

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Indução de Apoptose em Macrófagos de
Camundongos BALB/c pela Infecção *in vitro*
com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Jarina Pena Da Mata

Belo Horizonte, Minas Gerais

2007

Jarina Pena Da Mata

Indução de Apoptose em Macrófagos de
Camundongos BALB/c pela Infecção *in vitro*
com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ORIENTAÇÃO:
PROF.^A. DR.^A. MARIA DE FÁTIMA HORTA

BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS
FEVEREIRO, 2007

Este trabalho recebeu apoio financeiro das seguintes entidades:
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq)

À minha família, biológica ou não.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	VIII
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
INTRODUÇÃO.....	15
1- Leishmaniose e suas formas.....	15
2- O ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	17
3- <i>Leishmania</i> e a resposta do hospedeiro.....	19
4- Apoptose e infecções parasitárias.....	24
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1- Parasitas.....	33
2- Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	33
3- Criopreservação.....	34
4- Cultivo de parasitas.....	34
5- Preparo de extratos de membrana e citosólico dos parasitas.....	35
6- Animais.....	36
7- Obtenção de macrófagos peritoneais murinos.....	36
8- Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	37
9- Análise da taxa de infecção e multiplicação de parasitas no interior dos macrófagos.....	37

10- Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose.....	38
11- Indução de fragmentação de DNA em <i>L. amazonensis</i>	39
12- Ensaio TUNEL (<i>Tdt-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>).....	40
13- Marcação de macrófagos com α -CD11b e análise em citometria de fluxo.	41
14- Marcação e análise de células com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio.	42
15- Estatística e reprodutibilidade dos resultados	42
RESULTADOS.....	43
1- Taxa de infecção e sobrevivência do parasita.....	43
2- Viabilidade dos macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	45
3- Fragmentação do DNA de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ...	45
3.1- Visualização do DNA fragmentado pela coloração por brometo de etídio em gel de agarose.....	45
3.2- Visualização e quantificação dos macrófagos com o DNA fragmentado pelo método TUNEL.....	51
4- Exposição de fosfatidilserina em macrófagos infectados.....	53
5- Fragmentação de DNA de macrófagos incubados com extratos citosólicos ou de membrana de <i>L. amazonensis</i>	58
DISCUSSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação de Bioquímica e Imunologia, pela oportunidade e aprendizado.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelo espaço de trabalho, convivência e aprendizado constante. Aos Professores, pelos ensinamentos e amadurecimento. Aos funcionários do Departamento. À Celise e Grazielle, obrigada pela paciência apoio.

À minha orientadora, Patiu, pelo voto de confiança desde o primeiro momento. Seu apoio e orientação, que muitas vezes se confundia com uma grande amizade, foi a essência de todo esforço colocado neste trabalho. Sua paciência e compreensão foram imprescindíveis para o meu crescimento profissional e humano. Obrigada por iluminar meu percurso na Ciência, com a complicada tarefa de guia, onde se mostrou uma pessoa presente e com um infindável ânimo, que me fez perceber que sou capaz de tudo e vencer os desafios que ainda encontrarei.

À Professora Dra. Walderez O. Dutra e à Cristiane Menezes por toda a ajuda no FACS. A convivência e aprendizado serão sempre estimados.

Aos Professores Dra. Santuza Teixeira, Dra. Daniela Bartholomeu e Dr. Álvaro C. Nunes pelas idéias e o apoio que me auxiliaram e ensinaram durante todo o percurso.

Aos amigos do Departamento, presentes no dia a dia com ajuda, idéias, dicas miraculosas, momentos de descontração e, com certeza, inesquecíveis.

Ao Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Doenças Parasitárias. Durante todo o meu percurso foi fonte de grandes amizades, amadurecimento e aprendizado. Ao

grande Elimar, amigo que é um alicerce do laboratório, por todo o trabalho em fazer o laboratório funcionar, pela amizade e sorrisos. Aos amigos Thiago, Pati, Pri, Fabiano, Wanderson, Lu W., João, Nat, Carol, Maria Paula e Ramon que facilitaram a rotina laboratorial, com diversão, respeito e companheirismo. À Junia, Vinicio, Dani Marra, Rosiane, Themis, Paula, Camila, Vivi, Diego, Juscélia, Marilene, Luciana B. e todos mais, que por aqui passaram e deixaram sua marca individual no lab e em cada um.

Ao Maurício. Força, amor, fé e franqueza. Com tudo isso e de milhões de outras formas você me ajudou, me ensinou e me fortaleceu em todos os momentos destes anos.

Aos meus amigos, Ana, Rê, Maíra, Fe, Sulz, Bigode, Lumbriga e mais todos aqueles que me ajudaram com compreensão, diversão, jogos do Galo, conversas infindáveis, e muito mais.

À minha família, em especial minha mãe, minha irmã e minha avó. Por tudo e mais.

A todos que me ajudaram neste percurso, nos bons e nos maus momentos, não mencionados, mas não esquecidos.

RESUMO

A apoptose tem sido associada com um papel fundamental no controle ou progressão de diversas doenças, incluindo doenças parasitárias. Assim, foi objetivo deste estudo investigar o tipo de morte celular em macrófagos de camundongos BALB/c infectados *in vitro* por *L. amazonensis*. Nossos resultados demonstraram que macrófagos infectados apresentaram fragmentação de DNA em padrão “escada”, observada em géis de agarose, típica de morte celular programada. Esse resultado foi corroborado pelo método do TUNEL, que também demonstra a fragmentação de DNA, e mostrou que essa fragmentação parece se iniciar já em 3 horas após a infecção. Outra característica marcante da apoptose, a exposição de fosfatidilserina, também foi demonstrada em macrófagos de BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Esta demonstrou ser dependente de tempo de infecção e número de parasitas utilizados. Por esse método, mostramos que uma grande percentagem de células entra em apoptose após a infecção. Além disto, nossos dados demonstraram a necessidade da integridade do parasita para a indução desta morte celular, uma vez que a incubação de macrófagos de BALB/c com extrato de membrana ou citosólico não levou à fragmentação típica em “escada” do DNA. Esta típica fragmentação do DNA também foi observada em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, mas não em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major* ou *L. guyanensis*, sugerindo que a indução de apoptose está associada com a espécie de *Leishmania* infectante. A apoptose, induzida por *L. amazonensis*, pode estar relacionada com mecanismos de evasão da espécie e envolvida na susceptibilidade do hospedeiro.

ABSTRACT

Apoptosis has been associated with a fundamental role on the control or progression of several diseases, including parasitic. Thus, the aim of this work was to investigate the type of cell death of BALB/c mice macrophages infected *in vitro* with *L. amazonensis*. Our results demonstrate that infected macrophages present a DNA fragmentation in a “ladder” pattern, visualized in agarose gels, typical of programmed cell death. This result was corroborated by the TUNEL method, which also demonstrates DNA fragmentation, and that this fragmentation seems to initiate as soon as 3 hours post-infection. Another landmark of apoptosis, the exposure of phosphatidylserine, was also demonstrated in BALB/c macrophages infected with *L. amazonensis*. This exposure showed to be dependent of time of infection and the number of parasites used. By this method we demonstrate a great percentage of cells entering apoptosis after infection. Furthermore, our data show the necessity of parasite integrity for inducing the programmed cell death, once the incubation of BALB/c macrophages with membrane or cytosol extracts did not lead to the typical DNA fragmentation in the “ladder” pattern. This typical DNA fragmentation was also observed in C57BL/6 mice macrophages infected with *L. amazonensis*, although not in BALB/c macrophages infected with *L. major*, nor *L. guyanensis*, suggesting that apoptosis induction is associated with the infecting *Leishmania* species. Apoptosis, induced by *L. amazonensis*, may be related with the species evasion mechanisms, as well as be involved in host susceptibility.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -CD11b: anti-CD11b

AnnV: Anexina V - FITC

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

FITC: *fluorescein isothiocyanate* (fluorescência isotiocianato)

FSC: *foward-angle light scatter*

g/L: grama por litro

gp63: glicoproteína de 63 kD

hs: horas

i.p.: intra peritoneal

IFN- γ : Interferon - gama

IL-4: interleucina-4

LACK: *Leishmania homolog of receptors for activated C kinase* (Homólogo de *Leishmania* para receptores para quinase C ativada)

LPG: *Lipophosphoglycan* (Lipofosfoglicano)

mg: miligrama

MGG: May-Grünwald/Giemsa

μ g: micrograma

μ L: microlitro

μ m: micrômetro

mL: mililitro

MTT: brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

NaNO₂:nitrito de sódio

NK: células *Natural Killer*

NO: *Nitric Oxide* (óxido nítrico)

pb: pares de base

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (salina tamponada com fosfato)

PI: *Propidium Iodide* (Iodeto de propídio)

PS: *Phosphatidylserine* (fosfatidilserina)

RNI: *Reactive nitrogen intermediates* (Reativos intermediários do nitrogênio)

ROI: *reactive oxygen intermediates* (Reativos intermediários do oxigênio)

RPMI: Roswell P Mem. Inst., meio de cultura

SFB: soro fetal bovino

SSC: *side-angle light scatter*

T.E.: Tris-EDTA

TGF-β: *Tumour Growth Factor* - beta (Fator de crescimento transformante - beta)

Th1: linfócito T *helper* (auxiliar) do tipo 1

Th2: linfócito T *helper* (auxiliary) do tipo 2

TNF-α: *Tumour Necrosis Factor* - alfa (Fator de necrose tumoral – alfa)

TUNEL: *TdT- mediated dUTP Nick-End Labeling*

UV: ultravioleta

v/v: volume por volume

V: Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	18
Figura 2 – Resumo dos principais eventos celulares da apoptose.....	27
Figura 3 – Taxa de infecção e multiplicação de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos murinos.....	44
Figura 4 – Mortalidade celular de macrófagos de BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i>	46
Figura 5 – Fragmentação de DNA em macrófagos de BALB/c infectados por <i>L. amazonensis</i>	48
Figura 6 – Fragmentação de DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados por <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> ou <i>L. major</i>	49
Figura 7 – Fragmentação de DNA de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 8 – Quantificação de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> com DNA fragmentado.....	52
Figura 9 – Tamanho e granulosidade de macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com <i>L. amazonensis</i>	55
Figura 10 – Exposição de fosfatidilserina e permeabilidade ao iodeto de propídio de macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com <i>L. amazonensis</i>	56
Figura 11 – Cinética da exposição de fosfatidilserina em macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	57
Figura 12 – Fragmentação de DNA de macrófagos de camundongos BALB/c incubados com extratos de <i>L. amazonensis</i>	59

INTRODUÇÃO

1 - Leishmaniose e suas formas

Leishmania é um gênero de parasitas unicelulares flagelados pertencentes ao reino *Protozoa*, da ordem *Kinetoplastida*, e família *Trypanosomatidae* (NEVES *et al.*, 2000). Os organismos pertencentes a este gênero são causadores da leishmaniose, uma doença endêmica em 88 países de 4 continentes do mundo. Destes, 16 são países desenvolvidos e 72 em desenvolvimento, com o total de 21 países no Novo Mundo. Brasil, Peru, Irã, Afeganistão, Síria e Arábia Saudita são responsáveis por 90% dos casos de leishmaniose descritos no mundo atualmente. Os levantamentos mais recentes apontam cerca de 12 milhões de casos descritos, 57 mil de mortes ao ano, 2 milhões de casos novos anuais, com 350 milhões de pessoas residindo em áreas de risco de infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania* (OMS, 2001).

Já foram identificadas mais de 20 espécies de *Leishmania* causadoras da patologia em humanos, cada espécie causando um espectro distinto de sintomas. Existem quatro principais formas de leishmaniose segundo DESJEUX (1996) e a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2001). Estas diferentes formas de desenvolvimento da doença dependem da espécie do parasita e grau de infecção, do sexo do hospedeiro, da localização primária da infecção, do tipo de resposta celular e da resistência do hospedeiro, além de predisposições genéticas determinadas. Além do mais, não há ainda medidas de controle realmente eficazes contra a leishmaniose, o que gera um grande impacto na saúde pública de diversos países (OMS, 2001; DESJEUX, 1996; ROGERS *et al.*, 2002).

A forma cutânea geralmente produz desde uma única lesão com o potencial de cura, até múltiplas lesões que formam cicatrizes desfigurantes. As principais espécies associadas a esta forma são *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis*, no Novo Mundo e *Leishmania major*, encontrada no Velho Mundo. A forma cutânea difusa é rara e está associada a uma resposta celular antígeno-específico defeituosa. O indivíduo pode apresentar lesões do tipo lepromatosa que não se curam sozinhas e que geralmente retornam após o tratamento com os medicamentos disponíveis atualmente. As principais espécies associadas com esta doença são *L. amazonensis* e *L. aethiopica*, encontradas no Novo Mundo e Velho Mundo, respectivamente (OMS, 2001; DESJEUX, 1996)

A forma mucocutânea produz uma extensa destruição das cavidades oronasal e faríngea, provocando lesões extensas e também desfigurantes. Normalmente encontrada nas Américas, ocorre basicamente em pacientes imunossuprimidos. 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 (OMS, 2001; DESJEUX, 1996).

A quarta e última forma é a visceral, uma das formas mais severas, letal na maioria dos casos não tratados. 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* é responsável por esta forma da doença (OMS, 2001; DESJEUX, 1996).

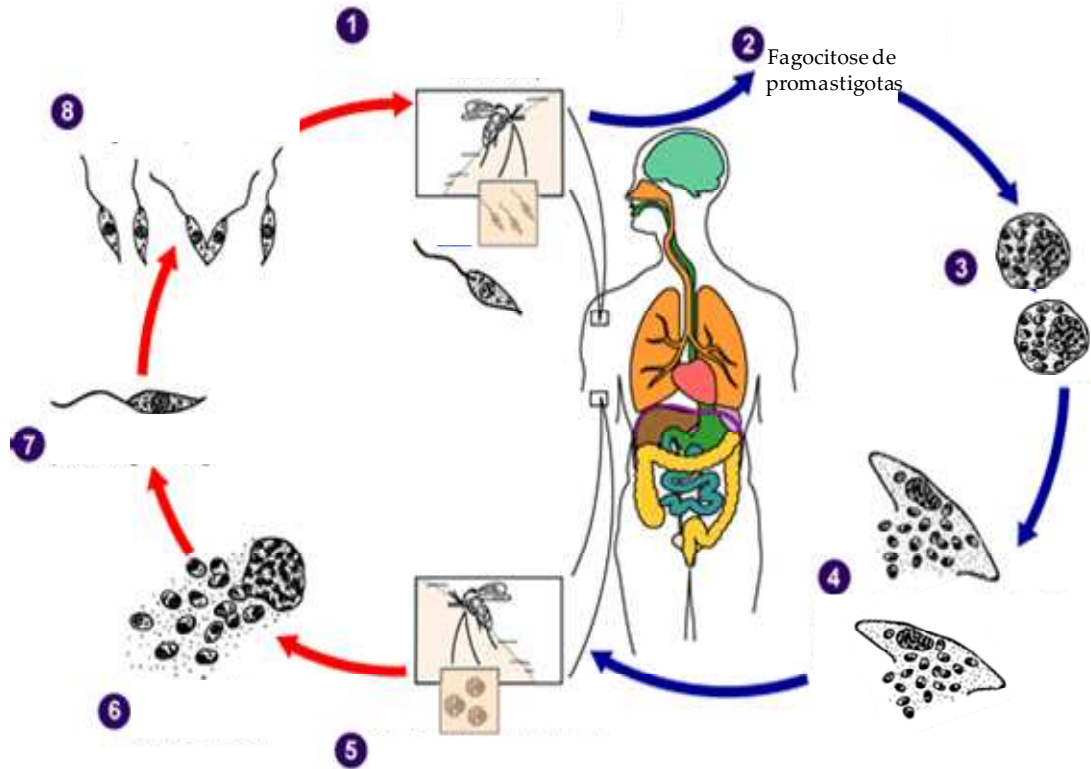
A espécie que é o foco deste trabalho, *Leishmania amazonensis*, além de ser a principal espécie a induzir a forma cutânea difusa nas Américas, também apresenta casos que vão desde uma lesão cutânea simples e única, até a visceralização (BERMAN, 1988 *apud* JI *et al.*, 2002). Essa espécie possui uma ampla distribuição geográfica no Brasil

partindo da região amazônica, e vem se adaptando a florestas secundárias baixas (capoeiras), permitindo que sua distribuição atinja até ao norte do Estado do Paraná. 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 vôo (NEVES *et al.*, 2000).

2 - O ciclo de vida de *Leishmania* spp.

No ciclo de vida heteroxeno de *Leishmania* spp. (**Fig. 1**), o hospedeiro vertebrado é infectado durante o repasto sanguíneo de fêmeas dos insetos vetores pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (Velho Mundo). O vetor inocula promastigotas metacíclicas que possuem flagelo e corpo alongado e são infectantes ao hospedeiro vertebrado (**Fig. 1**). A saliva do inseto vetor aparentemente auxilia na infecção, promovendo vasodilatação, recrutamento de células inflamatórias e produção de IL-10 (NEVES *et al.*, 2000; NORSWORTHY *et al.*, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005).

A aderência de *Leishmania* às células do hospedeiro é auxiliada por moléculas de superfície do parasita como, por exemplo, a gp63. Esta glicoproteína tem a capacidade de clivar a molécula do complemento C3b em iC3b que se liga ao receptor celular Mac-1 (CD18/11b) promovendo uma aderência firme durante a fagocitose (DA SILVA *et al.*, 1989; MOSSER *et al.*, 1992; KANE & MOSSER, 2000). Outra molécula envolvida é o lipofosfoglicano (LPG), altamente glicosilada e com potencial de ligação a vários receptores, inclusive de manose-fucose de macrófagos, implicado na fagocitose de *Leishmania* (BLACKWELL *et al.*, 1985).



Adaptado de: Center of Disease Control – E.U.A.

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Fases do ciclo segundo a numeração acima: 1 - infecção do hospedeiro vertebrado por formas promastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo; 2 - fagocitose de formas promastigotas por macrófagos; 3 - transformação de promastigotas em amastigotas e multiplicação; 4 - rompimento do macrófago e liberação de amastigotas; 5 - ingestão de células infectadas pelo inseto vetor; 6 - lise de células infectadas durante digestão; 7 - transformação de amastigotas em promastigotas; 8 - multiplicação de promastigotas.

A interiorização é passiva, ou seja, é completamente dependente da capacidade fagocítica da célula hospedeira, principalmente o macrófago (HANDMAN & BULLEN, 2002; RITTIG & BOGDAN, 2000; COURRET *et al.* 2002). Após a interiorização pelos macrófagos, ocorre a fusão do lisossomo com o fagossomo, formando o fagolisossomo, ou vacúolo parasitóforo, acarretando na transformação da forma promastigota em amastigota, forma arredondada com um semiflagelo curto e capaz de se desenvolver e multiplicar no interior ácido do vacúolo (COURRET *et al.*, 2002). A divisão binária se inicia, e após sucessivas multiplicações e ausência de uma contenção pela célula do hospedeiro, esta acaba por liberar as formas amastigotas (**Fig. 1**), sendo conseqüentemente fagocitadas por outros macrófagos (HANDMAN & BULLEN, 2002; NEVES *et al.*, 2000).

A infecção do inseto vetor se dá durante o repasto sangüíneo em hospedeiros infectados, através da ingestão de amastigotas livres ou de macrófagos carregando o parasita (**Fig. 1**). A multiplicação de *Leishmania* dentro do hospedeiro invertebrado ocorre na luz do trato digestivo, onde o parasita sofre modificações morfológicas e bioquímicas. Esses processos dependem de uma alimentação rica em açúcares, da ausência de infecções bacterianas concomitantes no trato intestinal do inseto e da total digestão do sangue antes do próximo repasto sangüíneo (NEVES *et al.*, 2000). Este fenômeno de diferenciação do parasita (**Fig. 1**) é denominado metaciclogênese, onde amastigotas transformam-se em promastigotas metaciclícas, completando assim, o ciclo de vida de *Leishmania* (WALTERS, 1993).

3 - *Leishmania* e a resposta do hospedeiro

O amplo espectro patogênico da leishmaniose descrito em humanos também pode ser observado em linhagens de camundongos isogênicas. Devido ao fato de diferentes linhagens apresentarem diferentes respostas, elas se tornaram modelos amplamente

utilizados para caracterizar a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção com diferentes espécies de *Leishmania*.

O modelo de infecção de leishmaniose mais estudado utiliza a espécie *L. major*. Nas linhagens susceptíveis BALB/c e SWR/J, a infecção por este parasita gera uma lesão cutânea no sítio de infecção que, por não ser controlada pelo hospedeiro, se desenvolve, levando a uma doença sistêmica e, finalmente, à morte do animal. Entre as linhagens resistentes à *L. major* estão C57BL/6, C57BL/10, B10.D2, C3H e DBA/1, que apresentam uma lesão transitória, que acaba por regredir e desaparecer logo nas primeiras semanas de infecção (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002). Os modelos estudados em maior detalhe são as linhagens BALB/c e C57BL/6 (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

No início da infecção, tanto em BALB/c quanto em C57BL/6, há uma produção de interleucina (IL)-4 e direcionamento para uma resposta do tipo Th2 (linfócito T *helper* do tipo 2), inibindo o desenvolvimento da resposta tipo Th1. Como resultado dessa polarização, há um declínio nas respostas efetoras contra a infecção, como por exemplo, uma queda na produção de Reativos Intermediários do Nitrogênio (RNIs) e Reativos Intermediários do Oxigênio (ROIs). Essa polarização, entretanto, se reverte em linhagens resistentes que acaba por se desenvolver em uma resposta principalmente do tipo Th1 (BOGDAN *et al.*, 2000; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Além da produção de IL-4 em BALB/c, há também uma alta produção de TGF- β (Fator de Crescimento Transformante - beta) IL-10 e IL-13, citocinas típicas de uma resposta Th2. Essas citocinas estão associadas a manifestações que levam à susceptibilidade da linhagem, como a ausência de ativação de macrófagos que, conseqüentemente, permitiria a permanência do parasita (CHATELAIN *et al.*, 1992). Em linhagens resistentes, como em C57BL/6, a infecção com *L. major*, induz a produção de TNF- α (Fator de Necrose Tumoral - alfa) e outras citocinas, que acarreta na uma produção

de IFN- γ (interferon gama) pelos linfócitos Th1, ativando macrófagos infectados para a eliminação dos parasitas através da geração de óxido nítrico (NO) via L-arginina (GREEN *et al.*, 1990; WILHELM *et al.*, 2001).

Outras células do sistema imune também influenciam na resposta inflamatória e persistência do parasita. Durante infecção na pata de camundongos BALB/c, altos níveis de neutrófilos são observados por várias semanas no infiltrado inflamatório, enquanto que na infecção em camundongos da linhagem C57BL/6 estes níveis são mantidos apenas de maneira transitória. Assim, uma riqueza em neutrófilos poderia contribuir para a polarização Th2 da linhagem susceptível através da produção local de TGF- β e IL-10 (TACCHINI-COTTIER, *et al.*, 2000; SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002).

Enquanto há uma clara polarização entre as respostas de susceptibilidade e resistência durante a infecção por *L. major*, essa distinção não é tão clara na infecção por *L. amazonensis*. Primeiramente, não ocorre uma resposta essencialmente Th2 nas linhagens susceptíveis. Além do mais, não há uma linhagem que se demonstra realmente resistente contra a infecção, apresentando uma cura clínica como acontece nas linhagens resistentes à infecção por *L. major* (JI *et al.*, 2002). Esta ausência da cura ocorre nem mesmo na linhagem C57BL/6, resistente à maioria das espécies de *Leishmania* (JONES *et al.*, 2002).

A diferença entre as duas infecções já é aparente na biologia de *L. major* e *L. amazonensis*. O lipofosfoglicano (LPG) foi descrito como um fator de virulência para *L. major* (SPATH *et al.*, 2000) e *L. donovani* (McNEELY & TURCO, 1990), mas não para *L. mexicana* (ILG, 2000; TURCO *et al.*, 2001), espécie filogeneticamente próxima de *L. amazonensis*. Entre as funções associadas ao LPG estão: a sobrevivência e adesão do parasita no interior do inseto vetor (SACKS *et al.*, 2000) e modulação da produção de óxido nítrico (NO) (PROUDFOOT, *et al.*, 1996) em infecções por *L. major*. Da mesma

maneira, em infecções por *L. donovani*, foi associado ao LPG a habilidade de inibir a biogênese do fagolisossomo, impedindo a fusão do fagossomo ao lisossomo após a fagocitose (DERMINE *et al.*, 2000; LODGE & DESCOTEAUX, 2005); a inibição de transdução de sinal da via MAPK no macrófago, levando à ativação defeituosa da proteína quinase C (PKC) (KANE & MOSSER, 2000); inibição de apoptose (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994) e a associação ao iC3b para estabilizar a internalização no macrófago (HANDMAN & BULLEN, 2002). A associação com o complemento para *L. major* também representa um mecanismo de extrema importância para a sua internalização, mas para *L. amazonensis* esta importância é reduzida, demonstrando a existência de diferentes vias de internalização de *Leishmania* (LAURENTI *et al.*, 2004).

Outra molécula do parasita associada com resistência/susceptibilidade é a enzima LACK (*Leishmania homolog of receptors for activated C kinase*). Já foi mostrado que, em infecções de camundongos BALB/c por *L. major*, esta molécula induz a produção de IL-4, influenciando na susceptibilidade do hospedeiro (JULIA & GLAICHENHAUS, 1999; KELLY *et al.*, 2003). Todavia, a LACK não demonstrou a mesma importância em infecções por *L. mexicana*, onde camundongos BALB/c transgênicos resistentes a LACK continuavam a produzir IL-4 e mantendo o perfil de susceptibilidade (TORRENTERA *et al.*, 2001).

Assim como a biologia dos parasitas é importante, as diferenças da resposta do hospedeiro também influenciam na forma como a doença se manifesta. Como já mencionado acima, linhagens de camundongos resistentes à *L. major*, como C57BL/6 e C57BL/10, são susceptíveis a *L. amazonensis*. O perfil de resposta dessas linhagens à infecção por *L. amazonensis* é independente de IL-4 e apresenta uma produção de IL-10 que impede a ativação dos macrófagos. Esta citocina, porém, não influencia na resposta Th1 limitada, mostrando que há outros fatores de imunomodulação durante todo o curso da

infecção (AFONSO & SCOTT, 1993; JONES *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2003; McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Da mesma maneira, a linhagem BALB/c apresenta diferenças na resposta contra *L. amazonensis*, demonstrando um balanço entre Th1/Th2 (JI *et al.*, 2002) ao invés da polarização para Th2, observada em infecções por *L. major*. Há também uma alta proliferação de células T CD4⁺ CD25⁺ reguladoras capazes de restringir a ação de células T CD4⁺ CD25⁻ (JI *et al.*, 2005), levando a um controle inicial, mesmo que transitório, da infecção por *L. amazonensis*, juntamente com uma ação benéfica inicial do sistema do complemento (LAURENTI *et al.*, 2004) e células NK (ARANHA *et al.*, 2005; LAURENTI *et al.*, 1999).

Outra diferença entre as infecções nas linhagens acima está relacionada com a produção de IFN- γ . Em infecções por *L. major*, esta citocina, produzida por células Th1, juntamente com o TNF- α , ativa macrófagos a produzirem óxido nítrico com conseqüente contenção do parasita (GREEN *et al.*, 1990). Entretanto, durante infecções por *L. amazonensis* a produção de IFN- γ e TNF- α , por estimular o recrutamento e retenção de células no sítio de infecção, levam a um aumento na proliferação, e não contenção, de amastigotas (JI *et al.*, 2004). Com isto, a presença destas citocinas leva a um descontrole no sítio da infecção e conseqüente manifestação da doença. Foi demonstrado que *L. amazonensis* tolera o nível de IFN- γ produzido, e apenas quando em dosagens muito altas, o parasita sucumbe e os macrófagos são ativados (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). Estes dados explicariam porque, diferentemente de infecções com *L. major* (GREEN *et al.*, 1990), o tratamento de camundongos com IFN- γ não leva à resolução de infecções por *L. amazonensis* (JONES *et al.*, 2002).

A produção e ação da citocina IL-12 também divergem entre as duas infecções. Enquanto que a produção está intimamente relacionada à resolução da infecção por *L.*

major (HEINZEL *et al.*, 1993; AFONSO *et al.*, 1994), pois leva à uma resposta Th1 em estágios iniciais, a mesma é insuficiente para levar à resolução de infecções na linhagem C3H por *L. amazonensis* (JONES *et al.*, 2000) ou na linhagem C57BL/6 por *L. mexicana* (TORRENTERA *et al.*, 2002), mesmo sendo crítica em estágios mais tardios da infecção, atuando na estabilização da infecção nesses modelos.

Como aqui relatado, vários estudos vêm sendo realizados rompendo o paradigma de que a resposta imunológica contra *L. major* seria a resposta padrão contra infecções causadas pelas espécies do gênero *Leishmania*. Estes estudos demonstram uma complexidade na interação parasita/hospedeiro que depende tanto da espécie do parasita como do hospedeiro. Mesmo que *L. major* e *L. amazonensis* promovam principalmente lesões cutâneas, a diferença na resposta contra estas infecções está cada dia mais evidente. Uma explicação plausível para essa diferença é o fato das espécies de *Leishmania* terem se divergido de 40 – 80 milhões de anos atrás, juntamente com a separação das ordens de mamíferos. As adaptações específicas e singulares de cada espécie do parasita teriam influenciado em sua relação íntima com seus hospedeiros (vertebrados ou invertebrados) e reservatórios vertebrados, bem como através de expressão gênica nos parasitas que influenciam na infecção, gerando respostas específicas do hospedeiro e diferentes mecanismos de evasão do parasita (CROAN *et al.*, 1997; STEVENS *et al.*, 2001; McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004).

4 - Apoptose e infecções parasitárias

Um mecanismo de evasão já descrito para diversas infecções é a regulação da apoptose de células do hospedeiro, sejam as próprias células infectadas ou células relacionadas com a resposta imunológica contra a infecção (HEUSSLER *et al.*, 2001; DOCKRELL, 2001; GOUGEON, 2003). A apoptose é um tipo de morte celular

programada pela própria célula. É um fenômeno complexo, com o envolvimento de diversas proteínas, enzimas e controle da expressão gênica. Mecanismo ubíquo ao longo da evolução, a apoptose está presente desde o desenvolvimento até a manutenção da homeostase. Já foi descrita em eventos como a metamorfose em insetos, o desenvolvimento embrionário em metazoários, a eliminação de células desnecessárias e/ou que sofreram injúrias em organismos multicelulares e a seleção do repertório de linfócitos (BAEHRECKE, 2002; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003; MURO *et al.*, 2006).

Caracterizada como uma morte limpa e silenciosa e sendo uma parte natural do ciclo de vida ou parte de mecanismos de defesa (TRAMBAS & GRIFFITHS, 2003; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003), a apoptose apresenta vários mecanismos conservados (Figura 02) e características morfológicas marcantes. Dentre os aspectos morfológicos, estão incluídos perda da aderência da célula, condensação e fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos, remoção da célula apoptótica por fagócitos e ausência de uma resposta inflamatória. Estas características a distinguem da necrose, que é uma morte passiva, rápida e severa, com extravasamento do meio intracelular e conseqüente reação inflamatória (HENGARTNER, 2000; OPFERMAN & KORSMEYER, 2003; HAIL JR. *et al.*, 2006).

A maioria das mudanças morfológicas é causada pela ação, direta ou indireta, de uma família de cisteína proteases denominadas caspases. A nomenclatura é numeral e já foram descritas mais de uma dúzia de caspases em seres humanos, apesar de nem todas estarem envolvidas diretamente no processo apoptótico. As caspases são altamente conservadas ao longo da evolução, sendo descritas em hidras, nematódeos, insetos e mamíferos (HENGARTNER, 2000). São encontradas nas formas inativas (pró-caspases) no citoplasma e, quando ativadas, são capazes de ativar ou inativar diversos substratos,

incluindo outras pró-caspases, o que gera uma cascata de sinalização que vai culminar com a morte da célula (OPFERMAN & KORSMEYER, 2003; HENGARTNER, 2000) (**fig. 2**).

A apoptose pode ser induzida por duas vias principais: a extrínseca (ou tipo I) ou a intrínseca (ou mitocondrial ou tipo II). A primeira via é iniciada pela associação de Fas (CD95) ao FasL, que se torna capaz de recrutar moléculas adaptadoras capazes de interagir e ativar caspase 8 (**fig. 2**). A caspase 8 produz uma cascata de ativação de outras pró-caspases 8, além das chamadas caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) que promove a morte celular (HAIL JR *et al.*, 2006; WESCHE-SOLDATO *et al.*, 2007).

A via mitocondrial (**Fig. 2**) pode ser iniciada por IL-1, IL-6 ou fatores exógenos, como esteróides, NO, ROIS ou Ca^{+2} . É dependente da 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 apoptossomo. Este último possui a capacidade de ativar as caspases efetoras 3 e 7 (**Fig. 2**). A família de proteínas Bcl-2 está intimamente ligada a esta via, pois há proteínas anti-apoptóticas desta família mantendo a integridade da membrana mitocondrial, e são proteínas pró-apoptóticas desta família que facilitam a permeabilidade da membrana e liberação do citocromo c (HAIL JR *et al.*, 2006; WESCHE-SOLDATO *et al.*, 2007).

Dentre os diversos substratos já associados com as caspases efetoras encontram-se 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; HENGARTER, 2000). A caspase 3 (**Fig. 2**) foi associada com a ativação da CAD (*caspase-activated DNase*), endonuclease responsável pela fragmentação do DNA da célula apoptótica (HAIL JR., 2006). A cromatina apresenta-se com complexos octâmeros de histonas, responsáveis pelo enovelamento e proteção da dupla fita de DNA.

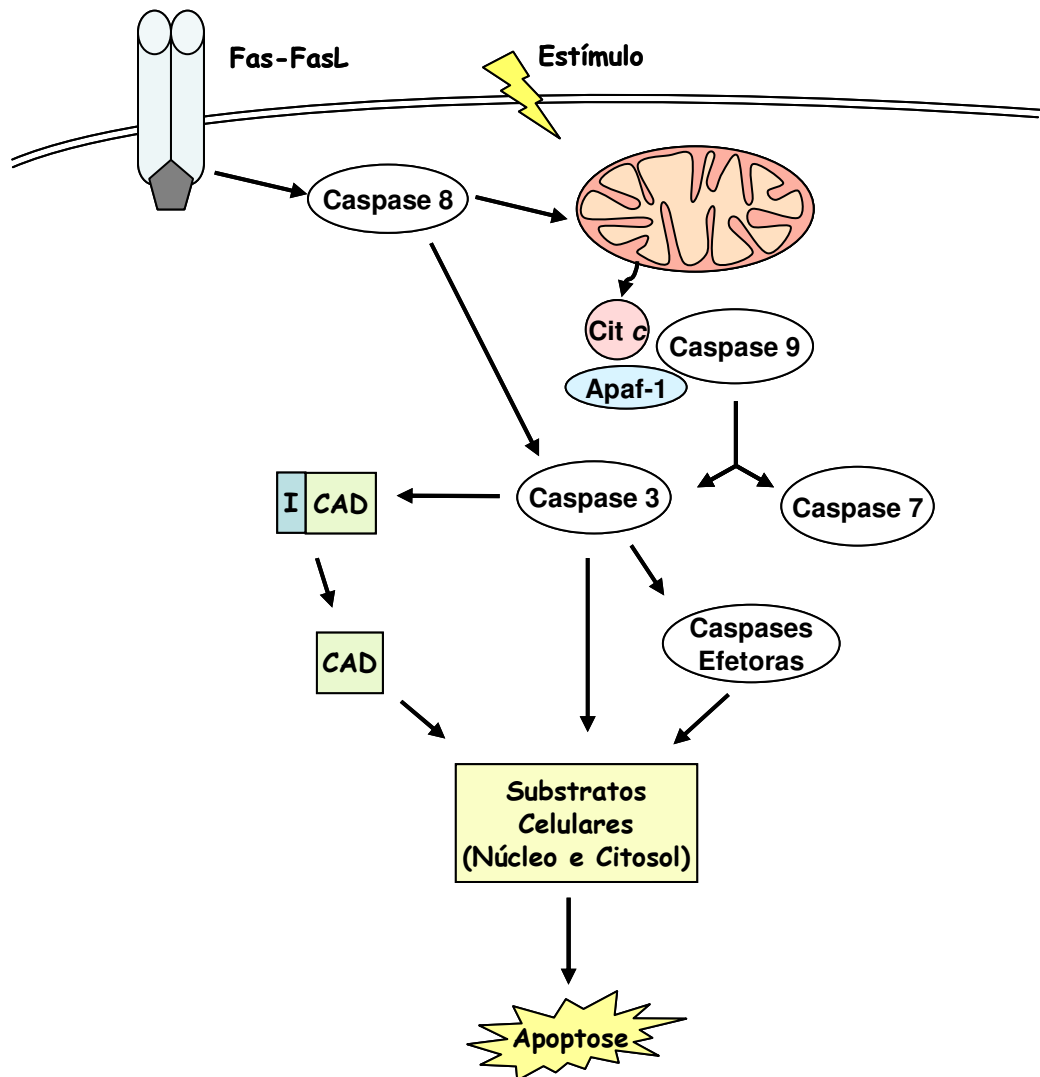


Figura 2- Resumo dos principais eventos celulares da apoptose. Após o estímulo apoptótico, externo ou via Fas-FasL, há ativação de diferentes cascatas iniciadoras (caspase 8 ou caspase 9). Estas caspases desencadeiam uma cascata de ativação de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) que ativarão diferentes substratos para a efetivação da morte celular programada.

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, exceto nas regiões internucleossômicas, o que gera fragmentos de 200 pb e múltiplos de 200 pb que são 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 fosfatidilserina (PS), um fosfolípido normalmente presente na camada interna da membrana citoplasmática. Com o estímulo apoptótico, a fosfatidilserina é exposta na camada externa e já foi mostrada sua importância para a fagocitose da célula apoptótica (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).

O papel da apoptose no sistema imune tem sido altamente relacionado com situações de imunodeficiência, autoimunidade e câncer quando há alterações na expressão de proteínas pró- ou anti-apoptóticas (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 por células NK e T CD8⁺ (SHI *et al.*, 1992; HEUSEL *et al.*, 1994).

Contudo, a regulação da apoptose tornou-se um mecanismo utilizado como forma de evadir o sistema imunológico em diversas patogenicias, como citado anteriormente. Esta regulação pode ser tanto pela indução quanto pela inibição da morte celular, influenciando assim na resolução ou amplificação de diversas patogenicias. 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.

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 através 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 parasita (HEUSSLER *et al.*, 1999; FICH *et al.*, 1998).

Entre os parasitas que inibem a morte celular programada estão também espécies do próprio gênero *Leishmania*. Infecções com *Leishmania donovani* resultam em resistência do macrófago infectado à morte programada após a retirada de fatores de crescimento de culturas *in vitro* (MOORE & MATLASHEWSKI, 1994). *L. major* também foi associada com retardar a apoptose de neutrófilos até o momento de chegada dos macrófagos no sítio de infecção (LASKAY *et al.*, 2003; AGA *et al.*, 2002). Esta inibição foi considerada pelos autores uma via de infecção do macrófago ao fagocitar o neutrófilo então apoptótico com o parasita viável em seu interior, reduzindo a resposta inflamatória.

Relatos de indução de apoptose durante infecções também já foram descritos, sendo relacionados com uma imunorregulação no hospedeiro pelo parasita, favorecendo seu estabelecimento sem uma resposta ideal do hospedeiro. Entre os agentes infecciosos que

promovem a morte celular programada está o vírus de imunodeficiência adquirida (HIV), que induz apoptose em linfócitos infectados ou não com o vírus (GOUGEON, 2003). Outras infecções virais indutoras de apoptose são pelos vírus de hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV) e alguns herpesvirus (DOCKRELL, 2001). Em infecções bacterianas, já foi descrita a indução de apoptose durante a invasão *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis* em neutrófilos humanos infectados (PERSKVIST *et al.*, 2002) e macrófagos (ROJAS *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2006), também sendo observado em lavagens broncoalveolares (PLACIDO *et al.*, 1997). Entre outras infecções por bactérias, também foi descrita a indução de morte celular programada por *Salmonella typhimurium* (MONACK *et al.*, 1996) e *Helicobacter pylori* (MENAKER *et al.*, 2004), ambas realizadas *in vitro* e em infecções *in vivo* por *Shigella dysenteriae* (RAQIB *et al.*, 2002)

Já em doenças causadas por protozoários, foi demonstrada a indução de apoptose por *Trichomonas vaginalis* em células RAW264.7 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 sangüínea em infecções por *Plasmodium chabaudi chabaudi*.

Este controle da sobrevivência de células do hospedeiro pelo parasita promove sua estabilização e um desenvolvimento da patogenia favorável ao parasita. Nos casos acima citados, os parasitas são diretamente beneficiados por este controle que pode ser visto com um bem-sucedido mecanismo de escape. Uma vez que tanto a indução, quanto a inibição de apoptose foram associados com o escape do parasita, não é de se surpreender que haja relatos em que o mesmo parasita faça a regulação da apoptose para os dois sentidos. Estes

diferentes mecanismos podem ser acionados em tempos de infecção ou células-alvo distintas.

Durante a infecção, *Cryptosporidium parvum* é capaz de proteger a célula infectada de estímulos pró-apoptóticos fortes, assegurando uma sobrevivência maior dentre das mesmas (McCOLE *et al.*, 2000) ao mesmo tempo que 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 parasita 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).

Em *Trypanosoma cruzi*, protozoário mais próximo de *Leishmania* foi demonstrado que cardiomiócitos infectados adquirem uma maior proteção contra apoptose (PETERSEN *et al.*, 2006). Foi descrito que macrófagos infectados por este parasita produz 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 parasitas 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 parasita para a proliferação (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2000). A presença de células apoptóticas, e sua conseqüente 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).

Como foi descrito acima, a sobrevivência da célula hospedeira dita a resposta imunológica e a amplificação/contenção da patogenia, mostrando ser um balanço delicado entre a infecção pelo parasita e a resposta do hospedeiro. As conseqüências deste balanço

contribuem de maneira significativa para o resultado final da regulação, determinando se haverá progressão ou declínio da infecção.

Com isto em mente, o objetivo do presente trabalho foi investigar a ocorrência de morte de macrófagos infectados *in vitro* com *Leishmania*, e a natureza dessa morte. Para isso, foram analisadas a fragmentação de DNA e a exposição de fosfatidilserina nas células infectadas. Foram escolhidas inicialmente, a linhagem de camundongos BALB/c e a espécie *L. amazonensis*, mas alguns resultados foram obtidos com as espécies *L. major* e *L. guyanensis* e a linhagem de camundongos C57BL/6.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Parasitas

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. A cepa de *Leishmania (Leishmania) major*, código internacional MHOM/SU/73/5-ASKH, utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela professora Dra. Fátima Noronha, do Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, também na forma de promastigotas.

2- Obtenção de formas promastigotas de *Leishmania*

O isolamento de formas amastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* 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) estéril e inativado. O meio de cultura RPMI era dissolvido em água bidestilada, tamponado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (2g/ L) e HEPES ([N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfônico)]) (5,96g/ L). Após adição do antibiótico gentamicina (50mg/ L), o pH era ajustado para 7,2 e o meio era esterilizado por filtração em filtros de 0,2 μm . O SFB estéril 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.

A espécie *L. (V.) guyanensis* foi re-isolada em nosso laboratório em hamster, a partir das promastigotas cedidas, pela Dra. Junia de Sousa Franco. As formas promastigotas das espécies utilizadas eram criopreservadas como descrito abaixo.

3- Criopreservação

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 botijões de N₂ líquido (Omega EM-32, MVE Cryogenics, New Prague, MN, E.U.A.). As amostras criopreservadas eram recuperadas através 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 2 repiques consecutivos para total recuperação dos parasitas.

4- Cultivo de parasitas

Os parasitas eram cultivados sob forma promastigota *in vitro* em RPMI com 10%

(v/v) SFB em estufa a 25°C. Eram inoculados $1,5 \times 10^6$ parasitas por mililitro (mL) de cultura. O cultivo era mantido por até 15 passagens, pois há descrição da perda de virulência do parasita 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 infecção nos experimentos.

O acompanhamento da cultura era realizado por observação em microscópio invertido (Olympus, IMT, Tóquio, Japão) e a contagem dos parasitas 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 1:100 em Isoton (0,05 M ácido cítrico, 0,12 M NaCl, 0,5% formaldeído, p/v, pH 7,2). Para calcular o número de parasitas por mililitro de cultura, em cada contagem era utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de parasitas} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de parasitas contados}}{4} \times 10^2 \text{ (diluição da amostra)} \times 10^4 \text{ (fator de correção)}$$

5- Preparo de extratos de membrana e extrato citosólico dos parasitas

Promastigotas de *L. amazonensis* eram ressuspensas em alíquotas de 2×10^9 parasitas em tampão ácido bórico-NaOH 50 mM pH 7,0 e então submetidos a cinco ciclos de congelamento-descongelamento em N₂ líquido e banho-maria 37 °C para rompimento dos parasitas. As alíquotas eram então submetidas a uma centrifugação a 1000g durante 5 minutos para sedimentação de núcleos e eventuais parasitas íntegros. O sobrenadante (extrato total) era então coletado e centrifugado durante uma hora a 10.000g para separação das frações de membrana e citosólico. Em seguida o sobrenadante era recolhido e reservado como extrato citosólico, enquanto que o sedimento rico em membranas era ressuspensado em PBS.

6- Animais

Para todos os experimentos realizados foram utilizados camundongos machos, com idade entre 5 a 10 semanas. As linhagens utilizadas foram BALB/c, susceptível à *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, porém resistente à *L. (V.) guyanensis*; e a linhagem C57BL/6, resistente à *L. major* e capaz de controlar infecções por *L. amazonensis*.

Os animais foram criados no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB, UFMG, e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da mesma Instituição.

7- Obtenção de macrófagos peritoneais murinos

Para retirar macrófagos peritoneais, os camundongos eram inoculados, via i.p., com 2 mL de tioglicolato a 3% (GORDON *et. al.*, 1974). Após 3 a 4 dias, os animais eram sacrificados e injetados com 5 mL de PBS gelado e estéril na cavidade peritoneal. Realizava-se uma massagem abdominal e retirava o PBS contendo os macrófagos, com auxílio da seringa; que eram mantidos no gelo. As células eram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS gelado e centrifugadas novamente para serem ressuspendidas em RPMI com 10% de SFB. As células eram então contadas na câmara de Neubauer para serem plaqueadas. Após plaquear as células, estas eram incubadas por 2 horas em estufa a 37°C com 5% CO₂ para adesão de macrófagos à superfície. Após esse tempo de incubação, as células eram lavadas 2 vezes com RPMI à temperatura ambiente para retirar células não aderidas, entre elas eventuais linfócitos e hemácias. 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 wells (Nalge Nunc International) com 1×10^5 , 5×10^4 ou 1×10^7 macrófagos, respectivamente. As células eram incubadas com RPMI adicionados com 10% SFB (v/v).

8- Infecção de macrófagos *in vitro*

Para a infecção dos macrófagos peritoneais aderidos em placas e lâminas, utilizavam-se parasitas na forma promastigota durante a fase estacionária. Os parasitas eram contados em câmara hemocitométrica de Neubauer, como descrito acima, e seu número era ajustado conforme o experimento. Os parasitas eram incubados por 4 horas a 34°C na presença de 5% CO₂ para permitir a infecção dos macrófagos, onde após esse tempo, as placas eram lavadas duas vezes com RPMI em temperatura ambiente para remover parasitas não interiorizados, sendo considerado este momento, então, o tempo “zero hora” de infecção. As células eram, então, reincubadas por tempos variáveis à 34°C na presença de 5% CO₂ até o término dos experimentos.

Em alguns experimentos, os macrófagos eram incubados com extrato de membrana ou citosólico com a mesma proporção de parasitas vivos utilizados nos experimentos equivalentes. A incubação se seguia com os mesmos passos descritos acima para parasitas íntegros.

9- Avaliação da taxa de infecção e multiplicação de parasitas no interior dos macrófagos

A taxa de infecção, assim como a multiplicação e permanência de *L. amazonensis* no interior de macrófagos peritoneais de BALB/c, era avaliada pela contagem do número de macrófagos infectados e pelo número de parasitas no interior dessas células, após

tempos variados de incubação. A porcentagem de macrófagos infectados era obtida a partir da contagem, em microscópio óptico, de 300 células, preparadas com a coloração de May-Grünwald/Giemsa (MGG). Para a taxa de infecção, contava-se parasitas presentes no interior de 100 macrófagos das mesmas lâminas, e o número de parasitas contatos era dividido pelo número de macrófagos infectados, obtendo-se uma média do número de parasitas por célula (BARRAL-NETTO *et al.*, 1996). Os resultados estão apresentados como a média da porcentagem de duplicatas \pm desvio padrão da média.

A técnica de coloração May-Grünwald/Giemsa consiste em uma coloração do conjunto parasita-célula (GIAIMIS *et al.*, 1992). Primeiramente, as células são fixadas em metanol PA por 5 minutos, onde em seguida adicionava o corante May-Grünwald nas câmaras por 1 a 3 minutos. Logo após este intervalo, adicionava 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 seladas com Bálsamo do Canadá.

10- Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose

Macrófagos peritoneais aderidos na superfície de placas de 6 poços eram infectados com *Leishmania* numa proporção de 10 parasitas por macrófago e incubadas como descrito acima. Após incubação em tempos variados, era retirado e separado o sobrenadante para fins de obter eventuais células 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 ressuspendidas 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 1,5 a 3 horas 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, centrifugadas 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 *overnight* com 0,25M 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 por 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 1µg/ µL, eram aplicadas em gel de agarose 1,8% e a corrida no gel se dava a uma voltagem constante de 90V. 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).

11- Indução de fragmentação de DNA em *L. amazonensis*

Para a indução de apoptose nos parasitas foi utilizado o protocolo previamente descrito por HOLZMULLER *et al.* (2002). Brevemente, parasitas na forma promastigota durante a fase estacionária eram contados na câmera hemocitométrica de Neubauer, como descrito acima, e seu número era ajustado alíquotas de 1×10^8 parasitas. Estas alíquotas

eram centrifugadas para a troca de meio de cultura adicionado com NaNO_2 (nitrato de sódio) nas concentrações de 2,5 mM e 5,0 mM. Os parasitas eram incubados, então, por 4 horas. Após este intervalo, células eram coletadas e realizava-se a extração de DNA genômico como descrito anteriormente para macrófagos.

12- Ensaio de TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*)

Macrófagos peritoneais aderidos em lâminas de vidro com 8 poços eram infectados e incubados como descrito anteriormente, nas proporções de 2, 5 ou 10 parasitas por macrófago. Após incubações em tempos variados, células eram fixadas com 4% formaldeído e mantidas a -20°C em etanol 70% por até 2 semanas. Protocolo para marcação com o kit TUNEL (BD Pharmingen, San Jose, CA, E.U.A.) era realizado de acordo com o fabricante. Rapidamente, após fixação, células eram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton (1%) e lavadas novamente com PBS. Com essa permeabilização, células eram incubadas por 10 minutos com Tampão de Equilíbrio [cacolidato de potássio (200 mM, pH 6,6), Tris-HCl (25 mM, pH 6,6), DTT (0,2 mM), BSA (0,25 mg/ml) e cloreto de cobalto (2,5 mM)] para, em seguida, incubar com a solução contendo a enzima TdT, dUTP e Anexina V conjugada com FITC por 1 hora em câmara úmida, no escuro, em estufa 37°C com 5% CO_2 . Após a marcação, a reação era interrompida com incubação da lâmina em SSC 2X por 15 minutos, seguida de lavagens com PBS. Em seguida, células eram coradas com iodeto de propídeo (PI) por 15 minutos e lavadas com água deionizada para retirar PI não incorporado. Aplicava-se glicerol: água (1:1) nas lâminas, que eram seladas com esmalte. Lâminas eram contadas imediatamente. Resultados são representados como média de porcentagem e desvio padrão de células que apresentavam DNA marcados. Testes eram realizados em duplicatas e eram contadas 300 células por amostra.

13- Marcação de macrófagos com α -CD11b e análise em citometria de fluxo

Macrófagos peritoneais aderidos em placas de 6 poços eram infectados ou não com diferentes proporções de *L. amazonensis* e mantidos como descrito acima. Previamente à marcação, células eram retiradas das placas com rodinhos descartáveis (Sarstedt), lavados com RPMI gelado 2 vezes e mantidos em suspensão em tubos de polipropileno de 5 mL (Sarstedt) *overnight*, para recuperação das células. Paralelamente, células provindas das mesmas placas eram separadas para a marcação com Anexina V – FITC e PI, descrita abaixo.

Para a marcação das células com α - CD11b - FITC (CalTag, Burlingame, CA, EUA) foi utilizado o protocolo de coloração para marcadores de superfície *ex-vivo* descrito por BOTTREL *et al.* (2001). Rapidamente, após plaquear as células em placas de 96 poços com fundo redondo (2×10^5 células em 20 μ L) adiciona-se os anticorpos em solução de diluição nas concentrações previamente padronizadas. Após incubação por 15 minutos a 4 °C e protegidos da luz, adicionava-se PBS gelado nas placas e centrifugava a 1,200 rpm por 5 minutos a 4 °C. Logo após a retirada do sobrenadante, acrescentava-se a solução de lavagem (PBS 1X, 0,5% de BSA, 2 mM de azida), e repetia-se a centrifugação. Adicionava-se PBS gelado e centrifugava em seguida, como anteriormente. Às células eram então adicionados 100 μ L de PBS e fixadas com 100 μ L de formaldeído 4%. Protegendo-as da luz, as células eram transferidas para tubos para aquisição em citômetro de fluxo. Aquisições foram realizadas em FACS Vantage e as amostras foram analisadas com o software *Cell Quest*.

14- Marcação e análise de células com AnexinaV-FITC e Iodeto de propídio

Macrófagos peritoneais aderidos em placas de 6 poços eram infectados ou não com diferentes proporções de *L. amazonensis* e mantidos como descrito acima. Previamente à marcação, células eram retiradas das placas com rodinhos descartáveis (Sarstedt), lavados com RPMI gelado 2 vezes e mantidos em suspensão em tubos de polipropileno de 5 mL (Sarstedt) *overnight*, para recuperação das células.

Para a marcação das células, foi utilizado o protocolo segundo o fabricante (BD Pharmingen). Brevemente, as células eram centrifugadas e lavadas 2 vezes com PBS gelado e ressuspendidas com Tampão de Ligação (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) para uma concentração final de 1×10^6 células por mL. Dessa solução com células, eram transferidos 100 µL (ou 1×10^5 células) para tubos menores, onde se adicionava 5 µL da Anexina – FITC (PharMingen) e 10 µL de solução estoque de iodeto de propídio (PI) (50 µg/mL) e incubava por 15 minutos. Logo em seguida, 400µL do tampão de ligação eram adicionados em cada tubo, que eram analisados no citômetro de fluxo (FACS Vantage) imediatamente para evitar perda de fluorescência. Amostras permaneciam protegidas da luz em todas as etapas após a incubação com Anexina V-FITC. Análises foram realizadas pelo software *Cell Quest*.

15- Reprodutibilidade e apresentação dos resultados

Todos os experimentos deste trabalho foram repetidos no mínimo 3 vezes e foram reprodutíveis, sendo que os dados apresentados são referentes à média de duplicatas de um experimento representativo.

RESULTADOS

1 - Taxa de infecção e sobrevivência do parasita

Para verificar se macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c se infectavam com promastigotas de *Leishmania amazonensis*, e se esta infecção se mantinha adequadamente *in vitro*, avaliamos inicialmente a taxa de infecção e a carga parasitária das células dos camundongos após um contato inicial de 4 horas com os parasitas. Essa avaliação foi feita utilizando macrófagos infectados com diferentes proporções de parasitas por macrófago. Para isto, após a retirada dos parasitas não aderidos à célula hospedeira, determinamos a percentagem de células infectadas e número de parasitas interiorizados, após coloração das lâminas por May-Grünwald/Giemsa ao longo de 72 horas.

A **figura 3** mostra que a taxa de infecção de macrófagos de camundongos BALB/c foi proporcional ao número de parasitas utilizados na infecção, sendo em torno de 50%, de 80% e de 85% para as proporções de 2:1, 5:1 e 10:1, respectivamente. Enquanto a percentagem de macrófagos infectados praticamente não se alterou ao longo da infecção, o número de parasitas no interior das células cresceu com o decorrer do tempo, exceto na proporção de 2 parasitas por macrófago. Nas proporções de 5:1 e de 10:1 os macrófagos infectados passaram de cerca de 3 para 8 parasitas por célula (com um pequeno decaimento ao final do período observado) e de cerca de 6 para 13 parasitas por célula, respectivamente. Juntos, esses resultados indicam a sobrevivência e a multiplicação das amastigotas de *L. amazonensis* no interior de macrófagos de BALB/c no tempo analisado.

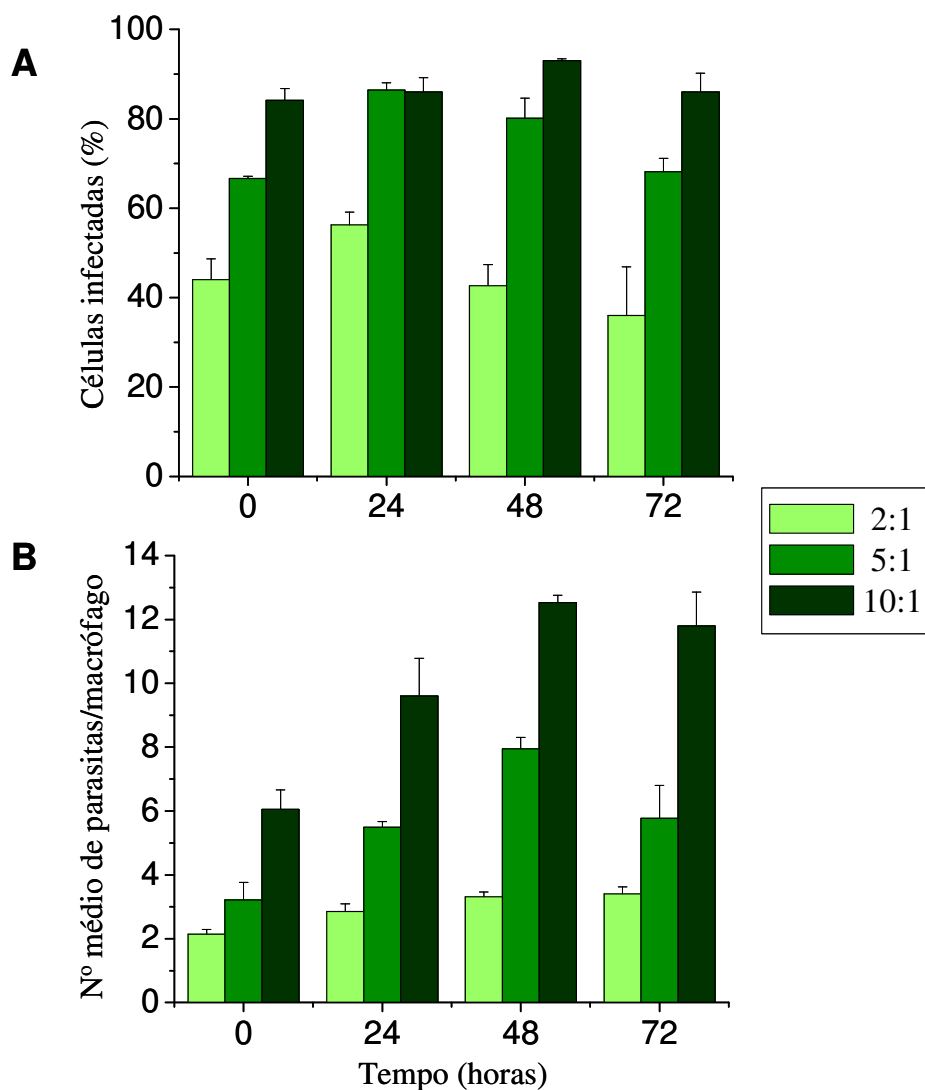


Figura 3- Taxa de infecção e multiplicação de *L. amazonensis* em macrófagos murinos. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c eram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes proporções parasita: macrófago (2:1, 5:1, 10:1). Nos intervalos indicados de infecção, foram avaliados o número de macrófagos infectados (**A**) e o número médio de parasitas no interior de cada macrófagos (**B**), como descrito em Material e Métodos. As barras verticais representam a média de duplicatas \pm desvio padrão de um experimento representativo.

2 - Viabilidade dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*

Embora os mecanismos ainda não sejam conhecidos, assume-se que, em uma infecção natural, os macrófagos infectados por *Leishmania* morrem permitindo que as amastigotas infectem células saudáveis vizinhas. Nosso próximo passo foi então, verificar a ocorrência de morte de macrófagos infectados *in vitro*, por um período de 72 horas. Inicialmente, utilizamos o método de MTT, mas este não foi satisfatório, provavelmente pela interferência dos parasitas na reação. Assim utilizamos o parâmetro de permeabilidade da membrana celular ao iodeto de propídeo (PI), utilizando a citometria de fluxo, que permitiu comparar a viabilidade das células infectadas com as células não infectadas. Nossos resultados mostraram que a infecção com *L. amazonensis* induz um aumento da permeabilidade das células para o corante, indicando a morte dos macrófagos *in vitro*, especialmente em infecções por 5 e 10 parasitas por macrófago (**Fig. 4**).

Assim, resolvemos investigar se a morte das células infectadas era por apoptose. Analisamos a presença das seguintes características marcadas da apoptose: fragmentação do DNA e exposição de fosfatidilserina.

3 - Fragmentação do DNA de macrófagos infectados com *L. amazonensis*

3.1 - Visualização do DNA fragmentado pela coloração por brometo de etídio em gel de agarose

Para verificar a ocorrência de fragmentação do DNA de macrófagos, extraímos o DNA de macrófagos infectados com *L. amazonensis* em diversos intervalos de infecção e o analisamos após eletroforese em gel de agarose. Devido à ativação de endonucleases durante a morte programada, o DNA é clivado nas regiões internucleossômicas criando fragmentos de 180 a 200 pares de base (pb) e múltiplos, o que gera um padrão tipo

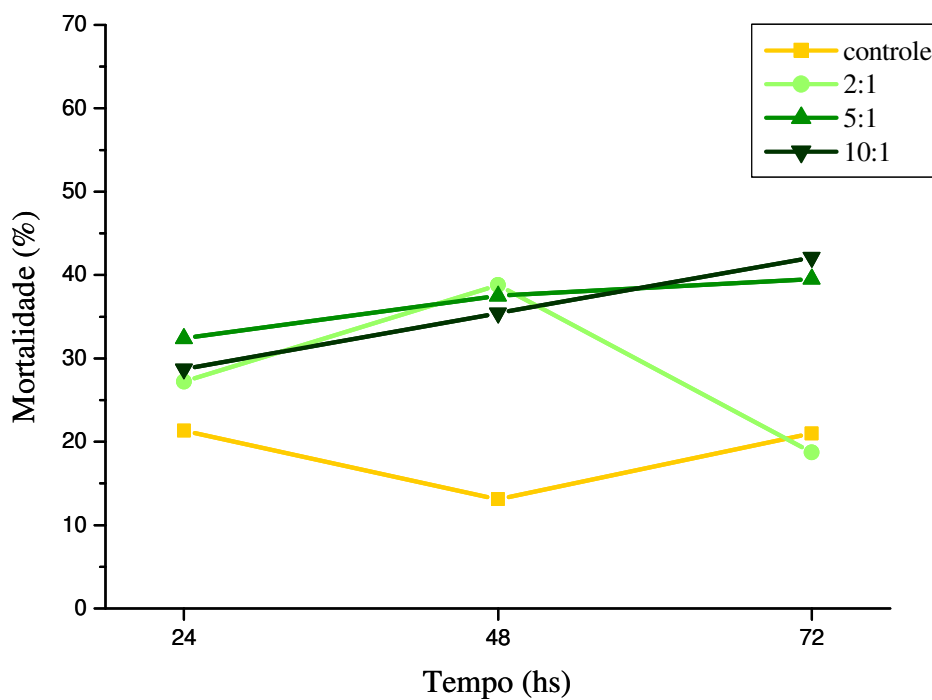


Figura 4- Mortalidade celular de macrófagos de BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Após intervalos de 24, 48 e 72 horas de infecção, células infectadas, ou não, com *L. amazonensis* em proporções de 2, 5 e 10 parasitas por macrófago foram coletadas, coradas com iodeto de propídio e analisadas conforme descrito em Material e Métodos. Os pontos representam a média de duplicatas de um experimento representativo.

“escada” quando analisado em géis de agarose.

Nossos resultados mostram que o DNA de células infectadas com *L. amazonensis* apresentou-se fragmentado com o típico padrão “escada”, cujos fragmentos foram do tamanho esperado. Este padrão de fragmentação pode ser observado nas células já a partir de 6 horas de infecção, enquanto que as células não infectadas apresentaram seu DNA intacto (**Fig. 5**).

Para determinar se a fragmentação de DNA estaria relacionada apenas com o modelo de infecção *L. amazonensis*-BALB/c, avaliamos a ocorrência desse evento em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* bem como em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com outras espécies de *Leishmania*.

Verificamos que macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* também apresentaram fragmentação de seu DNA, no padrão típico de apoptose (**Fig. 6A**). Por outro lado, macrófagos de BALB/c infectados com *L. guyanensis* ou com *L. major* apresentam seu DNA intacto (**Fig. 6B**). Esses resultados mostram que a indução da apoptose em macrófagos não é um evento induzido por todas as espécies do parasita, e sugerem que *L. amazonensis* induz apoptose em macrófagos independente da linhagem de camundongos.

Como o DNA extraído de células infectadas apresentava tanto DNA de macrófagos, quanto de *Leishmania*, fizemos um controle com o DNA apenas de promastigotas de *L. amazonensis*, para determinar se o padrão “escada” visualizado não seria devido à fragmentação do DNA do próprio parasita dentro do macrófago. Induzimos a apoptose dos parasitas com nitrato de sódio (NaNO₂) por 4 horas, como já descrito por HOLZMULLER *et al.* (2002) e analisamos o padrão da fragmentação do DNA. Na **figura 7** podemos

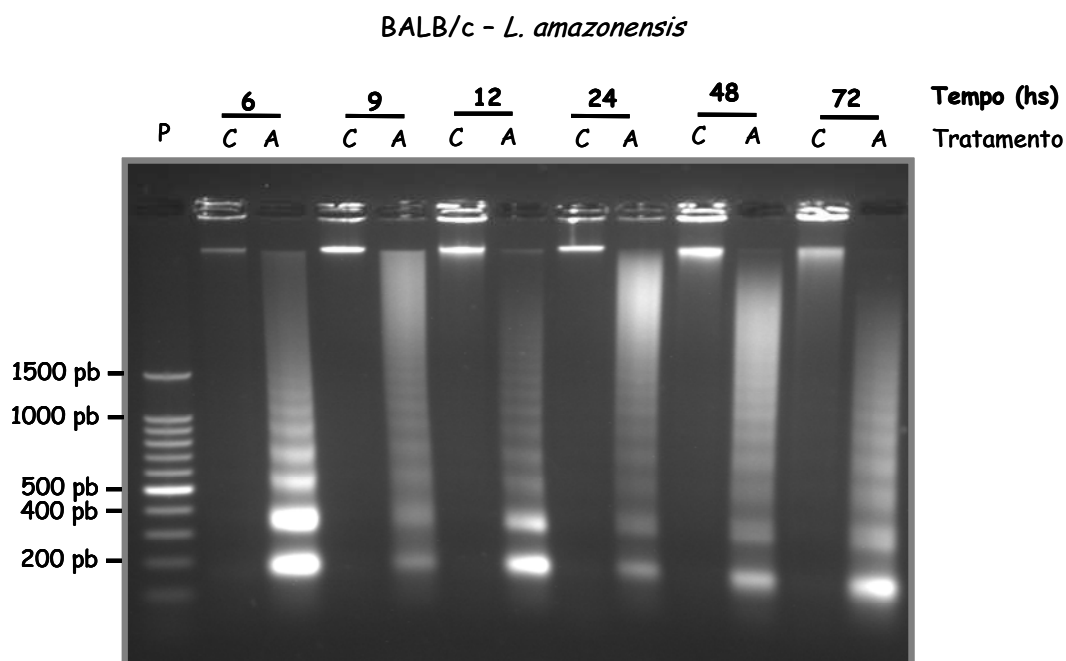


Figura 5- Fragmentação de DNA em macrófagos de BALB/c infectados por *L. amazonensis*. DNA de macrófagos infectados (A), ou não (C), com *L. amazonensis* na proporção de 10:1 (parasitas:célula) foi extraído nos tempos indicados conforme descrito em Material e Métodos e aplicado em gel de agarose a 1,6% seguido de eletroforese a 90 V. P - Padrão de Peso Molecular de escada de 100 pares de base (pb). Experimento representativo.

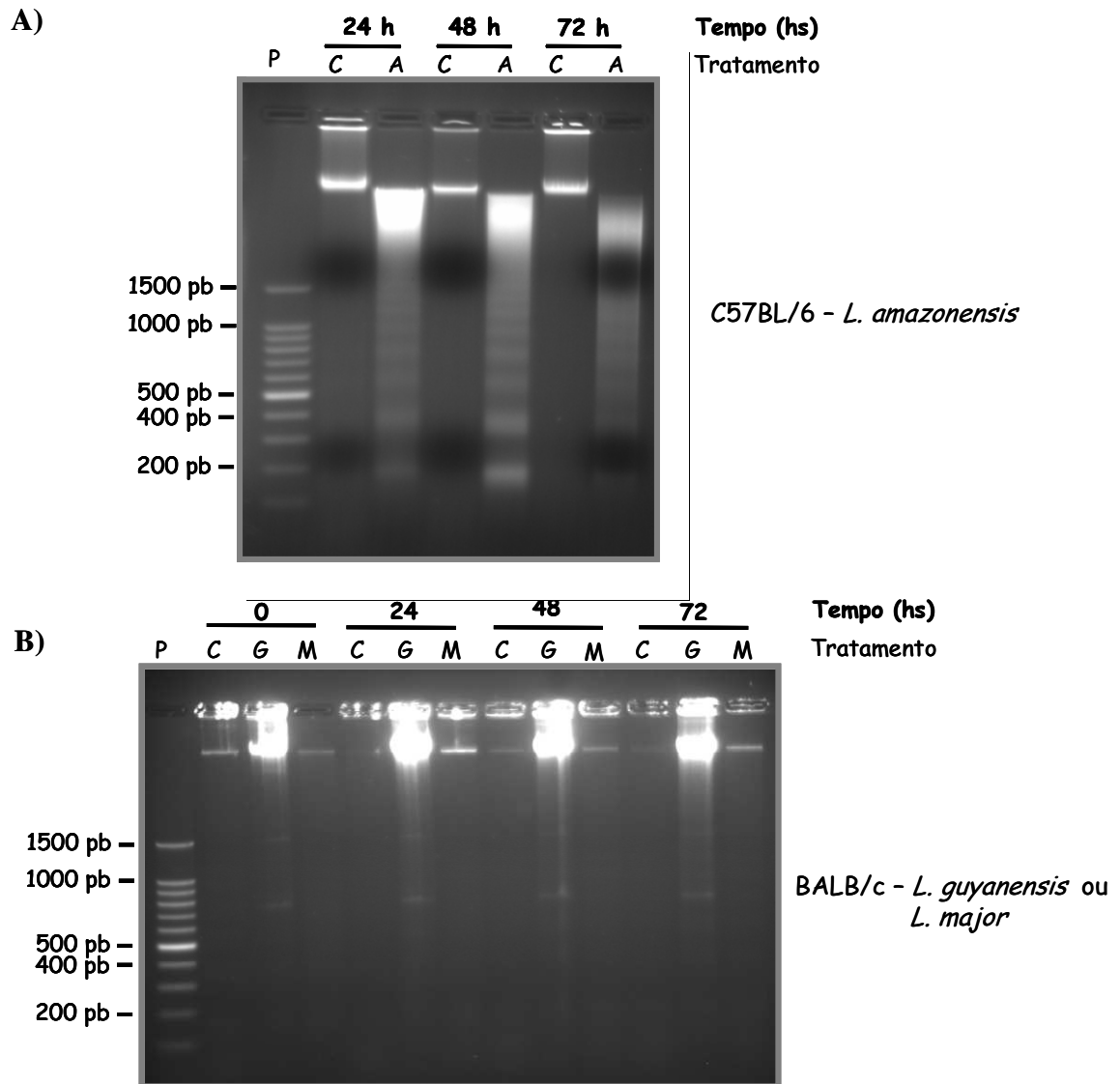


Figura 6- Fragmentação de DNA de macrófagos peritoneais de camundongos infectados por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* ou *L. major*. DNA de macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados, ou não (C), com *L. amazonensis* (A, painel **A) ou de camundongos BALB/c infectados, ou não (C), com *L. guyanensis* (G, painel **B**) ou *L. major* (M, painel **B**) na proporção de 10:1 (parasitas:célula) foi extraído conforme descrito em Material e Métodos e aplicado em gel de agarose a 1,6%, seguido de eletroforese a 90 V. P - Padrão de Peso Molecular de escada de 100 pb. Experimentos representativos.**

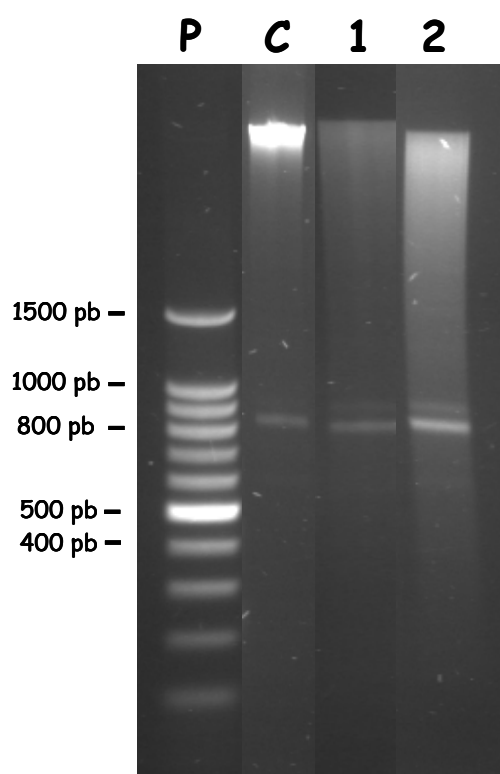


Figura 7- Fragmentação de DNA de promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas foram incubadas (1 e 2), ou não (C), com diferentes concentrações de NaNO₂ durante 4 hs. O DNA dos parasitas foi extraído conforme descrito em Material e Métodos e aplicado em gel de agarose a 1,6%, seguido de eletroforese a 90 V. P - Padrão de Peso Molecular de escada 100 pares de base (pb); 1 - 2,5 mM; 2- 5,0 mM. Experimento representativo.

observar que o DNA dos parasitas fragmenta-se quando os incubamos com diferentes concentrações desse indutor de apoptose. No entanto, o padrão de fragmentação é diferente do padrão “escada” observado nos experimentos anteriores, mostrando uma degradação aleatória, indicada pelo “rastros” de DNA. As duas bandas observadas nas canaletas C, 1 e 2 podem ser minicírculos pertencentes ao kDNA dos parasitas (SAVILL & HIGGS, 1999; ZANGGER *et al.*, 2002). Esse resultado indica que os fragmentos típicos de apoptose de 200 pb ou de múltiplos observados anteriormente são provenientes do DNA do macrófago.

3.2 – Visualização e quantificação dos macrófagos com o DNA fragmentado pelo método TUNEL

Para confirmar que o DNA fragmentado era do macrófago, bem como para quantificar as células que apresentaram seu DNA fragmentado após a infecção, utilizamos o método TUNEL (*Tdt-mediated dUTP Nick-end Labeling*), que marca as extremidades 3' OH de DNA fragmentado e possibilita a observação e contagem de núcleos contendo DNA fragmentado. Optamos por analisar as células por microscopia de fluorescência para observarmos a infecção e garantir que estaríamos quantificando apenas os núcleos de macrófagos e não de parasitas.

Macrófagos de camundongos BALB/c infectados, ou não, com *L. amazonensis* foram corados pelo método TUNEL e contados em microscópio de fluorescência após infecção com diferentes proporções de parasita por macrófago e diferentes tempos de incubação. Como a visualização da fragmentação do DNA no gel de agarose foi observada já a partir de 6 horas de infecção, avaliamos a fragmentação do DNA dos macrófagos infectados em tempos ainda menores, na tentativa de identificar o tempo mínimo de indução dessa lesão do DNA. O gráfico da **figura 8A** mostra que com 30 min após a

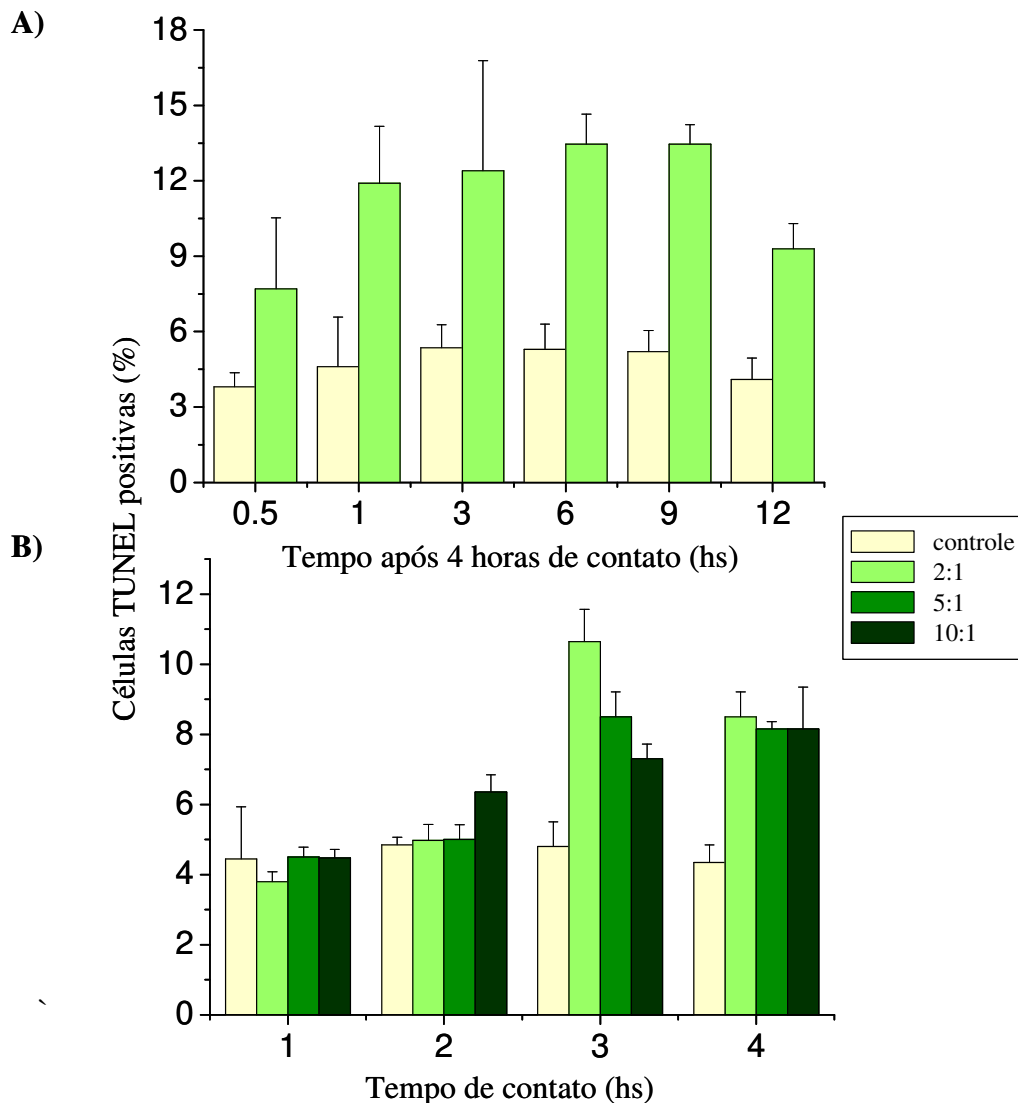


Figura 8- Quantificação de macrófagos infectados por *L. amazonensis* com DNA fragmentado Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* em diferentes proporções parasitas:macrófago (2:1, 5:1 e 10:1). Após os intervalos de 30 minutos até 12 hs após retirada dos parasitas não aderidos (**A**) ou de 1 a 4 hs de após o contato do parasita com os macrófagos (**B**), as células eram marcadas pelo método de TUNEL, como descrito em Material e Métodos. As barras verticais representam a média de duplicatas \pm desvio padrão de um experimento representativo.

retirada dos parasitas não interiorizados (após 4 horas de contato com os macrófagos), já podemos observar um número maior de núcleos de macrófagos com DNA fragmentado nas células infectadas do que nas células não infectadas. Com o tempo, há um aumento desse número que permanece constante durante o período observado (12 horas).

Como a fragmentação do DNA foi observada já nos primeiros minutos após a retirada dos parasitas, resolvemos reduzir o tempo de incubação dos macrófagos com as formas promastigotas para identificarmos a partir de que ponto após o contato com o parasita ocorria a fragmentação do DNA. Assim, analisamos a fragmentação do DNA pelo método de TUNEL desde a primeira hora de contato com a célula hospedeira. Resultados preliminares mostram que os macrófagos infectados começam a apresentar fragmentação do DNA após 3 horas de contato do parasita com o macrófago (**Fig. 8B**)

Não foi observada correlação entre o número de células com DNA fragmentado e o grau de infecção dos macrófagos.

4- Exposição de fosfatidilserina (PS) em macrófagos infectados

Outro processo marcante que ocorre no processo da apoptose é a exposição na superfície celular do fosfolipídio PS, usualmente encontrada na camada interna da bicamada lipídica. A exposição de PS ocorre já no início do processo apoptótico e representa um ponto “sem retorno”. Um meio de demonstrar esta exposição é a marcação da PS exteriorizada com Anexina V (AnnV), uma proteína com alta afinidade para OS (GERKE & MOSS, 1997). Essa marcação, juntamente com uma contra-coloração com iodeto de propídio (PI), nos permite distinguir células viáveis (duplo negativas), apoptóticas (AnnV⁺/ PI⁻), necróticas (AnnV⁻/ PI⁺) e mortas e/ou necróticas secundárias (AnnV⁺/ PI⁺), estas últimas sendo células que se encontram em uma fase consecutiva à apoptose, onde já houve perda da integridade da membrana plasmática (van ENGELAND

et al., 1996; VERMES *et al.*, 1995; VERMES *et al.*, 2000; SUSKA *et al.*, 2005).

Inicialmente, para distinguir macrófagos de eventuais células contaminantes presentes na cultura, as células foram marcadas em experimentos paralelos com anti-CD11b (resultado não mostrado). CD11b é uma molécula de adesão presente em monócitos e macrófagos, além de granulócitos e células NK. Com esta marcação, juntamente com o padrão de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), identificamos a população de macrófagos, que na **figura 9**, está delimitada pelo retângulo em cada painel. Nesta janela, considerando o tamanho e a granulosidade das células, podemos verificar que a população de células não infectadas é mais homogênea. A infecção, principalmente com uma carga maior de parasitas ou em tempos maiores de infecção, causa uma alteração dessas características: visivelmente observamos que as células tornam-se menores e mais granulosas.

As análises da marcação com Anexina V-FITC e PI estão apresentadas nas **figuras 10 e 11** que mostram o *dot-plot* das frequências de células coradas com AnnV e/ou PI e a cinética do aparecimento das células coradas com AnnV, respectivamente. Inicialmente, podemos verificar que, durante o período analisado, as células não infectadas apresentaram uma mortalidade (PI⁺) que variou aproximadamente de 13 a 20%, sendo que a percentagem de células em início de apoptose (AnnV⁺/PI) variou de cerca de 1 a 3%, durante o período analisado. A infecção por *L. amazonensis* acarretou, como já mostrado anteriormente (Fig. 4), um aumento da mortalidade (PI⁺) dos macrófagos. A frequência de células AnnV⁺/PI também aumentou de forma dramática, e foi proporcional ao número de parasitas por células e ao tempo de infecção. A exposição de fosfatidilserina se mostrou alta, particularmente em células infectadas com proporções de 5 ou 10 parasitas por macrófago, claramente visível pelo deslocamento da população do quadrante de células viáveis (AnnV/PI) para os quadrantes de células apoptóticas (AnnV⁺) (**Fig. 10**) e no

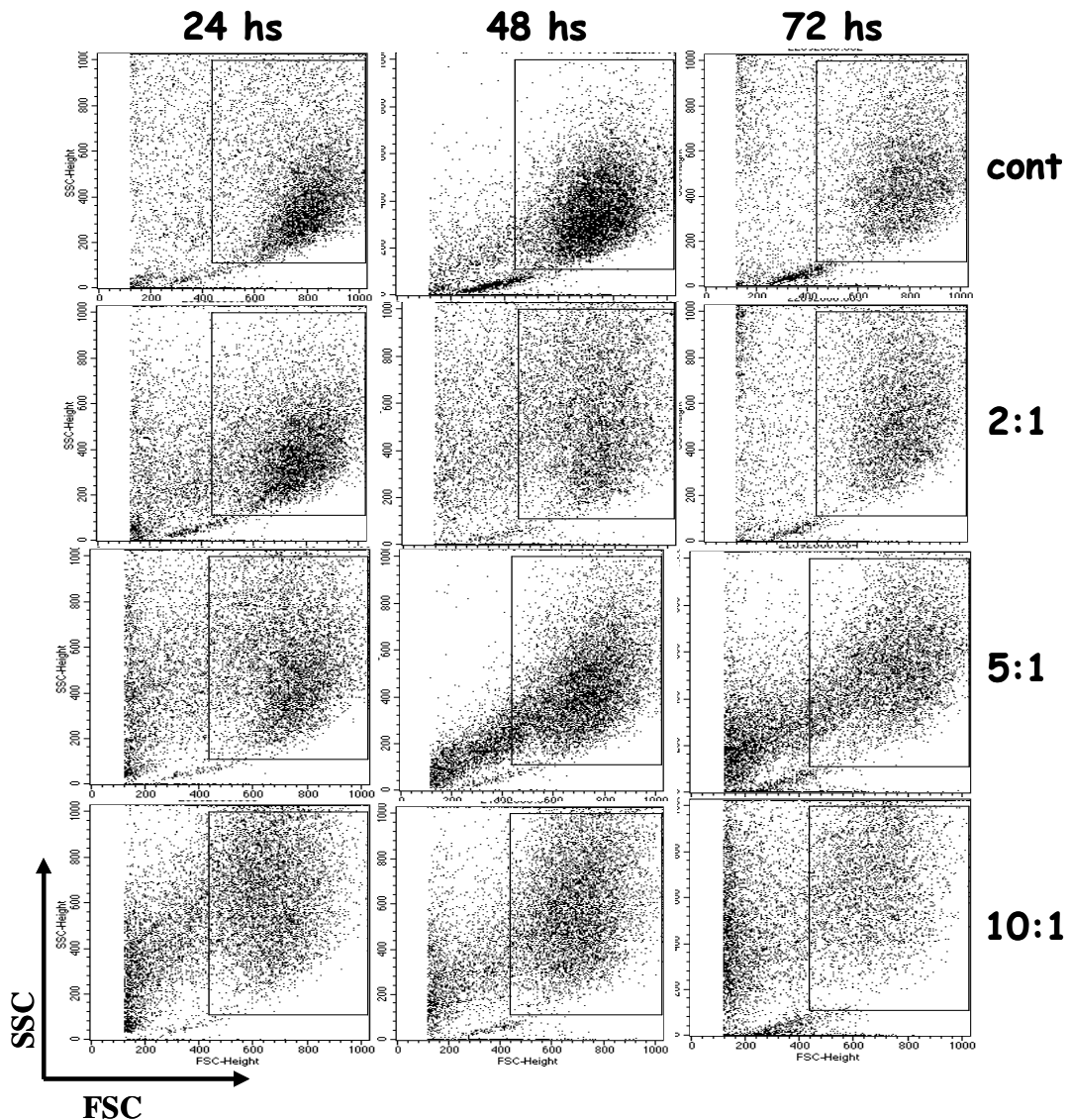


Figura 9- Tamanho e granulosidade de macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com *L. amazonensis*. Macrófagos eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* em diferentes proporções parasita:macrófago (2:1, 5:1 e 10:1). Após os intervalos indicados, as células eram marcadas com Anexina V-FITC e iodeto de propídeo e analisadas imediatamente por citometria de fluxo como descrito em Material e Métodos. Experimento representativo.

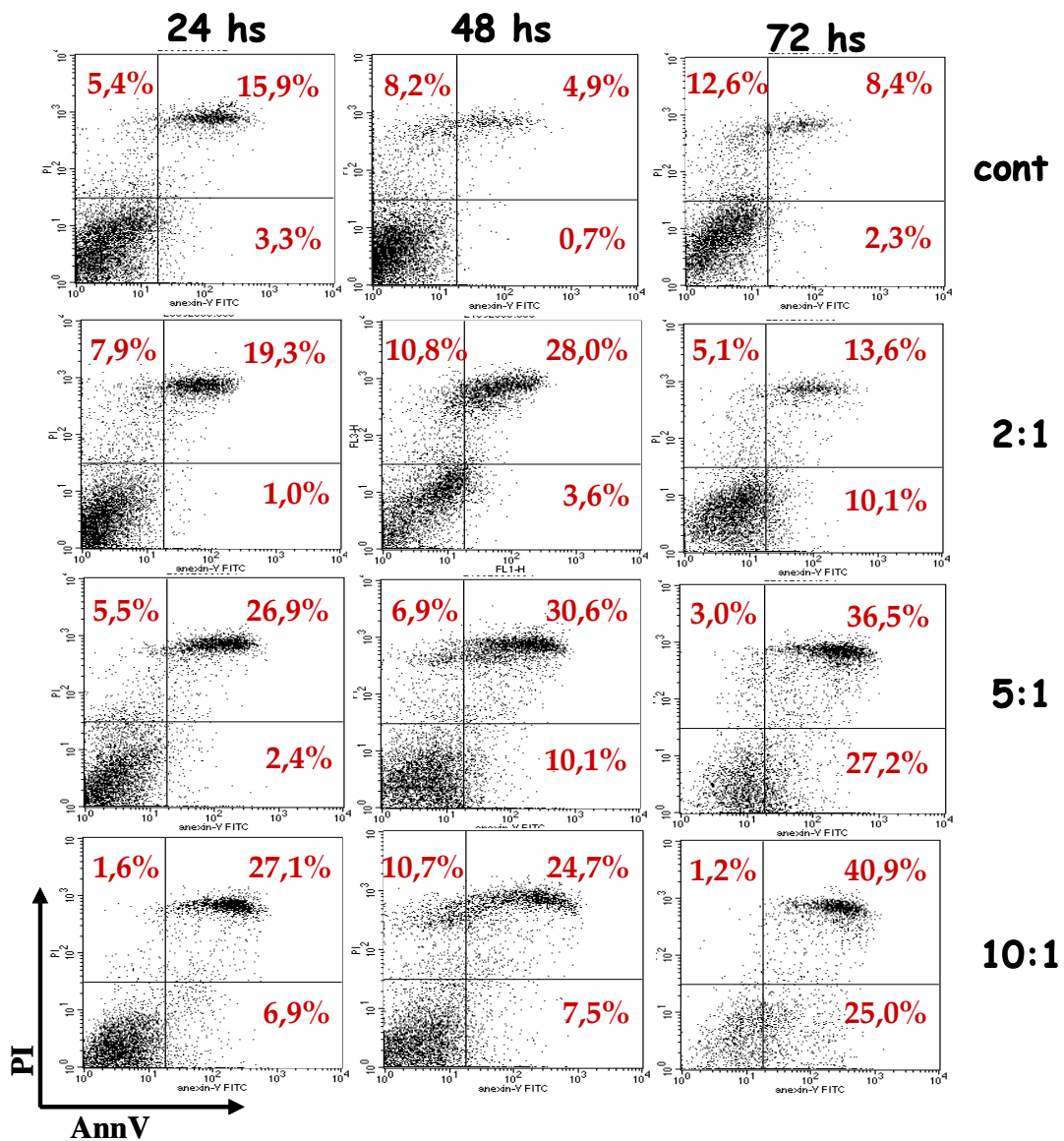


Figura 10- Exposição de fosfatidilserina e permeabilidade ao iodeto de propídio de macrófagos de camundongos BALB/c após infecção com *L. amazonensis*. Macrófagos eram infectados, ou não, com *L. amazonensis* em diferentes proporções parasita:macrófago (2:1, 5:1 e 10:1). Após os intervalos indicados, as células eram coletadas e marcadas com Anexina V-FITC (AnnV) e iodeto de propídeo (PI). Após marcação, células eram analisadas imediatamente por citometria de fluxo, como descrito em Material e Métodos. Experimento representativo.

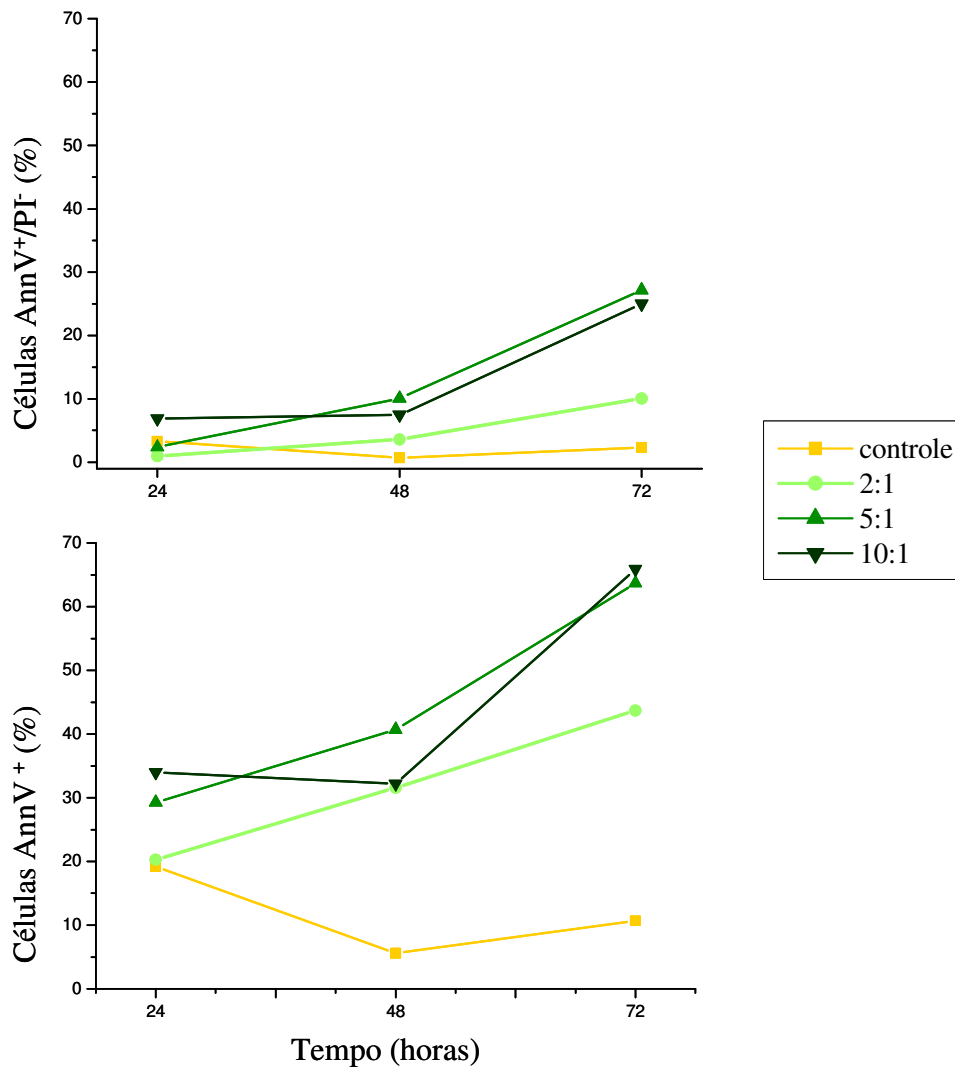


Figura 11- Cinética da exposição de fosfatidilserina em macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*. Macrófagos de BALB/c eram infectados, ou não, com diferentes proporções de *L. amazonensis* (2:1, 5:1 e 10:1). Após intervalos de 24, 48 e 72 horas células eram marcadas com Anexina V-FITC (AnnV) e iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo como descrito em Material e Métodos. Experimento representativo.

gráfico de cinética da exposição de fosfatidilserina (**Fig. 11**). Pode-se observar na **figura 10** que além de um aumento de células no início do processo apoptótico (AnnV^+/PI) e de células necróticas secundárias ou no final do processo apoptótico ($\text{AnnV}^+/\text{PI}^+$), não há um aumento considerável de células mortas por necrose ($\text{AnnV}^-/\text{PI}^+$) quando comparados com valores obtidos no controle.

5 - Fragmentação de DNA de macrófagos incubados com extratos citosólicos ou de membrana de *L. amazonensis*

Uma vez que mostramos que a infecção por *L. amazonensis* causa apoptose em macrófagos de camundongos BALB/c, investigamos a localização da molécula indutora de apoptose. Para isto, incubamos macrófagos de camundongos BALB/c com extratos de membrana e citosólico de *L. amazonensis*. Após diferentes intervalos, extraímos o DNA desses macrófagos e analisamos após corrida eletroforética em gel de agarose. Como mostrado na **figura 12**, não foi observada fragmentação do DNA com nenhum dos dois tratamentos. Este dado pode indicar que o parasita precisa estar íntegro/vivo para induzir a morte dos macrófagos. Ainda não foi possível realizar o mesmo experimento com parasitas mortos para confirmar esta suposição.

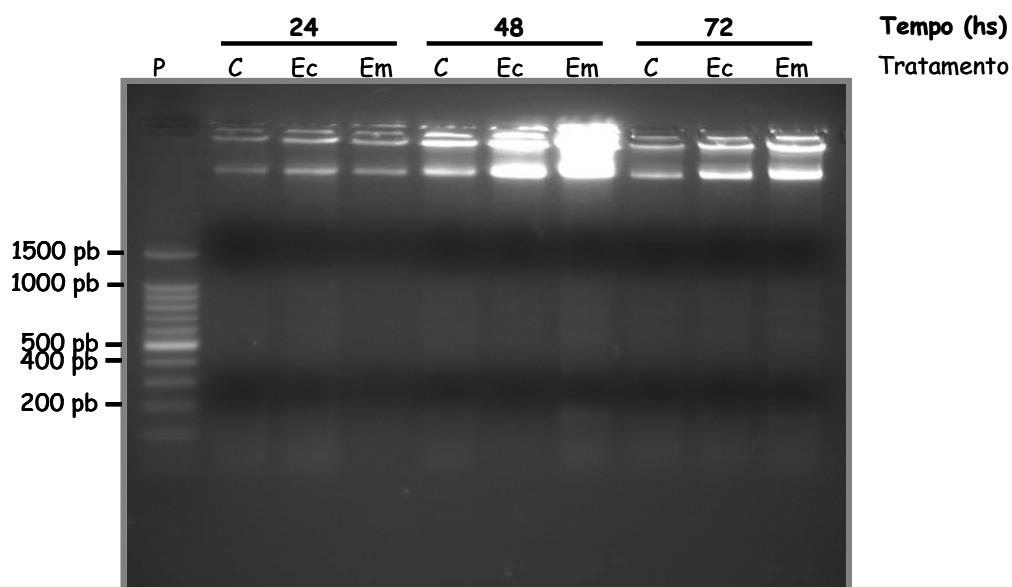


Figura 12- Fragmentação de DNA de macrófagos de camundongos BALB/c incubados com extratos de *L. amazonensis*. DNA de macrófagos incubados (E), ou não (C), com extratos de membrana (Em) ou citosólico (Ec) de promastigotas foi extraído conforme descrito em Material e Métodos nos tempo acima descritos e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,6% a 90 V. P – Padrão de Peso Molecular de escada de 100 pb. Experimento representativo.

DISCUSSÃO

Estudos da infecção por *Leishmania* em modelos murinos têm demonstrado uma complexa interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e os parasitas do gênero *Leishmania* (ALEXANDER *et al.*, 1999; MELBY, 2002; McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004). A biologia do parasita, incluindo os mecanismos de escape das várias espécies, assim como os diferentes fenótipos dos modelos experimentais, permitem um leque de manifestações da doença, que varia desde uma clara susceptibilidade, com doença incontrolável e fatal, até o manejo da infecção, tornando o hospedeiro resistente. Desse modo, o sucesso do parasita depende de sua capacidade de invadir as células do hospedeiro, particularmente o macrófago, de se diferenciar em formas que sobrevivem e se multiplicam dentro das células hospedeiras, de se propagar de uma célula para outra, além de sua capacidade de inibir ou evadir a resposta imune do hospedeiro. Similarmente, o modo como o hospedeiro responde à infecção é também fundamental para o estabelecimento do parasita, e o contato inicial do parasita com as células do hospedeiro são importantes na determinação do curso da infecção.

Após sua interiorização no macrófago, sua transformação promastigota-amastigota e sua multiplicação dentro da célula hospedeira, os parasitas se propagam de uma célula para outra, amplificando a infecção. Em geral, assume-se, por evidências visuais, que os macrófagos se rompem (morrem), como consequência da replicação irrestrita das amastigotas, liberando os parasitas infectantes (BRAY & ALEXANDER, 1987; WILSON & PEARSON, 1990; LIEW & O'DONNELL, 1993; HANDMAN, 1999). Também por evidências visuais, foi sugerido que as amastigotas são liberadas por exocitose, sem ruptura

celular (RITTIG & BOGDAN, 2000).

Por ser uma etapa no ciclo do parasita ainda sem evidências convincentes de como ocorre, e uma vez que relatos de apoptose de células do hospedeiro induzidas por diversos patógenos têm conseqüências no desenvolvimento da mesma, resolvemos investigar se, em decorrência da infecção por *Leishmania*, o macrófago morre e, em caso positivo, se é por apoptose. Nesse estudo restringimo-nos primariamente à infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos BALB/c por *L. amazonensis*, mas alguns experimentos foram feitos com outras espécies de *Leishmania* e com macrófagos de camundongos C57BL/6.

Verificamos no modelo de infecção *in vitro* estabelecido que *L. amazonensis* é capaz de infectar o macrófago, como já demonstrado (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004), além de manter a infecção por pelo menos 72 hs, tempo analisado em nossos ensaios. Uma vez que a taxa de infecção e a multiplicação são passos importantes para a estabilização do parasita e amplificação da moléstia, acompanhamos esses dois parâmetros na infecção *in vitro* de macrófagos de BALB/c por *L. amazonensis*. Mostramos que a magnitude da infecção é diretamente proporcional ao número de parasitas por macrófago utilizados na infecção, considerando-se tanto a percentagem de células infectadas como o número de parasitas encontrados no interior da célula (**Fig. 3**). Nossos resultados indicaram que as amastigotas de *L. amazonensis* sobrevivem e se multiplicam no interior de macrófagos de BALB/c no tempo analisado. É interessante notar que, quando a infecção é mais branda, o número de amastigotas intracelulares permanece constante, mostrando que nessas condições há um controle da multiplicação dos parasitas, assim como observado em infecções por *L. major* (SACKS & NOBENTRAUTH, 2002). O estabelecimento da infecção *in vitro* em macrófagos de camundongos BALB/c não é padrão para todas as espécies de *Leishmania*. Em uma infecção por *L. guyanensis*, por exemplo, os mesmos macrófagos conseguem, por mecanismos que

envolvem a explosão respiratória, eliminar os parasitas em seu interior, impedindo o estabelecimento da infecção (SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006).

Uma vez estabelecido o modelo de infecção *in vitro*, investigamos a taxa de mortalidade dos macrófagos infectados, comparada com a dos macrófagos não infectados. Utilizamos inicialmente ensaios de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium bromide)], baseado na redução de sais de tetrazolium (resultados não mostrados) que, após várias tentativas, não se mostraram adequados uma vez que os parasitas também metabolizam o formazano, impedindo a quantificação correta da mortalidade das células infectadas. Dois outros ensaios, que medem a integridade da membrana celular (azul de Trypan e cristal violeta), foram utilizados, mas também sem sucesso. Finalmente, utilizamos a permeabilidade ao corante fluorescente PI, no qual as células mortas, permeáveis, foram quantificadas por citometria de fluxo. Por este método foi observada uma morte dos macrófagos ao longo da infecção, sendo maior nas proporções de 5 e 10 parasitas por macrófago (**Fig.4**). Apesar desta mortalidade dos macrófagos infectados, a taxa de infecção não diminuiu com o tempo e a multiplicação dos parasitas não foi reduzida (**Fig. 3**). É possível que morte induzida dos macrófagos possa auxiliar no estabelecimento da infecção como já descrito para *Shigella flexneri* (ZYCHLINSKY, 1993; RAQIB *et al.*, 2002), *Salmonella typhimurium* (MONACK *et al.*, 1996), *Trichomonas vaginalis* (CHANG *et al.*, 2006), alguns vírus e outros patógenos (DOCKRELL, 2001).

A morte da célula hospedeira por necrose, em princípio, não seria desejável para o parasita intracelular, uma vez que este necessita da célula para sua sobrevivência. Além disso, a indução de necrose acarretaria uma reação inflamatória com a ativação de vários mecanismos de resposta do hospedeiro (MONACK *et al.*, 1996; SAVILL & FADOK, 2000; ORLOFSKY *et al.*, 2002). No entanto, induzir um processo que, num primeiro

momento, facilita a fagocitose e a interiorização dos parasitas é de conveniência dos mesmos para que se estabeleça uma infecção mais rápida e eficiente (McCOLE *et al.*, 2000; ALLENBACH *et al.*, 2006; MENAKER *et al.*, 2004; WANDERLEY, *et al.*, 2006). Assim, tornou-se óbvio investigar se os macrófagos estavam morrendo por apoptose. Para verificar se *L. amazonensis* estava induzindo apoptose em suas células hospedeiras, no modelo aqui estudado, investigamos algumas características marcantes da apoptose.

A fragmentação do DNA, ainda que observado em vários tipos de morte celular (BOWEN, 1993; GRASL-KRAUPP, 1995; VERMES *et al.*, 2000; HAIL JR. *et al.*, 2006), é considerado umas das principais alterações celulares da apoptose e este foi o primeiro parâmetro analisado. Inicialmente, utilizamos o método mais simples de análise do DNA através da eletroforese em gel de agarose. Foi observada a presença de um nítido padrão “escada” em culturas de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados *in vitro* com *L. amazonensis*, apresentando fragmentos dos tamanhos esperados pela ação de endonucleases (**Fig. 5**).

Inicialmente, o padrão “escada” encontrado deu origem à dúvida de qual seria a origem deste DNA fragmentado, uma vez que na preparação havia mistura de DNA de hospedeiro e parasita. Em uma primeira tentativa para descartar que a fragmentação de DNA pertencia a *L. amazonensis*, induzimos apoptose em promastigotas, como já descrito na literatura (HOLZMULLER *et al.*, 2002), e extraímos seu DNA para análise. Observamos um padrão de fragmentação distinto do observado anteriormente (**Fig. 7**), com fragmentação demonstrada pelo “rastros” de DNA no gel, mas sem o padrão “escada”. ZAGGEN *et al.* (2002) HOLZMULLER *et al.* (2002) e DAS *et al.* (2001) sugerem que em *Leishmania* ocorre uma fragmentação similar do padrão tipo “escada”, com fragmentos de tamanhos equivalentes a 180-200 pb. DAS e colaboradores (2001), no entanto, argumentam acerca da fragmentação dos nucleossomos, que não se apresenta de maneira

clara como quando em metazoários, possuindo um rastro ao longo do gel, como verificado em nossos experimentos (**Fig. 7**). ESPINOZA e colaboradores (1996) demonstraram diferenças na estrutura e tamanho dos nucleossomos da família *Trypanosomatidae*, quando comparado com os demais eucariotos, acarretando em uma maior fragilidade a ataques à cromatina. Essa seria uma provável causa do padrão distinto observado na fragmentação de DNA. De qualquer forma, o padrão nítido de “escada” observado na mistura de DNA não parece ser originário do DNA de *L. amazonensis*.

Uma forma de confirmar que o DNA fragmentado durante a infecção era de origem da célula hospedeira foi pela análise da fragmentação em microscópio de fluorescência *in situ* após coloração pelo método de TUNEL. Visualmente, pudemos verificar que a fragmentação do DNA ocorria nos núcleos dos macrófagos o que permitiu que quantificássemos os macrófagos com DNA fragmentado ao longo da infecção. Observamos a presença de fragmentação do DNA no núcleo de macrófagos infectados (**Fig. 8A**) e resultados preliminares sugerem que esta fragmentação começa a ocorrer entre 2 e 3 hs após contato dos macrófagos com as formas promastigotas (**Fig. 8B**). Nesses experimentos, não observamos correlação com o número de parasitas utilizados. Estes dados, no entanto, não significam que o contato do parasita com o macrófago em si induziria a morte do último, pois apesar da fragmentação de DNA ocorrer algumas horas após a indução da apoptose, COURRET e colaboradores (2002) demonstraram que a infecção ocorre rapidamente, e que após 30 a 60 minutos já há um alto número de parasitas internalizados.

A análise de um segundo aspecto da apoptose, a exposição de PS na membrana externa da célula foi realizada em culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis*. A PS está associada com o reconhecimento para a fagocitose de células apoptóticas antes do extravasamento do conteúdo celular resultando em uma morte silenciosa e sem inflamação

(KAGAN *et al.*, 2002; FADOK *et al.*, 2000). A anexina V (AnnV), que é o marcador utilizado para a demonstração da presença de PS, foi utilizada em conjugação com FITC e sua ligação às células foi analisada por citometria de fluxo. Não foram realizados experimentos em tempo menores de 24 horas nos experimentos de coloração por AnnV e PI devido a limitações no protocolo utilizado. Está descrito na literatura que o destacamento de células aderentes, inclusive por auxílio de tripsina, induziria a célula a expor PS por um período de tempo (van ENGELAND *et al.*, 1996; VERMES *et al.*, 2000). Assim, a marcação dessas células resultaria em um alto número de falso positivo para apoptose. Para eliminar este problema seguimos a metodologia descrita por CATELAS *et al.* (2005), onde as células eram raspadas, ressuspensas em meio de cultura novo e incubadas *overnight* em suspensão, permitindo a recuperação das células do procedimento.

Durante todo o intervalo observado houve um decaimento de células viáveis nas culturas, principalmente em infecções com proporções de 5:1 e 10:1 (**Figs. 10**). Simultaneamente, é observada a exposição de PS, que ocorre já no início do processo apoptótico e indica um “ponto sem retorno” (van ENGELAND *et al.*, 1998; VERMES *et al.*, 1996; VERMES *et al.*, 2000), pois está associada com o reconhecimento para a fagocitose de células apoptóticas antes do extravasamento do conteúdo celular (KAGAN *et al.*, 2002; FADOK *et al.*, 2000). Com o método utilizado, tendo como contra coloração o PI, que permeia as células com membranas danificadas (**Fig. 10**), podemos quantificar as células viáveis (AnnV⁻/PI⁻), células necróticas (AnnV⁻/PI⁺), apoptóticas (AnnV⁺/PI⁻) e necróticas e apoptóticas tardias (AnnV⁺/PI⁺), estas últimas são células que se encontram ou em uma fase posterior da apoptose, onde já houve perda da integridade da membrana plasmática, também chamadas de necróticas secundárias (VERMES *et al.*, 2000; SUSKA *et al.*, 2005). Nossos experimentos mostraram claramente um aumento considerável na exposição de PS nas células infectadas quando comparadas com as células não infectadas.

Ela ocorre de maneira dependente do tempo de infecção e da proporção de parasitas utilizada (**Fig. 10**) e, em tempos mais tardios de infecção, ocorre em grande parte da população infectada. Considerando apenas as populações em início de apoptose (AnnV^+/PI), que é a população claramente em apoptose, já verificamos que, em 72 hs, sua frequência chega a atingir cerca de $\frac{1}{4}$ da população de macrófagos (**Figs. 10 e 11**). As células duplo-positivas ($\text{AnnV}^+/\text{PI}^+$) são consideradas uma população mista de células necróticas e de células mortas consideradas fase apoptóticas tardias (VERMES *et al.*, 2000). Em nossos experimentos, é mesmo provável que as células $\text{AnnV}^+/\text{PI}^+$ sejam derivadas das células apoptóticas (AnnV^+/PI) uma vez que são essas e não as células $\text{AnnV}^-/\text{PI}^+$ que aumentam dentro da população total de células infectadas. A frequência dessas últimas é pouco alterada nas células infectadas em todas as proporções de parasita:célula e em todos os tempos analisados. Desta forma, já em 24 hs podemos observar cerca de $\frac{1}{4}$ da população em apoptose, sendo que ao final de 72 hs até cerca de 70% da população é de células apoptóticas (**Figs. 10 e 11**). É interessante notar que mesmo quando a infecção é controlada (proporção de 2 parasitas/célula) (**Fig. 3**), há a indução de apoptose, embora de maneira geral menor que nas proporções de 5 e 10:1 (**Figs. 3, 10 e 11**).

As células duplo positivas podem ser consideradas como consequência de uma fagocitose insuficiente, gerando células apoptóticas com a membrana plasmática sem integridade, comuns em culturas celulares (VERMES *et al.*, 2000). Esta deficiência na fagocitose pode ser uma explicação para o aumento gradual observado no quadrante superior direito ($\text{AnnV}^+/\text{PI}^+$) na maioria dos tratamentos, acompanhando o aumento de células AnnV^+/PI , crescente em uma proporção maior.

A janela analisada foi escolhida considerando-se determinados tamanhos e granulosidades, a partir dos quais encontravam-se células CD11b^+ (**Fig. 9**). Ao analisarmos

o perfil de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células infectadas e não infectadas com *L. amazonensis*, já são visíveis as alterações morfológicas no macrófago infectado (**Fig. 9**). De uma maneira geral, visualizamos um padrão com células menores e mais granulosas, condizente com a morfologia de células apoptóticas, dependente do tempo e do número de parasitas utilizados. O aumento da granulosidade observado pode ser devido aos vacúolos parasitóforos infestados de parasitas, bem marcantes nas infecções por *L. amazonensis*. O aumento da granulosidade e a diminuição do tamanho celular também é um indicador de apoptose em fase inicial (AnnV⁺/PI) como já descrito por VERMES *et al.*, 2000 e CATELAS *et al.*, 2005. Esta relação é devido à condensação da cromatina durante a apoptose, que ocorre antes da fragmentação da mesma. Ao observarmos os valores obtidos pelo TUNEL (**figura 8**) e os valores resultantes da marcação com AnnV (**figura 10 e 11**) pode-se observar uma diferença no número de células positivas para os marcadores e na dependência da proporção parasitas/macrófagos, mesmo que não coincidindo os tempos de infecção. Esta diferença pode ser devida a três fatores principais. Primeiramente, a exposição de PS se dá em estágios iniciais do processo apoptótico e permanece ao longo de todo o processo, enquanto a fragmentação do DNA detectável pelo TUNEL se encontra apenas em eventos mais tardios do processo. Outra razão seria que durante a marcação por AnnV e PI utilizamos todas as células presentes na cultura, aderidas ou não, enquanto que para a marcação com TUNEL utilizamos principalmente as células ainda aderidas, praticamente descartando as células em suspensão. Uma última justificativa para esta diferença nos resultados se dá pela marcação por TUNEL, no qual as células necessitam passar por vários processos de lavagem, levando a uma perda ainda maior no número de células fixadas (VERMES *et al.*, 2000).

Nossos resultados demonstrando a fragmentação do DNA de macrófagos peritoneais infectados, e a exposição de fosfatidilserina mostram que a infecção por *L.*

amazonensis induz apoptose nessas células hospedeiras. A indução de apoptose poderia tanto ser pelo contato das formas promastigotas com o macrófago como pela interação de moléculas da forma interiorizada do parasita, durante a transformação em amastigotas. Assim, buscamos, em seguida, investigar qual seria o sinal que induziria a morte celular programada no macrófago. Para isso, incubamos os macrófagos com os extratos citosólico e de membrana e investigamos se havia indução de apoptose, por visualização de DNA fragmentado em gel de agarose. Verificamos que nenhum dos extratos foi capaz de induzir a fragmentação de DNA (**Fig.12**), mostrando a importância da integridade do parasita nesta indução. Esta poderia ser então, devido a ações conjuntas do parasita vivo ou até mesmo da interação das moléculas de superfície do parasita, degradadas durante a produção do extrato de membrana. Assim, experimentos posteriores serão realizados para determinarmos se é necessário que o parasita esteja viável para induzir a apoptose nos macrófagos. No entanto, merece ser destacado que a integridade da membrana é perdida mesmo durante a fixação do parasita com formaldeído, que gera alterações nos agrupamentos amina de proteínas e peptídeos (SMITH, 2000), ou por indução térmica, onde o calor é capaz de desnaturar elementos protéicos (NELSON & COX, 2004). Assim, para obtermos resultados confiáveis para testar a importância da viabilidade do parasita no processo de indução de apoptose, há necessidade de obtermos um método apropriado para a fixação do parasita.

Foi demonstrado recentemente que, durante infecções por *L. amazonensis*, há presença de parasitas expondo fosfatidilserina no hospedeiro. Com a retirada destes parasitas apoptóticos, a infecção é reduzida e a resposta do hospedeiro é amplificada (WANDERLEY *et al.*, 2006), indicando que a fagocitose de células apoptóticas reduz a ativação dos macrófagos. Essa ativação deficiente levaria a uma queda na produção de NO e uma conseqüente sobrevivência maior do parasita (ZANDBERGEN *et al.*, 2006; SAKAI

et al., 1999). Este poderia ser um mecanismo similar ao observado pela indução de apoptose dos macrófagos por *L. amazonensis*, uma vez que a fagocitose dessas células também poderia inibir a resposta inflamatória no local da infecção. Além do mais, a fagocitose de células infectadas poderia ser um fator amplificador da doença uma vez que esta poderia ser uma forma de carrear as amastigotas que já se multiplicaram no interior do macrófago para células saudáveis.

Em experimentos iniciais para verificarmos a ocorrência de apoptose de diferentes hospedeiros induzida por diferentes espécies, analisamos em gel de agarose, a ocorrência de fragmentação de DNA induzida em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* e de macrófagos de camundongos BALB/c infectados por *L. major* ou *L. guyanensis*. Um padrão semelhante de fragmentação de DNA (em “escada”) também está presente em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem C57BL/6 (**Fig. 6 A**) cujo perfil de susceptibilidade à infecção por *L. amazonensis* é totalmente diferente do de camundongos BALB/c: Camundongos C57BL/6 desenvolvem lesão nas primeiras semanas de infecção, mas é capaz de controlar a infecção e curar as lesões, embora não sejam capazes de eliminar o parasita (JI *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2002). No entanto, esta linhagem apresenta várias respostas semelhantes às de BALB/c no início da infecção (McMAHON-PRATT & ALEXANDER, 2004) e é possível que a apoptose nos macrófagos seja uma delas.

Por outro lado, não observamos fragmentação do DNA em macrófagos de BALB/c infectados por *L. major* (**Fig. 6 B**), espécie à qual a linhagem se apresenta susceptível, como na infecção por *L. amazonensis*. CONCEIÇÃO-SILVA e colaboradores (1998) demonstraram que a apoptose de macrófagos é um importante fator na resolução de infecções por *L. major*, levando a resolução da lesão. Também foi demonstrado que *L. major* é capaz de retardar a morte celular por apoptose de neutrófilos por um período de

cerca 24 horas, período no qual chegam os macrófagos no local de infecção (AGA *et al.*, 2002; LASKAY *et al.*, 2003). Estes trabalhos demonstram que a presença de apoptose durante a infecção por *L. major* leva a resolução da lesão, mas que a inibição da mesma pelo parasita é capaz de aumentar a infecção.

A ausência de fragmentação do DNA em macrófagos de BALB/c infectados por *L. guyanensis* (**figura 6 B**), uma das poucas espécies de *Leishmania* na qual esta linhagem é resistente, também corroborou com os resultados demonstrados em nosso grupo por SOUSA-FRANCO e colaboradores (2006). Este trabalho demonstrou que em infecções de macrófagos de BALB/c por *L. guyanensis* não só leva à eliminação do parasita por apoptose, como também este controle não é resultado de uma morte da célula hospedeira. É possível observar um leve rastro de fragmentação observado nas canaletas referentes à infecção por *L. guyanensis* (**figura 5 B**). Este rastro mostra-se distinto do observado em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, mais uma vez em concordância com experimentos realizados por SOUSA-FRANCO e colaboradores (2006).

Estes resultados nos levam a interpretar que a morte dos macrófagos não é induzida como um fator que levaria, obrigatoriamente, à susceptibilidade durante a infecção *in vitro*, mas sim que ela seria particular da biologia de *L. amazonensis*, quando comparados com *L. major* e *L. guyanensis*.

As diferenças entre as infecções com *L. major* e *L. amazonensis*, apesar dos mesmos modelos murinos, evidenciam uma diferença entre as espécies, nos levando a supor uma diferença nos mecanismos de evasão e estabilização entre as duas espécies. Diferentes mecanismos de evasão podem gerar diferentes respostas no hospedeiro, assim como observado entre as infecções.

Concluindo, mostramos que *L. amazonensis* é capaz de induzir apoptose em macrófagos *in vitro* já nos primeiros momentos de infecção. Esta morte parece ser

dependente da integridade do parasita e pode ser mais um mecanismo de evasão do parasita, em uma tentativa de reduzir a resposta do macrófago.

Este é um trabalho inicial onde detectamos a apoptose, e certamente ainda faz-se necessário realizar diversos experimentos para melhor caracterizar este processo apoptótico de macrófagos induzido pela infecção por *L. amazonensis*. Os experimentos prioritários serão focados para a determinação da ativação de caspases, e da ocorrência desse fenômeno *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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: 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. C. C., SCHARTON, T. M., VIEIRA, L. Q., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., SCOTT, P. (1994) *The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against Leishmania major*. **Science** 263: 235-237
- 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*. **Journal of Immunology** 169: 898-905
- ALEXANDER, J., SATOSKAR, A. R., RUSSEL, D. G. (1999) *Leishmania species: models of intracellular parasitism* **Journal of Cell Science** 112: 2993-3002
- ALLENBACH, C., ZUFFEREY, C., PEREZ, C., LAUNOIS, P., MUELLER, C., TACCHINI-COTTIER, F. (2006) *Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by L. major*. **Journal of Immunology** 176: 6656-6664
- ARANHA, F. C. S., RIBEIRO JR, U., BASSE, P., LAURENTI, M. D. (2005) *Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of Leishmania*

- (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. **Scandinavian Journal of Immunology** 62: 334-341
- BAEHRECKE, E. H. (2002) *How death shapes life during development*. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology** 3: 779-787
- BARRAL-NETTO, M., VON SOHSTEN, R. L., TEIXEIRA, M., CONRADO DOS SANTOS, W. L., POMPEU, M. L., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B.S., FALCOFF, E., BARRAL, A. (1996) *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica** 60: 237-250
- 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
- BOGDAN, C., ROLLINGHOFF, M., DIEFENBACH, A. (2000) *The role of nitric oxide in innate immunity*. **Immunological Reviews** 173: 17-26
- BOTTREL, R. L., DUTRA, W. O., MARTINS, F. A., GONTIJO, B., CARVALHO, E., BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., ALMEIDA, R. P., MAYRINK, W., LOCKSLEY, R., GOLLOB, K. J. (2001) *Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis*. **Infection and Immunity** 69: 3232-3239.
- BOWEN, I. D. (1993) *Apoptosis or programmed cell death?* **Cell Biology International** 17: 365-379
- BRAY, R.S. & ALEXANDER, J. (1987) *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, pp.:211–233.
- 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
- 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 Th2 response in Leishmania major-infected mice*. **The Journal of Immunology** 148: 1182-1187
- CONCEIÇÃO-SILVA, F., HAHNE, M., SCRÖTER, M., TSCHOPP, J. (1998) *The resolution of lesions induced by Leishmania major in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity*. **European Journal of Immunology** 28: 237-245
- COURRET, N., FRÉHEL, C., POUCHELET, M., PRINA, E., ROUX, P., ANTOINE, J. (2002) *Biogenesis of Leishmania-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites*. **Journal of Cell Science** 115: 2303-2316
- CROAN, D. G., MORRISON, D. A., ELLIS, J. T. (1997) *Evolution of the genus Leishmania revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences*. **Molecular Biochemical Parasitology** 89: 149-159
- DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. (1989) *CRI, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic*

- promastigotes to human macrophages. The Journal of Immunology* 143: 617-622
- DAS, M., MUKHERJEE, S. B., SHAHA, C. (2001) *Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. Journal of Cell Science* 114: 2461-2469
- DERMINE, J., SCIANIMANICO, S., PRIVÉ, C., DESCOTEAUX, A., DESJARDINS, M. (2000) *Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of fagocytosis. Cellular Microbiology* 2: 115-126
- DESJEUX, P. (1996) *Leishmaniasis Public health aspects and control. Clinics in Dermatolology* 14: 417-423
- DOCKRELL, D. H. (2001) *Apoptotic cell death in the pathogenesis of infectious diseases. Journal of Infection* 42: 227-234
- ESPINOZA, I., TORO, G. C., HELLMAN, U., GALLANTI, N (1996) *Histone H1 and core histones in Leishmania and Crithidia: Comparison with Trypanosoma. Experimental Cell Research* 224: 1-7
- FADOK, V. A., BRATTON, D. L., ROSE, D. M., PEARSON, A., EZEKEWITZ, R. A. B., HENSON, P. M. (2000) *A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature* 405: 85-90
- 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
- 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

- GERKE, V. & MOSS, S. E. (1997) *Annexins and membrane dynamics*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1357: 129-154
- GIAMIS, J., LOMBARD, Y., MAKAYA-KUMBA, M., FONTENEAU, P., POINDRON, P. (1992) *A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts*. **Journal of Immunological Methods** 154: 185-193
- GORDON, S., UNKELESS, J. C., COHN, Z. A. (1974) *Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis: evidence for a two-stage process*. **The Journal of Experimental Medicine** 140: 278-283
- GOUGEON, M. (2003) *Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack*. **Nature Reviews Immunology** 3: 392-404
- GRASL-KRAUPP, B., RUTTKAY-NEDECKY, B., KOUDELKA, H., BUKOWSKA, K., BURSCH, W., SCHULTE-HERMAN, R. (1995) *In situ detection of DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note*. **Hepatology** 21: 1465-1468
- GREEN, S. J., CRAWFORD, R. M., HOCKMEYER, J. T., MELTZER, M. S., NACY, C. A. (1990) *Leishmania major amastigotas initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ stimulated macrophages by induction of Tumor Necrosis Factor- α* . **The Journal of Immunology** 145: 4290-4207
- 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: 942-51
- 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
- HANDMAN, E. (1999) *Cell biology of Leishmania*. **Advances in Parasitology** 44:1-39.
- HEINZEL, F. P., SCHOENHAUT, D. S., RERKO, R. M., ROSSER, L. E., GATELY, M. K. (1993) *Recombinant Interleukin 12 cures mice infected with Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine** 177: 1505-1509
- 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
- 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
- ILG, T. (2000) *Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by Leishmania mexicana. EMBO Journal* 19: 1953-1962
- 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. Journal of Immunology* 165: 364-372
- JULIA, V., GLAICHENHAUS, N. (1999) *CD4+ T cells which react to the Leishmania major LACK antigen rapidly secrete Interleukin-4 and are detrimental to the host in resistant B10.D2 mice. Infection and Immunity* 67: 3641-3644
- 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.* **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
- KELLY, B. L., STETSON, D. B., LOCKSLEY, R. M. (2003) *Leishmania major* LACK antigen is required for efficient vertebrate parasitization. **Journal of Experimental Medicine** 198: 2689-1698
- 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
- LAURENTI, M. D., GIDLUND, M., URA, D. M., SINHORINI, I. L., CORBETT, C. E. P., GOTO, H. (1999) *The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis.* **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 32: 323-325
- 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.* **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
- LIEW, F. Y. & O'DONNELL, C. A. (1993) *Immunology of leishmaniasis*. **Advances in Parasitology** 32: 161-259
- LODGE, R. & DESCOTEAUX, A. (2005) *Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania*. **Clinical Immunology** 114: 256-265
- 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 leishmaniases or the visceral disease?* **Immunological Reviews** 201: 206-224
- McNEELY, T. B. & TURCO S. J. (1990) *Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes*. **The Journal of Immunology** 144: 2745-2750
- 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
- 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*. **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
- NELSON, D. L. COX, M. M. (2004) **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4^a. edição, W.H. Freeman and Company
- NEVES, D. P., MELO, A. L., GENARO, O., LINARDI, P. M. (2000) **Parasitologia Humana**. 10^a edição, São Paulo: Editora Ateneu
- 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
- NORSWORTHY, N. B., SUN, J., ELNAIEM, D., LANZARO, G., SOONG, L. (2004) *Sand fly saliva enhances Leishmania amazonensis infection by modulating Interleukin-10 production*. **Infection and Immunity**, 72: 1240-1247
- 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
- OMS (2001) – endereço eletrônico <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/leish->

[poster.pdf](#), visitado dia 08 de fevereiro de 2007.

- OPFERMAN, J. T. & KORSMEYER, S. J. (2003) *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system*. **Nature Immunology** 4: 410- 415
- ORLOFSKY, A., WEISS, L. M., KAWACHI, N., PRYSTOWKY, M. B. (2002) *Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response*. **Journal of Immunology** 168: 1840-1846
- 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 Chlamydomphila 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
- 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-x_L via an oxygen-dependent pathway*. **Journal Immunology** 168: 6358-6365
- PETERSEN, C. A., KRUMHOLZ, K. A., CARMEN, J., SINAI, A. P., BURLEIGH, B. A. (2006) *Trypanosoma cruzi infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells*. **Infection and Immunity** 74: 1580-1587
- PLACIDO, R., MANCINO, G., AMENDOLA, A., MARIANI, F., VENDETTI, S., PIACENTINI, M., SANDUZZI, A., BOCCHINO, M. L., ZEMBALA, M., COLIZZI, V. (1997) *Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection*. **Journal of Pathology** 181: 31-38

- 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
- 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
- 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., BRODSKYN, 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
- 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., MODI, G., ROWTON, E., SPÄTH, G., EPSTEIN, L., TURCO, S. J., BEVERLEY, S. M. (2000) *The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. **Proceedings in the National Academy of Sciences USA** 97: 406-411*
- 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*
- SAVILL, J. & FADOK, V. (2000) *Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature** 407: 784-788*
- 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. & SHER, A. (1996) *A spectrum in the susceptibility of leishmanial strains to intracellular killing by murine macrophages. **Journal of Immunology** 136: 1461-1466*
- 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*
- 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*
- SMITH, A. D. (2000) **Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology**. 2^a.

- edição, Oxford: Oxford University Press
- 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*
- SPÄTH, G. F., EPSTEIN, L., LEADER, B., SINGER, S. M., AVILA, H. A., TURCO, S. J., BEVERLEY, S. M. (2000) *Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 97: 9258-9263*
- STEVENS, J. R., NOYES, H. A., SCHOFIELD, C. J., GIBSON, W. (2001) *The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Advances in Parasitology** 48: 1-56*
- 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., 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+ Th2 response in BALB/c mice infected with Leishmania major. **The Journal of Immunology** 165: 2628-2636*
- TEIXEIRA, C. R., TEIXEIRA, M. J., GOMES, R. B., SANTOS, C. S., ANDRADE, B. B., RAFFAELE-NETTO, I., SILVA, J. S., GUGLIELMOTTI, A., MIRANDA, J.C, BARRAL, A., BRODSKYN, C., BARRAL-NETTO, M. (2005) *Saliva from Lutzomyia longipalpis induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of Immunology** 175:*

8346-53

- TORRENTERA, F. A., GLAICHENHAUS, N., LAMAN, J. D., CARLIER, Y. (2001) *T-cell response to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining susceptibility of BALB/c mice to Leishmania mexicana*. **Infection and Immunity** 69: 617-621
- TORRENTERA, F. A., LAMAN, J. D., MEURS, M. V., ADORINI, L., MURAILLE, E., CARLIER, Y. (2002) *Endogenous Interleukin-12 is critical for controlling the late but not early stage of Leishmania mexicana infection in C57BL/6 mice*. **Infection and Immunity** 70: 5075-5080
- TRAMBAS, C. M. & GRIFFITHS, G. M. (2003) *Delivering the kiss of death*. **Nature Immunology** 4: 399-403
- TURCO, S. J., SPATH, G. F., BEVERLY, S. M. (2001) *Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species*. **Trends in Parasitology** 17: 223-226
- van ENGELAND, M., NIELAND, L. J. W., RAMAEKERS, F. C. S., SCHUTTE, B., REUTELINGSPERGER, C. P. M. (1998) *Annexin V-affinity assays: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure*. **Cytometry** 31: 1-9
- van ENGELAND, M., RAMAEKERS, F. C. S., SCHUTTE, B., REUTELINGSPERGER, C. P. M., (1996) *A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture*. **Cytometry** 24: 131-139
- 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
- WALTERS, L. L. (1993) *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. **Journal of Eukaryotic Microbiology** 40: 196-206
- WANDERLEY, J. L. M., MOREIRA, M. E. C., BENJAMIN, A., BONOMO, A. C., BARCINSKI, M. A. (2006) *Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts. The Journal of Immunology* 176: 1834-1839
- 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
- WILHELM, P., RITTER, U., LABBOW, S., DONHAUSER, N., RÖLLINGHOFF, M., BOGDAN, C., KÖRNER, H. (2001) *Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. The Journal of Immunology* 166: 4012-4019
- WILSON, M. E. & PEARSON, R. D. (1990) *Immunology of leishmaniasis*. In: Wyler, D. J., **Modern parasite biology**. New York: Freeman, pp. 200-221.
- 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. (1993). *Programmed cell death in infectious diseases*. **Trends in Microbiology** 1: 114-117.