

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Jarina Pena Da Mata

Morte celular de macrófagos infectados *in vitro* com *Leishmania*: indução de apoptose por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de necrose por *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Belo Horizonte

2015

Jarina Pena Da Mata

MORTE CELULAR DE MACRÓFAGOS INFECTADOS IN VITRO COM *LEISHMANIA*: INDUÇÃO DE APOPTOSE POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS* E DE NECROSE POR *LEISHMANIA (VIANNIA) GUYANENSIS*

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia de doenças infecciosas.

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Fátima Horta

Belo Horizonte

2015

043 Mata, Jarina Pena da.
Morte celular de macrófagos infectados in vitro com *Leishmania*: indução de apoptose por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de necrose por *Leishmania (Viannia) guyanensis* [manuscrito] / Jarina Pena da Mata. – 2015.
117 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Fátima Horta.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Imunologia. 2. *Leishmania*. 3. *Leishmania guyanensis*. 4. Morte celular. 5. Macrófago. I. Horta, Maria de Fátima Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

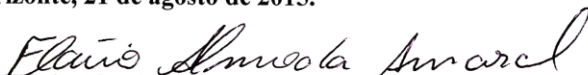
CDU: 577.1

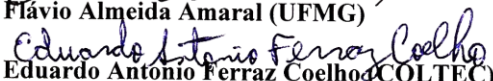


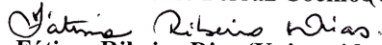
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




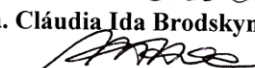
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE JARINA PENA DA MATA. Aos vinte e um dias do mês de agosto de 2015 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado " Morte celular de macrófagos infectados *in vitro* com *Leishmania*. Indução de apoptose por *Leishmania*(*Leishmania*) *amazonensis* e de necrose por *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Maria de Fátima Martins Horta, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (COLTEC), aprovada; Dra. Fátima Ribeiro Dias (Universidade Federal de Goiás), aprovada; Dra. Cláudia Ida Brodskyn (FIOCRUZ - BA), aprovada; Dr. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de agosto de 2015.

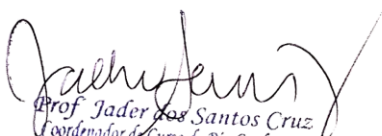

 Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)


 Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (COLTEC)


 Dra. Fátima Ribeiro Dias (Universidade Federal de Goiás)


 Dra. Cláudia Ida Brodskyn (FIOCRUZ - BA)


 Dr. Maria de Fátima Martins Horta - Orientadora (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

A todos que me ajudaram nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Patiu, pelos anos de paciente orientação e conselhos. Os anos de convivência foram sempre repletos de aprendizado e amadurecimento. A pessoa que sou hoje foi, com toda certeza, grandemente influenciada pelo nosso tempo juntas.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pelas oportunidades proporcionadas. Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelas discussões, dentro ou fora da sala de aula, que contribuíram para a minha formação. Aos funcionários do Departamento, por toda ajuda e momentos de convivência.

À Katia Maciel-Lima, à Profa. Dra. Lirlândia Pires Souza pela ajuda imprescindível neste trabalho, seja com discussões ou na bancada, sou extremamente grata por me receberam de braços abertos. À Profa. Dra. Walderez O. Dutra e à Dra. Cristiane A. S. Menezes, pela paciência e experiência.

Aos amigos do laboratório. Ao longo desses anos, vários passaram pelo laboratório e tantos ficarão eternamente no coração. Não tenho palavras para agradecer a todos, pois sem essas amizades eu nunca teria a força e habilidade de conseguir superar dificuldades e celebrar as pequenas vitórias do dia a dia. À Profa. Dra. Santuza M. R. Teixeira, pela oportunidade de convivência, discussões, conselhos e ensinamentos constantes. Ao Elimar, engrenagem essencial ao laboratório e à sanidade mental.

Aos amigos, que, mesmo não participando da rotina no laboratório, também foram fonte de força e inspiração.

À minha família, por tudo e mais.

“I like the scientific spirit—the holding off, the being sure but not too sure, the willingness to surrender ideas when the evidence is against them: this is ultimately fine—it always keeps the way beyond open—always gives life, thought, affection, the whole man, a chance to try over again after a mistake—after a wrong guess.”

Walt Whitman, *Walt Whitman's Camden Conversations*

RESUMO

Leishmania são parasitos protozoários transmitidos em sua forma promastigota para hospedeiros vertebrados pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. No hospedeiro mamífero, amastigotas replicam no interior de macrófagos e infectam células, levando à amplificação da infecção. Embora a transferência de amastigotas para células saudáveis seja um passo crucial na evolução da infecção, ainda não é completamente compreendida. Neste trabalho, infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* em macrófagos de BALB/c e C57BL/6 foram comparadas e a morte celular do macrófago investigada. Como já sabido, infecções em camundongos levam a diferentes progressões da doença. *L. amazonensis* causa infecção crônica em ambas as linhagens murinas (ainda que menos grave em C57BL/6), enquanto que a infecção por *L. guyanensis* é controlada nessas linhagens. *In vitro*, a infecção em macrófagos por *L. amazonensis* é persistente, enquanto o crescimento de *L. guyanensis* é controlado pela célula hospedeira em ambas as linhagens. *L. amazonensis* induz *in vitro* apoptose em macrófagos tanto de C57BL/6 quanto de BALB/c, caracterizada pela exposição de fosfatidilserina (PS), clivagem internucleossômica do DNA, e consequente hipodiploidia. Nenhum destes sinais é observado em macrófagos infectados com *L. guyanensis*, que aparentemente morrem por necrose, como indicado pelo aumento de células positivas para iodeto de propídeo (PI), mas não para Anexina V. Apoptose de macrófagos induzida por *L. amazonensis* se dá pela ativação das caspases 3, 8 e 9, em ambas as linhagens. Considerando estas duas espécies de *Leishmania* e as duas linhagens de camundongos, a apoptose de macrófagos induzida nos momentos iniciais de infecção está associada com uma infecção crônica, independente da sua gravidade. Macrófagos saudáveis foram observados fagocitando células infectadas com *L. amazonensis*, o que, até então, não tinha sido verificado, podendo ser uma forma de propagação da amastigota, levando à amplificação da infecção.

Palavras chave: *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis*, morte celular, macrófago

ABSTRACT

Leishmania are protozoan parasites transmitted by the insect vector during blood meal to the vertebrate host as promastigotes. In the mammal host, amastigotes replicate inside macrophages and are transmitted to healthy cells, amplifying the infection. Although transfer of amastigotes from infected to healthy cells is a crucial step that may shape the outcome of the infection, it is not fully understood. In the present work, *L. amazonensis* and *L. guyanensis* infection in C57BL/6 and BALB/c macrophages were compared and macrophages death was investigated. As previously shown, infection of mice results in distinct outcomes: *L. amazonensis* causes a chronic infection in both strains of mice (although milder in C57BL/6), whereas *L. guyanensis* infection is controlled by the strains. *In vitro*, infection is persistent in *L. amazonensis*-infected macrophages whereas *L. guyanensis* growth is controlled by host cells from both strains of mice. *L. amazonensis* induces apoptosis of both C57BL/6 and BALB/c macrophages *in vitro*, characterized by phosphatidylserine (PS) exposure, DNA cleavage into nucleosomal size fragments, and consequent hypodiploidy. None of these signs were seen in macrophages infected with *L. guyanensis*, which seem to die through necrosis, as indicated by increased propidium iodide (PI)-, but not Annexin V-, positive cells. *L. amazonensis*-induced macrophage apoptosis was through activation of caspases-3, -8 and -9, in both strains of mice. Considering these two species of *Leishmania* and strains of mice, macrophage apoptosis, induced at the initial moments of infection, is associated with chronic infection, regardless of its severity. Healthy macrophages were observed phagocytizing *L. amazonensis*-infected cells, which had not been verified so far, and could be a way of amastigote spreading, leading to the amplification of infection.

Key words: *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis*, cell death, murine macrophage

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	18
Figura 2 – Resumo dos principais eventos celulares da apoptose	27
Figura 3 – Gates representativos para análise em experimentos realizados por citometria de fluxo	38
Figura 4 – Progressão da lesão em camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i> e infecção in vitro de macrófagos peritoneais	43
Figura 5 – Infecção in vitro de macrófagos por <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	46
Figura 6 – Morte de macrófagos infectados in vitro com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i>	48
Figura 7 – Perda de DNA nuclear de células de BALB/c ou C57BL/6 infectadas com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i>	51
Figura 8 – Fragmentação de DNA observada em gel de agarose	53
Figura 9 – Exposição de fosfatidilserina em macrófagos após infecção com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i>	55
Figura 10 – Exposição de PS e permeabilidade a PI em infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com <i>L. amazonensis</i> em diferentes proporções	59
Figura 11 – Detecção de ativação de caspases 3, 8 e 9 em macrófagos de camundongos BALB/c ou C57BL/6 após infecção com <i>L. amazonensis</i>	61
Figura 12 – Detecção de ativação de caspase 8 em macrófagos de camundongos BALB/c ou C57BL/6 após infecção com diferentes cepas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnnV: Anexina V- FITC (*Annexin V-FITC*)

Apaf-1: Fator ativador de protease apoptótica 1 (*Apoptotic protease activating factor 1*)

Bcl-2: Linfoma de célula B 2 (*B cell lymphoma 2*)

FSC: *Forward Scatter*

gp63: glicoproteína 63

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucina

kDa: quilo Daltons

KO: *Knock-out*

LPG: lipofosfoglicano (*lipophosphoglycan*)

N.I.: Não infectado

NaNO₂: Nitrito de sódio

NET: Rede extracelular de neutrófilo (*Neutrophil extracellular trap*)

NO: Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

p/v: peso por volume

pb: Pares de base

PBS: Salina de tampão de fosfato (*Phosphate-buffered saline*)

PS: Fosfatidilserina (*Phosphatidylserine*)

RLU: Unidade relativa de luz (*Relative Light Units*)

ROS: Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RPMI: Meio do Instituto Roswell Park Memorial (*Roswell Park Memorial Institute*)

SFB: Soro fetal bovino

SSC: *Side Scatter*

T.E.: Tris EDTA

TBS: Salina tamponada com Tris (*Tris-buffered saline*)

TBS-T: Salina tamponada com Tris – Tween (*Tris-buffered saline – Tween*)

TGF- β : Fator de transformação do crescimento tumoral beta (*Tumor growth factor beta*)

T_H1: Células T auxiliares do tipo 1 (*T helper cells type 1*)

T_H2: Células T auxiliares do tipo 2 (*T helper cells type 2*)

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

T_{reg}: Células T reguladoras

v/v: Volume por volume

SUMÁRIO

1 – Introdução	14
1.1 – Leishmaniose	14
1.2 – O ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	17
1.3 – Resposta imune à infecção por <i>Leishmania</i>	19
1.4 – Morte celular na resposta à infecções	24
2 – Objetivos	31
3 – Material e Métodos	32
3.1 – Animais	32
3.2 – Parasitos	32
3.3 – Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	32
3.4 – Cultivo de parasitos	33
3.5 – Criopreservação	33
3.6 – Infecção de camundongos e acompanhamento da progressão da lesão ..	34
3.7 – Obtenção de macrófagos peritoneais murinos	34
3.8 – Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	35
3.9 – Avaliação da taxa de infecção e multiplicação de parasitos no interior dos macrófagos	35
3.10 – Análise de hipodiploidia em núcleos de macrófagos	36
3.11 – Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose	36
3.12 – Indução de fragmentação de DNA em <i>L. amazonensis</i>	37

3.13 – Detecção da permeabilidade da membrana plasmática e da exposição de PS em macrófagos infectados	39
3.14 – Análise por <i>Western Blotting</i>	39
3.15 – Detecção de ativação de Caspase 8 e 9	40
3.16 – Análises Estatísticas	41
4 – Resultados	42
4.1 – Curso de infecção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. guyanensis</i>	42
4.2 – Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. guyanensis</i> , mas não com <i>L. amazonensis</i> , causa perda da integridade da membrana plasmática tanto em macrófagos de BALB/c quanto de C57BL/6	45
4.3 – Infecção <i>in vitro</i> por <i>L. amazonensis</i> , mas não por <i>L. guyanensis</i> , causa perda e fragmentação do DNA do núcleo da célula hospedeira	49
4.4 – Infecção <i>in vitro</i> com <i>L. amazonensis</i> , mas não com <i>L. guyanensis</i> , causa exposição de PS em macrófagos	52
4.5 – Ativação de caspases -3, -8 e -9 por células apoptóticas infectadas por <i>L. amazonensis</i>	60
5 – Discussão	63
6 – Conclusão e Perspectivas	71
7 – Referências	72
8 – Anexo I – Trabalho Publicado	93

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Leishmaniose e Agentes Causadores

Leishmaniose ainda é considerada uma das principais doenças negligenciadas, afetando principalmente regiões em desenvolvimento. Seu agente etiológico são os protozoários do gênero *Leishmania* e mais de 20 espécies do gênero foram associadas à doenças em seres humanos. Leishmaniose é um nome geral para um amplo espectro de doenças, que vão desde uma forma cutânea de cura espontânea, até uma forma visceral, letal se não tratada (DESJEUX, 2004; SHARMA & SINGH, 2008).

Considerando os vários tipos de leishmaniose, a doença é endêmica em 98 países, colocando em áreas de risco 310 milhões de pessoas (WHO, 2014; ALVAR *et al.*, 2012). Há cerca de 600 mil novos casos registrados por ano pelo mundo, mas em apenas 33 dos 98 países é mandatório o registro do diagnóstico, tornando esse número uma subestimativa. Estima-se que por volta de 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (WHO, 2015), com cerca de 1.3 milhão de novos casos estimados por ano. Levantamentos recentes pela Organização Mundial de Saúde (CROMPTON, 2013; ALVAR *et al.*, 2012) estimam que entre 20 mil e 40 mil pessoas morrem por ano pela forma visceral. Noventa por cento dos casos com a forma visceral são diagnosticados na Índia, Nepal, Bangladesh, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (SHARMA & SINGH, 2008; CROMPTON, 2013). A maioria dos casos registrados da forma cutânea se concentra principalmente no Peru, Brasil, República Árabe, Síria e Tunísia. Apenas no Brasil foram registrados entre 1985 e 2005 uma média de mais de 28 mil novos casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Não há medidas de controle realmente eficientes contra a leishmaniose, o que gera um grande impacto na saúde pública de diversos países. Isto é devido à alta incidência e distribuição geográfica, que vem aumentando desde 1993, principalmente devido ao movimento de populações que expõe populações não imunes à transmissão.

A leishmaniose pode ser classificada em quatro formas principais: cutânea, mucocutânea, cutânea-difusa e visceral (DESJEUX, 2004; WHO, 2010). A razão do amplo espectro apresentado é multifatorial, dependendo da espécie do parasito e grau da infecção, local da infecção primária, idade, sexo e resistência imunológica do hospedeiro, além de fatores genéticos tanto do parasito quanto do hospedeiro (ROGERS *et al.*, 2002; BALDWIN *et al.*, 2003; LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2009).

A leishmaniose cutânea apresenta lesões exclusivamente na pele, frequentemente iniciando no ponto de inoculação dos parasitos infectantes. A lesão primária é geralmente única, mas pode se apresentar também com números elevados de lesões ocasionadas por vários fatores, como múltiplas picadas do(s) flebotomíneo(s), disseminação local ou a espécie do parasito. Há um notável polimorfismo das lesões, mas frequentemente configuram a clássica lesão com borda de moldura, isto é, ulceração com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira. As lesões podem se apresentar de maneira bastante agressiva, deixando o indivíduo desfigurado e incapacitado com diversos problemas psicossociais (DESJEUX, 1996; ROGERS *et al.*, 2002; GONTIJO & de CARVALHO, 2003; CROMPTON, 2013). As principais espécies associadas a esta forma são *Leishmania mexicana* e *L. braziliensis*, no Novo Mundo e *Leishmania major*, no Velho Mundo (DESJEUX, 1996; GONTIJO & de CARVALHO, 2003; SHARMA & SINGH, 2008; WHO, 2010).

A manifestação clínica da leishmaniose muco-cutânea é quase em sua totalidade acometida na mucosa nasal, porém também podendo acometer a mucosa bucal, trato respiratório superior ou genital. Apresenta grandes riscos de deformidades consideráveis e permanentes. É uma condição de difícil tratamento, com prognóstico de cura limitado, pois não há resposta rápida ao tratamento. O acometimento mucoso pode surgir concomitante à lesão cutânea ainda sem cicatrizar ou até vários anos após sua cicatrização. As principais espécies responsáveis são *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* no Novo Mundo, e *L. donovani*, *L. major* e *L. infantum* no Velho Mundo (DESJEUX, 1996; GONTIJO & de CARVALHO, 2003; SHARMA & SINGH, 2008; WHO, 2010).

A forma cutânea difusa da leishmaniose apresenta lesões múltiplas, nodulares e infiltrações cutâneas bem semelhantes à hanseníase virchowiana. Apresentam-se espalhadas por todo tegumento, distante do sítio de inoculação, e geralmente não cicatrizam espontaneamente. O tratamento pode se mostrar eficiente no início, mas há frequente recaída e de o parasito se tornar resistente ao tratamento. As principais espécies associadas com esta doença são *L. amazonensis* e *L. aethiopica*, encontradas no Novo Mundo e Velho Mundo, respectivamente (DESJEUX, 1996; GONTIJO & de CARVALHO, 2003; SHARMA & SINGH, 2008; WHO, 2010).

A leishmaniose visceral, considerada uma das formas mais severas, pode ser letal na maioria dos casos não tratados. Há muitos casos assintomáticos, mas o acompanhamento longitudinal demonstrou que alguns indivíduos eventualmente desenvolvem a doença clínica.

É caracterizada por febres irregulares, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e/ou linfadenopatia e anemia. Após o tratamento, pode ressurgir de forma dérmica, denominada Calazar, que exige um tratamento longo e dispendioso. Seus causadores no Velho Mundo são *L. donovani*, *L. infantum*, enquanto no Novo Mundo a espécie *L. chagasi* (= *L. infantum*) é responsável por esta forma da doença (DESJEUX, 1996; SHARMA & SINGH, 2008; WHO, 2010).

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de *Leishmania*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, ambas associadas à forma cutânea e encontradas nos países do Novo Mundo, entre eles o Brasil.

A espécie *Leishmania amazonensis*, além de ser a principal espécie a induzir a forma cutânea difusa nas Américas, também apresenta casos que vão desde uma lesão cutânea simples e única, à forma anérgica e até à visceralização (BARRAL *et al.*, 1991; ABREU-SILVA *et al.*, 2004). Essa espécie possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil partindo da região amazônica, e vem se adaptando a florestas secundárias baixas (capoeiras), permitindo que sua distribuição atinja até o norte do Estado do Paraná. Seus principais reservatórios são roedores e marsupiais (GONTIJO & de CARVALHO, 2003). O flebotomíneo descrito como vetor primário, *Lutzomyia flaviscutellata*, e o vetor secundário, *Lutzomyia olmeca*, residem em níveis basais de florestas, habitando até cerca de um metro de altura nas árvores, possuem hábitos noturnos e pequena capacidade de voo (LAINSON *et al.*, 1994; SHARMA & SINGH, 2008).

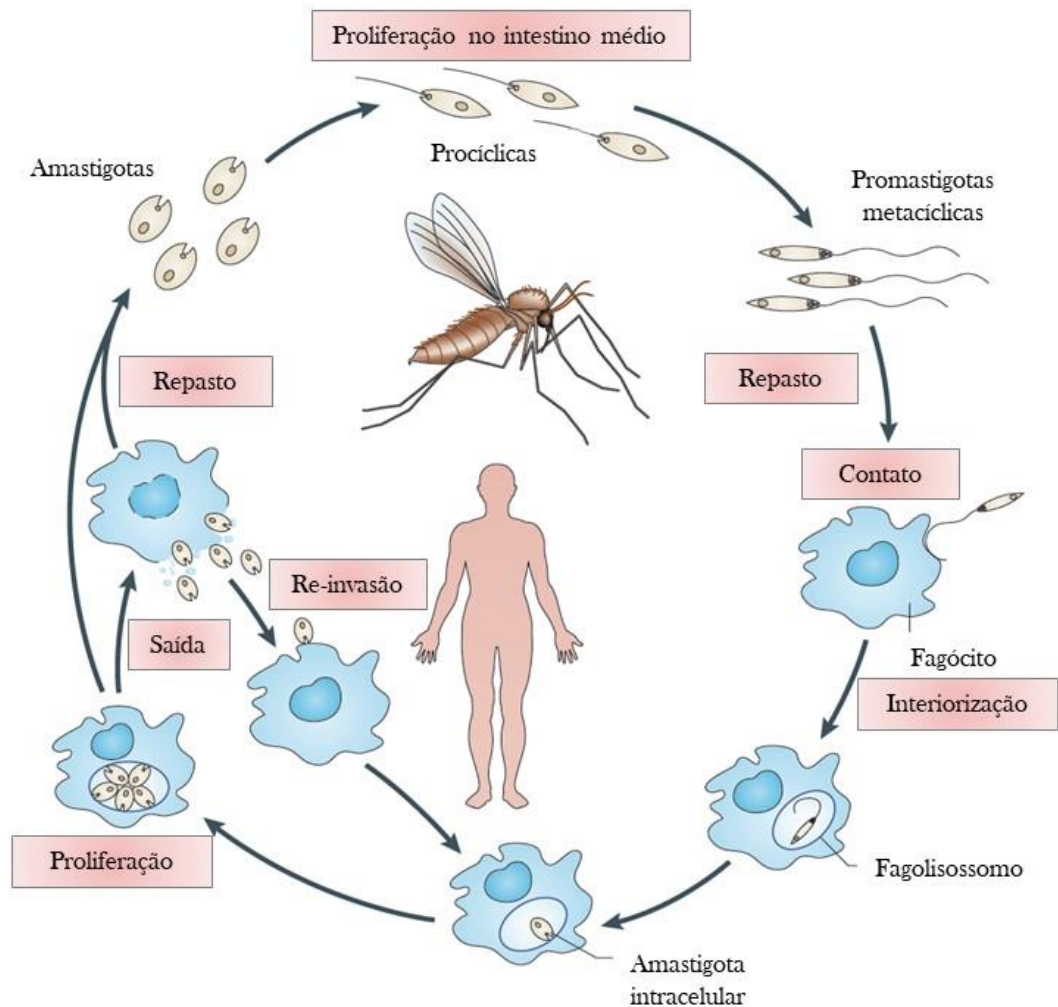
Leishmania guyanensis é uma espécie responsável por lesões cutâneas em sua maioria, predominantemente com pequenas lesões ulceradas únicas ou múltiplas. As lesões localizadas podem acompanhar-se de linfadenopatia regional e linfangite nodular, enquanto as lesões múltiplas estão geralmente associadas com várias picadas dos flebótomos ou metástases linfáticas secundárias (ROMERO *et al.*, 2001; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As lesões podem se desenvolver em lesões esporotricóides, com a pele íntegra e eritematose (GARNHAM, 1971; BAÑULS *et al.*, 2011). O paciente geralmente se apresenta positivo para o teste de Montenegro (intradermorreação de Montenegro), e como há baixa sensibilidade nos testes sorológicos, alguns pacientes são persistentemente negativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Essa espécie de *Leishmania* também pode causar a forma muco-cutânea da doença (NAIFF *et al.*, 1988), considerada infrequente até recentemente (GUERRA *et al.*, 2011). Foram descritos pacientes com a forma cutânea difusa (COUPPIÉ *et al.*, 2004) e até mesmo assintomáticos (POEPPL *et al.*, 2012). A espécie é encontrada na margem norte do Rio

Amazonas, em áreas de colonização recente e é associada a desdentados e marsupiais no ciclo silvestre. Seu principal vetor é *Lutzomyia umbratilis*, com vetores secundários *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* na Guiana e no Brasil, e *Lu. ovallesi* na Venezuela (LAINSON *et al.*, 1994; GONTIJO & de CARVALHO, 2003; SHARMA & SINGH, 2008).

1.2 – O ciclo de vida de *Leishmania* e infecção

Leishmania é um gênero de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O ciclo de vida de *Leishmania* spp. é heteroxênico, alternando entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. O hospedeiro vertebrado é infectado durante o repasto sanguíneo de fêmeas dos insetos vetores flebotomíneos (Psychodidae) pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo) (CROMPTON, 2013; DE SOUZA *et al.*, 1996; VILELA *et al.*, 2013). O vetor inocula formas promastigotas metacíclicas, forma infectante ao hospedeiro vertebrado que possui flagelo e corpo alongado (Fig. 1). Estas são internalizadas por fagócitos residentes no local e células do infiltrado inflamatório que rapidamente se acumulam, particularmente os neutrófilos (BELKAID *et al.*, 2000; POMPEU, *et al.*, 1991; BEIL *et al.*, 1992; PETERS *et al.*, 2008; CECÍLIO *et al.*, 2014).

Diversos fatores de virulência, como a glicoproteína 63 (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG), auxiliam a promastigota metacíclica a sobreviver e infectar células do hospedeiro vertebrado. Gp63, uma metaloprotease abundante da superfície da promastigota, é considerada um importante fator de virulência para *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. donovani*. É capaz de auxiliar no escape da lise pelo sistema do complemento e estimula a opsonização por clivagem da proteína do complemento C3b em iC3b. Essa opsonização estimula uma aderência firme, via Mac-1 (CD18/CD11b ou CR3), assim como via CD35 (CR1), durante a fagocitose e é um dos mecanismos que os parasitos utilizam para infectar o macrófago (da SILVA *et al.*, 1989; MOSSER *et al.*, 1992; ALEXANDER *et al.*, 1999; KANE & MOSSER, 2000; HANDMAN & BULLEN, 2002; MCMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; THIAKAKI *et al.*, 2006; ISNARD *et al.*, 2012). O LPG é uma molécula altamente glicosilada e fosforilada encontrada em abundância na superfície da *Leishmania* (ALEXANDER *et al.*, 1999). Foi descrito que em *L. donovani* e *L. major*, é capaz de modular a resposta imune protetora (PROUDFOOT *et al.*, 1996), inibir apoptose (DONOVAN *et al.*, 2009), retardar maturação do



Adaptado de Kaye & Scott, 2011. Nature Reviews. Microbiology

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Infecção do hospedeiro vertebrado por formas promastigotas metacíclicas do parasito durante o repasto sanguíneo; fagocitose de formas promastigotas por macrófagos; após formação do fagolisossomo ocorre diferenciação de promastigotas em amastigotas e multiplicação; liberação de amastigotas que podem ser fagocitadas por outras células do hospedeiro ou; ingestão de células infectadas pelo inseto vetor, levando à diferenciação de amastigotas em promastigotas; multiplicação e diferenciação de promastigotas durante a metaciclo-gênese.

fagolisossomo (HOLM *et al.*, 2001), todos mecanismos vantajosos para o parasito. Outra importante função associada ao LPG é a sua ligação em diversos receptores de macrófagos, como o receptor manose-fucose, associados à fagocitose (BLACKWELL *et al.*, 1985).

Após a interiorização dos parasitos pelos macrófagos, a fusão de lisossomos ao fagossomo, gerando um fagolisossomo de pH ácido, bem como a grande variação da temperatura entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero (ALCOLEA *et al.*, 2010), propicia a diferenciação da forma promastigota em amastigota, forma redonda e de flagelo curto não exteriorizado, capaz de multiplicar por divisão binária (Fig. 1).

A *Leishmania* multiplica-se dentro dos macrófagos até que os parasitos saem da célula, infectando novos macrófagos e, conseqüentemente, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (Fig. 1) (HANDMAN & BULLEN, 2002). Este é um passo de extrema importância para a manutenção e estabilização da infecção, apesar de escassa literatura sobre o tema.

A infecção do vetor se dá durante o repasto sanguíneo em um animal infectado. O inseto ingere sangue contendo a forma amastigota livre ou dentro de células do hospedeiro. Ao alcançar a luz do intestino médio do flebotomíneo, o parasito sofre modificações morfológicas e bioquímicas em um processo denominado metaciclôgenese. O primeiro estágio de diferenciação é em promastigota procíclica, forma flagelada e comprida. Esta forma é capaz de rápida multiplicação (Fig. 1) e é incapaz de infectar o hospedeiro vertebrado. Nesta fase, os parasitos começam a expressar novamente grandes quantidades de LPG e gp63. O LPG também possui função de auxiliar na adesão do parasito na parede do intestino do inseto enquanto ocorre multiplicação e diferenciação (ALEXANDER *et al.*, 1999, SACKS, 2001; DOSTALOVA *et al.*, 2012). Após a multiplicação, as formas procíclicas se soltam dos microvilos intestinais e migram para a colonização da válvula estomodeal onde se diferenciam em promastigotas metaciclísticas, completando assim, o ciclo de vida de *Leishmania* spp. (WALTERS, 1993; SACKS, 2001; BATES, 2007).

1.3 – Resposta imune à infecção por *Leishmania*

Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* foram relacionadas com as diversas formas de leishmaniose em seres humanos. A forma de desenvolvimento da doença depende não só da espécie, cepa do parasito e número de parasitos inoculados, mas também do genótipo, estado

nutricional e imunológico do hospedeiro, sítio anatômico da infecção, espécie do vetor e fatores ambientais e sociais (ROGERS *et al.*, 2002; BALDWIN *et al.*, 2003; LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006; SAKTHIANANDESWAREN *et al.*, 2009). Esse amplo espectro da patogenia também é descrito em linhagens isogênicas de camundongos, que se mostraram modelos importantes para a caracterização da resposta imunológica do hospedeiro em infecções com as diversas espécies de *Leishmania* (LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006).

O modelo mais estudado da doença é o da infecção por *Leishmania major*, em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6. A primeira linhagem, assim como a SWR/J, é incapaz de controlar a infecção, desenvolvendo lesões progressivas e patologia sistêmica, que levam à morte do animal (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Por outro lado, em C57BL/6, e também nas linhagens C57BL/10, C3H e DBA/1, as lesões regridem após certo tempo e o animal é capaz de curar a infecção (ROGERS *et al.*, 2002; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

A dicotomia das respostas de linfócitos T *helper* T_{H1}/ T_{H2}, ditando resistência/suscetibilidade a infecções intracelulares foi primeiro descrita por SCOTT e colaboradores (1988) utilizando a infecção por *L. major*. A resistência a *L. major* das linhagens descritas acima foi associada a um direcionamento, via IL-12, para uma resposta de linfócitos T *helper* tipo 1 (T_{H1}) produtora de interferon gama (IFN- γ), com a ativação de macrófagos e consequente eliminação dos parasitos pela explosão respiratória e pela produção de óxido nítrico (NO). A suscetibilidade de camundongos BALB/c e SWR/J está associada ao desenvolvimento de uma resposta T_{H2}, direcionada, ao menos em parte, pelas citocinas IL-4 e/ou IL-13 e/ou IL-10 (ALEXANDER & BRYSON, 2005; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Contudo, dados posteriores mostraram que este modelo é simplista e ineficiente para explicar a complexidade na regulação de citocinas e os mecanismos da imunidade celular, não só da infecção com *L. major*, mas, especialmente, com as demais espécies de *Leishmania* (ALEXANDER & BROMBACHER, 2012; KEDZIERSKI & EVANS, 2014).

Linfócitos T_{H17}, caracterizados pela expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e IL-22, estão envolvidos com o desenvolvimento da lesão em animais suscetíveis a *L. major*, mediando a persistência da inflamação (LOPEZ KOSTKA *et al.*, 2009; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2012). Linfócitos T reguladores (T_{regs}) também foram associados à incapacidade de cura durante a infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, reduzindo a

resposta T_{H1} , apesar de sua presença também ter sido associada a uma maior resistência durante uma resposta secundária, promovendo um balanço entre resposta imune e persistência do parasito (BELKAID *et al.*, 2002; SUFFIA *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, T_{regs} em BALB/c foram associados ao controle da carga parasitária durante a infecção por *L. major*, mostrando que essa população de linfócitos modula tanto respostas T_{H1} quanto T_{H2} (ASEFFA *et al.*, 2002; TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2012).

Diferentemente da infecção por *L. major*, a maioria das linhagens murinas produzem infecções crônicas quando infectadas por *L. amazonensis*, incluindo C57BL/6 (JONES *et al.*, 2002). Não há linhagem que se demonstra totalmente resistente contra a infecção com esta espécie, apresentando uma cura clínica como ocorre na infecção por *L. major*. Vários fatores estão associados com as diferenças imunopatológicas entre as duas espécies de *Leishmania*.

Para *L. major* e *L. donovani*, mas não para *L. mexicana* e *L. amazonensis*, o LPG foi considerado o ligante de iC3b, auxiliando na opsonização e consequente interiorização por macrófagos, indicando que as últimas espécies têm maneiras alternativas de invasão (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004; LAURENTI *et al.* 2004). Também foi observado que LPG de *L. amazonensis* participa na indução da liberação de NETs (*neutrophil extracellular traps*) por neutrófilos (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que não há polarização da resposta T_{H2} levando à suscetibilidade, mas sim um balanço entre T_{H1} e T_{H2} (JI *et al.*, 2002) com IFN- γ e TNF- α , com pouca ou nenhuma IL-4 e IL-10 (JI *et al.*, 2005). Camundongos C3H/HeJ são relativamente resistentes a *L. amazonensis*, porém, sem apresentarem um perfil de citocinas altamente polarizado para T_{H1} (QI *et al.*, 2004).

A persistência do parasito também está relacionada com a presença de IL-10, observada em infecções tanto com *L. major*, quanto com *L. amazonensis* (CECÍLIO *et al.*, 2014). O perfil de resposta de C57BL/6 à *L. amazonensis* é independente de IL-4 e há produção de IL-10 impedindo a ativação de macrófagos. Foi observado que animais deficientes em IL-4 ou tratados com anticorpos anti-IL-4 ainda desenvolviam lesões crônicas (JONES *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2003), embora quando BALB/c deficientes em IL-10 sejam tratados com anticorpo anti-IL-4, haja um aumento na resistência e desenvolvimento de uma resposta T_{H1} (PADIGEL *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que IL-10 não influencia na resposta limitada T_{H1} , indicando que há outros mecanismos de imunomodulação no curso da infecção (AFONSO & SCOTT, 1993; JONES *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2003; McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

Outra citocina que tem efeitos distintos entre as infecções por *L. major* e *L. amazonensis* é o IFN- γ . Durante a infecção por *L. amazonensis*, esta citocina, juntamente com TNF- α , leva um aumento na proliferação de células primárias, e não contenção, das amastigotas, provavelmente por estimular o recrutamento e retenção de células no sítio de infecção. Com isto, a presença destas citocinas leva a um descontrole no sítio de infecção, acarretando na manifestação da doença. Foi demonstrado que *L. amazonensis* tolera o nível de IFN- γ produzido, e apenas na presença de altas dosagens da citocina o macrófago é ativado e o parasito sucumbe (QI *et al.*, 2004). A presença de IFN- γ aparenta ser importante para o controle da infecção por *L. amazonensis* após 2 meses de infecção em C57BL/6, uma vez que animais IFN- γ *knockout* (KO) apresentaram um controle inicial da lesão, mas após este período a lesão se mostrou maior do que em animais *wild-type* (WT) (PINHEIRO & ROSSI-BERGMANN, 2007).

Células dendríticas se mostraram essenciais para a ativação e diferenciação de linfócitos T CD4⁺ específicos para *L. major*. Contudo, também foi observado que amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de inibir a maturação completa de células dendríticas, impedindo a apresentação de antígenos de maneira apropriada (PRINA *et al.*, 2004). A interação de moléculas coestimuladoras presentes nas células dendríticas maduras com seus respectivos ligantes nos linfócitos (por exemplo, CD40-CD40L e/ou CD80-CTLA-4/CD28), associada às citocinas presentes no local de origem da célula dendrítica, pode levar a diferenciação de linfócitos T_H1 produtores de IFN- γ , enquanto células dendríticas com deficiência em sua ativação, ou ainda não completamente maduras, podem induzir outras subpopulações de linfócitos (SOONG, 2008; XIN *et al.*, 2008).

Neutrófilos também parecem contribuir para os fenótipos de resistência e suscetibilidade durante a infecção por *L. major*. Em camundongos BALB/c infectados na pata, uma alta proporção do infiltrado inflamatório é constituída por neutrófilos que persistem por várias semanas. Todavia, na mesma infecção em camundongos C57BL/6, a presença de neutrófilos é passageira (BEIL *et al.*, 1992). A persistência de neutrófilos pode contribuir para a polarização T_H2 envolvida na suscetibilidade pela produção de TGF- β no local (TACCHINI-COTTIER *et al.*, 2000; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Enquanto a presença de neutrófilos está associada à suscetibilidade na infecção por *L. major*, dados demonstram que estas células seriam capazes de reduzir a carga parasitária de macrófagos de BALB/c infectados por *L. amazonensis*, pela produção de TNF- α , elastase e fator de ativação de plaquetas (PAF)

(SOUSA *et al.*, 2014), bem como pela liberação de NETs capazes de capturar e eliminar as formas promastigotas (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009). A depleção de neutrófilos em BALB/c demonstra um aumento na lesão e na carga parasitária em infecção na orelha, com um aumento de IL-10 e IL-17 na lesão (CARMO *et al.*, 2010).

Linfócitos T_{reg} também possuem funções opostas entre diferentes espécies de *Leishmania*. A presença de T_{reg} em camundongos infectados com *L. major* está associada com a exacerbação da doença, enquanto que em infecções por *L. amazonensis* estas células estão relacionadas com a resolução da infecção (CECÍLIO *et al.*, 2014). Corroborando a influência de IFN- γ na proliferação de parasitos, JI e colaboradores (2005) demonstraram que a presença de células T_{reg} no local de infecção em C57BL/6 está associada com a contenção da lesão e uma redução da quantidade desta citocina.

Muito pouco se sabe sobre a imunopatologia de *L. guyanensis*. Estudos imunológicos têm sido geralmente limitados a seres humanos, hamsters e primatas (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Ambas as linhagens BALB/c e C57BL/6 são resistentes a esta espécie. Camundongos BALB/c, altamente suscetíveis às infecções por *L. major* e *L. amazonensis* não desenvolvem lesão cutânea se infectados por *L. guyanensis*. Foi mostrado que os macrófagos infectados *in vitro* são capazes de eliminar os parasitos pela explosão respiratória de maneira independente de NO, induzindo uma morte semelhante à apoptose (SOUSA-FRANCO, 2006).

Em infecções *in vivo* por *L. guyanensis* foi observado que camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 apresentam pequeno inchaço na pata infectada (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006; MENDES, 2011), com lenta proliferação e posterior eliminação dos parasitos. Pouco se sabe da resposta adquirida de camundongos infectados com *L. guyanensis*. Foi demonstrado recentemente que animais IL-12AB^{-/-} se apresentam completamente suscetível à infecção, e que MyD88 e TLR9 participam na indução de uma resposta protetora T_H1 em C57BL/6 (IVES *et al.*, 2014). A persistência da infecção por esta espécie em seres humanos foi relacionada à não responsividade de células T específicas a IL-12 (BOURREAU *et al.*, 2001), e à presença intralésional de linfócitos T_{reg} e células TCD8⁺ produtoras de IL-10 (BOURREAU *et al.* 2009; BOURREAU *et al.*, 2007).

Como descrito acima, vários estudos têm sido realizados visando compreender os mecanismos imunológicos que determinam a resistência/suscetibilidade às diversas espécies de *Leishmania*. Os modelos de infecção por *L. major* em camundongos BALB/c e C57BL/6 já não

são suficientes para explicar a imunopatologia da leishmaniose de uma maneira geral, mostrando a importância de estudos com outras espécies e analisando outros parâmetros. Mesmo que *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, as duas espécies utilizadas neste trabalho, promovam principalmente lesões cutâneas, diferenças na resposta imunológica estão cada dia mais evidentes, mostrando adaptações específicas e singulares de cada espécie com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados no ciclo selvagem. Estas adaptações acarretam diferenças moleculares no parasito que afetam os mecanismos de evasão do parasito e a resposta do hospedeiro.

1.4 – Morte celular na resposta às infecções

Por algum tempo, várias evidências têm mostrado que a morte celular tem papel fundamental na regulação da inflamação e que os diferentes tipos de morte celular produzem padrões moleculares que influenciam de diferentes maneiras o curso da inflamação. Estudos desses padrões moleculares levaram à descrição e à classificação de alguns tipos principais de morte celular, programadas ou não. Entre eles podemos citar apoptose, necrose, necroptose, piroptose e morte celular por autofagia (WALLACH *et al.*, 2014; GALLUZZI *et al.*, 2012).

Apoptose é um fenômeno complexo e conservado ao longo da evolução, envolvendo proteínas, enzimas e controle da expressão gênica. Ocorre durante o desenvolvimento embrionário de metazoários, manutenção de homeostase por meio da eliminação de células desnecessárias ou que sofreram injúria ou anomalias, seleção do repertório de linfócitos, entre outros (BAEHRECKE, 2002; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003; AMEISEN, 2004; MURO *et al.*, 2006; GALLUZZI *et al.*, 2012; WALLACH *et al.*, 2014).

Devido a sua importância na manutenção da homeostase do organismo, a apoptose é altamente regulada. O resultado da apoptose é uma morte geralmente silenciosa, que não estimula a resposta inflamatória, onde a célula passa por processos moleculares que culminam em rápida interiorização por fagócitos vizinhos e a morte sem o extravasamento do conteúdo intracelular (TRAMBAS & GRIFFITHS, 2003). Dentre as características desta morte programada, podemos citar a condensação da cromatina, degradação internucleossômica do DNA nuclear, redução do tamanho da célula, pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas, exposição de fosfatidilserina (PS) no folheto externo da membrana celular, quebra da célula em corpos apoptóticos, entre outras (BOWEN, 1993; GALLUZZI *et*

al., 2012). A maioria destas características é resultado, direto ou indireto, da atividade de um grupo de enzimas da família de cisteína proteases denominadas caspases.

O nome caspase é derivado do termo em inglês *cysteinyl aspartate protease*, e já foram descritas onze em seres humanos e dez em camundongos, apesar de nem todas estarem diretamente associadas à apoptose. As caspases são altamente conservadas ao longo da evolução, sendo descritas em hidras, nematódeos, insetos e mamíferos (HENGARTNER, 2000). São encontradas como zimogênios (pró-caspases) no citoplasma da maioria das células saudáveis e, quando ativadas, são capazes de ativar ou inativar diversos substratos, incluindo outras pró-caspases, o que gera uma cascata de sinalização que irá culminar com a morte da célula (KUMAR, 2007; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003; HENGARTNER, 2000) (Fig. 2).

Há duas vias principais de indução da apoptose: a extrínseca (ou mediada por receptor de morte ou tipo I) ou a intrínseca (ou mitocondrial ou tipo II). A primeira via é iniciada pela associação de moléculas a receptores da família do TNF, como Fas (CD95) se ligando ao FasL, que se torna capaz de ativar caspase 8 ao se ligar ao DISC (*death-inducing signaling complex*) via molécula adaptadora denominada FADD (figura 2). A caspase 8 produz uma cascata de ativação de outras pró-caspases 8, além de ativar as chamadas caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), responsáveis por ativar enzimas e atuar diretamente em moléculas que resultarão na morte celular (HAIL JR *et al.*, 2006; WESCHE-SOLDATO *et al.*, 2007; KUMAR, 2007).

A via mitocondrial (Fig. 2) pode ser iniciada pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 ou fatores exógenos, como esteróides, radiação, quimioterápicos, NO, ROIs ou Ca^{+2} . Inicia-se com a permeabilização da membrana mitocondrial, onde há liberação de citocromo c do espaço intermembrana da organela. Com a liberação de citocromo c no citosol, este se liga à Apaf-1 e caspase 9 formando o complexo denominado apoptossomo, capaz de ativar as caspases efetoras 3 e 7 (figura 2). A família de proteínas Bcl-2 está intimamente ligada a esta via: há proteínas anti-apoptóticas, que normalmente mantêm a integridade da membrana mitocondrial, e proteínas pró-apoptóticas que facilitam a permeabilidade da membrana e liberação do citocromo c (HAIL JR *et al.*, 2006; WESCHE-SOLDATO *et al.*, 2007).

Diversos substratos já foram associados às caspases efetoras, especialmente a caspase 3: proteínas presentes no citoesqueleto (por exemplo, foldrina), na membrana citoplasmática e na membrana nuclear (laminina nuclear), que levam ao colapso da célula e de seu núcleo

(NICHOLSON, 1999; HENGARTNER, 2000; CHOWDHURY *et al.*, 2008). A caspase 3 (Fig. 2) também foi associada com a ativação da CAD (*caspase-activated DNase*), endonuclease responsável pela fragmentação do DNA da célula apoptótica (JÄNICKE *et al.*, 1998). A cromatina apresenta-se com complexos octâmeros de histonas, responsáveis pelo enovelamento e proteção da dupla fita de DNA. Esta associação do DNA com as histonas forma os nucleossomos, que possuem um comprimento aproximado de 180 a 200 pares de base (pb). Protegidos, os nucleossomos não sofrem clivagem pela endonuclease, que cliva apenas as regiões internucleossômicas, gerando fragmentos de 200 pb e múltiplos de 200 pb que podem ser visualizados em géis de agarose, como um padrão do tipo “escada”, frequentemente utilizado para identificar a morte celular por apoptose.

Outro processo que ocorre na apoptose é a exposição de PS, um fosfolipídio usualmente presente na camada interna da membrana citoplasmática. Com o estímulo apoptótico, a PS é exposta na camada externa e sua importância para a fagocitose da célula apoptótica já foi mostrada (KAGAN *et al.*, 2002; HANAYAMA *et al.*, 2002). Esta exposição ocorre de maneira dependente de ATP ainda no início do processo de morte celular programada, quando a membrana da célula ainda se apresenta intacta (VERMES *et al.*, 1995).

Em contrapartida, a necrose se caracteriza por ser uma morte passiva, causada por uma injúria à célula, resultando em perda da permeabilidade da membrana plasmática, culminando em lise celular com extravasamento do citoplasma. É, geralmente, associada a uma resposta inflamatória (CATELAS *et al.*, 2005). A necrose não possui marcadores bioquímicos específicos e, além da perda da permeabilidade da membrana celular, uma eventual degradação de organelas ou aumento do volume celular só podem ser detectados com microscopia eletrônica (GALLUZZI *et al.*, 2012). Entretanto, o conceito generalizado de morte celular acidental para necrose está sendo revisto, pois foi demonstrado que certos eventos, como a superprodução de ROS, a redução de ATP da célula ou a interrupção dos processos de morte apoptótica ou autofágica podem resultar em necrose (GOLDSTEIN & KROEMER, 2007; GALLUZZI *et al.*, 2012).

Alterações na regulação da apoptose, seja na sua inibição ou na sua indução, levam à diversos mecanismos patológicos. Aberrações na expressão de proteínas pró- ou anti-apoptóticas são bastante relacionadas com situações de imunodeficiência, autoimunidade e

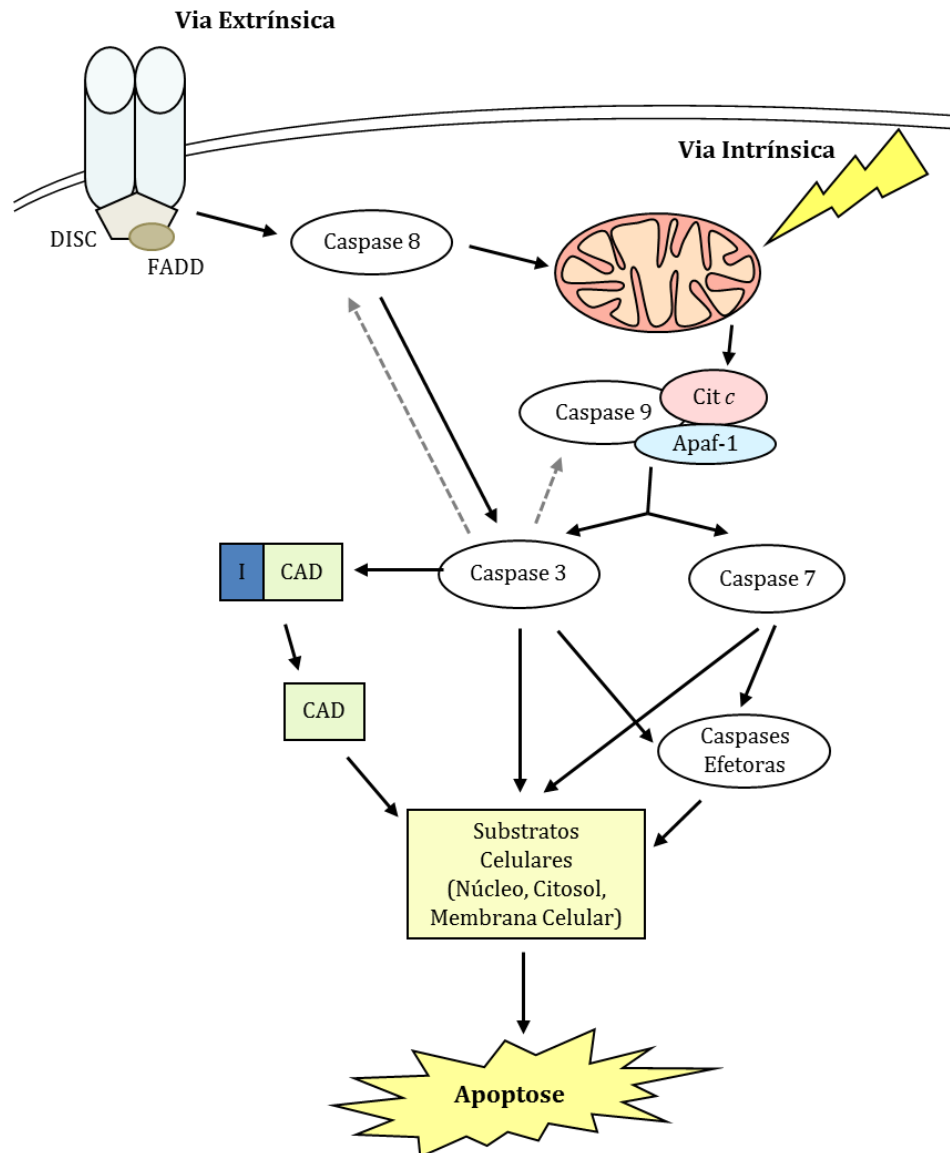


Figura 2 – Resumo dos principais eventos celulares da apoptose. O estímulo apoptótico pode se dar pela via extrínseca, por receptores de morte celular (i.e. CD95), ou pela via intrínseca, iniciada por dano no DNA, estresse celular, ou privação de fatores de crescimento. Em seguida, há ativação de diferentes cascatas iniciadoras (caspase 8 ou caspase 9, respectivamente). Estas caspases desencadeiam uma cascata de ativação de caspases efetoras (caspases 2, 3, 6 e 7) que ativam diferentes substratos para a efetivação da morte celular programada. A caspase 3 também é capaz de ativar mais caspases 8 e 9 pelo mecanismo de *feedback*. DISC: *Death-Inducing Signalling Complex*; FADD: *Fas-Associated Death Domain*; Cit c: citocromo c; Apaf-1: *Apoptotic protease-activating factor - 1*; CAD: *caspase-activated DNase*; ICAD: *inhibitor caspase-activated DNase*;

câncer (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003). Outra importância atribuída à apoptose é em relação ao combate às infecções, exemplificado pela indução de apoptose em células infectadas por vírus e bactérias intracelulares por células NK e T citotóxicas CD8⁺ (SHI *et al.*, 1992; HEUSEL *et al.*, 1994). A morte celular programada, como a apoptose, é capaz de eliminar infecções ainda em estágios iniciais sem emitir sinais de alarme, bem como induzir células dendríticas a recolher corpos apoptóticos contendo microrganismos e apresentar antígenos via moléculas de MHC de classe I (ASHIDA *et al.*, 2011).

Todavia, também foi demonstrado que a regulação da apoptose tornou-se um mecanismo utilizado como forma de evadir o sistema imunológico em diversas patologias. Esta regulação pode ser tanto pela indução quanto pela inibição da morte celular, influenciando assim na resolução ou amplificação de diversas patogenias. A inibição da apoptose já foi descrita para infecções por diversas espécies de bactérias, dentre elas *Chlamydomphila pneumoniae* (PALAND *et al.*, 2006), *Legionella pneumophila* (ABU-ZANT *et al.*, 2005) e *Chlamydia pneumoniae* (ZANDBERGEN *et al.*, 2004), todas aumentando a longevidade das células hospedeiras, acarretando em um tempo maior para a replicação do microrganismo. ABU-ZANT e colaboradores (2005) observaram *in vitro* que, mesmo com altas produções de caspase 3 ao longo da infecção, células infectadas por *Legionella pneumophila* não executavam o processo apoptótico até o final do estágio de replicação da bactéria, momento em que a última se encontra preparada para escapar da célula hospedeira. *Coxiella burnetti* também foi implicada em impedir a morte do macrófago, sua célula hospedeira, por mecanismos que afetam o tempo de ativação das quinases Akt e Erk 1/2 (VOTH & HEINZEN, 2009).

De forma similar, a inibição de apoptose já foi descrita em algumas infecções por protozoários (HEUSSLER *et al.*, 2001). A inibição por *Theileria parva* demonstrou ser por meio da transformação de sua célula hospedeira, o linfócito T, em uma célula com características tumorais como, por exemplo, proliferação irrestrita e proteção contra apoptose. Esta transformação, aparentemente, é reversível, pois a célula é capaz de voltar ao normal e, conseqüentemente, morrer por apoptose após tratamento e eliminação do parasito (HEUSSLER *et al.*, 1999; FICH *et al.*, 1998).

Espécies do gênero *Leishmania* também foram associadas com a inibição da morte celular programada. MOORE & MATLASHEWSKI (1994) demonstraram que infecções *in vitro* com *L. donovani* resultam em resistência do macrófago derivado de medula óssea infectado à morte programada, após a retirada de fatores de crescimento de culturas. *L. major*,

L. pifanoi e *L. amazonensis* são capazes de inibir apoptose induzida por camptotecina em macrófagos pela via de sinalização PI3K/Akt (RUHLAND *et al.*, 2007).

L. major também foi associada com o retardamento da apoptose de neutrófilos, reduzindo a expressão de Fas da membrana celular e aumentando a expressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bfl-1 (SARKAR *et al.*, 2013). Esta inibição foi considerada pelos autores uma via de infecção do macrófago, que ao fagocitar o neutrófilo apoptótico contendo o parasito viável em seu interior, reduz a resposta inflamatória. Este atraso na morte dos neutrófilos ocorreria até o momento de chegada dos macrófagos no sítio de infecção, fenômeno intitulado pelos autores como “cavalo de tróia” (LASKAY *et al.*, 2008; LASKAY *et al.*, 2003; AGA *et al.*, 2002).

Indução de apoptose por agentes infecciosos também foi descrita, relacionando uma imunorregulação do hospedeiro pelo agente infeccioso, favorecendo seu estabelecimento. Associados à indução da morte celular programada, podemos citar o vírus de imunodeficiência adquirida (HIV), que induz apoptose em linfócitos infectados ou não com o vírus (GOUGEON, 2003), os vírus de hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV) e alguns herpes vírus (DOCKRELL, 2001). Em infecções bacterianas, também já foi descrita a indução de apoptose *in vitro* em macrófagos por *Shigella flexneri* (ZYCHLINSKY *et al.*, 1992), por *Salmonella typhinurium* (MONACK *et al.*, 1996), por *Helicobacter pylori* (MENAKER *et al.*, 2004) e por *Mycobacterium tuberculosis* em neutrófilos humanos (PERSKVIST *et al.*, 2002) e macrófagos (ROJAS *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2006) infectados, bem como em infecções *in vivo* por *Shigella dysenteriae* (RAQIB *et al.*, 2002).

Em doenças causadas por protozoários, foi demonstrada a indução de apoptose por *Trichomonas vaginalis* em células RAW 264.7 e células mononucleares humanas *in vitro* (CHANG *et al.*, 2006). O mesmo foi demonstrado para *Tritrichomonas foetus* em células epiteliais vaginais bovina (SINGH *et al.*, 2004), sendo este evento de apoptose diretamente relacionando com a patogenia. HELMBY e colaboradores (2000) demonstraram um aumento significativo de linfócitos (B e T) e macrófagos no baço, morrendo por apoptose, durante a fase sanguínea em infecções por *Plasmodium chabaudi chabaudi*.

Nos casos acima citados, os agentes infecciosos são diretamente beneficiados por este controle que pode ser visto como um bem-sucedido mecanismo de escape. Uma vez que tanto a indução, quanto a inibição de apoptose foram associados com o escape do parasito, não é de

se surpreender que hajam relatos em que o mesmo agente consiga regular a apoptose para os dois sentidos. Estes diferentes mecanismos são acionados em tempos de infecção ou células-alvo distintas. *Cryptosporidium parvum* é capaz de proteger a célula infectada de estímulos pró-apoptóticos fortes, assegurando uma sobrevivência maior enquanto se encontra dentro das mesmas (McCOLE *et al.*, 2000), mas em tempos mais tardios da infecção induz um pequeno grau de apoptose, talvez com o objetivo de limitar uma resposta inflamatória do hospedeiro ou sair da célula hospedeira (McCOLE *et al.*, 2000; OJCIUS *et al.*, 1999). Da mesma forma, infecções com *Toxoplasma gondii* revelam que o parasito tem a capacidade de induzir apoptose de células T de placas de Peyer no momento da infecção peroral (LIESENFELD *et al.*, 1997) e de inibir a morte de células hospedeiras (PAYNE *et al.*, 2003).

Já foi proposto que a persistência de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro, bem como a infecção crônica, está associada com respostas deficientes de células T. Foi descrito que macrófagos infectados por *T. cruzi* produz em altas quantidades de HSP65 (*heat shock protein 65*), adquirindo uma maior proteção contra apoptose (SAKAI *et al.*, 1999). Também há a descrição de que macrófagos infectados ingerem células apoptóticas, resultando em um aumento na proliferação dos parasitos devido a um aumento de TGF- β . Essa citocina é capaz de inibir a produção de NO e induzir a biossíntese de poliaminas, como a putrescina, utilizada diretamente pelo parasito para a proliferação (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). A presença de células apoptóticas, e sua consequente fagocitose, podem ser resultado de uma indução diferenciada de morte celular em linfócitos T pelo *T. cruzi* em diversos sítios do corpo do hospedeiro (NUNES *et al.*, 1998; GUILLERMO *et al.*, 2007; DosREIS & LOPES, 2009).

A progressão ou declínio da doença depende de um fino balanço entre o parasito e o hospedeiro. A sobrevivência da célula hospedeira parece ser de extrema importância para a resposta imunológica e à amplificação/contenção da patogenia. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a morte celular em macrófagos murinos induzida nos momentos iniciais da infecção por *Leishmania*, verificando a ocorrência deste processo *in vitro*, comparando com diferentes espécies de *Leishmania* em diferentes linhagens de camundongos e com as diferentes manifestações clínicas.

2 – OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência e o tipo de morte de macrófagos de camundongos C57BL/6 e BALB/c induzida pela infecção por *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* *in vitro*, tentando correlacionar com a manifestação da doença:

- a) Aspectos morfológicos de macrófagos infectados;
- b) A presença da morte de células infectadas;
- c) Determinação do tipo de morte celular. Para tal serão utilizados os seguintes critérios para a classificação:
 - i) perda e fragmentação de DNA
 - ii) exposição de fosfatidilserina
 - iii) ativação de caspase 3
 - iv) ativação de caspases 8 e 9

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Animais

Camundongos machos BALB/c e C57BL/6, com idade entre 6 e 12 semanas foram utilizados em todos os experimentos. Os animais foram adquiridos no Centro de Bioterismo (CeBio) da UFMG e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da mesma instituição. Animais eram utilizados após vermifugação com ivermectina (Ivomec, Merial), onde era aplicada 1 mililitro (mL) para cada 500 mL de água. Os animais eram tratados por uma semana, após este tempo esperava-se uma semana para o uso experimental.

Os estudos foram realizados de acordo com as leis brasileiras de experimentação animal. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA – 109/2012) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 – Parasitos

As cepas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, código internacional IFLA/BR/67/PH8, e de *Leishmania (Viannia) guyanensis*, código internacional MHOM/BR/75/M4147, utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela professora Dra. Maria Norma Melo, do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na forma de promastigotas.

Cepas adicionais de *L. (L.) amazonensis*, código internacional MHOM/BR/1989/Ba199, e de *L. (V.) guyanensis*, código internacional MHOM/BR/70/M1176, foram utilizadas em resultados preliminares aqui apresentados (figura 12).

3.3 – Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania*

O isolamento de formas amastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* foi feito a partir de lesões de camundongos BALB/c infectados experimentalmente na pata. Os camundongos eram sacrificados e as patas eram dissecadas para isolar fragmentos do tecido infectado. Este tecido era macerado e inoculado em meio de cultura RPMI acrescidos de 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cripion) estéril e inativado. O meio de cultura RPMI (Sigma) era dissolvido

em água bidestilada, tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (2 g/L) e HEPES ([N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico)]) (5,96 g/L). Após adição do antibiótico gentamicina (50 mg/L), o pH era ajustado para 7,2 e o meio era esterilizado por filtração em filtros de 0,2 μm . O SFB era adicionado imediatamente antes do uso.

A incubação dos fragmentos da lesão em RPMI com SFB era feita 25°C (estufa BOD-REVCO) que permitia a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas. A cultura era manipulada apenas com instrumentos estéreis em capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, SP, Brasil ou Forma Scientific, Marietta, OH, E.U.A.) e observada periodicamente para determinar mudanças na morfologia e permitir o acompanhamento da cultura.

De modo semelhante à metodologia acima descrita, formas amastigotas da espécie *L. (V.) guyanensis* foram isoladas a partir de lesões em hamster e cultivadas em o meio RPMI acrescido de 10% SFB.

3.4 – Cultivo de parasitos

Os parasitos eram cultivados sob forma promastigota *in vitro* em meio RPMI com 10% (v/v) SFB, em estufa a 25°C. Eram inoculados $1,0 \times 10^6$ de parasitos por mL de meio de cultura. O cultivo era mantido por até 10 passagens, pois há descrição da perda de virulência do parasito após longos períodos em cultura (NOLAN & HERMAN, 1985). Após cerca de 5 dias, as formas promastigotas em cultivo alcançavam a fase estacionária e eram utilizados para a infecção nos experimentos.

O acompanhamento da cultura era realizado por observação em microscópio invertido (Olympus, IMT, Tóquio, Japão) e a contagem dos parasitos era feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (C.A. Hausser & Son, Filadélfia, PA, E.U.A.). A contagem era realizada em microscópio óptico (Olympus), em aumento de 400x, após uma diluição da cultura de 1:20 em isoton (0,05 M ácido cítrico, 0,12 M NaCl, 0,5% formaldeído, p/v, pH 7,2).

3.5 – Criopreservação

Para criopreservação, utilizavam-se culturas entre o quarto e o sexto dia, quando cultura se encontrava em fase estacionária. Às culturas de formas promastigotas adicionava-se 10% (v/v) de glicerol PA estéril, gota a gota, sob agitação constante. Após 30 minutos de agitação, a cultura era dividida em alíquotas em tubos próprios para criopreservação de 1,8 mL (Nunclon-Delta, Nunc, Dinamarca), movidas para o freezer - 20°C e deixadas por 24 horas. Em seguida, eram transferidas para o freezer a -80 °C (BioFreezer, Forma Scientific, Marietta, OH, E.U.A.) e mantidas por mais 24 horas. Após esse período, as amostras eram transferidas para N₂ líquido. As amostras criopreservadas eram recuperadas por meio do rápido descongelamento a 37°C e inoculação em meio de cultura, com manutenção em estufa a 25°C. As culturas recuperadas só eram utilizadas em experimentos após dois repiques consecutivos para total recuperação dos parasitos.

3.6 – Infecção de camundongos e acompanhamento da progressão da lesão

Animais das linhagens BALB/c e C57BL/6 eram infectados s.c. na pata direita traseira com 1×10^6 promastigotas na fase estacionária (cerca do 5º dia de cultivo). Parasitos eram contados e a quantidade ajustada para um volume final de 20 µL de PBS estéril para cada animal. Os animais eram inoculados com PBS na pata esquerda como controle. Para acompanhar o tamanho da lesão, ambas as patas eram medidas semanalmente com paquímetro (Mitutoyo), e o resultado era a diferença da pata direita pela pata esquerda em milímetros. Animais com lesões demasiadamente grandes já necrosadas eram sacrificados para evitar sofrimento desnecessário.

3.7 – Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para retirar macrófagos peritoneais, os camundongos eram inoculados, via i.p., com 2 mL de tioglicolato (Gibco) a 3%. Após 3 a 4 dias, os animais eram sacrificados e injetados com 5 mL de RPMI gelado e estéril na cavidade peritoneal. Realizava-se uma massagem abdominal e retirava, com auxílio da seringa, o RPMI contendo o *pool* das células que eram mantidas no gelo. As células eram centrifugadas a 100 x g por 10 minutos, lavadas com PBS gelado e centrifugadas novamente para serem ressuspensas em RPMI com 10% de SFB. As células eram então contadas e o volume ajustado para serem plaqueadas direto no poço e incubadas por

2 horas em estufa a 37°C com 5% CO₂, para adesão de macrófagos à superfície. Após esse tempo, as células eram lavadas 2 vezes com RPMI à temperatura ambiente, para retirar células contaminantes não aderidas. Adicionava-se novo RPMI com 10% SFB e células retornavam à estufa até o momento de infecção, no dia seguinte.

As células eram plaqueadas em câmaras de plástico com 8 poços sobre lâminas de vidro para microscópios (Lab-Tek, Nalge Nunc International, Naperville, IL, E.U.A.), placas de 96 poços de fundo chato (Nalge Nunc International) ou placas de 6 poços (Nalge Nunc International) com 1×10^5 , 5×10^4 ou 1×10^7 macrófagos, respectivamente. As células eram incubadas com RPMI adicionados de 10% SFB (v/v).

3.8 – Infecção de macrófagos *in vitro*

Para a infecção dos macrófagos peritoneais aderidos em placas e lâminas, utilizavam-se parasitos na forma promastigota durante a fase estacionária. Os parasitos eram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer, como descrito acima, e seu número era ajustado para a proporção de 10 parasitos por célula (10:1). Os parasitos eram co-incubados por 4 horas a 34°C na presença de 5% CO₂ para permitir a infecção dos macrófagos. Após esse tempo, as placas eram lavadas duas vezes com RPMI em temperatura ambiente para remover parasitos não interiorizados, sendo considerado este momento o “tempo zero” de infecção. As células eram, então, mantidas por tempos variáveis a 34°C na presença de 5% CO₂.

3.9 – Avaliação da taxa de infecção e multiplicação de parasitos no interior dos macrófagos

A taxa de infecção, assim como a multiplicação e permanência de *L. amazonensis* e *L. guyanensis* no interior de macrófagos peritoneais de BALB/c, era avaliada pela contagem do número de macrófagos infectados e pelo número de parasitos no interior dessas células, após tempos variados de incubação. As contagens eram realizadas em microscópio óptico, em lâminas preparadas com a coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG). As células eram fixadas em metanol PA por 5 minutos e, em seguida, adicionava-se o corante May-Grünwald nas câmaras por 1 a 3 minutos. Logo após este intervalo, adicionava-se o mesmo volume de água destilada (pH 7,0) sem retirar o corante, a solução era retirada imediatamente. O corante

Giemsa, preparado na hora do uso pela adição de 2 gotas do corante por mililitro de água destilada (pH 7,0), era adicionado e incubado por 10 a 15 minutos. Destacando as câmaras de plástico da lâmina de vidro, as células eram lavadas com água corrente e as lâminas eram seladas.

A porcentagem de macrófagos infectados era obtida a partir da contagem de 500 macrófagos. Para a taxa de infecção, eram contados os parasitos presentes no interior de 200 macrófagos dos mesmos campos, e o número de parasitos era dividido pelo número de macrófagos infectados, obtendo-se uma média do número de parasitos por célula. Para obtenção do índice de infecção, a porcentagem de macrófagos infectados era multiplicada pelo número médio de parasitos por macrófago. Os resultados estão apresentados como a média da porcentagem de duplicatas \pm desvio padrão da média.

3.10 – Análise de hipodiploidia em núcleos de macrófagos

Células foram lisadas com tampão hipotônico contendo iodeto de propídeo (PI) (Sigma) e seu conteúdo nuclear era avaliado utilizando FACScan (BD Biosciences), de acordo com RICCARDI & NICOLETTI (2006). Brevemente, após diferentes períodos de infecção dos macrófagos com promastigotas o sobrenadante era recolhido e centrifugado a 100 x g por 10 minutos para a recuperação de células não aderidas da placa. Células aderidas eram tratadas com tampão de lise (0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 50 μ g/mL de PI) e o lisado era adicionado às células recolhidas previamente do sobrenadante e incubado a 4°C por aproximadamente 18 horas. Ao menos 40.000 eventos eram coletados por amostra. Análise dos dados era conduzida utilizando o programa FlowJo (FlowJo, LCC/Tree Star). Primeiramente, era feito um *gate* por tamanho (*Forward Scatter* - FSC) x granulosidade (*Side Scatter* - SSC) delimitando a população de núcleos (Fig. 3A, painel da esquerda), do qual era feito outro *gate* para eliminar fluorescência muito baixa (Fig. 3A, painel da direita).

3.11 – Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose

Após infecção em tempos variados, o sobrenadante era retirado e separado a fim de coletar células que por ventura já estivessem mortas e não aderidas. Células aderidas eram destacadas com rodinhos de borracha próprios para cultura celular (Sarstedt Inc., Nümbrecht, Alemanha)

e, juntamente com as células vindas do sobrenadante, eram lavadas 2 vezes com PBS e ressuspensas com tampão de lise (40 mM EDTA pH8, 50 mM Tris pH 8, 1% Triton). Com a adição de RNase (20 µg/mL), a solução era incubada por 1 hora a 37°C e novamente incubadas por cerca de 2 horas a 56 °C, após a adição de Proteinase K (100 µg/mL). Após esse período de incubação, o sobrenadante era tratado com o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1) (Sigma, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) por 2 vezes, centrifugado a 15000 rpm, por 5 minutos, a 4°C e, finalmente, tratado com clorofórmio: álcool isopropílico (24:1) (Sigma), antes de ser incubado a -20°C por aproximadamente 18 horas com 0,25 M NaCl mais 2 vezes o volume de etanol PA. Após este intervalo, centrifugava-se o sobrenadante por 15 minutos, a 15000 rpm, a 4°C por duas vezes, com lavagem com etanol 70%. Finalmente, retirava-se o etanol e deixava o precipitado secar em temperatura ambiente para posterior ressuspensão em T.E. (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH8,0).

Para visualizar a fragmentação do DNA, as amostras em T.E. eram quantificadas (GeneQuant, Amersham, GE Healthcare Biosciences, E.U.A.) e adicionava-se tampão de amostra (Promega, Madison, WI, E.U.A.) às alíquotas a serem aplicadas. As amostras, a uma concentração final de 1 µg/µL, eram aplicadas em gel de agarose 1,8% e a corrida no gel se dava a uma voltagem constante de 90V. Os géis eram analisados em transluminador de UV (Stratagene, Cedar Creek, TX, E.U.A.), visualizados e documentados com câmera (Vilmer Loumart, França) e foto-documentador (Vídeo Graphic Printer UP-890MD, Sony, Japão).

3.12 – Indução de fragmentação de DNA em *L. amazonensis*

Para a indução de apoptose nos parasitos foi utilizado o protocolo previamente descrito por HOLZMULLER *et al.* (2002). Brevemente, os parasitos na forma promastigota durante a fase estacionária eram contados na câmera hemocitométrica de Neubauer, como descrito acima, e seu número era ajustado em alíquotas de 1×10^8 parasitos. Estas alíquotas eram centrifugadas para a troca de meio de cultura adicionado com NaNO₂ (nitrito de sódio) nas concentrações de 2,5 mM e 5,0 mM. Os parasitos eram incubados, então, por 4 horas. Após este intervalo, as células eram coletadas e realizava-se a extração de DNA genômico, como descrito anteriormente para macrófagos.

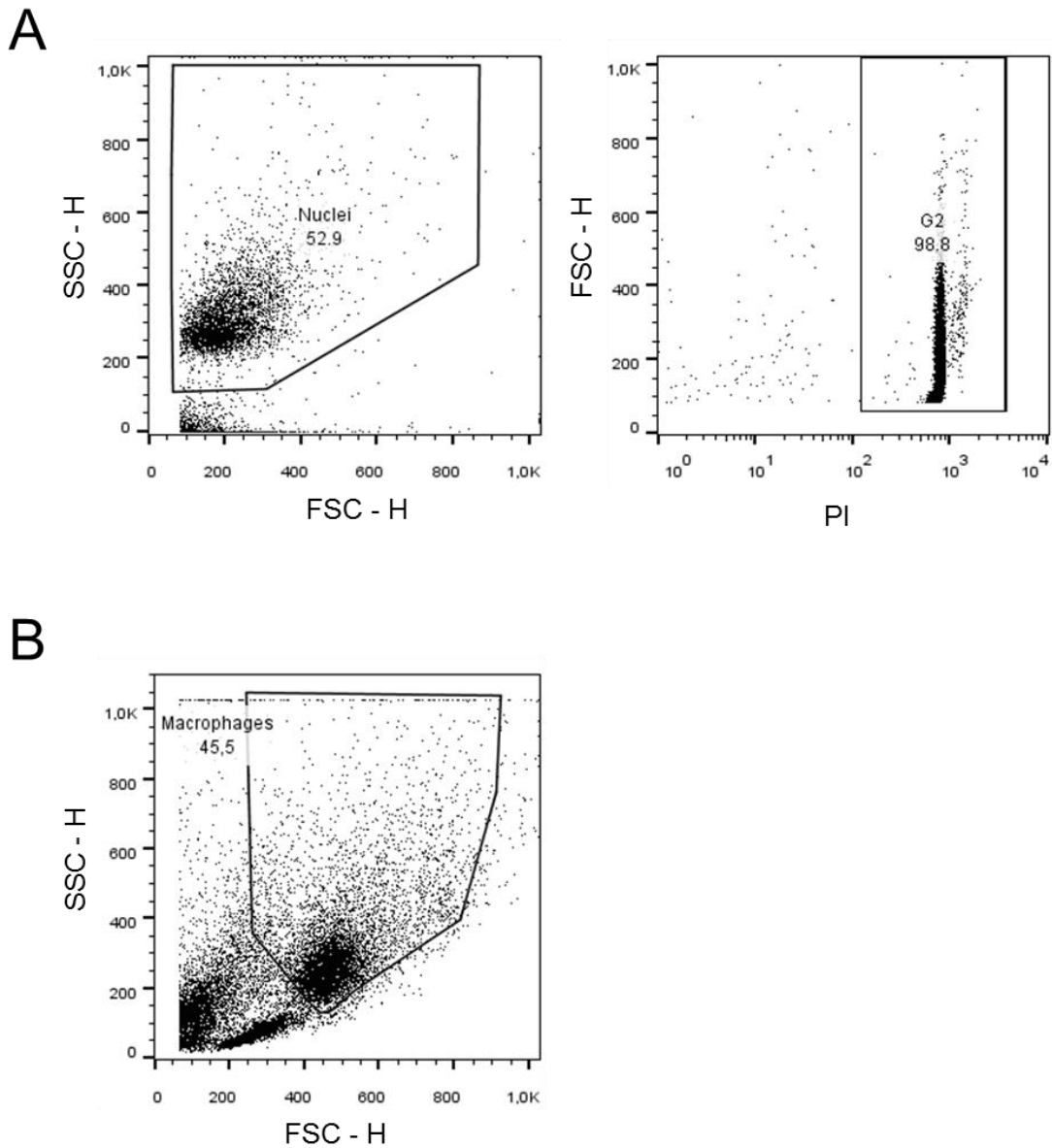


Figura 3 – Gates representativos para análise de eventos em experimentos realizados por citometria de fluxo. A – Núcleos de macrófagos em experimentos de hipodiploidia. População de núcleos selecionada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), eliminando artefatos e restos celulares (painel da esquerda). Em seguida, era feita seleção para a eliminação de elementos de baixa fluorescência (painel da direita). B – População de macrófagos íntegros para experimentos de permeabilidade celular e exposição de fosfatidilserina (PS). Seleção da população de macrófagos selecionados por FSC e SSC.

3.13 – Detecção da permeabilidade da membrana plasmática e da exposição de PS em macrófagos infectados

A perda da integridade da membrana foi determinada pela marcação com iodeto de propídio (PI), enquanto a avaliação da exposição de PS foi acessada pela marcação com Anexina V-FITC (AnnV), que se liga especificamente a esse fosfolípídeo. Para o preparo das células para marcação com PI apenas ou juntamente com Anexina V-FITC foi adaptado o protocolo descrito por CATELAS *et al.*, 2005.

De maneira sucinta, células aderidas em placas de 6 poços, infectadas ou não com *L. amazonensis*, foram gentilmente removidas com rodinhos próprios para cultura celular, centrifugadas, lavadas com meio RPMI gelado duas vezes e mantidas em suspensão em tubos de 5 mL de polipropilenos (Sarstedt) a 34 °C com 5% CO₂, por cerca de 18 horas, para a recuperação de danos à membrana celular. A marcação com AnnV (BD Bioscience Pharmingen) foi realizada de acordo com o fabricante e a contra marcação foi realizada com PI (Promega). Brevemente, as células eram centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspendidas com tampão de ligação (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) para uma concentração final de 1x10⁶ células por mL. Dessa suspensão celular eram transferidos 100 µL (ou 1x10⁵ células) para tubos menores, onde se adicionava 5 µL da Anexina – FITC (PharMingen) e 10 µL de solução estoque de PI (50 µg/mL) e incubava por 15 minutos. Logo em seguida, 400 µL do tampão de ligação eram adicionados em cada tubo, e eram analisados no citômetro de fluxo (FACScan) imediatamente, para evitar perda de fluorescência. As amostras permaneciam protegidas da luz em todas as etapas após a incubação com Anexina V- FITC. Ao menos 10,000 eventos eram salvos em cada amostra. Análises foram realizadas pelo software FlowJo (TreeStar). *Gate* representativo da seleção da população de macrófagos pode ser visualizado na Fig. 3B.

3.14 – Análise por *Western Blotting*

Os macrófagos aderidos, infectados ou não, eram coletados das placas de cultura com o auxílio de rodinhos de borracha próprios para cultura celular (Sarstedt Inc.) lavados com PBS e os extratos celulares eram obtidos por homogeneização com tampão de lise [1% (v/v) Triton

X-100, 100 mM/L Tris/HCl, pH 8.0, 10% (v/v) glicerol, 5 mM/L EDTA, 200 mM/L NaCl, 1 mM/L ditioneitol, 1 mM/L fluoreto sufonil fenilmetil, 25 mM/L NaF, 2.5 g/mL leupeptina, 5 g/mL aprotinina, e 1 mM/L ortovanadato de sódio] e centrifugação a 13,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. As amostras eram conservadas a -20°C até o momento de uso. A quantificação de proteína era determinada pelo ensaio do reagente de Bradford (Bio-Rad). Os extratos (20 µg) eram separados em géis de 12,5% por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad), no gelo, a 100V por 90 minutos, e lavadas com água destilada. As membranas eram bloqueadas por 2 horas a 4°C com TBS contendo 5% (w/v) de leite desnatado e 0,1% Tween-20, lavadas com TBS contendo 0,1% Tween-20 (TBST) e incubadas por aproximadamente 18 horas a 4°C com o anticorpo anti caspase-3 (#9695, Cell Signalling), em diluição de 1:1000. A membrana era lavada com TBST e incubada com anticorpo anti-coelho conjugado com peroxidase (1:3000) (#7074, Cell Signalling). As membranas eram então lavadas com tampão de bloqueio, seguidas por lavagens com TBST e, por fim, com TBS, todas por 3 vezes por 5 minutos. As bandas imunorreativas eram visualizadas utilizando o sistema de detecção ECL, como descrito pelo fabricante (GE Healthcare). O anticorpo anti-β-actina era utilizado como controle endógeno, na diluição de 1:5000 (A5316, Sigma Chemicals), com anticorpo o secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase 1:3000 (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology), diluição final.

3.15 – Detecção de ativação de Caspase 8 e 9

A ativação das caspases 8 e 9 foram detectadas utilizando Caspase-Glo® 8 Assay e Caspase-Glo® 9 Assay (Promega), respectivamente, de acordo com o fabricante.

Rapidamente, as células eram cultivadas em placas de 96 poços e infectadas como descrito anteriormente. Após tempos de infecção fixos, o reagente preparado previamente era adicionado às amostras e homogeneizados gentilmente. O reagente causa a lise celular e, com a clivagem do substrato presente na solução pelas caspases ativas, emite um sinal luminescente. Após incubação por uma hora em temperatura ambiente, os sobrenadantes eram transferidos para placas de 96 poços específicos para o luminômetro (Nalgene Nunc) para a avaliação da luminescência utilizando o luminômetro (Packard - Luminocount). O sinal gerado é proporcional à quantidade de atividade de caspase presente e os resultados são expresso em Unidade Relativa de Luz (R.L.U.)

3.16 – Análises Estatísticas

Os resultados são apresentados como média \pm DP ou EPM, conforme descrito. Cada dois grupos foram analisados por teste *t* de Student. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. As análises foram realizadas utilizando GraphPrism 5.0 software para Windows (GraphPad).

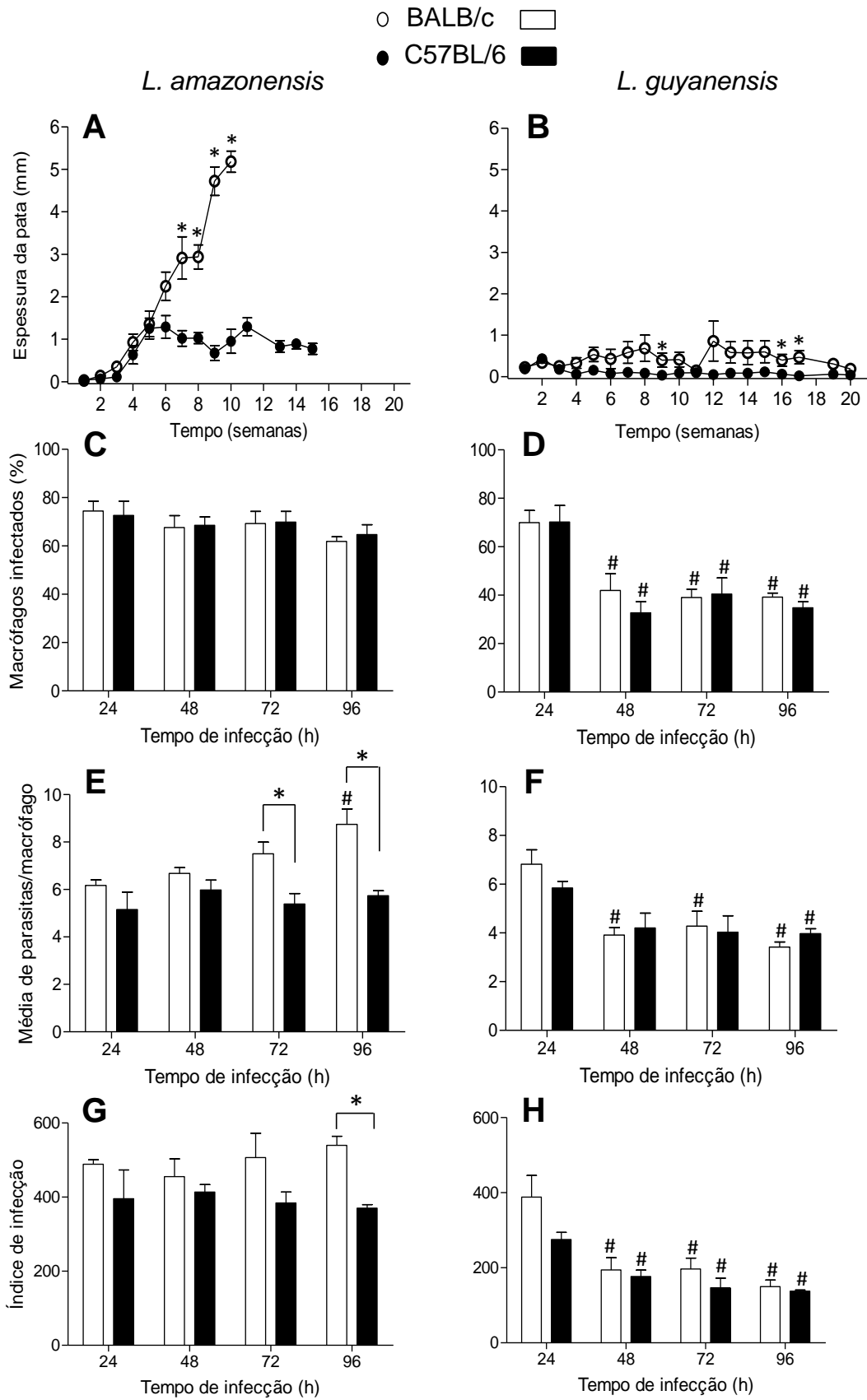
4 – RESULTADOS

4.1 – Curso de infecção *in vivo* e *in vitro* com formas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*

Há muito, estudos experimentais e epidemiológicos têm mostrado que diferentes espécies de *Leishmania* causam diferentes formas de doença. Essas diferenças são facilmente demonstradas nos modelos murinos de infecção, particularmente nas linhagens de camundongos C57BL/6 e BALB/c. Aqui, foram comparadas estas linhagens para as duas espécies de *Leishmania* utilizadas neste trabalho, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, quanto à infecção *in vivo*, na pata, com acompanhamento semanal da lesão (Fig. 4A e B) e *in vitro* em macrófagos peritoneais (Fig. 4C-H).

Como esperado, camundongos BALB/c são completamente suscetíveis a *L. amazonensis*, com uma lesão crescente com o tempo. Incapazes de controlar a infecção, esses animais têm que ser sacrificados na 10ª semana de infecção (Fig. 4A) devido ao tamanho das lesões necrosantes. Camundongos C57BL/6 são menos suscetíveis à infecção, iniciando com uma lesão comparável à do BALB/c, mas capazes de conter o crescimento da lesão (Fig. 4A). Já está bem descrito que C57BL/6 não são completamente capazes de controlar a infecção por *L. amazonensis*, levando a uma infecção crônica. Por outro lado, tanto BALB/c quanto C57BL/6 são capazes de controlar a infecção por *L. guyanensis*, embora com um curso de infecção diferente entre as linhagens (Fig. 4B). Camundongos BALB/c apresentam edema discreto a partir da 5ª semana, que regride até uma ausência completa de lesão mensurável na 20ª semana, enquanto que animais C57BL/6 não apresentaram qualquer lesão no mesmo período.

A infecção *in vitro* segue um padrão coerente com a infecção *in vivo*. Na proporção de 10:1 parasitos:célula, macrófagos peritoneais de ambas as linhagens apresentam uma porcentagem de infecção em torno de 80% quando infectados com *L. amazonensis*, que se mantém constante até o período observado de 96 horas de infecção (Fig. 4C). O número de parasitos, no entanto, aumenta de uma média de 5-6 parasitos após 24 h, para cerca de 9 após 96 h em macrófagos de BALB/c, mas se mantém estável em macrófagos de C57BL/6 (Fig. 4E). Em contrapartida, nas mesmas condições, a infecção com *L. guyanensis* se apresenta com porcentagem e média de parasitos similares à infecção por *L. amazonensis* no tempo de 24 h mas com uma redução para 30-40% de células infectadas (Fig. 4D) e 3 a 4 parasitos por célula (Fig. 4F) em ambas as linhagens em 48 h, que persistem até 96 h. O índice de infecção (Fig. 4G



e H) permite uma aproximação do número total de parasitos na infecção.

Imagens das infecções em diferentes tempos (Fig. 5A e B) também demonstram que as infecções são bastante distintas por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Amastigotas (setas pretas) da primeira espécie ocupam vacúolos amplos (Fig. 5A), ausentes na infecção por *L. guyanensis* (Fig. 5B). Foram detectadas, com frequência, células em processo de morte celular com núcleos condensados (setas verdes), característicos de apoptose, particularmente na infecção com *L. amazonensis*, e restos celulares (setas amarelas), que lembram necrose, contendo amastigotas, principalmente na infecção por *L. guyanensis*. Em alguns campos analisados na infecção por *L. amazonensis* foi possível observar o que aparentam ser células apoptóticas recém fagocitadas, ou aderidas a macrófagos viáveis (setas vermelhas). Em contrapartida, na infecção por *L. guyanensis*, particularmente a partir de 48 horas, era frequente observar amastigotas livres (setas pretas).

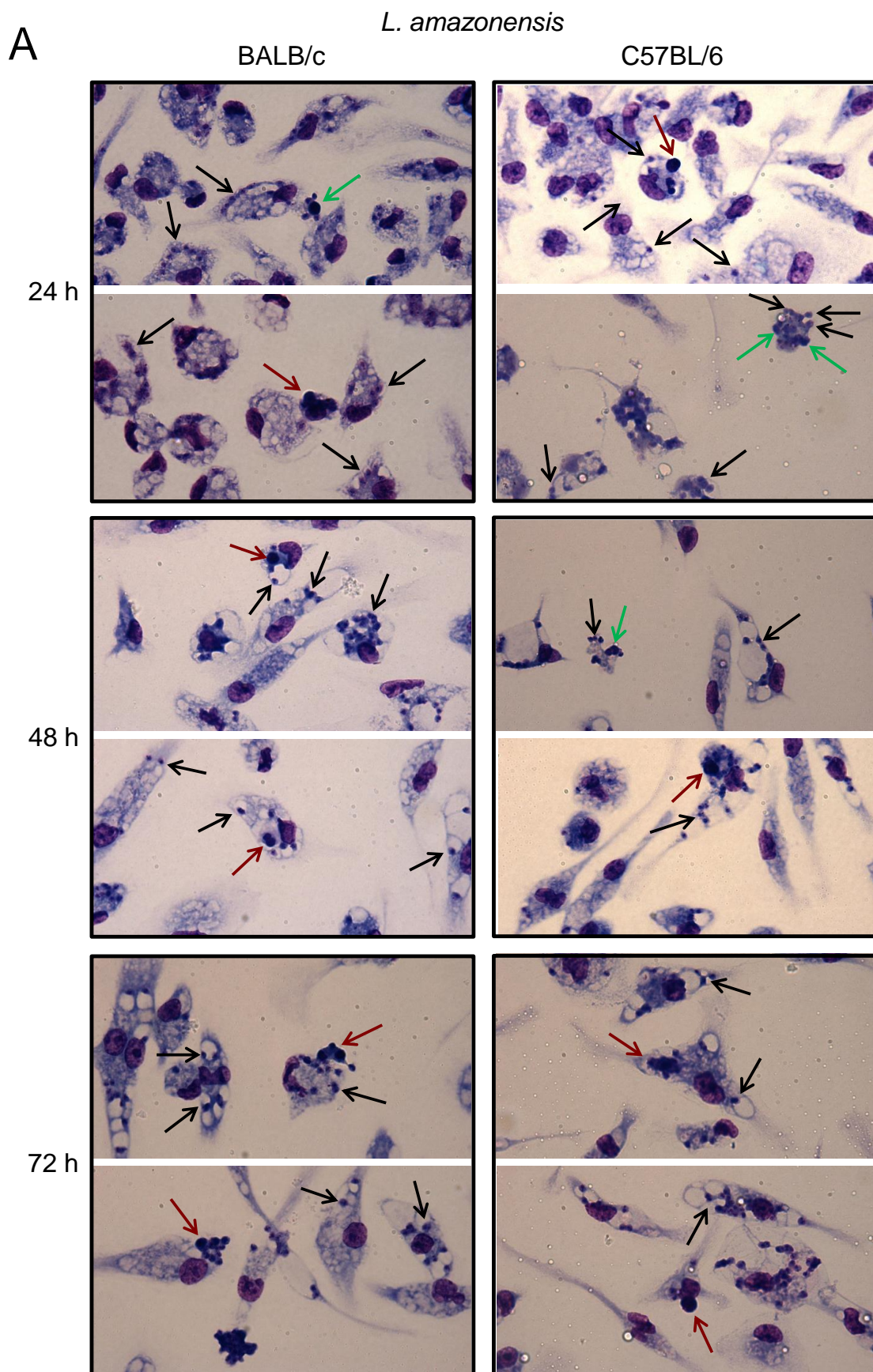
Figura 4 – Progressão da lesão em camundongos infectados com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* e infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais. 1×10^6 promastigotas em fase estacionária de cultivo de *L. amazonensis* (A) e *L. guyanensis* (B) foram utilizados para a infecção das patas traseiras de camundongos BALB/c (círculos abertos) e C57BL/6 (círculos fechados). A progressão da lesão foi medida semanalmente e a espessura da lesão é expressa pela diferença da pata infectada com a pata não infectada. Barras representam média \pm EPM (erro padrão da média) de 5 animais. Diferenças significantes indicadas entre os grupos, com $P < 0,05$, está representada por *. Em infecções *in vitro*, os macrófagos eram infectados com *L. amazonensis* (C, E e G) ou *L. guyanensis* (D, F e H), como descrito em Material e Métodos. Células infectadas foram contadas e as porcentagens eram obtidas (C e D), juntamente com o número médio de parasitos por macrófago infectado (E e F). Índice de infecção (G e H) foi obtido multiplicando a porcentagem de células infectadas por número de parasitos por célula. Barras representam média \pm DP (desvio padrão) de três a seis experimentos independentes, dependendo do tempo de infecção. As diferenças estatísticas significantes entre valores do mesmo grupo comparadas ao ponto de 24h ($P < 0,05$) são representados por #.

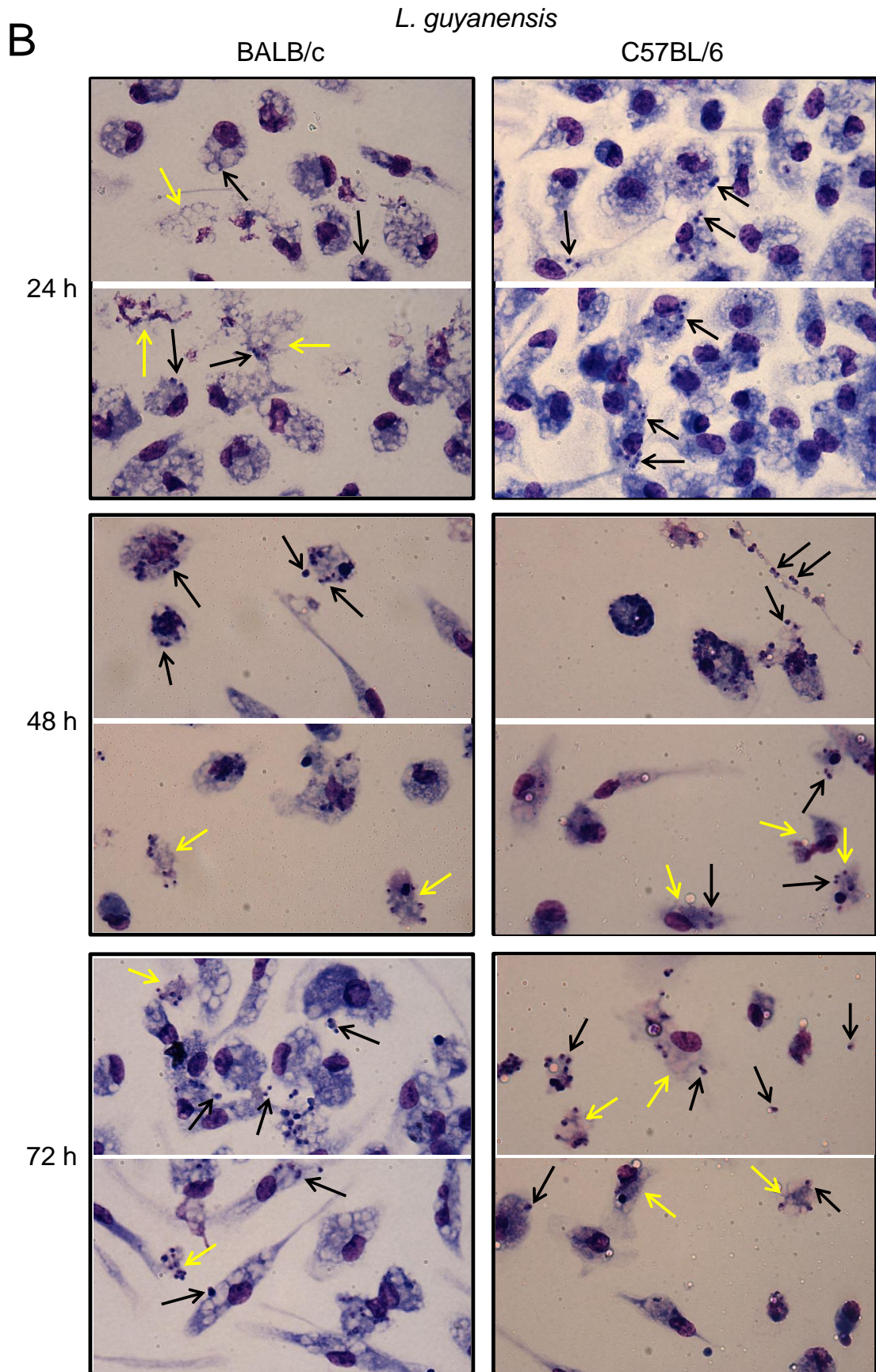
4.2 – Infecção *in vitro* com *L. guyanensis*, mas não com *L. amazonensis*, causa perda da integridade da membrana plasmática tanto em macrófagos de BALB/c, quanto de C57BL/6

Para confirmar se essas espécies de *Leishmania* causam a morte da célula hospedeira *in vitro*, macrófagos infectados foram incubados com iodeto de propídio (PI) e a permeabilidade dessas células era avaliada por citometria de fluxo (Fig. 6). A integridade da membrana celular, tanto de macrófagos de BALB/c, quanto de C57BL/6, infectados com cada uma das espécies apresenta padrões distintos à medida que a infecção progride. *L. guyanensis* claramente causa perda da integridade da membrana, induzindo uma morte significativa das células já com 24 h de infecção, culminando com a maioria das células de BALB/c permeáveis com 72 h e já com 48 h de infecção em macrófagos de C57BL/6. Contudo, esse perfil não é observado na infecção com *L. amazonensis*. Apesar de células infectadas por *L. amazonensis* também apresentarem perda de integridade da membrana celular com 24 h de infecção em macrófagos de C57BL/6, esta espécie parece impedir que a célula hospedeira perca a integridade da membrana em macrófagos de ambas as linhagens murinas no tempo de 72 h, cujos valores ficam ainda menores do que de células não infectadas.

O próximo passo foi investigar outros aspectos da morte celular das infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Inicialmente, foram utilizadas três características que auxiliam na identificação de morte programada por apoptose: a perda de DNA nuclear, degradação do DNA em padrão “escada” e a exposição de PS.

Figura 5 – Infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Macrófagos peritoneais de BALB/c (esquerda) ou C57BL/6 (direita) eram infectados com *L. amazonensis* (A) ou *L. guyanensis* (B). Após tempos indicados no canto esquerdo, as células eram coradas e analisadas. Imagens capturadas com 48 horas de infecção, em aumento de 1000x. *Setas pretas* – amastigotas; *setas verdes* – estruturas apoptóticas (núcleos condensados ou remanescentes de corpos apoptóticos); *setas amarelas* – estruturas remanescentes de células lisadas; *setas vermelhas* – estruturas remanescentes de células apoptóticas aparentemente fagocitadas.





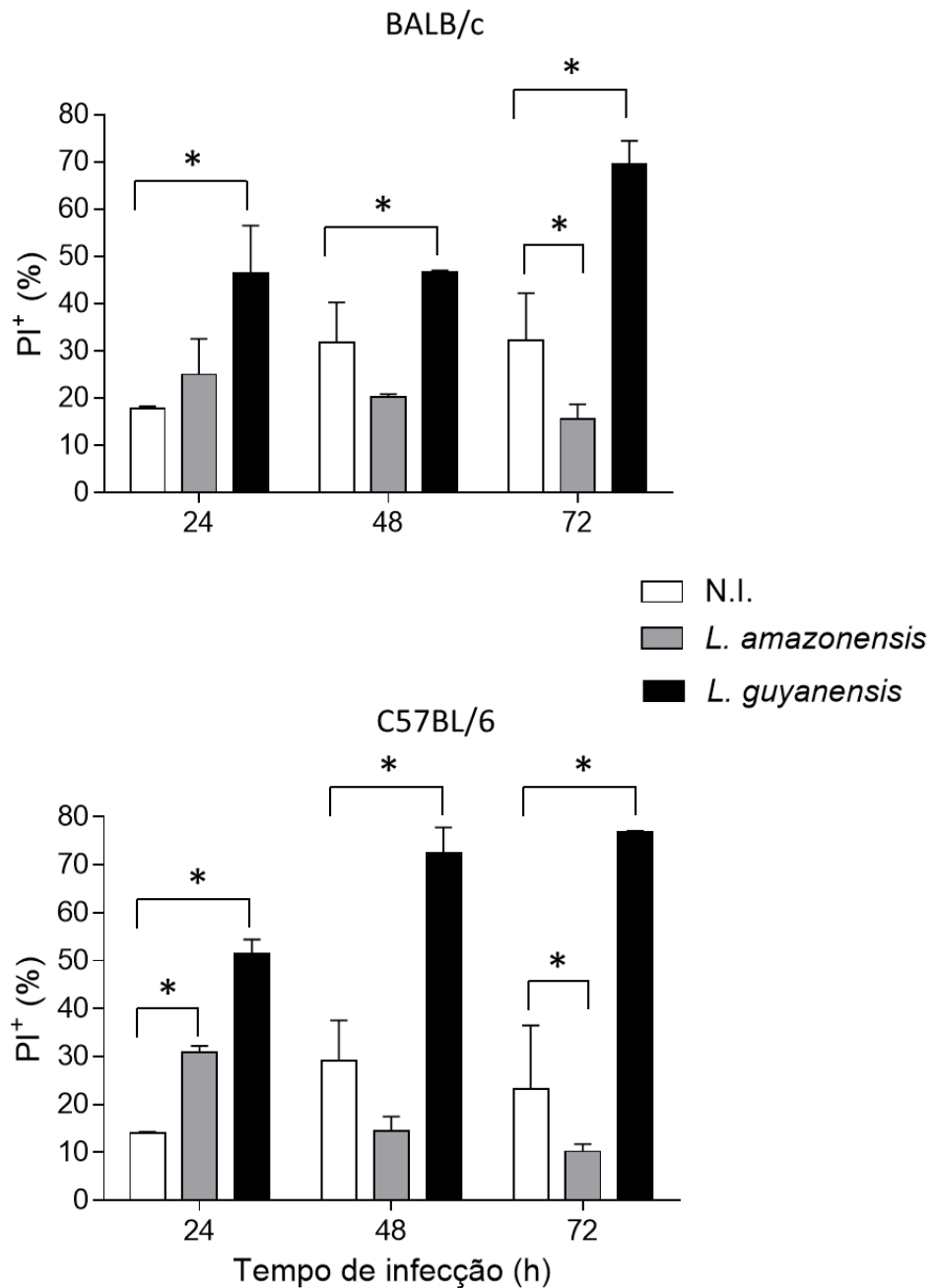


Figura 6 – Morte de macrófagos infectados *in vitro* com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*. Avaliação da internalização de PI (PI⁺) de células não infectadas (N.I.), infectadas com *L. amazonensis*, ou com *L. guyanensis*. O painel superior apresenta dados obtidos com a infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c e o painel inferior de C57BL/6. Os valores representam porcentagem de células PI positivas na cultura ao longo dos tempos descritos. Barras representam média \pm EPM de pelo menos quatro experimentos. As diferenças significantes indicadas entre os grupos, com $P < 0,05$, está representada por *.

4.3 – Infecção *in vitro* por *L. amazonensis*, mas não por *L. guyanensis*, causa perda e fragmentação do DNA do núcleo da célula hospedeira

A eventual perda do DNA nuclear de macrófagos infectados foi avaliada por marcação dos núcleos com PI e quantificação por citometria de fluxo. Essa avaliação é baseada no princípio que células apoptóticas têm seu DNA parcialmente degradados devido a ativação da endonucleases CAD, acarretando na liberação de pequenos fragmentos do núcleo para o citoplasma, levando à hipodiploidia da célula. Conseqüentemente, a marcação dos ácidos nucleicos com PI emite fluorescência proporcional ao conteúdo nuclear de DNA (RICCARDI & NICOLETTI, 2006). A figura 7 mostra a porcentagem de núcleos hipodiplóides de macrófagos após infecção com *Leishmania*. Surpreendentemente, foi observado que *L. guyanensis* induz uma perda de DNA pequena em ambas as linhagens murinas, enquanto *L. amazonensis* induz uma perda substancial, um sinal de que as células infectadas com *L. amazonensis* deveriam realmente estar morrendo por apoptose, como observado por microscopia óptica. Como nesse experimento apenas os núcleos de macrófagos são selecionados por tamanho para a citometria, fica claro que a apoptose ocorre nas células hospedeiras e não no parasito. Histogramas da quantificação de fluorescência de um experimento representativo estão mostrados na figura 7A, com a porcentagem de células hipodiplóides na figura 7B.

A clivagem de DNA dada pela ação da CAD, que ocorre durante a morte por apoptose, apresenta o chamado “padrão escada”, pois gera fragmentos de 180-200 pares de base (bp) e múltiplos, correspondente ao tamanho dos nucleossomos. Por outro lado, o DNA de células necróticas se apresenta como um rastro, uma vez que a quebra ocorre de maneira aleatória, sem qualquer forma de padrão ou organização. Para confirmar se o DNA de macrófagos infectados estava sendo fragmentado com esse padrão, este foi extraído para e analisado por eletroforese em gel de agarose.

Corroborando com os resultados de hipodiploidia, é possível observar a degradação internucleossômica em macrófagos infectados com *L. amazonensis* em ambas as linhagens de camundongos (Fig. 8 A e C). *L. guyanensis* não induz fragmentação de DNA em “escada” nas células hospedeiras de BALB/c ou C57BL/6 (Fig. 8B e D), apesar de ser visível um leve rastro em amostras de macrófagos de BALB/c infectados (Fig. 8B). A fragmentação induzida por *L. amazonensis* pode ser observada em tempos iniciais como 6 horas de infecção, como observado em BALB/c (Fig. 8A) que se estende até as 72 h (Fig. 8A e C). De fato, resultados obtidos pelo

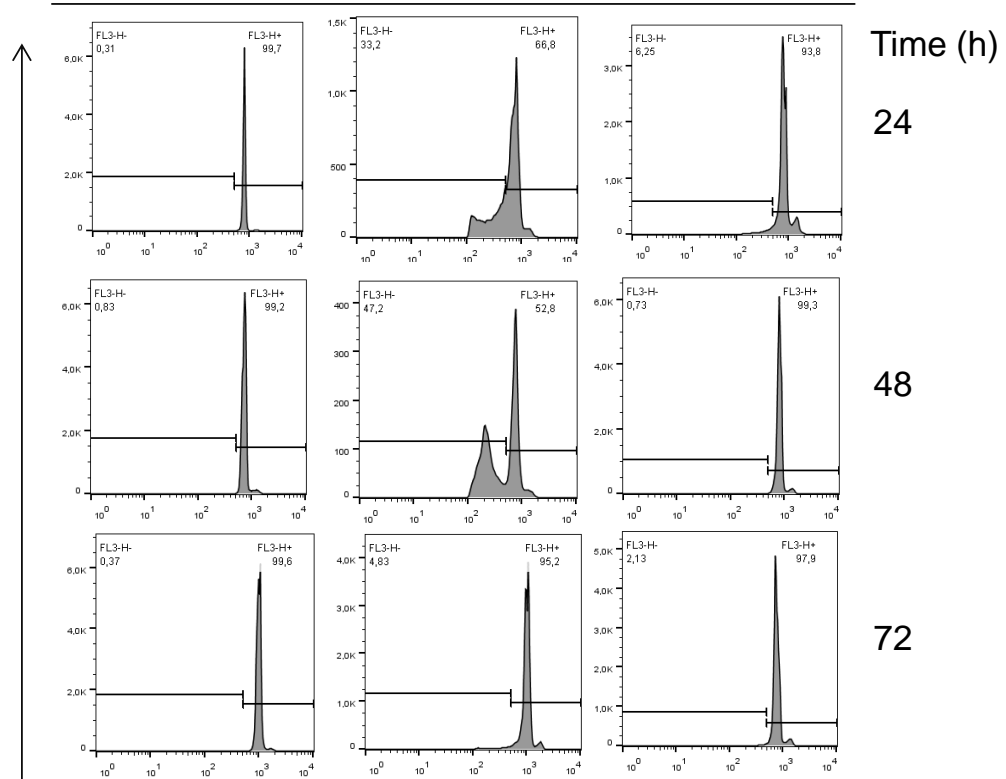
A

N.I.

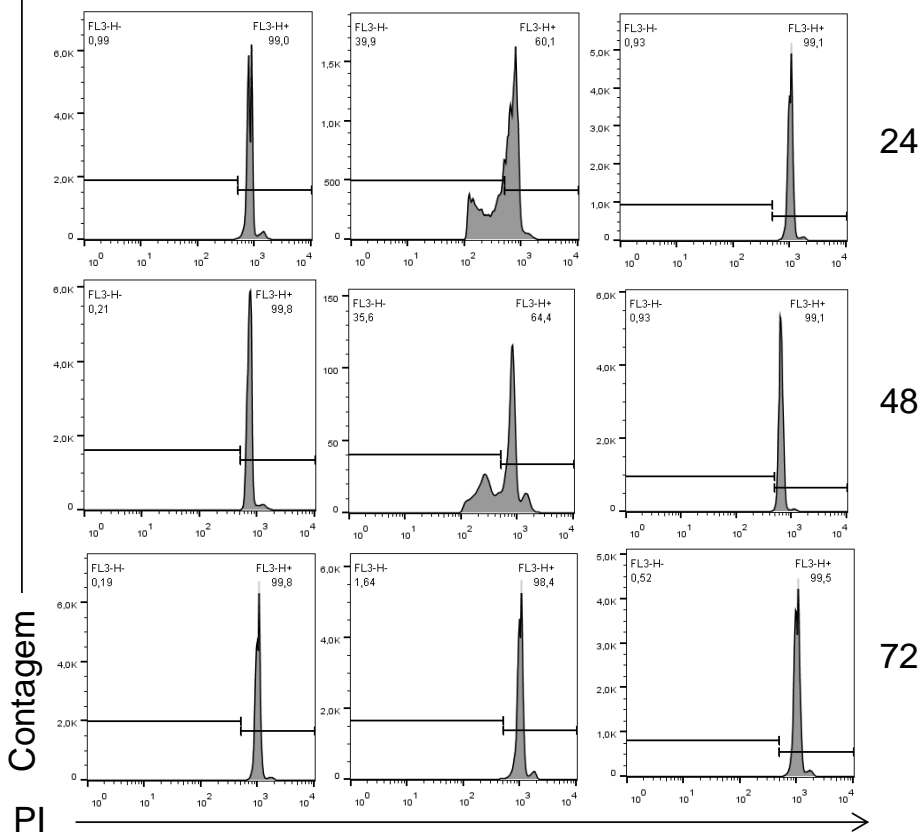
L. amazonensis

L. guyanensis

BALB/c



C57BL/6



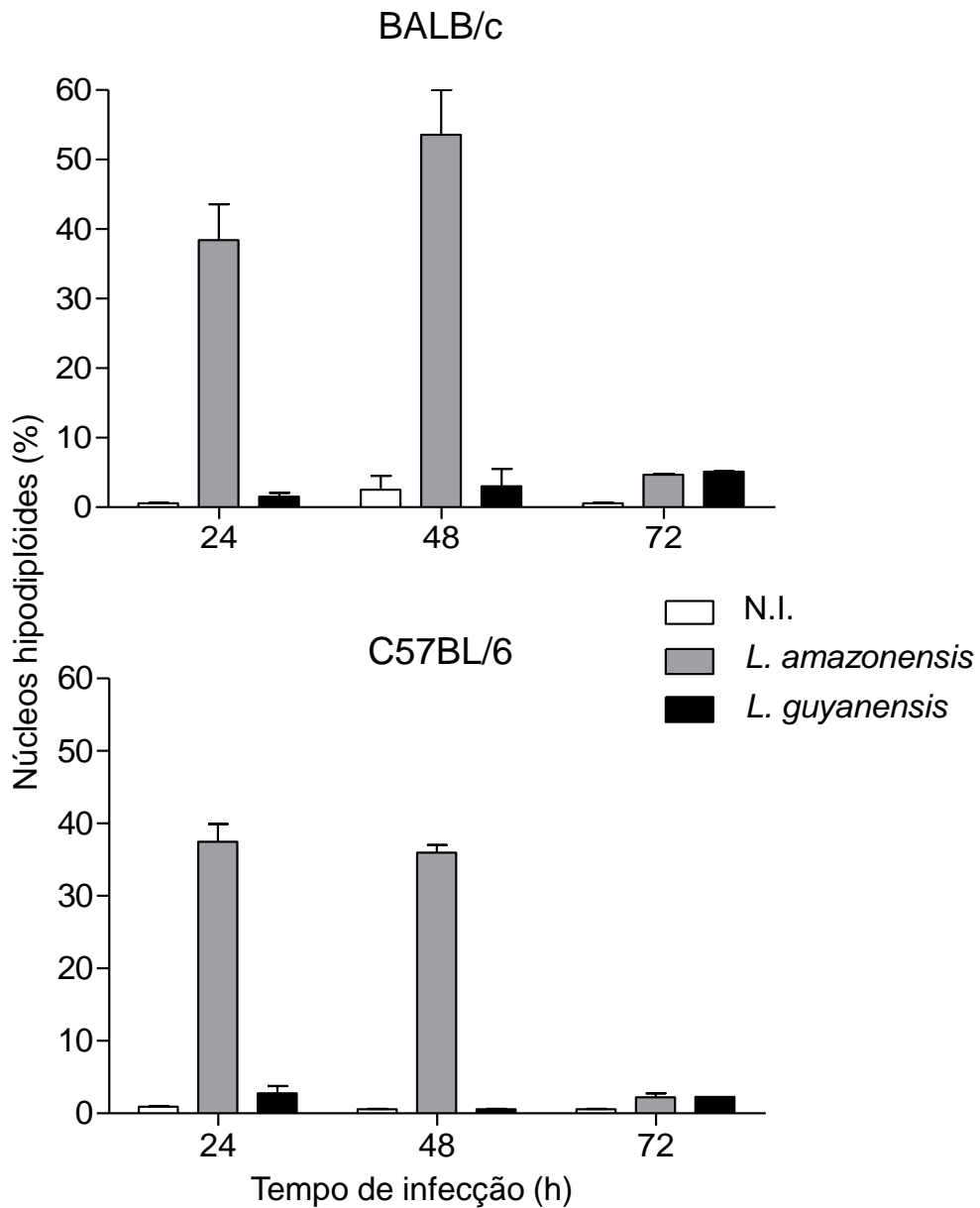


Figura 7 – Perda de DNA nuclear de células de BALB/c ou C57BL/6 infectadas com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*. Histogramas de fluorescência de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (A, painel superior) ou C57BL/6 (A, painel inferior) infectados com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*. Após os intervalos indicados as células eram lisadas com tampão hipotônico contendo PI e os núcleos de células de culturas infectadas eram comparados os com núcleos de células de culturas não infectadas (N.I.). (B) Porcentagem de células com núcleos hipodiplóides. Experimento representativo, em duplicata. Barras verticais representam média \pm EP (erro padrão).

ensaio TUNEL demonstram que a fragmentação de DNA já pode ser observada com apenas 3 horas de contato do parasito com o macrófago (DAMATA, 2007).

Para confirmar a origem do DNA fragmentado e determinar se o “padrão escada” observado poderia ser do parasito, promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes doses de NaNO₂ que induz morte celular apoptótica em *L. amazonensis*, como já descrito (HOLZMULLER *et al.*, 2002). Embora o DNA de *Leishmania* tenha sido fragmentado, particularmente na dose de 5 mM de NaNO₂, este se apresentou com um padrão em rastro, bem distinto do observado em células infectadas (Fig. 8E). As duas bandas observadas nas canaletas podem ser minicírculos pertencentes ao kDNA dos parasitos (SAVILL & HIGGS, 1999; ZANGGER *et al.*, 2002). Este resultado indica que os fragmentos típicos de apoptose de 200 pb ou múltiplos observados anteriormente são provenientes do DNA do macrófago, corroborando com os resultados da hipodiploidia avaliada por citometria de fluxo.

4.4 – Infecção *in vitro* com *L. amazonensis*, mas não com *L. guyanensis*, causa exposição de fosfatidilserina (PS) em macrófagos.

Uma característica chave das células em apoptose é a exposição de PS no folheto externo da membrana plasmática que, em células viáveis, está presente predominantemente no folheto interno. Seu deslocamento para o folheto externo está associado a sinais para a fagocitose da célula apoptótica e é detectada já em momentos iniciais da indução da morte programada (MADERNA & GODSON, 2003; MARTIN *et al.*, 1995). Para detectar a exposição de PS em macrófagos, as células, infectadas ou não, foram marcadas com o ligante específico Anexina V-FITC, e contra-marcação com PI para determinar integridade da membrana celular. Em concordância com os resultados anteriores, um número substancial de macrófagos infectados com *L. amazonensis* sofre apoptose, tanto os de BALB/c quanto os de C57BL/6 (Fig. 9). É curioso que durante os tempos de 24 h e 48 h, cerca de o dobro de macrófagos de C57BL/6 expõem PS quando comparados ao BALB/c. Quase nenhuma célula infectada com *L. guyanensis* expõe PS além do observado no controle não infectado, mostrando que a permeabilidade detectada em macrófagos infectados (como anteriormente mostrado na figura 6) não é por morte apoptótica.

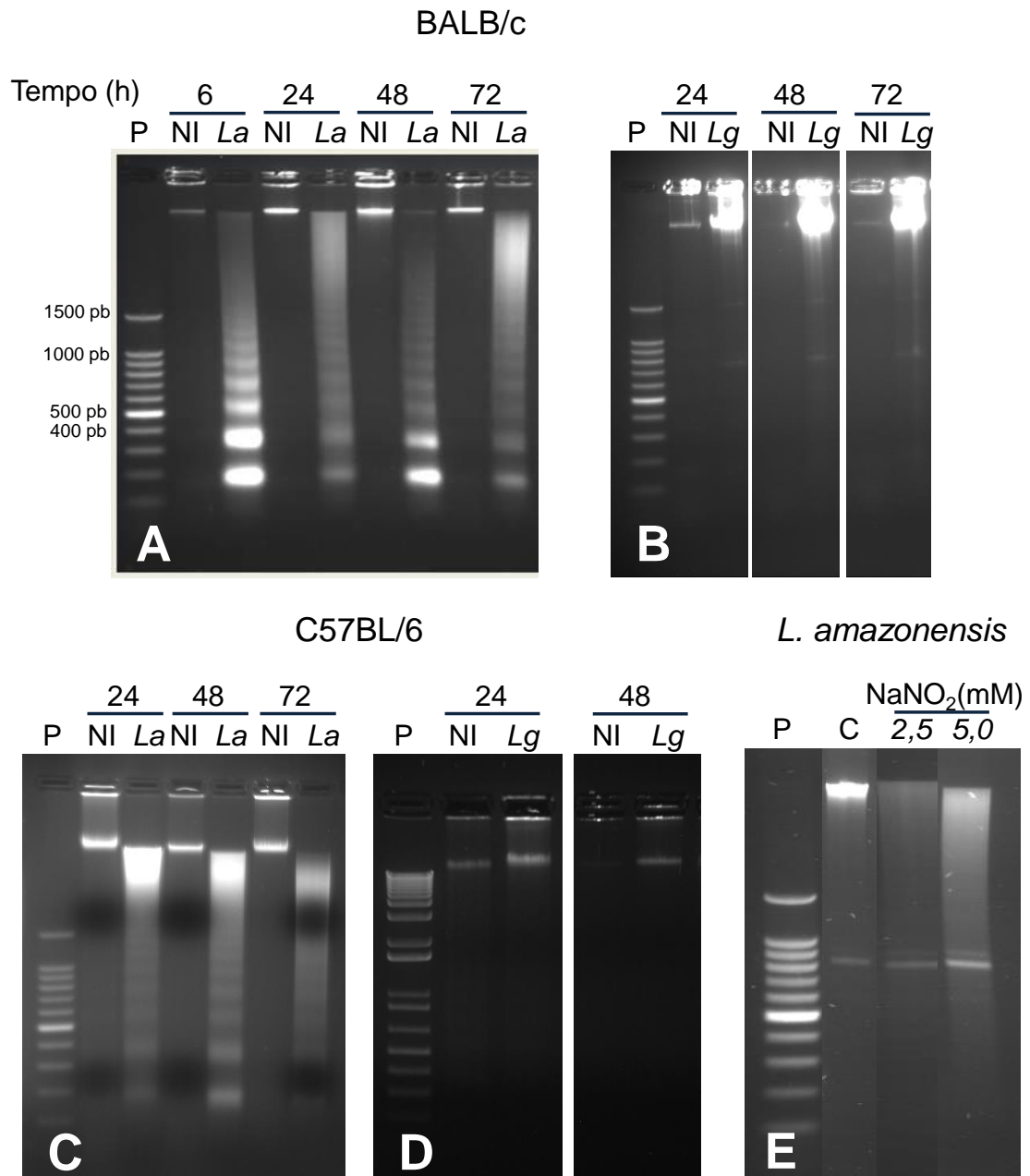


Figura 8 – Fragmentação de DNA observada em gel de agarose. Macrófagos de camundongos BALB/c (A e B) ou C57BL/6 (C e D) eram infectados com *L. amazonensis* (A e C) ou *L. guyanensis* (B e D). DNA era extraído após tempos indicados na parte superior de cada gel. Promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis* (E), após indução de fragmentação de DNA com NaNO₂ nas concentrações indicadas (2,5 mM e 5,0 mM), ou não, o DNA era extraído para análise. Gél de 1.8% agarose. P – Padrão de peso molecular 100pb base (bp); N.I.- não infectado; La – *L. amazonensis*; Lg – *L. guyanensis*; C – controle de fragmentação. Experimentos representativos.

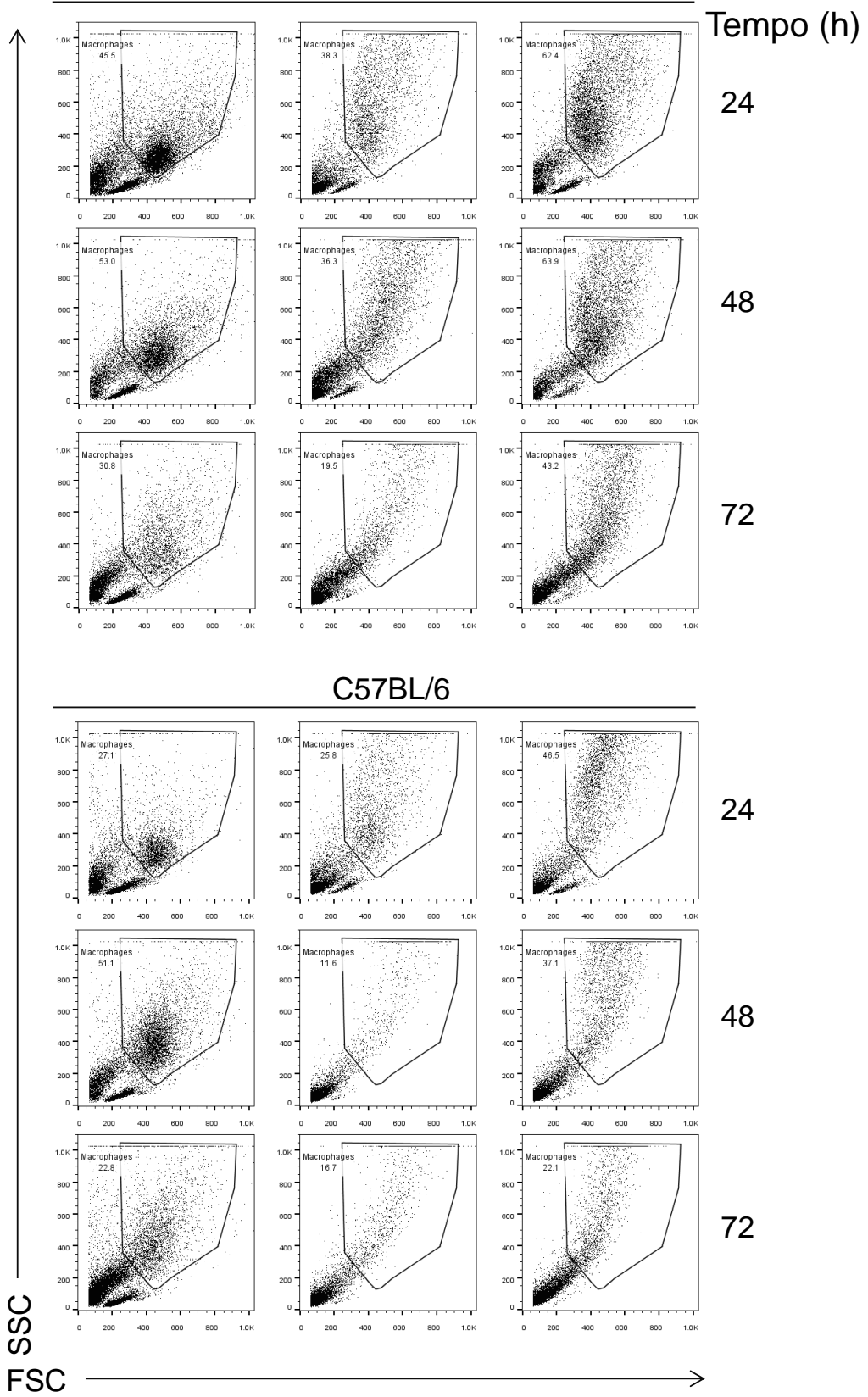
Na figura 9A mostramos um experimento representativo apresentado em *dot plots*, onde é possível observar as alterações de tamanho e granulosidade nas populações infectadas ao longo do tempo, que também corroboram as outras análises da morte celular. A redução do tamanho e o aumento da granulosidade podem indicar encolhimento da célula e condensação da cromatina, respectivamente (CATELAS *et al.* 2005). A figura 9A apresenta as populações selecionadas delimitadas pelos *gates* utilizados para a análise de marcação com AnnV e PI. Nesses *gates* é visível uma população mais homogênea nas células não infectadas, quando comparadas às infecções por ambas espécies de *Leishmania*. A infecção gera uma redução do tamanho das células (FSC) e um aumento em sua granulosidade (SSC) dependentes de tempo. Essas mudanças já podem ser indicativas de morte celular. Com o aumento do tempo de cultura, tanto FSC como SSC reduzem, o que pode refletir a presença de corpos apoptóticos. A redução de FSC, porém, também pode caracterizar células que sofreram danos mecânicos, núcleos isolados ou células necróticas (CATELAS *et al.*, 2005).

Na figura 9B podemos acompanhar as alterações na expressão de PS na membrana e o aumento da permeabilidade ao PI. Os macrófagos de ambas as linhagens infectados com *L. amazonensis* apresentam uma “migração” da população de células viáveis (duplo negativas, quadrante inferior esquerdo) para células apoptóticas (AnnV positivas, PI negativas, quadrante inferior direito). Em contrapartida, a infecção com *L. guyanensis* acarreta em uma “migração” de células viáveis diretamente para a população de células consideradas necróticas ou em necrose secundária (duplo positivas, quadrante superior direito). Os dados apresentados na figura 9C mostram apenas as células AnnV positivas/PI negativas uma vez que células duplo positivas podem representar células não só em fase tardia de apoptose (denominadas necrose secundária), mas também células que sofreram danos maiores à membrana celular (VERMES *et al.*, 2000; SUSKA *et al.*, 2005).

Para verificar se a exposição de PS em células infectadas com *L. amazonensis* ocorreria em infecções de menores proporções parasitos:macrófago, mais próximos de uma infecção natural, os macrófagos de BALB/c também foram incubados na proporção de 2:1. A figura 10A mostra as populações de macrófagos nas diferentes proporções de parasitos:macrófago, em relação ao tamanho e granulosidade. Pode-se observar o aumento da granulosidade das células, observada anteriormente (Fig. 9B), que acompanha a quantidade de parasitos infectantes.

A

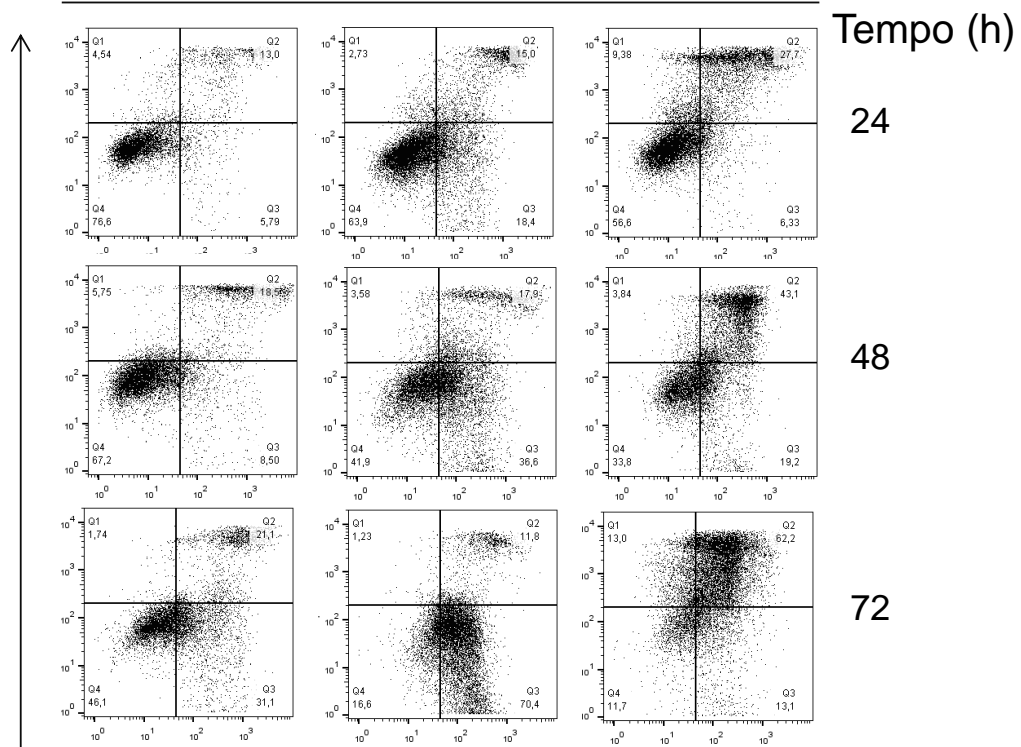
N.I. *L. amazonensis* *L. guyanensis*
BALB/c



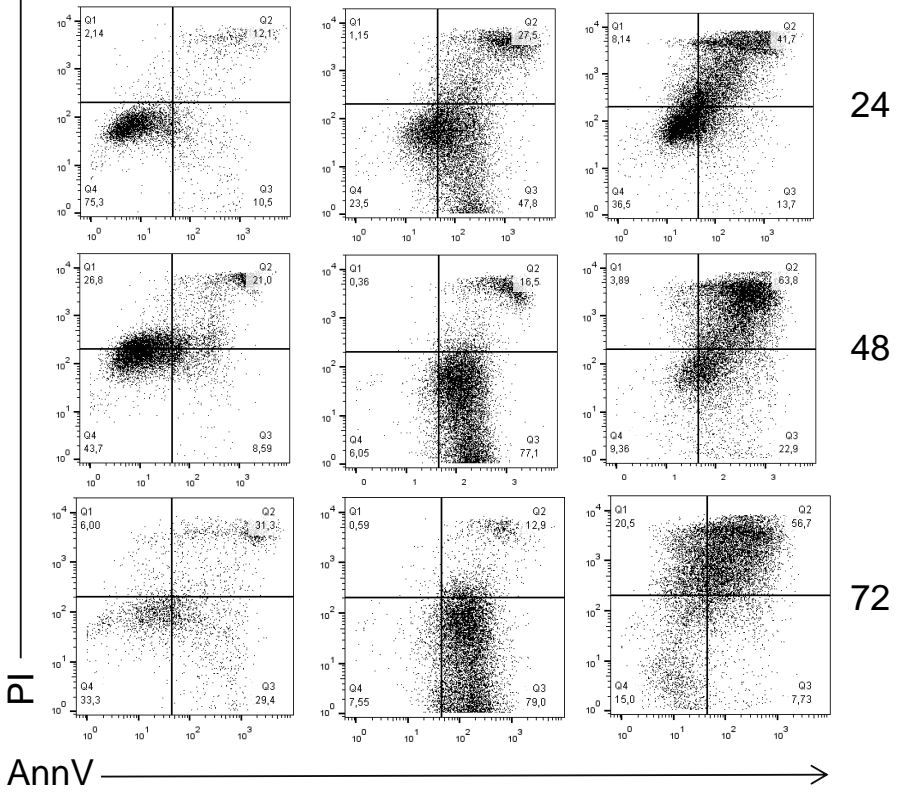
B

N.I. *L. amazonensis* *L. guyanensis*

BALB/c



C57BL/6



AnnV

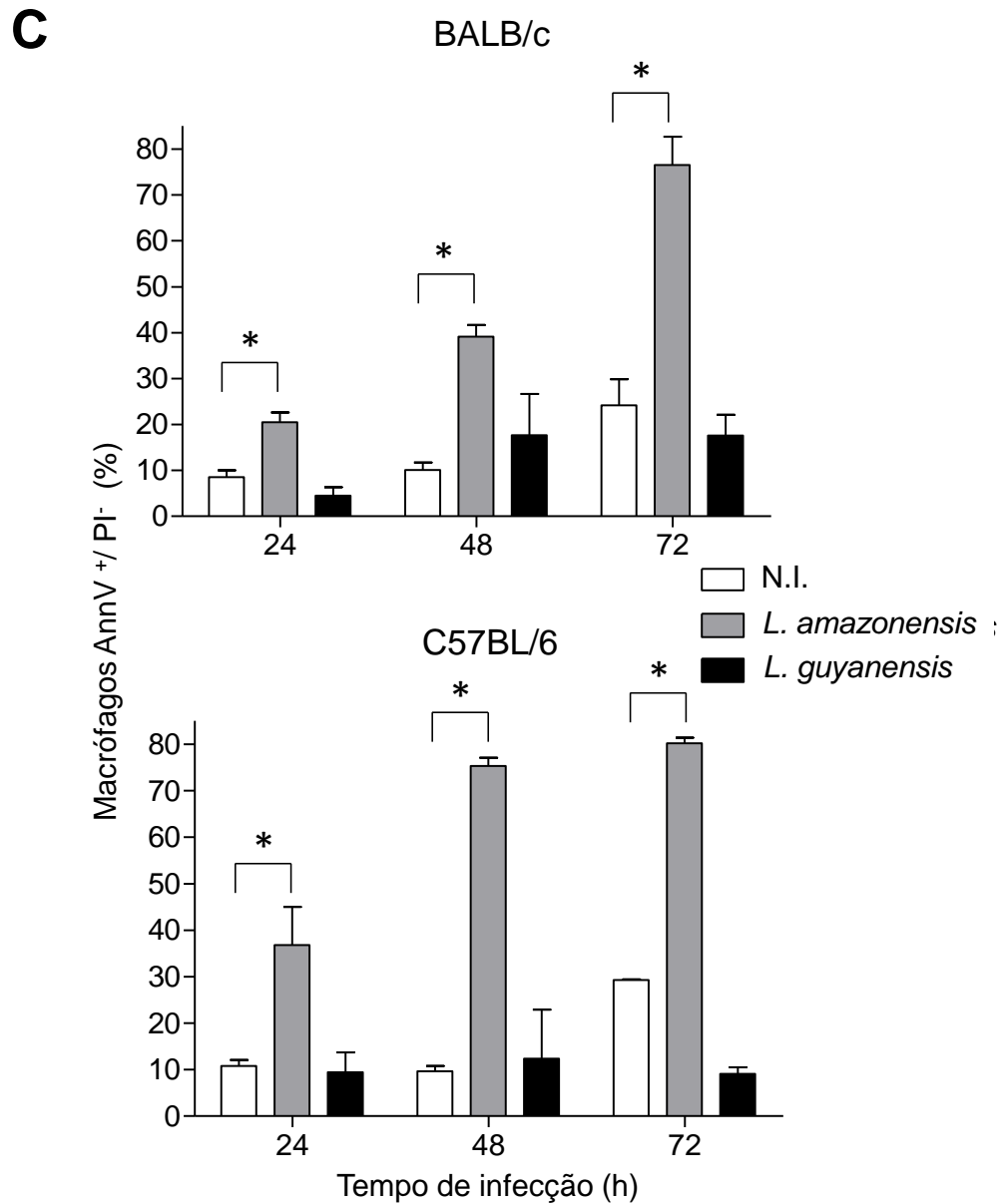
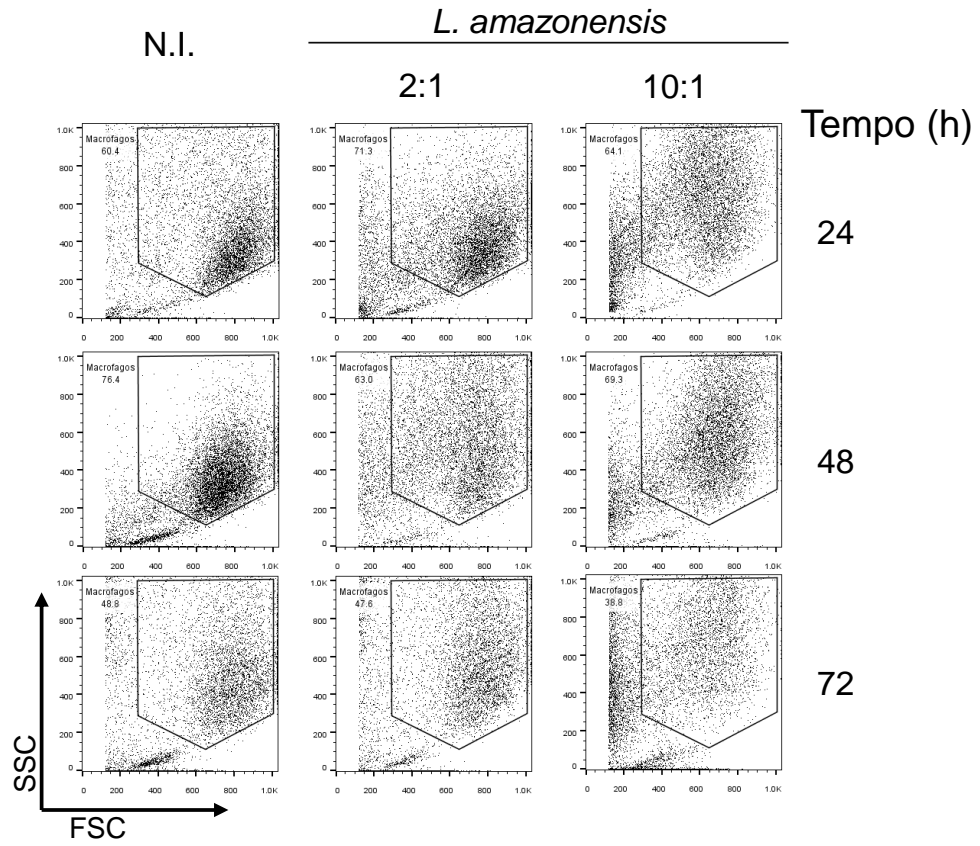


Figura 9 – Exposição de fosfatidilserina em macrófagos após infecção com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis*. Os macrófagos de BALB/c (painéis superiores) e C57BL/6 (painéis inferiores) eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* ou *L. guyanensis* e marcados com Anexina V-FITC (AnnV) e iodeto de propídeo (PI) nos tempos acima indicados. **A** – *Dot plots* de experimentos representativos indicando as populações de macrófagos. **B** – Quantificação de PI e AnnV, com representação dos macrófagos não infectados (N.I.), infectados com *L. amazonensis*, ou com *L. guyanensis*. **C**- Porcentagem das células em momentos iniciais de apoptose (AnnV positivas/PI negativas). As barras representam média \pm E.P.M. de 04 experimentos independentes. As diferenças significantes indicadas entre os grupos, com $P < 0,05$, estão representadas por *.

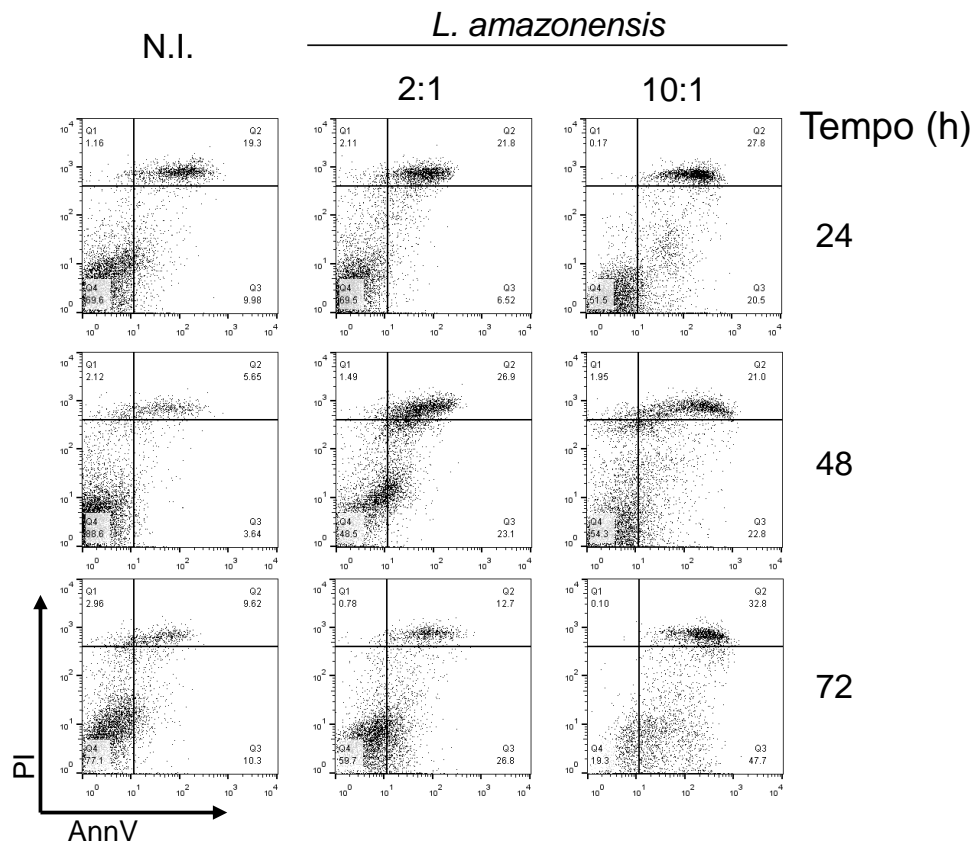
Como mostrado na figura 10B, a infecção com número reduzido de parasitos também acarreta no aumento de células AnnV positivas/PI negativas. Infecção com 2:1 parasitos:macrófago mostra um aumento progressivo, embora discreto e reduzido, de células apoptóticas, iniciando nesse experimento representativo com aproximadamente 6,5% das células AnnV positivas/PI negativas em 24 h, e finalizando com um cerca de 27% em 72 h. Em células não infectadas se observa cerca de 10% e 10,5% nos tempos de 24 h e 72 h, respectivamente. As porcentagens observadas nos tempos 24 h e 72 h em células infectadas com a proporção 10:1 foram de aproximadamente 20,5% e 48%, respectivamente. Pode-se observar também que, além de um aumento de células em fase inicial de apoptose (AnnV+/PI), não há um aumento de células mortas por necrose (AnnV-/PI+), quando comparados com valores obtidos no controle (N.I.).

Figura 10 – Exposição de PS e permeabilidade a PI em infecção de macrófagos de camundongos BALB/c com *L. amazonensis* em diferentes proporções. A – Tamanho e granulosidade de macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com *L. amazonensis*. B – Exposição de PS e permeabilidade ao PI. Macrófagos eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* em diferentes proporções parasito:macrófago (2:1 e 10:1). Após os intervalos indicados, as células eram coletadas e marcadas com Anexina V-FITC (AnnV) e iodeto de propídeo (PI) e imediatamente analisadas por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. Experimento representativo.

A



B



4.5 – Ativação de caspases -3, -8 e -9 por células apoptóticas infectadas com *L. amazonensis*

A fragmentação de DNA observada em macrófagos infectados com *L. amazonensis* sugerem que a ativação da CAD pela caspase 3. Assim, a fim de verificar a ativação de caspase 3, extratos proteicos de macrófagos de ambas as linhagens de camundongos infectados, ou não, com *L. amazonensis* foram analisados por *western blot*. A visualização (fig. 11A), bem como a semi-quantificação por densitometria (fig. 11B), indicam claramente a ativação da caspase em macrófagos já com 4 horas de infecção, a qual permanece detectável por pelo menos 18 h ou 24 h em BALB/c e C57BL/6, respectivamente.

Para melhor elucidar a cascata de ativação da apoptose, também foi avaliada a ativação das caspases 8 (fig. 11C) e 9 (fig. 11D), que ativam a caspase 3 (fig. 2). A ativação de ambas foi observada em macrófagos infectados com *L. amazonensis* nas duas linhagens murinas. Nos períodos avaliados, o pico de ativação de ambas caspases é em torno de 14 h – 18 h de infecção.

Por fim, resultados preliminares, apresentados na figura 12, sugerem que a ativação de caspase 8 ocorre não apenas na infecção pela cepa de *L. amazonensis* utilizada ao longo deste trabalho (PH8), mas também por uma segunda cepa de *L. amazonensis* (Ba199) testada. A cepa Ba199 aparenta seguir uma cinética similar à dos parasitos da cepa PH8, apesar de apresentarem uma ativação menor. Foi também observado que a ativação de caspase 8 aparenta ser específica para *L. amazonensis*, uma vez que não foi observada a ativação desta durante a infecção pela cepa de *L. guyanensis* utilizada ao longo deste trabalho (M4147) ou com uma segunda cepa (M1176) (Fig. 12).

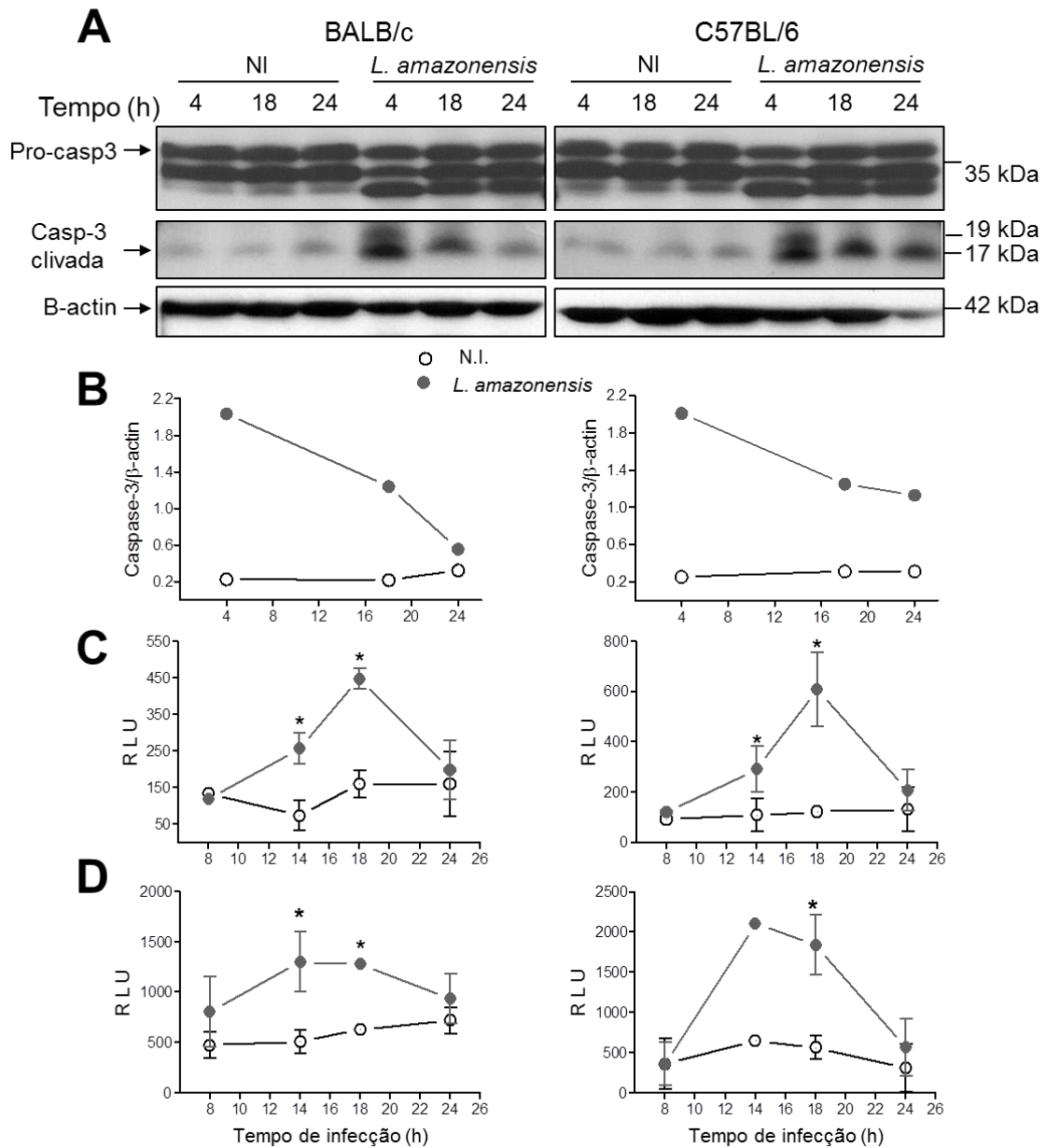


Figura 11 – Detecção de ativação de caspases 3, 8 e 9 em macrófagos de camundongos BALB/c ou C57BL/6 após infecção com *L. amazonensis*. Macrófagos eram infectados com *L. amazonensis*, ou não (N.I.). Após os tempos indicados de infecção as células eram lisadas para a detecção de caspases. **A** – Detecção de caspase 3 por western blot. (β -actina foi utilizada para quantificação), e **B** – Padronização das amostras por densitometria. **C** – Detecção de caspase 8 ativada, em **D** – Detecção de caspase 9 por luminometria. Gráficos à esquerda representam macrófagos de BALB/c e à direita, C57BL/6. RLU – Unidade Relativa de Luz. Experimentos representativos.

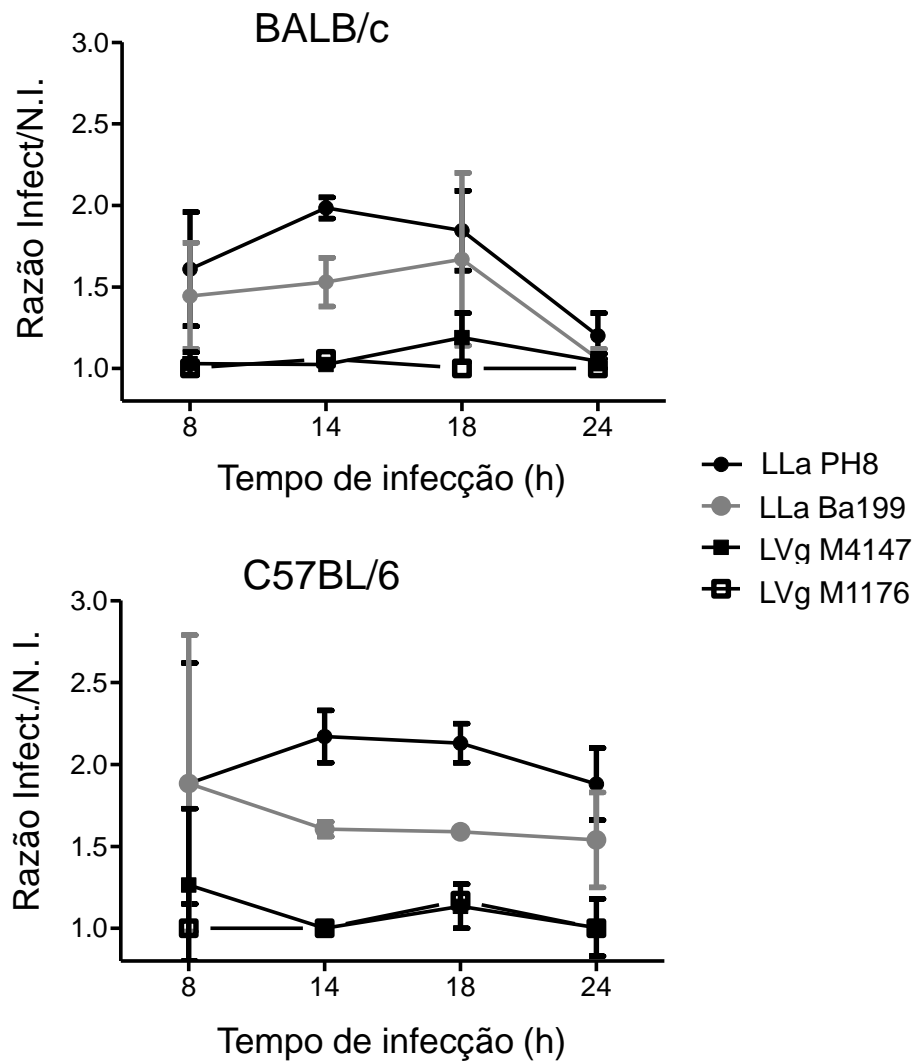


Figura 12 – Detecção de ativação de caspase 8 em macrófagos de camundongos BALB/c ou C57BL/6 após a infecção com diferentes cepas de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Macrófagos de BALB/c (painel superior) ou C57BL/6 (painel inferior) eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* de duas cepas distintas (PH8 ou Ba199), ou com as cepas M4147 ou M1176 de *L. guyanensis*. Dados preliminares representando a razão entre RLU de infectado por não infectado de dois experimentos independentes, em duplicata, combinados.

5 – DISCUSSÃO

Neste trabalho foram apresentadas evidências de que *L. amazonensis*, mas não *L. guyanensis*, induz a apoptose clássica em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6, e que macrófagos fagocitam células infectadas com *L. amazonensis*. Além disso, levanta-se a hipótese de que a fagocitose das células infectadas apoptóticas pode auxiliar na propagação de parasitos pelo tecido, contribuindo para o fenótipo patogênico.

Apesar dos modelos murinos serem bastante utilizados para compreender a resposta imunológica contra *Leishmania* e serem capazes de reproduzir sintomas apresentados nos seres humanos, nem todas as espécies de *Leishmania* sobrevivem e multiplicam dentro de macrófagos murinos. *L. guyanensis* é uma delas (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006; Figs 4 D, F e H). De fato, além de não causar doença, já foi demonstrado que macrófagos murinos são capazes de eliminar parasitos desta espécie por intermédio de ROS produzidos por explosão respiratória induzida pela infecção (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006). Aqui, foi demonstrado que a infecção por *L. guyanensis* causa necrose da célula hospedeira, com cerca de 40 a 50% dos macrófagos apresentando permeabilidade da membrana celular já às 24 h, e alcançando cerca de 70% em 72 h (Fig. 6 e 9D). Conjuntamente, o índice de infecção reduz com o tempo (Fig. 4H).

Ao contrário do observado na infecção murina por *L. guyanensis*, a *L. amazonensis* é capaz de sobreviver, multiplicar e estabelecer a infecção *in vivo* (Fig. 4A) e *in vitro* (Figs. 4C, E e G). A porcentagem de macrófagos infectados *in vitro* em ambas as linhagens se mantém estável ao longo das 96 h observadas (Fig. 4C), com um índice de infecção maior em macrófagos de BALB/c do que em C57BL/6 (Fig. 4E e G). Quase não foram observados parasitos livres na infecção *in vitro* com *L. amazonensis*, como observado durante a infecção por *L. guyanensis*, mas é comum observar células com morfologia apoptótica carregando parasitos (Fig. 5A).

A morte por apoptose foi confirmada com análises bioquímicas (Fig. 7 a 11) e, apesar da alta taxa de células apoptóticas observadas, a permeabilidade da membrana celular manteve-se reduzida (Fig. 6). Estes dados sugerem que as células apoptóticas são fagocitadas pelos macrófagos vizinhos antes de ocorrer a perda da integridade da membrana, acelerando a propagação das formas amastigotas para células saudáveis. Por outro lado, é interessante especular que a morte por necrose da célula hospedeira pode não ser um modo eficiente para a

propagação do parasito para outras células, e, eventualmente, as amastigotas de *L. guyanensis* livres dos macrófagos (como indicadas na Fig. 5B em ambas as linhagens) podem morrer quando fora das células hospedeiras.

A morte de células infectadas por *L. guyanensis* evidenciada por um número maior de células permeáveis ao PI (Fig. 6), a observação de pouca ou nenhuma célula infectada expondo PS (Fig. 9), juntamente com a ausência da fragmentação de DNA (Figs. 7 e 8), mostram que a morte celular observada na Fig. 6 é necrótica e não apoptótica. É possível que a morte de macrófagos evidenciada possa ser resultado da explosão respiratória que ocorre nos macrófagos infectados, como já mostrado anteriormente (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006), reduzindo não apenas os parasitos, como também algumas células infectadas. A perda da integridade da membrana plasmática poderia acarretar a liberação de substâncias intracelulares, que podem ser reconhecidas como alarminas e iniciar uma resposta da própria imunidade inata (TAYLOR *et al.*, 2008). Isto poderia explicar como, com o passar do tempo, são observados menos parasitos dentro das células e uma porcentagem menor de células infectadas, como observado no início da infecção *in vitro* de macrófagos de BALB/c e C57BL/6 (Fig. 4B, D, F e H e Fig. 5; SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006).

Os indícios de apoptose nas células infectadas com *L. amazonensis* aqui apresentados incluem exposição de PS (Fig. 9 e 10), perda de DNA (Fig. 7) clivado em fragmentos do tamanho de nucleossomos (Fig. 8) e ativação de caspases (Fig. 11). Células expondo PS foram observadas 24 h após a infecção, e seu número aumenta com o tempo e proporção de parasitos:macrófago utilizados na infecção (Fig. 9 e 10). É interessante que a exposição de PS aumenta com o tempo, sendo maior em 72 h nas duas linhagens, quando a hipodiploidia já não é detectada (Fig. 7). Uma explicação para essa aparente contradição é que às 72 h os núcleos dos macrófagos estão bastante degradados e mais estruturas com conteúdo nuclear reduzidos são desconsiderados, logo menos eventos se inserem nos *gates* (Fig. 3A). Como PS é medido em células inteiras, a exclusão de corpos apoptóticos expondo PS pode ser minimizada em comparação à metodologia anterior. Isto é corroborado pela visualização de fragmentação de DNA com 72 h (Fig. 8A e C).

Foi observado que células infectadas com *L. amazonensis* inicialmente induzem morte celular apenas em macrófagos de C57BL/6 (Fig. 5, painel inferior). Contudo, nos tempos de 48 e 72 h ocorre uma inversão e, aparentemente, o parasito é capaz de proteger os macrófagos da morte celular por necrose (fig. 6) de ambas as linhagens de camundongos. Já foi demonstrado

que *L. amazonensis* é capaz de inibir a apoptose de células, após o tratamento com indutores de apoptose (RUHLAND *et al.*, 2007). A sobrevivência e morte da célula hospedeira se mostra, assim, um equilíbrio delicado manipulado por essa espécie, uma vez que a sobrevivência da célula hospedeira é essencial para a sobrevivência do parasito e um descontrole pode reduzir as chances de uma infecção bem sucedida. Assim, *L. amazonensis* seria capaz de proteger células induzidas por estresse da morte celular, mas induzi-la em células saudáveis. Este mecanismo já foi sugerido por GETTI *et al.* (2008), que mostraram que infecções *in vitro* por *L. aethiopica*, *L. tropica* e *L. major* induzem apoptose em macrófagos humanos, com exposição de PS, permeabilização mitocondrial e ativação de caspase.

A hipótese mais considerada para a liberação dos parasitos é o rompimento passivo da célula causada por uma superpopulação de amastigotas (FARAH *et al.*, 1975; LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006; KAYE & SCOTT, 2011). RITTIG & BOGDAN (2000) descreveram também a liberação de amastigotas de *L. major* por um mecanismo similar à exocitose, com os vacúolos migrando para a periferia da célula hospedeira, liberando, com o tempo, os parasitos. As células hospedeiras, apesar de uma aparência mais fragilizada, não se rompiam. Recentemente, foi demonstrado que amastigotas de *L. amazonensis* podem ser transferidas de células infectadas para células vizinhas por extrusão do parasito (REAL *et al.*, 2014). Embora a apoptose não tenha sido demonstrada nas células hospedeiras, alguns aspectos desse tipo de morte celular foram observados, como extrusão de parasitos liberados dentro de estruturas zeióticas contendo LAMP (*lysosome-associated membrane protein*) capazes de serem capturadas por macrófagos vizinhos, permitindo a propagação das amastigotas (REAL *et al.*, 2014). Nossos resultados corroboram a suposição desses autores de que a apoptose das células infectadas deve ocorrer para que haja a transferência das amastigotas de célula infectadas para célula não infectadas. Esses dados também sustentam a hipótese da fagocitose entre macrófagos ser dependente da exposição de PS. Todavia, fagocitose de macrófagos infectados por macrófagos saudáveis ainda não havia sido demonstrada. As imagens obtidas de material fixado da infecção por *L. amazonensis* mostram macrófagos que parecem fagocitar as células infectadas em apoptose (Fig. 5A). Os resultados aqui obtidos mostrando apoptose em macrófagos infectados com *L. amazonensis* também estão de acordo com PROBST e colaboradores (2012), que descrevem um aumento na expressão de genes apoptóticos em macrófagos em resposta a infecção por *L. amazonensis*.

A velocidade de exposição de PS em macrófagos de C57BL/6 é maior que em macrófagos de BALB/c (Fig 9), que aparenta ser o contrário do raciocínio que apoptose

contribuiu para progressões mais patogênicas. Contudo, outros sinais de apoptose como hipodiploidia, fragmentação de DNA e ativação de caspase não diferem consideravelmente entre as linhagens murinas, e de fato, em 72h a exposição de PS são comparáveis entre as linhagens. Também pode-se considerar que uma resposta inflamatória diferente entre as duas linhagens de camundongos contribua para fenótipos mais resistentes. Além do mais, e não menos importante, outros fatores como a resposta de células T, bem descrita como componente chave da progressão da doença, agem para conferir resistência ou suscetibilidade. Assim, é possível que *in vivo* a cinética de exposição de PS, um dos sinais iniciais de apoptose, não seja um fator preponderante em determinar uma diferença marcante que afete o grau de suscetibilidade a *L. amazonensis* observado nas duas linhagens de camundongos.

A fragmentação típica em escada observada nos macrófagos infectados com *L. amazonensis* indicam a ativação da endonuclease CAD por caspase 3. Os resultados apresentados na figura 11A confirmam essa ativação, tanto para BALB/c, quanto para C57BL/6. A ativação da caspase 3 pode se dar por três vias de iniciação da apoptose: diretamente pela ação de granzima B, pela caspase 8 (ativada pela via extrínseca) ou pela caspase 9 (ativada pela via intrínseca ou pela caspase 8) (SIEGEL, 2006; TAYLOR *et al.*, 2008). A apoptose induzida pela infecção com *L. amazonensis* tem ativação tanto de caspase 8 quanto caspase 9 (fig. 11C e D, respectivamente), demonstrando a participação das duas vias na apoptose induzida pela infecção de macrófagos murinos com *L. amazonensis*.

A ativação de caspase 3 e a fragmentação de DNA são observadas com 4 h e 6 h, respectivamente (Figs. 11 A e 8 A). Pela intensidade de ambas, é provável que a ativação de caspase 3 e, conseqüentemente, a fragmentação de DNA, se inicie em momentos ainda mais precoces da infecção. Contudo, não foi observada a ativação das caspase 8 e/ou 9 antes de 14 h de infecção. Apesar da hierarquia canônica de ativação da cascata de caspases seguir a ordem das caspases 8 e 9 ativando a caspase 3, foi demonstrado recentemente que a ativação inicial de caspase 3 pode realizar um *feedback* pela caspase 8, aumentando a cascata de ativação (FERREIRA *et al.*, 2012). É possível, então, que a ativação inicial da caspase 8, não detectada pela técnica de luminescência, pode se tornar mais mensurável após o *feedback* pela caspase 3. Também é possível assumir que essa discrepância pode ser devido a diferenças na sensibilidade dos métodos utilizados (*western blot* versus quantificação de luminescência).

A apoptose também foi descrita *in vitro* em macrófagos murinos infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* (DESCHACHT *et al.*, 2012) e *in vivo* em macrófagos caninos

infectados com *L. chagasi* (VERÇOSA *et al.*, 2012). Todas as espécies de *Leishmania*, tanto do Novo Mundo (*L. amazonensis*, *L. chagasi*), quanto do Velho Mundo (*L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. donovan* e *L. major*), que foram demonstradas causar apoptose em células hospedeiras pertencem ao subgênero *Leishmania*. *L. guyanensis*, que não foi observado induzir apoptose, pertence ao subgênero *Viannia*. Outras espécies do subgênero devem ser investigadas na capacidade de induzir apoptose para verificar se essa habilidade seria um aspecto específico para o subgênero *Leishmania*.

Durante a infecção por *L. amazonensis*, camundongos BALB/c apresentam uma mistura das respostas T_H1 e T_H2 (JI *et al.*, 2002), enquanto os C57BL/6 possuem uma resposta mais voltada para T_H1 (SOONG *et al.*, 1997), mas que não está associada à proteção contra a infecção (VANLOUBBEECK *et al.*, 2004). Foi demonstrado que amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de internalizar e degradar moléculas de MHC de classe II das células hospedeiras (DE SOUZA LEÃO *et al.*, 1995) e a infecção, tanto com promastigotas, quanto com amastigotas, é capaz de impedir ou retardar a maturação de células dendríticas infectadas (PRINA *et al.*, 2004), resultando na produção reduzida de IL-12 (XIN *et al.*, 2008). Esses fatores levam à uma menor ativação de macrófagos e células dendríticas que a observada em infecções por *L. major* ou *L. braziliensis* (SOONG, 2012). Uma provável consequência disto é a incapacidade dos linfócitos $T CD4^+$ se diferenciarem em células efetoras, se tornando anérgicos, tanto em camundongos BALB/c (PINHEIRO *et al.*, 2004), quanto em C3HeB/FeJ (RAMER *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que há um rápido e provisório acúmulo de células T_{reg} na primeira semana de infecção com *L. amazonensis*, com a produção de TGF- β no local, sendo capaz de restringir a infecção neste período (JI *et al.*, 2005). Recentemente, também foi observada a importância da indução de apoptose em linfócitos $T CD4^+$ no baço durante a infecção por *L. major* (PEREIRA-MANFRO *et al.*, 2014). Ao inibir a morte dessas células, via inibição de caspase 8, houve um aumento tanto na resposta T_H1 (aumento de IFN- γ), quanto de T_H2 (detectado pelo aumento de IL-4), o que levou a um melhor controle da infecção pelos camundongos.

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos pode acarretar no aumento de substâncias como TGF- β 1, prostaglandina E2 (PGE2) e fator de ativação de plaquetas (PAF), e reduzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-1 β , IL-8 e TNF- α (FADOK *et al.*, 1998). Estudos anteriores mostram que promastigotas apoptóticas de *L. major* (van ZANDBERGEN *et al.*, 2006) e *L. amazonensis* (WANDERLEY *et al.*, 2009) auxiliam na

sobrevivência de parasitos viáveis, silenciando mecanismos efetores de fagócitos. A fagocitose de promastigotas apoptóticas tanto de *L. major* (van ZANDBERGEN *et al.*, 2006) quanto de *L. amazonensis* (WANDERLEY *et al.*, 2009) induz a produção de TGF- β (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; van ZANDBERGEN *et al.*, 2006; WANDERLEY *et al.*, 2009) e IL-10 (BALANÇO *et al.*, 2001), ambas citocinas que inibem óxido nítrico (NO) (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992). Promastigotas apoptóticas de *L. major* também inibem TNF- α (van ZANDBERGEN *et al.*, 2006), citocina pró-inflamatória que estimula a produção de NO. FRANÇA-COSTA *et al.* (2012) demonstraram que *L. amazonensis* isolada de pacientes com leishmaniose difusa é associada com a presença de parasitos expondo PS.

Da mesma forma, foi demonstrado que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos de BALB/c (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2004) ou humanos (AFONSO *et al.*, 2008) infectados com *L. amazonensis* induzem um aumento da carga parasitária dependente da produção de TGF- β 1 e PGE2. É provável que a indução da apoptose em macrófagos por *L. amazonensis* também possa resultar na secreção de substâncias anti-inflamatórias, contribuindo para a permanência e multiplicação da forma amastigota na célula hospedeira e, conseqüentemente, auxiliando na determinação do curso da infecção. Infecções de *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 mostram, nas primeiras semanas, um aumento no recrutamento de macrófagos imaturos, incapazes de eliminar o parasito, facilitando o estabelecimento da infecção (SOONG *et al.*, 1996; SOONG *et al.*, 1997; GUERRA *et al.*, 2010). Uma razão para esta migração poderia ser a liberação de fatores quimiotáticos por células apoptóticas capaz de recrutar monócitos e macrófagos primários (LAUBER *et al.*, 2003).

AFONSO *et al.* (2008) também demonstram que a ingestão de neutrófilos necróticos é capaz de reduzir a carga parasitária de células infectadas com *L. amazonensis*, com a produção de TNF- α , citocina capaz de ativar a produção de superóxido. A importância de espécies reativas do oxigênio para a eliminação de *L. guyanensis* por macrófagos *in vitro* já foi demonstrada (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006) e a presença de macrófagos necróticos poderia explicar a redução da carga parasitária observada neste trabalho.

A necrose está geralmente associada a respostas pró-inflamatórias (LABBÉ & SALEH, 2008), porém sabe-se, atualmente, que a interação com células necróticas também pode gerar efeitos anti-inflamatórios similares à interação com células apoptóticas (KRYSKO *et al.*, 2006), muitas vezes devido à presença de PS na célula necrótica (HIRT & LEIST, 2003). FADOK *et*

al. (2001) demonstraram que neutrófilos necróticos, mas não células T Jurkat, estimulam a produção de MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein 2*), IL-8, TNF- α e IL-10. Este trabalho também mostra que a separação de neutrófilos lisados em frações de membrana e solúvel geram respostas inflamatórias diferentes, com a fração de membrana destas células agindo como células apoptóticas. Demonstram, ainda, que a resposta inflamatória depende das substâncias apresentadas aos macrófagos, como as proteases, ácidos nucleicos e ATP, para definir o perfil de produção de citocinas pelos macrófagos. Estes dados podem ser uma razão pela qual a infecção por *L. guyanensis*, que induzem necrose nos macrófagos, um evento pró-inflamatório, não causa doença em camundongos BALB/c ou C57BL/6, e em seres humanos causa uma doença mais restrita que *L. amazonensis*.

Por outro lado, também já foi demonstrado que a fagocitose de células apoptóticas pode ser pró-inflamatória, dependendo do micro-ambiente que a infecção ocorre. Apoptose de células via FasL é capaz de recrutar neutrófilos para o tecido e foi associada à rejeição de enxertos (HOHLBAUM *et al.*, 2001) e suscetibilidade de camundongos infectados com *L. major* (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a ativação de caspase 3 em células apoptóticas promove a secreção de fatores quimiotáticos, recrutando macrófagos primários e monócitos, assegurando a eliminação das células apoptóticas e evitando a necrose secundária (LAUBER *et al.*, 2003). Inicialmente, há poucos macrófagos presentes no local de infecção e essa característica de natureza pró-inflamatória poderia ser um mecanismo para atrair mais fagócitos para eliminar uma grande quantidade de células apoptóticas antes da perda da integridade da membrana, que poderia induzir uma resposta inflamatória de proporções maiores. Corroborando com essa suposição foi demonstrado que células dendríticas que ingerem neutrófilos apoptóticos infectados com a bactéria *Citrobacter rodentium* secretam TGF- β , IL-6 e IL-23, levando a diferenciação de células pró-inflamatórias T_H17. Essa bactéria induz uma grande quantidade de células apoptóticas, e o bloqueio da apoptose causada durante a infecção reduz significativamente o número de T_H17. Em contrapartida, quando fagocitam neutrófilos apoptóticos não infectados há a produção de TGF- β e IL-10, o que leva à indução de células T_{reg}, supressoras da resposta imune (TORCHINSKY *et al.*, 2009).

Concluindo, mostramos que *L. amazonensis*, capaz de induzir apoptose em macrófagos BALB/c e C57BL/6 *in vitro* nos primeiros momentos de infecção, causa doença e infecção persistente nesses hospedeiros. Ao mesmo tempo, *L. guyanensis*, que não induz apoptose, é basicamente inofensiva para as duas linhagens *in vivo* e a infecção *in vitro* é reduzida. Essas

associações, juntamente com outros trabalhos da literatura, reforçam que a apoptose interfere no desenvolvimento das infecções. A indução de apoptose pode ser mais um mecanismo de evasão do parasito, em uma possível tentativa de reduzir a resposta local e/ou induzir uma maior migração de fagócitos para o local de infecção.

6 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Com os dados apresentados, pode-se observar diferenças claras entre as infecções por *L. amazonensis* e *L. guyanensis* em macrófagos peritoneais de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 e a relação do tipo de morte celular induzida com a progressão da doença.

Macrófagos infectados por *L. amazonensis* morrem por apoptose, confirmado pela perda parcial do conteúdo nuclear (hipodiploidia), fragmentação de DNA em padrão escada, exposição de PS no folheto externo da membrana plasmática e ativação das caspases 3, 8 e 9. Foi observado também que os corpos apoptóticos apresentam parasitos e são fagocitados por células vizinhas.

Em contrapartida, células infectadas por *L. guyanensis* morrem por necrose, onde é observado um aumento da permeabilidade da membrana celular, e detecta-se células rompidas e parasitos livres. Não foi observado fragmentação de DNA em padrão escada, exposição de PS ou ativação de caspase.

Como perspectivas para melhor compreender a relação da apoptose com o desenvolvimento da patologia durante a infecção por *L. amazonensis*, espera-se:

- Analisar as citocinas e outras moléculas secretadas pelas células infectadas, para melhor entender o microambiente da infecção;
- Determinar a se o mesmo ocorre quando a infecção se dá também com amastigotas, mostrando se este fenômeno é ocorre apenas no primeiro contato com o hospedeiro, ou se ocorre durante a propagação e perpetuação da infecção.
- Detecção da apoptose em testes *in vivo*.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-SILVA, A. L., CALABRESE, K. S., CUPOLILO, S. M. N., CARDOSO, F. O., SOUZA, C. S. F., GONÇALVES DA COSTA, S. C. (2004) Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology 121: 179–187.**

ABU-ZANT, A., SANTIC, M., MOLMERET, M., JONES, S., HELBIG, J., KWAIK, Y. A. (2005) Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity 73 (9): 5339-5349.**

AFONSO, L. C. C. & SCOTT, P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity 61: 2952-2959.**

AFONSO, L., BORGES, V. M., CRUZ, H., RIBEIRO-GOMES, F. L., DOS REIS, G. A., DUTRA, A. N., CLARÊNCIO, J., DE OLIVEIRA, C. I., BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., BRODSKYN, C. I. (2008) Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Leukocyte Biology 84: 389-396.**

AGA, E., KATSCHINSKI, D. M., van ZANDBERGEN, G., LAUFS, H., HANSEN, B., MÜLLER, K., SOLBACH, W., LASKAY, T. (2002) Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology 169: 898-905.**

ALCOLEA, P. J., ALONSO, A., GÓMEZ, M. J., SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, A., MORENO-PAZ, M., TORAÑO, A., PARRO, V., LARRAGA, V. (2010) Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics 11: 31-55.**

ALEXANDER, J. & BROMBACHER, F. (2012) T helper 1/T helper 2 and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology Volume 3 Article 80:1-13.**

ALEXANDER, J. & BRYSON, K. (2005) T helper (h)1/ T_H2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters 99: 17-23.**

ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R., RUSSEL, D. G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science 112: 2993-3002.**

ALVAR, J., VÉLEZ, I.D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNIN., J., DEN BOER, M., THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE 7: e35671.**

AMEISEN, J. C. (2004) Looking for death at the core of life in the light of evolution. **Cell Death Differentiation 11: 4-10.**

ASEFFA, A., GUMY, A., LAUNOIS, P., MACDONALD, H. R., LOUIS, J. A., TACCHINI-COTTIER, F. (2002). The early IL-4 response to *Leishmania major* and the resulting T_H2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. **Journal of Immunology 169, 3232–3241.**

ASHIDA, H., MIMURO, H., OGAWA, M., KOBAYASHI, T., SANADA, T., KIM, M., SASAKAWA, C. (2011) Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. **Journal of Cell Biology 195: 931-42.**

BAEHRECKE, E. H. (2002) How death shapes life during development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology 3: 779-787.*

BALANÇO, J. M. F., MOREIRA, M. E. C., BONOMO, A., BOZZA, P. T., AMARANTE-MENDES, G., PIRMEZ, C., BARCINSKI, M. A. (2001) Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology 11: 1870–1873.**

BALDWIN, T. M., ELSO, C., CURTIS, J., BUCKINGHAM, L., HANDMAN, E. (2003) The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. **Infection and Immunity 71: 6830-6834.**

BAÑULS, L., BASTIEN, P., POMARES, C., AREVALOS, J., FISA, R., HIDE, M. (2011) Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection 17: 1451-1461.**

BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JUNIOR, G., MOMEN, H., MCMAHON-PRATT, D., RIBEIRO DE JESUS, A., ALMEIDA, R., BADARO,

R., BARRAL-NETTO, M., CARVALHO, E.M., JOHNSON JR., W.D. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **44**: 536–546.

BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BROWNELL, C. E., SKEIKY, Y. A., ELLINGSWORTH, L. R., TWARDZIK, D. R., REED, S. G. (1992) Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science** **257**: 545-548.

BATES, P. A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology** **37**: 1097-1106.

BEIL, W. J., MEINARDUS-HAGER, G., NEUGEBAUER, D. C., SORG, C. (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology** **52**: 135-42.

BELKAID, Y., MENDEZ, S., LIRA, R., KADADMBI, N., MILON, G., SACKS, D. (2000) A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **The Journal of Immunology** **165**: 969-977.

BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E. M., SACKS, D. L. (2002) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature** **420**: 502-507.

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

BOURREAU, E., PRÉVOT, G., GARDON, J., PRADINAUD, R., LAUNOIS, P. (2001) Concise Communication - High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. **The Journal of Infectious Diseases** **184**: 1628-1630.

BOURREAU, E., RONET, C., COUPPIÉ, P., SAINTE-MARIE, M., TACCHINI-COTTIER, F., LAUNOIS, P. (2007) IL-10 producing CD8⁺ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. **Microbes and Infection** **9**: 1034e1041.

BOURREAU, E., RNET, C., DARCISSAC, E., LISE, M. C., SAINTE MARIE, D., CLITY, E., TACCHINI-COTTIER, F., COUPPIE, P., LAUNOIS, P. (2009) Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity** **77**: 1465-1474.

BOWEN, I. D. (1993). Apoptosis or programmed cell death? **Cell Biology International** **17**: 365-379.

CARMO, E. V. D. S., KATZ, S., BARBIÉRI, C. L. (2010) Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. **PLoS ONE** **5**: e13815.

CATELAS, I., PETIT, A., VALI, H., FRAGISKATOS, C., MEILLEUR, R., ZUKOR, D. J., ANTONIOU, J., HUK, O. L. (2005) Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro. **Biomaterials** **26**: 2441- 2453.

CECÍLIO, P., PÉREZ-CABEZAS, B., SANTARÉM, N., MACIEL, J., RODRIGUES, V., AND DA SILVA, A. C. (2014) Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology** **5** Article 480: 1-16.

CHANG, J., KIM, S., CHOI, I., LEE, S., MORIO, T., CHANG, E. (2006) Apoptosis of macrophages induced by *Trichomonas vaginalis* through the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase that locates downstream of mitochondria-dependent caspase activation. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** **38**: 638-647.

CHATELAIN, R., VARKILA, K., COFFMAN, R.L. (1992) IL-4 induces a T_H2 response in *Leishmania major*-infected mice. **The Journal of Immunology** **148**: 1182-1187.

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B., BHAT, G. K. (2008) Caspases – An update. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** **151**: 10–27.

COUPPIÉ, P., CLYTI, E., SAINT-MARIE, D., DEDET, J. P., CARME, B., PRADINAUD, R. (2004) Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **71**: 558-560.

CROMPTON D.W.T, editor (2013) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases – Second WHO report on neglected tropical diseases. **WHO: 67-71**
Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564540/en/

DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. (1989) CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages **The Journal of Immunology 143: 617-622.**

DAMATA, J. P. (2007) Indução de apoptose em macrófagos de camundongos BALB/c pela infecção *in vitro* com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Dissertação de Mestrado.** Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.

DE SOUZA LEÃO, S., LANG, T., PRINA, E., HELLIO, R., ANTOINE, J. C. (1995) Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science 108: 3219-3231.**

De SOUZA, A., ISHIKAWA, E., BRAGA, R., SILVEIRA, F., LAINSON, R., SHAW, J. (1996). *Psychodopygus* complexus, a new vector of *Leishmania braziliensis* to humans in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 90: 112-113.**

DESCHACHT, M., VAN ASSCHE, T., HENDRICKX, S., BULT, H., MAES, L., COS, P. (2012) Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. **Parasitology 139: 1429-1437.**

DESJEUX, P. (1996). Leishmaniasis Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology 14: 417-423.**

DESJEUX, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 27: 305–318.**

DOCKRELL, D. H. (2001) Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. **Journal of Infection 42: 227-234.**

DONOVAN, M. J., MACIUBA, B. Z., MAHAN, C. E., McDOWELL, M. A. (2009) *Leishmania* infection inhibits cyclohexamide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. **Experimental Parasitology 123: 58–64.**

DosREIS, G. A. & LOPES, M. F. (2009) The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **104**: 259-262.

DOSTÁLOVÁ, A., & VOLF, P. (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors** **5**: 276-88.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., GUTHRIE, L., HENSON, P. M. (2001) Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. **The Journal of Immunology** **166**: 6847-6854.

FADOK, V. A., BRATTON, D. L., KONOWAL, A., FREED, P. W., WESTCOTT, J. Y., HENSON, P. M. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **Journal of Clinical Investigation** **101**: 890-898.

FARAH, F. S., SAMRA, S. A., NUWAYRI-SALTI, N. (1975) The role of the macrophage in cutaneous leishmaniasis. **Immunology** **29**: 755-764.

FERREIRA, K. S., KREUTZ, C., MACNELLY, S., NEUBERT, K., HABER, A., BOGYO, M., TIMMER, J., BORNER, C. (2012). Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. **Apoptosis**; **17**: 503-515.

FICH, C., KLAUENBERG, U., FLEISCHER, B., BROKER, B. M. (1998) Modulation of enzymatic activity of Src-family kinases in bovine T cells transformed by *Theileria parva*. **Parasitology** **117**: 107-115.

FRANÇA-COSTA, J., WANDERLEY, J. L. M., DEOLINDO, P., ZARATTINI, J. B., COSTA, J., LYNN SOONG, BARCINSKI, M. A., BARRAL, A., BORGES, V. M. (2012) Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS ONE** **7**: e36595.

FREIRE-DE-LIMA, C. G., NASCIMENTO, D. O., SOARES, M. B. P., BOZZA, P. T., CASTRO-FARIA-NETO, H. C., DE MELLO, F. G., DOSREIS, G. A., LOPES, M. F. (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature** **403**:199-203.

GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E., GREEN, D. G., HENGARTNER, M. O., KEPP, O., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., LU, X., MADEO, F., MALORNI, W., MEHLEN, P., NUÑEZ, G., PETER, M. E., PIACENTINI, M., RUBINSZTEIN, D. C., SHI, Y., SIMON, H.-U., VANDENABEELE, P., WHITE, E., YUAN, J., ZHIVOTOVSKY, B., MELINO, G., KROEMER, G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation 19: 107–120.**

GARNHAM, P. C. C. (1971) The genus *Leishmania*. **Bulletin of the World Health Organization 44: 477-489.**

GETTI, G. T., CHEKE, R. A., RUMBER, D. P. (2008). Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? **Parasitology 135: 1391-1399.**

GOLDSTEIN, P. & KROEMER, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences 32: 37-43.**

GONTIJO, B. & de CARVALHO, M. L. (2003). Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36:71-80.**

GOUGEON, M. (2003) Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. **Nature Reviews Immunology 3: 392-404.**

GUERRA, C. S., SILVA, R. M. M., CARVALHO, L. O. P., CALABRESE, K. d. S., BOZZA, P. T., CÔRTE-REAL, S. (2010) Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. **International Journal of Experimental Pathology 91: 451-459.**

GUERRA, J. A. d. O., PRESTES, S. R., SILVEIRA, H., COELHO, L. I. d. A. R. C., GAMA, P., MOURA, A., AMATO, V., BARBOSA, M. G. V., FERREIRA, L. C. d. L. (2011) Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases 5: e980.**

GUILLERMO, L. V. C., SILVA, E. M., RIBEIRO-GOMES, F. L., MEIS, J. D., PEREIRA, W. F., YAGITA, H., DOSREIS, G. A., LOPES, M. F. (2007) The Fas death pathway controls

coordinated expansions of type 1 CD8 and type 2 CD4 T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Leukocyte Biology** **81**: 942-951.

GUIMARÃES-COSTA, A. B., NASCIMENTO, M. T. C., FROMENT, G. S., SOARES, R. P. P., MORGADO, F. N., CONCEIÇÃO-SILVA, F., SARAIVA, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **106**: 6748-6753.

HAIL Jr, N., CARTER, B. Z., KONOPLEVA, M., ANDREEFF, M. (2006) Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis** **11**: 889-904.

HANAYAMA, R., TANAKA, M., MIWA, K., SHINOHARA, A., IWAMATSU, A., NAGATA, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. **Nature** **217**: 182-187.

HANDMAN, E. & BULLEN, D. V. R. (2002) Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology** **18**: 332-334.

HELMBY, H., JÖNSSON, G., TROYE-BLOMBERG, M. (2000) Cellular changes and apoptosis in the spleen and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. **Infection and Immunity** **68**: 1485-1490.

HENGARTNER, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. **Nature** **407**: 770-776.

HEUSEL, J. W., WESSELSCHMIDT, R. L., SHRESTA, S., RUSSEL, J. H., LEY, T. J. (1994) Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. **Cell** **76**: 977-987.

HEUSSLER, V. T., KÜENZI, P., ROTTENBERG, S. (2001) Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. **International Journal for Parasitology** **31**: 1166-1176.

HEUSSLER, V. T., MACHADO, J. Jr, FERNANDEZ, P. C., CHEN, C. G., PEARSE, M. J., DOBBLAERE, D. A. (1999) The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **96**:7312-7317.

HIRT, U. A. & LEIST, M. (2003) Rapid, noninflammatory and PS-dependent phagocytic clearance of necrotic cells. **Cell Death and Differentiation** **10**: 1156-1164.

- HOHLBAUM, A. M., GREGORY, M. S., JU, S. T., MARSHAK-ROTHSTEIN, A. (2001) Fas ligand engagement of resident peritoneal macrophages *in vivo* induces apoptosis and the production of neutrophil chemotactic factors. **The Journal of Immunology** **167**: 6217-6224.
- HOLM, A., TEJLE, A., MAGNUSSON, K.-E., DESCOTEAUX, A., RASMUSSEN, B. (2001) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. **Cellular Microbiology** **3**: 439-447.
- HOLZMULLER, P., SERENO, D., CAVALEYRA, M., MANGOT, I., DAULOUEDE, S., VINCENDEAU, P., LEMESRE, J. (2002) Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Infection and Immunity** **70**: 3727-3735.
- ISNARD, A., SHIO, M.T., OLIVIER, M. (2012) Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** **2**: 72.
- IVES, A., MASINA, S., CASTIGLIONI, P., PRÉVEL, F., REVAZ-BRETON, M., HARTLEY, M. A., LAUNOIS, P., FASEL, N., RONET, C. (2014) MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. **PLoS ONE** **9**: e96766.
- JÄNICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R., PORTER, A. G. (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry** **273**: 9357-9360.
- Jl, J., MASTERSON, J., SUN, J., SOONG, L. (2005) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology** **174**: 7147-7153.
- Jl, J., SUN, J., QI, H., SOONG, L. (2002) Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **66**: 338-345.
- Jl, J., SUN, J., SOONG, L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity** **71**: 4278-4288.

JONES, D. E., ACKERMANN, M. R., WILLE, U., HUNTER, C. A., SCOTT P. (2002) Early enhanced TH1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10-deficient mice does not lead to resolution of infection. **Infection and Immunity** **70**: 2151-2158.

JONES, D. E., BUXBAUM, L., SCOTT, P. (2000) IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology** **165**: 364-372.

KAGAN, V. E., GLEISS, B., TYURINA, Y. Y., TYURIN, V. A., ELENSTRÖM-MAGNUSSON, C., LIU, S., SERINKAN, F. B., ARROYO, A., CHANDRA, J., ORRENIUS, S., FADEEL, B. (2002) A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. **The Journal of Immunology** **169**: 487-499.

KANE, M. M. & MOSSER, D. M. (2000) *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinions in Microbiology** **7**: 26-31.

KAYE, P. & SCOTT, P. (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology** **9**: 604- 615.

KEDZIERSKI, L. Z. & EVANS, K. J. (2014) Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology** **141**: 1544-1562.

KRYSKO, D. V., D'HERDE, K., VANDENABEELE, P. (2006) Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis** **11**: 1709-1726.

KUMAR, S. (2007) Caspase function in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation** **14**: 32-43.

LABBÉ, K. & SALEH, M. (2008) Cell death in the host response to infection. **Cell Death and Differentiation** **15**: 1339-1349.

LAINSON, R., SHAW., J. J., SILVEIRA, A. A. A., BRAGA, R. R., ISHIKAWA, E. A. Y. (1994) The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **89**: 435-443.

LASKAY, T., van ZANDBERBERN, G., SOLBACH, W. (2008) Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology 213: 183-91.**

LASKAY, T., van ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. (2003) Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology 11: 210-214.**

LAUBER, K., BOHN, E., KRÖBER, S. M., XIAO, Y. J., BLUMENTHAL, S. G., LINDEMANN, R.K., MARINI, P., WIEDIG, C., ZOBYWALSKI, A., BAKSH, S., XU, Y., AUTENRIETH, I. B., SCHULZE-OSTHOFF, K., BELKA, C., STUHLER, G., WESSELBORG, S. (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell 113: 717-730.**

LAURENTI, M. D., ÖRN, A., SINHORINI, I.L., CORBETT, C. E. P. (2004) The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research 37: 427-434.**

LEE, J., REMOLD, H. G., IEONG, M. H., KORNFELD, H. (2006) Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. **The Journal of Immunology 176: 4267-4274.**

LIESENFELD, O., KOSEK, J. C., SUZUKI, Y. (1997) Gamma Interferon induces Fas-dependent apoptosis of Peyer's Patch T cells in mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity 65: 4682-4689.**

LIPOLDOVÁ, M. & DEMANT P. (2006) Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics 7: 294-305.**

LOPEZ KOSTKA, S., DINGES, S., GRIEWANK, K., IWAKURA, Y., UDEY, M.C., VON STEBUT, E. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **The Journal of Immunology 182: 3039-3046.**

MADERNA, P. & GODSON, C. (2003) Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. **Biochimica et Biophysica 1639: 141-51.**

MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P. M., MCGAHON, A. J., RADER, J. A., VAN SCHIE, R. C. A. A., LaFACE, D. M., GREEN, D. R. (1995) Early distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **Journal of Experimental Medicine** **182: 1545-56.**

McCOLE, D. F., ECKMANN, L., LAURENT, F., KAGNOFF, M. F. (2000) Intestinal epithelial cell apoptosis following *Cryptosporidium parvum* infection. **Infection and Immunity** **68: 1710-1713.**

McMAHON-PRATT, D. & ALEXANDER, J. (2004) Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews** **201: 206-224.**

MELBY, P. C. (2002) Recent development in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases** **15:485-490.**

MENAKER, R. J., CEPONIS, P. J. M., JONES, N. L. (2004) *Helicobacter pylori* induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. **Infection and Immunity** **72: 2889-2898.**

MENDES, B. P (2011) Mecanismos de resistência de camundongos BALB/c e C57BL/6 à infecção por *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2007) Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) 2. ed. Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**

MONACK, D. M., RAUPACH, B., HROMOCKY, A. E., FALKOW, S. (1996) *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proceedings of the National Academy of Science USA** **93: 9833-9838.**

MOORE, K. J. & MATLASHEWSKI, G. (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. **The Journal of Immunology** **152: 2930-2937.**

MOSSER, D. M.; SPRINGER, T. A.; DIAMOND, M. S. (1992) *Leishmania* promastigotas require opsonic complement binding to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) **Journal of Cell Biology** **116**: 511-520.

MURO, I., BERRY, D. L., HUH, J. R., CHEN, C. H., HUANG, H., YOO, S. J., GUO, M., BAEHRECKE, E. H., HAY, B. A. (2006) The *Drosophila* caspase Ice is important for many apoptotic cell deaths and for spermatid individualization, a nonapoptotic process. **Development** **133**: 3305-3315.

NAIFF, R. D., TALHARI, S., BARRET, T. V. (1988) Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **83**: 529-530.

NICHOLSON, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**. **6**: 1028-42.

NOLAN, T. J. & HERMAN, R. (1985) Effects of long-term in vitro cultivation on *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Protozoology** **32**: 70-75.

NUNES, M. P., ANDRADE, R. M., LOPES, M. F., DOSREIS, G. A. (1998) Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. **The Journal of Immunology** **160**: 1313-1319.

OJCIUS, D. M., PERFETTINI, J., BONNIN, A., LAURENT, F. (1999) Caspase-dependent apoptosis during infection with *Cryptosporidium parvum*. **Microbes and Infection** **1**: 1163-1168.

OPFERMAN, J. T. & KORSMEYER, S. J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nature Immunology** **4**: 410- 415.

PADIGEL, U. M., ALEXANDER, J., FARRELL, J. P. (2003) The role of Interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **The Journal of Immunology** **171**: 3705-3710.

PALAND, N., RAJALINGAM, K., MACHUY, N., SZCZEPEK, A., WEHRL, W., RUDEL, T. (2006) NK- κ B and inhibitor of apoptosis proteins are required for apoptosis resistance of epithelial cells persistently infected with *Chlamydomyxa pneumoniae*. **Cellular Microbiology** **8**: 1643-1655.

PAYNE, T. M., MOLESTINA, R. E., SINAI, A. P. (2003) Inhibition of caspase activation and a requirement for NF- κ B function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. **Journal of Cell Science** **116**: 4345-4358.

PEREIRA-MANFRO, W. F., RIBEIRO-GOMES, F. L., FILARDY, A. A., VELLOZO, N. S., GUILLERMO, L. V., SILVA, E. M., SIEGEL, R. M., DOSREIS, G. A., LOPES, M. F. (2014) Inhibition of caspase-8 activity promotes protective T_H1- and T_H2-mediated immunity to *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology** **95(2)**:347-55.

PERSKVIST, N., LONG, M., STENDHAHL, O., ZHENG, L. (2002) *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. **The Journal Immunology** **168**: 6358-6365.

PETERS, N. C., EGEN, J. G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M. P., GERMAIN, R. N., SACKS, D. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science** **321**: 970–974.

PINHEIRO, R. O. & ROSSI-BERGMANN, B. (2007) Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102**: 79-82.

PINHEIRO, R. O., PINTO, E. F., BENEDITO, A. B., LOPES, U. G., BERGMANN, B. R. (2004) The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** **76**: 519-527.

POEPPL, W., BURGMANN, H., AUER, H., MOOSEDER, G., WALOCHNIK, J. (2012) Letters: *Leishmania (Viannia) guyanensis* infection, Austria. **Emerging Infectious Diseases** **18**: 1534-1535.

POMPEU, M. L., FREITAS, L. A., SANTOS, M. L., BARRAL-NETTO, M. (1991) Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Tropica** **48**: 185-193.

PRINA, E., ABDI, S. Z., LEBASTARD, M., PERRET, E., WINTER, N., ANTOINE, J.-C. (2004) Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania*

amazonensis: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **Journal of Cell Science 117: 315-325.**

PROBST, C. M., SILVA, R. A., MENEZES, J. P. B., ALMEIDA, T. F., GOMES, I. N., DALLABONA, A. C., OZAKI, L. S., BUCK, G. A., PAVONI, D. P., KRIEGER, M. A., VERAS, P. S. T. (2012) A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. **BMC Microbiology 12:22.**

PROUDFOOT, L., NIKOLAEV, A. V., FENG, G., WEI, X., FERGUSON, M. A. J., BRIMACOMBE, J. S., LIEW, F. Y. (1996) Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the National Academy of Science USA 93: 10984-10989.**

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

RAMER, A. E., VANLOUBBEECK, Y. F., JONES, D. E. (2006) Antigen-responsive CD4⁺ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. **Infection and Immunity 74: 1547-1554.**

RAQIB, R., EKBERG, C., SHARKAR, P., BARDHAN, P. K., ZYCHLINSKY, A., SANSONETTI, P. J., ANDERSSON, J. (2002) Apoptosis in acute shigellosis is associated with increased production of Fas/Fas Ligand, perforin, caspase-1, and caspase-3 but reduced production of Bcl-2 and Interleukin-2. **Infection and Immunity 70: 3199-3207.**

REAL, F., FLORENTINO, P. T. V., REIS, L. C., RAMOS-SANCHEZ, E. M., VERAS, P. S. T., GOTO, H., MORTARA, R. A. (2014) Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cellular Microbiology 16: 1549–1564.**

RIBEIRO-GOMES, F.L., MONIZ-DE-SOUZA, M. C. A., BORGES, V. M., NUNES, M. P., MANTUANO-BARRADAS, M. D'ÁVILA, H., BOZZA, P. T., CALICH, V. L., DOSREIS G. A. (2005) Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. **Journal of Infectious Diseases 192: 1127–34.**

- RIBEIRO-GOMES, F.L., OTERO, A. C., GOMES, N. A., MONIZ-DE-SOUZA, M. C., CYSNE-FINKESLSTEIN, L., ARNHOLDT, A. C., CALICH, V. L., COUTINHO, S. G., LOPEZ, M. F., DOS REIS, G. A. (2004) Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology** **172**: 4454-4462.
- RICCARDI, C. & NICOLETTI, I. (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols** **1**:1458-1461.
- RITTIG, M. G. & BOGDAN, C. (2000) *Leishmania*–host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today** **16**: 292-297.
- ROGERS, K. A., DeKREY, G. K., MBOW, M. L., GILLESPIE, R. D., BRODSKY, C.I., TITUS, R. G. (2002) Type 1 and 2 responses to *Leishmania major* **FEMS Microbiology Letters** **209**: 01-07.
- ROJAS, M., BARRERA, L. F., PUZO, G., GARCIA, L. F. (1997) Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. **The Journal of Immunology** **159**: 1352-1361.
- ROMERO, G. A. S., GUERRA, M. V. F., PAES, M. G., MACÊDO, V. O. (2001) Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. **Clinical Infectious Diseases** **32**: 1304-1312.
- RUHLAND, A., LEAL, N., KIMA, P. E. (2007) *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. **Cellular Microbiology** **9**: 84-96.
- SACKS, D. & ANDERSON, C. (2004) Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunological Reviews** **201**: 225-38.
- SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology** **2**: 845-858.
- SACKS, D. L. (2001) *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology** **3**: 189-96.
- SAKAI, T., HISAEDA, H., ISHIKAWA, H., MAEKAWA, Y., ZHANG, M., NAKAO, Y., TAKEUCHI, T. MATSUMOTO, K., GOOD, R. A., HIMENO, K. (1999) Expression and the

role of heat-shock protein 65 (HSP65) in macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of HSP65 in prevention of apoptosis of macrophages. **Microbes and Infection 1: 419-427.**

SAKTHIANANDESWAREN, A., FOOTE, S. J., HANDMAN, E. (2009). The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in Parasitology 25: 383-91.**

SARKAR, A., AGA, E., BUSSMEYER, U., BHATTACHARYYA, A., MOLLER, S., HELLBERG, L., BEHNEN, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. (2013) Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Medical Microbiology and Immunology 202: 25–35.**

SARKAR, A., AGA, E., BUSSMEYER, U., BHATTACHRYYA, A., MÖLLER, S., HELLBERG, L., BEHNEN, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. (2013) Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. **Medical Microbiology and Immunology 202: 25-35.**

SAVILL, N. J. & HIGGS, P. G. (1999) A theoretical study of random segregation of minicircles trypanosomatids. **Proceedings of the Royal Society of London B 266:611-620.**

SCOTT, P., NATOVITZ, P., COFFMAN, R. L. PEARCE, E., SHER, A. (1988) Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **Journal of Experimental Medicine 168: 1675-1684.**

SHARMA, U. & SINGH, S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control **Journal of Vector Borne Diseases 45: 255–272.**

SHI, L., KRAUT, R. P., AEBERSOLD, R., GREENBERG, A. H. (1992) A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. **Journal of Experimental Medicine 175: 553-566.**

SIEGEL, R. M. (2006) Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. **Nature Reviews in Immunology 6: 308-317.**

SINGH, B. N., LUCAS, J. J., HAYES, G. R., KUMAR, I., BEACH, D. H., FRAJBLAT, M., GILBERT, R. O., SOMMER, U., COSTELLO, C. E. (2004) *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. **Infection and Immunity** **72: 4151-4158**.

SOONG, L. (2008) Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **The Journal of Immunology** **180: 4355-4360**.

SOONG, L. (2012) Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Immunology** **3: 58**.

SOONG, L., CHANG, C. H., SUN, J., LONGLEY, B. J. JR, RUDDLE, N. H., FLAVELL, R. A., MCMAHON-PRATT, D. (1997) Role of CD4⁺ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology** **158: 5374-5383**.

SOONG, L., XU, J. C., GREWAL, I. S., KIMA, P., SUN, J., LONGLEY, B. J. JR, RUDDLE, N. H., MCMAHON-PRATT, D., FLAVELL, R. A. (1996) Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. **Immunity** **4: 263-273**.

SOUSA, L. M., CARNEIRO, M. B., RESENDE, M. .E, MARTINS, L. S., DOS SANTOS, L. M., VAZ, L. G., MELOO, P. S., MOSSER, D. M., OLIVEIRA, M. A., VIEIRA, L. Q. (2014) Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology** **36: 13-31**.

SOUSA-FRANCO, J., ARAÚJO-MENDES, E., SILVA-JARDIM, I., L.-SANTOS, J., FARIA, D. L., DUTRA, W.O., HORTA, M. F. (2006) Infection-induced respiratory burst in BALB/c kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. **Microbes and Infection** **8: 390-400**.

SUFFIA, I., RECKLING, S. K., SALAY, G., BELKAID, Y. (2005) A role for CD103 in the retention of CD4⁺CD25⁺ T_{reg} and control of *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology** **174, 5444–5455**.

SUSKA, F., GRETZER, C., ESPOSITO, M., TENGVALL, P., THOMSEN, P. (2005) Monocyte viability on titanium and copper coated titanium. **Biomaterials** **26:5942-5950**.

TACCHINI-COTTIER, F., WEINKOPFF, T., LAUNOIS, P. (2012) Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. **Frontiers in Immunology 3: 32.**

TACCHINI-COTTIER, F., ZWEIFEL, C., BELKAID, Y., MUKANKUNDIYE, C., VASEI, M., LAUNOIS, P., MILON, G., LOUIS, J. A. (2000) An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ T_H2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology 165: 2628-2636.**

TAYLOR, R C., CULLEN, S. P., MARTIN, S. J (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 9: 231-41.**

THIAKAKI, M., KOLLI, B., CHANG, K. P., SOTERIADOU, K. (2006) Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. **Microbes and Infection 8: 1455-1463.**

TORCHINSKY, M. B., GARAUDE, J., MARTIN, A. P., BLANDER, J. M. (2009) Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T_H17 cell differentiation. **Nature 458: 78-82.**

TRAMBAS, C. M. & GRIFFITHS, G. M. (2003) Delivering the kiss of death. **Nature Immunology 4(5): 399-403.**

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. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA 103: 13837-13842.**

VANLOUBBEECK, Y. F., RAMER, A. E., JIE, F., JONES, D. E. J. (2004) CD4⁺ T_H1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. **Infection and Immunity 72: 4455–4463.**

VERÇOSA, B. L., MELO, M. N., PUERTO, H. L., MENDONÇA, I. L., VASCONCELOS, A. C. (2012) Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Veterinary Parasitology 189: 162-170.**

VERMES, I., HAANEN, C., REUTELINGSPERGER, C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods** **243:167-190**.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELINGSPERGER, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. **Journal of Immunological Methods** **184: 39-51**.

VILELA, M.L., PITA-PEREIRA, D., AZEVEDO, C.G., GODOY, R.E., BRITTO, C., RANGEL, E.F. (2013) The phlebotomine fauna (Diptera: Psychodidae) of Guaraí, state of Tocantins, with an emphasis on the putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in rural settlement and periurban areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **108: 578-585**.

VOTH, D. E., HEINZEN, R. A. (2009) Sustained activation of Akt and Erk1/2 is required for *Coxiella burnetii* antiapoptotic activity. **Infection and Immunity** **77: 205-213**.

WALLACH, D., KANG, T.-B., KOVALENKO, A. (2014) Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. **Nature Reviews Immunology** **14: 51-59**.

WALTERS, L. L. (1993) *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology** **40: 196-206**.

WANDERLEY, J. L., PINTO DA SILVA, L. H., DEOLINDO, P., SOONG, L., BORGES, V. M., PRATES, D. B., SOUZA, A. P., BARRAL, A., BALANCO, J. M. F., DO NASCIMENTO, M. T., SARAIVA, E. M., BARCINSKY, M. A. (2009) Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. **PLoS One** **4: e5733**.

WESCHE-SOLDATO, D. E., SWAN, R. Z., CHUNG, C. S., AYALA, A. (2007) The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. **Current Drug Targets** **8: 493-500**.

WHO – World Health Organization (2015) http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/ Acessado 08 de janeiro de 2015.

WHO – World Health Organization (2014) <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acessado 29 de dezembro de 2014.

WHO (2010) Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 **WHO technical report series número 949**. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf?ua=1
Acessado dia 04 de janeiro de 2015.

XIN, L., LI, K., SOONG, L. (2008) Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Molecular Immunology 45: 3371-3382.**

ZANDBERGEN, G. V., GIEFFERS, J., KOTHE, H., RUPP, J., BOLLINGER, A., AGA, E., KLINGER, M., BRADE, H., DALHOFF, K., MAASS, M., SOLBACH, W., LASKAY, T. (2004) *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. **The Journal of Immunology 172: 1768-1776.**

ZANGGER, H., MOTTRAM, J. C., FASEL, N. (2002) Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death and Differentiation 9:1126-1139.**

ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M. C., SANSONETTI, P. J. (1992) *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. **Nature. 358: 167-169.**

8 – ANEXO I – TRABALHO PUBLICADO



RESEARCH ARTICLE

Distinct Macrophage Fates after *in vitro* Infection with Different Species of *Leishmania*: Induction of Apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but Not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Jarina Pena DaMata¹, Bárbara Pinheiro Mendes¹, Kátia Maciel-Lima², Cristiane Alves Silva Menezes^{2*}, Walderez Ornelas Dutra², Lirlândia Pires Sousa³, Maria Fátima Horta^{1*}

1 Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **2** Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **3** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

✉ Current address: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

* phorta@icb.ufmg.br



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: DaMata JP, Mendes BP, Maciel-Lima K, Menezes CAS, Dutra WO, Sousa LP, et al. (2015) Distinct Macrophage Fates after *in vitro* Infection with Different Species of *Leishmania*: Induction of Apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but Not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. PLoS ONE 10(10): e0141196. doi:10.1371/journal.pone.0141196

Editor: Farhat Afrin, Department of Medical Lab Technology, Faculty of Applied Medical Sciences, Taibah University, SAUDI ARABIA

Received: February 25, 2015

Accepted: October 6, 2015

Published: October 29, 2015

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

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

Funding: This work was supported by the following Brazilian financing programs or institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JPD, BPM, and KML

Abstract

Leishmania is an intracellular parasite in vertebrate hosts, including man. During infection, amastigotes replicate inside macrophages and are transmitted to healthy cells, leading to amplification of the infection. Although transfer of amastigotes from infected to healthy cells is a crucial step that may shape the outcome of the infection, it is not fully understood. Here we compare *L. amazonensis* and *L. guyanensis* infection in C57BL/6 and BALB/c mice and investigate the fate of macrophages when infected with these species of *Leishmania in vitro*. As previously shown, infection of mice results in distinct outcomes: *L. amazonensis* causes a chronic infection in both strains of mice (although milder in C57BL/6), whereas *L. guyanensis* does not cause them disease. *In vitro*, infection is persistent in *L. amazonensis*-infected macrophages whereas *L. guyanensis* growth is controlled by host cells from both strains of mice. We demonstrate that, *in vitro*, *L. amazonensis* induces apoptosis of both C57BL/6 and BALB/c macrophages, characterized by PS exposure, DNA cleavage into nucleosomal size fragments, and consequent hypodiploidy. None of these signs were seen in macrophages infected with *L. guyanensis*, which seem to die through necrosis, as indicated by increased PI-, but not Annexin V-, positive cells. *L. amazonensis*-induced macrophage apoptosis was associated to activation of caspases-3, -8 and -9 in both strains of mice. Considering these two species of *Leishmania* and strains of mice, macrophage apoptosis, induced at the initial moments of infection, correlates with chronic infection, regardless of its severity. We present evidence suggestive that macrophages phagocytize *L. amazonensis*-infected cells, which has not been verified so far. The ingestion of apoptotic infected macrophages by healthy macrophages could be a way of amastigote spreading, leading to the establishment of infection.

were supported by CAPES, LPS, WOD, and MFH are CNPq research fellows. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Introduction

Leishmaniasis is a broad spectrum disease caused by over 20 different species of protozoa of the genus *Leishmania*. The disease manifests with four major outcomes, namely, localized cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous and visceral forms [1], which depend on parasite species, degree and primary site of infection, immune response and genetic predisposition of the host [2]. An estimated 12 million cases of leishmaniasis exist worldwide with 1.5–2 million new cases occurring annually, of which cutaneous leishmaniasis accounts for more than 50% [2, 3]. Over 350 million people in 88 countries live at risk of infection [1].

Leishmania (Leishmania) amazonensis and *L. (Viannia) guyanensis* are species associated with cutaneous leishmaniasis, although they differ in several aspects, including the kind of lesion and the type of immune response they cause. *L. amazonensis* accounts for a broad spectrum of diseases, with cases of simple cutaneous lesions, but also extending from anergic diffuse cutaneous to mucocutaneous or visceralization [4–6]. *L. guyanensis* causes small and numerous cutaneous ulcers, usually without any mucosal secondary involvement [7, 8]. In the murine model, it has been shown that these species also behave rather differently, producing diverse outcomes, according to the mouse strain used for infection. C57BL/6 and BALB/c mice are widely compared strains in the study of leishmaniasis due to their contrasting reactions to infection with some species of *Leishmania*. C57BL/6 mice are usually resistant to infection with *L. guyanensis*, but develop a chronic disease when infected with *L. amazonensis*, whereas BALB/c are extremely vulnerable to *L. amazonensis*, but like C57BL/6, totally resistant to *L. guyanensis* [9, 10]. In *L. amazonensis* infections, susceptibility in both mice strains is related with activation of both Th1 and Th2 response, with low production of IFN- γ , IL-10, IL-17 and IL-4 [11, 12]. A rapid and transient accumulation of Treg cells in the initial weeks of infection in C57BL/6, which modulates IFN- γ production helps restraining disease progression [13, 14]. Little is known about the *L. guyanensis* Th response of infected mice. Previous results from our group have suggested that the innate respiratory burst is involved in BALB/c mice resistance [10]. In C57BL/6 MyD88- and TLR9-dependent IL-12 production induces a protective Th1 response [15]. IL-12 was also shown to be protective in humans infected with *L. guyanensis*, while IL-13 favors the persistence of the infection by rendering CD4+ T cells unresponsive to IL-12 [16, 17]. T regs and IL-10 produced by T CD8+ also have a role in the pathogenesis of human *L. guyanensis* infection [18, 19].

Vertebrate hosts are infected when female sandflies inoculate, during blood meal, infective promastigotes into the dermis, where they are ultimately phagocytized by macrophages. Within these cells, promastigotes differentiate into replicative amastigotes, which settle inside acidic phagolysosomes. Amastigotes eventually leave infected macrophages and are taken up by neighboring healthy cells. Infected cells can also be ingested by sandflies, where amastigotes differentiate into infective promastigotes, closing the cycle [20].

The replication of amastigotes, together with their escape from macrophage killing mechanisms, and their continuous infectivity to bystander cells, amplifies the infection and, thus, the severity of the disease [21–23]. How amastigotes leave macrophages to infect neighboring cells is not yet understood. It has usually been presumed, based on static images only, that unrestricted replication of the amastigotes directly causes host cell rupture [24–27] or that amastigotes are released by exocytosis with membrane shriveling, but without cell rupture [28]. Based on our findings that *Leishmania* have a pore-forming cytolysin that we call leishporin, we have been proposing that amastigotes egress from the macrophages is mediated by pore formation on the parasitophorous vacuole and the plasma membrane [29, 30]. However, whether there is damage to both the parasitophorous vacuole and the plasma membrane and whether the macrophage dies in the process is still controversial.

Polymorphonuclear neutrophils have also been implicated in the silent transfer of intracellular parasites to macrophages. Neutrophils are short-lived cells that undergo apoptosis exposing phosphatidylserine (PS) in the outer leaflet of cell membrane, which is an ‘eat me’ signal for macrophages [31]. It has been shown that infection of neutrophils with *L. major* promastigotes delays, but does not prevent spontaneous granulocyte apoptosis. Therefore, neutrophils that have ingested but not killed *Leishmania* promastigotes act as safe targets for the survival of the parasites until macrophages phagocytize infected cells [32, 33].

A non-exclusive possibility would be that *Leishmania*-infected macrophages also die through apoptosis, exposing PS on their surface being phagocytized by neighboring healthy macrophages, propagating the infection. In fact, recently, Real *et al.* (2014) [34] have elegantly shown by multidimensional live cell imaging that, *in vitro*, *L. amazonensis* amastigotes are indeed transferred from cell to cell, apparently when the donor host macrophage delivers warning signs of imminent apoptosis. However, there are no reports on classic apoptosis of macrophages induced by the infection of *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. Therefore, the aim of this study was to determine whether these cutaneous leishmaniasis-causing species are able to induce apoptosis in macrophages, trying to relate this process with the outcome of disease in mice. Our results show that *L. amazonensis* induces classic apoptosis in murine macrophages *in vitro*, from both C57BL/6 and BALB/c, showing PS exposure, classic DNA fragmentation and consequent hypodiploidy. None of these signs are seen in macrophages infected by *L. guyanensis*, which seem to die through necrosis. Caspases-3, -8 and -9 are activated in *L. amazonensis*-infected apoptotic cells from both strains of mice. Considering these two species of *Leishmania* and strains of mice, macrophage apoptosis induced at the initial moments of *in vitro* infection correlates with chronic infection, regardless of its severity.

Material and Methods

Animals and Ethics Statement

Male BALB/c and C57BL/6 mice, 6 to 12 weeks of age, were purchased from Centro de Bioterismo facility, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. This study was carried out in strict accordance with Brazilian laws governing animal experimentation. All procedures described here had prior approval from Animal Experimentation Ethics Committee of UFMG (Permit Number CEUA—109/2012) and all efforts were made to minimize suffering. Condition of the animals was monitored three times a week and no unintended deaths of animals occurred during this study. Euthanasia was performed by cervical dislocation by a trained person who ensured instantaneous animal death without pain or stress.

Consumables

Equipment, consumables and software were purchased from: **Brazil**: Cripion Biotecnologia Ltda, Andradina, SP; Mitutoyo, Santo Amaro, SP; **USA**: Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA; Cell Signaling—Danvers, MA; Difco, Kansas City, USA; FlowJo, LLC/Tree Star, Ashland, OR; Gibco Life Technologies, Grand Island, NY; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA; ImageJ 1.44p software (available at <http://imagej.nih.gov/ij/>) National Institutes of Health, Bethesda, MD; Nalgene Nunc International, Penfield, New York; Packard, Meriden, CT; Promega Corporation, Fitchburg, WI; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; Stratagene-Agilent Technologies, Santa Clara, CA; **France**: Vilmer Loumart, Marne-la-Vallée; **Germany**: Sarstedt Inc., Nümbrecht.

Parasites

L. (L.) amazonensis PH8 (IFLA/BR/67/PH8) and *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) promastigotes were axenically cultured at 24°C in Schneider medium supplemented (Sigma) with 10% heat-inactivated (hi) fetal bovine serum (FBS) (Cripion Biotecnologia Ltda). Promastigotes were harvested on the 4th or 5th day of culture, during the stationary phase of growth, for *in vitro* and *in vivo* infections.

Macrophage culture and infection with promastigotes *in vitro*

Peritoneal macrophages were obtained from mice 4 days after i.p. injection of 2mL of 3% thioglycollate medium (Difco), as previously described [35]. Cells were washed with PBS, and resuspended in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% hi FBS and 50mg/mL of gentamicin. Cells were plated on 8-well chamber LabTek[®] (Nalge Nunc International) tissue culture slides, 96-, 24-, and 6-well flat bottom plates (Nalge Nunc International), with 1×10^5 cells, 5×10^4 , 5×10^5 , and 1×10^7 , respectively, and left at 37°C in 5% CO₂ for 2h for macrophages adherence. Adherent cells were then washed with room temperature RPMI and further incubated overnight under the same conditions.

Macrophages were infected with stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* or *L. guyanensis* at a 10:1 parasite:macrophage ratio and incubated at 34°C at 5% CO₂ for 4h. Cells were then washed twice to remove non-adhered or -interiorized parasites and we considered this point as the initial time of infection. Cultures of infected macrophages were incubated at same conditions for up to 4 days. Cells on the slides were fixed with methanol and stained with May-Grünwald, followed by Giemsa, method. The stained slides were used for determining the percentage of infected macrophages and the number of intracellular parasites after counting 400 or 200 macrophages, respectively, in duplicate with an optical microscope (Olympus—CX31). Infection index (percentage of infected cells x number of parasites per infected cells) was also determined. Images were obtained using QCapture Pro 6 Imaging Software (QImaging) obtained from <http://www.qimaging.com/products/software/qcappro7.php>.

In vivo infection

Stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* or *L. guyanensis* (1×10^6) in 40 μ L of PBS were inoculated subcutaneously into the right hind footpad of 6-week-old BALB/c or C57BL/6 male mice (n = 5). The evolution of the disease was monitored by weekly measuring footpad thickness with a metric caliper (Mitutoyo) and expressed as the difference in thickness between the infected and the uninfected footpad. BALB/c mice infected with *L. amazonensis* were sacrificed after the 10th week due to the development of large necrotic lesions, while C57BL/6 infected with *L. amazonensis* or both strains infected with *L. guyanensis* were observed for 14 or 20 weeks, respectively.

Detection of PS on infected macrophages and evaluation of cell permeability

Adhered cells, infected or not with *L. amazonensis* or *L. guyanensis* were removed with cell scrapers, washed twice with ice-cold RPMI medium and kept at 34°C with 5% CO₂ in suspension in 5mL polypropylene tubes (Sarstedt) overnight for recovering [36]. Staining with Annexin V(AnnV)-FITC (BD Bioscience Pharmingen) was proceeded according to manufacturer and counterstained with PI (Sigma-Aldrich). Briefly, cells were centrifuged, washed twice with ice-cold PBS and resuspended in binding buffer (10mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140mM NaCl and 2.5mM CaCl₂). Cells were incubated with AnnV-FITC and PI for 15 minutes in the

dark at room temperature. Fluorescence of samples was immediately measured in FACScan (Becton-Dickinson). For detection of cell permeability cells were stained as described above with PI. Macrophage population was gated by size (FSC) versus granularity (SSC), previously defined with anti-CD11b specific antibody (not shown). Gate analysis is shown in [S1A Fig](#). Ten thousand events inside the macrophage gate were counted. Results were expressed as the percentage of AnnV positive and PI negative cells, indicating the early apoptosis events. Data analysis was performed with FlowJo (LLC/TreeStar) software.

Hypodiploidy analysis

To evaluate nucleic acid content within macrophage nuclei, cells were lysed with hypotonic buffer containing propidium iodide (PI) and nuclear content was measured using FACScan (BD Biosciences), according to Riccardi & Nicoletti (2006) [37]. Briefly, after different periods of macrophage infection with promastigotes, supernatants were collected from plastic dishes and centrifuged for 10 minutes at 2000 rpm to recover cells that had detached from the plate. Adherent cells were treated with lysis buffer (0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 50µg/mL PI) and the lysates were added to the previously pelleted detached cells and incubated at 4°C for overnight. Macrophage nuclei population was first gated by size (FSC) versus granularity (SSC), which was further gated to eliminate very low PI fluorescence. Gate analysis is shown in [S1B and S1C Fig](#). Ten thousand events inside the nuclei gate were counted. Data analysis was performed with FlowJo (LLC/TreeStar) software. Results were expressed as the frequency of PI fluorescent nuclei indicating their amount of DNA.

Analysis of DNA

1×10^7 adhered cells infected or not with promastigotes, at different periods of infection, were collected using cell scrapers (Sarstedt) alongside eventually detached cells present in culture medium. Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed with lysis buffer (40 mM EDTA pH8, 50 mM Tris pH 8, 1% Triton) and incubated with RNase (20µg/mL) (Promega) for 1h at 37°C. Proteinase K (Promega) was added to a final concentration of 100µg/mL and incubated at 56°C for at least 2h. Supernatants were treated twice with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) (Sigma-Aldrich), centrifuged at 15000 rpm for 5 minutes at 4°C and finally treated with chloroform (Sigma-Aldrich) before overnight incubation at -20°C with 0.25M NaCl and twice the volume of pure ethanol (Promega). Samples were washed twice with ethanol 70% and the dried pellet was solubilized in TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA, pH 8.0). DNA samples were quantified using GeneQuant (Amersham, GE Healthcare Biosciences) and 1 µg of DNA of each sample was applied in 1.8% agarose gels. Gels were analyzed and documented with UV transilluminator (Stratagene-Agilent Technologies) and a camera (Vilmer Loumart).

Preparation of cell extracts and Western Blotting Analysis

Macrophages in 6-well plates infected or not, were harvested with cell scrapers (Sarstedt) alongside with eventually detached cells, and washed twice with ice cold PBS. Cell extracts were obtained through cell homogenization with lysis buffer, as previously described [38] and centrifuged at 13,000 rpm, 10 minutes and 4°C. Samples were stored at -20°C until required. Protein quantification was assessed with Bradford reagent assay (Bio-Rad). Extracts (20µg) were fractionated by electrophoresis in SDS-PAGE 15% gels, transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and membranes were blocked for 2h at 4°C with PBS containing 0.1% Tween-20 and 5% (w/v) of nonfat milk. After washing, membranes were incubated overnight at 4°C with anti-caspase-3 (#9665, Cell Signaling), at a 1:1000 dilution. Membranes were

washed and incubated with a mouse anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (1:3000) (#7074, Cell Signaling). Finally, membranes were washed, and immunoreactive bands were visualized using ECL detection system as instructed by the manufacturer (GE Healthcare). Anti- β -actin was used as a load control at a 1:5000 dilution (A5316, Sigma), with anti-mouse secondary antibody conjugated with peroxidase at a 1:3000 dilution (sc-2005, Santa Cruz Biotechnology). Densitometry analyses were performed using ImageJ 1.44p software (National Institutes of Health), using β -actin and the band above pro-caspase-3 as load controls.

Activated caspase-8 and caspase-9 detection

Caspase-8 and -9 were detected using Caspase-Glo[®] 8 Assay and Caspase-Glo[®] 9 Assay (Promega), respectively, according to manufacturer. Briefly, cells were cultured in 96-well plates and infected as described above. After determined periods of infection, prepared reagent was added to samples and gently mixed to homogenize. After 2h incubation, at room temperature, supernatants were transferred to 96-well plate appropriate for luminometer (Nalgene Nunc). Luminescence was measured in plate-reading luminometer (Packard—Luminocount). Luminescence is represented as RLU (relative light units).

Statistical analysis

All results are presented as the mean \pm SE or SD. Each two groups were analyzed by Student's *t* test. A *P* value < 0.05 was considered significant. Calculations were performed using the Prism 5.0 software for Windows (GraphPad).

Results

Course of infection with *L. amazonensis* and *L. guyanensis* in C57BL/6 and BALB/c mice

Epidemiological and experimental studies have shown that different species of *Leishmania* cause recognizably different disease outcomes. These differences are easily shown in murine models of infection, particularly in C57BL/6 and BALB/c strains of mice. Here we compare the course of infection with *L. amazonensis* and *L. guyanensis* in these two strains of mice, in which lesion growth was followed weekly (Fig 1). As observed, BALB/c mice are totally susceptible to *L. amazonensis* with an increasing lesion over time. Unable to control infection, mice would die if not euthanized at the 10th week of infection (Fig 1A). C57BL/6 mice are much less susceptible to infection, starting with lesions comparable to those of BALB/c up to 5 weeks of infection, which, although do not progress, are persistent (Fig 1A). It is already well documented that C57BL/6 mice are not able to resolve *L. amazonensis*, giving rise to a chronic infection [9]. In contrast, both strains of mice completely control the lesion caused by *L. guyanensis*. In Fig 1B, we can see that in BALB/c, infection results in a very small footpad swelling from the 5th week, which recedes to no swelling at the 20th week, whereas C57BL/6 shows no lesion whatsoever during the same period.

In vitro, infection follows a pattern coherent with that of the *in vivo* infection. At the parasite:cell ratio of 10:1, almost 80% of the macrophages from both BALB/c and C57BL/6 are infected with *L. amazonensis* (Fig 1C) with a mean of 5–6 parasites/cell after 24 h, which increases to around 9 in 96 h in BALB/c macrophages, but remains constant in C57BL/6 cells. On the contrary, at the same conditions, not only the percentage of macrophages infected with *L. guyanensis* decreases from 70% to 30–40% in 48h (Fig 1D), but also the mean of parasites/cell decreases from 6–7 to 3–4 in both mice (Fig 1E), a condition that persists up to 96h. Infection index (Fig 1G and 1H) provides an approximation of the total number of parasites in the

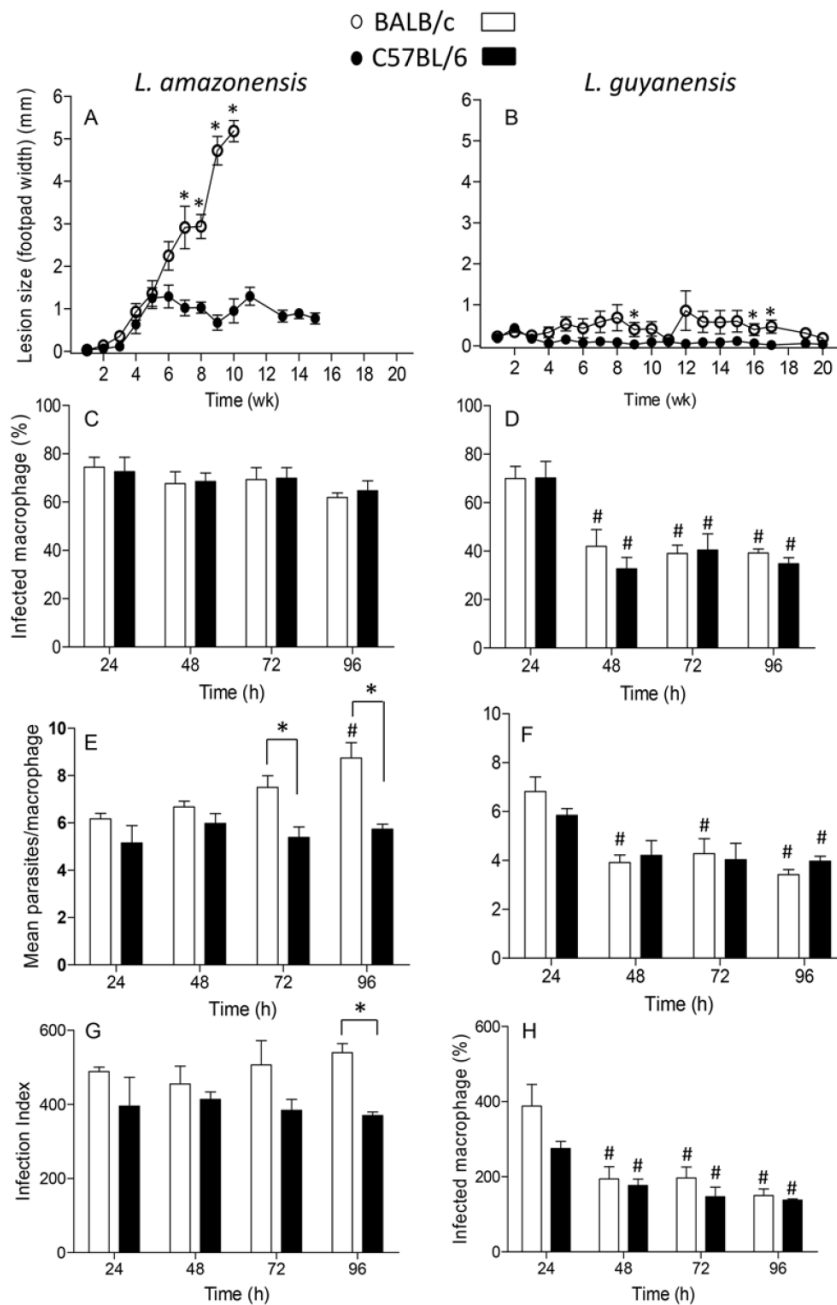


Fig 1. Lesion progression in mice infected with *L. amazonensis* or *L. guyanensis* and *in vitro* infection of macrophages. Groups of 5 BALB/c (open circles) or C57BL/6 (filled circles) mice were infected in one of the hind footpads with 1×10^6 stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* (A) or *L. guyanensis* (B). Lesion progression was assessed weekly for up to 20 weeks by measuring the hind footpads. Lesion size was expressed as the difference

between infected and non-infected footpad. Each point represents mean \pm SE obtained from 5 mice. Macrophages were infected with *L. amazonensis* (C, E, G) or *L. guyanensis* (D, F, H) at a 10:1 parasite:macrophage ratio and incubated for up to 4 days. Infected cells were counted and results are expressed as percentage of infected macrophages (C, D), number of parasite/cell (E, F) and infection index (G, H). Infection index was estimated as the mean percentage of infected cells \times the mean number of parasites per infected cells. Bars represent mean \pm SE of two to six (depending on the time point) independent experiments. Statistically significant differences between the two groups at a $P < 0.05$ are represented by (*). Statistically significant differences between values of the same group as compared to values at 24h at a $P < 0.05$ are represented by (#).

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g001

infection. Images of infected macrophages at various time points are presented on [Fig 2A and 2B](#), where we can observe that infection with *L. amazonensis* is quite different from infection with *L. guyanensis*. *L. amazonensis* amastigotes (black arrows) occupy large vacuoles ([Fig 2A](#)), whereas vacuoles containing *L. guyanensis* amastigotes (black arrows) are not apparent ([Fig 2B](#)) in both BALB/c and C57BL/6 mice. It was frequent to observe signs of cell death such as condensed nuclei (green arrows), particularly in *L. amazonensis* infection, and disintegrated cells containing amastigotes (yellow arrows), particularly in *L. guyanensis* infection. In *L. amazonensis* infection apoptotic cells that seem to have been ingested by (or are attached to) other macrophages (red arrows) could also be observed. In *L. guyanensis* infection, at later periods, it was also frequent to observe free amastigotes among cells (black arrows). These observations prompt us to further investigate whether cell death was being caused by infection and which type of death was occurring.

In vitro infection with *L. guyanensis*, but not with *L. amazonensis*, causes loss of membrane integrity in both BALB/c and C57BL/6 macrophages

To investigate whether these *Leishmania* species were causing death of host cells, infected macrophages were treated with PI and cell permeability was assessed by flow cytometry ([Fig 3](#)). Membrane integrity of both BALB/c ([Fig 3A](#)) and C57BL/6 ([Fig 3B](#)) macrophages infected with each of the two species shows distinct patterns, as infection progresses. *L. guyanensis* clearly causes loss of macrophage membrane integrity, inducing a massive macrophage death as early as 24h of infection, culminating with most cells dead at 72h. On the contrary, although *L. amazonensis* also may cause some loss of macrophage membrane integrity in 24h of infection, this is not observed at 48 or 72h. In fact, there are less *L. amazonensis*-infected cells from both strains of mice permeable to PI than uninfected cells that spontaneously die, losing membrane integrity. A typical cytometry plot can be seen in [Fig 4C](#), in which case cells were also labeled with AnnV, as described in the following section. Simultaneously, we sought to investigate whether macrophage death caused by *L. guyanensis* was through apoptosis. We initially looked for the following features shown by apoptotic cells: exposure of PS, degradation and loss of DNA.

In vitro infection with *L. amazonensis*, but not with *L. guyanensis*, causes macrophage exposure of PS

To detect the exposure of PS on macrophages, we incubated cells with FITC-labeled AnnV, which specifically binds to PS, and counterstained with PI ([Fig 4](#)). Unexpectedly, the massive damage of *L. guyanensis*-infected BALB/c or C57BL/6 macrophages was not derived from apoptotic cell death since the percentage of cells exposing PS did not exceed that of non-infected cells (the apparent difference between *L. guyanensis*-infected and uninfected at 48h, is not statistically significant at $p < 0.05$). Conversely, a substantial number of *L. amazonensis*-infected macrophages gradually exposed PS on their surface, indicating that these cells underwent apoptosis induced by the infection, in both BALB/c ([Fig 4A](#)) and C57BL/6 ([Fig 4B](#)). PS exposure is already evident at 24h of infection, and by 48h (C57BL/6) or 72h (BALB/c) most cells are PS

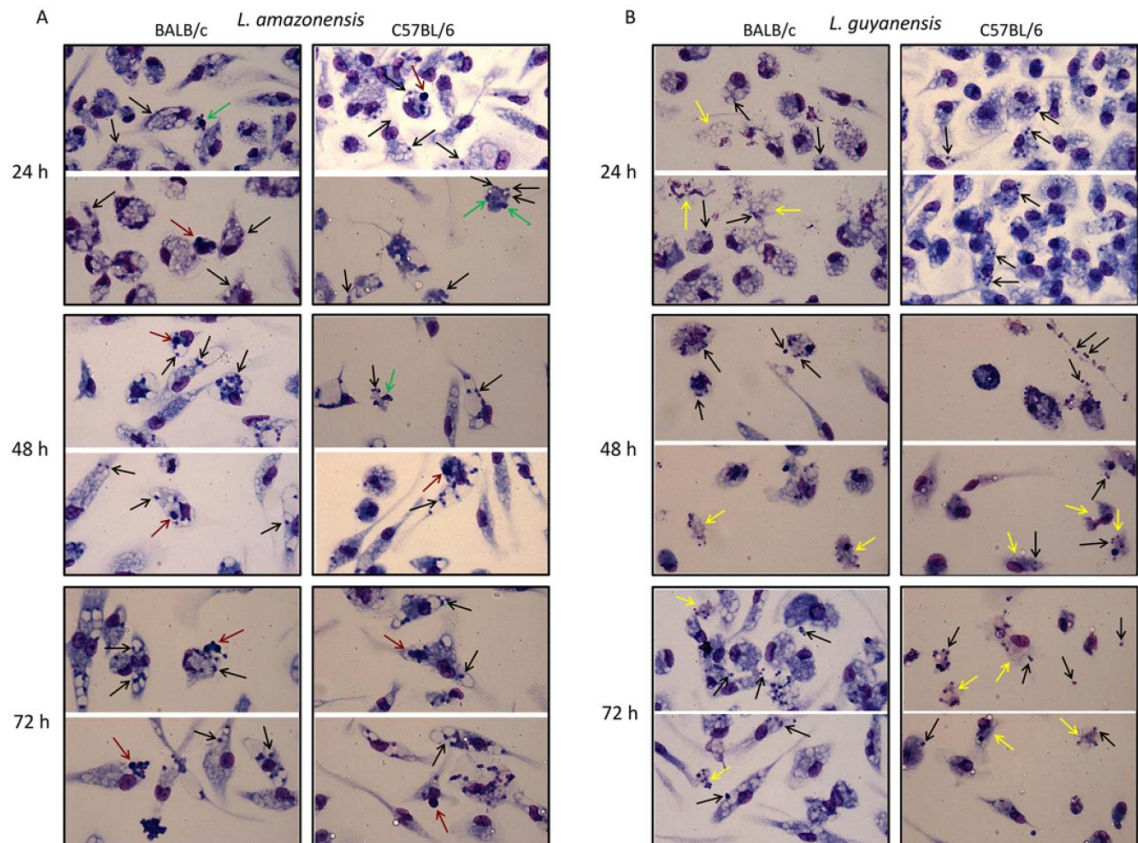


Fig 2. In vitro macrophage infection with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (left panel) or C57BL/6 mice (right panel) were infected with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. After the indicated time points cells were stained with May-Grünwald, followed by Giemsa, method. Images were obtained using QCapture Pro 7 Imaging Software (QImaging) obtained from http://www.qimaging.com/support/software/releases/030107_qcappro.php. Black arrows—amastigotes; green arrows—structures reminiscent of apoptotic bodies or condensed nuclei; yellow arrows—structures reminiscent of disintegrated cells; red arrows—structures reminiscent of apoptotic cells that seem to have been phagocytized by (or are attached in) other macrophages.

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g002

positive. In this analysis, we are representing cells at early stage of death (AnnV positive/PI negative), since at the end of necrosis cells may also be labeled with AnnV. It is curious that, during the period of 48h, more than twice as many *L. amazonensis*-infected C57BL/6 macrophages expose PS as compared to *L. amazonensis*-infected BALB/c cells. Typical plots are shown in Fig 4C.

In vitro infection with *L. amazonensis*, but not with *L. guyanensis*, causes loss of host cell DNA and a typical 180–200 bp-, or multiples-, ladder DNA degradation

Loss of nuclear DNA from infected macrophages was evaluated with PI staining of cell nuclei only and quantified by flow cytometry. This protocol is based on the principle that apoptotic

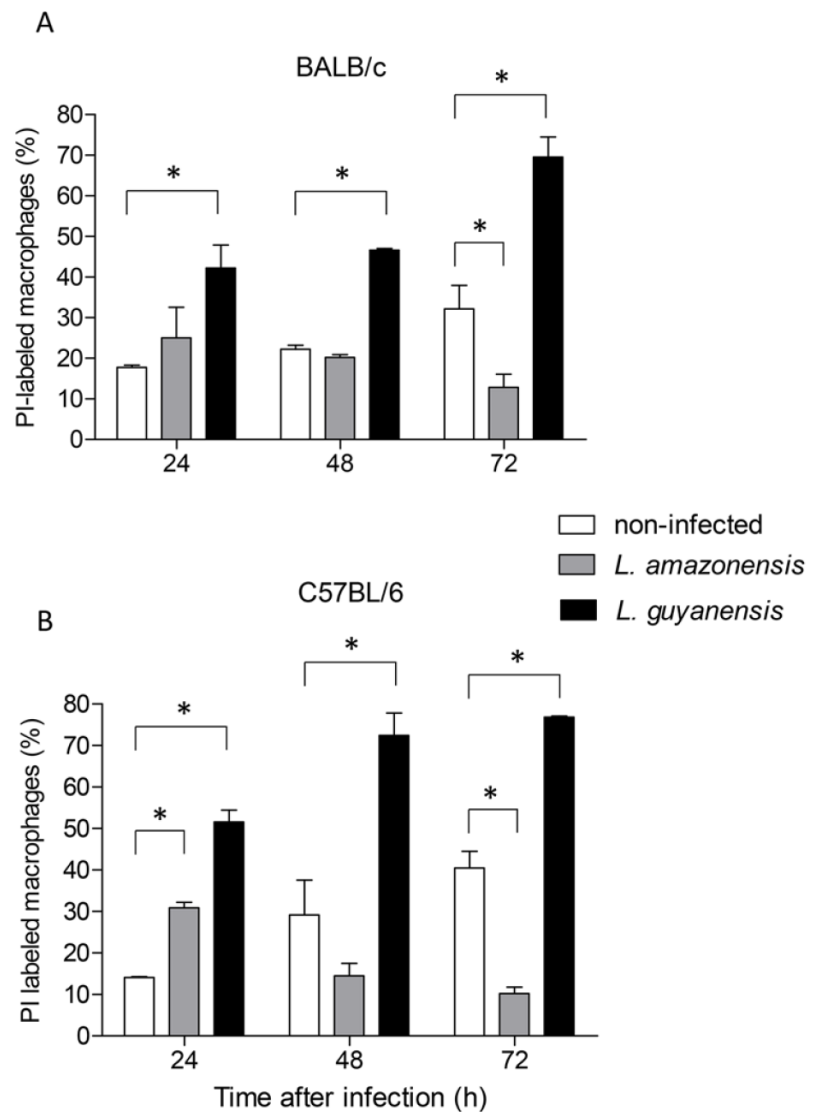


Fig 3. Loss of macrophage membrane integrity after *in vitro* infection with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice infected or not with *L. amazonensis* or *L. guyanensis* were incubated with PI and analyzed by flow cytometry at the time points indicated. Values represent percentage of PI positive cells in culture. Bars represent mean \pm SE of two or three (depending on the time point) independent experiments. Statistically significant differences between the two groups indicated, at a $P < 0.05$, are represented by (*). One typical experiment is shown in dot plots after macrophage gating and analysis by FlowJo (Fig 3C). Gating strategy is shown in S1A Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g003

cells have their DNA degraded by the action of endonucleases, and PI binding to DNA emits fluorescence proportional to nuclear DNA content [36]. Fig 5 shows the percentage of

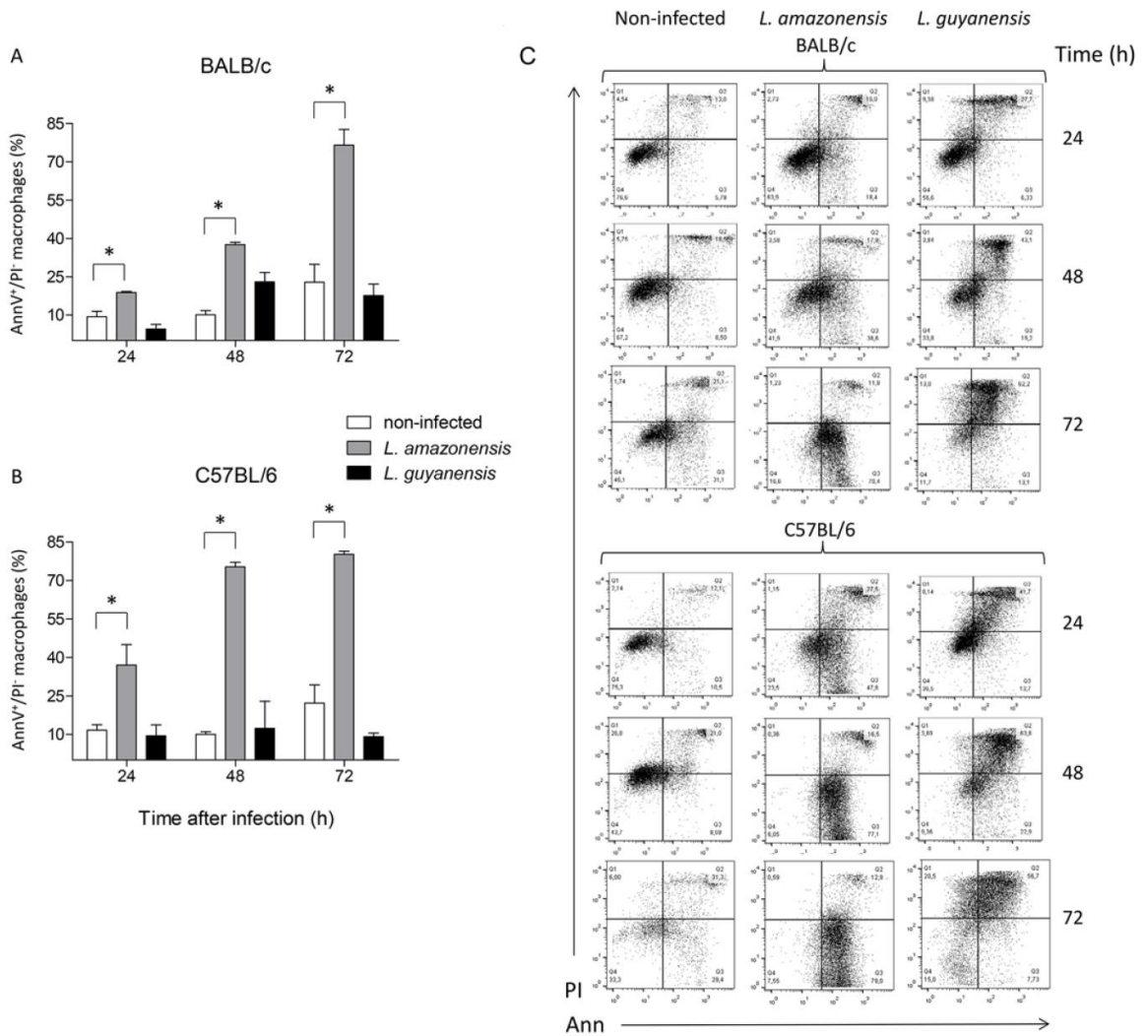


Fig 4. Exposure of PS by macrophages after *in vitro* infection with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice infected or not with *L. amazonensis* or *L. guyanensis* were labeled with AnnV-FITC and counterstained with PI. Analysis was carried out by flow cytometry and only initial moments of apoptosis (AnnV⁺/PI⁺) were considered at the indicated time points. Bars represent mean ± SE of two or three (depending on the time point) independent experiments. Statistically significant differences between the two groups indicated, at a *P* < 0.05, are represented by (*). A typical experiment is shown in dot plots after macrophage gating and analysis by FlowJo (C). Gating strategy is shown in S1A Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g004

hypodiploid macrophage nuclei of BALB/c (Fig 5A) and C57BL/6 (Fig 5B) mice after infection with each species of *Leishmania*. Corroborating the previous results, we could observe that *L. guyanensis* induces a very small loss of DNA content, whereas *L. amazonensis* induces a substantial DNA loss in both strains of mice, indicating that *L. amazonensis*-infected cells are indeed undergoing apoptosis. Typical histograms are shown in Fig 5C. To confirm that classic

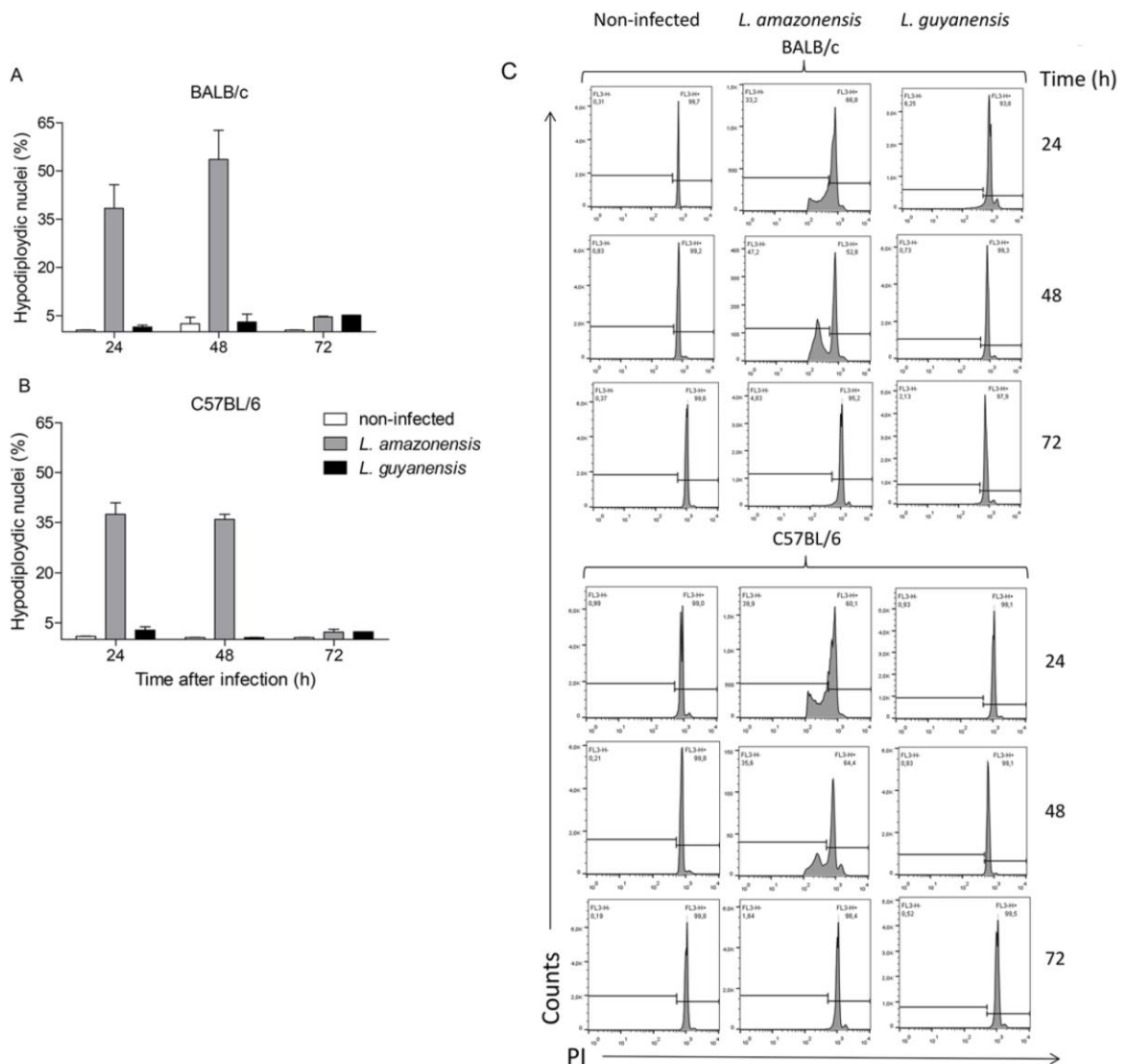


Fig 5. Loss of nuclear DNA by macrophages after *in vitro* infection with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (A) or C57BL/6 (B) mice infected or not with *L. amazonensis* or *L. guyanensis*. After the indicated time points cells were lysed with hypotonic lysis buffer containing PI and nuclei were analyzed by flow cytometry. Bars represent mean \pm SD of three independent experiments. A typical experiment is shown in histograms after macrophage nuclei gating and analysis by FlowJo. Gating strategy of cell nuclei is shown in S1B and S1C Fig.

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g005

apoptosis was taking place, we carried out agarose gel electrophoresis to investigate how loss of DNA was occurring.

In accordance with the preceding results, we could observe the typical DNA cleavage into nucleosomal size fragments of 180–200 bp, or multiples, in macrophages infected with *L.*

amazonensis in both BALB/c (Fig 6A) and C57BL/6 (Fig 6C). *L. guyanensis* does not induce DNA fragmentation in host cells from either mice strains (Fig 5B and 5D). *L. amazonensis*-induced DNA fragmentation can be observed as early as 6h after infection, as seen in BALB/c macrophages (Fig 6A) and is extended to up to 72h in both strains (Fig 6A and 6C). In fact, preliminary TUNEL assay results show fragmented DNA as early as 30min after parasite-host cell interaction (data not shown).

Caspases-3, -8 and -9 are activated in *L. amazonensis*-infected apoptotic cells

The DNA fragmentation observed in *L. amazonensis*-infected macrophages suggested that CAD (caspase-activated DNase) was activated by caspase-3. To verify whether caspase-3 was activated, protein extracts of *L. amazonensis*-infected macrophages from both BALB/c and C57BL/6 were analyzed by Western blot, using an anti-caspase-3 antibody, which detects endogenous levels of full-length pro-caspase-3 (35 kDa) and large fragments (17 and 19 kDa) of active caspase-3 resulting from cleavage at aspartic acid 175 (Fig 7A). Caspase-3 activation is clear in infected macrophages, as observed by the appearance of the fragments of the expected size that reacted with the specific antibody. Visualization (Fig 7A) and quantification (Fig 7B) of the bands showed that activation occurs at as early as 4h and remains activated for at least 18 or 24h post-infection in BALB/c and C57BL/6 macrophages, respectively. We also measured the activation of the upstream caspases-8 (Fig 7C) and -9 (Fig 7D) and observed that both are also activated in *L. amazonensis*-infected macrophages. We did not observe activation of caspases 8 and 9 up to 8h of infection. For the periods evaluated, activation peaks at 18 or 14–18h post-infection for caspase-8 and caspase-9, respectively. Infection-induced caspase-8 activation also occurred with strain BA199 of *L. amazonensis*, but was absent with strain M1176 of *L. guyanensis*, corroborating the idea that induction or non-induction of apoptosis are features associated with the species (S2 Fig).

Discussion

Despite the amount of data on host cell-*Leishmania* interactions, the fate of infected macrophages persists as a poorly explained event, and how amastigotes spread to healthy macrophages, amplifying the infection, is still not fully understood. Transfer of amastigotes from infected to healthy cells could occur through 1) release of parasites due to cell death with rupture, 2) phagocytosis of apoptosis-dying infected cells by healthy cells without cell rupture, 3) exocytosis or extrusion of parasites inside membranous host cells structures without cell death, and/or 4) extrusion of parasites from dying cells.

Cell death/rupture passively caused by amastigote overpopulation has been the customary assumption for release of parasites [24–27]. Lately, we have proposed that a parasite-derived pore-forming cytolysin may actively damage macrophage membranes [29, 30]. It has also been proposed that cells release amastigotes through exocytosis without bursting [28]. These assumptions, however, remain to be confirmed. On the other hand, phagocytosis of *L. major*-infected apoptotic neutrophils by macrophages was proposed [32] and demonstrated [33] by Laskay's group. Dubbed as the Trojan horse strategy, it is also used by *L. donovani* [39]. Macrophage-macrophage phagocytosis of infected cells had not been verified so far. Recently, however, it has been shown by live cell imaging that *L. amazonensis* amastigotes can be transferred from infected to healthy macrophages by extrusion of LAMP-rich structures containing the parasite [34]. This process was observed only after 15 days of infection *in vitro*, suggesting that it is triggered by dying host cells. In fact, although apoptosis had not been demonstrated in

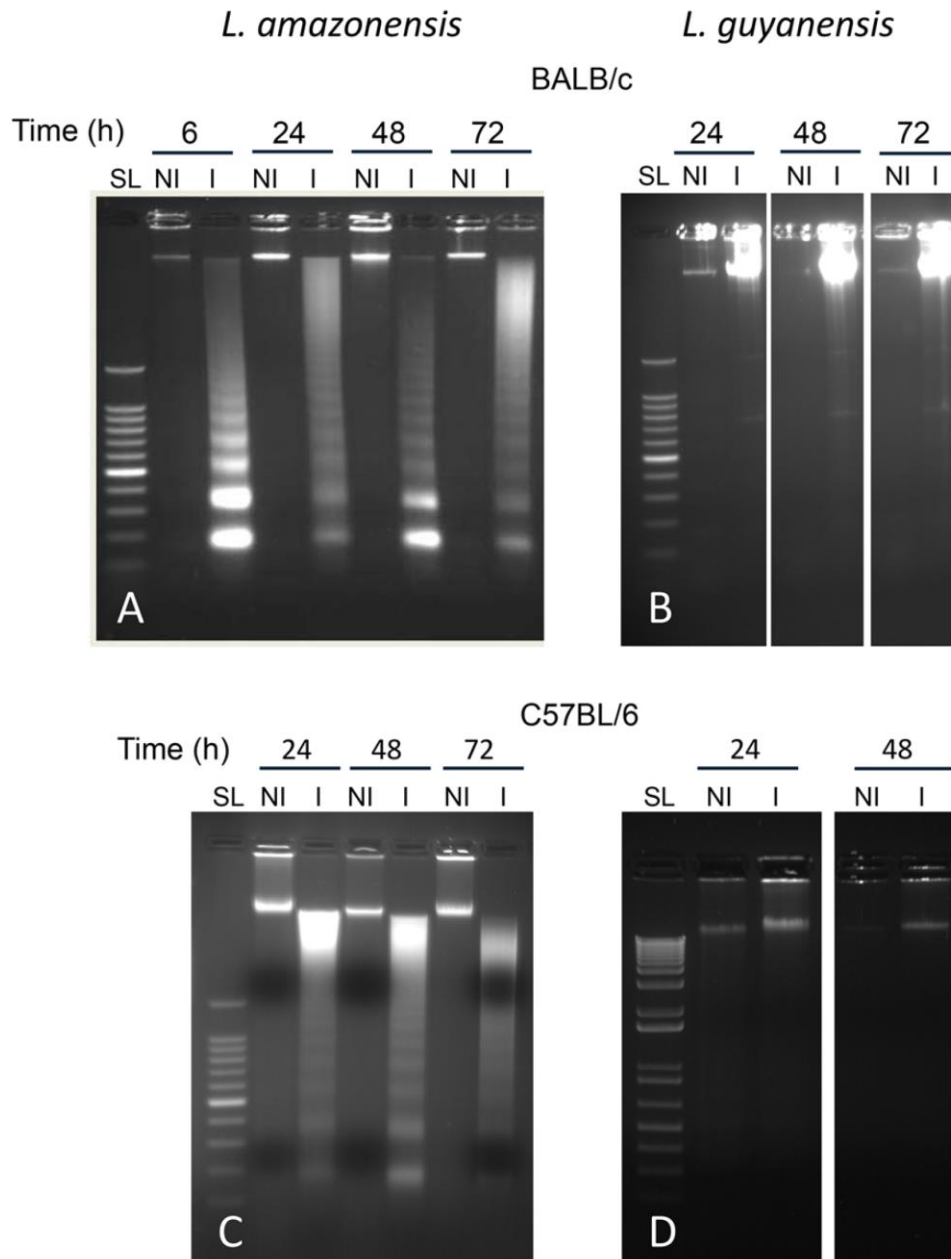


Fig 6. Macrophage DNA fragmentation pattern after *in vitro* infection with *L. amazonensis* or *L. guyanensis* as shown by agarose gel electrophoresis. Peritoneal macrophages of BALB/c (A and B) or C57BL/6 mice (C and D) were infected or not with *L. amazonensis* (A and C) or *L. guyanensis* (B and D). DNA was extracted after the indicated time points and submitted to electrophoresis on agarose gel at 1.8%. SL—Step Ladder of 100 bp; NI—non-infected; I—infected.

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g006

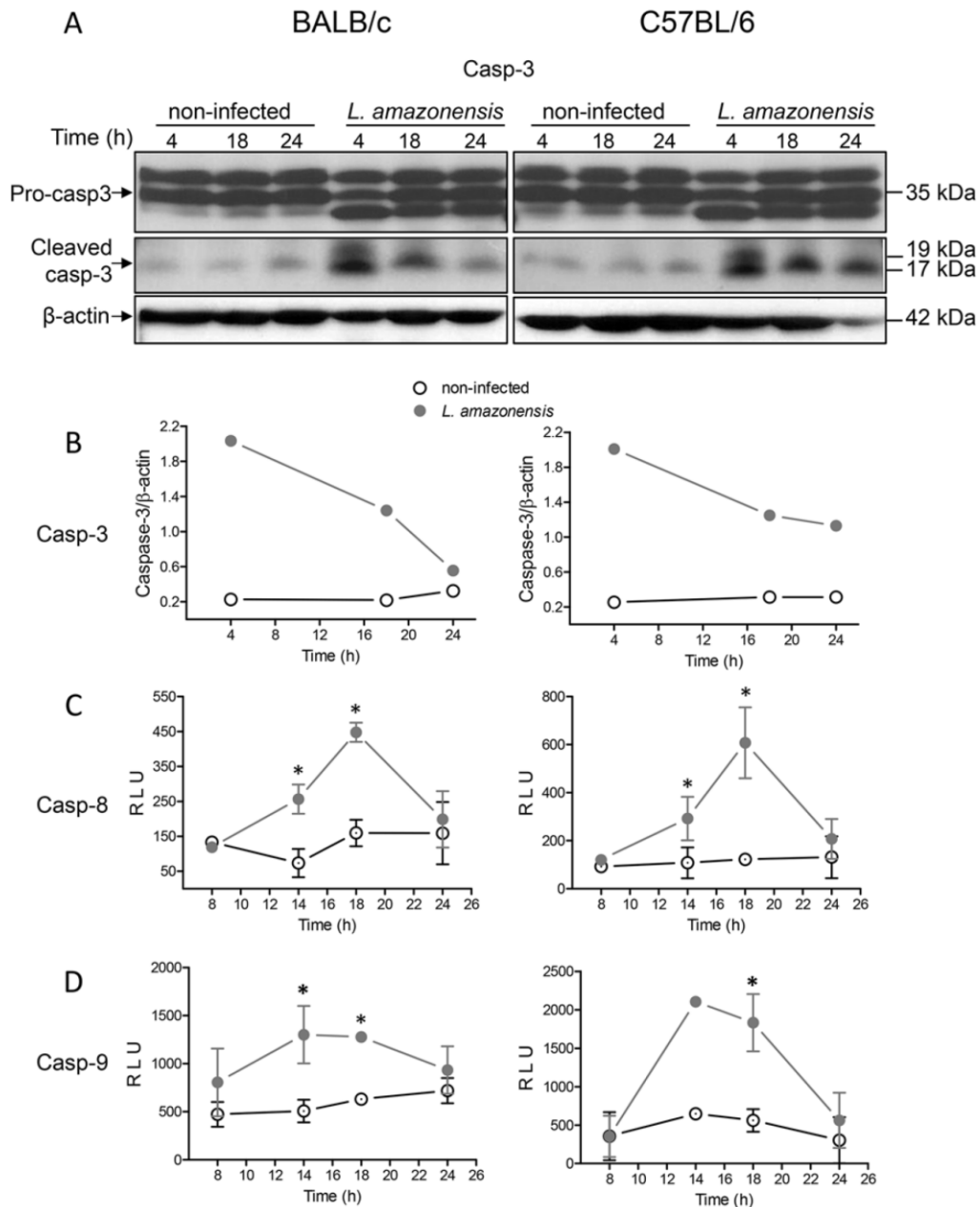


Fig 7. Caspase-3, -8 and -9 activation in macrophages after *in vitro* infection with *L. amazonensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (left panel) or C57BL/6 mice (right panel) were infected or not (NI) with *L. amazonensis*. After the indicated time points cell lysates were analysed for caspase activation. Caspase-3 activation was analyzed by Western blot (A) and quantified by densitometry using β -actin and the band above pro-caspase-3 as a load control (B). Caspase-8 and caspase-9 activation was analyzed by CaspaseGlo8 (C) or CaspaseGlo9 (D), both detected by luminescence. For caspases 8 and 9, values represent relative light units (RLU) \pm SE from two, three or four (depending on the time point) independent experiments, except for time 14h for

caspase-9 in C57BL/6 macrophages a value obtained from one experiment. Statistically significant differences between the two groups indicated, at a $P < 0.05$, are represented by (*).

doi:10.1371/journal.pone.0141196.g007

host cells, some apoptotic-like features, such as the extrusion of parasites trapped within zeiotic structures and the increase of anti-apoptotic genes, were shown [34].

Here, we present evidence that *L. amazonensis*, but not *L. guyanensis*, induces classic apoptosis in infected macrophages from both BALB/c and C57BL/6 mice, evidence suggestive that macrophages phagocytize *L. amazonensis*-infected cells, which had not been verified so far, and propose that apoptosis causes a macrophage-macrophage phagocytosis, accelerating spreading of amastigotes and contributing to more pathogenic outcomes. Apoptotic signs included PS exposure (Fig 4) and loss of DNA (Fig 5), cleaved into nucleosome-sized fragments (Fig 6). DNA fragmentation could be observed as early as 6 h (or even earlier) being present during the whole period analyzed (Fig 6). Although cells exposing PS were observed 1 day post infection, their number increasing with time (Fig 4), it probably started much earlier since PS exposure is an earlier step in apoptosis than DNA degradation. It was puzzling that, after high levels of DNA degradation up to 48 h (Figs 6 and 4), hypodiploid cells were almost absent at 72 h (Fig 5) even though PS exposure could still be observed (Fig 4). One explanation for this apparent contradiction is that at 72 h, as nuclei are mostly degraded, fewer hypodiploid nuclei are size-gated and small apoptotic bodies are excluded (Fig 2). As PS exposure is measured in whole cells, size-gating might not exclude positive fragments of cells (membrane-surrounded apoptotic bodies). In fact, apoptotic bodies, free or surrounded by membrane, could be observed at the microscope (Fig 2). Supporting this is the fact that we still see DNA fragmentation at 72 h (Fig 6). *L. guyanensis*-infected cells seem to die through necrosis, as evidenced by the high number of PI-permeable cells (Fig 3) and observation of ruptured cells without nuclear lesion (Fig 2).

Although *L. amazonensis*-infected cells were dying through apoptosis, we only observed a small loss of host cell membrane integrity at 24h of infection (Fig 2). At 48 or 72h, the percentage of PI-permeable cells was actually lower than that of the non-infected cells (Fig 3). These results suggested that cells were probably phagocytized by other macrophages before loss of membrane integrity. Indeed, apoptotic nuclei were often observed inside macrophages (Fig 2), demonstrating that macrophage-macrophage phagocytosis actually occurs. This contrasted with *L. guyanensis*-infected cells, which had not exposed PS on their outer membrane (Fig 4) and almost all infected cells had lost their membrane integrity at 72 h (Fig 3). Moreover, we did not observe apoptotic nuclei inside macrophages in *L. guyanensis* infections (Fig 2). These results also support the idea that macrophage-macrophage phagocytosis occurs only in PS-exposing infected host cells. Our results showing apoptosis in *L. amazonensis*-infected macrophages are in accordance with Probst et al. (2012) [40], who showed that many genes involved in apoptosis are up-regulated in host cell in response to *L. amazonensis* infection.

The uptake of infected PS-exposing cells by healthy macrophages could be one reason why *L. amazonensis*-infected macrophages maintain the *in vitro* infection for up to 96h, while *L. guyanensis*-infected cells decrease the degree of infection and actually kill amastigotes inside the cells [10] (and Fig 2). This mechanism had already been suggested by Getti et al. (2008) [41], who showed that *in vitro* infection with *L. aethiops*, *L. tropica* and *L. major* induces apoptosis in human macrophages, as shown by exposure of PS, mitochondrial permeabilization and caspase activation. Apoptosis has also been described *in vitro* in mouse macrophages [42] and *in vivo* in dog macrophages [43] and mice (de Castro W and Vieira, LQ—personal communication) infected with *L. chagasi* (= *L. infantum*). All species of *Leishmania*, from both New (*L. amazonensis*, *L. chagasi*) and Old World (*L. aethiops*, *L. tropica* and *L. major*),

shown to cause apoptosis in host cells belong to the subgenus *Leishmania*, whereas *L. guyanensis*, which does not cause apoptosis in host cells, belongs to the subgenus *Viannia*. We showed here that, like the strains of the *Leishmania* species used throughout this study, the strain BA199 of *L. amazonensis* also activates caspase-8 whereas the strain M1176 of *L. guyanensis* does not, suggesting that these features are species specific. It is worth mentioning that the *L. guyanensis* strain used in this work contains the *Leishmania RNA virus-1* [44] and a possibility exists that it may have a role in the induction of macrophage necrosis. Other species of the subgenus *Leishmania* and *Viannia* should be investigated in their capacity to induce apoptosis to verify whether this ability is a subgenus-specific feature. Another reason why macrophages infected with *L. amazonensis*, but not *L. guyanensis*, maintain infection could be the uptake by healthy cells of *L. amazonensis*-containing macrophage extrusions, as demonstrated by Real et al. (2014) [34]. Our results also corroborate their findings on the increase of the anti-apoptotic genes Bcl-2 and IGF-1 in *L. amazonensis*-infected macrophages and strengthen their assumption of the importance of macrophage apoptosis for parasite spreading. Indeed, Getti et al. (2008) [41] showed that macrophage apoptosis intensifies *Leishmania* infection.

It is curious that the speed of PS exposure in *L. amazonensis*-infected macrophages is higher in C57BL/6 than in BALB/c (Fig 4), which seems opposed to the reasoning that apoptosis contributes to more pathogenic outcomes. However, other signs of apoptosis do not considerably differ and, in 72h, PS exposure is already comparable (Figs 4–6). It is thus possible that the kinetics of PS appearance *in vivo* is not a preponderant factor and one-day delay does not affect the degree of susceptibility. One might also think that early inflammation may contribute to more resistant phenotypes. Besides, other factors, such as the later T cell response, widely known to be a key component to the infection outcome, must act to confer resistance or susceptibility. Our hypothesis is that early apoptosis/necrosis could intensify/hinder parasite spreading.

The assumption that CAD had been activated by caspase-3, as suggested by the typical nucleosome-sized DNA fragmentation in *L. amazonensis*-infected macrophages (Fig 6), was indeed confirmed in both BALB/c and C57BL/6 mice (Fig 7A and 7B). Activation of caspase-3 can be achieved by either caspase-8 or -9 [45], both of which had also been activated in *L. amazonensis*-infected macrophages from both strains of mice (Fig 7C and 7D). It is known that caspase-8 can be activated by stimulation of TLR3 or TLR4 [46] and that caspase-9 can be activated by caspase-8 [47, 48]. Since *Leishmania* proteoglycolipids [49] and glycoinositol phospholipids [50] are stimulators of macrophage TLR4, and that *L. mexicana* activates macrophages via TLR4 [51], it is reasonable to hypothesize that a TLR4/caspase-8/caspase-9 pathway takes place in *L. amazonensis*-induced macrophage apoptosis. We can rule out that phagocytosis is sufficient to induce apoptosis, since macrophages that have phagocytized *L. guyanensis* or heat-killed *L. amazonensis* (preliminary results) do not undergo apoptosis.

Activation of caspase-3 and DNA fragmentation are observed in 4 and 6h after infection, respectively, but it is probable that active caspase-3, and fragmented DNA, appears earlier. Indicative of this is the fact that an already large amount of active caspase-3 (Fig 7A) and fragmented DNA (Fig 6A) is observed at the first points measured. Moreover, preliminary TUNEL assay results have revealed a small percentage of cells with DNA fragmented in 30min (data not shown). The kinetics of caspase-3 activation and of DNA fragmentation and loss are consistent, but we could not observe activation of caspase-8 and -9 before 8h of infection (Fig 7C and 7D). Although the canonic hierarchy of caspase activation is caspase-8/9 activating caspase-3, it has been recently shown that caspase-3 feeds back on caspase-8 by cleaving p43 form into active p18 species [52]. It is thus possible that initial activation of caspase-3 requires small amounts of active caspase-8, undetected by luminescence, which become measurable after

feedback activation by caspase-3. It is also possible that the sensitivity of the caspases-8/9 detection kits is lower than that of Western blotting.

Apoptosis is an event commonly present in modulation of inflammation, and can be involved in lesion progression/regression or in mechanisms of susceptibility/resistance in many infections. Previous studies have shown that apoptotic promastigotes of both *L. major* [53] and *L. amazonensis* [54] induces TGF- β [53, 54] and IL-10 expression [55], which facilitate leishmanial growth [53, 56, 57]. Likewise, it has been shown that phagocytosis of apoptotic neutrophils by *L. major*-infected BALB/c mice [58] or *L. amazonensis*-infected human [59] macrophages leads to an increase in parasite burden. *In vivo*, apoptotic neutrophils amplified *L. major* replication in BALB/c [58]. However, depending on the environment where infection takes place, engulfment of apoptotic cells can also be pro-inflammatory. In *L. major* infection of resistant C57BL/6 mice, apoptotic neutrophils help kill intracellular parasites by macrophages *in vitro* and prevented parasite growth *in vivo* [58]. It is possible that *L. amazonensis*-infected macrophages have a similar effect and, ultimately, also contribute to the outcome of infection. On the other hand, uptake of necrotic neutrophils by *L. amazonensis*-infected human cells induces killing of parasites [59], which is dependent on neutrophil elastase and TNF- α and mediated by reactive oxygen species. This is also in consonance with the present study, in which *L. guyanensis*, whose infection is controlled (Fig 1), induces necrosis in macrophages, as well as with our previous studies showing that *L. guyanensis* is eliminated by BALB macrophage reactive oxygen species, also through apoptosis [10]. It is possible that uptake of necrotic macrophages causes the same effect as of necrotic neutrophils.

Along the line of inflammation, because caspase-8 activated by stimulation of TLR3 or TLR4 mediates the processing of pro-IL-1 β [46], it is also tempting to speculate that a TLR4/caspase-8/IL-1 β pathway is activated during infection, activating caspase-3 and releasing IL-1 β , which, although can produce acute inflammation, can also contribute to the non-resolution of inflammation [60]. Conceivably, this could also be one reason why *L. guyanensis*, which seems to induce macrophage necrosis, an inflammation-inducing event, does not cause disease in BALB/c or C57BL/6 mice, and causes in humans a more restrained illness than *L. amazonensis*.

While *L. amazonensis*, which induces apoptosis in BALB/c and C57BL/6 mice, causes disease (Fig 1A) and a persistent *in vitro* macrophage infection in both strains (Fig 1C and 1D), *L. guyanensis*, which does not induce apoptosis, is basically harmless to both strains (Fig 1B) and *in vitro* macrophage infection is reduced (Fig 1E and 1F). Moreover, considering that PS exposing-macrophages cause the same effect as apoptotic neutrophils [32, 33, 58, 59] or promastigotes [53, 54], in BALB/c or C57BL/6, it can be expected that the different outcomes in BALB/c and C57BL/6 (Fig 1A) may also be influenced by *L. amazonensis*-induced macrophage apoptosis. These correlations reinforce the current thought that apoptosis interferes with the outcome of the infection and depends on the environment where the infection takes place.

Supporting Information

S1 Fig. Gating strategy for flow cytometry. Macrophage population was gated by size (FSC) versus granularity (SSC) (A), previously defined with anti-CD11b specific antibody (not shown). Macrophage nuclei population was first gated by size (FSC) versus granularity (SSC) (B), excluding parasite nuclei. The gate excluding smaller events was chosen after running controls with only parasites nuclei. Size gate was further gated to eliminate very low PI fluorescence (G2) (C). These strategies were used in experiments described in Figs 2, 3 and 4. (TIF)

S2 Fig. Caspase-3, -8 and -9 activation in macrophages after *in vitro* infection with 2 strains of *L. amazonensis* and *L. guyanensis*. Peritoneal macrophages of BALB/c (left panel) or

C57BL/6 mice (right panel) were infected or not (NI) with two strains of *L. amazonensis* (PH8 and BA199). After the indicated time points cell lysates were analysed for caspase-8 activation using CaspaseGlo8 detected by luminescence. Values represent mean fold increase in caspase-8 activation, as compared with uninfected controls, measured in relative light units from 2 (depending on the time point) independent experiments, except for strain M1176 of *L. guyanensis*, a preliminary result obtained from one experiment.

(TIF)

Acknowledgments

We thank Elimar Faria for his valuable technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPD MFH. Performed the experiments: JPD BPM KML CASM. Analyzed the data: JPD BPM KML LPS WOD MFH. Contributed reagents/materials/analysis tools: LPS WOD MFH. Wrote the paper: JPD MFH. Reviewed and helped improve the manuscript writing: LPS WOD.

References

1. World Health Organization. Leishmaniasis: the disease and its epidemiology. 2014. Available: http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en. Accessed January 2015.
2. Kedzierski L, Evans KJ. Immune response during cutaneous and visceral leishmaniasis. 2014. Parasitology 30: 1–19.
3. World Health Organization. Global Alert and Response. 2014. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/CSR_ISR_2000_1leish/en/. Accessed January 2015.
4. Gontijo B, de Carvalho ML. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36:71–80. PMID: [12715066](#)
5. Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolillo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. Vet Parasitol 2004; 121: 179–187. PMID: [15135858](#)
6. Silveira FT, Lainson R, de Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol 2009; 31: 423–431. doi: [10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x](#) PMID: [19646206](#)
7. Dedet J-P. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. Am J Trop. Med Hyg 1990; 43: 25–28. PMID: [2200289](#)
8. Romero AS, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. Clin Infect Dis 2001; 32:1304–12 PMID: [11303265](#)
9. McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? Immunol Rev 2004; 201: 206–224. PMID: [15361243](#)
10. Sousa-Franco J, Araujo-Mendes E, Silva-Jardim I, Lima-Santos J, Faria DR, Dutra WO et al. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. Microb Infect 2006; 8: 390–400.
11. Soong L, Chang C-H, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH, Flavell RA et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 1997; 158: 5374–5383. PMID: [9164958](#)
12. Soong L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. 2012 Front Immunol 3:58
13. 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: 338–345. PMID: [12164286](#)
14. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+ Cd25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. J Immunol 2005; 174: 7147–7153. PMID: [15905558](#)

15. Ives A, Masina S, Castiglioni P, Prével F, Revaz-Breton M, Hartley M et al. MyD88 and TLR9 dependent immune responses mediate resistance to *Leishmania guyanensis* infections, irrespective of *Leishmania* RNA virus burden. PLoS ONE 2014; 9: e96766. doi: [10.1371/journal.pone.0096766](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096766) PMID: [24801628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24801628/)
16. Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Unresponsiveness of specific T cells to IL-12 is associated with active cutaneous leishmaniasis owing to *Leishmania guyanensis*. Scand J Immunol 2001; 54: 335–339. PMID: [11555399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11555399/)
17. Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E et al. Intralosomal regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. Infect Immun 2009; 77: 1465–1474. doi: [10.1128/IAI.01398-08](https://doi.org/10.1128/IAI.01398-08) PMID: [19168733](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168733/)
18. Bourreau E, Prévot G, Pradinaud R, Launois P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. J Infect Dis 2001; 183: 953–959.
19. Bourreau E, Ronet C, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. Microbes Infect 2007; 9: 1034–1041. PMID: [17544800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17544800/)
20. Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sandflies: parasite-vector interaction overview. Parasit Vect 2012; 5:276
21. Bañuls AL, Hide M, Prugnotte F. *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Adv Parasitol 2007; 64:1–109. PMID: [17499100](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17499100/)
22. WHO Expert Committee: Control of the Leishmaniases. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2010.
23. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host/pathogen interface. Nat Rev Microbiol 2011; 9: 604–615. doi: [10.1038/nrmicro2608](https://doi.org/10.1038/nrmicro2608) PMID: [21747391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21747391/)
24. Bray RS, Alexander J. *Leishmania* and the macrophage. In: Peters W, Killick-Kendrich R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. Biology and epidemiology, vol. 1. London: Academic Press, 1987:211–33.
25. Wilson ME, Pearson RD. Immunology of leishmaniasis. In: Wyler DJ, editor. Modern parasite biology. New York: Freeman, 1990; 200–221.
26. Liew FY, O'Donnel CA. Immunology of leishmaniasis. Adv Parasitol 1993; 32:161–259. PMID: [8237615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8237615/)
27. Handman E. Cell biology of *Leishmania*. Adv Parasitol 1999; 44:1–39. PMID: [10563394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10563394/)
28. Rittig MG, Bogdan C. *Leishmania*-host cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today 2000; 6: 292–297.
29. Noronha FS, Cruz JS, Beirão PS, Horta MF. Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane. Infect Immun 2000; 68:4578–4584. PMID: [10899858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10899858/)
30. Almeida-Campos FR, Noronha FSM, Horta MF. The multitasking pore-forming proteins of intracellular pathogens. Microb Infect 2002; 4: 741–750.
31. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes—Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? Trends Microbiol 2003; 11: 210–214. PMID: [12781523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12781523/)
32. Aga E, Katschinsk DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Müller K et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. J Immunol 2002; 169: 898–905. PMID: [12097394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12097394/)
33. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol 2004; 173: 6521–6525. PMID: [15557140](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15557140/)
34. Real F, Florentino PT, Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Veras PS, Goto H et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. Cell Microbiol 2014; 16: 1549–1564. doi: [10.1111/cmi.12311](https://doi.org/10.1111/cmi.12311) PMID: [24824158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24824158/)
35. Santos JL, Andrade AA, Dias AAM, Bonjardim CA, Reis LF, Teixeira SMR et al. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to IFN- γ /LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. J Interferon Cytokine Res 2006; 26: 682–688. PMID: [16978073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16978073/)
36. Catelas I, Petit A, Vali H, Fragiskatos C, Meilleur R, Zukor DJ et al. Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions *in vitro*. Biomaterials 2005; 26: 2441–2453 PMID: [15585247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15585247/)

37. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; 1: 1458–1461. PMID: [17406435](#)
38. Sousa LP, Silva BM, Brasil BS, Nogueira SV, Ferreira PC, Kroon EG et al. Plasminogen/plasmin regulates alpha-enolase expression through the MEK/ERK pathway. *Biochem Biophys Res Comm* 2005; 337: 1065–1071. PMID: [16225843](#)
39. Gueirard P, Laplante A, Rondeau C, Milon G, Desjardins M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enable the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol* 2008; 10: 100–111. PMID: [17651446](#)
40. Probst CM, Silva RA, Menezes JPB, Almeida TF, Gomes IN, Dallabona AC et al. A comparison of two distinct murine macrophage gene expression profiles in response to *Leishmania amazonensis* infection. *BMC Microbiology* 2012; 12:22. doi: [10.1186/1471-2180-12-22](#) PMID: [22321871](#)
41. Getti GT, Cheke RA, Rumber DP. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for *Leishmania* parasites? *Parasitology* 2008 135: 1391–1399. doi: [10.1017/S0031182008004915](#) PMID: [18775094](#)
42. Deschacht M, Van Assche T, Hendrickx S, Bult H, Maes L, Cos P. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. *Parasitology* 2012; 139: 1429–1437. doi: [10.1017/S003118201200073X](#) PMID: [22776404](#)
43. Verçosa BL, Melo MN, Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. *Vet Parasitol* 2012; 189: 162–170. doi: [10.1016/j.vetpar.2012.04.035](#) PMID: [22694833](#)
44. Widmer G, Comeau AM, Furlong DB, Wirth DF, Patterson JL. Characterization of a RNA virus from the parasite *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; 86: 5979–5982. PMID: [2762308](#)
45. Cullen SP, Martin SJ. Caspase activated pathways: some recent progress. *Cell Death Differ* 2009; 16: 935–938. doi: [10.1038/cdd.2009.59](#) PMID: [19528949](#)
46. Maelfait J, Vercammen E, Janssens S, Schotte P, Haegman M, Magez S et al. Stimulation of Toll-like receptor 3 and 4 induces interleukin-1 beta maturation by caspase-8. *J Exp Med* 2008; 205: 1967–1973. doi: [10.1084/jem.20071632](#) PMID: [18725521](#)
47. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 308–317. PMID: [16557262](#)
48. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231–241. PMID: [18073771](#)
49. Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. *PLoS Neg Trop Dis* 2012; 6: e1543.
50. Ibraim IC, Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors* 2013; 6: 54. doi: [10.1186/1756-3305-6-54](#) PMID: [23497381](#)
51. Muhannad S, McGachy HA, Schroeder J, Neamatallah T, Bryant CE, Millington O et al. *Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression. *Mol Immunol* 2011; 48: 1800–1808. doi: [10.1016/j.molimm.2011.05.013](#) PMID: [21664694](#)
52. Ferreira KS, Kreutz C, Macnelly S, Neubert K, Haber A, Bogoy M et al. Caspase-3 feeds back on caspase-8, Bid and XIAP in type I Fas signaling in primary mouse hepatocytes. *Apoptosis* 2012; 17: 503–515. doi: [10.1007/s10495-011-0691-0](#) PMID: [22246639](#)
53. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13837–13842. PMID: [16945916](#)
54. Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. *PLoS One* 2009; 4: e5733 doi: [10.1371/journal.pone.0005733](#) PMID: [19478944](#)
55. de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 2001; 11: 1870–1873. PMID: [11728310](#)
56. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992; 257: 545–548. PMID: [1636092](#)
57. Chatelain R, Mauze S, Coffman RL. Experimental *Leishmania major* infection in mice: role of IL-10. *Parasite Immunol* 1999; 21: 211–218. PMID: [10320618](#)

58. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MC, Cysne-Finkesltein L, Arnholdt AC et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2004; 172: 4454–4462. PMID: [15034061](#)
59. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, Dos Reis GA, Dutra AN et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 389–396. doi: [10.1189/jlb.0108018](#) PMID: [18483206](#)
60. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol* 2011; 41:1203–1217. doi: [10.1002/eji.201141550](#) PMID: [21523780](#)

Figure S1

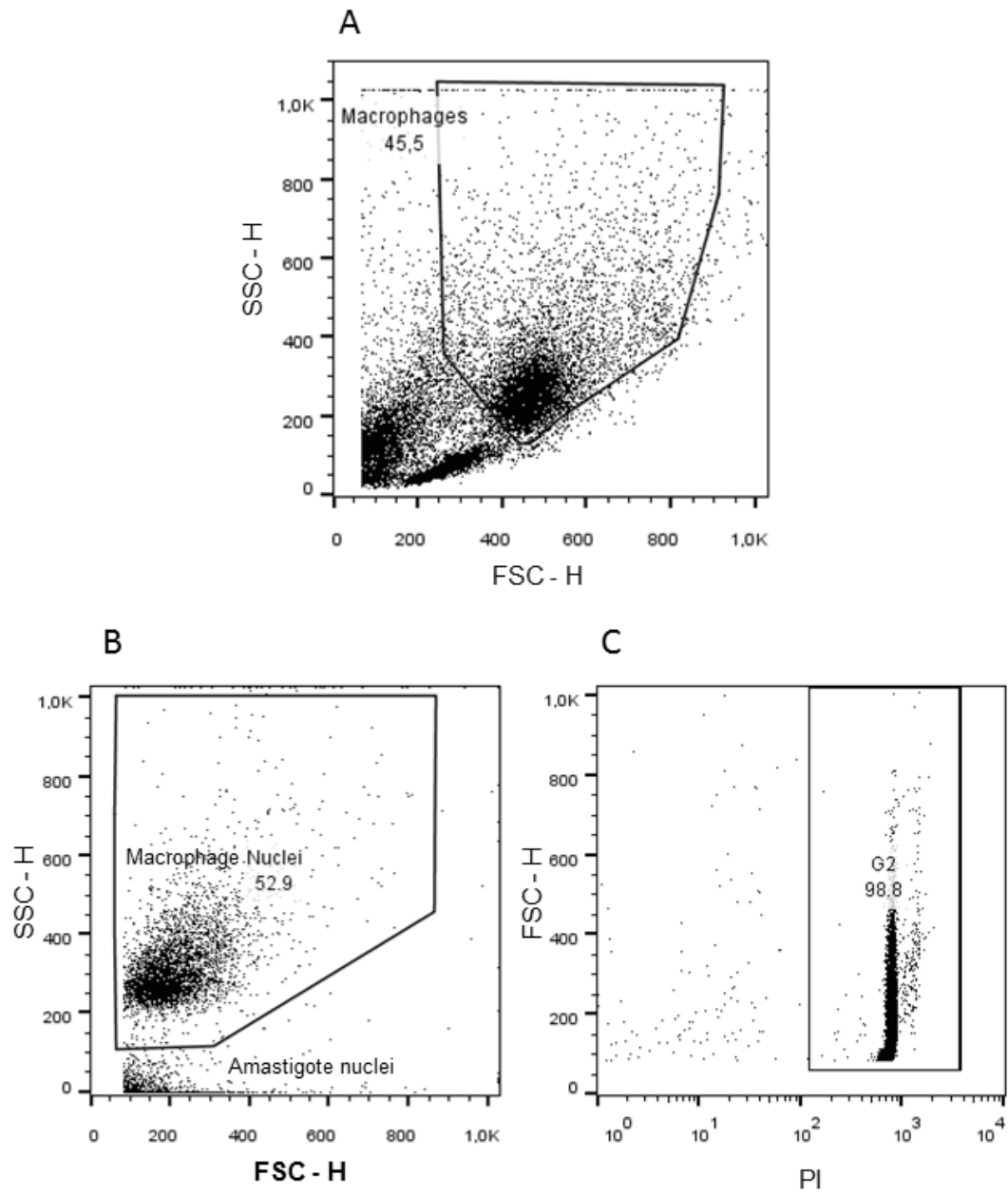


Figure S2

