

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA TAVARES CYRINO

**“AVALIAÇÃO DO PROCESSO AUTOFÁGICO DE  
MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *LEISHMANIA  
AMAZONENSIS*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>LARISSA TAVARES CYRINO</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Selma Giorgio

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C993a

Cyrino, Larissa Tavares  
Avaliação do processo autofágico de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* / Larissa Tavares Cyrino. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Selma Giorgio.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Autofagia. 2. Macrófagos. 3. *Leishmania amazonenses*. I. Giorgio, Selma, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Evaluation of the autophagic process of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*.

**Palavras-chave em inglês:** Autophagy; Macrophages; *Leishmania amazonensis*.

**Área de concentração:** Imunologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Selma Giorgio, Maria Heloísa de Souza Lima Blotta, Liana Maria Cardoso Verinaud.

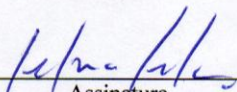
**Data da defesa:** 19/05/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.


Campinas, 19 de maio de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

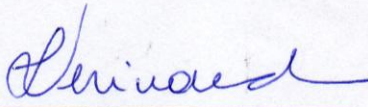
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> . Selma Giorgio (Orientadora)

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> . Maria Heloísa de Souza Lima Blotta

  
Assinatura

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> . Liana Maria Cardoso Verinaud

  
Assinatura

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr<sup>ª</sup> . Edlaine Linares

\_\_\_\_\_  
Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas, São Paulo, com apoio financeiro do CNPq e da FAPESP (Processo número: 2009/01816-9)

À minha mãe, meu maior  
exemplo de vida, amor e  
dedicação.

Ao meu amor, Gustavo. Por todos os anos de companheirismo, carinho e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP;

À professora Selma Giorgio, por ter acreditado em meu potencial, pelos ensinamentos, orientação e paciência durante esses anos;

Aos técnicos e professores e amigos do Departamento de Biologia Animal/ Parasitologia pelo auxílio, apoio e amizade durante a execução deste trabalho;

A todos os amigos do Laboratório de Leishmaniose, obrigada pelo apoio, pelos conselhos, pelos ensinamentos, discussões, pelos momentos de descontração tão importantes durante esses anos.

Adriana, Ademar, Alexandra, Bárbara, Flávia, Juliana, Marina, Myriam e Solange, sem vocês nada disso teria acontecido!

Às amigas de república, Ana, Beatriz, Germanna, Heloísa, Luciana, Marina, Izabela, Olívia e Priscila. Muito obrigada pelo carinho, pela companhia, pelos conselhos e pela amizade. Vocês fizeram de Campinas o meu lar nesse último ano!

Aos amigos Aline, Luciana, Juliana, Meissa, Priscila, Sami, Carlos, José Jadsom, Júlio, Daniel, Luciana e Claudineide pela alegria, pelo carinho, pela atenção e pelo apoio;

A toda família do meu namorado, especialmente à Celma, ao Adão, ao Rodrigo e ao Rafael, que me acolheram tão maravilhosamente durante todos esses anos, muito obrigada por todo o apoio, carinho, ensinamentos e orações;

Aos meus avós, tios e primos, que me acompanharam em cada etapa da minha vida, me apoiando e orientando em cada decisão. Muito obrigada pelo carinho e por todos os momentos de alegria compartilhados, tão importantes para mim;

À minha mãe, Dora, meu irmão, Lucas e ao meu padrasto, César pelo apoio incondicional em minhas decisões, por todo amor e carinho. Jamais poderei retribuir tudo o que foi me oferecido durante toda minha vida. Vocês são o meu bem mais precioso;

Ao meu namorado Gustavo. Todo seu amor, dedicação, carinho e paciência foram fundamentais para essa conquista;

A Deus, por sempre me iluminar e guiar minhas escolhas.



## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	vii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1.Introdução.....	1
1.1. Aspectos gerais da autofagia.....	1
1.2.Aspectos gerais e modelos experimentais da leishmaniose.....	4
1.3. <i>Leishmania</i> , macrófagos e autofagia.....	7
2. Objetivos.....	10
3. Materiais e métodos.....	11
3.1. Células.....	11
3.1.1. Macrófagos derivados de medula óssea.....	11
3.1.2. Células L929.....	11
3.1.3. Macrófagos Raw 264.7.....	12
3.2. Parasitas e infecção.....	12
3.2.1. Parasitas.....	12
3.2.2. Infecção de macrófagos derivados de medula óssea.....	13
3.2.3 Infecção de macrófagos Raw 264.....	13
3.3. <i>Western blotting</i> para detecção de LC3.....	13
3.4. Contagem da carga parasitária.....	14
3.5. Microscopia eletrônica de transmissão.....	15
3.6. Microscopia de fluorescência para detecção de atividade lisossomal.....	15

3.7. Indução de autofagia.....	16
3.8. Ativação de macrófagos.....	16
3.9. Análise dos resultados.....	17
4. Resultados.....	18
4.1. Padronização dos ensaios de <i>western blotting</i> para detecção de LC3.....	18
4.2. A infecção causada por <i>L. amazonensis</i> induz autofagia em macrófagos Raw 264.7 e em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos de diferentes linhagens.....	20
4.3. Correlação entre o índice de infecção e autofagia.....	27
4.4. Efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de BMDMs de camundongos BALB/c.....	29
4.5. Efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6.....	34
4.6. Visualização de BMDMs de camundongos BALB/c por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	38
4.7. Análise da atividade lisossomal de BMDMs de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	39
5. Discussão.....	42
6. Conclusão.....	49
7. Referências bibliográficas.....	50
8. Anexo.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos de BALB/c infectados com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	6
Figura 2	- Padronização do sistema de <i>western blotting</i> para detecção de LC3.....	19
Figura 3	- A infecção causada por <i>L. amazonensis</i> induz autofagia em macrófagos Raw 264.7.....	22
Figura 4	- Comparação do índice de infecção de diferentes macrófagos com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	23
Figura 5	- Análise do processo autofágico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	25
Figura 6	- Análise do processo autofágico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	26
Figura 7	- Relação entre o índice de infecção e a indução de autofagia em BMDMs de camundongos BALB/c.....	28
Figura 8	- Efeito da indução de autofagia em BMDMs de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , após 2h de <i>starvation</i> .....	30
Figura 9	- Efeito da indução de autofagia por <i>starvation</i> em BMDMs de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , após 3 dias de cultura.....	33
Figura 10	- Efeito da indução de autofagia em BMDMs de camundongos C57BL-6, infectados com <i>L. amazonensis</i> , após 2h de <i>starvation</i> .....	35
Figura 11	- Efeito da indução de autofagia por <i>starvation</i> em BMDMs de camundongos C57BL-6, infectados com <i>L. amazonensis</i> após 3 dias de cultura.....	37

Figura 12 - Visualização de BMDMs de camundongos BALB/c por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	39
Figura 13 - Avaliação de atividade lisossomal em BMDMs de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	41

## RESUMO

A autofagia é o principal mecanismo celular de degradação de proteínas e organelas citoplasmáticas. Este processo biológico vem sendo considerado importante no combate aos microrganismos durante processos infecciosos, eliminando-os e ativando respostas imunes inatas e adaptativas. A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que parasitam macrófagos e células dendríticas e é responsável pelo aparecimento de lesões cutâneas simples, lesões mucosas e leishmaniose visceral. O conhecimento dos fatores do hospedeiro e das espécies de *Leishmania* que influenciam a patogênese dos vários tipos de leishmaniose é limitado e pouco se sabe sobre o papel da autofagia nesta doença. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o processo autofágico durante a infecção de macrófagos com *L. amazonensis*. O monitoramento da autofagia por *western blotting* (detecção de LC3, proteína marcadora de autofagia), por microscopia eletrônica de transmissão, e pela detecção de atividade lisossomal (*LysoTracker® Red*) indicou que a infecção causada por *L. amazonensis* induz autofagia tanto em macrófagos de linhagem tumoral quanto em macrófagos primários de camundongos de diferentes linhagens. Nossos dados também indicam que o aumento do índice de infecção está relacionado ao aumento da autofagia nesses macrófagos e que a indução de autofagia por *starvation* (inanição) aumenta a porcentagem de infecção com *L. amazonensis* em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c. Por outro lado, a indução de autofagia não altera o índice de infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6, indicando que a linhagem de camundongos de origem dos macrófagos interfere no desfecho da infecção. Juntos, nossos resultados indicam que a autofagia apresenta um

papel importante na infecção causada por *L. amazonensis* e abre novas perspectivas para o estudo desse processo biológico durante a infecção causada por outras espécies de *Leishmania*.

## ABSTRACT

Autophagy is the primary mechanism of degradation of cellular proteins and organelles. This biological process has been considered important in fighting microorganisms during the infectious processes, eliminating them and activating innate and adaptive immune responses. Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which parasitize macrophages and dendritic cells, and it is responsible for the appearance of simple skin lesions, mucosal and visceral leishmaniasis. The knowledge of host factors and the *Leishmania* species that influence the pathogenesis of many types of leishmaniasis is limited and little is known about the role of autophagy in this disease. The general aim of this study was to evaluate the autophagic process during infection of macrophages with *L. amazonensis*. The monitoring of autophagy by western blotting (to detect LC3, a protein marker of autophagy), by Transmission Electron Microscopy, and by lysosomal activity detection (by using Lysotracker® Red) indicated that the infection caused by *L. amazonensis* induces autophagy in both tumor macrophage lineage and in primary macrophages from mice of different strains. Our data also indicate that the increase in the rate of infection is related to the increase of autophagy in these macrophages and that induction of autophagy by starvation increases the percentage of bone marrow-derived macrophages from BALB / c mice with *L. amazonensis* after three days of culture. On the other hand, the induction of autophagy does not change the infection rate of bone marrow –derived macrophages from C57BL / 6 mice, indicating that the mice strain interfere in the outcome of infection of macrophages. Together, our results indicate that autophagy has an important role in infection caused by *L. amazonensis* and creates new perspectives to the study of this biological processes during infection caused by other species of *Leishmania*.

## **1. Introdução**

### **1.1. Aspectos gerais da autofagia**

Autofagia é um termo geral para o processo de degradação de componentes citoplasmáticos, como proteínas e organelas velhas ou defeituosas, envolvendo a entrega destes componentes ao lisossomo (Levine & Klionsky, 2004). Pelo menos três formas de autofagia foram identificadas – autofagia mediada por chaperonas, microautofagia e macroautofagia - que diferem entre si pelas suas funções fisiológicas e pela maneira de entrega da carga aos lisossomos. A macroautofagia (ou simplesmente autofagia) é o tipo de autofagia mais estudado (Levine & Kroemer, 2008, Yang e Klionsky, 2010) e foi nosso objeto de estudo.

A dinâmica de formação do autofagossomo (organela envolvida no processo autofágico) durante a autofagia é conservada em leveduras, plantas e animais. Na primeira etapa da formação do autofagossomo, constituintes citoplasmáticos, incluindo organelas, são isolados em uma membrana única chamada fagóforo, ou membrana de isolamento. O isolamento completo pelo fagóforo em alongamento resulta na formação do autofagossomo, que é uma organela de membrana dupla. Na próxima etapa do processo, os autofagossomos fundem-se aos lisossomos, em células metazoárias, ou vacúolos, em leveduras e células vegetais. A membrana mais interna do autofagossomo e os materiais derivados do citoplasma dentro dos autofagossomos são degradados pelas hidrolases lisossomais ou vacuolares (Mizushima, 2007). Essas estruturas de degradação são comumente chamadas de autolisossomos ou autofagolisossomos. Entretanto, como quase todos os lisossomos recebem fluxo contínuo da rota endocítica (Gordon & Seglen, 1998), os autolisossomos podem conter materiais heterofágicos (não-próprios). Os



autofagossomos também podem se fundir aos endossomos, tornando-se anfissomos, antes da fusão com lisossomos (Tooze et al., 1990; Berg et al., 1998).

Acredita-se que a maquinaria autofágica tenha evoluído como uma resposta ao estresse, que permitiu que eucariotos unicelulares sobrevivessem durante condições desfavoráveis, provavelmente regulando a energia da homeostase e/ou através do controle de qualidade de proteínas e organelas. Assim, era de se esperar que a mesma maquinaria se diversificasse funcionalmente em metazoários complexos, bem como que regulasse as novas frentes de defesa utilizadas por organismos multicelulares para confrontarem diferentes formas de estresse (Levine et al., 2011).

A autofagia ocorre em níveis basais em todas as células para a realização de homeostase (Levine & Yuan, 2005) e pode ser induzida rapidamente quando as células precisam gerar nutrientes intracelulares e energia como, por exemplo, durante a inanição (*starvation*), durante a retirada de fatores de crescimento ou em demandas bioenergéticas altas. A autofagia também é induzida quando as células estão se preparando para sofrer remodelamento estrutural, isto é, durante transições de desenvolvimento ou para salvarem a si mesmas de componentes citoplasmáticos que causam danos durante o estresse oxidativo, infecções ou durante o acúmulo de agregados protéicos. O status nutricional, fatores hormonais e outros fatores, tais como temperatura, concentrações de oxigênio e densidade celular também são importantes no controle da autofagia (Levine & Kroemer, 2008). Experimentalmente, a indução de autofagia é comumente realizada por *starvation* e pela utilização de rapamicina, um antibiótico macrolídico que inibe a via da TOR quinase (Klionsky et al., 2007).

A maquinaria autofágica interage com a maior parte das vias de resposta a estresse celular, incluindo aquelas envolvidas no controle da resposta imune e inflamação, podendo ser

utilizada como um tipo de defesa inata contra microrganismos (Kroemer et al., 2010). Ela elimina patógenos intracelulares de maneira semelhante ao processo de captura e digestão de moléculas e organelas intracelulares (Deretic, 2006). Esse mecanismo envolve a entrega seletiva dos microrganismos aos lisossomos de degradação (processo chamado de xenofagia) e a entrega de ácidos nucléicos e antígenos microbianos aos compartimentos endo/lisossomais, para a ativação da imunidade inata e adaptativa (Levine & Deretic 2007; Schmid & Munz 2007). Ainda não se sabe, entretanto, quando e como os patógenos, ou os vacúolos membranosos que os abrigam, são reconhecidos pela maquinaria autofágica (Deretic, 2006). Inúmeros patógenos de importância médica são degradados *in vitro* por xenofagia, incluindo bactérias como *Streptococcus* do grupo A, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*; Vírus como Herpes Simplex tipo I (HSV-1) e parasitas como *Toxoplasma gondii*. Acredita-se que a xenofagia participe da proteção contra patógenos *in vivo*, mas dados que comprovem isso são limitados a algumas doenças virais, tais como vírus do mosaico do tabaco em plantas e HSV-1 e o vírus Sindbis em camundongos (Levine & Deretic, 2007). Já outros patógenos intracelulares, como *Porphyromonas gingivalis* e *Legionella pneumophila*, desenvolveram estratégias de proteção contra a autofagia ou de componentes danosos da rota autofágica, mas as bases moleculares desse mecanismo de defesa ainda não foram bem definidas (Kirkegaard et al., 2004).

Um dos métodos mais utilizados de detecção de autofagia em mamíferos é a verificação do *turnover* da proteína LC3 (proteína considerada marcadora de autofagia), que em homeostase apresenta uma forma difusa LC3-I (16kDa), associada ao microtúbulo, e passa para uma forma lipídica e organizada LC3-II (14kDa), ligada ao autofagossomo, quando as células sofrem indução de autofagia (Klionsky et al., 2007). O *turnover* de LC3 pode ser visualizado tanto por

imunocitoquímica quanto por *western-blotting* (Biswas et al., 2008). O monitoramento da autofagia também pode ser realizado através da visualização de organelas autofágicas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e através do monitoramento da atividade lisossomal utilizando-se sondas fluorescentes acidotrópicas como *LysoTracker® Red*, *acridine orange* e *Monodansylcadaverine*, que se ligam compartimentos ácidos, tornando possível a visualização e quantificação da atividade lisossomal (Klionsky et al., 2007). Neste trabalho o monitoramento da autofagia foi realizado por *western blotting* para a detecção de LC3, por microscopia eletrônica de transmissão e pela verificação de atividade lisossomal utilizando-se *LysoTracker® Red*.

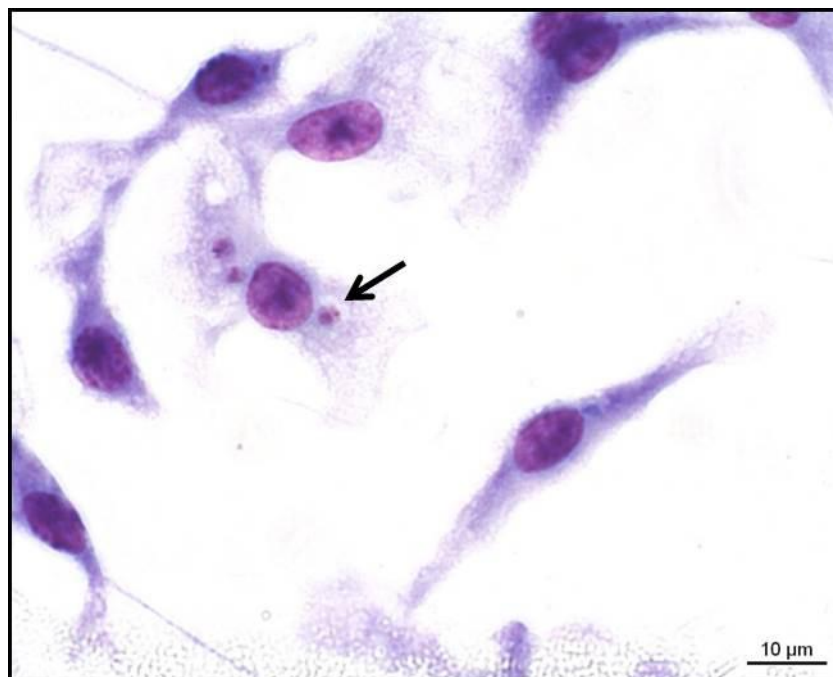
## **1.2. Aspectos gerais e modelos experimentais da leishmaniose**

A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Henry et al., 2005). Este parasita de macrófagos e células dendríticas é responsável pelo aparecimento de um grupo de doenças que variam de lesões cutâneas simples, que se curam espontaneamente, lesões mucosas com destruição tecidual intensa, à leishmaniose visceral, que quando não tratada é fatal (Handman, 2001; Henry et al., 2005). Esta parasitose figura como um importante problema de Saúde Pública, com incidência estimada em 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano (WHO, 2004). No Brasil, tem ocorrido progressão de casos clínicos em novas áreas de transmissão (Azeredo-Coutinho et al., 2007) e, no Estado de São Paulo, um número significativo de infecções tem ocorrido nos últimos anos (Camargo Neves, 2004; CVE, 2010). A *L. amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa (Barral et al., 1991) e foi utilizada em nossos estudos.

Os medicamentos de primeira-escolha utilizados no tratamento contra a leishmaniose são os antimoniais pentavalentes, utilizados desde a década de 1940 (Berman 1988; Olliaro & Bryceson 1993; Raht et al. 2003). Em alguns casos, outros medicamentos como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são utilizados como segunda opção em casos de resistência, apesar da toxicidade ao hospedeiro (Ramos et al. 1990; Kuhlencord et al. 1992; Escobar et al. 2001; Bray et al. 2003; Rosa et al. 2003). Recentemente foi descrito caso de resistência à pentamidina (Bray et al. 2003), e dificuldades no tratamento de pacientes imunodeprimidos (como no caso de portadores de AIDS) (Escobar et al. 2001). O conhecimento dos fatores do hospedeiro e das espécies de *Leishmania* que influenciam a patogênese dos vários tipos de leishmaniose é limitado (Handman, 1999; Handman, 2001; Henry et al., 2005). Sendo assim, a pesquisa dos modelos experimentais (*in vitro*: macrófagos cultivados e infectados com *Leishmania* e *in vivo*: camundongos isogênicos) que excelentes ferramentas para estudos imunológicos, bioquímicos e patológicos e a busca de novas alternativas ao tratamento da leishmaniose são perfeitamente justificados (Handman, 1999).

Os parasitas do gênero *Leishmania* realizam seu ciclo de vida em vetores invertebrados (flebotomíneos) e diversos mamíferos, incluindo humanos. Nos flebotomíneos, a *Leishmania* se multiplica na forma de promastigotas flagelados, que são parasitas extracelulares do trato digestivo do seu hospedeiro. Esses parasitas sofrem metaciclogênese, um processo de diferenciação que resulta no aparecimento da forma infectiva (ou metacíclica) dos promastigotas, que se acumula na porção anterior do ducto do invertebrado. Nos mamíferos, o processo infeccioso começa com a picada do flebotomíneo infectado e com a inoculação dos promastigotas infectivos na derme. Os promastigotas aderem rapidamente aos macrófagos residentes ou aos que foram recrutados para o sítio de infecção. A fagocitose é o mecanismo básico de infecção da

*Leishmania*, porém, a participação ativa do parasita na entrada da célula também é importante. Após a fagocitose, a *Leishmania* se localiza em compartimentos que são limitados por membranas derivadas do plasmalema dos macrófagos. Esses fagossomos, então, sofrem maturação e fusão com organelas endocíticas, resultando na formação dos vacúolos parasitóforos (VPs) (Figura 1). Durante esse período, ocorre a transformação dos promastigotas em amastigotas, que leva de 2 a 5 dias dependendo da espécie de *Leishmania*. A multiplicação das formas amastigotas ocorre dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos que posteriormente irão se romper, liberando o parasita na corrente sanguínea e linfática. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos ingerem o sangue infectado, fechando o ciclo de vida do parasita (Antoine et al., 1998; Reithinger et al., 2007).



**Figura 1. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos de BALB/c infectados com amastigotas de *Leishmania amazonensis*.** Macrófagos de camundongos BALB/c foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, fixados em metanol e submetidos à coloração com Giemsa. Note a presença de Vacúolos parasitóforos no citoplasma dos macrófagos (seta preta) que abrigam as formas amastigotas do parasita.

O curso da infecção experimental causada por parasitas do gênero *Leishmania* difere entre várias linhagens de camundongos utilizadas. Algumas linhagens de camundongos desenvolvem lesão pequena, que se cura após um período de tempo variável, deixando pouco ou nenhum parasita no sítio de infecção. Outras linhagens apresentam crescimento progressivo da lesão, que eventualmente leva à morte do animal por metástase generalizada. Entre esses dois extremos, algumas linhagens de camundongos desenvolvem apenas pequenas lesões e apesar das lesões terem número elevado de parasitas, a infecção não é fatal (Afonso e Scott, 1993). Por exemplo, camundongos BALB/c desenvolvem doença descontrolada quando infectados com *L. major* ou *L. amazonensis*, enquanto que *L. braziliensis* e *L. panamensis* induzem apenas pequenas lesões em qualquer linhagem de camundongo (Childs et al., 1984; Neal e Hale, 1983). Outros camundongos apresentam variados níveis de suscetibilidade, dependendo da espécie do parasita. Camundongos C3H/HeN são capazes de curar a infecção causada por *L. major*, mas desenvolvem doença crônica quando infectado com *L. mexicana* (Grimaldi et al., 1980). De maneira semelhante, camundongos C57BL/6 se curam após a infecção causada por *L. major*, mas não se curam quando infectados com *L. amazonensis*, sendo apenas capazes de controlar a infecção (Barral et al., 1983, Giorgio et al., 1998). Nenhuma linhagem de camundongo foi descrita como sendo completamente resistente a *L. amazonensis* (Pereira & Alves, 2008).

### **1.3. *Leishmania*, macrófagos e autofagia**

A autofagia é descrita como um mecanismo essencial para a diferenciação dos parasitas do gênero *Leishmania* (Bates, 2006; Williams et al., 2006; Besteiro et al., 2007). Estudos com *L. major* apontaram um aumento no número de estruturas autofagossomais durante a diferenciação

de promastigota para a forma infectiva metacíclica ou amastigota. No processo de diferenciação, são removidas as macromoléculas e complexos protéicos desnecessários, como parte de um fenótipo pré-adaptado à invasão das células do mamífero hospedeiro (Bates, 2006; Besteiro et al., 2007). A autofagia foi descrita também como um mecanismo de morte celular programada em promastigotas de *L. donovani*, induzido pelo tratamento com peptídeos antimicrobianos (Bera et al., 2002).

Apenas quatro estudos descrevem o processo autofágico nas células hospedeiras do parasita, durante a infecção causada por *Leishmania* (Schaible et al., 1999; Pinheiro et al., 2009; Mitroulis et al., 2010; Lima et al., 2011). Schaible et al., 1999 observaram que o tratamento com 3-Metiladenina (um inibidor farmacológico de autofagia) em macrófagos murinos infectados com *L. mexicana* impediu a transferência de partículas dextran (um polissacarídeo de tamanho variável) para os vacúolos parasitóforos desses macrófagos, sugerindo uma interceptação entre os vacúolos parasitóforos e a via autofágica. Estes autores sugerem a autofagia como uma via de obtenção de moléculas citoplasmáticas pelas formas amastigotas de *L. mexicana*. Pinheiro et al., 2009, demonstraram que a indução da autofagia (por *starvation* ou pelo tratamento com INF- $\gamma$  ou com rapamicina) aumenta a carga parasitária de macrófagos inflamatórios de camundongos BALB/c quando infectados com promastigotas de *L. amazonensis*. A indução da autofagia em macrófagos inflamatórios infectados com *L. amazonensis* de camundongos C57BL/6 não alterou a carga parasitária dos mesmos. Dessa forma, os autores sugerem que a indução de autofagia em macrófagos facilita a infecção de *L. amazonensis* dependendo da linhagem do hospedeiro (Pinheiro et al., 2009). Mitroulis et al., 2010 descreveram, pela primeira vez, a indução da maquinaria autofágica do hospedeiro durante a infecção por *Leishmania*. Neste trabalho, foi observada a indução de autofagia *in vivo* em macrófagos de medula óssea de paciente infectado

em fase aguda com *L. donovani*, detectada por imunoblot de LC3B. Também foi demonstrado que o tratamento com Anfotericina B lipossomal levou à eliminação do parasita e à diminuição da autofagia. Este foi o primeiro trabalho que descreveu a indução da maquinaria autofágica do hospedeiro durante a infecção natural por *Leishmania*. Recentemente, outro grupo de pesquisa correlacionou a indução de autofagia à redução da capacidade fagocítica de macrófagos murinos, levando à redução do índice de infecção dessas células com *L. amazonensis*, ao contrário de Pinheiro et al., 2009 (Lima et al., 2011). De fato, estudos recentes demonstraram que existe uma comunicação entre as vias autofágica e fagocítica, indicando que a convergência dessas duas vias apresenta um papel importante na resposta imune inata contra microrganismos intracelulares (Sanjuan et al., 2007; Shui et al., 2008; Martinet et al., 2009; Lima et al. 2011).

Como apresentado anteriormente, a autofagia vem ganhando importância no combate aos microrganismos durante processos infecciosos. Poucos trabalhos, entretanto, descrevem o papel da autofagia em macrófagos infectados por *Leishmania* e são observadas algumas divergências entre eles. Em nosso trabalho, utilizamos técnicas de monitoramento de autofagia e protocolos de infecção diferentes dos trabalhos anteriores (como a infecção com formas amastigotas do parasita) para inferir sobre o papel da autofagia durante a infecção causada por *L. amazonensis* e sobre a importância da origem de macrófagos no processo autofágico durante esta infecção.



## 2. Objetivos

Em linhas gerais, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo autofágico de macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis*.

Especificamente, nossos objetivos foram:

- avaliar se macrófagos infectados com *L. amazonensis* apresentam autofagia;
- avaliar se existe correlação entre o índice de infecção de macrófagos e nível de autofagia;
- avaliar se a indução da autofagia influenciaria o índice de infecção de macrófagos, de diferentes linhagens de camundongos, infectados com *L. amazonensis*.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Células

##### 3.1.1. Macrófagos derivados de medula óssea :

Os macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs - *Bone Marrow Derived Macrophages*) foram obtidos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (fêmeas, de 6 a 10 semanas, obtidas do CEMIB – Centro de bioterismo da UNICAMP). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical de acordo com as normas do Conselho de Ética para experimentação animal (número de protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal: 1778-1). Os animais tiveram as patas traseiras dissecadas em fluxo laminar, retirando-se o fêmur e a tíbia e, utilizando-se seringa de insulina, a medula óssea foi lavada com salina estéril suplementada com gentamicina (Sigma-Aldrich). As células foram centrifugadas a 1000 rpm/5 min e suspendidas novamente em meio DME (Nutricell) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell) e 20% de meio condicionado de L929 (L929-CM) (vide item 3.1.2). As células foram cultivadas semeadas em placas de petri estéreis e permaneceram em cultura em estufa a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, durante 7 dias, para diferenciação em macrófagos (Swanson et al. 2009).

##### 3.1.2. Células L929:

A linhagem de fibroblasto murino, L929, foi utilizada para o preparo de meio condicionado (L929-CM). Essas células secretam M-CSF (*Macrophage- Colony Stimulation Factor*), responsável pela diferenciação das células de medula óssea em macrófagos (Swanson et al. 2009). Resumidamente, para o preparo de L929-CM, foram cultivadas  $3 \times 10^7$  células em

frascos de cultura de 150 cm<sup>2</sup>, com 100 ml de meio DME contendo 10% de SFB. Após 14 dias de cultura em estufa a 37°C/ 5% CO<sub>2</sub>, o sobrenadante (L929-CM) foi filtrado, aliquotado e estocado a -20°C.

### 3.1.3. Macrófagos Raw 264.7:

A linhagem murina Raw 264.7 foi cultivada nas condições descritas por Linares et al., 2008. Resumidamente, as células foram mantidas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> com meio DME suplementado com 25 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 10 % SFB em estufa incubadora úmida (37°C/ 5% CO<sub>2</sub>).

## **3.2. Parasitas e infecção**

### 3.2.1. Parasitas:

Foram utilizadas formas amastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269), isoladas de patas de camundongos infectados (mantidos em isoladores no Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP), conforme padronizado anteriormente (Arrais-Silva et al., 2006). Resumidamente, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram a pata infectada removida e lavada com etanol 70%. Em capela de fluxo laminar a camada externa da lesão foi retirada para a diminuição do risco de infecção. Em uma placa de petri estéril contendo solução salina suplementada com gentamicina, a lesão foi raspada com bisturi estéril para promover a lise das células infectadas e a liberação das formas amastigotas do parasita. A solução salina contendo os parasitas foi filtrada em gaze estéril e os amastigotas contados em microscópio óptico, utilizando-se câmara de Neubauer.

### 3.2.2. Infecção de macrófagos derivados de medula óssea:

Após a diferenciação, os BMDMs foram cultivados em placas de 6 ou 24 wells ( $3,5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^5$  células/ *well*, respectivamente), e infectados com uma das seguintes proporções de amastigota/macrófago: 3:1, durante 24h ou 0,5:1, 3:1 ou 15:1 durante 1h. Após a infecção, as células foram lavadas 3 vezes com salina estéril, para a remoção dos amastigotas livres. Os macrófagos infectados foram utilizados nos ensaios de *western blotting* para detecção de LC3, de microscopia eletrônica de transmissão, de monitoramento de atividade lisossomal ou de contagem de carga parasitária.

### 3.2.3. Infecção de macrófagos Raw 264.7

Os macrófagos Raw 264.7 foram infectados *overnight* com *L. amazonensis* na proporção de 10 amastigotas : macrófago (Linares et al., 2008). Após a infecção, as células foram lavadas 3 vezes com salina estéril, para a remoção dos amastigotas livres. Posteriormente, os macrófagos infectados foram utilizados nos ensaios de *western blotting* para detecção de LC3 e de contagem de carga parasitária.

## **3.3. *Western blotting* para detecção de LC3**

Nos ensaios de *western blotting* para a detecção de LC3, os macrófagos foram lavados com PBS e em seguida, foi adicionado tampão de lise (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 69 mM SDS, 10% glicerol, 2% 2-mercaptoetanol, 34 mM ácido etilenodiaminotetraacético, 2 µg/ml pepstatina, e 1 mM fenilmetilsulfonil fluorido (Amersham Pharmacia Biotech). As proteínas foram desnaturadas a 40°C/1h, quantificadas pelo método de Bradford. Posteriormente, as proteínas (25µg/poço)

foram separadas por eletroforese pelo método de Tricina-SDS-PAGE, utilizando-se o sistema de gel da Thermo EC (Holbrook, N.Y., USA) e foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech). Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com 5% de leite desnatado por 1 h à temperatura ambiente e, posteriormente, incubadas *overnight*/4°C com anticorpo primário de coelho anti-LC3B (Novus Biologicals) ou anticorpo primário de camundongo anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich). Os anticorpos anti-coelho e anti-camundongo, conjugados com peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech), utilizados como anticorpos secundários, foram incubados com a membrana por 1h à temperatura ambiente. As imunoreações reveladas em filme radiológico (Kodak), escaniadas (EPSON CX4900) e quantificadas por densitometria óptica (Degrossoli et al., 2004) em software ImageJ. As densitometrias de LC3 foram normalizadas com  $\beta$ -actina em todos os ensaios.

### **3.4. Contagem da carga parasitária**

As células infectadas foram lavadas com solução salina à temperatura ambiente, fixadas com álcool metílico 100% por 15 minutos e coradas com solução corante Giemsa (Sigma-Aldrich) durante 8 minutos. A avaliação da infecção baseou-se na contagem de 200 células, em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes. Os resultados foram expressos como índice de infecção, que corresponde ao produto da porcentagem de células infectadas pelo número de amastigotas por células (Linares et al., 2008).

### **3.5. Microscopia eletrônica de transmissão**

Aproximadamente  $2 \times 10^5$  BMDMs de camundongos BALB/c foram plaqueados em Lâmina Labtek de Permanox (NUNC) com 8 wells, e incubados com meio HBBS por 2h para a indução de autofagia por *starvation* (controle positivo da indução de autofagia). Um grupo de macrófagos foi infectado na proporção de 0,5:1 (1h) com *L. amazonensis* e outro grupo permaneceu em meio DME + 10% de SFB e serviu como controle. Após o tratamento, as células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 45 minutos à temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com o mesmo tampão (sem glutaraldeído) e fixadas com tetróxido de ósmio 1% por 1h. Após 3 lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1M, as células foram incubadas *overnight* em solução glicosada, lavadas, desidratadas em gradiente alcóolico e embebidas em resina Epóxi EPON 812. Secções ultrafinas de aproximadamente 60nm foram feitas, utilizando-se ultra micrótomo (Leica – UCT). Os cortes foram coletados em grades de cobre e observados no Microscópio Eletrônico de Transmissão (906 Zeiss, Alemanha), do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UNICAMP. Os ensaios de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados em colaboração com o professor Paulo Joazeiro, do Departamento de Histologia/ Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

### **3.6. Microscopia de fluorescência para detecção de atividade lisossomal**

BMDMs foram cultivados em meio DME + 10% de SFB, em placas de 96 wells, numa densidade celular de aproximadamente  $2 \times 10^4$  macrófagos por well. Os macrófagos foram infectados com 3 amastigotas : 1 macrófago (1h) ou foram induzidos a autofagia por *starvation* (2h). Macrófagos do grupo controle permaneceram em meio DME fresco para a detecção de

atividade lisossomal das células em homeostase. Após os tratamentos, as células foram incubadas com *LysoTracker® Red Lysosomal Probe* (Lonza Walkersville, Inc.) (100nM), por 1h no meio de cultura específico para cada situação, conforme as instruções do fabricante, e foram lavadas três vezes para evitar marcação de fundo, com meio sem SFB. Após as lavagens, as células foram visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (NIKON - ECLIPSE TS100) e fotografadas com em campo claro e campo escuro com filtro apropriado.

### **3.7. Indução de autofagia**

A autofagia foi induzida por *starvation*, utilizando-se o meio HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) (Sigma-Aldrich). As células foram lavadas 3 vezes, para a retirada do SFB, com salina estéril e incubadas com HBSS por 2h. A autofagia também foi induzida farmacologicamente, com a utilização de 50µg/ml de rapamicina (Sigma-Aldrich) (Singh et al., 2006) em meio DME (Nutricell) com 10% de SFB por 2h.

### **3.8. Ativação de macrófagos**

A ativação de macrófagos Raw 264.7 foi realizada antes da infecção através do cultivo com meio DME + 10% de SFB, contendo 200 ng/ml de IFN- $\gamma$  e 100 ng/ml de LPS, durante 7h. Os macrófagos permaneceram com os ativadores até o fim de cada experimento.

Em BMDMs, a ativação foi feita utilizando-se meio DME + 10% de SFB contendo 20 ng/ml de IFN- $\gamma$  e 10 ng/ml de LPS. Os BMDMs infectados foram pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS por 8h e permaneceram com os ativadores até o fim de cada experimento.

### **3.9. Análise dos resultados**

Todos os ensaios apresentados nesse trabalho foram repetidos pelo menos duas vezes. Os testes de determinação da carga parasitária foram realizados em triplicata e os resultados de cada experimento foram expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Os valores foram comparados utilizando-se o Teste t de Student para amostras independentes (diferenças com *p value*  $\leq 0,05$  foram consideradas significativas).



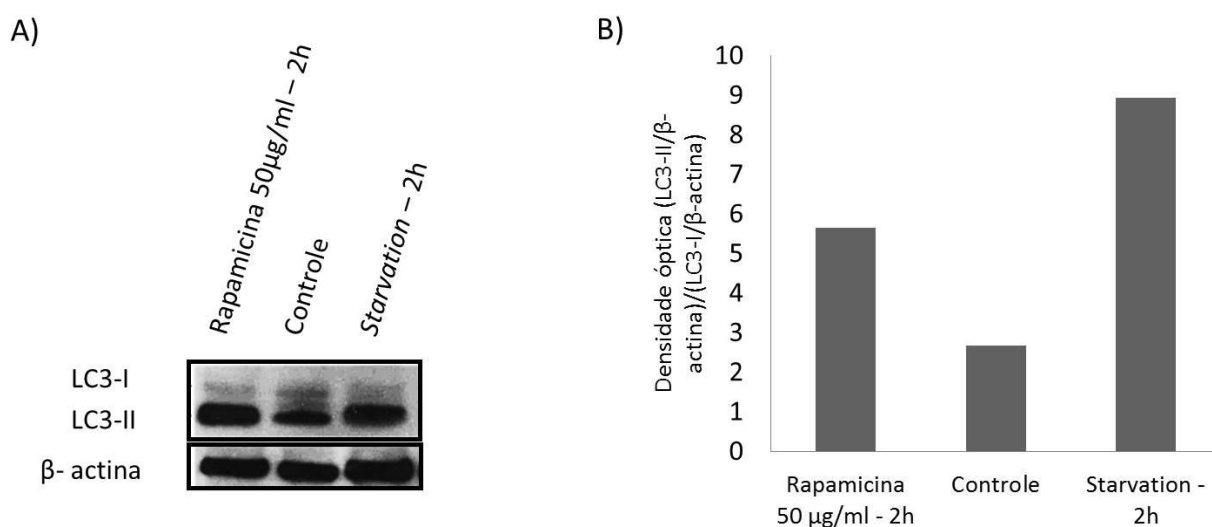
## 4. Resultados

### 4.1. Padronização dos ensaios de *western blotting* para detecção de LC3

Quando as células sofrem indução de autofagia, a forma LC3-I, de 16 kDa que é encontrada dispersa no citoplasma das células, é clivada e passa para a forma LC3-II, de 14 kDa, associada à membrana do autofagossomo. Assim, é possível monitorar a autofagia através da conversão (*turnover*) de LC3-I em LC3-II por *western blotting*, utilizando-se um anticorpo específico para LC3. A linhagem de macrófagos tumorais Raw 264.7 foi escolhida para ser utilizada nesses ensaios de padronização pela facilidade de cultivo e obtenção de células suficientes para a extração de proteínas.

Por se tratar de proteínas de baixo peso molecular (16 e 14 kDa) e pelo fato das isoformas de LC3 apresentarem uma diferença de apenas 2 kDa entre elas, foi necessária a padronização do método de separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Primeiramente, testamos protocolos já padronizados em nosso laboratório (Degrossoili et al., 2004) utilizando-se diferentes concentrações do gel de poliacrilamida (12 e 15%). A separação das bandas apresentou baixa resolução tanto nos géis de 12% quanto nos de 15%, o que dificultou a visualização das bandas LC3-I e LC3-II (dados não apresentados). O sistema de separação de proteínas por eletroforese em que obtivemos melhores resultados na visualização das duas bandas foi o de Tricina-SDS-PAGE (Gallagher, 2002). Com a utilização do sistema de separação de proteínas Tricina-SDS-PAGE, observamos que a separação das bandas LC3-I e LC3-II teve maior resolução do que a separação das bandas no sistema de SDS-PAGE (Figura 2A). Nesses ensaios, a indução de autofagia foi realizada por *starvation* (meio Hanks/2h) e pelo tratamento

com rapamicina (50µg/ml/2h) (Singh et al., 2006). O grupo de macrófagos, controle negativo recebeu meio DME fresco, suplementado com 10% de SFB. Pela análise da figura 2A e 2B, é possível notar que houve aumento da conversão de LC3-I em LC3-II em células que sofreram autofagia quando comparadas as células do controle negativo. Esses resultados indicam que a autofagia foi, de fato, induzida nos macrófagos através do tratamento com rapamicina e por *starvation* e que o método de detecção de LC3 por *western blotting* foi padronizado com sucesso.

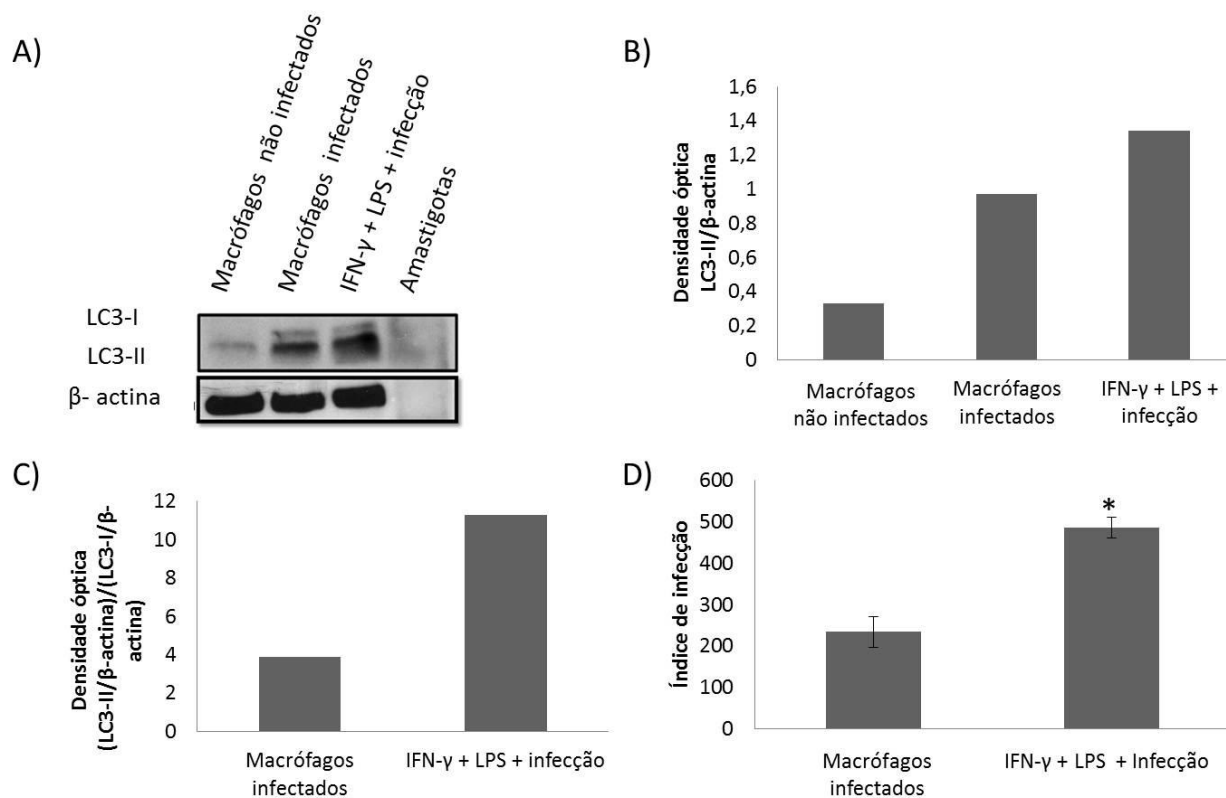


**Figura 2. Padronização do sistema de *western blotting* para detecção de LC3.** Macrófagos Raw264.7 foram cultivados em meio DME fresco + 10% SFB (controle) ou sofreram indução de autofagia por rapamicina 50µg/ml (2h) ou foram cultivadas durante 2h em meio Hanks para a indução de autofagia por *starvation* (*starvation* - 2h). A) *Western blotting* para detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3 por densitometria. Dado expresso sob a forma LC3-II/LC3-I.

#### **4.2. A infecção causada por *L. amazonensis* induz autofagia em macrófagos Raw 264.7 e em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos de diferentes linhagens.**

Nosso próximo passo foi avaliar se a infecção causada por *L. amazonensis in vitro* induz autofagia. Para tanto, realizamos ensaios de detecção de LC3 por *western blotting*, nos quais, macrófagos Raw 264.7 foram infectados com 10 amastigotas/célula ou foram mantidos sem infecção. Um grupo de macrófagos foi ativado com LPS (100ng/ml) e IFN- $\gamma$  (200ng/ml) antes da infecção. Tanto IFN- $\gamma$  como LPS são ativadores clássicos de macrófagos, ou seja, induzem macrófagos a estados microbicidas e leishmanicidas (Corradin et al., 1991; Degrossoli et al., 2004; Linares et al., 2008; Panaro et al., 1999) e também são indutores de autofagia (Gutierrez et al., 2004; Shi & Kehrl, 2008; Xu et al., 2007). Ambos foram utilizados nesses ensaios tanto como um controle positivo da indução de autofagia quanto como controle negativo da infecção. Um controle com extrato de amastigotas foi testado para verificar se o anticorpo anti-LC3 se ligaria a proteínas do parasita. Nesses ensaios, observamos que os macrófagos infectados apresentaram maior intensidade da banda LC3-II do que os macrófagos não infectados (Figuras 3A, 3B), sugerindo que a infecção com *L. amazonensis* induz autofagia. Também observamos aumento da intensidade da banda de LC3-II nas células pré-ativadas com IFN- $\gamma$  e LPS, quando comparado ao grupo não infectado e ao grupo infectado não-ativado (Figuras 3A, 3B). A figura 3C mostra que houve maior *turnover* de LC3-I em LC3-II nos macrófagos pré-ativados e infectados em comparação aos macrófagos que foram apenas infectados. Pode-se observar que no controle feito com o extrato de amastigotas não houve marcação de LC3, comprovando que o anticorpo é específico para proteínas de mamíferos. Na figura 3D, observamos que a pré-ativação dos macrófagos com IFN- $\gamma$  e LPS causou um aumento significativo do índice de infecção dos

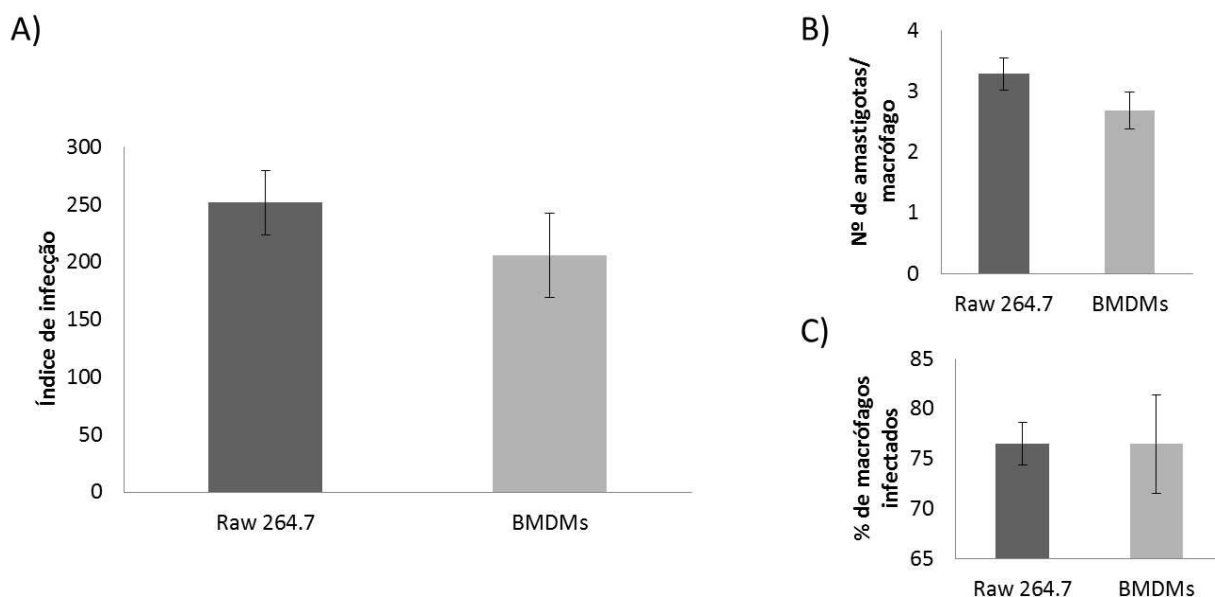
mesmos em nossos ensaios. Já foi observado anteriormente que a ativação de macrófagos com IFN- $\gamma$  pode promover a replicação de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos murinos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Qui et al., 2004) e questionamos se a alta concentração de IFN- $\gamma$  testada seria responsável pelo aumento do índice de infecção em nossos ensaios. Com base nisso, testamos diferentes concentrações de IFN- $\gamma$  e LPS (dados não apresentados), mas nenhuma delas induziu uma redução significativa na carga parasitária desses macrófagos. Dentre essas concentrações testadas, a que melhor induziu controle da infecção em nossos testes foi a de 20 ng/ml de IFN- $\gamma$  e 10ng/ml de LPS, posteriormente utilizadas nos ensaios com BMDMs.



**Figura 3. A infecção causada por *L. amazonensis* induz autofagia em macrófagos Raw 264.7.** Macrófagos Raw 264.7 foram infectados com *L. amazonensis* (macrófagos infectados) ou não (macrófagos não infectados). Um grupo de macrófagos foi ativado com IFN- $\gamma$  (200 ng/ml) e LPS (100 ng/ml) antes da infecção (IFN- $\gamma$  + LPS + infecção). A) Western blotting para detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Quantificação das bandas de LC3 por densitometria. Dado expresso na forma LC3-II/LC3-I. D) Índice de infecção. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

Com o intuito de verificar se a infecção causada por *L. amazonensis* também induz autofagia em macrófagos primários, realizamos ensaios de detecção de LC3 por *western blotting* em BMDMs de camundongos BALB/c e C57BL/6. Primeiramente, padronizamos a infecção desses macrófagos com *L. amazonensis* e observamos que ao infectarmos BMDMs de camundongos BALB/c com *L. amazonensis overnight*, na proporção de 3:1, atingimos uma média de 76,5% de macrófagos infectados e de 2,68 amastigotas por macrófago (Figura 4).

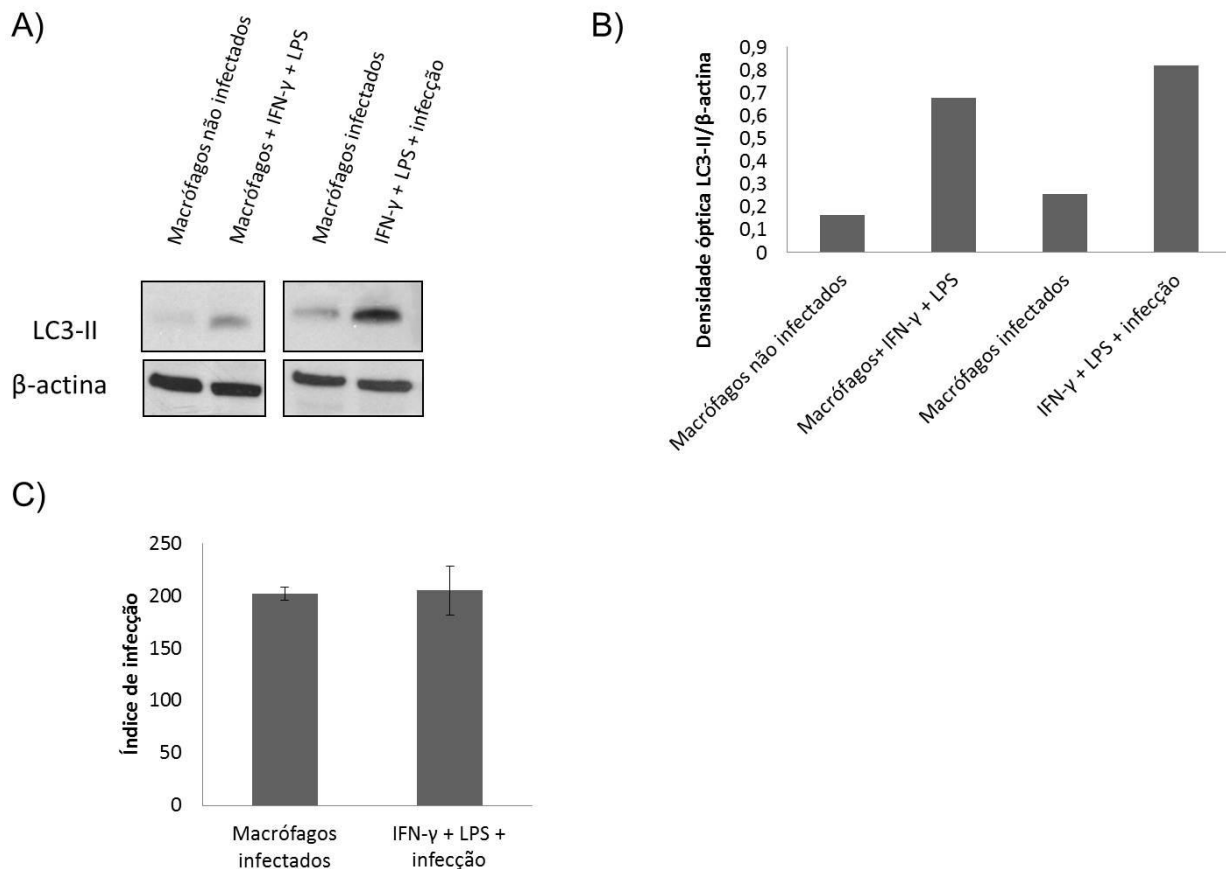
Condições, estas, semelhantes às da infecção de Raw 264.7 que, quando infectados *overnight* com amastigotas de *L. amazonensis* apresentam 76,5% de macrófagos infectados e 3,3 amastigotas/macrófago (Figura 4).



**Figura 4. Comparação do índice de infecção de diferentes macrófagos com amastigotas de *L. amazonensis*.** Macrófagos Raw 264.7 foram infectados com *L. amazonensis overnight* na proporção de 10 amastigotas: 1 macrófago. Em macrófagos derivados de medula óssea (BMDMs) de camundongos BALB/c a infecção com *L. amazonensis* foi realizada por 24h, na proporção de 3 amastigotas : 1 macrófago. A) Índice de infecção. B) Porcentagem de macrófagos infectados. C) Número de amastigotas/ macrófago.

Para verificarmos se a infecção causada por *L. amazonensis* induz autofagia em macrófagos primários, infectamos BMDMs de camundongos BALB/c e C57BL/6 com *L. amazonensis*, como explicado anteriormente, e realizamos ensaios de *western blotting* para a detecção de LC3. A partir da análise dos imunoblots e da quantificação das bandas de LC3-II por densitometria (Figuras 5A, 5B, 6A e 6B) observamos que a infecção aumenta a intensidade da banda LC3-II em BMDMs nas duas linhagens de camundongos testadas, indicando que a infecção também induz

autofagia nesses macrófagos. BMDMs de camundongos BALB/c que foram infectados apresentaram aumento na intensidade de LC3-II de 1,56 vezes em comparação aos macrófagos não infectados (Figura 5B), enquanto que BMDMs de camundongos C57BL/6 infectados apresentaram um aumento de 44 vezes em comparação aos macrófagos não infectados (Figura 6B). A indução de autofagia foi maior nos grupos de células ativadas com IFN- $\gamma$  e LPS, em comparação aos macrófagos não ativados (aumento de 4,18 vezes em BMDMs de camundongos BALB/c e de 7,66 vezes em camundongos C57BL/6). As células pré-ativadas com IFN- $\gamma$  e LPS e infectadas apresentaram a intensidade de LC3 aumentada quando comparadas a todos os outros grupos, tanto em BMDMs de camundongos BALB/c quanto em BMDMs de camundongos C57BL/6 (Figuras 5A, 5B, 6A e 6B). Curiosamente, nos ensaios de *western blotting* realizados com extrato de proteínas de BMDMs foi possível visualizar apenas a marcação da banda de LC3-II (14kDa).

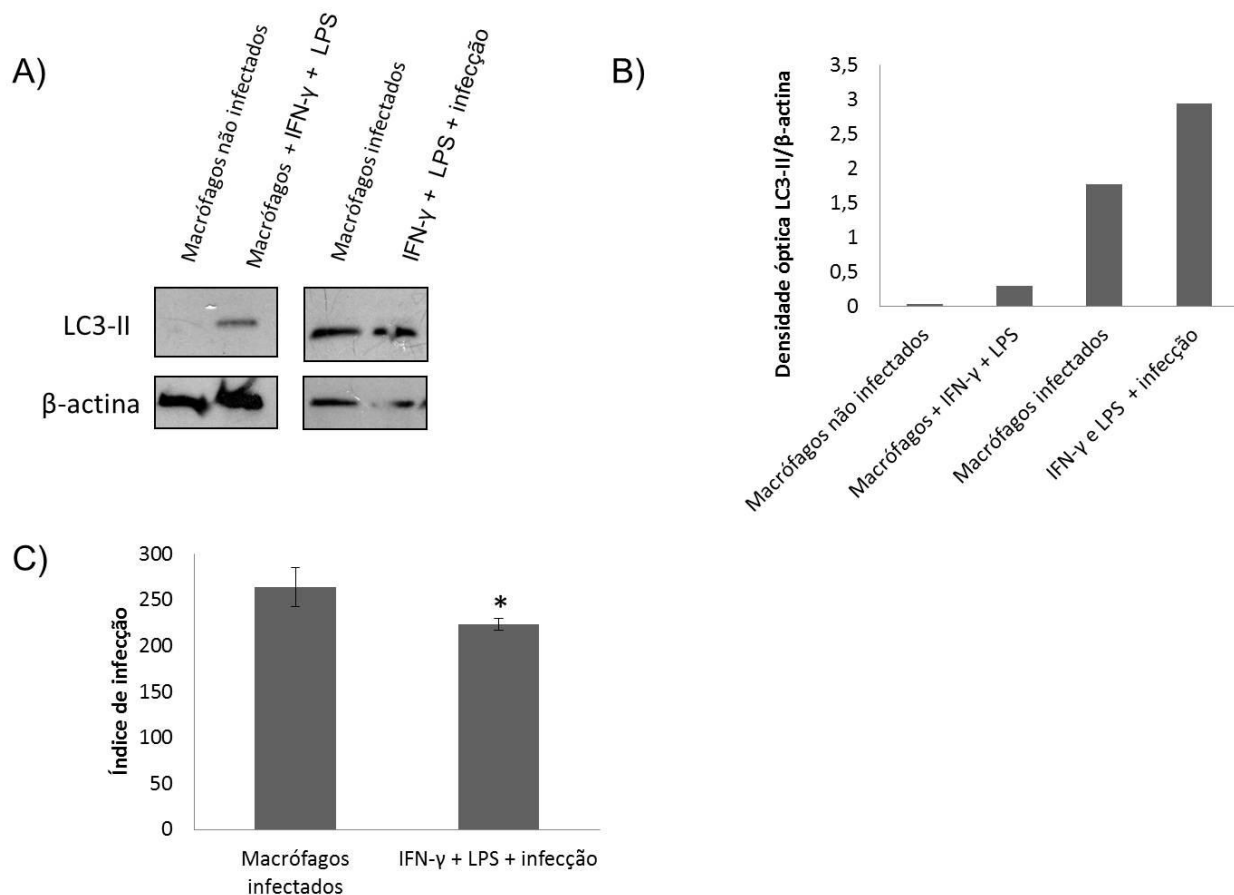


**Figura 5. Análise do processo autofágico de BMDMs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos controle) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Os macrófagos infectados permaneceram por 24h com os parasitas (infecção com 3 amastigotas: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  e LPS + infecção). A) *Western blotting* para a detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Índice de infecção.

Com relação ao índice de infecção, observamos que ele não é alterado com a pré-ativação de BMDMs de camundongos BALB/c com IFN- $\gamma$  e LPS (Figura 5C). Os dados da figura 6C, por sua vez, indicam que a pré-ativação de BMDMs de camundongos C57BL/6 diminui em 1,18 vezes o índice de infecção quando comparados aos macrófagos controle (Figura 6C). Esta redução no índice de infecção foi significativa e pode ser devido ao fenótipo mais resistente desses camundongos, à infecção causada por *L. amazonensis*. Como apresentado na introdução desse trabalho, em modelos experimentais de infecção de camundongos com *Leishmania*, a



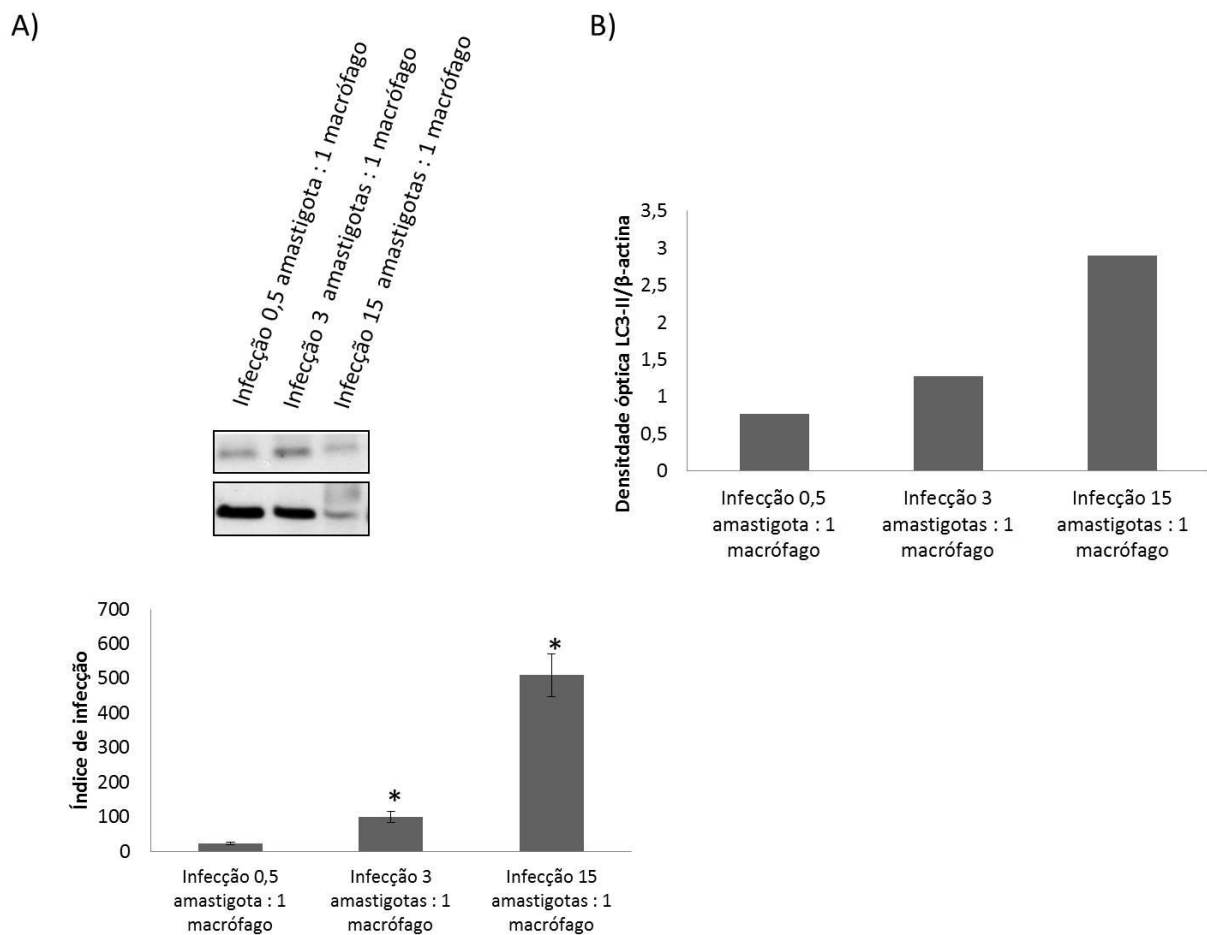
linhagem C57BL/6 controla a infecção causada por *L. amazonensis*, enquanto que a linhagem BALB/c é altamente suscetível ao parasita.



**Figura 6. Análise do processo autofágico de BMDMs de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos controle) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Os macrófagos infectados permaneceram por 24h com os parasitas (infecção com 3 amastigotas: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  e LPS + infecção). A) Western blotting para a detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Índice de infecção. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.3. Correlação entre o índice de infecção e a autofagia

A partir da demonstração de que macrófagos infectados com *L. amazonensis* apresentam indução da maquinaria autofágica, questionamos se ao aumentarmos a carga parasitária desses macrófagos aumentaríamos também a autofagia. Para respondermos a essa questão, realizamos ensaios de *western blotting* para a detecção de LC3 nos quais BMDMs de camundongos BALB/c foram infectados com três diferentes proporções de amastigotas : macrófago (0,5:1, 3:1 e 15:1). Ao analisarmos a figura 7, observamos que o índice de infecção correlaciona-se com a indução de autofagia, já que houve aumento na intensidade da banda LC3-II à medida que aumentou o índice de infecção. As figuras 7A e 7B mostram que houve aumento 1,65 de vezes na intensidade de LC3-II nos macrófagos infectados com 3 amastigotas : 1 macrófago, quando comparados aos macrófagos infectados na proporção de 0,5 amastigota : macrófago. Esse aumento foi ainda maior quando comparamos a intensidade de LC3-II dos macrófagos infectados na proporção de 15 amastigotas : 1 macrófago com os macrófagos infectados com 0,5 amastigota : macrófago (aumento de 3,80 vezes). Com relação à carga parasitária, a figura 7C evidencia que nos macrófagos infectados com 0,5:1, o índice de infecção foi de 24,4, enquanto que na proporção 3:1 esse número subiu para 100,35 (aumento de 4,11 vezes) e na proporção 15:1 o índice de infecção foi de 510,5 (aumento de 20,9 vezes em comparação com o índice de infecção da proporção 0,5:1 e aumento de 5,08 vezes em comparação com o índice de infecção da proporção 3:1).



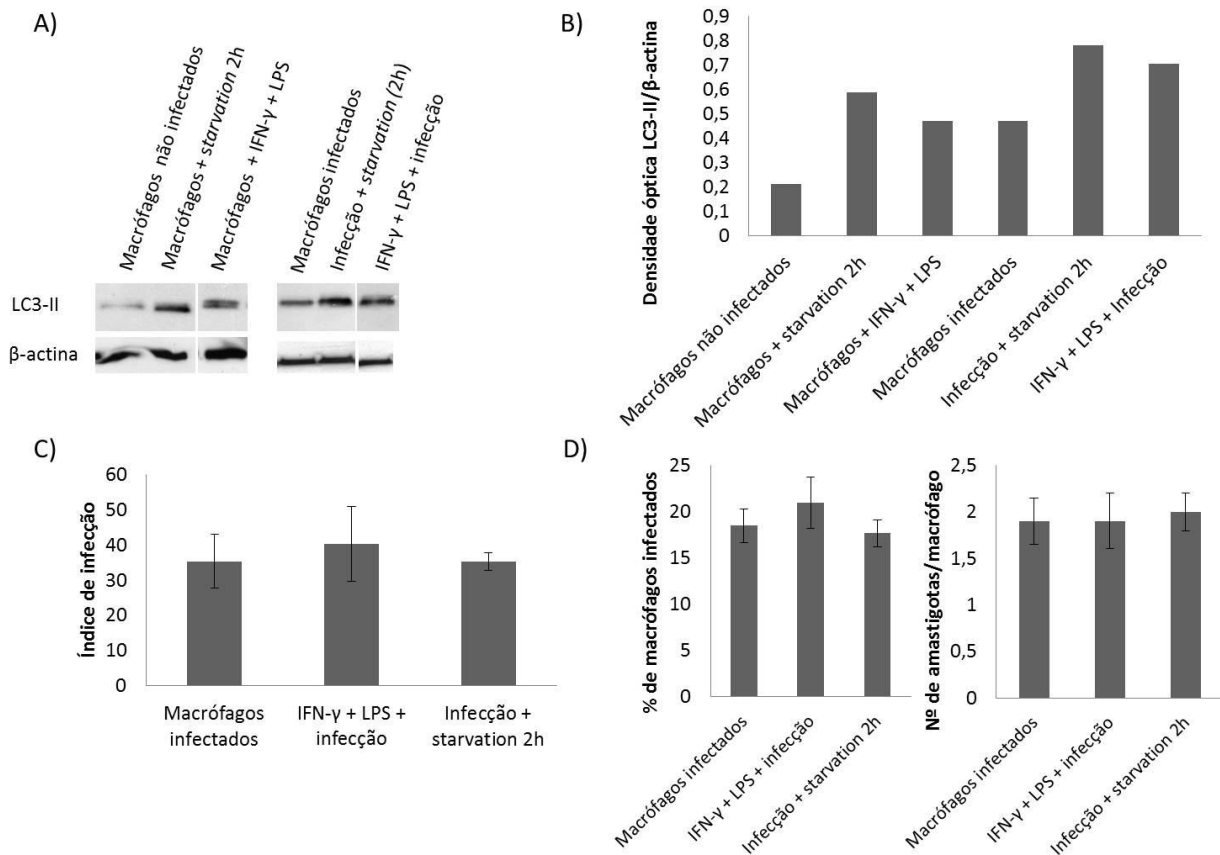
**Figura 7. Relação entre o índice de infecção e a indução de autofagia em BMDMs de camundongos BALB/c.** Diferentes proporções de amastigotas : macrófago foram utilizadas para infectar BMDMs de camundongos BALB/c durante 1h. A) *Western blotting* para a detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Índice de infecção. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

A figura 7A mostra que a expressão de LC3-II e  $\beta$ -actina dos macrófagos infectados na proporção 15:1 foi fraca em comparação aos outros grupos. Uma possível explicação para este resultado é a de que a quantidade de proteínas de amastigotas era superior às proteínas celulares, o que teria enfraquecido a marcação de LC3-II e  $\beta$ -actina. Como a intensidade de LC3 foi calculada proporcionalmente à intensidade de  $\beta$ -actina, as análises de densitometria mostram que

o grupo infectado na proporção de 15 amastigotas : 1 macrófago tem maior intensidade da banda de LC3-II em comparação aos outros grupos, indicando que houve maior indução de autofagia (figura 7B).

#### **4.4. Efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de BMDMs de camundongos BALB/c**

Para testar o efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, realizamos ensaios de *western blotting* para detecção de LC3 e contagem da carga parasitária. Os BMDMs de camundongos BALB/c foram submetidos às seguintes condições: 1) macrófagos não infectados (cultivados em meio DME + 10% de SFB), que apresentaram intensidade de LC3-II equivalente a 0,21; 2) macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS ( macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  + LPS durante todo o experimento), que apresentaram intensidade da banda LC3-II equivalente a 0,58; 3) macrófagos + *starvation* 2h (induzidos à autofagia por *starvation*, durante 2h), que apresentaram intensidade de LC3-II equivalente a 0,47; 4) macrófagos infectados (na proporção de 0,5 amastigota: 1 macrófago), que apresentaram intensidade de LC3-II equivalente a 0,47; 5) IFN- $\gamma$  + LPS + infecção (macrófagos pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS e que permaneceram com esses ativadores durante todo o experimento), que apresentaram intensidade de LC3-II equivalente a 0,78; e por fim, 6) infecção + *starvation*- 2h (macrófagos infectados e submetidos a *starvation* por 2h), que apresentaram intensidade de LC3-II equivalente a 0,70 (Figura 8).



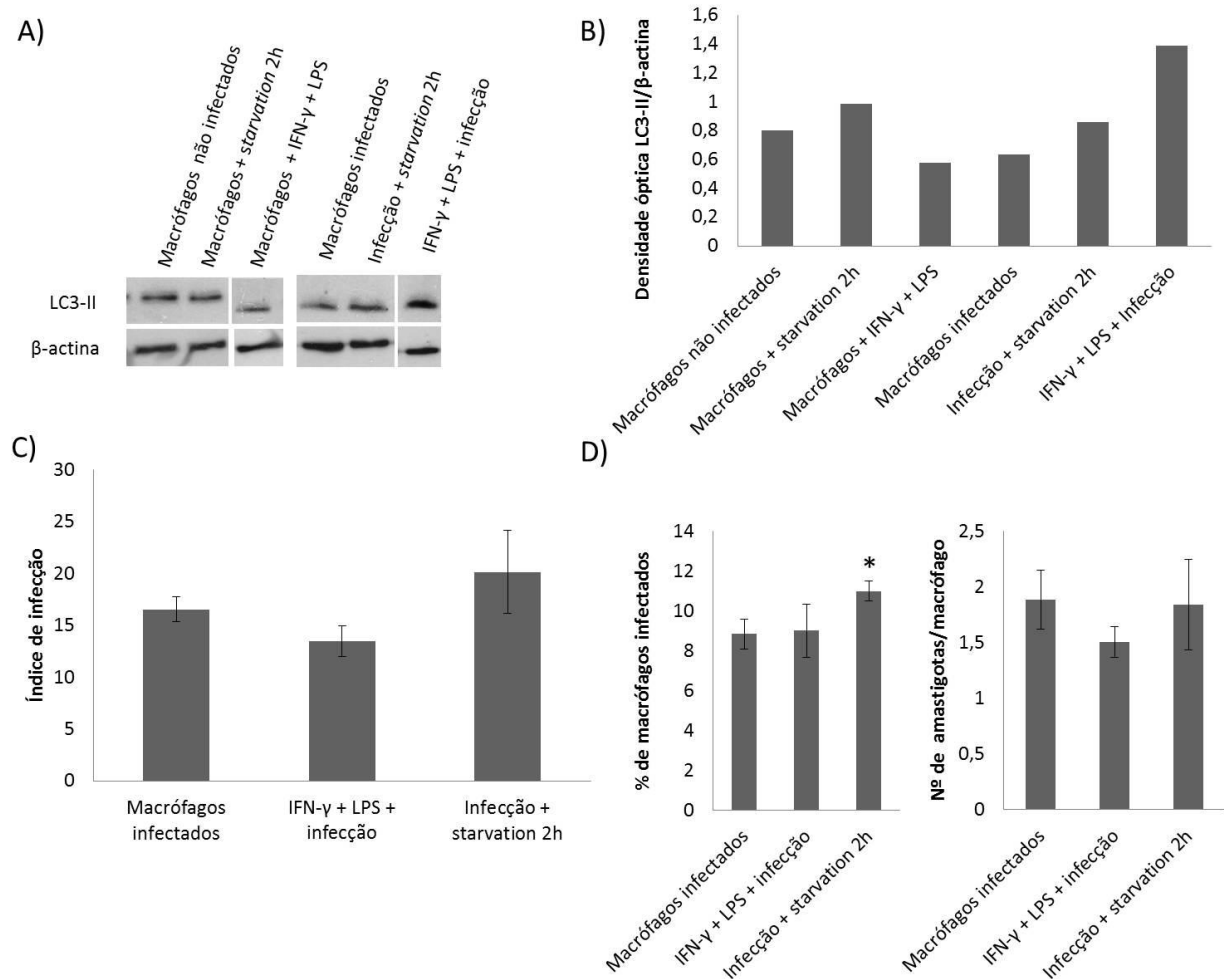
**Figura 8. Efeito da indução de autofagia em BMDMs de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis*, após 2h de starvation.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos não infectados) ou sofreram indução de autofagia por *starvation* (macrófagos + *starvation* 2h) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Macrófagos infectados permaneceram por 1h com os parasitas (infecção com 0,5 amastigota: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados sofreu indução de autofagia por *starvation* (infecção + *starvation* 2h) e outro grupo foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  + LPS + infecção). Os BMDMs tratados com IFN- $\gamma$  e LPS permaneceram com esses ativadores durante todo o experimento. Imediatamente após os tratamentos, os macrófagos foram utilizados em ensaios de *western blotting* e de contagem de carga parasitária. A) *Western blotting* para detecção de LC3. B) Densitometria das bandas de LC3-II C) Índice de infecção. D) Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas/macrófagos.

As figuras 8A e 8B indicam houve aumento da intensidade da banda LC3-II nos BMDMs de camundongos BALB/c que foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS e também em BMDMs que tiveram o meio substituído por HBSS (*starvation*), indicando indução de autofagia em

comparação aos macrófagos controle. O aumento da intensidade de LC3-II foi ainda maior quando esses macrófagos estavam infectados durante esses mesmos tratamentos. A análise da imagem dos imunoblots e a quantificação das bandas de LC3-II mostram que a indução da autofagia por *starvation* nos macrófagos infectados aumentou 1,6 vezes a intensidade da banda de LC3-II, em comparação ao grupo que foi apenas infectado. Já o grupo pré-ativado e infectado apresentou um aumento de 1,65 vezes na intensidade da banda LC3-II. Essa indução de autofagia, entretanto, não parece relacionada à alteração da carga parasitária dos macrófagos infectados imediatamente após os tratamentos (não houve alteração da porcentagem de macrófagos infectados bem como do número de amastigotas por macrófago) (Figuras 8C e 8D). Uma hipótese que explicaria tal fenômeno seria a de que os macrófagos não teriam tido tempo hábil para processar o estímulo, já que os ensaios foram realizados imediatamente após o tempo de 2h da indução de autofagia. Para testar esta hipótese, executamos novos ensaios com os mesmos parâmetros do experimento descrito acima, porém, após o fim dos tratamentos, os macrófagos tiveram o meio de cultura substituído por meio DME + 10% de SFB e permaneceram em cultura por mais três dias (exceto os grupos que foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS, que receberam meio fresco contendo IFN- $\gamma$  e LPS, permanecendo com os ativadores durante todo o ensaio) (Figura 9). Três dias após a indução de autofagia, observamos que houve um aumento na intensidade de LC3-II (Figura 9), quando comparados ao ensaio anterior (Figura 8), no grupo “macrófagos não infectados” e no grupo “macrófagos + *starvation*”; o grupo que foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS permaneceu com nível de LC3-II semelhante nos dois ensaios (Figuras 9A e 9B). Os grupos de células que foram infectados e que sofreram indução de autofagia por *starvation* ou que foram infectados e ativados com IFN- $\gamma$  e LPS apresentaram maior intensidade de LC3-II que células apenas infectadas melhor assim. Quando comparamos a intensidade de

LC3-II dos macrófagos infectados, com os macrófagos não infectados, observamos que os macrófagos não infectados apresentaram maior intensidade de LC3-II maior que os macrófagos não infectados. Esse aumento na intensidade de LC3-II no grupo de macrófagos não infectados pode ter ocorrido em decorrência da redução de nutrientes disponíveis no meio após três dias de cultura, tornando as células mais autofágicas, bem como pela possibilidade de ter sido plaqueada uma quantidade maior de células nesse *well*, o que teria ocasionado a diminuição de nutrientes; caso essa última hipótese seja verdadeira, a fagocitose desse excesso de células também pode ter sido responsável pelo aumento na intensidade de LC3-II, já que em outros trabalhos, foi observada marcação desta proteína em fagossomos (Sanjuan et al., 2007; Shui et al., 2008).

Com relação à carga parasitária, não houve diferença significativa no índice de infecção dos macrófagos que foram pré-ativados e do grupo *starvation*, quando comparados ao grupo controle. Entretanto, a indução de autofagia por *starvation* aumentou significativamente a porcentagem de macrófagos infectados na cultura (aumento de 1,24 vezes), quando comparado ao grupo controle, não havendo diferença significativa no número de amastigotas por macrófago entre esses grupos (Figura 9D).



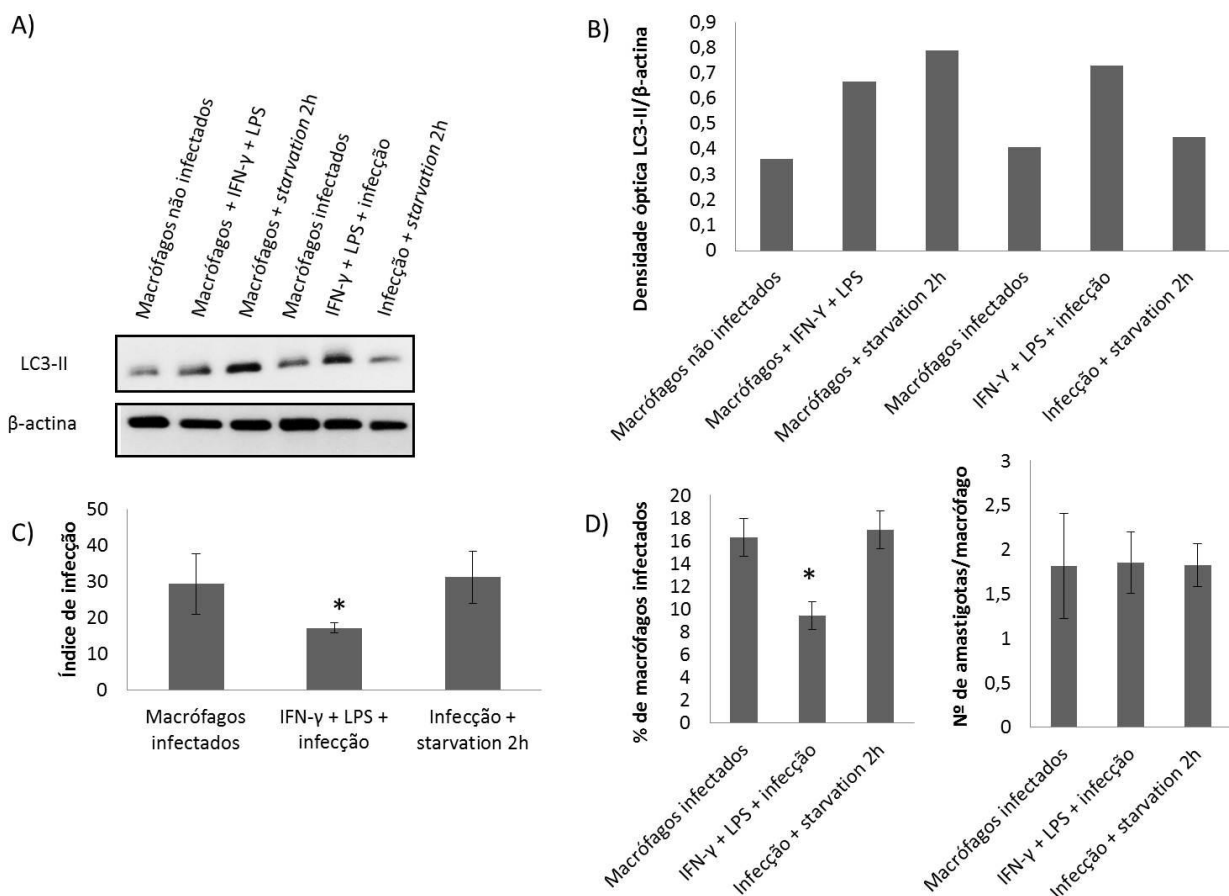
**Figura 9. Efeito da indução de autofagia por *starvation* em BMDMs de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis*, após 3 dias de cultura.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos não infectados) ou sofreram indução de autofagia por *starvation* (macrófagos + *starvation* 2h) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Macrófagos infectados permaneceram por 1h com os parasitas (infecção com 0,5 amastigota: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados sofreu indução de autofagia por *starvation* (infecção + *starvation* 2h) e outro grupo foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  + LPS + infecção). Após os tratamentos as células foram lavadas e permaneceram em meio DME + 10% de SFB por três dias (exceto o grupo que foi ativado, que recebeu meio DME contendo IFN- $\gamma$  + LPS). A) *Western blotting* para detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Índice de infecção. D) Porcentagem de macrófagos infectados e Número de amastigotas/macrófago. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).



#### **4.5. Efeito da indução de autofagia sobre a carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6.**

Com o intuito de verificar se o aumento da porcentagem de macrófagos infectados após a indução de autofagia por *starvation* era um fenômeno específico de BMDMs de camundongos BALB/c, realizamos os mesmos ensaios com BMDMs de camundongos C57BL/6 (Figuras 10 e 11).

Na figura 10 são apresentados os resultados dos ensaios realizados imediatamente após os macrófagos receberem o estímulo de indução de autofagia. Notamos que houve aumento na intensidade da banda LC3-II nos macrófagos que foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (aumento de 1,83 vezes) e nos macrófagos que sofreram indução de autofagia por *starvation* (aumento de 1,82 vezes), quando comparados aos macrófagos não infectados (Figura 10A e 10B). Também houve aumento na intensidade de LC3-II nos macrófagos infectados e pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (aumento de 1,82 vezes) e no grupo que foi infectado e que sofreu indução de autofagia por *starvation* (aumento de 1,12 vezes), quando comparados ao grupo que foi apenas infectado.

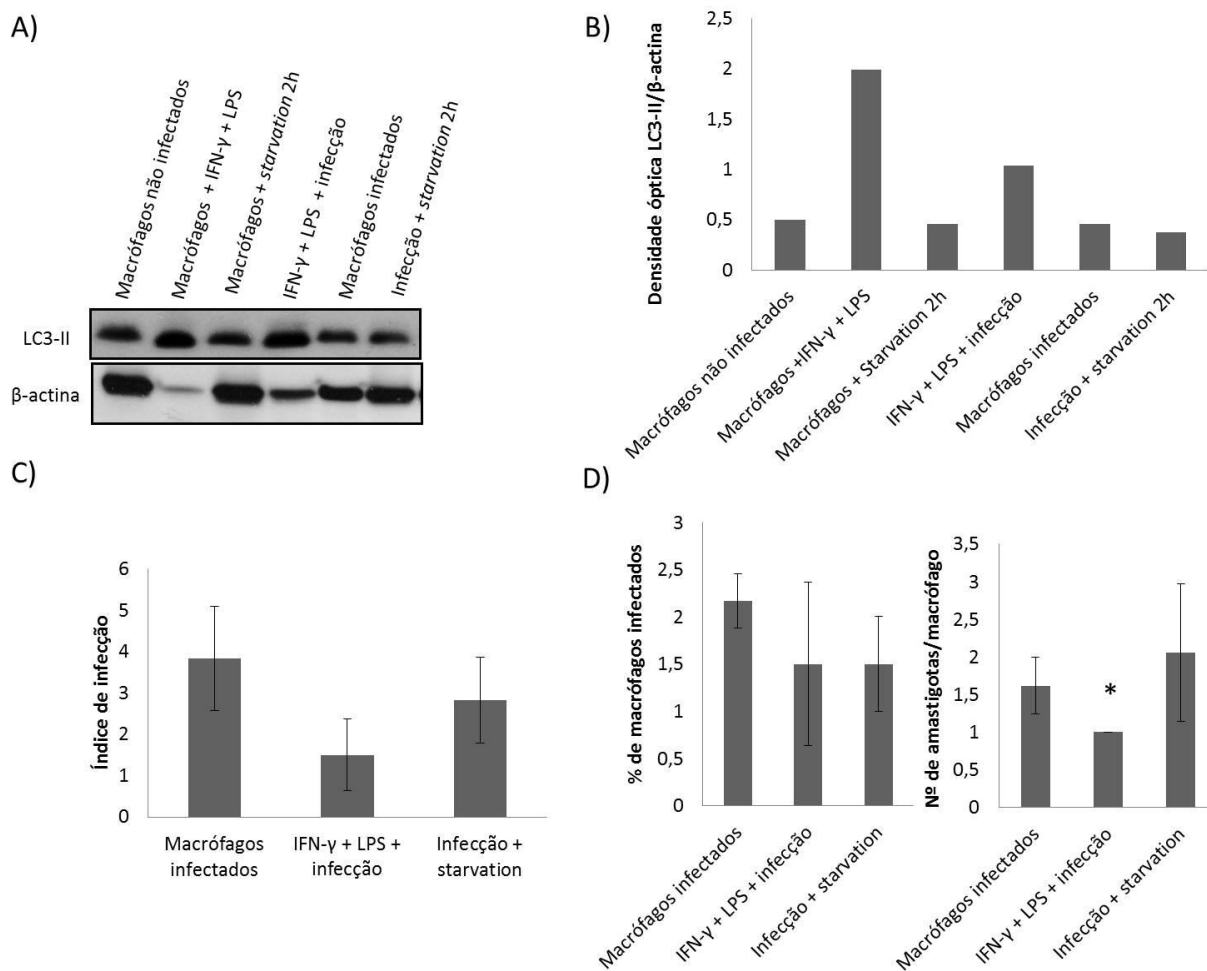


**Figura 10. Efeito da indução de autofagia em BMDMs de camundongos C57BL-6, infectados com *L. amazonensis*, após 2h de starvation.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos não infectados) ou sofreram indução de autofagia por starvation (macrófagos + starvation 2h) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Macrófagos infectados permaneceram por 1h com os parasitas (infecção com 0,5 amastigota: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados sofreu indução de autofagia por starvation (infecção + starvation 2h) e outro grupo foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  e LPS + infecção). Os BMDMs tratados com IFN- $\gamma$  e LPS permaneceram com esses ativadores durante todo o experimento. Imediatamente após os tratamentos, os macrófagos foram utilizados em ensaios de western blotting e de contagem de carga parasitária. A) Western blotting para detecção de LC3. B) Densitometria das bandas de LC3-II C) Índice de infecção. D) Porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas/macrófago. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

A análise do índice de infecção mostra que BMDMs de camundongos C57BL/6 que foram pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS conseguiram reduzir o índice de infecção quando comparado ao grupo controle (Figura 10C). Isto ocorreu devido à redução na porcentagem de macrófagos infectados (Figura 10D). Já os macrófagos que foram infectados e que sofreram

indução de autofagia por *starvation* não apresentaram diferença significativa no índice de infecção quando comparado ao grupo de células controle (Figuras 10C e 10D). A partir desses resultados, concluímos que, ao contrário dos BMDMs de camundongos BALB/c, BMDMs de C57BL/6 conseguem diminuir o índice de infecção quando pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS, e que não há alteração da carga parasitária de BMDMs desses animais imediatamente após a indução de autofagia por *starvation*.

Na figura 11, são apresentados os resultados referentes aos ensaios realizados três dias após a indução de autofagia por *starvation*. A intensidade de LC3-II foi semelhante entre os grupos de macrófagos, exceto naqueles que foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS, que apresentaram aumento na intensidade de LC3-II (Figuras 11A e 11B). Com relação à carga parasitária, não houve alteração no índice de infecção dos macrófagos que foram pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS e daqueles que sofreram indução de autofagia por *starvation*, quando comparados ao grupo de macrófagos não infectados. Quando comparamos estes resultados (Figura 11) aos de BMDMs de camundongos BALB/c após três dias de cultura (Figura 9), observamos que nestes BMDMs, que foram infectados e que sofreram indução de autofagia por *starvation*, houve aumento na porcentagem de macrófagos infectados e da intensidade de LC3-II, quando comparados aos macrófagos que foram apenas infectados (Figuras 9A e 9B). Já em BMDMs de camundongos C57BL/6, a intensidade LC3-II dos macrófagos infectados e que sofreram indução de autofagia foi semelhante à do grupo que foi apenas infectado, não sendo observada diferença no índice de infecção entre esses grupos (Figura 11). Esses dados sugerem que o aumento da intensidade de LC3-II, observada em BMDMs de camundongos BALB/c, está relacionada ao aumento da porcentagem de macrófagos infectados.



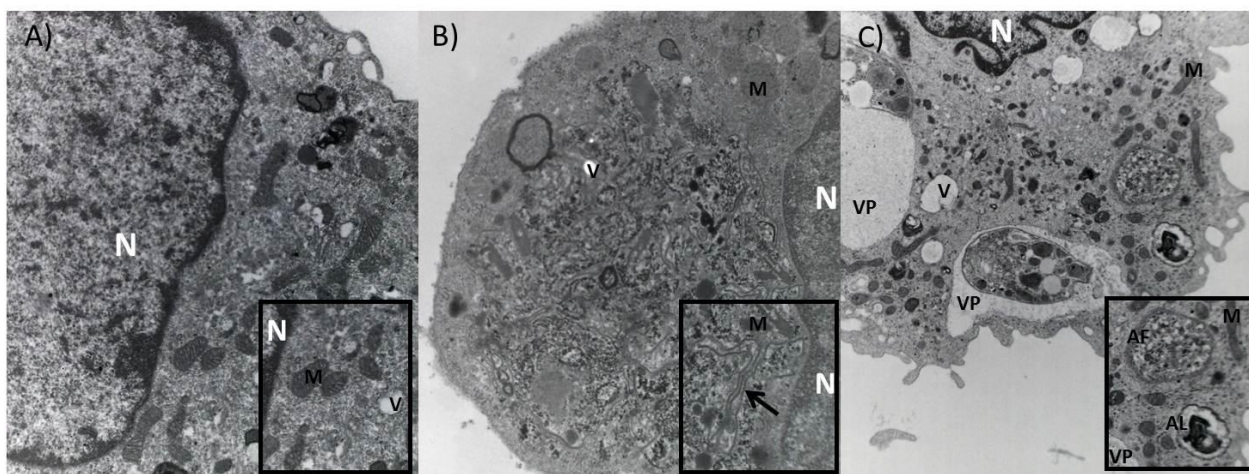
**Figura 11. Efeito da indução de autofagia por *starvation* em BMDMs de camundongos C57BL/6, infectados com *L. amazonensis*, após 3 dias de cultura.** BMDMs não infectados permaneceram em meio DME + 10% de SFB (macrófagos não infectados) ou sofreram indução de autofagia por *starvation* (macrófagos + *starvation* 2h) ou foram ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (macrófagos + IFN- $\gamma$  + LPS). Macrófagos infectados permaneceram por 1h com os parasitas (infecção com 0,5 amastigota: 1 macrófago). Um grupo de macrófagos infectados sofreu indução de autofagia por *starvation* (infecção + *starvation* 2h) e outro grupo foi pré-ativado com IFN- $\gamma$  e LPS (IFN- $\gamma$  + LPS + infecção). Após os tratamentos as células foram lavadas e permaneceram em meio DME + 10% de SFB por três dias (exceto o grupo que foi ativado, que recebeu meio DME + 10% de SFB por três dias). A) *Western blotting* para detecção de LC3. B) Quantificação das bandas de LC3-II por densitometria. C) Índice de infecção. D) Porcentagem de macrófagos infectados e Número de amastigotas/macrófagos. \*= significativamente diferente ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação à carga parasitária dos BMDMs de camundongos C57BL/6 que permaneceram 3 dias em cultura, houve redução do índice de infecção em todos os grupos quando comparado ao índice de infecção dos macrófagos utilizados imediatamente após os tratamentos (Figura 11C). Nessas células, o índice de infecção foi de aproximadamente 3, com cerca de 1,5% dos macrófagos infectados (Figuras 10C e 10D), enquanto que nos BMDMs utilizados imediatamente após os tratamentos, o índice de infecção foi de aproximadamente 30, com cerca de 15% de macrófagos infectados (Figuras 11C e 11D). Sugerimos que pelo fato da infecção inicial ter sido baixa (aproximadamente 15% de macrófagos infectados na cultura), esses macrófagos foram capazes de controlar a infecção *in vitro*.

#### **4.6. Visualização de BMDMs de camundongos BALB/c por Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A fim de visualizar ultraestruturas características de autofagia e de inferir sobre a localização das mesmas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, realizamos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão com BMDMs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. A figura 12 mostra que, os macrófagos, de uma maneira geral, apresentam núcleo íntegro e bem definido. Os macrófagos controle (não-autofágicos e não-infectados) apresentam citoplasma homogêneo, com presença de mitocôndrias e de poucos vacúolos sem conteúdo (Figura 12 A). Os macrófagos que sofreram indução de autofagia por *starvation* apresentam grande quantidade de organelas e membranas sequestradas no citoplasma e é notória a presença de estruturas com membranas duplas que sugerem a formação de autofagossomos (Singh et al., 2009; Lima et al., 2011) (Figura 12B). Nos macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 12C), constatamos a

presença do parasita no interior dos vacúolos parasitóforos e de autofagossomo (com conteúdo citoplasmático evidente em seu interior) e autolisossomo (com conteúdo citoplasmático em degradação) nos arredores dos vacúolos parasitóforos. Não foi observada fusão entre essas organelas autofágicas e vacúolos parasitóforos (Figura 12C).



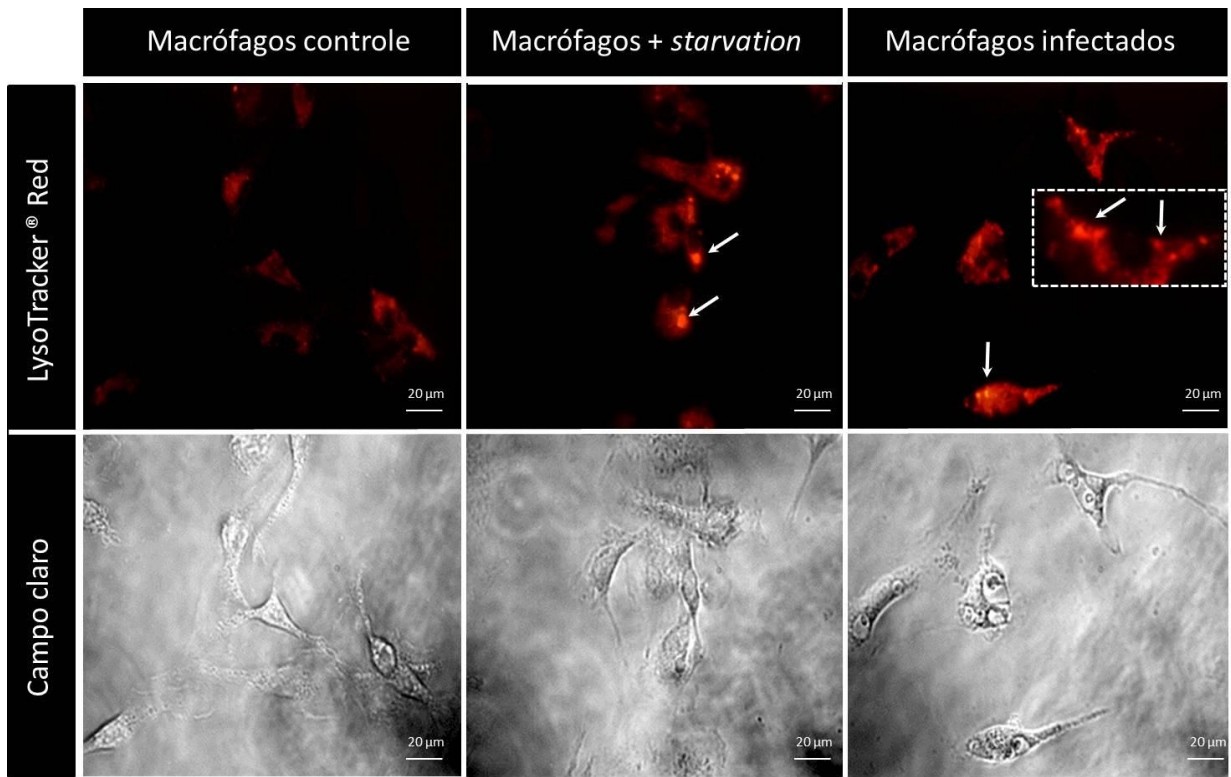
**Figura 12. Visualização de BMDMs de camundongos BALB/c por Microscopia Eletrônica de Transmissão.** A) BMDMs mantidos em meio DME + 10% de SFB. O aumento em detalhe evidencia citoplasma homogêneo, com presença de mitocôndrias e poucos vacúolos com ausência de conteúdo citoplasmático. B) BMDMs que sofreram indução de autofagia por *starvation* (2h). O aumento em detalhe evidencia a presença de grande quantidade de membranas e organelas sequestradas no citoplasma, característico de células autofágicas. As setas indicam a presença de regiões com membranas duplas. C) BMDMs infectados com *L. amazonensis*. Detalhe indica a presença de autofagossomo com material citoplasmático em seu interior e autolisossomo contendo material citoplasmático em degradação. Não foi observada fusão de organelas autofágicas com os vacúolos parasitóforos que abrigam os parasitas. A= amastigota, N= núcleo, M= mitocôndrias, V= vacúolo, VP= vacúolo parasitóforo AF= autofagossomo, AL= autolisossomo.

#### 4.7. Análise da atividade lisossomal de BMDMs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

A fim de monitorar a atividade lisossomal de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, realizamos ensaios de marcação de lisossomos com *LysoTracker® Red*. A avaliação da atividade lisossomal é uma maneira indireta de monitoramento da autofagia e foi utilizada nesse trabalho

como uma técnica complementar aos ensaios de *western blotting* para detecção de LC3 e aos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão para visualização de organelas autofágicas.

Nesses ensaios utilizamos: 1) macrófagos não infectados (controle), mantidos em meio DME + 10% de SFB (Figura 13A); 2) macrófagos que sofreram indução de autofagia por *starvation* (2h) (Figura 13B) e 3) macrófagos infectados na proporção 3:1 (1h) com *L. amazonensis* (Figura 13C). Os macrófagos controle apresentam marcação mais homogênea de *LysoTracker® Red* quando comparados as células do grupo *starvation*. Nessas células do grupo *starvation*, ocorreu marcação pontual bastante evidente, indicando intensa atividade lisossomal. Também observamos que os macrófagos que foram infectados com *L. amazonensis* tiveram aumento da atividade lisossomal quando comparados ao grupo controle, sugerindo que houve indução de autofagia nas células infectadas. Esse aumento, entretanto, não foi tão grande quando comparado ao grupo *starvation*. É interessante notar não houve marcação por *LysoTracker® Red* no interior dos vacúolos parasitóforos e nem no parasita; a marcação foi vista apenas no citoplasma e na periferia externa do vacúolo parasitóforo.



**Figura 13. Avaliação de atividade lisossomal em BMDMs de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.** BMDMs de camundongos BALB/c foram cultivados em meio DME + 10% de SFB (controle) (A) ou mantidos por 2h em *starvation* para a indução de autofagia (B) ou infectados na proporção de 3 amastigotas : 1 macrófago – 1h (C). A marcação de atividade lisossomal foi realizada com *LysoTracker Red® Lysosensor* em meio fresco. A análise das células foi feita em microscópio de fluorescência, em campo escuro com filtro apropriado e campo claro. Setas brancas evidenciam pontos de marcação de atividade lisossomal intensa. Detalhe em C evidencia região celular com marcação lisossomal intensa. Note que essas estruturas localizam-se nas proximidades do vacúolo parasitóforo e na periferia externa do mesmo.



## 5. Discussão

Além da importância na reciclagem de macromoléculas, a autofagia é um mecanismo de defesa induzível que marca patógenos invasores para a fusão com lisossomos (Levine & Deretic 2007). O processo autofágico está envolvido na eliminação de patógenos tal como *Mycobacterium tuberculosis* e *Shigella flexneri* (Gutierrez et al., 2004; Levine & Deretic 2007). Por outro lado, alguns patógenos, como *Legionella pneumophilla* e alguns herpesvirus desenvolveram mecanismos de subverter a maquinaria autofágica (revisado por Deretic & Levine, 2009). Protozoários do gênero *Leishmania* são capazes de sobreviver e de se multiplicar nos vacúolos parasitóforos, vesículas acidificadas enriquecidas com enzimas lisossomais (Alexander et al., 1992; Russel & Chakraborty, 1992). O papel da autofagia na infecção causada pela *Leishmania* ainda não é muito bem compreendido e os dados encontrados na literatura apresentam algumas discordâncias, possivelmente devido a diferenças nos protocolos experimentais utilizados. Schaible et al., observaram que a inibição da autofagia com 3-metiladenina impede a fusão de vesículas contendo partículas de dextran aos vacúolos parasitóforos que abrigam os parasitas (Schaible et al., 1999). Os autores sugerem que amastigotas da espécie *L. mexicana* adquirem macromoléculas dos macrófagos hospedeiros por uma via que envolve autofagia celular. Pinheiro et al. 2009 demonstraram que a indução de autofagia aumenta a carga parasitária de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, mas não altera a carga parasitária de macrófagos de camundongos C57BL/6. Neste trabalho, foi feita a infecção de macrófagos inflamatórios e utilizou-se formas promastigotas do parasita. Deve-se ressaltar também que o monitoramento de autofagia foi realizado apenas por *monodansylcadaverine*, um marcador de compartimentos celulares ácidos e microscopia

eletrônica de transmissão, não sendo utilizado qualquer marcador específico de autofagossomos, como utilizado em nossos estudos, o LC3. Recentemente outro grupo de pesquisa demonstrou que a indução de autofagia em macrófagos murinos de diferentes origens e linhagens (tais como macrófagos peritoneais inflamatórios e BMDMs de camundongos CBA, BALB/c e C57BL/6), reduz a capacidade fagocítica dos macrófagos, diminuindo o número de *L. amazonensis* por célula (Lima et al., 2011). Neste trabalho os macrófagos foram infectados com promastigotas do parasita, mas, diferentemente de Pinheiro et al., 2009, a indução de autofagia foi realizada antes da infecção, o que pode estar relacionado com a discordância dos resultados. Mitroulis et al., 2009 demonstraram que macrófagos extraídos de medula óssea de paciente infectado naturalmente com *L. donovani* apresentam indução da maquinaria autofágica e que o tratamento desses pacientes com anfotericina B foi capaz de eliminar o parasita, o que, conseqüentemente, levou à redução da autofagia. Este trabalho é importante por se tratar da primeira descrição do envolvimento da maquinaria autofágica durante a infecção natural causada por *Leishmania*. Deve-se, entretanto, destacar que o monitoramento da autofagia foi realizado em macrófagos de apenas um paciente, que gera questionamentos se o fenômeno observado é global ou se foi apenas um caso isolado (Mitroulis et al., 2009).

Em nosso trabalho, avaliamos o processo autofágico de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Nossos objetivos principais foram avaliar se a infecção *in vitro*, utilizando-se esses parasitas, induzem autofagia em macrófagos murinos e a indução de autofagia altera a carga parasitária de macrófagos de diferentes linhagens de camundongos. Foram utilizadas três diferentes técnicas de monitoramento de autofagia durante a execução deste trabalho: *western blotting* para detecção de LC3 (marcador de autofagia), microscopia eletrônica de transmissão para visualização de ultraestruturas autofágicas e avaliação de atividade lisossomal por

microscopia de fluorescência através da marcação com *LysoTracker® Red*. Através de *western blotting* para a detecção de LC3, demonstramos que a infecção *in vitro* causada por *L. amazonensis* induz autofagia em macrófagos Raw 264.7, BMDMs de camundongos BALB/c e BMDMs de camundongos C57BL/6 (Figuras 3, 5 e 6). Nesses ensaios, foi visto um aumento na intensidade da banda de LC3-II nos macrófagos infectados em comparação aos macrófagos não infectados. Esses dados apresentam semelhança aos de Mitroulis et al., 2009, que, observaram indução da maquinaria autofágica em macrófagos de paciente infectados com *L. donovani*. Nossos dados também indicam que o aumento do índice de infecção está relacionado ao aumento da intensidade da banda de LC3-II (Figura 7). Curiosamente, em nossos ensaios de *western blotting* realizados com proteínas de BMDMs de camundongos, foi possível visualizar apenas a marcação da banda de LC3-II (14kDa). Uma explicação para esse fenômeno é a de que os anticorpos produzidos contra LC3 apresentaram maior afinidade pela isoforma LC3-II. Esse fenômeno já foi descrito na literatura utilizando-se células HeLa (N'Diaye et al., 2009) e BMDMs de camundongos C57BL/6 (Swanson et al., 2009).

A ativação dos macrófagos com IFN- $\gamma$  e LPS causou aumento na intensidade de LC3-II (Figuras 3, 5 e 6). Esses dados vão de acordo os da literatura, que demonstram que IFN- $\gamma$  e/ou LPS, são capazes de induzir autofagia (Gutierrez et al., 2004; Shi & Kehrl, 2008; Xu et al., 2007). Isso sugeriria uma possível correlação entre indução de autofagia e eliminação do parasita, já que macrófagos ativados classicamente com IFN- $\gamma$  e LPS são capazes de eliminar *Leishmania*. Entretanto, ao contrário do que era esperado, a pré-ativação de macrófagos Raw 264.7 com IFN- $\gamma$  e LPS causou um aumento do índice de infecção em nossos ensaios (Figura 3D). Nós sugerimos que a alta concentração de IFN- $\gamma$  utilizada (200 ng/ml) tenha sido a responsável por esse fenômeno, já que foi demonstrado anteriormente que a ativação com IFN- $\gamma$  pode promover a

replicação de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos murinos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Qui et al., 2004). Em nenhum dos ensaios com BMDMs de camundongos BALB/c foi observada alteração do índice de infecção de macrófagos pré-ativados com IFN- $\gamma$  e LPS (Figuras 5, 8 e 9). Já nos ensaios com BMDMs de camundongos C57BL/6 houve redução significativa do índice de infecção dos macrófagos pré-ativados (Figuras 6, 10 e 11). Sugerimos que essa diferença de resposta aos ativadores, observada entre os macrófagos de diferentes linhagens, ocorra devido à elevada suscetibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. amazonensis* e à capacidade de camundongos C57BL/6 de controlar tal infecção (Barral et al., 1983, Giorgio et al., 1998).

Quando realizamos a indução de autofagia (*starvation*) em BMDMs de camundongos BALB/c após a infecção, observamos um aumento significativo da porcentagem de macrófagos infectados, após três dias em cultura (Figura 8). Interessante notar que o aumento do número de macrófagos infectados, nas culturas de células que sofreram indução de autofagia, foi acompanhado do aumento da intensidade da banda de LC3-II, quando comparados aos macrófagos apenas infectados. Esses dados sugerem que o aumento da intensidade de LC3-II ocorreu devido ao aumento do número de macrófagos infectados. Por outro lado, BMDMs de camundongos C57BL/6 que sofreram indução de autofagia por *starvation* após a infecção não alteram o índice de infecção após três dias de cultura, sugerindo que a origem dos macrófagos interfere no efeito da indução de autofagia sobre a infecção com *L. amazonensis*. Esses dados corroboram com os de Pinheiro et al, 2009, que também observaram aumento na porcentagem de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Esses autores demonstraram que a indução de autofagia em macrófagos de camundongos BALB/c infectados induz aumento no número de amastigotas por macrófago, diferentemente dos nossos dados. Nós

sugerimos que essa discordância tenha ocorrido por duas razões: terem sido utilizados macrófagos de diferentes origens nos dois trabalhos (utilizamos BMDMs enquanto Pinheiro et al. 2009, utilizaram macrófagos peritoneais inflamatórios), e também pela utilização do parasita em diferentes estágios de diferenciação (utilizamos amastigotas em nosso trabalho enquanto Pinheiro et al. 2009 utilizaram promastigotas). Do ponto de vista celular, macrófagos inflamatórios apresentam uma série de alterações metabólicas (Cohn, 1978) que poderiam influenciar a multiplicação do parasita. Além disso, a infecção realizada com as duas diferentes formas do parasita também poderia influenciar a carga parasitária após a indução de autofagia, já que formas promastigotas e amastigotas apresentam diferentes antígenos de superfície que induzem respostas imunológicas diferentes no hospedeiro.

Lima et al., 2011, correlacionaram a indução de autofagia à redução do número de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Em nosso trabalho foi visto aumento da porcentagem de macrófagos infectados após a indução de autofagia e sugerimos que isso ocorra devido ao aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos, diferentemente de Lima et al., 2011. Uma possível explicação para isso é a de que as diferentes metodologias utilizadas em cada um dos trabalhos tenham sido responsáveis resultados distintos. Enquanto Lima et al., 2011 induziram autofagia nos macrófagos em momento anterior à infecção com promastigota, em nosso estudo, a indução de autofagia foi realizada após a infecção dos macrófagos com amastigotas. De fato, estudos recentes demonstraram que, existe uma comunicação entre as vias autofágica e fagocítica, indicando que a convergência dessas duas vias tem papel importante na resposta imune inata contra microrganismos intracelulares (Sanjuan et al., 2007; Shui et al., 2008; Martinet et al., 2009; Lima et al. 2011). Sanjuan et al., 2007 demonstraram que o envolvimento da sinalização via *Toll-like receptors* durante a fagocitose de organismos extracelulares induz a

maquinaria autofágica clivar LC3 diretamente no fagossomo, aparentemente sem a formação da estrutura autofagossomal (Sanjuan et al., 2007). Em outro trabalho, demonstrou-se através de análises proteômicas que LC3-II foi identificada na membrana de fagossomos contendo *beads* de látex (Shui et al., 2008). Em nosso trabalho observamos expressão de LC3-II em macrófagos infectados e vimos que o aumento do índice de infecção aumenta ainda mais a expressão de LC3-II. Como o parasita *Leishmania* entra nas células hospedeiras via fagocitose, sugerimos algumas hipóteses para explicar nossos dados: 1) a fagocitose de *L. amazonensis* pelos macrófagos induz o aumento do número de autofagossomos, e esses poderiam se fundir ou não ao vacúolo parasitóforo e alternativamente, 2) a fagocitose de *L. amazonensis* induz a clivagem de LC3 diretamente nos vacúolos parasitóforos, já que estas estruturas são originadas a partir dos fagossomos. Apesar de termos observado marcação lisossomal na periferia externa dos vacúolos parasitóforos que abrigam os parasitas (Figura 13), não observamos fusão entre tais estruturas com autofagossomos através de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 12). Ensaio de localização de LC3, pelo método de imunofluorescência, foram realizados, mas mostraram resultados pouco conclusivos (dados não mostrados). Também realizamos algumas tentativas de transfecção de macrófagos com LC3-GFP durante esse estudo, mas obtivemos uma baixa porcentagem de macrófagos transfectados, impossibilitando a utilização dos mesmos (dados não mostrados). Dessa maneira, não foi possível inferir sobre a localização de LC3-II em macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Compreender os mecanismos pelos quais as células hospedeiras tentam combater a infecção e os mecanismos de adaptação da *Leishmania* são fundamentais para o desenvolvimento de medicamentos contra a leishmaniose. Nossos resultados contribuem para a elucidação do

papel da autofagia durante a infecção causada por *L. amazonensis* e abre novas perspectivas para o estudo desse processo biológico durante a infecção causada por outras espécies de *Leishmania*.

## 6. Conclusão

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, concluímos que:

- a infecção causada por *L. amazonensis* induz autofagia em macrófagos Raw 264.7 e macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6;
- o nível de autofagia, observado por *western blotting* para a detecção de LC3, em BMDMs infectados por *L. amazonensis* é influenciado pelo índice de infecção da cultura;
- a indução de autofagia por *starvation* em macrófagos infectados com *L. amazonensis* aumenta a porcentagem de células infectadas após 3 dias de cultura, possivelmente devido ao aumento da capacidade fagocítica desses macrófagos;
- o aumento da porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis* após a indução de autofagia é um fenômeno dependente da linhagem do camundongo de origem dos macrófagos, já que não houve alteração da carga parasitária de BMDMs de camundongos C57BL/6.



## 7. Referências bibliográficas

- AFONSO, L.C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 2952-2959, 1993.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D.G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages, *Advances in Parasitology*, v. 31, p. 175-254, 1992.
- ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, v. 7 (10), p. 392-401, 1998.
- ARRAIS-SILVA, W.W.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; GIORGIO, S. Hyperbaric oxygen therapy reduces the sizes of *Leishmania amazonensis*-induced soft tissues lesions in mice. *Parasitology International*, v. 98(2), p. 130-136, 2006.
- AZEREDO-COUTINHO, R.G.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLLIO, E., QUINTELLA, R.P., MADEIRA, M.F., PACHECO, R.S., VALETE-ROSALINO, C.M.; MENDONÇA, S.C.F. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 101, p. 735-737, 2007.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEM, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRODEJESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR., W.D. (1991). Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, v. 44, p. 536-546, 1991.
- BARRAL, A.; PETERSEN, E.A.; SACKS, D.L.; NEVA, F.A. Late metastatic leishmaniasis in the mouse. A model for mucocutaneous disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 32, p. 277-285, 1983.
- BATES, P.A. Housekeeping by *Leishmania*. *Trends In Parasitology*, v. 22, p. 447-448, 2006.
- BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 127, p. 23-35, 2003.
- BERG, T.O.; FENGSRUUD, M.; STROMHAUG, P.E.; BERG, T.; SELGEN, P.O. Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 21883-21892, 1998.
- BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*, v.10, p. 560-586, 1988.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R.A.M.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal of Parasitology*, v. 37(10), p. 1063-1075, 2007.
- BISWAS, D.; QURESHI, S.O.; LEE, W.Y.; CROUDACE, J.E.; MURA, M., LAMMAS, D.A. (2008). ATP-induced autophagy is associated with rapid Killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunology*, v. 9:35, p., 2008.
- BRAY, P.G.; BARRETT, M.P.; WARD, S.A.; KONING, H.P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, v. 19, p. 232-239, 2003.

- CAMARGO NEVES, V.L.F. A leishmaniose visceral Americana no Estado de São Paulo, Boletim Epidemiológico Paulista, v. 1(6), p. 1-4, 2004.
- CHILDS, G.E.; LIGHTNER, L.K.; GROOVES, M.C.; PRICE, E.E.; ENDRCKS, L.D. Inbred mice as model for cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 78, p. 25-34, 1984.
- COHN, Z.A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *The journal of immunology*, v. 121 (3), p. 813-816, 1978.
- CORRADIN, S.B.; MAUE, L.J. Phagocytosis of *Leishmania* enhances macrophage activation by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide. *Journal of Immunology*, v. 146, p. 279–285, 1991.
- CVE - Centro de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Tegumentar no Estado de São Paulo- Casos Notificados por GVE e Ano da Notificação - 1998 a 2010. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta\\_gve.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lta_gve.htm). Acesso em: 27 de abril de 2011.
- DEGROSSOLI, A.; COLHONE, M.C.; ARRAIS-SILVA, W.W.; GIORGIO, S. Hypoxia modulates the expression of 70 kDa heat shock protein and reduces *Leishmania* infection in macrophages. *Journal of Biomedical Science*, v. 11(6), p. 847-854, 2004.
- DERETIC, V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 375-382, 2006.
- DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy, immunity and microbial adaptations. *Cell Host and Microbe*, v. 5, p.527-549.
- ESCOBAR, P.; YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), ambisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob Agents Chemother* 45(6):1872–1875, 2001.
- GALLAGHER, S.R. Analysis of Proteins: One dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins:Electrophoresis in Tris-Tricine Buffer Systems. In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Struhl, K. (Eds). *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, 2002. 10-5 to 10-26.
- GIORGIO, S.; LINARES, E.; ISCHIROPOULOS, H.; VON ZUBEN, F.J.; YAMADA, A.; AUGUSTO, O. *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infection and Immunity*, v. 66, p. 807-814, 1998.
- GORDON, P.B. & SEGLEN, P.O. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 15, p. 40-47, 1988.
- GRIMALDI, G. Jr; MORIEARTY, P. L.; Hoff, R. *Leishmania mexicana*: Immunology and histopathology in C3H mice. *Experimental Parasitology*, v. 50, p. 45-56, 1980.
- GUTIERREZ, M.G.; MASTER S.S.; SINGH, S.B.; TAYLOR G.A.; COLOMBO, M.I.; DERETIC, V. Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* Survival in Infected Macrophages. *Cell*, v. 119, p. 753–766, 2004.
- HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*, v. 44, p. 1-39, 1999.
- HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 14, p. 229-43, 2001.
- HENRY, W.M.; BERGMAN, J.D.; DAVIES, C.D.; SARAIVA, N. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366(9496), p. 1561-1577, 2005.
- KIRKEGAARD, K.; TAYLOR, M. P.; JACKSON, W. T. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 301–314, 2004.

- KLIONSKY, D.J.; CUERVO, A.M.; SEGLEN, P.O. Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy*, v. 3(3), p. 181-206, 2007.
- KROEMER, G.; MARINO, G. & LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, v. 40, p. 280–293, 2010.
- KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36(8), p. 1630–1634, 1992.
- LEVINE, B. & DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, p. 67–777, 2007.
- LEVINE, B. & KLIONSKY, D. J. Development by selfdigestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental Cell*, v. 6, p. 463–477, 2004.
- LEVINE, B. & KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of Disease. *Cell*, v. 132(1), p. 27-42, 2008.
- LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H.W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, v. 469, p. 323-335, 2011.
- LEVINE, B. & YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115(10), p. 2679-2688, 2005.
- LIMA, J.G.B; VINHAS,C.F.; GOMES,I.N.; AZEVEDO, C.M.; SANTOS,R.R.; VANNIER-SANTOS, M.A.; VERAS, P.S.T . Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 405, p. 604-609, 2011.
- LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 44, p. 1668–1676, 2008.
- MARTINET, W.; SCHRIJVERS, D.M.; TIMMERMANS, J.; HERMAN, A.G.; DE MEYER, G.R.Y. Phagocytosis of bacteria is enhanced in macrophages undergoing nutrient deprivation, *FEBS Journal*, v. 276, p. 2227–2240, 2009
- MITROULIS, I.; KOURTZELIS, I.; PAPADOPOULOS, V.P.; MIMIDIS, K.; SPELETAS, M.; RITIS, K. *In vivo* induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. *Parasitology International*, v. 58, p. 475-477, 2009.
- MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. *International Journal of Biochemistry & Cellular Biology*, v. 36, p. 2491-502, 2004.
- MIZUSHIMA, N. Autophagy: Process and functions. *Genes & Development*, v. 21, p. 2861-2873, 2007.
- N'DIAYE, E.N.; KAJIHARA, K.K.; HSIEH, I.; MORISAKI, H.; DEBNATH, J.; BROWN, E.J. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagydependent cell survival during nutrient starvation. *European Molecular Biology Organization Reports*, v. 10 (2), p. 173-179, 2009.
- NEAL, R.A. & HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, v. 87, p. 7–13, 1983.
- OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitology Today*, v. 9, p. 323–328, 1993.
- PANARO, M.A.; ACQUAFREDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D.D.; TRTOTTA, T.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V.; BRANDONISIO, O. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages

- stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *International Journal of Clinical and Laboratorial Research*, v. 29, p. 122–127, 1999.
- PEREIRA, B.A.S. & ALVES, C.R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Veterinary Parasitology*, v. 158, p. 239–255, 2008.
- PINHEIRO, R.O.; NUNES, P.N.; PINHEIRO, C.S.; D'ÁVILA, H.; BOZZA, P.T.; TAKIYA, C.M.; CORTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; DOS REIS, G.A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes and Infection.*, 2009. doi:10.1016/j.micinf.2008.11.006.
- QUI, H.; Ji, J.; WANASEN, N.; SOONG, S. Enhanced Replication of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Gamma Interferon-Stimulated Murine Macrophages: Implications for the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. *American Society for Microbiology*, v. 72(2), p. 988-995, 2004.
- RAHT, S.; TRIVELLIN, A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.; JUNIOR, H.F.A. Tempone, A.G. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550–557, 2003.
- RAMOS, H.; MILHAUD, J.; COHEN, B.E.; BOLARD, J. Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34(8), p. 1584–1589, 1990.
- RAVIKUMAR, B.; MOREAU, K.; RUBINSZTEIN, D.C. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, v. 6 (8), p. 1184-1186, 2010.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, p. 581–96, 2007.
- ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R., BIZZO, H.R., RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.; PADRÓN, T.S.; ALVIANO, C.S., LOOPES, A.H.C.S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Cróton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(6):1895–1901, 2003.
- RUSSELL, D.G.; XU, S.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *Journal of Cell Science*, v. 103, p. 1193-1210, 1993.
- SANJUAN, M.A.; DILLON, P.C.; TAIT, S.W.G.; MOSHIACH, S.; DORSEY, F.; CONNELL, S.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; CLEVELAND, J.L.; WITHOFF, S.; GREEN, D.R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *NATURE*, v. 450, p 20-27, 2007.
- SCHAIBLE, U.E.; SCHLESINGER, P.H.; STEINBERG, T.H.; MANGEL, W.F.; KOBAYASHI, T.; RUSSELL, D.G. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *Journal of Cell Science*, v. 112, p. 681-693, 1999.
- SCHIMID, D., & MUNZ, C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity*, v. 27, p. 11–21, 2007.
- SHI, C.S. KEHRL, J.H. MyD88 and Trif Target Beclin 1 to Trigger Autophagy in Macrophages. *Journal of Biological Chemical*, v. 283(48), p. 33175–33182, 2008.
- SHUI, W.; SHEUB, L.; LIUC, J.; SMARTA, B.; PETZOLDD, C.J.; HSIEHB, T.; PITCHERA, A., KEASLINGD, J.D.; BERTOZZIA, C.R. Membrane proteomics of phagosomes suggests

- a connection to autophagy. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 105 (44), p. 16952–16957.
- SINGH, S.B.; DAVIS, A.S.; TAYLOR, G.A.; DERETIC, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*, v. 313, p. 1438-1441, 2006.
- SWANSON, M.; BYRNE, B.G.; DUBUISSON, J.F. Kinetic Analysis of Autophagosome Formation and Turnover in Primary Mouse Macrophages. *Methods in Enzymology*, v. 452 (23), p. 1-18, 2009.
- TOOZE, J.; HOLLINSHEAD, M.; LUDWIG, T.; HOWELL, K.; HOFLACK, B.; KERN, H. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *The Journal of Cellular Biology*, v. 111, p. 329-345, 1990.
- WHO - World Health Organization, Leishmaniasis: Burden of disease. Magnitude of the problem. 2004. Disponível em: <[http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html)> Acesso em: 25 de maio de 2008.
- WILLIAMS, R.A.; TETLEY, L.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. (2006). Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*, v. 61, p. 655–674, 2006.
- XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X.D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K.E.; EISSLER, N.T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity*, v. 27(1), p. 135–144, 2007.
- YANG, Z.; KLIONSKY, D. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, v. 12, p. 814–822, 2010.

## 8. Anexo



CEEA/Unicamp

### Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

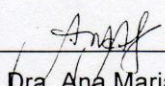
#### CERTIFICADO

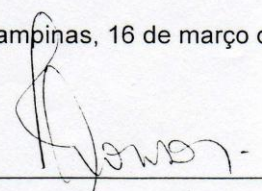
Certificamos que o Protocolo nº 1778-1, sobre "Avaliação do processo autofágico de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* em diferentes macroambientes", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Selma Giorgio / Larissa Tavares Cyrino, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 16 de março de 2009.

#### CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1778-1, entitled "Evaluation of the autophagic process in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* in different microenvironments", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on March 16, 2009.

Campinas, 16 de março de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva