no tronco e nos membros, podendo disseminar-se para todo o corpo por via hematogênica após meses ou anos da infecção (Fonseca *et al.*, 1981).

Histologicamente, as lesões se caracterizam por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolizados intensamente parasitados (Barral *et al.* 1995). Na maioria dos casos, as lesões envolvem espontaneamente ou por ação do tratamento quimioterápico. Entretanto, as recidivas são freqüentes, podendo ser atribuída a reinfecção ou alterações no estado imunológico ou nutricional do paciente, ou ainda problemas com a farmacocinética das drogas utilizadas (Barral *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1995).

Do ponto de vista imunológico chama atenção o teste de IDRM e transformação linfoblástica serem negativos, uma vez que culturas de células mononucleares do sangue periférico estimuladas com antígenos de *Leishmania*, não respondem aos testes de proliferação celular e produção de IFN- γ . Apesar da ausência de respostas celulares específicas, os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes são altos (Barral *et al.* 1995; Peterson *et al.*, 1984).

O perfil de citocinas da resposta imune na LCD é predominantemente do tipo Th2, com baixa produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12 e níveis elevados de IL-4 e IL-10. Entretanto, o perfil de citocinas pode variar de acordo como os diferentes estágios da doença. Células do PBMC de pacientes com lesões em atividade apresentaram altos níveis de expressão de mRNA para IL-2, IL-10 e IL-4, enquanto que não foram detectados

expressão de mRNA para IFN- γ . Em contraste, alta expressão de IFN- γ e uma redução de IL-10 foram observadas em pacientes com cura transitória pós-tratamento (Bonfim *et al.*, 1996). Nos casos em que houve recidiva da lesão, houve redução na expressão de IFN- γ com ausência de IL-10. Alta concentração de IL-10 foi encontrada no sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com LCD estimulados com antígeno de *Leishmania*. Estes dados demonstraram que uma das principais deficiências imunológica em LCD está na inabilidade em produzir IFN- γ e que IL-10 tem um importante papel na modulação negativa na resposta de pacientes com LCD (Bonfim *et al.*, 1996).

3.4 Modelos de Suscetibilidade e Resistência à Leishmaniose

Diversos modelos murinos têm sido utilizados para estudar as características clínicas, imunológicas e bioquímicas da Leishmaniose. O modelo murino mais estudado de resistência ou susceptibilidade a *Leishmania* é o da infecção com a espécie *Leishmania major*. Neste modelo, a dominância de uma resposta de células T CD4+ com fenótipo Th1 geralmente resulta na cura da lesão e eliminação do parasita, contrastando com a resposta Th2, que se correlaciona com a susceptibilidade à doença (Heinzel *et al.*, 1989, Sacks & Noben-Trauth, 2002). Muitas linhagens de camundongos (C57BL/6, C3H, CBA) desenvolvem lesões autolimitantes com *L. major*, sendo a resolução da infecção mediada pelas células Th1, com a produção de IFN- γ . Em contraste, a linhagem de camundongo BALB/c desenvolve uma resposta do tipo Th2, sendo susceptível à infecção com *L. major* (Gumy *et al.* 2004)

Diferente do que ocorre nos modelos de resistência e susceptibilidade em infecções com *L. major*, a maioria das linhagens de camundongos é susceptível à infecção com *L. amazonensis*. No entanto, essa susceptibilidade não está relacionada a um perfil de resposta Th2 bem estabelecido. Por exemplo, camundongos BALB/c são muito susceptíveis à

infecção com *L. amazonensis* e apresentam uma produção importante de IL-4 no decorrer da infecção. No entanto, a quantidade de IL-4 produzida é insuficiente para polarizar a resposta imune para um perfil Th2 e reduzir a síntese de citocinas como IFN- γ e TNF- α que são produzidas constantemente, caracterizando uma resposta mista entre o perfil Th1 e Th2 (Ji *et al.*, 2002).

O que os modelos murinos de susceptibilidade à infecção com *L. amazonensis* sugerem é que a interação entre o hospedeiro e o parasita resulta em ineficiência de polarização para um perfil Th1. Camundongos C57BL/6 quando infectados com *L. amazonensis*, desenvolvem lesões que, embora diminuam de tamanho no decorrer das semanas, raramente curam, tornando-se persistentes como uma infecção crônica. Em estudo comparativo de infecção com *L. major* e *L. amazonensis* nestes camundongos, Ji e colaboradores (2003) demonstraram que a susceptibilidade à *L. amazonensis* está relacionada à redução da produção de mediadores pró-inflamatórios, bem como de seus receptores, nas primeiras semanas após a infecção. Estas alterações, juntamente com a presença de baixos níveis de citocinas do tipo Th2, previnem o desenvolvimento de células Th1 específicas para o parasita. A susceptibilidade de camundongos C57BL/6 à infecção com *L. amazonensis* está relacionada à baixa produção de IFN- γ no decorrer da infecção e produção de IL-4 apenas nos momentos iniciais, revelando que também nestes animais a susceptibilidade está mais associada à ausência de resposta Th1 do que a presença de uma resposta Th2 bem estabelecida (Afonso & Scott, 1993).

A citocina IL-10 parece estar relacionada com inibição da resposta inflamatória no modelo de susceptibilidade à infecção com *L. amazonensis*. Camundongos C57BL/6 com deleção do gene que codifica para esta citocina (IL-10^{-/-}) apresentam até 10x menos parasitas nas lesões quando comparadas às de camundongos C57BL/6 selvagens (Jones *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2003). A ausência de IL-10 nesta linhagem de camundongo induz a produção de citocinas e quimiocinas antiinflamatórias nos linfonodos drenantes e nas patas

infectadas (Ji *et al.*, 2003). Além disso, a ausência de IL-10 também induz o aumento da atividade de iNOS na lesão, resultando em necrose do tecido infectado (Jones *et al.*, 2002).

A citocina TGF- β parece contribuir para inibição da resposta inflamatória durante a infecção com *L. amazonensis* e a produção desta citocina é aumentada em modelos de infecção de macrófagos *in vitro* e em lesões em camundongos BALB/c (Barral-Netto *et al.*, 1992). O tratamento de camundongos BALB/c com anti-TGF- β pela *L. amazonensis* impede o aparecimento de grandes lesões e aumenta os níveis de mRNA para IFN- γ nas células do linfonodo drenante da lesão. Desta forma, a indução da produção de TGF- β pela *L. amazonensis* pode estar envolvida com controle da resposta imune, mantendo níveis baixo de IFN- γ e favorecendo o estabelecimento da infecção (Barral-Netto *et al.*, 1992).

Camundongos de linhagens resistentes à *L. major* apresentam, comparativamente, produção mais baixa de IFN- γ , quando infectados com *L. amazonensis* (Afonso & Scott, 1993; Jones *et al.*, 2000). A falta da polarização para Th2 em modelo de susceptibilidade de camundongo BALB/c à *L. amazonensis* mostrou que concomitante à produção de IL-4, ocorre uma produção baixa e contínua de IFN- γ no decorrer de toda a infecção (Ji *et al.*, 2002). Diferente da alta produção de IFN- γ responsável pela polarização da resposta para Th1 e cura da lesão em infecções com *L. major*, a presença de concentrações baixas desta citocina durante a infecção com *L. amazonensis* pode favorecer a sobrevivência do parasita. Comparativamente com outras espécies, *L. amazonensis* apresenta maior resistência à ativação do macrófago (Scott & Sher, 1986). Qi e colaboradores (2004) demonstraram que concentrações de até 100ng/ml de IFN- γ adicionados em culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* induzem maior proliferação das amastigotas intracelulares, sugerindo que esta espécie pode ter evoluído mecanismos de subverter a ativação macrofágica e as resposta imune do hospedeiro.

3.5 Resposta intramacrofágica à infecção por *Leishmania*

Macrófagos são as células hospedeiras preferenciais para a infecção e proliferação de parasitas do gênero *Leishmania*. Tanto o controle quanto o estabelecimento dos parasitas é determinado pelo grau de ativação dos macrófagos do hospedeiro, que por sua vez é dependente de interações com células do sistema imune.

As vias de ativação macrofágica estão centradas no metabolismo do aminoácido L-arginina. Os macrófagos apresentam duas vias metabólicas que competem por este aminoácido. A via de ativação clássica é caracterizada pelo processamento da L-arginina pela enzima Óxido Nítrico Sintase induzida (iNOS). Esta via é ativada por citocinas características de resposta imune do tipo Th1, como o IFN- γ e o TNF- α . O aumento da síntese da enzima iNOS induz maior produção de NO ativando os mecanismos microbicidas. Por outro lado, a via alternativa envolve o processamento da L-arginina pela enzima Arginase 1. Esta via é ativada por citocinas características de resposta imune do tipo Th2 como IL-4, IL-10 ou prostaglandinas E₂ (PGE₂) (Modolell *et al.*, 1995; Mori & Gotoh, 2000). A atividade da arginase 1 leva a produção de ornitina, um importante precursor da via de poliaminas, que são compostos que favorecem a proliferação de parasitas intracelulares (Vicendeau *et al.*, 2003).

A importância da ativação da enzima arginase 1 para a sobrevivência de várias espécies de *Leishmania* foi demonstrada em modelos *in vitro*. Formas amastigotas de *L. major* e *L. infantum* proliferam mais em macrófagos incubados com citocinas do tipo Th2, IL-4, IL-10 e TGF- β , que induzem aumento da atividade da arginase 1 (Iniesta *et al.*, 2001).

A sobrevivência e a proliferação da *Leishmania* dentro do macrófago também são dependentes da captação de ferro no vacúolo parasitóforo. O ferro na forma Fe²⁺ é um íon divalente essencial como co-fator para a atividade de diversas enzimas. Os macrófagos internalizam o ferro por endocitose, na forma de Fe³⁺ acoplado a glicoproteína transferrina.

A partir da acidificação do endossoma o Fe^{3+} é liberado da transferrina e convertido em Fe^{2+} por redutases endossomais. Os macrófagos previnem o acúmulo de Fe^{2+} nos endossomas através da atividade de bombas para o efluxo de íons divalentes chamadas Nramp (*Natural Resistance-associated Macrophage protein*). Camundongos com deleção para o gene que codifica o transportador Nramp 1 são mais susceptíveis a infecção com *Mycobacterium bovis* (BCG), *Salmonella typhimurium* e *Leishmania donovani*, sugerindo a importância da disponibilidade de Fe^{2+} no interior do vacúolo para a sobrevivência e proliferação destes parasitas (Vidal *et al.*, 1995).

Formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* possuem um transportador de Fe^{2+} na membrana plasmática, denominado LIT1, que apresenta características semelhantes aos transportadores de ferro da família ZIP, descritos em *Arabidopsis thaliana* (Huynh *et al.*, 2006). Dentro do vacúolo, as amastigotas têm que competir pelo Fe^{2+} livre antes que ele seja bombeado para o citoplasma do macrófago pelo Nramp. *L. amazonensis* com deleção do gene que codifica para o transportador LIT1 não prolifera em macrófagos e não é capaz de desenvolver lesão em camundongos susceptíveis BALB/c. A expressão de LIT1 em amastigotas intracelulares sugere um mecanismo de adaptação da *Leishmania* para a sobrevivência em um ambiente onde a concentração de Fe^{2+} disponível é limitada (Huynh *et al.*, 2006).

O sucesso da infecção com *Leishmania* não depende apenas da interação entre o parasita e a célula hospedeira. Macrófagos infectados são potenciais candidatos a apresentarem antígenos do parasita para linfócitos T. Desta forma, peptídeos do parasita associados à molécula de MHC de classe II expostas na superfície dos macrófagos podem ativar células T CD4^+ específicas para *Leishmania*, potencializando a resposta imune. Diversos trabalhos têm demonstrado que a infecção com *Leishmania* interfere negativamente na apresentação de antígenos pelos macrófagos. Em infecção com *L. major* e *L. amazonensis* os macrófagos têm a capacidade de apresentação diminuída tanto para

antígenos do parasita como para outros antígenos (Fruth *et al.*, 1993, Prina *et al.*, 1993). Trabalhos do grupo de Jean-Claude Antoine demonstraram que moléculas de MHC de classe II são retidas no vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* e *L. donovani* (Lang *et al.*, 1994a, Lang *et al.*, 1994b). Utilizando inibidores de proteases este grupo conseguiu observar que as formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizam as moléculas de MHC-II do macrófago, degradando-as em organelas equivalentes aos lisossomos, denominadas megassomas (De Souza Leão *et al.*, 1995).

Após serem fagocitadas, os parasitos do gênero *Leishmania* se localizam em fagossomas denominados vacúolos parasitóforos (VPs). Os VPs amadurecem fusionando com vesículas da via endocítica, endossomas tardios e/ou lisossomas. A morfologia e a maturação de compartimentos contendo o parasito variam dependendo da espécie de *Leishmania*. Amastigotas de espécies do Velho Mundo, como *L. donovani* e *L. major*, sobrevivem em um vacúolo caracterizado como “justo” que apresenta vários pontos de contato com a membrana do parasita e em geral poucos amastigota em seu interior (Castro *et al.*, 2006). No entanto espécies do Novo Mundo, como *L. amazonensis* e *L. mexicana* induzem a formação de vacúolos parasitóforos com um lúmen grande, descritos como “largos”, que podem apresentar várias amastigotas, aderidas à membrana preferencialmente pela região posterior (Benchimol & De Souza, 1981). Isto pode ser resultado de processos distintos que controlam a fusão e fissão de endossomas e organelas aos vacúolos ou diferenças nas interações entre as espécies e a célula hospedeira (Antoine *et al.*, 1998).

Em consequência da morfologia peculiar que os vacúolos das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo apresentam, há diversos trabalhos na literatura caracterizando a composição e a dinâmica de formação destas estruturas. Vacúolos de *L. amazonensis* são altamente fusogênicos com lisossomos, podendo depletar estas organelas do citoplasma da célula infectada nas primeiras horas após a infecção (Barbieri *et al.*, 1985; Antoine *et al.*,

1990). Devido a esta dinâmica, os vacúolos apresentam pH entre 4,74 e 5,26 (Antoine *et al.*, 1990) e diversas proteases lisossomais como as catepsinas B, H, L e D (Prina *et al.*, 1990). Além da fusão com os lisossomas, os vacúolos desta espécie também adquirem proteínas características de endossomas tardios (Courret *et al.*, 2002).

Apesar da presença do conteúdo lisossomal no vacúolo de *L. amazonensis*, as formas amastigotas desenvolveram diversas estratégias para sobreviverem neste ambiente de pH ácido. Devido a ação de uma H^+ - ATPase na membrana das amastigotas, o pH é mantido em torno de 6,36, o que não compromete a atividade das enzimas citoplasmáticas (Marchesini & Docampo, 2002). Além disso, transportadores importantes para a aquisição de nutrientes como prolina, glicose e poliaminas estão presentes na superfície das formas amastigotas e apresentam atividade ótima em pH próximo ao do vacúolo parasitóforo (Glaser & Mukkada, 1992; Burchmore & Hart, 1995; Basselin *et al.*, 2000).

Mesmo apresentando características altamente fusogênicas, a interação entre o vacúolo de *L. amazonensis* com vesículas da via endocítica não parece ser um processo aleatório. Veras e colaboradores (1992) demonstraram que vacúolos contendo amastigotas podem fundir com endossomas contendo zimozan, β -glicana e leveduras mortas pelo calor. Real e colaboradores (2008) também demonstraram que vacúolos de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* fundem com vacúolos recentes de uma nova infecção, tanto de promastigotas como amastigotas. No entanto, a fusão com endossomas contendo partículas de látex, eritrócitos fixados e eritrócitos opsonizados com IgG é inibida. A bactéria *Coxiella burnetti* apresenta vacúolo morfologicamente semelhante ao de *L. amazonensis*, também bastante fusogênico. Porém, diferente do observado para *L. amazonensis* esta bactéria não parece controlar seletivamente a fusão do vacúolo com as vesículas endossomais (Veras *et al.*, 1992).

Os fatos apresentados mostram que a interação da *Leishmania* com o macrófago é um processo extremamente complexo e regulado. A sobrevivência do parasita dentro do

vacúolo envolve mecanismos de captação de nutrientes, de controle da ativação dos macrófagos e da resposta imune mediada pelas células T.

3.6 APOPTOSE E PARASITISMO

3.6.1 Fenótipo Apoptótico

O processo de morte celular programada (MCP) é um mecanismo dependente de uma programação genética, com a participação de genes ativadores e repressores, que modulam os eventos envolvidos nesse tipo de morte celular. Diversos estímulos podem ativar diferentes vias de sinalização celular que levam a MCP. Células sofrendo esse processo de morte apresentam características próprias que dependem do tipo celular envolvido e do estímulo indutor da morte (Fadeel & Orrenius, 2005).

O fenótipo mais encontrado em células sofrendo MCP é a apoptose, que é caracterizada por diversas modificações morfológicas e bioquímicas características na célula, iniciadas e efetuadas pelas enzimas da família das caspases (Miller, 1997): cisteíno proteases que tem especificidade por seqüências com ácido aspártico na posição P1. Perda do potencial de membrana de mitocôndria, alterações estruturais de membrana, degradação oligonucleossomal do DNA, condensação da cromatina nuclear, formação de extrusões da membrana plasmática (blebs) e formação de corpos apoptóticos são as principais alterações que caracterizam o fenótipo apoptótico (Fang *et al.*, 1996; Ohyama *et al.*, 1985; Oberhammer *et al.*, 1994; Tounekti *et al.*, 1995; Daniel *et al.*, 1999). No contexto de manutenção da homeostasia, o reconhecimento e a rápida fagocitose das células apoptóticas permitem que células auto-reativas, que já desempenharam sua função, que sofreram algum tipo de estresse físico ou químico, sejam reconhecidas e eliminadas sem

iniciar um processo inflamatório danoso ao tecido adjacente, já que não ocorre liberação do conteúdo citoplasmático no ambiente extracelular (Savill & Fadok, 2001).

3.6.2 Perda da assimetria de membrana durante a apoptose

Em células viáveis, os principais fosfolipídios que formam a bicamada lipídica da membrana plasmática são fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamida (PE) e esfingomiéline (SM). A localização de cada fosfolipídio é fundamental para o desempenho de suas funções; esta localização é controlada pela atividade de determinadas enzimas. Aproximadamente 100% da PS e 80% da PE são encontrados na face interna da membrana e 75% da PC e 80% da SM são encontrados na face externa da membrana (Diaz & Schroit, 1996). Essa distribuição assimétrica é mantida através de enzimas denominadas translocases, que catalisam o movimento vertical de fosfolipídios na membrana, chamado flip-flop ou translocação, redirecionando as moléculas para o seu sítio habitual. Essas enzimas são denominadas fosfolipídio-translocases, sendo que as flopasses direcionam os lipídios para a face externa enquanto que as flipases induzem o movimento contrário (Diaz & Schroit, 1996).

Uma das modificações mais bem definidas em células apoptóticas é a perda da assimetria da membrana plasmática, que está vinculada à inativação das translocases, e a superexpressão das enzimas fosfolipídio-escramblases que promovem a translocação bidirecional dos lipídios, em um mecanismo dependente de cálcio intracitoplasmático e ativação de caspases (Bever, *et al.*, 1999). A translocação dos lipídios leva a alguns efeitos importantes para o processo de apoptose e reconhecimento das células alvo. Um deles é a internalização de SM, que ao chegar ao citoplasma, sofre a ação de esfingomielinases citoplasmáticas liberando ceramida que desempenha papel importante na formação e liberação dos corpos apoptóticos (Tepper, 2000). A alteração estrutural mais

bem estudada na membrana plasmática de células apoptóticas é a exposição de PS (Fadok *et al.*, 1992;), fosfolipídio aniônico que é reconhecido por fagócitos ou por moléculas presentes no soro (van der Eijnde, 1998). Como a maior parte dos tipos celulares apresenta a exposição de PS na sua superfície externa quando em processo de apoptose, esse fosfolipídio é utilizado como um marcador específico de apoptose. Para tanto, o PS é, em geral, marcado com a proteína anexina V, que tem alta afinidade por PS na presença de altas concentrações de cálcio (Tait & Gibson, 1992).

3.6.3 Reconhecimento de Fosfatidilserina

O reconhecimento de células apoptóticas ocorre devido à expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, principais responsáveis pela endocitose e eliminação destas células. Muitos destes ligantes, já foram caracterizados, sendo o PS o mais estudado na literatura (Moreira & Barcinski, 2004).

Uma tentativa de identificação dos mecanismos de reconhecimento do PS na superfície das células apoptóticas foi pela caracterização de receptores específicos presentes na membrana dos fagócitos. O primeiro relato de um possível receptor para PS foi descrito por Fadok e colaboradores (2000). Neste trabalho os autores identificaram um anticorpo policlonal que bloqueia a fagocitose de células apoptóticas de forma dependente de PS. O epítipo reconhecido por este anticorpo foi isolado pela técnica de *phage display* e o gene que codifica para esse epítipo foi identificado como sendo o receptor de PS (PSR). O PSR foi descrito como uma proteína transmembrana e a expressão deste receptor em células não fagocíticas aumentou a eficiência de fagocitose destas células (Fadok *et al.*, 2000). A partir da caracterização da estrutura protéica e gênica do PSR, diversos grupos

desenvolveram camundongos homozigotos com deleção do gene *psr* (Li *et al.*, 2003; Kunisaki *et al.*, 2004; Böse *et al.*, 2004).

Como consenso, foi observado que a deleção deste gene é letal para os camundongos, entretanto os artigos posteriores ao de Fadok e colaboradores (2000) indicaram questionamentos sobre o receptor para PS inicialmente proposto, uma vez que experimentos posteriores com substituição dos primeiros éxons do gene *psr* (de um total de 6 éxons) por um gene de resistência a neomicina levaram a resultados conflitantes entre estes grupos.

Li e colaboradores (2003) observaram anomalias no pulmão, no sistema nervoso central e redução da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos derivados de precursores retirados do fígado de fetos homozigotos para a mutação, enquanto que as alterações observadas por Kunisaki e colaboradores (2004) foram relacionadas com defeito na eritropoiese, anemia intensa e atrofia tímica, resultando em falhas no desenvolvimento de linfócitos T. Além disso, os autores demonstraram acúmulo de células apoptóticas no fígado e no timo, porém sem a presença de inflamação, sugerindo que a fagocitose destas células não estava inibida, e sim retardada.

Contrariamente a implicação do PS no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, Böse e colaboradores (2004) observaram que os camundongos mutados apresentavam retardo na diferenciação de rins, intestino, pulmão, fígado e olhos. No entanto, não foi encontrado acúmulo de células apoptóticas em nenhum destes órgãos e macrófagos derivados do fígado fetal não apresentaram dificuldades em fagocitar células apoptóticas. Os autores concluíram então que o PSR possui funções essenciais durante a embriogênese, mas que não está envolvido na fagocitose de células apoptóticas.

Mais recentemente, Mitchel e colaboradores (2006) desenvolveram uma linhagem de fibroblastos a partir de células de camundongos deficientes para o PSR. Os autores demonstraram que ausência do PSR nos fibroblastos não influencia no reconhecimento, na

fagocitose ou na resposta às células apoptóticas, corroborando as observações anteriores de Böse e colaboradores (2004). Em experimentos de fusão do PSR com a proteína GFP os autores demonstraram que a localização deste receptor é nuclear. A localização nuclear do PSR já havia sido demonstrada anteriormente em células de mamíferos (Cui *et al.*, 2004) e em Hydra (Cikala *et al.*, 2004) e foi descrita recentemente em *Drosophila* (Krieser *et al.*, 2007), contradizendo os resultados apresentados por Fadok e colaboradores (2000).

Até este momento não está claro se existe um receptor específico para o PS e qual seria esse receptor, mas existe um consenso atual que o sistema de reconhecimento de ligantes na superfície de células apoptóticas compreende vários receptores na membrana de fagócitos que atuam de modo redundante, otimizando a capacidade do organismo de eliminar rapidamente essas células (Bratton & Henson, 2007). Devido à importância que o reconhecimento e a rápida remoção destas células apresentam para a manutenção da viabilidade dos tecidos, é muito provável que novos sistemas de reconhecimento para PS sejam descritos no futuro.

3.6.4 Conseqüências do reconhecimento de células apoptóticas.

O papel do reconhecimento de células apoptóticas é mediar a rápida fagocitose destas células e destruí-las através de digestão intracelular, impedindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático de células mortas. As principais células responsáveis pelo clearance de células apoptóticas são os macrófagos. Quando células apoptóticas são fagocitadas, os macrófagos não são induzidos a gerarem uma resposta inflamatória, o que é absolutamente necessário para a manutenção da homeostase do organismo (Kumar *et al.* 2005)

A fagocitose de células apoptóticas leva a supressão da produção de TNF- α por macrófagos ativados (Voll *et al.*, 1997) e a indução da produção de TGF- β , PGE2 e PAF

(Fadok *et al.*, 1998). A produção de quimiocinas pró-inflamatórias como IL-8, MIP-1c (macrophage inflammatory protein-1c), MIP- 2 e óxido nítrico por macrófagos é modulada negativamente pelo reconhecimento de células apoptóticas (McDonald *et al.*, 1999) A produção de TGF- β é fundamental na modulação da resposta macrofágica, conforme foi demonstrado pela adição dessa citocina à cultura, o que mimetizou os efeitos causados pelo reconhecimento de células apoptóticas. Anticorpos que bloqueiam TGF- β revertem o fenótipo dos macrófagos que endocitaram células apoptóticas (McDonald *et al.*, 1999).

3.6.5 Mimetismo Apoptótico

Formas promastigotas de *L. amazonensis* morrem por apoptose quando submetidas a choque térmico. Isto foi observado em experimentos de transferência dos parasitos da temperatura de crescimento *in vitro*, para a temperatura de crescimento *in vivo* (de 22°C para 37°C, respectivamente) (Moreira *et al.*,1996). Durante este processo, os parasitas apresentam mudanças morfológicas características de uma célula apoptótica como fragmentação da cromatina e clivagem de DNA. Formas amastigotas desta espécie quando purificadas de lesões cutâneas na pata de camundongos expõem PS na sua superfície. No entanto, estas células são viáveis, altamente infectivas e replicam em macrófagos após a infecção, o que sugere que não estão morrendo por apoptose (De Freitas Balanco *et al.* 2001). Os autores observaram que, semelhante ao que ocorre durante o reconhecimento de células apoptóticas, o reconhecimento destas amastigotas pelo macrófago induz um fenótipo antiinflamatório, com produção de TGF- β , IL-10 e inibição de NO. Esse mecanismo foi denominado de “Mimetismo Apoptótico” (De Freitas Balanco *et al.*, 2001) (Figura 4).

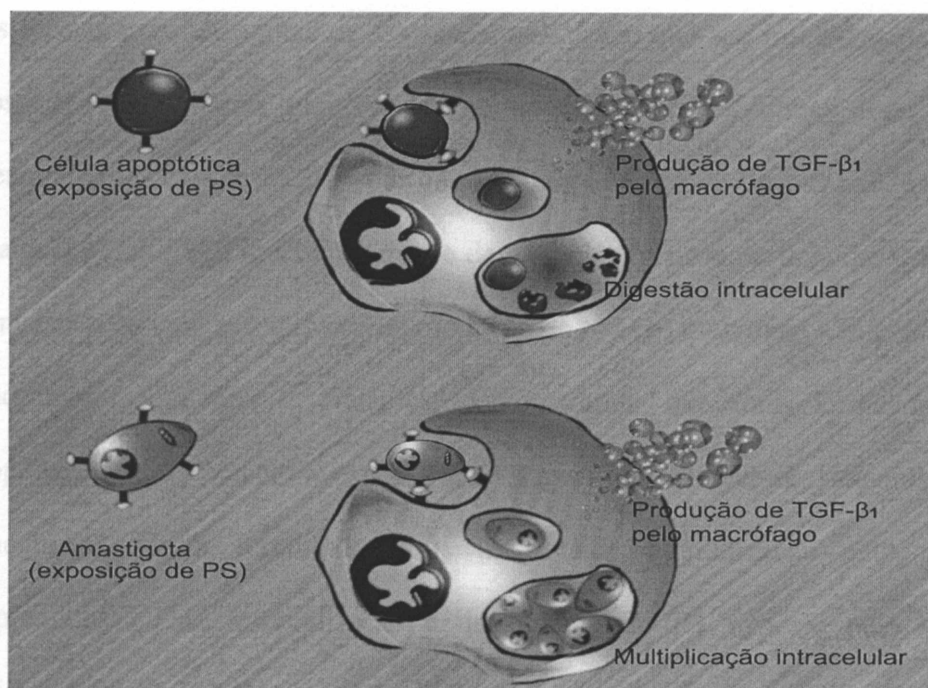


Figura 4. Mimetismo apoptótico em amastigotas de *Leishmania amazonensis*.
(Figura cedida por João Luiz Mendes Wanderley).

Assim, a expressão de PS na superfície das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* é um fator de virulência, pois funciona como um ligante, mediando o reconhecimento destes parasitas por macrófagos (De Freitas Balanco *et al.*, 2001). O bloqueio da sinalização por PS diminui a internalização e a proliferação intracelular das formas amastigotas de modo específico (De Freitas Balanco *et al.*, 2001). Estes resultados mostram que a exposição de PS por formas amastigotas, além de torná-las mais infectivas induz uma permissividade macrófaga para o crescimento do parasita.

Este mecanismo ou mecanismos semelhantes parecem operar em outras infecções parasitárias, como tem sido mostrado em alguns trabalhos. A infecção ativa de macrófagos pelo parasita *Toxoplasma gondii* inibe a produção de óxido nítrico, e esta inibição depende da exposição de PS pelo parasita. Bloqueando PS na superfície do parasita, através da incubação com anexina V, ou bloqueando-se TGF-β₁ com um anticorpo monoclonal específico este efeito é abolido (Seabra *et al.*, 2004).

As formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, que são infectivas para as células do hospedeiro vertebrado, parecem ser as únicas formas evolutivas deste parasita que apresentam exposição de PS, mesmo quando provenientes de formas axênicas de cultura (DaMatta *et al.*, 2007). O reconhecimento dessa molécula na superfície das tripomastigotas também está relacionado à inibição da produção de NO em macrófagos infectados.

Recentemente Mercer e Helenius, demonstraram que uma forma infectiva não envelopada do vírus Vaccinia expõe PS na superfície (Mercer & Helenius, 2008). O reconhecimento desta forma do vírus induz sua internalização pelo processo de macropinocitose. Esta internalização é dependente do PS exposto pelo vírus e este mecanismo também foi descrito como Mimetismo Apoptótico (Mercer & Helenius, 2008). Estes resultados sugerem que a habilidade em induzir uma resposta antiinflamatória utilizando características de células apoptóticas parece ser um mecanismo comum entre patógenos intracelulares, que precisam lidar com mecanismos microbicidas das células hospedeiras.

4 JUSTIFICATIVA

A progressão crônica da LCD é atribuída à falta da imunidade mediada por células específica para antígeno de *Leishmania* e predominância de uma resposta do tipo Th2. Neste sentido, mecanismos imunossupressores podem ser modulados por moléculas do próprio parasita durante a interação com a célula hospedeira.

Trabalhos de Barcinski e colaboradores vêm descrevendo a exposição e o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis* como mecanismo de desativação de macrófagos por uma via dependente de TGF- β_1 .

Neste projeto, a avaliação do papel de PS na superfície de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com forma cutânea difusa, comparando com isolados da cutânea localizada, nos permitirá inferir se existe uma modulação positiva da expressão de PS em cepas de difusa que justificaria em parte a desativação macrofágica associada a LCD.

5 HIPÓTESE

Os isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD apresentam maior exposição de PS em comparação com a forma LCL e isto contribui para desativação do macrófago favorecendo a replicação do parasita.

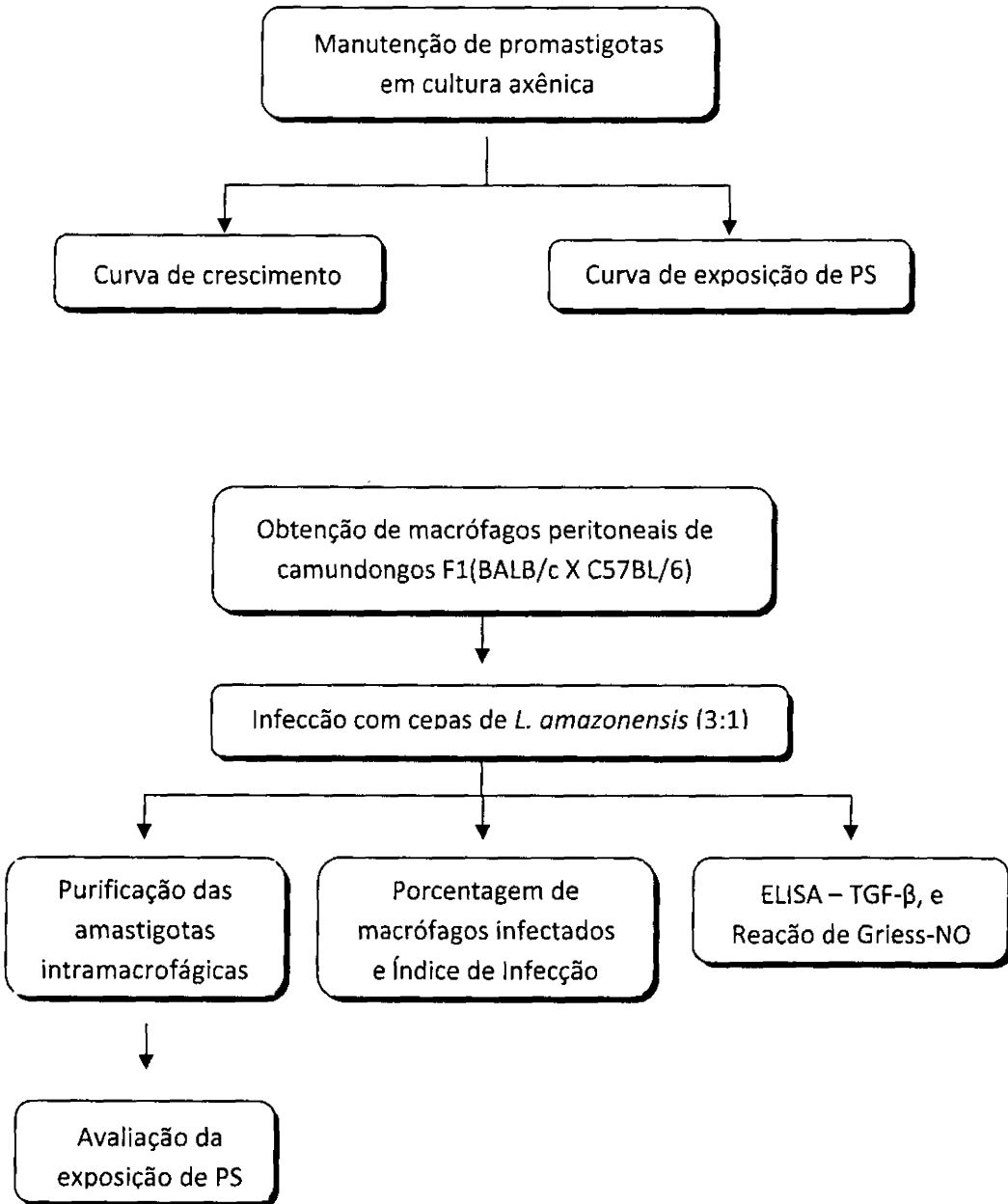
6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a exposição de PS em cepas de *L. amazonensis* de pacientes com LCL e LCD e qual o papel imunossupressor dessa molécula durante a infecção de macrófagos.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Comparar a exposição de PS na superfície de promastigotas de *L. amazonensis* isolados de pacientes com LCL e LCD;
2. Comparar a exposição de PS na superfície das amastigotas de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCL e LCD;
3. Avaliar a carga parasitária, produção de TGF- β_1 e óxido nítrico durante a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais com isolados de pacientes com LCL e LCD.

6 DESENHO EXPERIMENTAL



7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 Animais

Foram utilizados camundongos F1 (resultante do cruzamento entre camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6), machos de 6-8 semanas, mantidos no setor de biotério da Coordenação de Pesquisa no Instituto Nacional do Câncer (INCa-RJ), sob condições controladas de temperatura, luminosidade, umidade e alimentados com água e ração comercial balanceada *ad libitum*. Os ensaios experimentais nessa tese estão de acordo com o Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) sob número de licença L-0036/08.

7.2 Parasitas

Foi utilizado um total de 14 cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cuja caracterização por zimodemas foi realizada no serviço prestado pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) sob a responsabilidade de Dra. Elisa Cupolillo (FIOCRUZ-RJ). As cepas foram isoladas a partir de lesões de pacientes com

Leishmaniose	Cutânea	Difusa	(n=7):	(MHOM/BR/1986/BA106),
				(MHOM/BR/1989/BA199), (MHOM/BR/1989/BA276), (MHOM/BR/1990/BA336),
				(MHOM/BR/1997/BA700), (MHOM/BR/1999/BA760), (MHOM/BR/2002/BA820) e
Leishmaniose	Cutânea	Localizada	(n=6):	(MHOM/BR/1985/BA69),
				(MHOM/BR/1985/BA73), (MHOM/BR/1987/BA113), (MHOM/BR/1987/BA115),
				(MHOM/BR/1987/BA125) e a (MHOM/BR/1973/M2269), cepa de referência

internacional da Organização Mundial de Saúde (OMS). Para armazenar as cepas, alíquotas foram congeladas em meio RPMI completo contendo 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, California, EUA) e 1% de DMSO. Todas as cepas são mantidas congeladas em nitrogênio líquido no Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunorregulação e foram cedidas por Dra Aldina Barral. A cepa de *L. amazonensis* LV79 (MPRO/BR/72/M 1841-LV-79), isolada de um caso de LCL de primata, foi cedida por Dr. Marcello

Barcinski e é mantida no Instituto Nacional do Câncer (INCa-RJ). Para este estudo, os parasitas foram descongelados, cultivados em meio NNN e expandidos *in vitro* em meio Schneider contendo 10% de SFB, pH 7,2 a 25°C, até atingirem a fase estacionária de crescimento.

7.3 Sincronização das culturas de promastigotas de *Leishmania*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em garrafas de cultura de 25cm², no volume de 5 ml em meio Schneider com 10% de soro bovino fetal (SBF). Para sincronização do cultivo, as cepas foram repicadas de dois em dois dias em um total de três repiques sucessivos, adicionando-se 10% (500µl) da cultura inicial ao novo repique. Para obtenção de promastigotas em fase logarítmica foram realizadas passagens, onde o número inicial de parasitas foi fixado em 10⁵/ml. O número de promastigotas nos dias subseqüentes foi determinado por contagem em câmara de Neubauer e acompanhado até a fase estacionária.

7.4 Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos F1 foram inoculados com 3 ml de tioglicolato (Sigma, Saint Louis, EUA) na concentração de 3% diluído em PBS (Gibco, California, EUA). Após 5-7 dias os camundongos foram sacrificados e foi feito o lavado peritoneal com HBSS (Hank's Balanced Salt Solution – Sigma, Saint Louis, EUA) contendo 2mM de EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid - Sigma, Saint Louis, EUA). As células foram centrifugadas por 5 min à 1200 rpm em temperatura ambiente, ressuspensas em meio DMEM contendo 10 % de SBF (Gibco, California, EUA) e mantidas no gelo até o uso.

7.5 Infecção de macrófagos

As células do lavado peritoneal de camundongos F1 foram contadas e plaqueadas em diferentes concentrações de acordo com cada experimento. Após 2 horas de incubação

em estufa a 34°C e 5% de CO₂, as monocamadas foram lavadas 2 x com PBS para a retirada de células não aderentes e permaneceram em estufa por um período de 12 horas. As infecções com os isolados de *L. amazonensis* foram realizadas nas proporções de 3:1 (promastigota: macrófago). Após 2 horas de interação, as culturas foram lavadas com PBS para a retirada dos parasitas não internalizados da cultura. Os macrófagos infectados permaneceram em meio DMEM contendo 10% de SFB e em estufa 34°C, 5% CO₂ para análise de distintos parâmetros em diferentes intervalos de tempo.

7.6 Purificação de amastigotas intracelulares

Para obtenção de formas amastigotas foi utilizado protocolo previamente padronizado por Wanderley e colaboradores (2006). Macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos F1 foram plaqueados em garrafas de cultura de 25cm² na concentração de 2×10^6 e em seguida infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária. Após diferentes intervalos de infecção, as culturas foram lavadas com 5 ml de PBS e foi adicionado 3 ml de tampão de lise (Hepes 20 mM, Sacarose 0,25 M, EDTA 5 mM, Aprotinina 0,3 µM, E-64 10 µM, Pepstatina 1 µM, pH 7,2) nas garrafas que permaneceram sobre gelo durante 5 min. Após este período, os macrófagos foram raspados da garrafa e lisados mecanicamente em um homogeneizador de vidro. As células foram centrifugadas a 50 g durante 5 min. para retirada de macrófagos não lisados. O sobrenadante contendo as amastigotas foi centrifugado a 300 g por 17 min. a 4°C. O *pellet* de amastigotas foi ressuscitado em meio DMEM contendo 4% de SFB e os tubos permaneceram 2 horas sob agitação a 34°C. Após esse período, os parasitas foram lavados 2 vezes com PBS, antes da utilização nos ensaios de exposição de PS.

7.7 Avaliação da exposição de PS

A avaliação da exposição de PS foi realizada segundo protocolo adaptado de Wanderley e colaboradores (Wanderley *et al.*, 2006). Em resumo, 2×10^5 formas promastigotas ou amastigotas purificadas de macrófagos de camundongos F1 foram marcadas com anexina V conjugada a fluoresceína (Molecular Probes, Oregon, EUA) em 20 μ l de tampão contendo 2,5 mM de cálcio e 0,7 μ g/ml de iodeto de propídio (PI - Sigma, Saint Louis, EUA), que é um marcador vital, para garantir que as células PS^{pos}/PI^{neg} não estavam mortas ou com a viabilidade comprometida. Os parasitas foram analisados por citometria de fluxo (FACScalibur® – BD Biosciences, California, EUA) através do programa Cell-Quest Pro®.

7.8 Determinação do índice de infectividade

Macrófagos na concentração de 2×10^5 foram plaqueados em lamínulas redondas de vidro estéreis em placa de 24 poços e infectados com os diferentes isolados de *L. amazonensis* em fase estacionária. Após diferentes tempos de infecção, as culturas foram fixadas em metanol 100% e coradas com Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany). Após uma série de desidratação em acetona: xilol (10:90, 30:70, 70:30 e 100% acetona), a lamínula foi montada em Entelan. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada através da contagem de no mínimo 200 macrófagos por lamínula em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão (100x). Foram avaliados o percentual de macrófagos infectados e o índice de infectividade, que foi determinado a partir da seguinte fórmula: Índice de Infectividade = porcentagem de macrófagos infectados X número de amastigotas por macrófago/100 (Wanderley *et al.*, 2006).

7.9 Quantificação da síntese de TGF- β_1

Para determinação dos níveis de produção de TGF- β_1 , os macrófagos foram plaqueados na concentração de 2×10^6 em placas de 24 poços e infectados com promastigotas de *L. amazonensis* em meio DMEM suplementado com 1% de Nutridoma-SP (Roche – USA). A análise da produção de TGF- β_1 foi realizada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção. Vinte horas antes da coleta do sobrenadante os macrófagos foram tratados com 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*, serotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich). Os níveis totais de TGF- β_1 foram mensurados usando a técnica de ELISA (DuoSet Kit; R&D Systems). Brevemente, os sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados com LPS apenas ou infectados com *L. amazonensis* foram acidificados e posteriormente neutralizados de acordo com as especificações do fabricante do Kit. A concentração de TGF- β_1 em cada experimento foi determinada pela comparação com a curva padrão e os resultados expressos em ng/ml de proteína.

7.10 Quantificação da produção de óxido nítrico

Para a determinação da produção de NO, macrófagos infectados e não infectados foram estimulados com 100 ng/ml de LPS de *E. coli*, serotipo 026:B6 (Sigma-Aldrich) e 50 ng/ml de IFN- γ murino recombinante (Prepotec), 20 horas antes da coleta do sobrenadante. A concentração de NO foi determinada indiretamente pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982) (Sigma-Aldrich) e os valores comparados com uma curva padrão contendo concentrações crescentes de nitrito de sódio (NaNO₂).

7.11 Microscopia de luz

Preparações coradas com Giemsa de macrófagos infectados por diferentes isolados de *L. amazonensis* foram fotografadas em objetiva de imersão no microscópio Olympus XL59 no aumento de 40X e as imagens adquiridas utilizando o software ImageProPlus. Os parâmetros avaliados por esta técnica foram a porcentagem de macrófagos infectados e o índice de infecção.

7.12 Análise estatística

Para determinar a significância estatística das diferenças entre os grupos experimentais, análises de variância (Kruskal-Wallis) foram realizadas utilizando o programa Prism 5.0 (Graphpad Software, CA). Após análise de significância Kruskal-Wallis foi utilizado o pós-teste de Dunn's. As análises de associação entre alguns parâmetros foram plotadas em um diagrama de dispersão e utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman (r) e o valor de p para validar a existência de correlação. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

8 RESULTADOS

8.1 Descrição clínico - patológica

Os casos de leishmaniose cutânea difusa (LCD) causados por *L. amazonensis* possuem aspectos clínicos e imunopatológicos bem distintos da Leishmaniose cutânea localizada (LCL). Nesse estudo, nós utilizamos cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCD e LCL, apresentando manifestação clínica compatível com as classificações da doença.

Os critérios utilizados para classificar os pacientes como LCD foram os estabelecidos por Convit em 1972. São eles: presença de lesões nodulares acometendo grandes áreas corpóreas; riqueza de parasitas nas lesões; número intenso de macrófagos parasitados; ausência de comprometimento visceral; intradermorreação de Montenegro (IDRM) negativa; evolução crônica da doença; difícil resposta ao tratamento e refratariedade (Convit *et al.*, 1972). Para classificar os pacientes com a forma LCL os critérios adotados foram os descritos por Guimarães em 2005. São eles: lesão (ões) ulcerada (s) de bordas elevadas com um fundo geralmente granuloso e IDRM positiva. (Guimarães *et al.*, 2005).

A avaliação clínica dos pacientes foi feita nos postos de saúde do município onde os mesmos residem por uma equipe de médicos coordenada por Dr. Jackson Costa e Dra. Aldina Barral. Esses indivíduos fazem parte do programa de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, tendo acompanhamento médico durante todo o curso da infecção e pós-tratamento. As fichas clínicas nas quais constam informações a respeito da evolução da doença foram disponibilizadas para este estudo, sendo alguns dos dados relevantes sobre os pacientes com LCD listados na tabela I e LCL na tabela II.

Paciente (N°)	Sexo	Início da doença	Idade no início da doença	Tempo da doença (anos)	IDRM	Lesões							
						Nódulos	Úlceras	Número	Face	MS	MI	Abdômen	Tórax
1	M	1990	23	05	Neg.	++++	0	>500	++++	++++	++++	++++	++++
2	M	1976	06	12	Neg.	+++	6	51	++	++	+++	-	-
3	M	1985	20	15	Neg.	+++	0	168	++	++	+++	+++	++
4	M	1980	04	23	Neg.	++	0	20	++	++	++	-	-
5	F	1997	07	15	Neg.	+++	0	140	+++	++	+++	++	+
6	M	1993	22	10	Neg.	+++	+	68	+++	+++	++	+	+
7	M	1999	41	03	Neg.	++	0	22	++	+++	++	-	+

Tabela I. Pacientes com LCD dos quais foram isolados as cepas de *Leishmania amazonensis* utilizados nesse estudo. Todos os pacientes possuíam a descrição segundo Convit, 1972 para serem classificados como portadores de Leishmaniose cutânea difusa. A tabela consta do sexo, início da doença, idade do início da doença, tempo da doença, Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM), tipo da lesão, número das lesões e distribuição das lesões no corpo dos pacientes. – ausente; + Leve; ++ moderado; +++ intenso; ++++ muito intenso. MS = Membros superiores. MI= Membros Inferiores.

Paciente (N°)	Sexo	Idade no início da doença	Tempo da doença (meses)	IDRM	Lesões							
					Nódulos	Úlceras	Número	Face	MS	MI	Abdômen	Tórax
8	M	64	04	+32mm	0	+	8	-	+	+	-	-
9	M	54	01	+25mm	0	+	2	+	-	-	-	-
10	M	70	02	+10mm	0	+	1	-	+	-	-	-
11	F	08	03	+12mm	0	+	5	+	-	-	-	-
12	M	27	06	+25mm	0	+	1	+	-	-	-	-

Tabela II. Pacientes com LCL dos quais foram isolados as cepas de *Leishmania amazonensis* utilizados nesse estudo. Todos os pacientes possuíam a descrição segundo Guimarães, 2005 para serem classificados como portadores de Leishmaniose cutânea localizada. A tabela consta do sexo, idade do início da doença, tempo da doença, Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM), tipo da lesão, número das lesões e distribuição das lesões no corpo dos pacientes. -ausente; + Leve; ++ moderado; +++ intenso; ++++ muito intenso. MS = Membros superiores. MI= Membros Inferiores.

8.2 Identificação dos isolados de *Leishmania amazonensis*

Para fins de confirmação de diagnóstico, as cepas utilizadas nesse estudo foram isoladas a partir de fragmentos de biópsias de pacientes contendo a lesão ativa. Após a confirmação do crescimento em meio axênico de formas promastigotas de *Leishmania*, as culturas foram expandidas em meio Schneider suplementado com 10% de SFB. A caracterização das diferentes cepas de *Leishmania* foi realizada por Eletroforese de Enzimas Multilocus (MLEE) (Cupolillo *et al.*, 1994), na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) - Fundação Oswaldo Cruz-RJ, sob coordenação de Dra. Elisa Cupolillo. O resultado da fenotipagem confirma que todas as cepas pertencem à espécie *Leishmania amazonensis*. O relatório com o perfil de isoenzimas avaliada encontra-se no anexo I.

A lista com o código de todas as cepas apresentadas neste trabalho está na tabela III, onde estão correlacionadas a identificação parasitária com a procedência e patologia das 14 cepas.

Número	Cepa	Código Internacional (.)	Origem	Patologia
1	BA106	MHOM/BR/1986/BA106	BA	LCD
2	BA199	MHOM/BR/1989/BA199	MA	LCD
3	BA276	MHOM/BR/1989/BA276	MA	LCD
4	BA336	MHOM/BR/1990/BA336	MA	LCD
5	BA 700	MHOM/BR/1997/BA700	MA	LCD
6	BA 760	MHOM/BR/1999/BA760	MA	LCD
7	BA 820	MHOM/BR/2002/BA820	MA	LCD
8	BA 69	MHOM/BR/1985/BA 69	BA	LCL
9	BA 73	MHOM/BR/1985/BA 73	BA	LCL
10	BA 115	MHOM/BR/1987/BA115	BA	LCL
11	BA125	MHOM/BR/1987/BA125	BA	LCL
12	BA113	MHOM/BR/1987/BA113	BA	LCL
13	M2269	MHOM/BR/1973/M2269	PA	LCL
14	LV-79	MPRO/BR/72M 1841-LV-79	BR	LCL

Tabela III. Isolados de *Leishmania amazonensis* utilizados nesse estudo. A caracterização fenotípica dos isolados foi feita por eletroforese de enzimas (CLIOC-FIOCRUZ-RJ). (.) Código recomendado para nomenclatura de cepas de *Leishmania*, que inclui os seguintes dados: Hospedeiro, país de origem, ano quando foi isolada e código original (WHO, 1984).

8.3 Exposição de PS em formas promastigotas de *L. amazonensis* isolados de casos de LCD e LCL

A exposição de PS na superfície de *Leishmania major* tem sido considerada como um fator de virulência na forma promastigota, influenciando no estabelecimento da infecção (van Zandbergen *et al.*, 2006). Para determinarmos se a exposição deste fosfolípido participa como fator diferencial na infectividade dos diferentes isolados de *L. amazonensis*, nós analisamos inicialmente a exposição de PS na forma promastigota ao longo da curva de crescimento em culturas axênicas.

Para isso, cepas isoladas de pacientes com LCD (BA 106, BA 199, BA276, BA336, BA700, BA760 e BA820) e de pacientes com LCL (BA 113, BA125 e a M2269) foram submetidas a três repiques sucessivos com intervalos de dois dias, de modo a gerar culturas sincronizadas em fase logarítmica de crescimento. As curvas de crescimento de promastigotas foram acompanhadas até o sétimo dia de cultivo, sendo avaliada a exposição de PS na superfície dos parasitas.

A cepa LV79 de *L. amazonensis* foi utilizada como controle interno do experimento, uma vez que seu perfil em ensaios relacionados à exposição de PS já havia sido caracterizado previamente (Wanderley *et al.*, 2006). A exposição de PS foi avaliada por citometria de fluxo a partir da marcação com anexina V e iodeto de propídio.

Como observado no gráfico 1, não houve diferença significativa de exposição de PS na forma promastigota entre as cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCD e LCL ao longo dos sete dias de cultura. Entretanto, observamos um discreto aumento na exposição para ambos os grupos no sétimo dia de cultura.

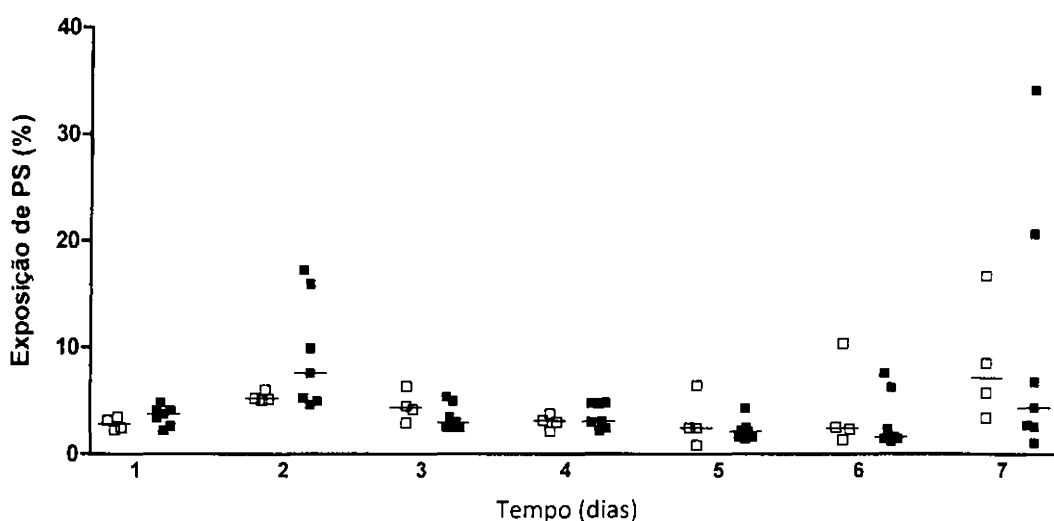


Gráfico 1. Cinética de exposição de PS em promastigotas de *L. amazonensis*. Cepas isoladas de casos de LCL: BA113, BA125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA106, BA199, BA 276, BA336, BA700, BA760, BA820 (■) foram mantidas em cultura axênica, a 23°C durante sete dias. A exposição de PS foi avaliada pela marcação com anexina V diariamente, por citometria de fluxo. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à mediana dos valores dentro de cada grupo. A imagem é representativa de dois ensaios independentes.

8.4 Exposição de PS em formas amastigotas de *L. amazonensis* isolados de casos de LCD e LCL

O conceito de Mimetismo Apoptótico foi descrito inicialmente para formas amastigotas de *L. amazonensis*, em que os autores demonstraram que a exposição de PS é importante para modular a atividade leishmanicida do macrófago (De Freitas Balanco *et al.*, 2001). Dentro desse contexto, foi avaliada a exposição de PS na superfície das amastigotas de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com forma cutânea localizada e cutânea difusa. Para isso, macrófagos de camundongos F1 (BALB/c X C57BL/6) foram infectados *in vitro* com formas promastigotas em fase estacionária com a proporção de três parasitas para cada macrófago. A cada 24 horas de infecção, os macrófagos foram lisados e a exposição de PS na superfície das amastigotas purificadas foi determinada através de citometria de fluxo.

Nossos resultados demonstram que no tempo de 24 horas de infecção, as cepas isoladas de pacientes com LCD (BA106, BA276, BA336, BA 700, BA 760) apresentam maior expressão de PS em formas amastigotas quando comparadas com as cepas isoladas de casos com LCL (BA69, BA73, BA115, BA 125, M2269 e LV 79) (Gráfico 2). Os pontos de 48, 72 e 96 horas foram analisados com as cepas representativas dos grupos LCD e LCL. A partir de 48 horas de infecção a exposição aumentou gradualmente para os dois grupos, permanecendo em níveis similares até 72 horas e tornando a aumentar em 96 horas. O gráfico 2 mostra a diferença entre as médias de intensidade de fluorescência dos parasitas marcados e não marcados para anexina V. Este número indica a quantidade de PS que está exposto na membrana externa do parasita, sendo os parasitas positivos para iodeto de propídio excluídos da análise.

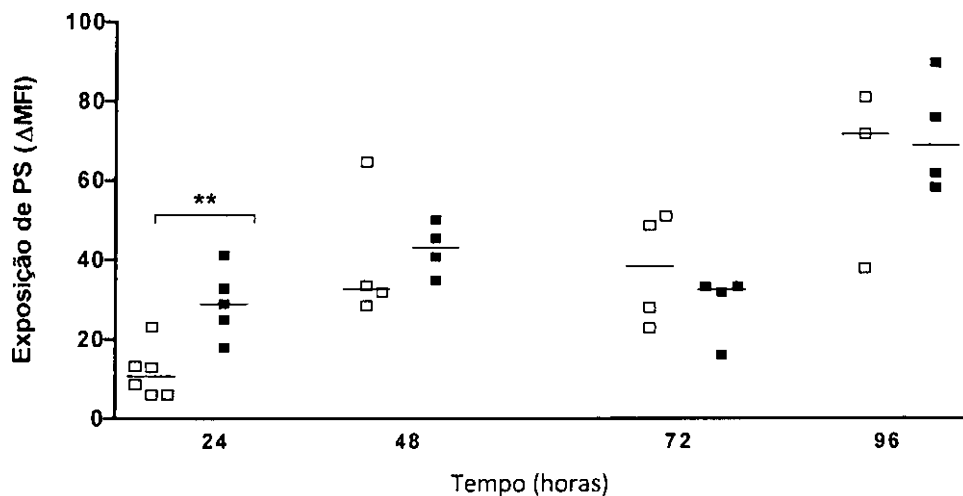


Gráfico 2. Cinética de exposição de PS em amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos F1 foram infectados com *L. amazonensis* isolados de diferentes casos de LCL: BA69, BA73, BA115, BA 125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA 106, BA 276, BA 336, BA 700, BA 760 (■). As amastigotas foram purificadas e a exposição de PS foi determinada por análise de citômetro de fluxo utilizando anexina V e Iodeto de Propídio. Δ MFI representa a diferença da média de intensidade de fluorescência entre os parasitas marcados e não marcados com Anexina V. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à mediana dos valores dentro de cada grupo A figura é representativa de três ensaios independentes. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós- teste de Dunn's. $**p < 0.01$

8.5 Caracterização da infecção de macrófagos *in vitro* com *L. amazonensis* isolados de casos de LCD e LCL

Em paralelo às análises de exposição de PS em amastigotas de LCD e LCL, nós avaliamos também a resposta macrofágica durante a infecção entre os grupos. Para isso, macrófagos peritoneais de camundongo F1 foram plaqueados e infectados por *L. amazonensis* isolados de diferentes casos de LCD (BA 276, BA336, BA700 e BA820) e LCL (BA125, M2269 e LV79) com uma relação de infecção de três parasitas para cada macrófago. Após 5, 24, 48 e 72 horas, as células foram fixadas e coradas. A porcentagem de macrófagos infectados e o índice de infectividade foram determinados por microscopia óptica.

Nossos resultados indicam que a porcentagem de macrófagos infectados foi similar entre os isolados de LCD e LCL no tempo inicial de 5 horas de infecção. Porém, após 24 horas, as cepas de LCD mantiveram a infecção, enquanto as cepas de LCL tiveram a infecção reduzida pela metade, mantendo este padrão 48 e 72 horas pós-infecção (Gráfico 3). Essa diferença foi estatisticamente significativa no tempo de 72 horas.

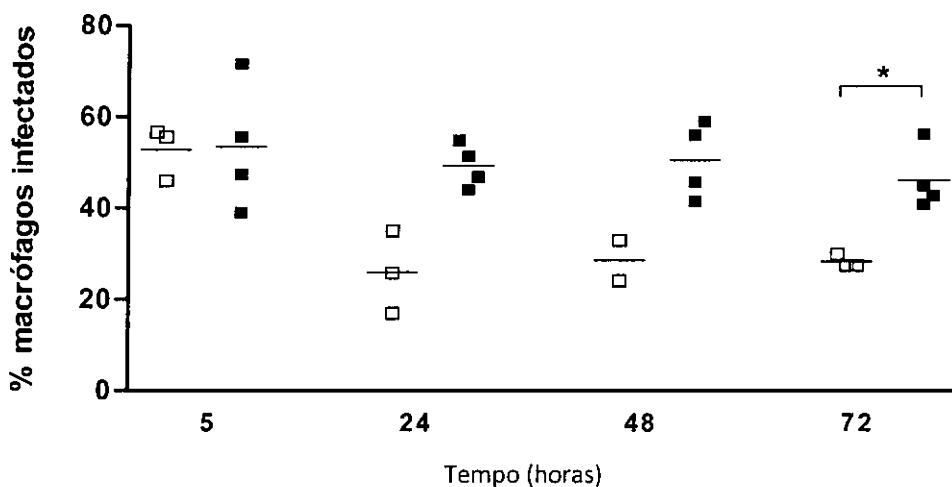


Gráfico 3. Porcentagem de macrófagos de camundongos F1 infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* isolados de diferentes casos com LCL: cepas BA 125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA 276, BA 336, BA 700, BA 820 (■). A cada 24 horas após a infecção, as laminulas foram fixadas, coradas em Giemsa e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinado após contagem cega de no mínimo 200 células. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à média dos valores dentro de cada grupo. A imagem é representativa de três ensaios independentes. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós- teste de Dunn's. * $p < 0.05$

Com relação ao índice de infectividade, nossos resultados mostraram que o perfil de proliferação das amastigotas difere entre os grupos LCD e LCL. No tempo inicial de infecção é observada a taxa de internalização do parasita, já que nesse tempo não ocorre multiplicação intramacrofágica. A internalização de promastigotas de *L. amazonensis* obtidas de casos de LCL e LCD foram semelhantes no tempo de 5 horas. Contudo, a partir de 24 horas, o índice de infectividade de ama-LCL foi reduzido em comparação à taxa de internalização no tempo

de 5 horas, enquanto que para ama-LCD ocorreu uma tendência de aumento nos níveis de infecção ao longo da cinética. Assim, quando comparamos a taxa de internalização em 5 horas com o índice de infectividade no tempo de 72 horas, percebemos que houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na quantidade de amastigotas intracelulares apenas no grupo infectado com cepas de LCD (Gráfico 4).

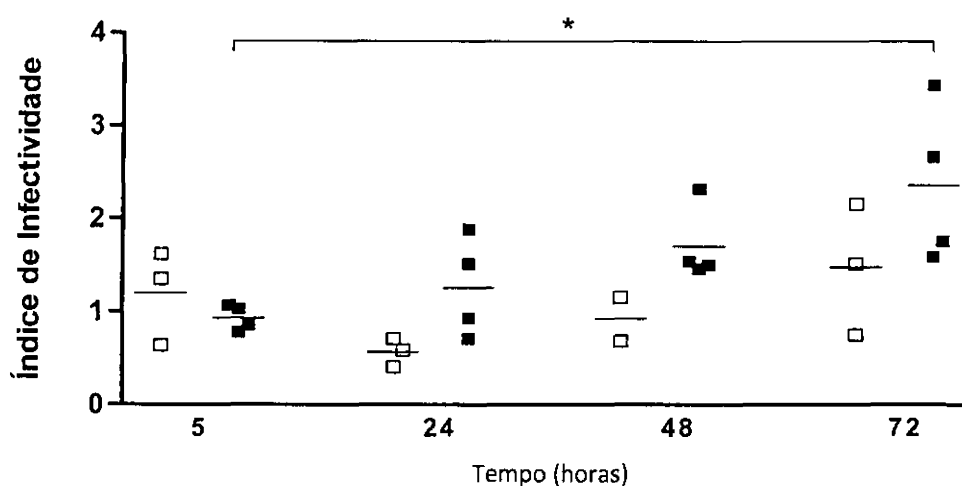


Gráfico 4. Índice de infectividade em macrófagos de camundongos F1 infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* isolados de diferentes casos com LCL: cepas BA 125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA 276, BA 336, BA 700, BA 820 (■). A cada 24 horas após a infecção, as lamínulas foram fixadas, coradas em Giemsa e o índice de infectividade (porcentagem de macrófagos infectados x número de amastigotas por macrófago/100) foi determinado após contagem cega de no mínimo 200 células. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à média dos valores dentro de cada grupo. A imagem é representativa de três ensaios independentes. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's. * $p < 0,05$

Para determinar se existe uma associação entre a exposição de PS em amastigotas de ambos os grupos estudados (LCD e LCL) no tempo inicial de 24 horas e a resposta macrófágica à infecção no tempo de 72 horas, representamos os valores em um diagrama de dispersão e utilizamos o coeficiente de correlação de Spearman (r).

Como se pode observar no gráfico 5A, existe uma tendência de correlação entre a exposição de PS e a porcentagem de macrófagos infectados. O coeficiente de correlação neste caso foi $r = 0,756$ com $p = 0.066$, sugerindo que o grau de correlação entre tais variáveis é forte, embora não seja significativa.

Entretanto, fazendo esta mesma análise com o índice de infecção, obtivemos $r = 0,942$ com $p = 0.016$, confirmando que existe uma correlação positiva entre esses parâmetros é verdadeira, ou seja, à medida em que aumenta os níveis de PS exposto na superfície das amastigotas, aumenta o número de parasita intracelular (Gráfico 5B).

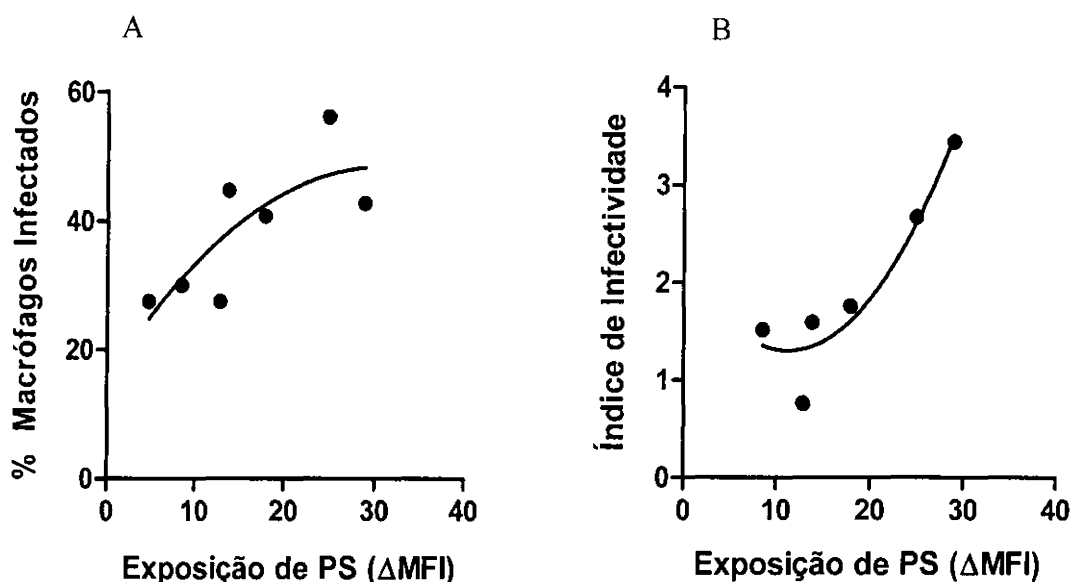


Gráfico 5. Relação entre a porcentagem de macrófagos infectados e índice de infectividade com a exposição de PS. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis* de ambos os grupos, LCL ou LCD. Os dados mostrados no eixo X são referentes aos valores da exposição de PS no tempo de 24 horas e no eixo Y são referentes à porcentagem de macrófagos infectados (A) e ao índice de infectividade 72 horas pós-infecção (B). Para análise de associação entre os parâmetros de exposição de PS e índice de infectividade foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman (r) e o valor de p para validar a existência de correlação. Utilizamos uma curva quadrática polinomial para evidenciar a tendência da correlação. Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A visualização por microscopia óptica da infecção entre os diferentes isolados de *L. amazonensis* de pacientes com forma LCD e LCL pode ser observada na figura 5. Comparando as figuras 5A (LCD-5h) e 5C (LCL-5h) é possível observar que não houve

diferença nos grupos quanto à internalização do parasita. Ao passo que as figuras 51B (LCD-72h) e 5D (LCL-72h) mostram claramente que tanto a porcentagem de macrófagos infectados quanto o número de amastigotas intracelulares foram maiores para o grupo infectado com os isolados de pacientes com LCD. Além disso, no tempo de 72 horas, existe uma diferença visível quanto ao tamanho dos vacúolos induzidos por cepas LCD em comparação às cepas LCL (análise morfológica está em andamento).

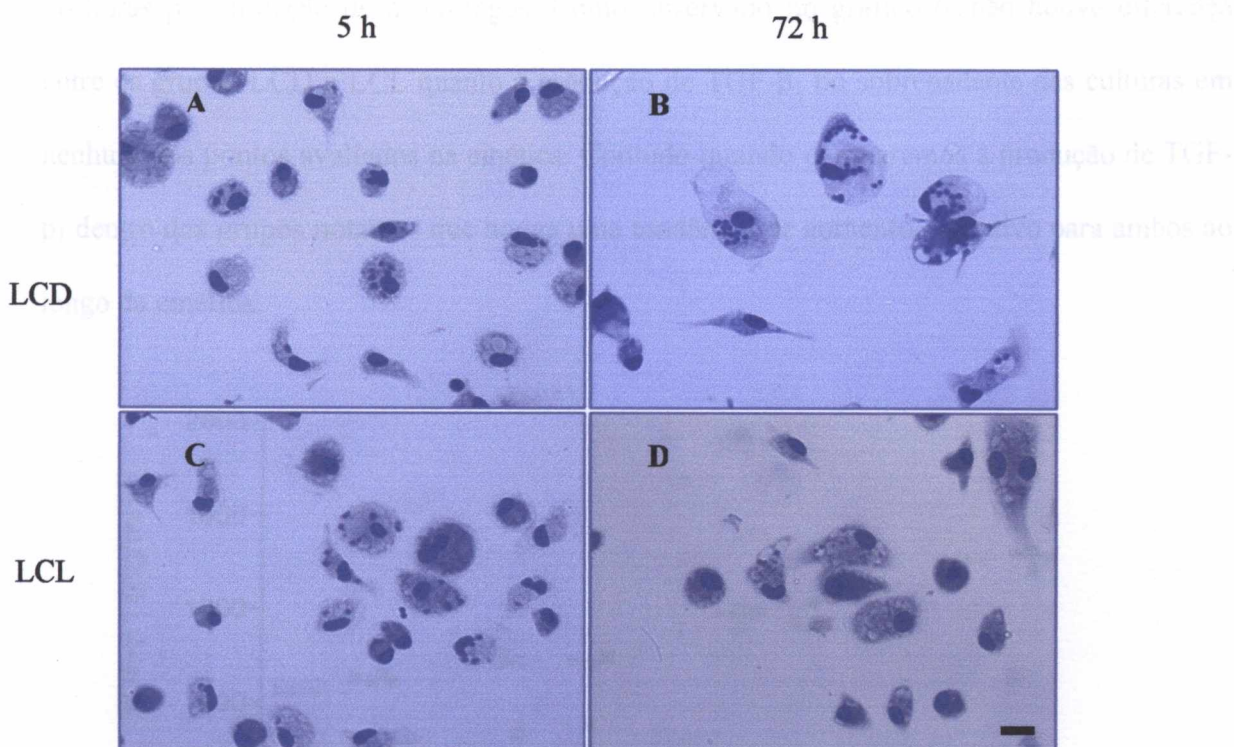


Figura 5. Fotomicrografia de macrófagos de camundongos F1 infectados com *L. amazonensis*. Imagem representativa de macrófagos peritoneais infectados após 5 e 72 horas com isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD (cepa BA 336) e LCL (cepa BA 125). As lamínulas foram fixadas e coradas em Giemsa. A imagem é representativa de três ensaios independentes. Objetiva 40X. Barra, 10 μ m.

8.6 Avaliação da produção de TGF- β_1 e óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos infectados com *L. amazonensis* isolados de casos de LCD e LCL

Para avaliar se a infecção de isolados de *L. amazonensis* de LCD e LCL modulam distintamente a atividade inflamatória da célula hospedeira, quantificamos os níveis de produção de TGF- β_1 no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) infectados. O TGF- β_1 total secretado foi avaliado após 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção de macrófagos. Como observado no gráfico 6, não houve diferença entre os grupos LCD e LCL quanto à produção de TGF- β_1 no sobrenadante das culturas em nenhum dos pontos avaliados na cinética. Contudo quando comparamos a produção de TGF- β_1 dentro dos grupos notamos que houve uma tendência de aumento gradativo para ambos ao longo da cinética.

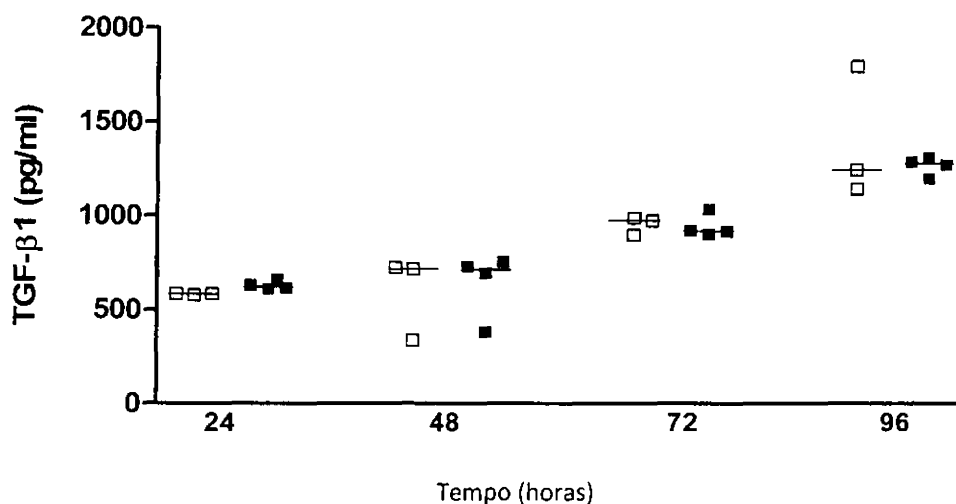


Gráfico 6. Produção de TGF- β_1 por macrófagos de camundongos F1 infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* isolados de diferentes casos de LCL: cepas BA 125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA 276, BA 336, BA 700, BA 820 (■). Os macrófagos foram ativados com 100 ng/ml de LPS por um período de 20 horas antes de cada ponto experimental. O TGF- β_1 foi dosado por ELISA no sobrenadante da cultura. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à mediana dos valores dentro de cada grupo. A imagem é representativa de três ensaios independentes. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's.

Uma das principais moléculas leishmanicida produzida por macrófagos é o óxido nítrico (NO). Para determinar se a infecção com os isolados de LCL e LCD induzem diferentes níveis da produção de óxido nítrico, macrófagos peritoneais de camundongos F1 foram cultivados com formas promastigotas em fase estacionária das diferentes cepas de *L. amazonensis*. O sobrenadante das culturas foi obtido após 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção e a quantidade de NO foi medida através da reação de Griess. Como pode ser visto na gráfico 7, não houve diferença na capacidade de produção de NO entre os macrófagos infectados com isolados de pacientes com LCD e LCL. Porém quando comparamos a produção de NO dentro dos grupos observamos que tanto para os isolados de LCD quanto para os de LCL, houve uma redução após 48h que é mantida até o ponto de 96 horas.

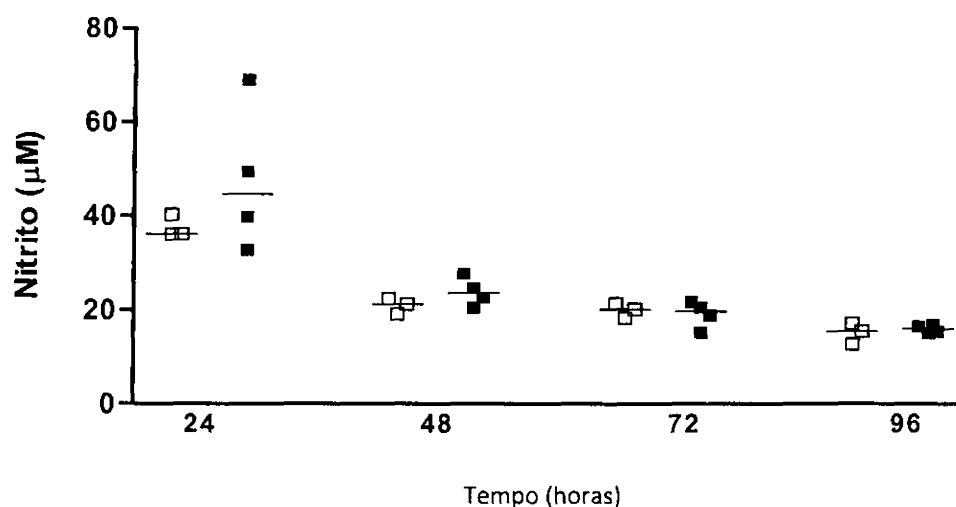


Gráfico 7. Produção de NO por macrófagos de camundongos F1 infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* isolados de diferentes casos com LCL: cepas BA 125, M2269, LV 79 (□) e LCD: BA 276, BA 336, BA 700, BA 820 (■). Os macrófagos foram ativados com 50 ng/ml de INF- γ e 100 ng/ml de LPS por um período de 20 horas antes de cada ponto experimental. Após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção a produção de NO na cultura de macrófagos foi quantificada pela Reação de Griess no sobrenadante. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis*. Os dados mostrados são referentes à mediana dos valores dentro de cada grupo. A imagem é representativa de três ensaios independentes. Foi utilizado Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn's.

9 DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária com amplo espectro clínico. Porém, não existe uma associação direta entre as possíveis manifestações e as diferentes espécies de *Leishmania*. Assim, não é possível identificar o parasita a partir da clínica do hospedeiro, já que diferentes espécies de *Leishmania* podem causar doenças clinicamente similares e uma única espécie pode produzir um amplo espectro de manifestações clínicas. Nesse contexto, *Leishmania amazonensis* já foi associada a todas as formas de leishmaniose tegumentar e eventualmente, à forma visceral (Barral *et al.*, 1991). No presente estudo, a fenotipagem dos isolados de *L. amazonensis* confirmou que se trata de um mesmo agente etiológico para as formas LCD e LCL (tabela II). Apesar disso, não podemos descartar que exista uma subespeciação para *L. amazonensis*. Nesse sentido, já foi sugerido que para *Leishmania braziliensis* existe mais de três subespécies relacionadas à LCL e à Leishmaniose Mucocutânea (Walton, 1987; Kahl *et al.*, 1990).

No Brasil, *Leishmania amazonensis* é a espécie majoritária associada à LCD, sendo a maioria dos casos clínicos relatados no Maranhão, local de onde foram isoladas as cepas utilizadas no nosso estudo (Costa, 1998). Com relação aos isolados de pacientes com LCL, foram utilizadas casos clínicos da Bahia, disponíveis em nosso banco de cepas de *Leishmania* (FIOCRUZ-BA). Ambos os grupos apresentaram aspectos clínicos, imunológicos, parasitológicos, anatomopatológicos e terapêuticos característicos das distintas manifestações clínicas, LCL e LCD (Convit *et al.*, 1972; Guimarães *et al.*, 2005). Também foi incluída nesse estudo a cepa de *L. amazonensis* referência da Organização Mundial de Saúde e a cepa utilizada pelo grupo de Dr. Marcello Barcinski, já caracterizada quanto à exposição de fosfatidilserina (PS), ambas isoladas de casos de LCL.

A LCD é uma manifestação rara da leishmaniose, caracterizada pela presença de macrófagos intensamente parasitados e imunossupressão da resposta imune celular específica para antígeno de *Leishmania*. Na maioria dos casos os pacientes são resistentes ao tratamento específico e apresentam inúmeras recidivas (Costa *et al.*, 1992; Convit *et al.*, 1972). Os isolados de *L. amazonensis* aqui utilizados foram obtidos de pacientes na fase ativa da doença, apresentando os parâmetros clínicos e imunológicos da LCD estabelecidos por Convit (Tabela I) (Convit *et al.*, 1972). Os fatores determinantes da LCD permanecem sem esclarecimentos definitivos, podendo estar associados tanto a eventos imunológicos e genéticos do paciente quanto a fatores patogênicos relacionados ao parasita e ao vetor (Barral-netto *et al.*, 1986; Liew, 1992; Carvalho *et al.*, 1994; Bomfim *et al.*, 1996). Nesta dissertação, buscamos avaliar a exposição de PS como um fator do parasita que poderia contribuir durante a interação parasita-hospedeiro como possível mecanismo imunossupressor da LCD.

A exposição e o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis* têm sido implicados na desativação de macrófagos, fenômeno que foi denominado de “Mimetismo Apoptótico” (De Freitas Balanco *et al.* 2001, Wanderley *et al.* 2005). Dentro desse contexto, nossa hipótese é que as cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCD modulariam positivamente a exposição de PS na superfície dos parasitas, favorecendo sua infecção e sobrevivência na célula hospedeira. Para testarmos nossa hipótese, comparamos a exposição de PS na superfície de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com forma cutânea difusa e cutânea localizada e a resposta deflagrada pela interação desses isolados com macrófagos peritoneais murinos.

Inicialmente investigamos se existia alguma diferença entre as cepas isoladas de casos com LCL e LCD com relação à exposição de PS na superfície das formas promastigotas. Apesar de não termos observado diferença na exposição de PS entre os diferentes isolados

durante os sete dias de cultura, houve um discreto aumento para ambos os grupos, LCL e LCD, no último dia de análise (Figura 5). Essa observação sugere que a exposição de PS faz parte do processo de morte das promastigotas após alcançarem a diferenciação em formas estacionárias metacíclicas. Nesse sentido, van Zandbergen e colaboradores demonstraram que promastigotas apoptóticas de *L. major*, em um comportamento altruísta, permite a sobrevivência intracelular dos parasitas viáveis (van Zandbergen *et al.*, 2006). O comportamento altruísta tem sido descrito como mecanismo de sobrevivência para várias outras populações de organismos unicelulares, como *Dictyostelium discoideum* (Kaiser, 1986) e para o *Bacillus subtilis* (Kaiser, 1993).

Wanderley e colaboradores apontam o PS como a molécula responsável para este tipo de comportamento (Wanderley *et al.*, 2009). Os autores demonstraram que o reconhecimento das células PS^{pos} pelos macrófagos estimula os processos de internalização e inibe a atividade microbicida, facilitando a sobrevivência e a proliferação das formas PS^{neg} no interior da célula. A importância deste mecanismo de cooperação entre as duas populações foi confirmada em modelo de infecção *in vivo*. Camundongos infectados com formas metacíclicas PS^{pos} ou PS^{neg} isoladamente não desenvolvem lesão ou apresentam lesões significativamente menores que aquelas infectadas com as duas formas do parasita (Wanderley *et al.*, 2009). Apesar de não termos observado diferença quanto à exposição de PS na superfície dos promastigotas de *L. amazonensis* isolados de pacientes com LCL e LCD, esse parece ser um mecanismo geral que constitui um fator de virulência importante no estabelecimento da infecção por esse parasita.

Os mecanismos pelos quais a exposição de PS favorece a infecção da *Leishmania* diferem entre as duas formas evolutivas do parasita. Enquanto que, em formas promastigotas esta exposição parece ser consequência da progressão na diferenciação do parasita, a exposição de PS em formas amastigotas é modulada pelo hospedeiro (Wanderley *et al.*,

2006). Assim como para as formas promastigotas, a exposição de PS nas formas amastigotas também representa um importante fator de virulência (De Freitas Balanco *et al.* 2001). Semelhante ao que ocorre durante o processo de morte celular por apoptose, formas amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS na sua superfície, no contexto de “Mimetismo Apoptótico” (De Freitas Balanco *et al.*, 2001).

A exposição de PS pode ser fundamental para o reconhecimento e fagocitose do parasita durante a interação com a célula hospedeira, uma vez que amastigotas podem expor PS na superfície sem evoluírem necessariamente para a morte por apoptose. Amastigotas de *L. amazonensis* purificadas de lesões de camundongos, mantidas em cultura axênica a 34°C, na ausência de células hospedeiras, morrem após alguns dias de cultura, apresentando fragmentação de DNA, característica do processo de morte por apoptose (Moreira & Barcinski, 2004). No entanto quando cultivadas na presença de macrófagos, estas amastigotas são altamente infectivas e sustentam a infecção por vários dias, não apresentando evidências de que estejam em processo de morte (Moreira & Barcinski, 2004).

Existem outros trabalhos na literatura demonstrando que a exposição de PS na superfície de células eucarióticas nem sempre está relacionada ao processo de morte celular. A exposição deste fosfolípido é um fenômeno que antecede a degradação de DNA (Verhoven *et al.*, 1995) que pode ser revertido antes do comprometimento da célula (Yang *et al.*, 2002) e pode estar envolvido em processos de sinalização durante as interações celulares. Hemácias senescentes, por exemplo, podem expor PS na superfície por um longo período de tempo e esta exposição facilita a remoção destas células pelo sistema monocítico-fagocitário no baço (Connor *et al.*, 1994). Esses dados sugerem que o PS exposto na superfície das amastigotas de pacientes com LCD e LCL não está relacionado ao processo de morte, mas de fato ao mecanismo descrito como “Mimetismo Apoptótico”.

Wanderley *et al.* (2006) demonstraram que em modelos murinos de infecção por *L. amazonensis*, a exposição de PS foi dependente do perfil genético de susceptibilidade (BALB/C) ou resistência (C57BL/6), induzindo respectivamente alta ou baixa expressão de PS com conseqüências diferenciais para a resposta imune na eliminação do parasita. Este fato sugere que em camundongos BALB/c, a exposição de PS pode participar do desenvolvimento da doença mais severa quando comparados a camundongos C57BL/6 (Wanderley *et al.*,2006). Tendo em vista a possibilidade da exposição de PS ser modulada por diferentes hospedeiros, em nossos ensaios de interação parasito-hospedeiro, utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos F1 (cruzamento de BALB/c e C57BL/6) com a intenção de anular uma possível modulação diferencial da exposição de PS pelo hospedeiro.

Para determinarmos se existe diferença na exposição de PS entre as formas amastigotas dos isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCL e LCD, infectamos macrófagos peritoneais de camundongos F1 com os diferentes isolados. Nossos resultados demonstraram que no tempo de 24 horas pós-infecção, amastigotas de cepas isoladas de pacientes com LCD apresentaram maior positividade de exposição de PS quando comparadas com as cepas isoladas de casos de LCL (figura 6). A diferença encontrada para os valores de PS no tempo de 24 horas pós-infecção pode ser decorrente de uma modulação positiva na exposição deste fosfolípido pelo hospedeiro do qual foram isolados e que possivelmente não é mantida durante a cinética de infecção *in vitro*.

A diferença na exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* de LCL e LCD observada no tempo de 24 horas refletiram na resposta macrofágica durante o curso da infecção tanto na porcentagem de macrófagos infectados (figura 7) bem como no índice de infectividade (figura 8). Apesar dos valores semelhantes na avaliação do tempo inicial de 5 horas, após 24 horas se observa uma manutenção da infecção pelas cepas de LCD enquanto que ocorre uma redução nas cepas de LCL. Esta diferença no tempo de 72 horas foi diretamente relacionada à

maior exposição de PS na superfície das ama-LCD no tempo de 24 horas em relação às ama-LCL (Figuras 9 e 10). Nossos dados sugerem que as conseqüências do reconhecimento de PS interferem no curso da infecção nos momentos tardios e que a maior exposição de PS nas cepas LCD possa estar associada a mecanismos de desativação do macrófago mediados por PS, que possibilitariam a manutenção da infecção e o crescimento intramacrofágico exacerbado. Nesse sentido, já havia sido demonstrado que formas amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de inibir a atividade microbicida de fagócitos através da exposição e do reconhecimento de PS na sua superfície, o que favorece a replicação do parasita (De Freitas Balanco *et al.*, 2001).

Nossos resultados indicam que isolados de uma mesma espécie de *Leishmania*, proveniente de diferentes formas clínicas apresentam variações que determinam diferenças no curso da infecção. Akuffo e colaboradores (1987) demonstraram que culturas de células mononucleares de sangue periférico de pacientes, quando estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania aethiopica* (agente etiológico da LCL e da LCD na Etiópia) respondem menos ao antígeno de *Leishmania* obtido de paciente com LCD, nos testes de proliferação celular e produção de IFN- γ , do que aos antígenos de *Leishmania* obtido de paciente com LCL (Akuffo *et al.*, 1987). Além disso, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que cepas de *L. amazonensis* isoladas de diferentes formas clínicas promovem padrões diferentes de lesão no curso da infecção em camundongos BALB/c, sugerindo que devam existir diferenças sutis entre esses parasitas, não relacionadas com características e moléculas utilizadas para taxonomia, que sejam importantes na determinação do curso da infecção (Almeida *et al.* 1996). Embora esses trabalhos reforcem a participação de fatores associados ao parasita na Leishmaniose, não esclarecem quais são e como esses fatores atuariam na patogênese e imunorregulação de tal doença.

Uma característica marcante das análises histológicas feitas em biopsias de pacientes com LCD é a presença de macrófagos amplamente vacuolizados (Bittencourt *et al.*, 1995). O tamanho dos vacúolos induzidos pelos isolados de pacientes com LCD no tempo de 72 horas foram consideravelmente maiores do que os induzidos pelos isolados de casos de LCL (figura 11). Embora esta observação não tenha sido quantificada (análise morfométrica em andamento), ela é bastante interessante, tendo em vista a sua semelhança com a descrição histopatológica para as lesões dos pacientes com LCD e LCL dos quais foram isoladas as cepas utilizadas neste estudo.

Existem evidências de que amastigotas de *L. mexicana* secretam proteofosfoglicanas no interior do VP e estes compostos induzem a formação de grandes vacúolos nos macrófagos mesmo na ausência do parasita, sugerindo que possam contribuir para a formação dos vacúolos característicos desta espécie (Peters *et al.*, 1997). Por outro lado, Wanderley e colaboradores demonstraram que os grandes vacúolos formados durante a internalização das formas amastigotas de *L. amazonensis* são consequência de um processo de macropinocitose induzido pelo parasita e são dependentes da exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2006). Embora os mecanismos pelos quais as espécies do complexo *L. mexicana* manipulam a formação de grandes vacúolos parasitóforos ainda não estejam bem caracterizados, tem sido sugerido que a expansão do VP pode proteger a *L. amazonensis* dos mecanismos microbicidas do hospedeiro, por diluir as enzimas proteolíticas presentes no VP (Sacks & Sher, 2002) e a fusão das vesículas macropinocíticas com o vacúolo podem ser um importante mecanismo de aquisição de nutrientes pelas amastigotas intracelulares. Se a indução e manutenção dos grandes vacúolos por isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD está ou não relacionado à exposição de PS permanece a ser explorado.

O TGF- β_1 tem sido a principal citocina envolvida nos mecanismos de desativação macrofágica em resposta ao reconhecimento

nto de PS. A produção desta molécula tem sido observada em modelos de reconhecimento de células apoptóticas (Fadok *et al.*, 1998; Savill *et al.*, 2002) e lipossomos contendo PS (Hoffmann *et al.*, 2005; Otsuka *et al.*, 2007). Da mesma forma que o observado durante o reconhecimento de células apoptóticas, De Freitas Balanco e colaboradores (2001) demonstraram a produção de citocinas antiinflamatórias por macrófagos após o reconhecimento de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis*. Os autores detectaram a produção de TGF- β após a fagocitose de formas amastigotas, processo que é inibido quando o parasita é incubado previamente com Anexina-V. Posteriormente Wanderley *et al.*, (2006) demonstraram que a produção destas citocinas anti-inflamatórias é diretamente dependente da quantidade de PS exposto na superfície do parasita, comprovando a atividade funcional desta molécula.

Para determinarmos se o aumento da exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD se correlaciona com um mecanismo de inativação macrofágica via TGF- β_1 , avaliamos a produção desta citocina no sobrenadante de macrófagos ativado com LPS e infectado com os diferentes isolados. Nossos resultados mostraram que houve um aumento gradual na produção de TGF- β_1 ao longo da infecção tanto para os macrófagos infectados com os isolados de pacientes com LCD, quanto para os infectados com os isolados de pacientes com LCL, não sendo observada diferenças entre os grupos (figura 12). Comparando os valores de PS expostos no tempo de 24 horas e a produção de TGF- β no tempo de 72 horas, nossos resultados indicam que existe uma tendência de correlação positiva entre a exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* com a produção de TGF- β_1 (dados não mostrados). Sendo assim é possível que o aumento na produção de TGF- β_1 ao longo da cinética no sobrenadante dos macrófagos infectados com os isolados de *L. amazonensis* de

pacientes com LCD e LCL esteja associada ao aumento da exposição de PS na superfície das amastigotas.

Além de ser umas das principais citocinas envolvidas na resposta macrofágica deflagrada em reconhecimento ao PS, o TGF- β_1 está diretamente relacionado à regulação dos eventos que sucedem o reconhecimento deste fosfolipídio. Freire-de-Lima e colaboradores (2006) demonstraram que a indução da produção de mediadores antiinflamatórios por células apoptóticas é bloqueada na presença de macrófagos da linhagem RAW com receptor truncado para TGF- β_1 (RAWT β II). Por outro lado, A supressão de NO e a expressão de iNOS induzidos pelo reconhecimento de PS foi revertida em macrófagos RAWT β II (Freire-de-Lima *et al.*, 2006). Estes resultados indicam o TGF- β como principal regulador da expressão de mediadores antiinflamatórios e concomitante inibição dos mediadores pró-inflamatórios induzidos em resposta ao reconhecimento de PS por macrófagos.

Embora nossas observações em relação ao aumento na produção de TGF- β em resposta a infecção pelos diferentes isolados de *L. amazonensis* estejam de acordo com dados da literatura, não esclarecem qual mecanismo seria responsável pelas diferenças encontradas no perfil da resposta macrofágica induzidos pelos isolados de LCD e os de LCL. Nossos resultados sugerem que devam existir outras moléculas atuando em conjunto com o TGF- β_1 , que não foram avaliadas neste estudo e que podem estar influenciando no curso da infecção. Nesse sentido tem se destacado o papel da IL-10 na imunomodulação da resposta do hospedeiro. Camundongos BALB/c *knockout* para IL-10 (IL-10 *-/-*) infectados com *L. major* controlam a progressão da doença, além de terem lesões e carga parasitária relativamente menores do que os camundongos selvagens (Kane *et al.*, 2001). Em humanos, a produção desta citocina é correlacionada com a progressão da lesão em pacientes com LCL (Louzir *et al.* 1998) e LCD (Bomfim, *et al.* 1996). Além disso, a IL-10 também tem sido relacionada aos efeitos imunossupressores em resposta ao reconhecimento de PS na superfície de células

apoptóticas (Voll *et al.*, 1997; Fadok *et al.*, 1998) e de *L. amazonensis* (De Freitas Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006). Nesse sentido, buscaremos futuramente investigar o perfil de citocinas deflagradas pela interação de *L. amazonensis* de casos com LCL e LCD e se existe uma correlação com a quantidade de PS exposto na superfície desses parasitas.

A produção de TGF- β_1 está amplamente ligada à inibição da atividade microbicida de macrófagos e o óxido nítrico (NO) tem sido descrito como a principal molécula leishmanicida. Para determinarmos se o NO participa dos mecanismos leishmanicidas induzidos pelos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD e LCL, avaliamos a produção de NO no sobrenadante das culturas através da reação de Griess. Nossos resultados revelaram que não houve diferença na produção de NO entre os grupos LCD e LCL em nenhum dos pontos avaliados (figura 13). Entretanto, observamos que houve uma redução na produção de NO para ambos os grupos estudados ao longo da cinética, e que esta redução é inversamente proporcional a quantidade de TGF produzido e ao PS exposto na superfície das amastigotas. A infecção com amastigotas de *L. amazonensis* inibe a produção de NO por macrófagos ativados e esta inibição é dependente da ação de TGF- β_1 (Wanderley *et al.*, 2006). Dentro desse contexto, nossos dados sugerem que a redução da produção de NO induzida pelos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD e LCL pode estar associada ao aumento da produção de TGF- β_1 .

Os mecanismos até aqui descritos para desativação macrofágica através do reconhecimento de PS não foram suficientes para explicar a maior permissividade à infecção com *L. amazonensis* de pacientes com LCD em relação aos isolados de casos com LCL. Nossos resultados sugerem que os isolados de pacientes com LCL sejam mais susceptíveis ao NO do que os isolados de pacientes com LCD, o que justificaria em parte a redução do número de parasitas observada neste grupo, mesmo com a concentração de NO produzida sendo similar ao do grupo LCD. Giudice e colaboradores (2007) demonstraram que a

resistência ao NO de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas se correlaciona com a severidade da doença. Pacientes infectados com os isolados resistentes ao NO tiveram lesões significativamente maiores do que as dos pacientes infectados com os isolados susceptíveis ao NO. Além disso, os autores também demonstraram que macrófagos humanos infectados *in vitro* com amastigotas de isolados resistentes ao NO têm uma taxa de proliferação melhor que os isolados susceptíveis (Giudice *et al.* 2007). Entretanto, se a exposição de PS na superfície de *L. amazonensis* modula negativamente as vias de produção de NO na célula hospedeira ainda permanece em aberto.

Em conjunto nossos resultados demonstraram que os isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD foram mais infectivos do que os isolados casos com LCL. Nossos dados sugerem o aumento na exposição o PS como um dos possíveis fatores patogênicos para LCD. No entanto é preciso aprofundar os mecanismos pelos quais o reconhecimento de PS na superfície dos isolados de *L. amazonensis* contribui para desativar a resposta macrofágica que favorece o estabelecimento e manutenção da infecção em pacientes com LCD.

10 CONCLUSÃO

- Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* isoladas de casos de LCL e LCD não apresentam diferenças quanto à exposição de PS ao longo da curva de crescimento;
- Os isolados de *Leishmania amazonensis* diferem na sua capacidade de expor fosfatidilserina no interior de macrófagos murinos infectados, sendo que as formas isoladas de pacientes com LCD têm maior exposição do que as isoladas de pacientes com LCL;
- A diferença de exposição de PS pelas amastigotas de pacientes com LCD e LCL se correlaciona com a porcentagem de macrófagos infectados e o índice de infectividade;
- Valores similares na produção de TGF- β_1 e óxido nítrico entre os grupos sugere que outros mecanismos imunorregulatórios estejam relacionados com a resposta macrofágica induzida pelos isolados de pacientes com LCD e LCL;
- Em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento na exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD representa um importante mecanismo de adaptação à sobrevivência e estabelecimento da infecção.

11 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AFONSO, L.C.C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infec. Immun.* 1993. 61:2952-2959.
- AKTAS, O.; PROZOROVSKI, T.; ZIPP, F. Death ligands and autoimmune demyelination. *Neuroscientist.* 2006. 12 (4):305-316.
- AKUFFO, H.; SCHURR, E.; ANDERSSON, G.; YAMANEBERHAN, T.; BRITTON, S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. *Scand J Immunol.* 1987. 26 (6):717-721.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol.* 1992. 31:175-254.
- ALMEIDA, R.P.; BARRAL-NETTO, M.; DE JESUS, A.M.; DE FREITAS, L.A.; CARVALHO, E.M.; BARRAL, A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. *Am J Trop Med Hyg.* 1996. 54(2):178-184.
- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infec. Immun.* 1990. 58: 779-787.
- ANTOINE, J.C.; 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.
- BARBIERI, C.L.; BROWN, K.; RABINOVITCH, M. Depletion of secondary lysosomes in mouse macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*: a cytochemical study. *Z. Parasitenkd.* 1985. 71(2):159-168
- BARRAL, A.; PEDRAL - SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G.; MOMEM H.; MAHON-PRATT, D.; JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR, W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1991. 44:536-546.
- BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C. E.; SKEIKY, Y. A.; ELLINGSWORTH L. R.; TWARDZIK D. R.; REED S. G. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* 1992. 257:545-548.
- BARRAL-NETTO, M.; BADARÓ, R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M. Immunology of tegumentary leishmaniasis (in portuguese). Review. *Rev. Soc. Bras Med.Trop.* 1986. 19:173-191.

BARRAL-NETTO, M.; MACHADO, P.L.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis. Recent advances in physiopathology and treatment. *Eur. J. Dermatol.* 1995. 5:104 -113.

BASSELIN, M.; COOMBS, G.H.; BARRETT, M.P. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000. 109(1):37-46.

BENCHIMOL, M. & DE SOUZA, W. *Leishmania mexicana amazonensis*: attachment to the membrane of the phagocytic vacuole of macrophages in vivo. *Z. Parasitenkd.* 1981. 66(1):25-29

BEVERS, E. M.; COMFURIUS, P.; DEKKERS, D. W.; ZWAAL, R. F. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. 1439(3): 317-330.

BITTENCOURT, A.L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int. J. Dermatol.* 1995. 34(7):474-479.

BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 1996. 84:188-194.

BÖSE, J.; GRUBER, A. D.; HELMING, L.; SCHIEBE, S.; WEGENER, I.; HAFNER, M.; BEALES, M.; KÖNTGEN, F., LENGELING, A. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J. Biol.* 2004. 3(4):15.

BRATTON, D.L. & HENSON, P.M. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? *Curr. Biol.* 2008. 18(2):R76-79.
BURCHMORE, R.J. & HART, D.T. Glucose transport in amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. 74(1):77-86.

CASTRO, R.; SCOTT, K.; JORDAN, T.; EVANS, B.; CRAIG, J.; PETERS, E.L.; SWIER, K. The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. *J. Parasitol.* 2006. 92 (6):1162-1170.

CARVALHO, E.M.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L.; BITTENCOURT, A.L.; MARSDEN, P.D. Clinical and immunological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. 1994. *Acta Tropica.* 56:315-325.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. 5(11):873-882.

CIKALA, M.; ALEXANDROVA, O.; DAVID, C.N.; PRÖSCHEL, M.; STIENING, B.; CRAMER, P.; BÖTTGER, A. The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol.* 2004. 5:26.

CONNOR, J.; PAK, C.C.; SCHROIT, A.J. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1994. 269(4):2399-2404.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDON, A J.; Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972. 66(4):603-610.

COSTA, J.M.; SALDANHA, A.C.; SILVA, C.M.; BRANCO, M. DOS R.; BARRAL, A.; CARVALHO, E.M.; BITTENCOURT, A.L. Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995. 28(1):45-47.

COSTA, J.M.L. Estudo da Leishmaniose Cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão-Brasil: Avaliação terapêutica e correlação do perfil imunológico entre os pacientes e seus familiares. Resumo de tese de doutoramento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1998. 31:89- 93.

COSTA, J.M.L.; SALDANHA, A.C.R.; SILVA, A.C.M.; SERRA-NETO, A.; GALVÃO, C.E.S.; SILVA, C.M.P. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no estado do Maranhão: aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1992. 25:115-123.

COURRET, N.; FRÉHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX P.; ANTOINE, J.C. Biogenesis of Leishmania-harboring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell Sci.* 2002. 115(11):2303-2316.

CUI, P.; QIN, B.; LIU, N.; PAN, G.; PEI, D. Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp. Cell Res.* 2004. 293(1):154-163.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. JR.; MOMEN, H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994. 50(3):296-311.

DANIEL, P. T.; STURM, I.; RITSCHER, S.; FRIEDRICH, K.; DORKEN, B.; BENDZKO, P.; HILLEBRAND, T. Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Anal. Biochem.* 1999. 266(1):110-115

DeCATHÉLINEAU, A. M. & HENSON, P. M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem.* 2003. 39:105-117. Review.

DE FREITAS BALANCO, J.M.; MOREIRA, M.E.; BONOMO, A.; BOZZA, P.T.; AMARANTES-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M.A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* 2001. 11:1870-1873.

- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004. 27(5):305-318.
- DE SOUZA LEO, S.; LANG, T.; PRINA, E.; HELLIO, R.; ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* 1995. 108 (10):3219-3231.
- DIAZ, C. & SCHROIT, A. J. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J. Membrane Biol.* 1996. 151:1-9.
- FADEEL, B. & ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern. Med.* 2005. 258(6):479-517.
- FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; ROSE, D. M.; PEARSON, A.; EZEKEWITZ, R. A.; HENSON, P. M. A receptor for phosphatidylserine specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000. 405:85-87.
- FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992. 148:2207-2216.
- FADOK, V.A.; BRATTON, D.L.; KONOWAL, A.; FREED, P.W.; WESTCOTT J.Y.; HENSON, P.M. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF. *J Clin Invest.* 1998. 101:890-891
- FANG, M.; ZHANG, H. Q.; XUE, S. B. Apoptosis of HL-60 cells induced by Harringtonine: membrane blebs, nucleus blebs and chromatin condensation. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 1996. 29 (3):221-233.
- FONSECA, A.P.M.; ARAÚJO, T.; FONSECA, W.S.M. Leishmaniose tegumentar difusa. *Med. Cutânea. ILA.* 1981. 9:317-322.
- FREIRE-DE-LIMA, C. G.; XIAO, Y. Q.; GARDAL, S. J.; BRATTON, D. L.; SCHIEMANN, W. P.; HENSON, P. M. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 2006. 281(50):38376-38384.
- FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J.A. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J. Immunol.* 1993. 150(5):1857-1864.
- GARDAL, S.J.; BRATTON, D.L.; OGDEN, C.A.; HENSON, P.M. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J. Leukoc. Biol.* 2006. 79(5):896-903.
- GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.; PEREIRA, J.M.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; HO, J.L.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of

Leishmania (Leishmania) amazonensis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect Dis. 2007. 7:7.

GLASER, T.A.; MUKKADA, A.J. Proline transport in *Leishmania donovani* amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential. Mol. Biochem. Parasitol. 1992. 51(1): 1-8.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Biochem. 1982. 126 (1):131-138.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. Int. J. Parasitol. 2004. 34(4):433-444.

HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; COFFMAN, R.L.; LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. J. Exp. Med. 1989. 169(1):59-72.

HOFFMANN, P.R.; KENCH, J.A.; VONDRACEK, A.; KRUK, E.; DALEKE, D.L.; JORDAN, M.; MARRACK. P.; HENSON, P.M.; FADOK, V.A. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. J. Immunol. 2005. 174(3):1393-1404.

HUYNH, C.; SACKS, D.L.; ANDREWS, N.W. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes J. Exp. Med. 2006. 203 (10):2363-2375.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L.C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. J. Exp. Med. 2001. 193:777-784.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2002. 66(4):338-345.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. Infect. Immun. 2003. 71(8):4278-4288.

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4 independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. J. Immunol. 2000. 165:364-372.

JONES, D.E.; ACKERMANN, M.R.; WILLE, U.; HUNTER, C.A.; SCOTT, P. Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. Infect. Immun. 2002. 70(4):2151-2158.

KAHL, L.P.; BYRAM, J.E.; DAVID, J.R. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Três Braços, Bahia, Brazil differ in virulence for the golden hamster. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990. 84(6): 783-784.

KAISER, D. & LOSICK, R. How and why bacteria talk to each other. *Cell.* 1993. 73(5): 873-885.

KAISER, D. Control of multicellular development: Dictyostelium and Myxococcus. *Annu. Rev. Genet.* 1986. 20:539-566.

KANE, M.M. & MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 2001. 166 (2):1141-1147.

KRIESER, R.J.; MOORE, F.E.; DRESNEK, D.; PELLOCK, B.J.; PATEL, R.; HUANG, A.; BRACHMANN, C.; WHITE, K. The Drosophila homolog of the putative phosphatidylserine receptor functions to inhibit apoptosis. *Development.* 2007. 134 (13):2407-2414.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Bases Patológicas das Doenças. 2005. 7ª Edição. Editora Elsevier.

KUNISAKI, Y.; MASUKO, S.; NODA, M.; INAYOSHI, A.; SANUI, T.; HARADA, M.; SASAZUKI, T.; FUKUI, Y. Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. *Blood.* 2004. 103(9):3362-3364.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987. 81(4):702-703.

LANG, T.; DE CHASTELLIER, C.; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEO, S.D.E.S., ANTOINE, J.C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Cell Sci.* 1994a. 107 (1):69-82.

LANG, T.; HELLIO, R.; KAYE, P.M.; ANTOINE, J.C. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J. Cell Sci.* 1994b. 107 (8):2137-2150.

LI, M. O.; SARKISIAN, M. R.; MEHAL, W. Z.; RAKIC, P.; FLAVELL, R. A.; Liew, F. Y. Induction, regulation and function of T cell subsets in leishmaniasis. *Chem. Imm.* 1992. 54: 117 - 135.

LOUZIR, H.; MELBY, P.C.; BEN SALAH, A.; MARRAKCHI, H.; AOUN, K.; BEN ISMAIL, R.; DELLAGI, K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.* 1998. 177(6):1687-1695.

MARCHESINI, N. & DOCAMPO, R. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002. 119 (2):225-236.

- McDONALD, P. P.; FADOK, V. A.; BRATTON, D.; HENSON, P. M. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J. Immunol.* 1999. 163:6164-6172.
- MERCER, J. & HELENIUS, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science.* 2008. 320(5875):531-535.
- MILLER, D.K. The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin. Immunol.* 1997. 9(1):35-49.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007. 2ª Ed. Brasília, DF.
- MITCHELL, J. E.; CVETANOVIC, M.; TIBREWAL, N.; PATEL, V.; COLAMONICI, O. R.; LI, M. O.; FLAVELL, R. A.; LEVINE, J. S.; BIRGE, R. B.; UCKER, D. S. The presumptive phosphatidylserine receptor is dispensable for innate anti-inflammatory recognition and clearance of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 2006. 281(9): 5718-5725.
- MODELELL, M.; CORRALIZA, I. M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25(4): 1101-1104.
- MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of Leishmania. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2003. (97) Suppl 1:29-45.
- MOREIRA, M.E. & BARCINSKI, M.A. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad. Bras. Cienc.* 2004. 76(1):93-115.
- MOREIRA, M. E.; DEL PORTILLO, H. A.; MILDNER, R. V.; DE FREITAS BALANCO, J. M.; BARCINSKI, M. A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J. Cell. Physiol.* 1996. 167(2):305-313.
- MORI, M. & GOTOH, T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000. (275):715-719.
- OBERHAMMER, F. A.; HOCHEGGER, K.; FROSCHL, G.; TIEFENBACHER, R.; PAVELKA, M. Chromatin condensation during apoptosis is accompanied by degradation of lamina A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase. *J Cell Biol.* 1994. 126(4):827-837.
- OHYAMA, H.; YAMADA, T.; OHKAWA, A.; WATANABE, I. Radiation-induced formation of apoptotic bodies in rat thymus. *Radiat. Res.* 1985. 101(1):123-130.
- OTSUKA, M.; NEGISHI, Y.; ARAMAKI, Y. Involvement of phosphatidylinositol-3-kinase and ERK pathways in the production of TGF-beta1 by macrophages treated with liposomes composed of phosphatidylserine. *FEBS Lett.* 2007. 581(2):325-330.

PARK, A.; HONDOWICZ, B.; SCOTT, P. IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* 2000. 165:896-902.

PETERS, C.; STIERHOF, Y.D.; ILG, T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana amastigotes* causes vacuole formation in macrophages. *Infect. Immun.* 1997. 65(2): 783-786.

PETERSON, E.A.; NEVA, F.A.; BARRAL, A.; CORREA-CORONAS, R.; BOGGART-DIAZ, H.; MARTINEZ, D.; WARD, F.E. Monocyte suppression of antigen specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patient from Dominican Republic. *Journal of Immunology.* 1984. 132:2603-2606.

PRINA, E.; ANTOINE, J.C.; WIEDERANDERS, B.; KIRSCHKE, H. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect Immun.* 1990. 58(6):1730-1737.

PRINA, E.; JOUANNE, C.; DE SOUZA LEÃO, S.; SZABO, A.; GUILLET, J.G.; ANTOINE, J.C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol.* 1993. 151(4):2050-2061.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004. 72(2):988-995

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Exp. Parasitol.* 2008. 119(1):15-23.

SACKS, D. & SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 2002. 3(11):1041-1047.

SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. 2(11):845-858.

SACKS, D.L. & PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984. 223(4643):1417-1419.

SALDANHA, A.C.R.; COSTA, A.A.U.M.L.; ELKHOURY, A.N.; BÁFICA, A.; BARRAL, A.; COSTA, J.M.L. Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) in Brazil. 2007. Manuscrito submetido para publicação.

SAVILL, J. & FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2001. (412):133-135.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. 2002. *Nat. Rev. Immunol.* 2(12): 965-975.

SCOTT, P. & SHER, A. A spectrum in the susceptibility of leishmanial strains to intracellular killing by murine macrophages. 1986. *J. Immunol.* 1986. 136(4):1461-1466.

SHAW, J. The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2007. 102(5):541-547.

STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1983. 9(2):93-104.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C.L.; MAYOR, S.E.; SUBRAMANYAM, J.M.; GOLDMAN, S.J.; SIEBURTH, D.S.; WOLF, S.F.; SCHAUB, R.G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 1993. 177(6):1797-1802.

TAIT, J. F. & GIBSON, D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992. 298(1):187-191.

TEPPER, A. D. Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *J. Cell. Biol.* 2000. 150(1):155-164.

TOUNEKTI, O.; BELEHRADEK, J. JR.; MIR, L. M. Relationships between DNA fragmentation, chromatin condensation, and changes in flow cytometry profiles detected during apoptosis. *Exp. Cell Res.* 1995. 217(2):506-516.

VAN DEN EIJNDE, S.M.; BOSCHART, L.; BAEHRECKE, E.H.; DE ZEEUW, C.I.; REUTELINGSPERGER, C.P.; VERMEIJ-KEERS, C. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis.* 1998. 3(1):9-16.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; HÖLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. 103(37):13837-13842.

VERAS, P.S.; DE CHASTELLIER, C.; RABINOVITCH, M. Transfer of zymosan (yeast cell walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Exp. Med.* 1992. 176(3):639-646.

VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R.A.; WILLIAMSON, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995. 182(5):1597-1601.

VINCENDEAU, P.; GOBERT, A.P.; DAULOUÈDE, S.; MOYNET, D.; MOSSALAYI, M.D. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 2003. 19(1):9-12.

VIDAL, S.; TREMBLAY, M.L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J. Exp. Med.* 1995. 182(3):655-666.

VOLL, R. E.; HERRMANN, M.; ROTH, E. A.; STACH, C.; KALDEN, J. R.; GIRKONTAITE, I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997. 390:350-351.

WANDERLEY, J.L.M.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M. E.C.; BARCINSKI, M.A. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005. 38(6):807-812.

WANDERLEY, J.L.M.; MOREIRA, M.E.C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A.; BARCINSKI, M.A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis*. *J. Immunol.* 2006. 176(3): 1834-1839.

WANDERLEY, J.L.M.; MOREIRA, M.E.C.; BENJAMIN, A.; BONOMO, A.; BARCINSKI, M.A. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis*. *Plos One.* 2009. 176(3): 1834-1839.

YANG, M.Y.; CHUANG, H.; CHEN, R.F.; YANG, K.D. Reversible phosphatidylserine expression on blood granulocytes related to membrane perturbation but not DNA strand breaks. *J. Leukoc. Biol.* 2002. 71(2):231-237.

ANEXO A - Resultado da caracterização de espécies por Eletroforese de enzimas.



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC - WDCM 731
 Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania*

RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

FORMULÁRIO Nº: ER 17/08

Solicitação (s) nº:

SCD 45/08; SCD 46/08; SCD 47/08; SCD 48/08; SCD 49/08; SCD 50/08; SCD 51/08; SCD 52/08; SCD 53/08

Solicitante (nome e instituição): **Jaqueline França Costa – Lab. Imunorregulação (LIMI) FIOCRUZ/Bania**

Data da entrada da amostra na CLIOC: **20/06/08**

Data da liberação do resultado: **03/09/08**

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
LV 79	057/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 106	058/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i> *	XXXXX
BA 276	059/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 336	060/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 700	061/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i> **	XXXXX
BA 760	062/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 820	063/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 125	064/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i>	XXXXX
BA 690	065/2008	CULTURA	<i>Leishmania amazonensis</i> **	XXXXX

Enzimas ensaiadas:

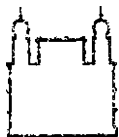
ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH	IDH	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupoillio et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Obs.: * Perfil característico de *L. amazonensis*, mas com variação na enzima IDH.

** Perfil característico de *L. amazonensis* cepa IOC/L 569 (MHOM/BR/1982/M69).

Sugerimos a utilização de outros métodos de caracterização para uma melhor identificação destas amostras.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose



Registro do ensaio: --
Caderno de caracterização por MLEE nº: 1
Página nº: 96

Executado por:
Grazielle Cardoso da Graça
Bióloga

Conferido por:
Elisa Cupolillo
Pesquisador- Curadora CLIOC

Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2008.