



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



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DA AUTOFAGIA PARA A
SUSCEPTIBILIDADE POR *L. AMAZONENSIS* OU RESISTÊNCIA
POR *L. MAJOR* NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS
DA LINHAGEM CBA**

BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS

Salvador - Bahia

2018

**UNIVERSIADADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DA CONTRIBUIÇÃO DA AUTOFAGIA PARA A
SUSCEPTIBILIDADE POR *L. AMAZONENSIS* OU RESISTÊNCIA POR *L.
MAJOR* NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DA LINHAGEM CBA**

BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS

Orientadora: Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras

Co-orientador: Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

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

Salvador - Bahia

2018

INSERIR A FOLHA DE APROVAÇÃO

Vou inserir no pdf

FONTES DE FINANCIAMENTO

CNPq

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tânia e Louro,
por me darem asas e raízes.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Patrícia Veras por ter confiado em mim desde minha iniciação científica, pelas discussões entusiasmadas, amizade e principalmente por me mostrar como a pesquisa de qualidade deve ser desenvolvida;

À minha co-orientadora Dra. Juliana Perrone pelo apoio, dedicação, paciência, discussões científicas e pela grande amizade que foi construída ao longo desses anos;

À minha grande amiga de laboratório, Luana Palma, por estar sempre do meu lado me dando força e apoio e por compartilhar comigo momentos de alegria e tristeza;

À Carina Santos, pela paciência e coragem por ter sido a primeira estudante de iniciação científica sob minha co-orientação e pela amizade;

Ao querido grupo P. Veras - J. Perrone: Brenda Melo, Bruna Leite, Carina Santos, Carine Araujo, Diana Dantas, Kercia Pinheiro, Luana Palma, Marina Faillace, Amanda Rebouças, Carolina Oliveira, Gustavo Nery, Yasmin Luz e Rosidete Bastos;

À Deborah Fraga e a todo seu grupo pela amizade e preciosas contribuições;

À Dra. Cláudia Brodskyn e à sua equipe pela agradável convivência e sugestões;

À Dra. Natália Machado e ao seu grupo pelo convívio e discussões;

Ao Dr. Ricardo Khouri pelas discussões e auxílio em bioinformática;

À Dra. Jaqueline França e Thiale Santos pela contribuição e ensinamentos;

À Manuela Solcà, Niara Almeida, Antônio Petersen, Carlos Eduardo Guedes e José Geraldo Bomfim Lima pelos anos de laboratório que tivemos juntos e pela construção de uma grande amizade;

À Dra. Maria Isabel Colombo pelas discussões científicas e valiosas contribuições para este trabalho;

Ao Dr. Maurício Terebiznik pelos ensinamentos e por ter me recebido em seu laboratório;

À Isabele Coelho e Patrícia Luz pela amizade e eficiência em resolver questões burocráticas;

À Dra. Adriana Lanfredi, Dr. Cláudio Figueiredo, Dra. Maria Lúcia Moreno, Márcio dos Santos e Arlene Lessa pelos ensinamentos em microscopia de fluorescência e por serem sempre tão solícitos em me auxiliar;

Aos membros da banca examinadora por contribuírem para a minha formação científica e para o aperfeiçoamento deste trabalho;

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia do Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/Ba e Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia pelos ensinamentos;

À Ana Carolina Sodré, Ana Carolina Costa, Noélia dos Santos, Simone Fortunato e Clara Mutti por estarem sempre dispostas à sanar minhas dúvidas e pelo auxílio em questões burocráticas;

À biblioteca do IGM, pelas orientações na dissertação final;

Aos meus pais, Louro e Tânia, por todo amor, sacrifício, incentivo à minha vida acadêmica e por serem responsáveis pela pessoa que me tornei;

Ao meu namorado, Lairton Borja, por trazer mais amor e leveza à minha vida, pelo companheirismo, por confiar em mim e por sempre me apoiar nos momentos difíceis;

À minha avó e minha irmã, Hélvia e Carla, pelo carinho, atenção, por sempre estarem torcendo por mim e entenderem minhas ausências em momentos especiais;

À todos meus amigos que me acompanharam nessa longa jornada e me ajudaram direta ou indiretamente.

DIAS, Beatriz Rocha Simões. Estudo da contribuição da autofagia para a susceptibilidade por *L. amazonensis* ou resistência por *L. major* na infecção de macrófagos murinos da linhagem CBA. 125 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Macrófagos de camundongos CBA controlam a infecção por *Leishmania major*, no entanto, são permissivos à infecção por *Leishmania amazonensis*. Os estudos conduzidos, até o momento, sobre o papel desempenhado pela autofagia na infecção por *Leishmania* levaram a dados controversos. **OBJETIVO:** No presente trabalho, avaliamos se a resposta autofágica de macrófagos infectados pode ser responsável pela diferença no curso da infecção por essas duas espécies de *Leishmania*. **MATERIAL e MÉTODOS e RESULTADOS:** Inicialmente, demonstramos por qPCR e por análise de dados de microarranjos públicos que um número maior de genes relacionados à autofagia é modulado positivamente em células infectadas por *L. amazonensis* em comparação às infectadas *L. major*. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) demonstrou modulação oposta dos genes relacionados à autofagia entre os macrófagos infectados com *L. amazonensis* daqueles infectados com *L. major*. Após 24 h de infecção, a relação LC3-II/Act é aumentada tanto em macrófagos infectados por *L. amazonensis* quanto nos infectados por *L. major* em comparação com controles não infectados, mas menos do que em células tratadas com cloroquina. Embora, os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* tenham apresentado maior positividade para o marcador degradativo, DQ-BSA, o recrutamento de LC3 foi maior nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis*. Interessantemente, tanto a indução farmacológica quanto a fisiológica da autofagia aumentaram a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. major*, enquanto a inibição da autofagia não teve efeito sobre a viabilidade intracelular desses parasitas. Também demonstramos que a indução da autofagia reduziu a produção de NO por macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, mas não alterou a atividade da arginase. A análise de componentes principais e agrupamento hierárquico de *clusters* discriminaram completamente os macrófagos infectados por *L. major* de células infectadas por *L. amazonensis* de acordo com a intensidade da infecção e características autofágicas dos vacúolos induzidos por essas duas cepas. **CONCLUSÃO:** Em conclusão, a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, apesar de ativar similarmente o fluxo autofágico em macrófagos infectados e os parasitos terem sua viabilidade favorecida pela indução da autofagia, promove expressão diferenciada de genes relacionados à autofagia e interação distinta dos vacúolos parasitóforos com compartimentos autofágicos. Essas diferenças são capazes de

separar completamente os macrófagos infectados por *L. amazonensis* daqueles por *L. major*.

Palavras-chave: *Leishmania*, Macrófago, Autofagia, LC3, Vacúolos parasitóforos

DIAS, Beatriz Rocha Simões. Study of the autophagy contribution to susceptibility by *L. amazonensis* or resistance to *L. major* in the infection of CBA murine macrophages. 125 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: CBA mouse macrophages (MΦ) control *Leishmania major* infection yet are permissive to *Leishmania amazonensis*. The role played by autophagy in *Leishmania* infection needs further investigation. **OBJECTIVE:** Thus, we assessed whether activation of autophagic pathway may account for differences in the response of infected MΦ to these two parasite strains. **MATERIAL and METHODS and RESULTS:** First, we demonstrated by qPCR and by analysis of publicly available microarray data that a greater number of autophagy-related genes (Atg) are positively modulated in cells infected by *L. amazonensis* compared to those infected by *L. major*. Ingenuity Pathway Analyses (IPA) demonstrated opposite modulation in genes in *L. amazonensis*- and *L. major*-infected MΦ. After 24 h of infection, the autophagic flux measured by LC3-II/Act ratio was similarly increased in either *L. amazonensis*- or *L. major*-infected MΦ compared to uninfected cells. Although *L. major*-induced parasitophorous vacuoles exhibited greater positivity for the degradative marker, DQ-BSA, LC3 recruitment was increased in *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles. Interestingly, autophagy induction enhanced intracellular *L. amazonensis* and *L. major* viability, although autophagy inhibition caused no effect on infection profile. We also demonstrated that autophagy induction reduced NO production by *Leishmania*-infected MΦ, yet did not alter arginase activity. Moreover, principal component analysis completely discriminated *L. major*-infected MΦ from *L. amazonensis*-infected cells regarding infection intensity and autophagic features of parasite-induced PV. **CONCLUSION:** In conclusion, infection by *L. amazonensis* or *L. major*, although similarly activates the autophagic flux in infected MΦ and the parasites have their viability favored by autophagy induction, these *Leishmania* species cause differentiated expression of Atg and distinct interaction of their parasitophorous vacuoles with autophagic vacuoles. These differences are capable to discriminate MΦ infected by *L. amazonensis* from those infected by *L. major*.

Keywords: *Leishmania*, Macrophages, Autophagy, LC3, Parasitophorous vacuole

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da <i>Leishmania</i> | 16 |
| Figura 2 | Representação esquemática da autofagia. | 26 |
| Figura 3 | Configuração da placa RT ² Profiler PCR Array (Qiagen). | 38 |
| Figura 4 | Perfil de expressão de genes relacionados à autofagia de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 52 |
| Figura 5 | Via Canônica da autofagia, desenvolvida pelo IPA, com dados dos <i>datasets</i> GSE11497 (<i>L. amazonensis</i>) e GSE31996 (<i>L. major</i>) sobrepostos.. | 54 |
| Figura 6 | Fluxograma dos genes relacionados à autofagia com expressão modulada na infecção por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 55 |
| Figura 7 | Genes selecionados para validação. | 58 |
| Figura 8 | A via autofágica é ativada similarmente em células infectadas por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 60 |
| Figura 9 | Avaliação dos vacúolos parasitóforos induzidos por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> marcados com DQ-BSA™. | 62 |
| Figura 10 | Avaliação dos vacúolos parasitóforos induzidos por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> marcados com LysoTracker®. | 64 |
| Figura 11 | Avaliação do recrutamento de LC3 para os vacúolos parasitóforos induzidos por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 66 |
| Figura 12 | Determinação do efeito de inibidores e indutores da via autofágica na viabilidade de promastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> . | 67 |
| Figura 13 | Determinação do efeito da rapamicina na viabilidade de culturas axênicas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 68 |
| Figura 14 | Avaliação do efeito da modulação da via autofágica em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> . | 70 |
| Figura 15 | Cinética da viabilidade intracelular de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> frente ao tratamento de macrófagos com moduladores da via autofágica. | 72 |
| Figura 16 | Efeito da modulação da autofagia na produção de NO e atividade da arginase, em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> | 74 |

Figura 17 Agrupamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* em *clusters* quanto às características autofágicas e parâmetros de infecção.

76

Figura 18 Resumo esquemático dos resultados.

83

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | <i>Datasets</i> de <i>microarrays</i> públicos de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> ou macrófagos não infectados utilizados no presente estudo..... | 40 |
| Tabela 2 | Genes da célula hospedeira diferencialmente expressos em BMM ϕ infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| ATG | Genes relacionados à autofagia (<i>autophagy-related genes</i>) |
| B.O.D. | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| CaCl ₂ | Cloreto de Cálcio |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CHO | Células de ovário de <i>hamster</i> |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CR | Receptor do complemento |
| CFSE | Carboxifluoresceína succinimidil éster |
| DMEM | Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| D.O. | Densidade óptica |
| EDTA | Ácido etilenodiamina tetracético |
| FAs | Contatos focais ou adesões focais |
| F-actina | Citoesqueleto de actina filamentosa |
| GPI | Glicosilfosfatidilinositol |
| gp63 | Glicoproteína de 63 KDa |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico |
| IgG | Imunoglobulina G |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| LB | Meio Luria-Bertani |
| LC3 | Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos |

| | |
|----------|---|
| LC | Leishmaniose cutânea |
| LCD | Leishmaniose cutâneo-difusa |
| LMC | Leishmaniose mucocutânea |
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LTB4 | Leucotrieno B4 |
| M Φ | Macrófago |
| MARCO | Receptor de macrófago com estrutura de colágeno |
| MET | microscópio eletrônico de transmissão |
| MDC | Monodancylcadaverina |
| miRNA | Micro RNAs |
| mTOR | Proteína alvo da rapamicina em mamíferos |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| PBS | Tampão fosfato salino |
| PBST | Tampão fosfato salino com Tween 20 |
| PCA | Análise de componentes principais |
| PE | Fosfatidiletanolamina |
| PGE2 | prostaglandina e2 |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-cinase |
| PKC | Proteína cinase C |
| PPG | Proteofosfoglicano |
| PtdIns | Fosfatidilinositol |
| SD | Desvio padrão |
| Th | Células T auxiliares |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 14 |
| 1.1 | A LEISHMANIOSE | 14 |
| 1.2 | O PARASITO | 15 |
| 1.3 | MODELO MURINO | 17 |
| 1.4 | INTERAÇÃO <i>LEISHMANIA</i> -CÉLULA HOSPEDEIRA..... | 18 |
| 1.5 | FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO..... | 19 |
| 1.6 | AUTOFAGIA..... | 22 |
| 1.7 | AUTOFAGIA E INFECÇÃO POR MICRORGANISMOS INTRACELULARES..... | 27 |
| 1.8 | ANÁLISE integrada de rede | 29 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 31 |
| 3 | OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 | GERAL | 33 |
| 3.2 | ESPECÍFICOS | 33 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 4.1 | OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS | 34 |
| 4.2 | CULTURA DE <i>LEISHMANIA</i> | 34 |
| 4.3 | SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 35 |
| 4.4 | MARCAÇÃO DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> COM CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ÉSTER (CFSE)..... | 35 |
| 4.5 | AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS POR INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L.</i> <i>MAJOR</i> | 36 |
| 4.5.1 | <i>Obtenção RNA total</i> | 36 |
| 4.5.2 | <i>Transcrição reversa</i> | 37 |
| 4.5.3 | <i>PCR array</i> | 37 |
| 4.6 | INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)..... | 38 |
| 4.7 | AVALIAÇÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 40 |
| 4.8 | AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO VACÚOLO PARASITÓFORO DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> POR DEGRADAÇÃO DO DQ-BSA..... | 42 |
| 4.9 | MARCAÇÃO DE VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR <i>L.</i> <i>AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> COM A SONDA LISOSSOMAL LYSOTRACKER® | 43 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.10 | AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE LC3 PARA OS VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 44 |
| 4.11 | IMUNOMARCAÇÃO..... | 45 |
| 4.12 | DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DA VIA AUTOFÁGICA NA VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. MAJOR</i> | 46 |
| 4.13 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 47 |
| 4.14 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS FORMAS INTRACELULARES DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> EM MACRÓFAGOS..... | 48 |
| 4.15 | QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) E ATIVIDADE DE ARGINASE | 49 |
| 4.16 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 50 |
| 5 | RESULTADOS | 51 |
| 5.1 | EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 51 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 59 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS AUTOLISOSSÔMICAS EM VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 61 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE LC3 PARA OS VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 65 |
| 5.3 | DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DA VIA AUTOFÁGICA NA VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS AXÊNICAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. MAJOR</i> | 67 |
| 5.4 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. MAJOR</i> | 69 |
| 5.5 | AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> FRENTE AO TRATAMENTO DE CÉLULAS COM MODULADORES DA VIA AUTOFÁGICA..... | 71 |
| 5.6 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MODULAÇÃO DA AUTOFAGIA NA PRODUÇÃO DE NO E NA ATIVIDADE DA ARGINASE EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> OU <i>L. MAJOR</i> | 73 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 5.7 | MARCADORES AUTOFÁGICOS DISCRIMINAM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i> DAQUELES INFECTADOS POR <i>L.</i> <i>MAJOR</i> | 75 |
| 6 | DISCUSSÃO | 77 |
| 7 | CONCLUSÃO | 83 |
| 8 | PRÓXIMAS ETAPAS | 84 |
| | REFERÊNCIAS | 85 |
| | APÊNDICE | 100 |

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma zoonose causada por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e representa uma doença emergente que permanece como um importante problema de saúde pública, especialmente por sua alta incidência em países em desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2008; PERINOTO *et al.*, 2010). Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta doença acomete cerca de 15 milhões de pessoas em todo mundo e está presente em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (WORLD HEALTH, 2010; ALVAR *et al.*, 2012). Além disso, 70-75% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem em dez países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR *et al.*, 2012). Apesar de serem declarados oficialmente somente 600.000 novos casos por ano, estima-se que esse número na realidade alcance 2 milhões de pessoas e que cerca de 350 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas. Devido à grande incidência, ampla distribuição e gravidade da doença, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das seis doenças infecto-parasitárias de maior importância (WORLD HEALTH, 2010). No Brasil, a leishmaniose tegumentar é endêmica, sendo registrados cerca de 26 mil casos novos por ano, atingindo todos os estados brasileiros (ALVAR *et al.*, 2012).

O curso da infecção por *Leishmania* apresenta características clínicas variadas que dependem de fatores do parasito e da resposta imune do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar nas Américas tem como principais agentes causadores a *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis*; enquanto que as principais espécies causadoras dessa doença no continente europeu e na África sub-Sahariana são *Leishmania tropica* e *Leishmania major* (GRIMALDI E TESH, 1993).

A leishmaniose tegumentar é uma doença de evolução crônica que pode apresentar-se sob três formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose

disseminada. A LC caracteriza-se pela presença de úlcera de fundo granuloso e bordas elevadas, podendo ser única ou múltipla, com tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. Geralmente, a LMC é secundária à lesão cutânea e surge após a cura espontânea ou ao tratamento inadequado da LC (ASHFORD, 2000; Desjeux, 2004). Esta forma clínica de leishmaniose tegumentar é caracterizada por uma lesão inicial no local da picada do flebótomo e pelo surgimento posterior de lesões metastáticas nas mucosas das vias aéreas superiores: nariz, boca e, eventualmente, faringe e laringe (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004). A LCD é uma forma rara, porém grave, de apresentação da doença, que no Brasil é causada pela *L. amazonensis*. Essa manifestação clínica se inicia de maneira insidiosa, com lesão única e evolui com formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados por todo o corpo do paciente. Nas leishmanioses mucocutânea, cutânea difusa e disseminada, o parasito se distribui em diferentes locais do organismo hospedeiro, distantes do sítio de inoculação. Até momento, pouco se sabe sobre os fatores que determinam a permanência dos parasitos em lesões localizadas e os fatores que levam a certas espécies do parasito a se disseminar para outros órgãos a partir do local da picada ou da lesão (MOLL *et al.*, 1993; FIORINI *et al.*, 2002; LEON *et al.*, 2007).

1.2 O PARASITE

A leishmaniose é causada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Estes parasitos apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida: um estágio flagelado promastigota no vetor (*Lutzomyia* – nas Américas; *Phlebotomus* – no continente europeu, africano e asiático) e um estágio amastigota no hospedeiro vertebrado (GRIMALDI E TESH, 1993). As formas amastigotas são circulares, com flagelo inserido no interior da bolsa flagelar e medem de 3 a 7 µm de diâmetro. Por sua vez, as formas promastigotas são alongadas, flageladas e medem cerca de 10 a 20 µm de diâmetro. O ciclo de vida (Figura 1) se inicia quando os flebotomíneos fêmeas ao realizarem o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado ou em um animal reservatório ingerem macrófagos

parasitados. A lise dos macrófagos infectados resulta na liberação das formas amastigotas no estômago dos flebotomíneos, estas rapidamente se diferenciam em promastigotas procíclicas que migram para a região anterior do trato digestivo do vetor, onde se multiplicam por fissão binária (BATES E ROGERS, 2004). A transição das formas promastigotas não-infecciosas procíclicas em promastigotas metacíclicas infectivas, ou seja, a metaciclogênese ocorre no intestino dos flebotomíneos (SACKS, 1992). Nesse processo, as promastigotas procíclicas sofrem um conjunto de alterações morfológicas, ultraestruturais e também na expressão gênica (SACKS, 1989). As formas promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do flebótomo e durante o novo repasto sanguíneo são inoculadas na pele do hospedeiro mamífero, juntamente com a saliva. As promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, onde se transformam na forma amastigota. À medida que as formas amastigotas multiplicam-se, os macrófagos se rompem e liberam os parasitos, que podem ser fagocitados por outros macrófagos, dando continuidade ao seu ciclo de vida (BATES E ROGERS, 2004).

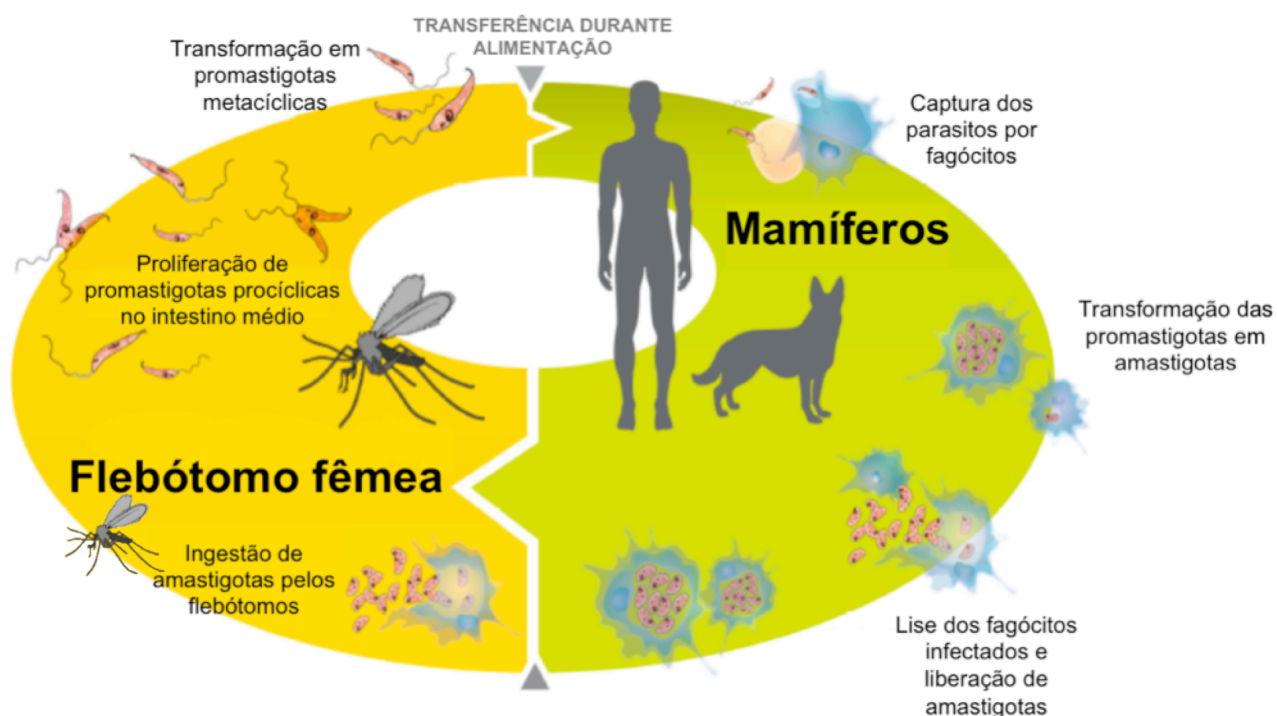


Figura 1 - Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da *Leishmania* (adaptado de (VERAS E BEZERRA DE MENEZES, 2016))

1.3 MODELO MURINO

Apesar de não reproduzir fielmente a doença em humanos (HANDMAN, 2001), modelos experimentais de leishmaniose são utilizados com objetivo de caracterizar o efeito da doença sobre o hospedeiro (PEREZ *et al.*, 1979; HOWARD *et al.*, 1980; HEINZEL *et al.*, 1989; AFONSO E SCOTT, 1993; AWASTHI *et al.*, 2004). Em modelos animais, é possível mimetizar a resposta imuno-inflamatória observada em seres humanos quando expostos a uma variedade de espécies de *Leishmania* (GARG E DUBE, 2006). Assim como em humanos, a leishmaniose murina experimental pode apresentar diferentes formas clínicas com cursos distintos de infecção a depender tanto do perfil genético do hospedeiro quanto da espécie de *Leishmania* infectante (ANDRADE *et al.*, 1984).

A resistência ou susceptibilidade de algumas linhagens de camundongos a uma determinada espécie de *Leishmania* foi relacionado com a ativação polarizada de um dos dois subconjuntos de linfócitos CD4+, Th1 associado à resistência ou Th2 associado à progressão da doença (HEINZEL *et al.*, 1989; LOCKSLEY E SCOTT, 1991). No entanto, estudos posteriores demonstraram que a polarização Th1/Th2 não explica a resistência ou suscetibilidade a todas as espécies de *Leishmania* (AFONSO E SCOTT, 1993; DEKREY *et al.*, 1998; SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006).

Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que camundongos de um mesmo *background* genético apresentam diferentes perfis de resposta imuno-inflamatória quando são infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003). Camundongos da linhagem CBA são susceptíveis à *L. amazonensis* e são capazes de controlar a infecção por *L. major*. Estudos *in vitro* foram realizados com intuito de analisar a interação entre macrófagos e *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos peritoneais de camundongo CBA infectados com *L. amazonensis* apresentam uma maior carga parasitária do que aqueles infectados com *L. major* (GOMES *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que a *L. amazonensis*, em contraste com *L. major*, é resistente aos mecanismos leishmanicidas inatos do macrófago (GOMES *et al.*, 2003). Em conjunto, esses dados sugerem que o contato inicial entre o macrófago e a *Leishmania* spp. é fundamental para ativar a resposta imune do hospedeiro,

favorecendo ou não a infecção. Adicionalmente, esses dados indicam a importância dos macrófagos no direcionamento da resposta imune do hospedeiro na resolução da infecção causada por esses parasitos (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003).

1.4 INTERAÇÃO *LEISHMANIA*-CÉLULA HOSPEDEIRA

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que vive e se multiplica dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (RUSSELL E WILHELM, 1986). A interação macrófago-*Leishmania* é um exemplo de uma complexa interação parasito-hospedeiro que envolve múltiplos receptores da célula hospedeira e ligantes do parasito (MOSSER E ROSENTHAL, 1993; AWASTHI *et al.*, 2004).

A ligação dos parasitos com a superfície celular dos macrófagos pode ocorrer através de receptores CR1 e CR3 (BLACKWELL, 1985; MOSSER E EDELSON, 1985) e de receptores de reconhecimento de padrão como receptores fucose-manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH E GORDON, 2000). Esses receptores reconhecem ligantes presentes na superfície do parasito, sendo o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína de 63 KDa (gp63) as principais moléculas envolvidas na interação macrófago-*Leishmania* (RUSSELL E WILHELM, 1986; BEVERLEY E TURCO, 1998). A gp63 e o LPG são as moléculas mais abundantes na superfície das formas promastigotas e se encontram ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana da *Leishmania*. A proteína de superfície gp63 auxilia na entrada da *Leishmania* na célula hospedeira e favorece a sobrevivência das formas promastigotas fagocitadas (CHANG E CHANG, 1986; CHAUDHURI *et al.*, 1989). Por sua vez, o LPG é necessário para o estabelecimento da infecção nos macrófagos e sobrevivência do parasito nos flebotomíneos. Estudos já demonstraram que o LPG está envolvido na proteção de formas promastigotas contra espécies reativas de oxigênio produzidas durante a fagocitose, da digestão dentro do fagolisossomo e da atividade da proteína cinase C (PKC) (HANDMAN *et al.*, 1986; DESCOTEAUX *et al.*, 1991; SPATH *et al.*, 2003). Em parasitos da espécie *L. amazonensis*, outras moléculas como a de ligação à heparina e os glicoesfingolípídios específicos de amastigota têm sido

também associados ao processo de entrada desta espécie de *Leishmania* na célula hospedeira (LOVE *et al.*, 1993; STRaus *et al.*, 1993).

A presença de LPG na superfície de promastigotas parece ser importante também para a sobrevivência de *L. major* e *L. donovani* após a fagocitose (HANDMAN *et al.*, 1986; MCNEELY E TURCO, 1990). Promastigotas de *L. donovani* mutantes, que não apresentam determinadas unidades-repetitivas de LPG, são rapidamente destruídas nos momentos iniciais da infecção. Além do mais, a transferência passiva de LPG purificado para a membrana de *Leishmania* deficiente nessa molécula prolonga significativamente a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos (HANDMAN *et al.*, 1986; MCNEELY E TURCO, 1990). Vinet *et al.* (2009) demonstraram que o LPG de *L. donovani* é transferido da superfície do parasito para microdomínios lipídicos presentes na membrana dos fagossomos recém-formados, alterando a dinâmica da formação/biogênese do vacúolo parasitóforo. Por outro lado, outros estudos demonstraram que os proteofosfoglicano (PPG, do inglês proteophosphoglycan) e não LPG se mostrou como um fator de virulência de *L. mexicana* (ILG *et al.*, 2001). Assim como o LPG, a proteína gp63 é rapidamente transferida para as células infectadas. A gp63 é responsável pela clivagem de diversos componentes da maquinaria de fusão da membrana celular hospedeira, tais como: VAMP3 (MATHEOUD *et al.*, 2013), VAMP8 (VINET *et al.*, 2009; MATHEOUD *et al.*, 2013; ARANGO DUQUE *et al.*, 2014; MATTE *et al.*, 2016) e Syt XI (ARANGO DUQUE *et al.*, 2014) favorecendo a sobrevivência de *Leishmania* spp. Em macrófagos, a clivagem destas proteínas leva ao aumento da atividade proteolítica nos vacúolos parasitóforos (MATHEOUD *et al.*, 2013). Além disso, aumenta a liberação das citocinas proinflamatórias TNF e IL-6, as quais são responsáveis pelo aumento do influxo de neutrófilos e monócitos para o local de inoculação dos parasitos, o que contribui para a disseminação e manutenção da infecção (ARANGO DUQUE *et al.*, 2014).

1.5 FORMAÇÃO E MATURAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO

Após o contato entre receptores da célula hospedeira e ligantes do

parasito, promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* são internalizadas e passam a se localizar dentro de vacúolos parasitóforos. Existem evidências que esses compartimentos são fagossomos que na sua formação/biogênese adquirem, em diferentes etapas, moléculas provenientes de vesículas intracelulares, provavelmente resultantes de processos de fusão com essas vesículas. Entre essas moléculas estão incluídas a bomba vacuolar H⁺-ATPase (ANTOINE *et al.*, 1990), a proteína G monomérica rab 5 e rab 7 (DUCLOS e DESJARDINS, 2000; COURRET *et al.*, 2002), Catepsina D (PRINA *et al.*, 1990), LAMP-1 (RUSSELL *et al.*, 1992; LANG *et al.*, 1994), LAMP-2 (RUSSELL *et al.*, 1992), calnexina (NDJAMEN *et al.*, 2010) e Sec22b (NDJAMEN *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que os vacúolos parasitóforos são compartimentos híbridos que amadurecem de fagossomos primário a endossoma tardio/fagolisossoma, que são ácidos (pH ≤ 5) e ricos em enzimas hidrolíticas (ALEXANDER E VICKERMAN, 1975; CHANG E DWYER, 1978; RABINOVITCH *et al.*, 1985). Ndjamen *et al.* (2010) demonstraram que vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania* interagem continuamente com vesículas do retículo endoplasmático da célula hospedeira, adquirindo proteínas associadas à membrana do retículo, bem como moléculas do lúmen reticular.

Apesar dos vacúolos parasitóforos compartilharem as características comuns acima descritas, há diferenças significativas na dimensão desses compartimentos induzidos por diferentes espécies de *Leishmania*. Os vacúolos parasitóforos produzidos na infecção por *L. mexicana* e *L. amazonensis* são grandes e contêm uma grande quantidade de amastigotas (SHEPHERD *et al.*, 1983; RABINOVITCH *et al.*, 1985; VERAS *et al.*, 1992), enquanto *L. major* e *L. donovani* produzem vacúolos parasitóforos pequenos, com pouco espaço ao redor das amastigotas (CHANG E DWYER, 1978; ANTOINE *et al.*, 1998). Os mecanismos que resultam nessas diferenças entre os vacúolos parasitóforos ainda não foram claramente demonstrados.

Os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* são capazes de fundir com fagossomos contendo partículas de zymosan, com compartimentos induzidos por *Coxiella burnetii* e com compartimentos da via endocítica. Entretanto, a capacidade de fusão desses vacúolos é seletiva, uma vez que não se fusionam com fagossomos contendo bolas de látex e eritrócitos fixados

(VERAS *et al.*, 1992; VERAS *et al.*, 1995; RABINOVITCH E VERAS, 1996). Real e Mortara (2012) demonstraram que os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* apresentam LAMP-1 já nas primeiras horas de infecção e são marcados com LysoTracker[®], um indicador de pH ácido. Adicionalmente, esses autores mostraram que o aumento de tamanho e volume desses vacúolos está associado com a diminuição do número de lisossomos secundários e pequenas vesículas ácidas da célula hospedeira. No entanto, a fusão homotípica entre vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* não altera o volume final do vacúolo resultante (REAL E MORTARA, 2012). Esses dados sugerem que a fusão entre os vacúolos parasitóforos e lisossomos, mas não a fusão homotípica, é um fator importante no crescimento dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* (REAL E MORTARA, 2012).

Poucos estudos foram realizados a fim de avaliar as características bioquímicas e funcionais dos vacúolos induzidos por *L. major*, visto que o espaço disponível entre os parasitas e a membrana vacuolar é limitado dificultando assim a identificação do conteúdo intravacuolar. Real e Mortara (2012) demonstraram que no processo de divisão, os vacúolos induzidos por *L. major* aumentam de volume e após a fissão resultam em dois outros vacúolos, cada um com aproximadamente metade do volume original e com diferente quantidade de LysoTracker[®]. Além disso, foi demonstrado que há correlação temporal entre a multiplicação de *L. major* e a diminuição no número de vesículas ácidas da célula hospedeira, as quais seriam necessárias para incorporação de membrana no processo de fissão dos vacúolos parasitóforos (REAL E MORTARA, 2012).

As formas amastigotas são resistentes ao ambiente dentro de compartimentos fagolisossomais em macrófagos. É possível que isto esteja relacionado à expressão de uma grande quantidade de glicosilfosfatidilinositol de baixo peso molecular na sua membrana plasmática, que teria um papel protetor contra as hidrolases e o meio ácido dos fagolisossomos (ZILBERSTEIN E SHAPIRA, 1994). Outro mecanismo que favorece a sobrevivência das amastigotas está relacionado à capacidade de amastigotas de *L. amazonensis* e *L. mexicana* em internalizar e degradar os complexos antígeno-MHC-II, que chegam aos vacúolos parasitóforos. A degradação desses complexos ocorre em organelas específicas das amastigotas, denominadas megassomos, onde

acredita-se que são rapidamente degradadas por ação de proteases (DE SOUZA LEAO *et al.*, 1995). A degradação de MHC-II reduz a presença dessas moléculas associadas a antígenos de *Leishmania* na superfície dos macrófagos, dificultando o reconhecimento e ativação dos linfócitos T. Isto dificulta a formação de uma resposta adaptativa eficiente anti-*Leishmania*, facilitando a sobrevivência do parasito e a manutenção da infecção.

1.6 AUTOFAGIA

O processo autofágico é conservado evolutivamente e ocorre de forma constitutiva em todos os tipos de células eucarióticas. Entretanto, a autofagia pode ser induzida em resposta a diferentes situações de estresse: i) extracelular, como a privação de nutrientes, mudança no volume celular, elevação da temperatura, estresse oxidativo, hipóxia, altas temperaturas, e ii) intracelular, como acúmulo de proteína, sinalização hormonal, irradiação e tratamento de xenobióticos (MEIJER E CODOGNO, 2004). Em condições de estresse extra ou intracelular, a autofagia é desencadeada, promovendo a remoção de componentes citoplasmáticos danificados, redundantes ou de outra forma indesejáveis, incluindo proteínas e organelas, favorecendo a sobrevivência da célula (LEVINE E DERETIC, 2007; DUSZENKO *et al.*, 2011). Esse processo degradativo tem papel importante em células eucariotas, com reflexo em outros processos fisiológicos, tais como, fagocitose, adesão e migração celular, diferenciação celular, desenvolvimento e manutenção da homeostase do organismo (KLIONSKY, 2005). Além disso, estudos demonstraram que a autofagia pode ser capaz de, em algumas situações, prevenir, e, em outras situações, promover doenças como o câncer (DEGENHARDT *et al.*, 2006), doenças neurodegenerativas (YU *et al.*, 2005), envelhecimento (BERGAMINI, 2006), infecções virais, bacterianas e parasitárias (MIZUSHIMA *et al.*, 2008).

Diferentes tipos de processos autofágicos foram descritos na literatura, incluindo microautofagia, autofagia mediada por chaperona e outros que envolvem a degradação seletiva de organelas específicas, além da macroautofagia (CUERVO, 2004). O processo de microautofagia consiste na absorção de componentes citoplasmáticos de forma aleatória diretamente pela

membrana lisossomal (DE DUVE E WATTIAUX, 1966). Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas com motivos pentapeptídeos ligados a chaperonas são entregues aos lisossomos para degradação (DICE, 2007; BEJARANO E CUERVO, 2010). Por fim, no processo de macroautofagia, os componentes citosólicos são englobados por um compartimento denominado de autofagossomo que, posteriormente, se funde com lisossomos (KLIONSKY E EMR, 2000). O objeto de estudo do presente trabalho compreende a avaliação do possível papel da macroautofagia, doravante referida como autofagia, na infecção de macrófagos por *Leishmania*.

Dois elementos foram descritos como importantes na regulação da autofagia: a serina/treonina cinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian Target Of Rapamycin*) e fosfatidilinositol 3-cinase classe I e III (PI3Ks ou PI 3-cinases). A via de regulação da autofagia mais bem estudada em mamíferos é a da mTOR. Esta quinase ativa uma via de sinalização que regula não apenas a autofagia, mas também outros importantes processos celulares, como crescimento e proliferação de células, transcrição e reorganização do citoesqueleto (SARBASSOV *et al.*, 2005). Essa via de sinalização, por sua vez, é regulada por fatores de crescimento, aminoácidos, glicose e energia (SARBASSOV *et al.*, 2005).

As diferentes classes de PI3K podem inibir ou ativar o processo autofágico. Em presença de fatores de crescimento, PI3K de classe I geram fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PtdIns (3,4,5) P3] na membrana plasmática, que, por sua vez, ativa mTOR, reprimindo assim a autofagia (LEVINE E DERETIC, 2007). Já a PI3K de classe 3 desempenha um papel essencial na nucleação da membrana de autofagossomos durante o processo autofágico (MARINO E LOPEZ-OTIN, 2004).

Diferentes moduladores da via autofágica são utilizados para avaliar o papel do processo autofágico sobre doenças, incluindo infecções causadas por patógenos. Um composto muito utilizado para inibição da via autofágica é a wortmanina, droga inibidora de PI3K. Recentemente, Bago *et al.* (2014) descreveram um novo inibidor, VPS34-IN1, específico de PI3K de classe 3 (VPS34), que é conhecida por ser importante na etapa de nucleação do autofagossomo durante o processo autofágico (Figura 2). Outras drogas

utilizadas, como a cloroquina e o cloreto de amônio (NH₄Cl), inibem a via autofágica por inibir a fusão dos autofagossomos com lisossomos e, conseqüentemente, maturação em autolisossomos. Por outro lado, a indução da via autofágica pode ser realizada por meio farmacológico, utilizando-se a rapamicina, droga inibidora da proteína mTOR mesmo na presença de nutrientes ou por meio fisiológico, utilizando-se o meio EBSS (Earle's Balanced Salt Solution), meio pobre em nutrientes, que induz a via autofágica por privação de aminoácidos (*starvation*). Adicionalmente, a via autofágica pode ser modulada por abordagens genéticas experimentais tais como a superexpressão ou silenciamento de um dos genes relacionados à autofagia (KLIONSKY *et al.*, 2016).

Após a autofagia ser desencadeada, o processo é regulado por um conjunto de proteínas que compõem a maquinaria molecular. Apesar do processo autofágico ter sido originalmente descrito em mamíferos desde a década de 1950, esse conjunto de proteínas envolvido na regulação da autofagia foi, inicialmente, descrito em leveduras (HE E KLIONSKY, 2009). Até o momento, trinta e cinco proteínas relacionadas ao processo autofágico foram descritas em *Saccharomyces cerevisiae*, fazendo parte da família Atg (do inglês *autophagic-related genes*) e muitas delas possuem homólogos em mamíferos. Essas proteínas possuem atividades específicas durante as diferentes etapas do processo autofágico (SUZUKI E OHSUMI, 2007; SUZUKI *et al.*, 2010; NAZARKO *et al.*, 2011).

A via autofágica pode ser dividida em uma série de eventos coordenados e consecutivos (Figura 2). A nucleação envolve o recrutamento de proteínas para formação de uma membrana lipídica dupla (fagóforo) que dará início à formação dos autofagossomos. A origem da membrana para essas vesículas permanece controversa. Estudos recentes sugerem que a membrana do retículo endoplasmático e a membrana mitocondrial externa seriam a principal fonte de membrana para a formação do autofagossomo em células de mamífero (AXE *et al.*, 2008; HAILEY *et al.*, 2010). Foi demonstrado que as principais proteínas envolvidas nessa etapa inicial da formação do autofagossomo são as proteínas VPS34, beclina 1 (Atg6), Atg 14 e p150 (1) (Figura 2).

A expansão/elongação do fagóforo ocorre simultaneamente ao processo de nucleação (2) (Figura 2). Dois sistemas de conjugação estão, subsequentemente, envolvidos na expansão do fagóforo, o sistema dependente de Atg12 (2a) e aquele de Atg8 (2b) (Figura 2). No sistema de conjugação envolvendo Atg12, esta proteína é hidrolisada e ativada por Atg7 e, em seguida, transferida para associar-se à Atg10. Posteriormente, a Atg12 é ligada à porção C-terminal de Atg5 através de um resíduo lisina (MIZUSHIMA *et al.*, 1998). Atg12-Atg5 formam então um conjugado com Atg16 (Atg12-Atg5-Atg16), resultando em um complexo de 800 kDa, contendo tetrâmeros de Atg12-Atg5-Atg16 (MIZUSHIMA *et al.*, 2003). Uma pequena porção desse complexo se associa à membrana do fagóforo em expansão e, após concluída a formação do autofagossomo, o complexo Atg12-Atg5-Atg16 se dissocia da membrana desse compartimento (TANIDA *et al.*, 2004).

Paralelamente, o outro sistema, dependente de Atg8, em mamíferos é desencadeado pela proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos), que é homóloga à Atg8 de leveduras. A LC3 é sintetizada como uma forma precursora, designada proLC3, e processada, sequencialmente, em LC3-I e LC3-II (KABEYA *et al.*, 2000). A ProLC3 é clivada pela Atg4 na sua porção C terminal, aproximadamente 6 minutos após sua síntese no citoplasma (KABEYA *et al.*, 2000; HEMELAAR *et al.*, 2003; MARINO *et al.*, 2003; TANIDA *et al.*, 2004). Até o momento, quatro homólogos humanos da Atg4 de levedura foram descritos: HsAtg4A/autofagina-2, HsAtg4B/autofagina-1, autofagina-3 e autofagina-4 (Hemelaar *et al.*, 2003; Marino *et al.*, 2003). Dentre eles, apenas HsAtg4B é capaz de clivar eficientemente proLC3 (KABEYA *et al.*, 2004).

A forma processada, denominada LC3-I (18kDa), apresenta um resíduo de glicina na sua porção C terminal e reside no citoplasma (KABEYA *et al.*, 2000). Em resposta às baixas concentrações de nutrientes (*starvation*), uma subpopulação de LC3-I é clivada e conjugada a fosfatidiletanolamina (PE), pela ação de Atg7 e Atg3, formando LC3-II (16-kDa), que se associa à membrana das vesículas autofágicas (KABEYA *et al.*, 2000).

Além de integrar a membrana dos autofagossomos, a quantidade de LC3-II se correlaciona positivamente com o número de autofagossomas nas células

(KABEYA *et al.*, 2000). Assim, a geração de LC3-II é um bom marcador para estudos envolvendo a dinâmica dos compartimentos da via autofágica. A razão LC3-II/LC3-I está correlacionada com o aumento no número de autofagossomos na célula indicando aumento da atividade autofágica, que, no entanto, não indica um aumento do fluxo autofágico que é uma medida de atividade de degradação. A inibição por drogas, como a cloroquina, que inibem a fusão dos autofagossomos com lisossomos e, conseqüentemente, aumentam a razão LC3-II/LC3-I devido acúmulo de LC3II, é utilizada para avaliar o fluxo autofágico por meio de análises por *western blot* (KLIONSKY *et al.*, 2016).

Uma vez formado, o autofagossomo (3) amadurece por meio de fusão com lisossomos, resultando em um compartimento com características lisossomais, denominado autofagolisossomo (4) (Figura 2). Este compartimento apresenta ATPase vacuolar, pH ácido, LAMP1 e hidrolases lisossomais (HIRSIMAKI e REUNANEN, 1980; DUNN, 1990a; KOPITZ *et al.*, 1990). Após a fusão entre autofagossomo com lisossomos, a membrana interna, bem como os materiais sequestrados são degradados por hidrolases ácidas e os produtos da degradação são liberados para o citoplasma (5) (Figura 2) (DUNN, 1990b).

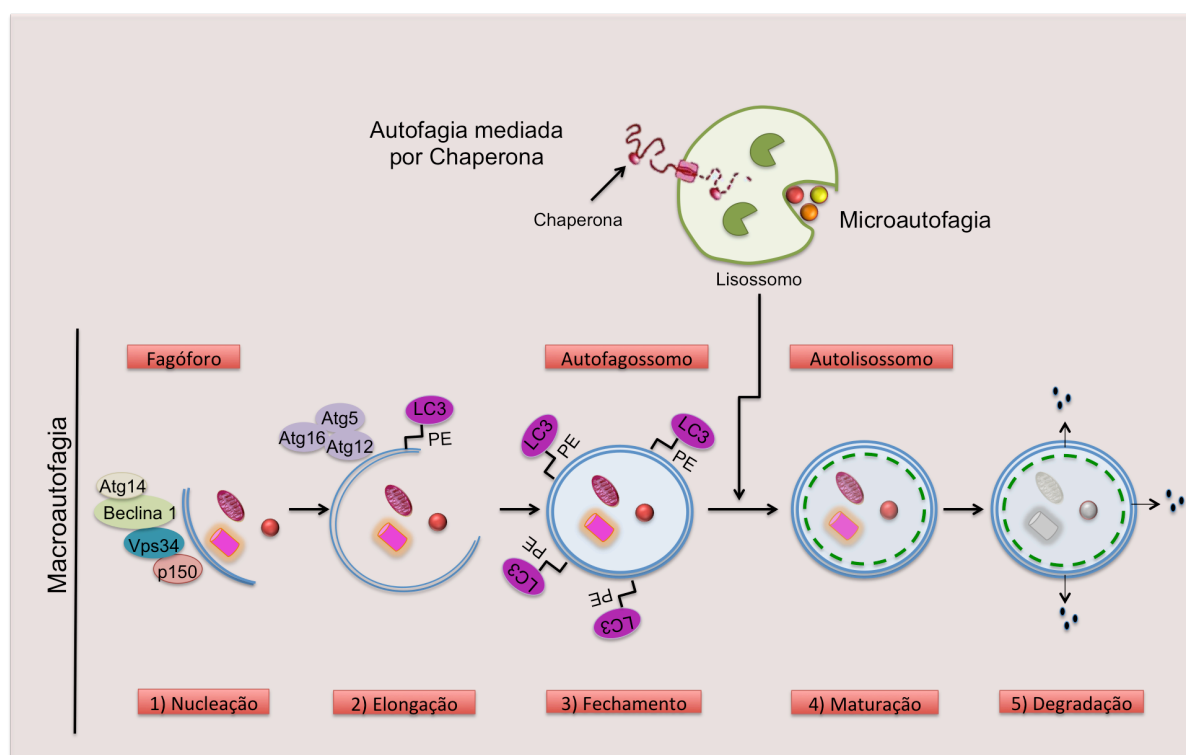


Figura 2 - Representação esquemática da autofagia. Adaptado de (Baehrecke, 2005; Yang e Klionsky, 2007).

1.7 AUTOFAGIA E INFECÇÃO POR MICRORGANISMOS INTRACELULARES

Existem evidências que a autofagia pode desempenhar um papel na resposta imune inata protegendo a célula hospedeira contra infecções causadas por microrganismos intracelulares bem como favorecer a sobrevivência e multiplicação de microrganismos intracelulares, a depender de sua natureza (GUTIERREZ *et al.*, 2005; LEVINE E DERETIC, 2007; SCHMID E MUNZ, 2007; GOMES E DIKIC, 2014).

Gutierrez *et al.* (2004) demonstraram que, na indução fisiológica, por privação de aminoácidos ou farmacológica da via autofágica, os fagossomos de *M. tuberculosis* adquirem marcadores de autofagossomos como LC3 e beclina-1. Nessas condições, há inibição da sobrevivência de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos, sugerindo que a autofagia funciona como um mecanismo de defesa contra a infecção por esses microrganismos. Diferentemente, apesar dos vacúolos induzidos por *C. burnetti* serem permissivos a sua multiplicação, eles também exibem características autofágicas. Beron *et al.* (2002) demonstraram que esses vacúolos são marcados por monodancylcadaverina (MDC) e apresentam LC3 e beclina na sua membrana. A proteína LC3 é recrutada para o vacúolo cerca de 5 minutos após infecção por *C. burnetti*. Esse processo parece depender de proteínas sintetizadas por *C. burnetti* viável, uma vez que não é observado quando as células são incubadas com bactérias inativadas ou tratadas com cloranfenicol, antibiótico que inibe a síntese proteica de bactérias (ROMANO *et al.*, 2007). Além disso, esse mesmo grupo demonstrou que a indução da autofagia promove um aumento no percentual de células infectadas, no tamanho dos vacúolos, além de favorecer a replicação de *C. burnetii* em células de linhagem CHO (GUTIERREZ *et al.*, 2005). Ainda mais, os autores mostraram que a superexpressão de proteínas envolvidas na via autofágica favoreceu o desenvolvimento dos vacúolos de *C. burnetti*.

Interessantemente, *C. burnetti* sobrevive e se multiplica dentro de vacúolos de grande tamanho e composição semelhante aos induzidos por *Leishmania* do

complexo Mexicana, *L. amazonensis* ou *L. mexicana* (ANTOINE *et al.*, 1990; MAURIN *et al.*, 1992; VERAS *et al.*, 1994; VERAS *et al.*, 1995). Até o momento, poucos trabalhos foram realizados para avaliar o papel da autofagia na infecção por *Leishmania*. Estudo pioneiro realizado por Schaible *et al.* (1999) mostrou que vacúolos parasitóforos de *L. mexicana* adquirem macromoléculas do citoplasma da célula hospedeira por meio de microautofagia. Além disso, anteriormente foi demonstrado que essas macromoléculas, uma vez transferidas do citoplasma da célula hospedeira para o lúmen do vacúolo parasitóforo, podem ser endocitadas pelo parasita (RUSSELL *et al.*, 1992). Em conjunto, esses dados sugerem que a autofagia pode ser ativada pela infecção por *L. mexicana*, e que isso poderia estar favorecendo o suprimento de nutrientes e, conseqüentemente, a sobrevivência deste parasito no interior dos vacúolos parasitóforos.

Cyrino *et al.* (2012) demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* induz a autofagia em macrófagos de camundongo BALB/c. Pinheiro *et al.* (2009) evidenciaram que a autofagia pode ter efeitos distintos sobre a infecção por *L. amazonensis*, a depender da linhagem dos macrófagos. Em macrófagos de camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c, a indução de autofagia leva ao aumento da carga parasitária por *L. amazonensis*, enquanto que, em macrófagos de camundongos resistentes da linhagem C57BL/6, resulta em controle da infecção. Esses autores também demonstraram que a indução fisiológica de autofagia em macrófagos de BALB/c não é capaz de aumentar a carga parasitária de *L. major* (PINHEIRO *et al.*, 2009). Adicionalmente, foi observado que a infecção por *L. major* induz a formação de estruturas características da autofagia, tais como figura de mielina, vacuolização celular e vesículas com dupla membrana lipídica (FRANK *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, foi demonstrado aumento na conversão de LC3-I em LC3-II em macrófagos infectados por *L. major*, 1 e 24 h após a infecção, reforçando os achados morfológicos que a infecção por *L. major* ativa a via autofágica (FRANK *et al.*, 2015). Matte *et al.* (2016) demonstraram que *L. major* induz uma conversão rápida e transitória de LC3-I para LC3-II por meio da ativação da NADPH oxidase NOX2. Além disso, esses autores observaram que a inibição da atividade de NOX2 com DPI reduziu o recrutamento de LC3 para os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major*.

1.8 ANÁLISE INTEGRADA DE REDE

Estudos em larga escala, como a genômica funcional e proteômica, são uma ferramenta poderosa no monitoramento de mudanças no padrão de expressão de genes ou de proteínas na célula, possibilitando uma visão global da expressão dessas moléculas em uma dada linhagem celular, tecido ou organismo (LIOTTA E PETRICOIN, 2000; MILLS *et al.*, 2001; VERAS E BEZERRA DE MENEZES, 2016). Além de permitir a análise de genes ou proteínas diferentemente expressas, os dados gerados pelos estudos em larga escala podem ser submetidos à análise de enriquecimento de vias. Estas abordagens já permitiram a identificação e caracterização de vias envolvidas em diferentes doenças, incluindo as doenças infecto-parasitárias, tendo se mostrado ferramentas mais eficazes do que o estudo de moléculas individuais (WANG *et al.*, 2009; VERAS E BEZERRA DE MENEZES, 2016). Até o momento, nenhum estudo buscou comparar a expressão de genes relacionados à autofagia em células infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

Nas leishmanioses, estudos em larga escala forneceram informações valiosas sobre moléculas e vias de sinalização envolvidas na interação parasito-hospedeiro (EL FAKHRY *et al.*, 2002; BIYANI E MADHUBALA, 2012; MENEZES *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2015). Estudo realizado por Araujo-Santos *et al.* (2017) identificou um conjunto de biomarcadores inflamatórios capazes de discriminar pacientes com leishmaniose visceral de indivíduos saudáveis por análise hierárquica de clusters. Em relação à leishmaniose visceral canina, Solca *et al.* (2016) demonstraram que um padrão distinto de biomarcadores de inflamação, ativação da resposta imune, estresse oxidativo e concentrações de IgG anti-saliva flebotomínica estão correlacionados com as diferentes manifestações clínicas da doença. Adicionalmente, os autores demonstram que a avaliação combinada de leucotrieno B4 (LTB4), prostaglandina E2 (PGE2) e CXCL1 foi capaz de distinguir cães infectados com diferentes escores clínicos (SOLCA *et al.*, 2016).

Além de estudos usando soros de indivíduos com leishmaniose visceral, também já foram realizadas análises do transcriptoma de macrófagos em resposta à infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Fernandes *et al.* (2016) demonstraram que a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* alteraram similarmente o transcriptoma de macrófagos humanos em comparação às células

não infectadas em tempos iniciais (4 h). Este efeito foi intensamente reduzido em tempos tardios (24, 48, e 72 h), sugerindo que grande parte da reprogramação gênica ocorre logo após a fagocitose desses parasitos (FERNANDES *et al.*, 2016). Similarmente, Dillon *et al.* (2015) demonstraram que a infecção por *L. major* em macrófagos de camundongos C57BL/6 induz uma maior alteração da expressão gênica em tempos iniciais do que em tempos tardios da infecção. Em ambos os estudos, a análise de enriquecimento de vias demonstrou que as vias mais altamente induzidas em macrófagos infectados estão relacionadas à ativação da resposta imune e da sinalização celular, incluindo aquelas para TNF, HIF-1, NF- κ B, Jak-STAT, PI3K-Akt e MAPK (DILLON *et al.*, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016). Interessantemente, Frank *et al.* (2015) demonstraram que a infecção por *L. major* em macrófagos de camundongo BALB/c, além de modular genes associados à resposta imune, regula a expressão de genes relacionados à autofagia. Este estudo também evidenciou que a infecção por *L. major* altera a expressão de um conjunto de micro RNAs (miRNAs) que regulam a expressão de genes relacionados à autofagia. A relação entre a infecção por *Leishmania* e modulação de miRNAs reguladores de genes relacionados à autofagia também foi descrita por Singh *et al.* (2016). Estes autores, ao avaliar o perfil de expressão de microRNAs em células de linhagem humana THP-1 infectadas por *L. donovani*, demonstraram que a expressão de MIR30A-3p, microRNA que regula a expressão de beclina 1, Atg3 e Atg9, está aumentada nas células infectadas em comparação àquelas não infectadas.

Assim, por permitir a identificação de potenciais biomarcadores, a análise de genes diferentemente expressos de forma integrada e utilizando análise de redes é uma ferramenta interessante para, em conjunto com as outras análises realizadas no presente trabalho, avaliarmos possíveis contribuições da autofagia na resposta diferenciada de macrófagos de camundongos CBA à infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*.

2 JUSTIFICATIVA

Desde o início dos anos 2000, a autofagia vem sendo alvo de investigação em diversas frentes de pesquisa. Uma grande quantidade de trabalhos vem estudando o papel da via autofágica na infecção de células hospedeiras por diversos patógenos. Estudos sugerem que a via autofágica desempenha um papel na resposta imune inata protegendo a célula hospedeira contra infecções causadas por microrganismos intracelulares como é o caso de *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pyogenes* (GUTIERREZ *et al.*, 2004; NAKAGAWA *et al.*, 2004; GUTIERREZ *et al.*, 2005; LEVINE E DERETIC, 2007). No entanto, a interação com a via autofágica é favorável a alguns patógenos intracelulares, como *Staphylococcus aureus* e *Coxiella burnetti* (GUTIERREZ *et al.*, 2005; SCHNAITH *et al.*, 2007; MESTRE *et al.*, 2010).

Até o momento, pouco estudos foram realizados a fim de avaliar o papel da autofagia na infecção por *Leishmania*. Além disso, os resultados obtidos são pouco esclarecedores. Já foi demonstrado que tanto a infecção por *L. amazonensis* quanto por *L. major* induz a autofagia em macrófagos de camundongo BALB/c (CYRINO *et al.*, 2012; FRANK *et al.*, 2015). Pinheiro *et al.* (2009) mostraram que, em macrófagos de camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c, mas não em macrófagos de camundongos resistentes da linhagem C57BL/6, a indução de autofagia provoca um aumento na carga parasitária por *L. amazonensis*. Adicionalmente, estudos indicam que vacúolos parasitóforos de *L. mexicana* adquirem macromoléculas do citoplasma da célula hospedeira por meio de autofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1999) e que, essas macromoléculas uma vez transferidas do citoplasma da célula hospedeira para o lúmen do vacúolo parasitóforo, podem ser endocitadas pelo parasita (RUSSELL *et al.*, 1992). Por outro lado, na infecção por *L. major*, já foi demonstrado que o processo autofágico dependente de Atg5 leva à eliminação de amastigotas desta espécie de *Leishmania* em macrófagos de camundongos BALB/c (FRANK *et al.*, 2015). No entanto, a indução da via autofágica por *starvation* não é capaz de aumentar a carga parasitária de *L. major* em macrófagos de BALB/c (PINHEIRO *et al.*, 2009).

Estudos para melhor compreender o papel da autofagia na infecção por *Leishmania* são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que incluam a modulação desta via. O tratamento das leishmanioses é o mesmo há sete décadas e se baseia, principalmente, no uso de antimoniais pentavalentes. Tal tratamento mostra-se ineficiente em razão dos prolongados ciclos, graves efeitos colaterais (CHAPPUIS *et al.*, 2007) e aparecimento de resistência por abandono do tratamento (SUNDAR *et al.*, 2000; SUNDAR, 2001). A segunda linha de tratamento apresenta efeitos colaterais ou altos custos a exemplo da anfotericina B lipossomal (ASSAN *et al.*, 1995; ANTONIOU E GOUGH, 2005; CHAPPUIS *et al.*, 2007). Em razão ao aumento do número de casos de leishmaniose tegumentar, da dispersão desta doença e das limitações há uma necessidade urgente de drogas novas e mais eficientes (WORLD HEALTH, 2010). Esta necessidade de intervenções mais eficazes torna-se fundamental em países como o Brasil, onde a doença é endêmica. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar comparativamente o papel da autofagia na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, utilizando o modelo de macrófagos de camundongos CBA. Este modelo apresenta a vantagem de permitir a avaliação do papel da autofagia sobre a resposta diferenciada de macrófagos, que apresentam mesmo background genético, à infecção por duas espécies distintas de *Leishmania*. Nossa hipótese é que a via autofágica é ativada pela infecção por *L. amazonensis*, mas não por *Leishmania major*, favorecendo a sobrevivência deste parasito no interior dos vacúolos parasitóforos em macrófagos de camundongos CBA *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar comparativamente o papel da autofagia na infecção por *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania major* em macrófagos de camundongos CBA *in vitro*.

3.2 ESPECÍFICOS

- i) Comparar a expressão de genes relacionados à autofagia em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*;
- ii) Determinar se a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* altera o fluxo autofágico em macrófagos de camundongos CBA;
- iii) Caracterizar os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* quanto à atividade hidrolítica, acidez e características autofágicas;
- iv) Avaliar o efeito da modulação da via autofágica na infecção por *Leishmania*;
- v) Avaliar efeito da modulação da via autofágica na produção de óxido nítrico e na atividade da arginase em macrófagos infectados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para obtenção de macrófagos peritoneais inflamatórios, 2,5 mL de tioglicolato a 3% (Sigma, St Louis, MO, EUA) foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos CBA, segundo protocolo modificado de Gomes *et al.* (2003). Após 96 h, os camundongos foram eutanasiados e a cavidade peritoneal lavada duas vezes com 10 mL de NaCl 0,9 % com heparina (20 U.I./mL) (Cristália, Itapira, SP, BR). Em seguida, os macrófagos foram plaqueados em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) completo [suplementado com 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) (Sigma) pH 7,4; 2 mM de glutamax (Gibco, Grand Island, NY, EUA); bicarbonato de sódio 2 g/L (Sigma), 20 µg/mL ciprofloxacino (Isofarma, Precabura, CE, BR) e 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco)], e cultivados *overnight* a 37 °C em estufa suplementada com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os camundongos da linhagem CBA utilizados no estudo foram fornecidos pelo Biotério do Instituto Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 015/2014. Os animais foram mantidos e manipulados dentro das normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais.

4.2 CULTURA DE *LEISHMANIA*

Culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) e *L. major* (MHOM/RI/-/WR-173) foram mantidas por passagens sucessivas em meio *Schneider's Insect Medium* (Sigma) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 10% de soro bovino fetal (Gibco), segundo protocolo modificado de Gomes *et al.* (2003). As formas promastigotas foram cultivadas por 3 a 5 dias em estufa B.O.D. a 24 °C e o crescimento foi acompanhado diariamente, pela contagem em câmara de Neubauer. Ao atingirem a fase estacionária, as formas promastigotas foram repicadas ou utilizadas nos

experimentos. As repicagens foram realizadas por até seis vezes consecutivas e em concentrações entre 2×10^5 e 5×10^6 por mL.

Nos experimentos, as placas com células infectadas com *L. amazonensis* foram incubadas em estufa a 35 °C e as infectadas com *L. major* a 37 °C, ambas suplementadas com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3 SEPARAÇÃO DE PROMASTIGOTAS METACÍCLICAS DE *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

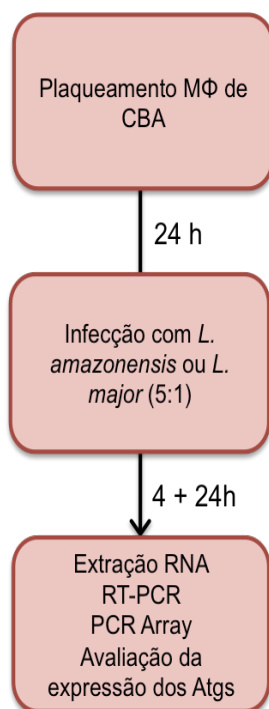
Promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* em fase estacionária foram submetidas à separação de formas metacíclicas infectivas utilizando gradiente de Ficoll-Paque, conforme descrito por Spath e Beverley (2001). Inicialmente, os parasitos foram recolhidos e lavados em meio DMEM completo a 1.800 x g por 10 min a 25 °C. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em DMEM completo e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. Em seguida, para a separação das metacíclicas, 2×10^8 parasitos foram adicionados em 2 mL de DMEM e sob este volume foram adicionados 2 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, SWZ) 10% diluído em Meio 199 (Gibco) e 2 mL de Ficoll-Paque a 40% diluído em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*). O gradiente foi submetido à centrifugação a 360 x g a 25 °C por 10 min com a desaceleração ajustada para zero. As metacíclicas acumuladas na fase do Ficoll 10% foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1.800 x g por 10 min a 25 °C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e os parasitos foram utilizados em diferentes concentrações de acordo com os experimentos.

4.4 MARCAÇÃO DE *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR* COM CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ÉSTER (CFSE)

A marcação de *L. amazonensis* ou *L. major* com CFSE (Sigma) (21888) foi realizada segundo protocolo modificado de Chang *et al.* (2007). Os parasitos (10^8) foram incubados em 4 mL de solução de NaCl 0,9% contendo 1 µM de CFSE, por 10 min a 37 °C, ao abrigo da luz. Em seguida, para finalizar a reação, foi adicionado o mesmo volume de soro fetal bovino. Após 1 min de incubação, os

parasitos foram lavados duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1.800 x g por 10 min a 4 °C. A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e os parasitos foram utilizados em concentrações de acordo com os experimentos.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS POR INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*



A fim de avaliar o efeito da infecção por *L. amazonensis* e *L. major* na expressão de genes relacionados à autofagia em macrófagos peritoneais de camundongo CBA, as células foram plaqueadas ($2 \times 10^6/2$ mL) em placas de 6 poços em meio DMEM completo e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Após 4 h, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e incubadas por tempo adicional de 24 h.

4.5.1 Obtenção RNA total

Após o tempo de incubação, o RNA total foi extraído com o kit RNeasy Mini (Qiagen, Hilden, GER), de acordo com a seção *Purification of Total RNA from*

Animal Cells Using Spin Technology do manual RNeasy Mini Handbook (Qiagen). A quantificação e o controle de qualidade dos RNAs totais foram realizados pela medição de densidades ópticas a 260 e 280 nm em Nanodrop (ThermoScientific).

4.5.2 *Transcrição reversa*

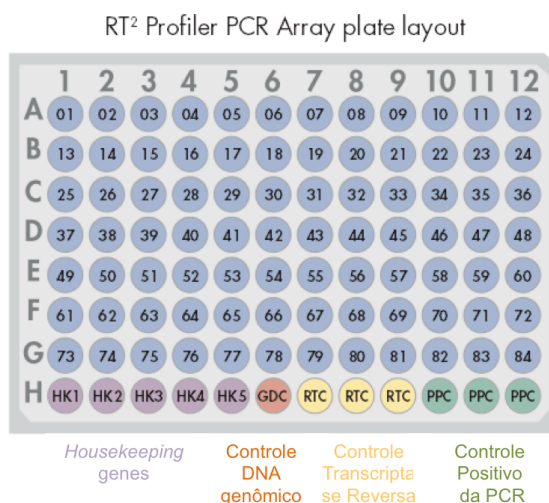
Para obtenção de cDNA por transcrição reversa, o RNA total foi submetido a RT-PCR. Inicialmente, 1 µg do RNA total foi linearizado em solução contendo 0,5 µg/mL de oligo dT (Invitrogen) e água deionizada, totalizando 13,8 µL, a reação foi realizada no termociclador Mastercycler[®] gradient 53331 (Eppendorf) a 70 °C por 10 min. Para a síntese do cDNA foram adicionados à solução RNA-oligo dT: 1 mM de cada dNTP (Fermentas, Waltham, MA, EUA), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão de PCR 1x (Invitrogen), 2 U/µL de RNase OUT (Invitrogen) e 4 U/µL da SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Invitrogen), totalizando 20 µL. A reação foi realizada a 42 °C por 2 h no termociclador Mastercycler[®] gradient 53331 (Eppendorf). Ao fim das duas horas, o cDNA foi diluído, aliquoteado e armazenado em freezer -80 °C. Em seguida, os cDNAs obtidos foram analisados quanto à qualidade utilizando a placa RT² RNA QC PCR Array Format C (Qiagen). Esta placa possui controles para integridade do RNA, para a presença de inibidores da transcrição reversa e para a presença de contaminação genômica ou de outros DNA.

4.5.3 *PCR array*

O RT² Profiler PCR Array Mouse Autophagy PAMM-084ZC-12 (Qiagen) permite a análise da expressão de 84 genes relacionados à autofagia. Além disso, as placas possuem seis genes constitutivos e controles para avaliar a presença de DNA genômico, a reação de transcriptase reversa e controles positivos (Figura 3). Conforme as recomendações do fabricante, foi preparada uma mistura contendo 102 µL do cDNA diluído, 1350 µL de 2 x RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen, Hilden, GER) e 1248 µL de água livre de RNase. Em seguida, 25 µL da mistura foi distribuído em cada um dos poços da placa de *PCR array* de 96 poços. A reação foi realizada no aparelho de PCR em tempo real 7500 Fast (Applied Biosystems) sob as condições recomendadas: 10 min a 95 °C para ativação da

enzima Taq DNA polimerase e 40 ciclos de 15 s a 95 °C, para desnaturação do DNA, e 1 min a 60 °C, para associação dos *primers*, extensão da nova fita e detecção da fluorescência emitida. Por fim, os dados foram analisados no site <http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>.

A



B

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----------|--------|--------|--------|----------|---------|----------|-----------|-----------|----------|--------|---------|
| A | Akt1 | Ambra1 | App | Atg10 | Atg12 | Atg16l1 | Atg16l2 | Atg3 | Atg4a | Atg4b | Atg4c | Atg4d |
| B | Atg5 | Atg7 | Atg9a | Atg9b | Bad | Bak1 | Bax | Bcl2 | Bcl2l1 | Becn1 | Bid | Bnip3 |
| C | Casp3 | Casp8 | Cdkn1b | Cdkn2a | Cln3 | Ctsb | Ctsd | Ctss | Cxcr4 | Dapk1 | Dram1 | Dram2 |
| D | Eif2ak3 | Eif4g1 | Esr1 | Fadd | Fas | Gaa | Gabarap | Gabarapl1 | Gabarapl2 | Hdac1 | Hdac6 | Hgs |
| E | Hsp90aa1 | Hspa8 | Htt | Ifng | Igf1 | Ins2 | Irgm1 | Lamp1 | Map11c3a | Map11c3b | Mapk14 | Mapk8 |
| F | Mtor | Nrkb1 | Npc1 | Pik3c3 | Pik3cg | Pik3r4 | Prkaa1 | Plen | Rab24 | Rb1 | Rgs19 | Rps6kb1 |
| G | Snca | Sqstm1 | Tgfb1 | Tgm2 | Tmem74 | Tnf | Tnfrsf10 | Trp53 | Ulk1 | Ulk2 | Uvrag | Wfs1 |
| H | Actb | B2m | Gapdh | Gusb | Hsp90ab1 | MGDC | RTC | RTC | RTC | PPC | PPC | PPC |

Figura 3 – Configuração da placa RT² Profiler PCR Array (Qiagen). A) Cada placa de 96 poços contem 84 genes relacionados à via estudada, cinco *housekeeping* genes, um poço para avaliar contaminação por DNA genômico, três poços para avaliar a reação de transcriptase reversa e três poços com controles positivos da PCR. B) Lista de genes relacionados à autofagia avaliados na RT² Profiler PCR Array.

4.6 INGENUITY PATHWAY ANALYSIS (IPA)

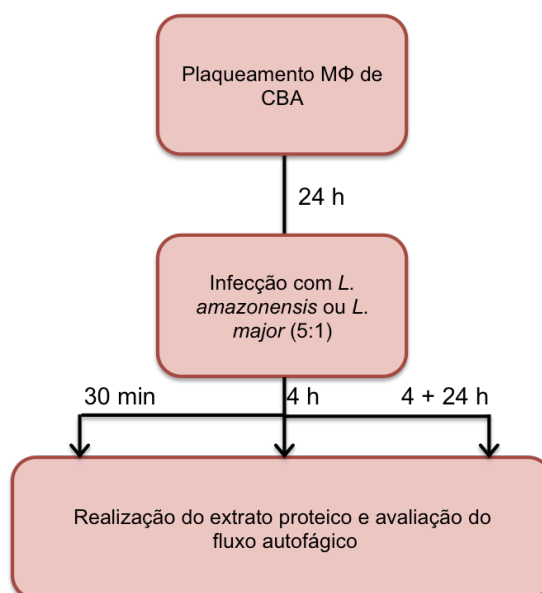
Com o objetivo de realizar uma análise comparativa dos dados de RT² Profiler PCR Array Mouse Autophagy com os dados de genes expressos em microarrays públicos, dados foram obtidos no site NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) de genes expressos em macrófagos murinos

infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* comparados a macrófagos controle não infectados (Tabela 1). Utilizando os seguintes termos de inclusão: "macrophages", "mouse", "*Leishmania amazonensis*" e "*Leishmania major*", foram identificados 4 *datasets* [GSE 11497 (OSORIO Y FORTEA *et al.*, 2009), GSE 31995 (RABHI *et al.*, 2012), GSE 31996 (RABHI *et al.*, 2013) e GSE 52624 (FRANK *et al.*, 2015)] contendo amostras com as características acima citadas (Tabela 1). Em seguida, os dados destes *datasets* em conjunto com os dados obtidos pela PCR realizada no presente trabalho foi analisada no IPA (Ingenuity H Systems, Redwood City, CA, EUA; <http://www.ingenuity.com>). Inicialmente, a fim de avaliar se a via autofágica era diferentemente modulada na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* os dados de cada *dataset* foram sobrepostos na via canônica de Autofagia desenvolvida pelo IPA, a partir de informações contidas na base de dados. Posteriormente, avaliamos os genes da via autofágica que estavam modulados na infecção por *L. amazonensis* e na infecção por *L. major* nos contextos: *Autophagy of Cells – Affects Autophagy of Cells* e *Decreases Autophagy of Cells*. Por fim, a modulação dos genes, nestes dois contextos, foi comparada entre os dados obtidos dos microarranjos de macrófagos infectados por *L. amazonensis* e macrófagos infectados por *L. major*. Nestas análises não foi estabelecida nenhuma pré-configuração do valor de *p* ou do *fold change* uma vez que nossas análises foram realizadas de forma direcional para avaliar a modulação de genes relacionados apenas à autofagia e devido à baixa concordância de dados oriundos de diferentes plataformas de *microarray* (KUO *et al.*, 2002; TAN *et al.*, 2003; MIKLOS E MALESZKA, 2004). Além disso, há diversos fatores experimentais, como manipulação das amostras, método de isolamento do RNA e procedimento de hibridação que influenciam fortemente nos resultados dos estudos de expressão (HUMINIECKI *et al.*, 2003; RHODES *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Datasets de *microarrays* públicos de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* ou macrófagos não infectados utilizados no presente estudo.

| Número de acesso | Espécie de <i>Leishmania</i> | Célula | Modelo Murino | Número de Amostras | Referência |
|------------------|------------------------------|--------|---------------|----------------------------|------------------------------|
| GSE11497 | <i>L. amazonensis</i> | BMMΦ | BALB/c | 2 controles e 2 infectados | Osorio y Fortéa et al., 2009 |
| GSE31995 | <i>L. major</i> | BMMΦ | BALB/c | 9 controles e 9 infectados | Rabhi et al., 2012 |
| GSE31996 | <i>L. major</i> | BMMΦ | C57/BL6 | 9 controles e 9 infectados | Rabhi et al., 2013 |
| GSE52624 | <i>L. major</i> | BMMΦ | BALB/c | 4 controles e 4 infectados | Frank et al., 2015 |

4.7 AVALIAÇÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

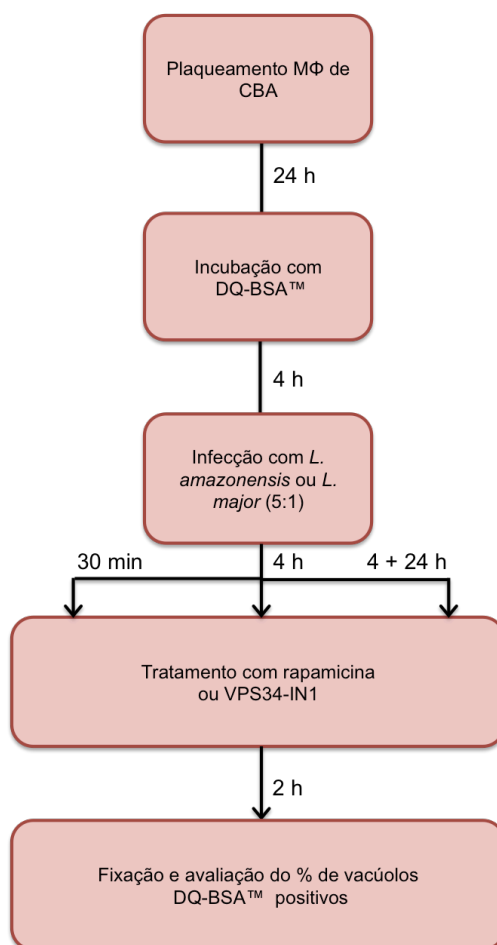


Macrófagos de camundongos CBA foram plaqueados ($2 \times 10^6/2$ mL) em placas de 6 poços e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Os macrófagos foram infectados por 30 min ou por 4 h, seguido por um período adicional de 24 h de incubação. Ao fim de cada tempo, o grupo controle positivo foi tratado com cloroquina ($10 \mu\text{M}$), droga que induz o bloqueio da fusão dos autofagossomos com lisossomos e aumento da intensidade da banda equivalente à LC3 - II por *western blot* (KLIONSKY *et al.*, 2016), e reincubadas por 4 h. Após os diferentes tempos de incubação, as células foram soltas com raspadores de silicone (Sarstedt),

recuperadas em tubo e centrifugados a 720 x g, por 10 min a 4 °C. Em seguida, as células foram ressuspensas em RIPA [1 M Tris HCl pH 8, 1 M NaCl, Nonidet P40 substitute (Sigma, St Louis, MO, EUA), sodium dodecyl sulfate 10% (Riedel-de-Haen, Seelge, GER), desoxicolato de sódio 5%, Água mili-Q e Inibidor de protease] e incubadas por 30 min a 4 °C. Após o tempo de incubação, o extrato foi sonificado três vezes por 10 s a 127V no aparelho Branson Sonifier. Ao fim da sonicação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g a 4 °C por 20 min e quantificadas em Nanodrop (ThermoScientific).

Inicialmente, 60 µg de proteína de cada extrato foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 15%, no aparelho Bio-RadMini-Protean Tetra System a 150 V e 20 mA por 1 h. Após a corrida, foi realizada transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose no aparelho Bio-RADtrans-blo Turbo por 30 min a 25V, 1A. Em seguida, a membrana foi submetida ao bloqueio com 5% de leite desnatado em PBST (PBS 1 x + 0,1% de Tween20) por 1 h em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo anti-LC3 (NB600-1384, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) em solução de PBST + 3% de leite *overnight* a 4 °C sob leve agitação. Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min cada, com PBST + 3% de leite desnatado, sob leve agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário por 1 h à temperatura ambiente, sob leve agitação. Por fim, as membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL de Quimioluminescência [Luminol e Idofenol na proporção 1:1] (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EUA), as imagens foram capturadas usando o programa Image Quant Las 4000 e processadas com o Luminescent Image Analyzer. A quantificação densitométrica das bandas foi realizada no programa Image J.

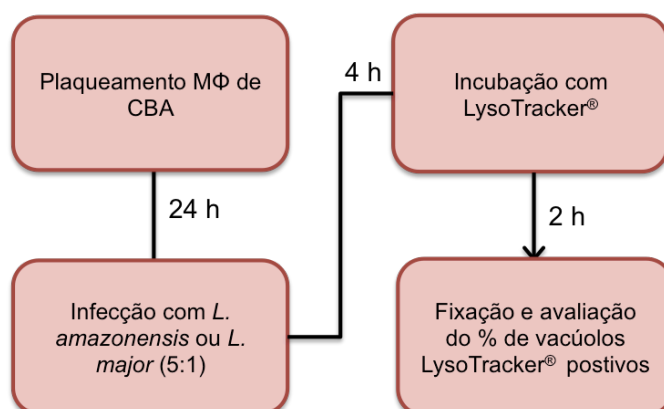
4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO VACÚOLO PARASITÓFORO DE *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR* POR DEGRADAÇÃO DO DQ-BSA



A capacidade hidrolítica de vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foi avaliada utilizando DQ-BSA™ (DQ™ Red BSA; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), marcador de compartimento degradativo, como descrito por Lerena e Colombo (2011). Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5 /mL) foram distribuídos em poços de placas de 24 poços em meio DMEM completo. Após 24 h, as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% e incubadas com 10 μ g/mL de DQ-BSA por 4 h a 37 °C. As células foram então lavadas com solução de NaCl 0,9% e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* marcadas com CFSE (Sigma, St Louis, MO, EUA), na proporção de 5:1 por 30 min, 4 h ou 4 h seguidas por um tempo adicional de infecção de 24 h. Após a infecção, as células

infectadas por 4 h ou mais foram incubadas com 10 µg/mL de rapamicina ou 1 µM de VPS34-IN1, um inibidor específico da PI3K de classe III (Bago *et al.*, 2014), por 2 h para avaliar o efeito da modulação da autofagia na marcação de DQ-BSA dos vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania*. Finalmente, as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 15 min e as lâminas foram então montadas utilizando o kit ProLong Gold Antifade contendo DAPI (Life Technologies). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal Leica SP8 (Leica) utilizando objetiva de 63x/1.4. Foram realizados três experimentos de maneira independente e em cada um deles pelo menos 30 células foram avaliadas.

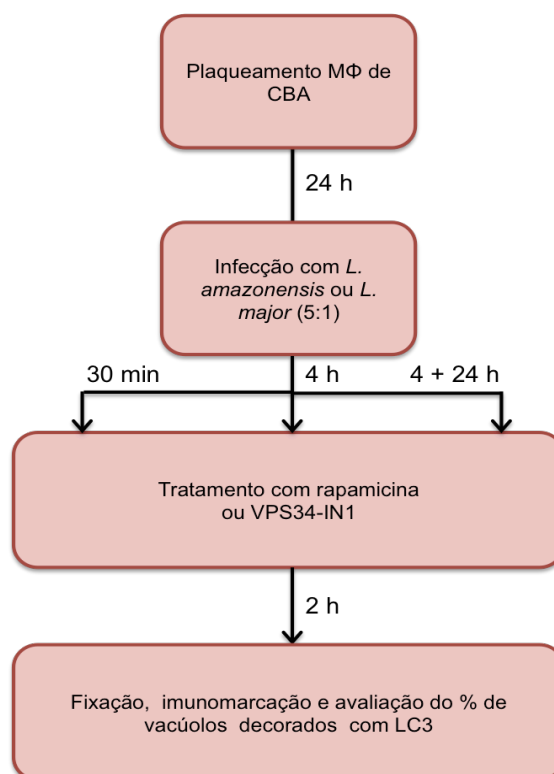
4.9 MARCAÇÃO DE VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR* COM A SONDA LISOSSOMAL LYSOTRACKER®



Para caracterizar o vacúolo induzido por *L. amazonensis* ou *L. major* quanto a características lisossomais foi utilizado o LysoTracker® Red DND-99 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), como descrito por Aguilera *et al.* (2009). Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5 /mL) foram semeados em poços de placas de 24 poços em meio DMEM completo. Após 24 h, as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* marcadas com CFSE (Sigma, St Louis, MO, EUA), na proporção de 5:1. Transcorridas 4 h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de

24 h. Em seguida, os macrófagos foram incubados com 1 μ M de LysoTracker[®] Red DND-99 (Molecular Probes) por 2 h. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e as lâminas foram então montadas utilizando o kit ProLong Gold Antifade com DAPI (Life Technologies). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal Leica SP8 (Leica) utilizando objetiva de 63x/1.4. Foram realizados três experimentos de maneira independente e em cada um deles pelo menos 30 células foram avaliadas.

4.10 AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE LC3 PARA OS VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*.



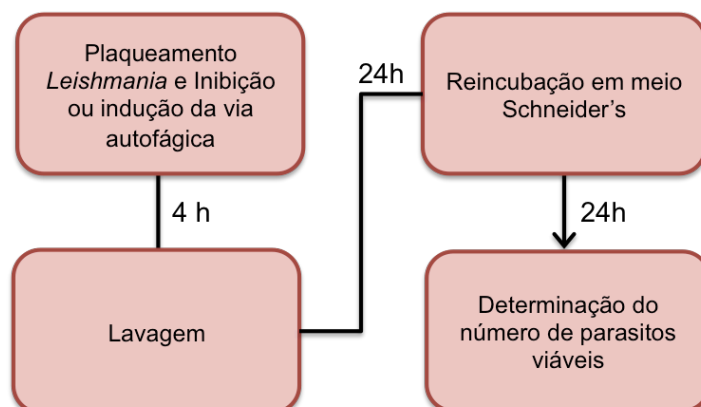
Macrófagos peritoneais de camundongos CBA foram distribuídos (2×10^5 /mL) em placas de 24 poços em meio DMEM completo e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1 por 30 min ou 4 h, para avaliar o recrutamento de LC3 por vacúolos parasitóforos em momentos iniciais da infecção por *Leishmania*. Alternativamente, com intuito

de observar o recrutamento da proteína LC3 em tempos tardios da infecção, outro grupo foi infectado por 4 h e, em seguida, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e incubadas por um período adicional de 24 h. Após os diferentes tempos de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e armazenadas a 4 °C. Adicionalmente, com intuito de avaliar o efeito da modulação da via autofágica no recrutamento de LC3 para os vacúolos parasitóforos de *Leishmania*, células infectadas por 4 h ou mais horas foram incubadas com 10 µg/mL de rapamicina ou 1 µM VPS34-IN1 por 2 h, sendo, em seguida, fixadas com PFA 4%. Posteriormente, foi realizada marcação para proteína LC3, seguindo o protocolo descrito a seguir em 4.11 *Imunomarcação*. Foram realizados três experimentos de maneira independente e em cada um deles pelo menos 30 células foram avaliadas.

4.11 IMUNOMARCAÇÃO

Os macrófagos infectados foram submetidos à imunomarcação da proteína LC3, marcadora de compartimentos da via autofágica, segundo protocolo descrito por Matte e colaboradores (2016). As células fixadas foram simultaneamente bloqueadas e permeabilizadas em 0,1% de Triton X-100, 1% de albumina sérica bovina, 20% soro de cabra (Sigma, G9023, St Louis, MO, EUA), 6% de leite desnatado e 50% de FBS por 20 min. Em seguida, as células foram incubadas durante 2 h com anticorpo anti-LC3 (1:200, NB600-1384, Novus Biologicals, Littleton, CO, EUA) diluído em PBS 1x. Como controle negativo da imunomarcação, as células foram incubadas com imunoglobulina G (IgG) do animal de origem do anticorpo primário em concentração equivalente a que foi utilizada no anticorpo primário. Subsequentemente, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e expostas ao anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor (1:200). Por fim, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x e as lâminas foram então montadas utilizando o kit ProLong Gold Antifade com DAPI (Life Technologies, Eugene, OR, EUA). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência confocal Leica SP8 (Leica). Todos os passos foram realizados à temperatura ambiente utilizando objetiva de 63x/1.4.

4.12 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DA VIA AUTOFÁGICA NA VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. AMAZONENSIS* E *L. MAJOR*



Promastigotas axênicas de *L. amazonensis* ou *L. major* em fase logarítmica foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $4 \times 10^6 / 200 \mu\text{L}$ em meio Schneider (Schneider's Insect Medium) (Sigma, St Louis, MO, EUA) com 10% de soro Bovino Fetal inativado (Gibco, Grand Island, NY, EUA) e tratadas os inibidores da via autofágica: 10 μM de cloroquina (Sigma, St Louis, MO, EUA), 10 mM de cloreto de amônio (Sigma, St Louis, MO, EUA), 100 nM de wortmanina (Sigma, St Louis, MO, EUA) e 1 μM VPS34-IN1 (Dra. Hilary McLauchlan, Universidade de Dundee, Escócia) ou com os indutores: meio pobre em nutrientes EBSS (Sigma, St Louis, MO, EUA) além de rapamicina (Sigma, St Louis, MO, EUA) nas concentrações de 50; 25; 10; 5; 1 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente, um grupo controle foi incubado com meio contendo o diluente das drogas, DMSO (Sigma, St Louis, MO, EUA) e um outro grupo controle permaneceu em meio Schneider com 10% de Soro Bovino Fetal. Após 4 h de tratamento, as promastigotas foram recolhidas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,9% a 1.800 x g, 4 °C por 10 min. Posteriormente, os parasitos foram redistribuídos em placas de 96 poços em meio Schneider com 10% soro bovino fetal e mantidas em estufa B.O.D a 24 °C. Após 24 h, foi adicionado 10% (v/v) de alamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e as placas foram novamente colocadas em estufa B.O.D. Por fim, foi realizada a leitura no espectrofotômetro Spectramax 340pc (Molecular Devices) sob os comprimentos de onda (λ) de 570 nm e 600

nm. A viabilidade das promastigotas axênicas foi determinada com cálculo do percentual de redução do alamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de redução} = \frac{(\epsilon_{ox})\lambda_2 A \lambda_1 - (\epsilon_{ox})\lambda_1 A \lambda_2}{(\epsilon_{RED})\lambda_1 A' \lambda_2 - (\epsilon_{RED})\lambda_2 A' \lambda_1}$$

Onde:

$$\lambda_1 = 570, \lambda_2 = 600$$

$$(\epsilon_{ox}) \lambda_2 = 117,216$$

$$(\epsilon_{ox}) \lambda_1 = 80,586$$

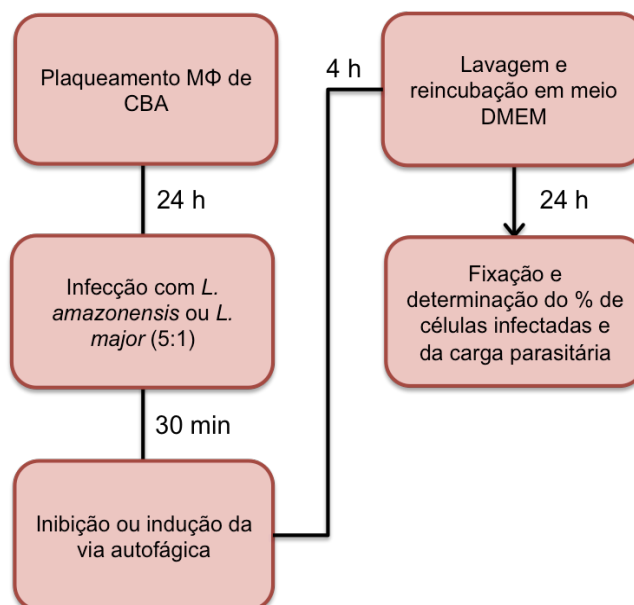
$$(\epsilon_{RED}) \lambda_1 = 155,677$$

$$(\epsilon_{RED}) \lambda_2 = 14,652$$

$A\lambda_1$ e $A\lambda_2$ = absorvância observada para o poço teste

$A'\lambda_1$ e $A'\lambda_2$ = absorvância observada para o poço controle negativo

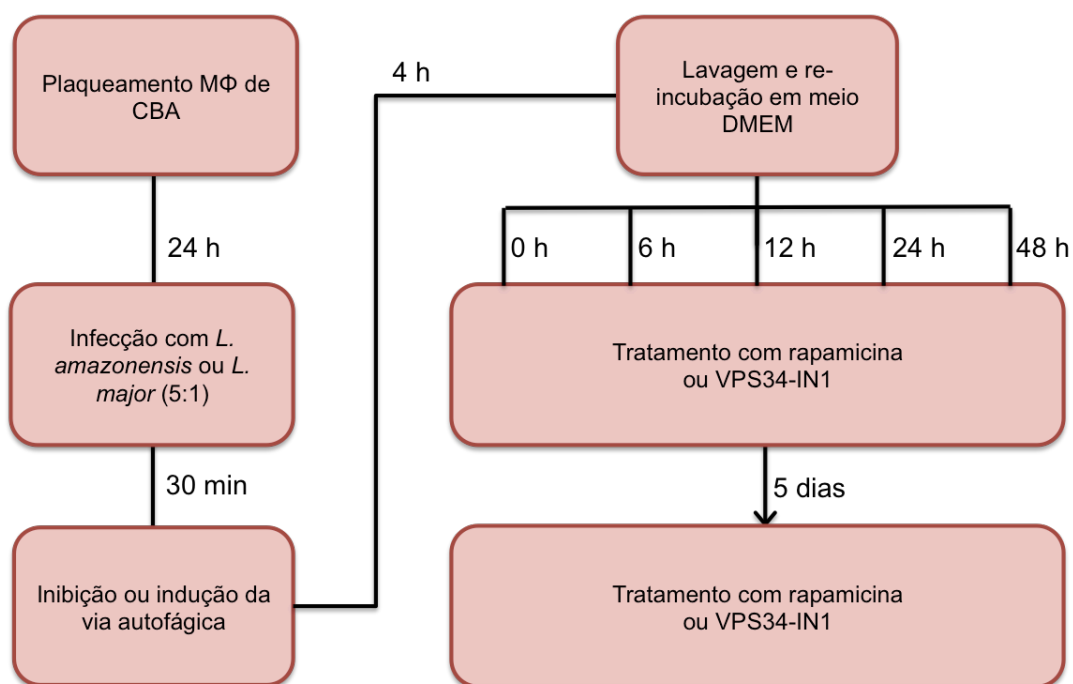
4.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*



Com intuito de avaliar a modulação da via autofágica sobre a infecção de macrófagos, macrófagos de camundongos CBA foram distribuídos (2×10^5 /mL) em placas de 24 poços em meio DMEM completo e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Transcorridos

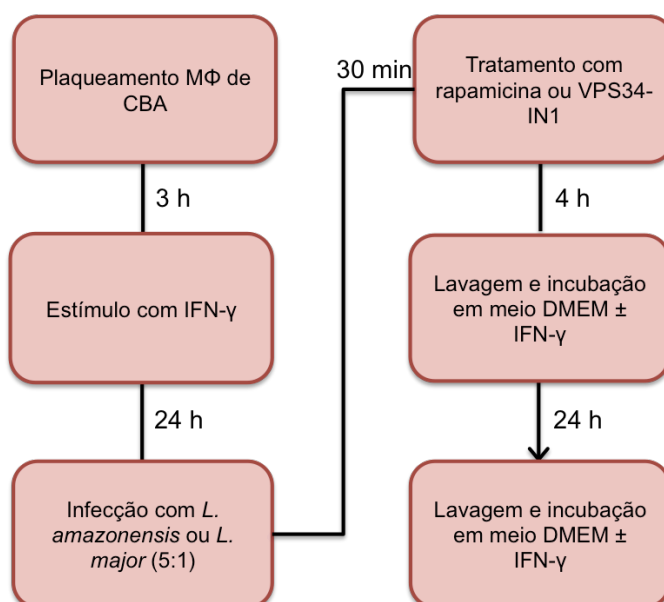
30 min de infecção, as células foram incubadas com os inibidores da via autofágica: 10 μ M de cloroquina (Sigma, St Louis, MO, EUA), 10 mM de cloreto de amônio (Sigma, St Louis, MO, EUA), 100nM de wortmanina (Sigma, St Louis, MO, EUA) e 1 μ M VPS34-IN1 (Dra. Hilary McLauchlan, Universidade de Dundee, Escócia) ou com os indutores: 10 μ g/mL de rapamicina (Sigma, St Louis, MO, EUA) e em meio pobre em nutrientes EBSS (Sigma, St Louis, MO, EUA). Após 4 h, as células foram lavadas e reincubadas em DMEM completo por tempo adicional de 24 h. Após o intervalo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 min e armazenadas a 4 °C. Posteriormente, as células foram montadas utilizando kit ProLong Gold Antifade com DAPI (Life Technologies) e, em seguida, foi realizada a contagem das células infectadas em microscópio de fluorescência Olympus BX 51 usando objetiva de 100x/1.4 para determinação do percentual de células infectadas e da carga parasitária, como descrito por Huynh *et al.* (2006). Foram realizados dois experimentos em quintuplicata de maneira independente.

4.14 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS FORMAS INTRACELULARES DE *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR* EM MACRÓFAGOS



Macrófagos de camundongos CBA foram distribuídos (2×10^5 /mL) em placas de 24 poços em meio DMEM completo e infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 5:1. Transcorrido 30 min de infecção, as células foram incubadas com os inibidores da via autofágica: cloroquina (10 μ M) ou VPS34-IN1 (1 μ M) ou com os indutores: rapamicina (10 μ g/mL) e em meio pobre em nutrientes (EBSS). Após 4 h, tempo zero, as células foram lavadas e um grupo de células foi incubado em meio Schneider (Schneider's Insect Medium) (Sigma) e outros reincubados em meio DMEM completo por tempos adicionais de 6, 12, 24 e 48 h. Após os diferentes tempos de incubação, as células foram lavadas e o meio foi substituído por Schneider (Schneider's Insect Medium) (Sigma, St Louis, MO, EUA) com 10% de soro bovino fetal inativado (Gibco, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 50 μ g/mL de Gentamicina, sendo cultivadas em estufa B.O.D a 24 °C por 5 dias, até a transformação em promastigotas viáveis. Por fim, os parasitos foram coletados e contados em câmara de Neubauer. Foram realizados dois experimentos em quintuplicata de maneira independente.

4.15 QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) E ATIVIDADE DE ARGINASE



Para determinar se a modulação da via autofágica interfere na produção de NO por macrófagos infectados e/ou na atividade da arginase, macrófagos foram

estimulados com IFN- γ 50 UI/mL (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) por 24 h. Em seguida, os macrófagos foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por 30 min. Após o período de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e tratadas com 1 μ M de VPS34-IN1 ou 10 μ g / mL de rapamicina. Após 4 h, todas as células foram lavadas e reincubadas em meio DMEM contendo IFN- γ por mais 24 h. Como controle negativo, as células infectadas foram incubadas em meio sem IFN- γ . A produção de NO foi quantificada pela reação de Griess, que mede a concentração de nitrito acumulado nos sobrenadantes das culturas de células. A atividade da arginase foi quantificada por um ensaio colorimétrico para a detecção de uréia como descrito anteriormente (ABEBE et al., 2013). Foram realizados dois experimentos em sextuplicata de maneira independente.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão Mac 5.0c - GraphPad Software. Os dados obtidos foram primeiramente submetidos à análise estatística descritiva, obtendo-se média, mediana, valor máximo e valor mínimo. A hipótese da normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e para comparação entre dois grupos entre si, com distribuição normal, foi utilizado o teste *t* de Student não pareado e como teste não paramétrico o de Mann-Whitney. Para a comparação entre grupos com distribuição normal, foi utilizado o teste *One way* ANOVA e como teste não paramétrico o Kruskal-Wallis. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significante quando o valor de $p < 0,05$. Análise de componentes principais (PCA, do inglês Principal component analysis) e análise hierárquica (método de Ward) foram utilizados para avaliar se macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* poderiam ser agrupados separadamente pelo percentual de macrófagos infectados, carga parasitária, viabilidade intracelular, porcentagem de vacúolos com LC3 bem como porcentagem de vacúolos positivos para DQ-BSA e para LysoTracker. Essas análises de dados foram realizadas utilizando o software JMP 11.0 (SAS)

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

Com intuito de avaliar se a infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* altera a expressão de genes relacionados à autofagia, RNA total extraído de macrófagos infectados ou não foram submetidos à RT² Profiler PCR Array Mouse Autophagy (PAMM-084ZC-12, Qiagen). Como é observado na Figura 4 A, o perfil de expressão gênica dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* (M ϕ + *L.a.*) (61% de genes) revelou uma maior regulação positiva de vários genes relacionado à autofagia em comparação com macrófagos infectados com *L. major* (M ϕ + *L.m.*) (25%). Os genes regulados positivamente nos macrófagos infectados estão envolvidos na formação de autofagossomas (68% dos genes de M ϕ + *L.a.* versus 21% de M ϕ + *L.m.*), maquinaria de regulação da autofagia (73% de M ϕ + *L.a.* versus 21% de M ϕ + *L.m.*) e ligação autofagossoma-lissosoma (50% de M ϕ + *L.a.* versus 25% de M ϕ + *L.m.*) (Figura 4 B).

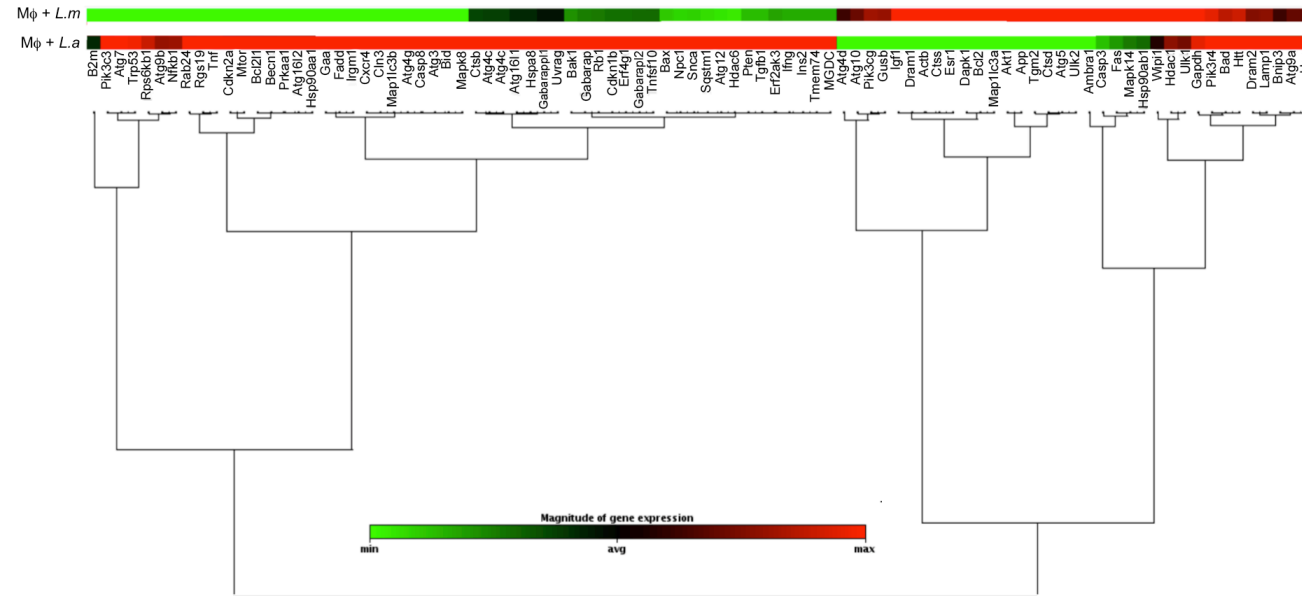
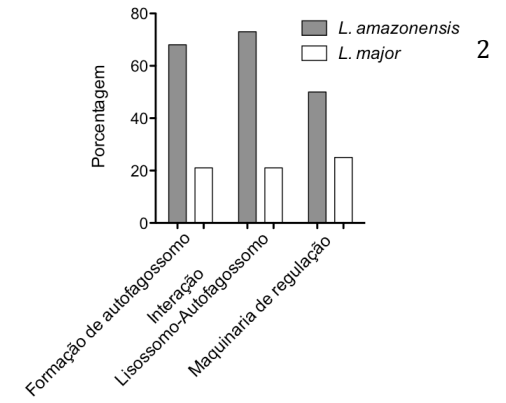
A**B**

Figura 4 - Perfil de expressão de genes relacionados à autofagia de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. (A e B) Macrófagos peritoneais de camundongo de linhagem CBA foram infectados por promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*, após 30 min de infecção, as células foram lavadas e reincubadas por tempo adicional de 24 h. O RNA total foi extraído dos macrófagos infectados e depois submetido à transcrição reversa para obtenção do cDNA que foi utilizado como molde na PCR em tempo real para genes relacionados à autofagia QIAGEN. (A) *Heat map* demonstrando análise de alterações na expressão de genes relacionados à autofagia em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* ou *L. major*. (B) Genes diferencialmente expressos relacionados aos processos de autofagia foram sub-categorizados quanto a suas funções.

Para realizar uma melhor análise da modulação dos genes relacionados à autofagia na infecção por *L. amazonensis* e *L. major*, buscamos dados de *microarrays* públicos de macrófagos infectados com uma dessas duas espécies de *Leishmania* e estes foram sobrepostos na via canônica da autofagia disponível no IPA. Na figura 5 é possível observar que, assim como os dados obtidos na RT² Profiler PCR Array Mouse Autophagy, nos macrófagos infectados com *L. amazonensis* há um maior número de genes relacionados à autofagia regulados positivamente em comparação com os macrófagos infectados com *L. major* (Figura 5).

Em seguida, avaliamos a modulação dos genes relacionados à autofagia no contexto de *Autophagy of Cells* – subgrupos: *Affects Autophagy of Cells* e *Decreases Autophagy of Cells*. Ao avaliar os genes relacionados à autofagia no contexto *Affects Autophagy of Cells* foram pré-selecionados 192 genes com expressão modulada. Dentre esses genes, 39 apresentaram modulação oposta entre macrófagos infectados com *L. amazonensis* em comparação com macrófagos infectados com *L. major*. Por sua vez, no contexto *Decreases Autophagy of Cells* foi observado 57 genes com expressão modulada e entre eles apenas 14 exibiram modulação oposta entre macrófagos infectados com *L. amazonensis* quando comparados com macrófagos infectados com *L. major* (Figura 6 e Tabela 2).

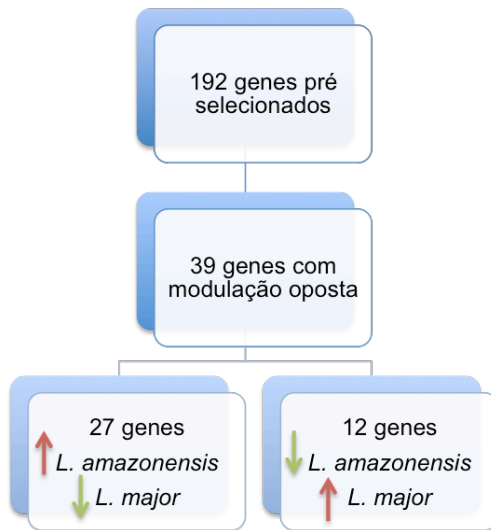
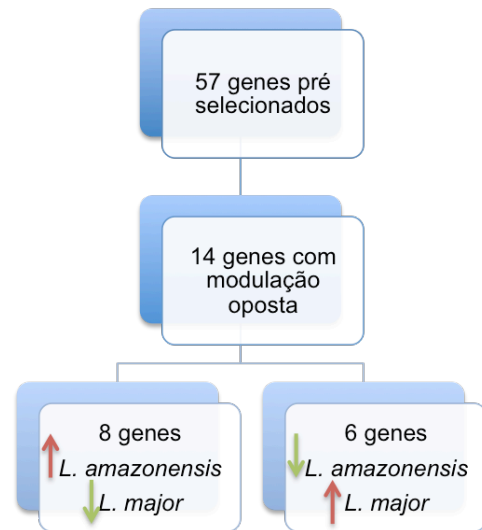
Affects Autophagy of Cells*Decreases Autophagy of Cells*

Figura 6 – Fluxograma dos genes relacionados à autofagia com expressão modulada na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Dados de *microarrays* públicos de macrófagos infectados com *L. amazonensis* (GSE11497) ou *L. major* (GSE31995, GSE31996 e GSE52624) foram analisados no IPA no contexto de *Autophagy of Cells – Affects Autophagy of Cells* e *Decreases Autophagy of Cells*.

Tabela 2 – Genes da célula hospedeira diferencialmente expressos em BMM ϕ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*

| <i>Decreases Autophagy of Cells</i> | | |
|--|--|------------------------------------|
| Gene | Descrição | Modulação |
| BNIP3 | BCL2 Interacting Protein 3 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| CAPN1 | Calpain 1 | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| CAPN11 | Calpain 11 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| CAPN5 | Calpain 5 | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| CAPN6 | Calpain 6 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| DAPK2 | Death Associated Protein Kinase 2 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| FUNDC1 | FUN14 Domain Containing 1 | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| HIF1A | Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Subunit | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| KRAS | KRAS Proto-Oncogene, GTPase | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| nbr1 | NBR1, Autophagy Cargo Receptor | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| POLG | Mitochondrial DNA Polymerase Catalytic Subunit | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| RRAGA | Ras Related GTP Binding A | Aumentado em <i>L. major</i> |
| SNAI1 | Snail Family Transcriptional Repressor 1 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| TFE3 | Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3 | Aumentado em <i>L. amazonensis</i> |
| <i>Affects Autophagy of Cells</i> | | |
| Gene | Descrição/Função | Modulação |
| ADCY4 | Adenylate Cyclase 4 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| ADCY6 | Adenylate Cyclase 6 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| ADCY9 | Adenylate Cyclase 9 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| BCL2 | BCL2, Apoptosis Regulator | Aumentado em <i>L. major</i> |
| CAPN1 | Calpain 1 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| CAPN11 | Calpain 11 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| CAPN5 | Calpain 5 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| CAPN6 | Calpain 6 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| CLN3 | CLN3, Battenin | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| CSF2 | Colony Stimulating Factor 2 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| EP300 | E1A Binding Protein P300 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| FBXL20 | F-Box And Leucine Rich Repeat Protein 20 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| FLT1 | Fms Related Tyrosine Kinase 1 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| GAB1 | GRB2 Associated Binding Protein 1 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| GHR | Growth Hormone Receptor | Aumentado em <i>L. major</i> |
| HDAC11 | Histone Deacetylase 11 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| HDAC3 | Histone Deacetylase 3 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| HDAC4 | Histone Deacetylase 4 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| IGF1R | Insulin Like Growth Factor 1 Receptor | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| IL6 | Interleukin 6 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| INSR | Insulin Receptor | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| KLB | Klotho Beta | Aumentado em <i>L. major</i> |
| KRT18 | Keratin 18 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| NTRK1 | Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1 | Aumentado em <i>L. major</i> |
| PGAM5 | PGAM Family Member 5, Mitochondrial Serine/Threonine Protein Phosphatase | Aumentado em <i>L. major</i> |

Tabela 2 – Genes da célula hospedeira diferencialmente expressos em BMM ϕ infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* (Continuação)

| | | |
|---------|---|---------------------------------|
| PIK3CB | Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta | Aumentado em <i>L. major</i> |
| PIK3R6 | Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 6 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| PTGER2 | Prostaglandin E Receptor 2 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| PTPA | Protein Phosphatase 2 Phosphatase Activator | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| PTPN11 | Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| QSOX1 | Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| SAP130 | Sin3A Associated Protein 130 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| SIN3A | SIN3 Transcription Regulator Family Member A | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| TBC1D14 | TBC1 Domain Family Member 14 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| TBC1D16 | TBC1 Domain Family Member 16 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| TBC1D17 | TBC1 Domain Family Member 17 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| TGFBR1 | Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |
| TGFRB2 | Transforming Growth Factor Beta Receptor 2 | Aumentado <i>L. amazonensis</i> |

5.2 AVALIAÇÃO DO FLUXO AUTOFÁGICO EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

A avaliação do fluxo autofágico em extratos proteicos de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*, submetidos a *western blot* com anticorpos específicos para LC3, proteína marcadora de compartimentos autofágicos, confirmou a presença das duas formas da proteína LC3: (i) a banda correspondente à forma citosólica LC3-I (18kDa) e (ii) a banda da forma conjugada à membrana de autofagossomos LC3-II (16kDa). No presente trabalho não foi observada diferença na razão LC3-II/Actina entre as células infectadas por *L. amazonensis* e aquelas infectadas por *L. major* após 30 min de infecção em comparação com as células controle não infectadas. No entanto no tempo de 24h, a razão LC3-II/Actina estava aumentada 1,79 e 1,80 vezes em macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*, respectivamente, em comparação ao controle não infectado (Figura 8 A e B). Adicionalmente, observa-se que as células tratadas com cloroquina acumularam LC3-II em comparação com os grupos não tratados (Figura 8 A), mostrando que não há diferença na ativação do fluxo autofágico entre as células infectadas e que não observa-se bloqueio do fluxo autofágico nessas células como nas células controle positivo que foram tratadas com cloroquina.

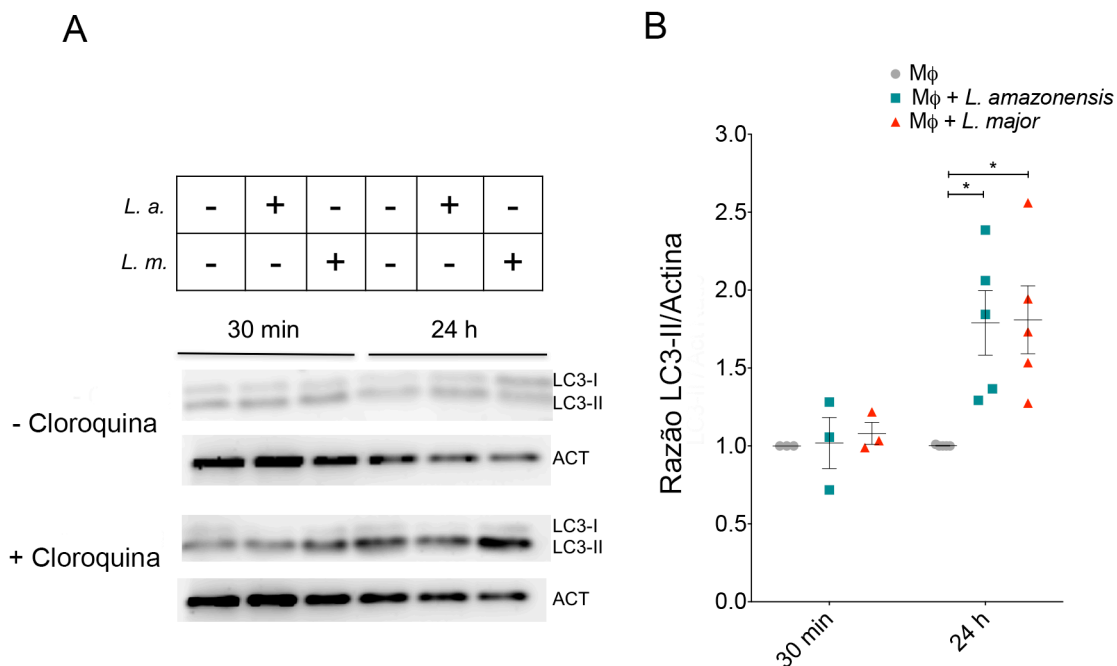


Figura 8 - A via autofágica é ativada similarmente em células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. (A) *Western blot* da expressão de LC3-II e actina (Act) em macrófagos de camundongos CBA infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por 30 min ou por 4 h, seguido por um período adicional de 24 h de incubação. A inibição do fluxo autofágico foi realizada com o tratamento dos macrófagos por 6 h com cloroquina (10 μ M), tanto em células não infectadas quanto em células infectadas. A actina foi usado como controle interno de carga. (B) As bandas de proteína foram quantificadas densitometricamente para determinadas da razão LC3II/Act. Os símbolos representam cada experimento realizado, enquanto as linhas são representativas das médias \pm SE (One-way ANOVA, * $p < 0,01$). M ϕ : Macrófagos; M ϕ + *L.a.*: Macrófagos infectados com *L. amazonensis*; M ϕ + *L.m.* : Macrófagos infectados por *L. major*.

5.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS AUTOLISOSSÔMICAS EM VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

Para determinar se a capacidade de interagir com a via autofágica pode explicar as diferenças na sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras, as características dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* foram avaliadas. Inicialmente, foi avaliada a atividade hidrolítica dentro destes compartimentos determinando o percentual de vacúolos parasitóforos marcados com DQ-BSA. Após 30 min de infecção, a porcentagem de vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com DQ-BSA foi semelhante (Figura 9 A - C). No entanto, após 4 h de infecção, os vacúolos contendo *L. major* (46%) exibiram maior positividade para DQ-BSA do que os induzidos por *L. amazonensis* (33,33%) (Figura 9 C). Da mesma forma, após 24 h de infecção, 50% dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* foram positivos para DQ-BSA sendo que apenas 25% dos vacúolos de *L. amazonensis* foram positivos (Figura 9 C). Também observamos que, em macrófagos nos quais a autofagia foi induzida por rapamicina, a positividade de DQ-BSA foi aumentada em 27,58% nos vacúolos induzidos por *L. amazonensis* e em 57,33% naqueles induzidos por *L. major* quando comparada com células não tratadas ($p < 0,01$, Figura 9 D). Apesar disso, a positividade de DQ-BSA foi estatisticamente semelhante nos vacúolos induzidos por *L. amazonensis* e *L. major* em macrófagos tratados com rapamicina ($p < 0,01$, Figura 9 D).

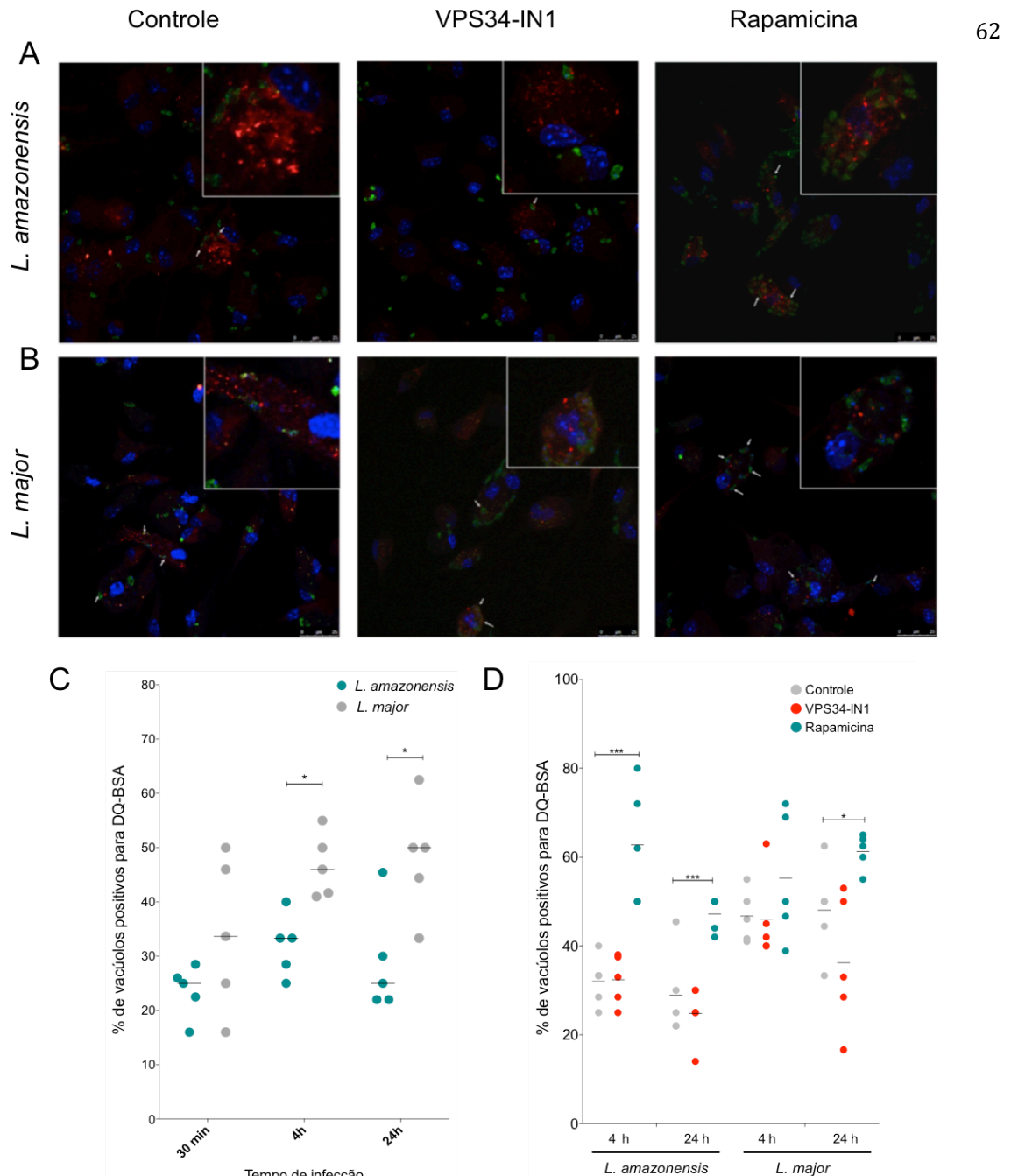


Figura 9 – Avaliação dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com DQ-BSA™. Macrófagos de camundongo CBA foram incubados com 10 µg/mL de DQ-BSA™ por 4 h, infectados com promastigotas metacíclicos de *L. amazonensis* ou *L. major* marcadas com CFSE e depois fixadas. Grupos de células de controle positivas e negativas foram incubadas com 10 µg / mL de rapamicina ou 1 µM VPS34-IN1, respectivamente, após a infecção e então fixadas. Para microscopia confocal, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). (A) macrófagos infectados com *L. amazonensis* (verde) ou (B) *L. major* (verde) por 24 h marcados com DQ-BSA (vermelho). Setas brancas indicam vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania* marcados com DQ-BSA. (C) Porcentagem de vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com DQ-BSA (teste *t* de Student, * $p < 0,05$). (D) Porcentagem de vacúolos induzidos por *Leishmania* marcados com DQ-BSA em macrófagos tratados com VPS34-IN1 ou rapamicina (One-way ANOVA, *** $p < 0,01$). Os círculos correspondem a cada campo selecionado aleatoriamente de um experimento representativo de três realizados de maneira independente.

Adicionalmente, caracterizamos comparativamente a acidificação dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* por meio do acúmulo de LysoTracker. A figura 10 ilustra as imagens de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (Figura 10 A) ou *L. major* (Figura 10 B), nas quais observa-se nos vacúolos induzidos pelos parasitos, marcados em verde, a presença de LysoTracker® em vermelho. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa no percentual de vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* (42,25%) em comparação com *L. amazonensis* (31,75%) quanto à positividade para LysoTracker (Figura 10 A - C).

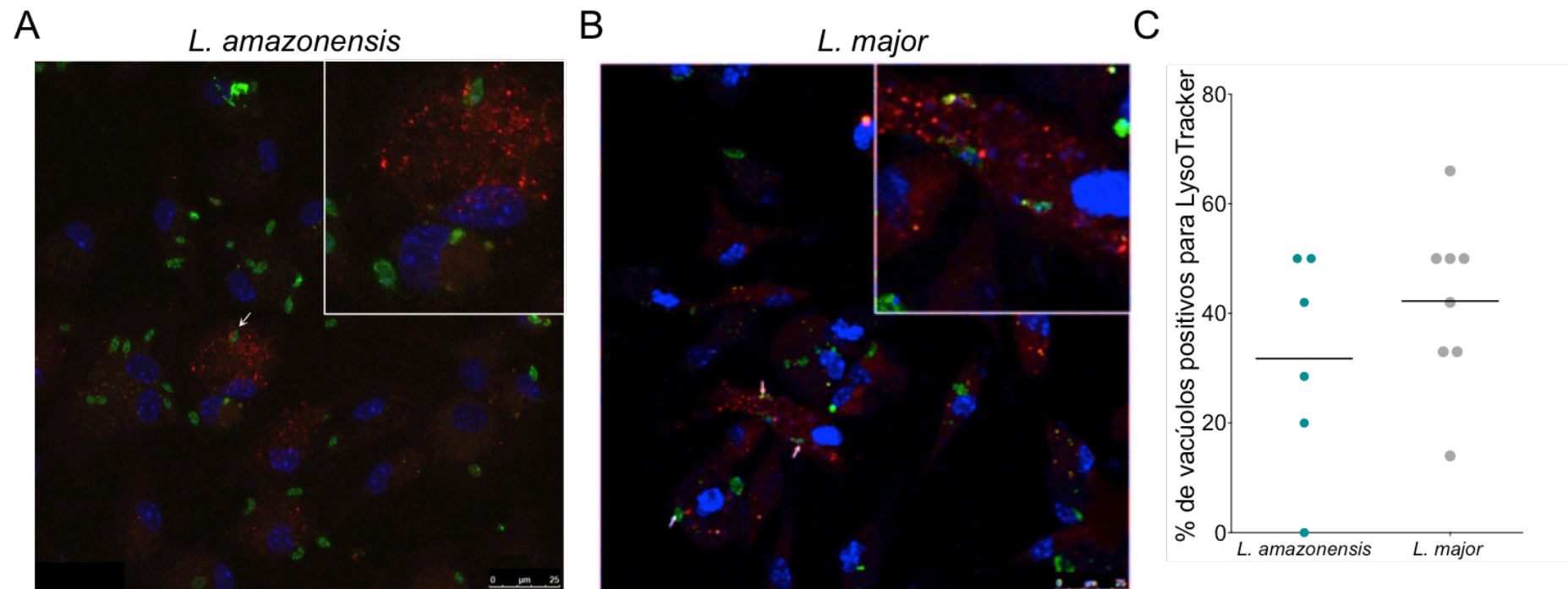


Figura 10 – Avaliação dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com LysoTracker®. Macrófagos infectados com (A) *L. amazonensis* (verde) ou (B) com *L. major* (verde) por 24 h foram marcados com 100 nM de LysoTracker (vermelho). Setas brancas indicam vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania* marcados com LysoTracker. (C) Porcentagem de vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com LysoTracker (teste *t* de Student, * $p > 0,05$). Os círculos correspondem a cada campo selecionado aleatoriamente de um experimento representativo de três realizados de maneira independente.

5.4 AVALIAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE LC3 PARA OS VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

O recrutamento da proteína LC3 para os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* foi observado (Figura 11 A e B) e quantificado (Figura 11 C). Nos tempos iniciais da infecção, 30 min ou 4h, o percentual de vacúolos parasitóforos decorados por LC3 foi similar nas células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*. No entanto, após 24h de infecção observa-se um maior recrutamento da proteína LC3 nos vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* em comparação com *L. major* com 42,36% e 18,10%, respectivamente (Figura 11 C). Em seguida, com intuito de avaliar o efeito da modulação da via autofágica no recrutamento de LC3 para os vacúolos induzidos por *Leishmania*, células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major* foram incubadas com VPS34-IN1, um inibidor específico de PI3K de classe III, ou rapamicina, droga inibidora da proteína mTOR (Figura 11 A e B). Os resultados mostraram que não houve alteração no recrutamento de LC3 nos vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* em comparação com macrófagos não tratados infectados (Figura 11 D). Este resultado sugere que o recrutamento de LC3 para vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania* é independente da via PI3K-Akt-mTOR.

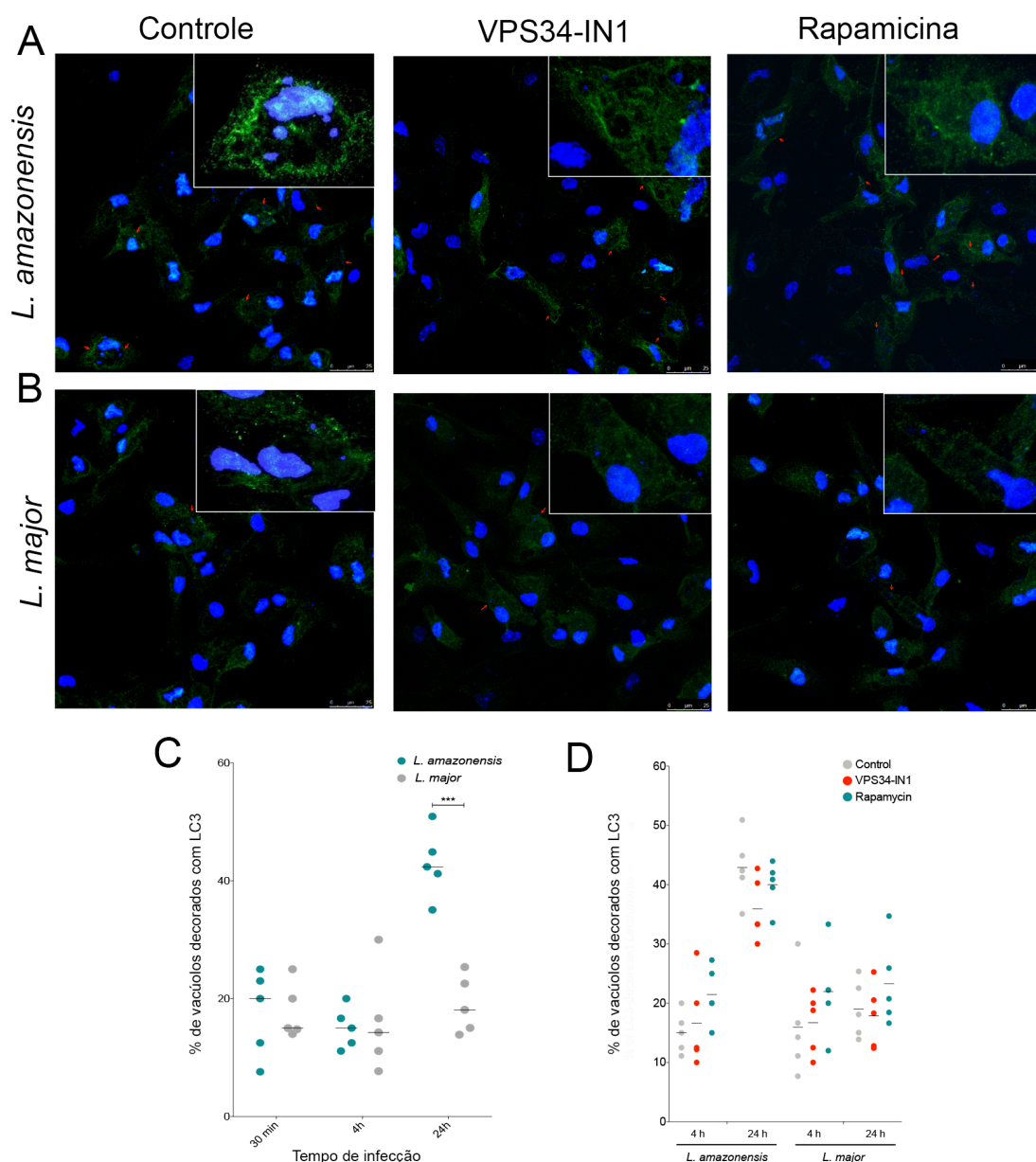


Figura 11 - Avaliação do recrutamento de LC3 para os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Um grupo de células de controle foi incubado com rapamicina (10 µg/mL) ou VPS34-IN1 (1 µM) após a infecção. As células foram então fixadas e marcadas com anticorpo anti-LC3 seguido do anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado ao Alexa Fluor 488 (verde). Para microscopia confocal, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). Imagens de microscopia confocal de macrófagos infectados com (A) *L. amazonensis* ou (B) *L. major* por 24 h marcados com LC3. Setas vermelhas indicam vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania* positivos para LC3. (C) Porcentagem de vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* decorados com LC3 (teste *t* de Student, *** $p < 0,01$). (D) Porcentagem de vacúolos induzidos por *Leishmania* decorados com LC3 em macrófagos tratados com VPS34-IN1 ou rapamicina (One-way ANOVA, $p > 0,05$). Os círculos correspondem a cada campo selecionado aleatoriamente de um experimento representativo de três realizados de maneira independente.

5.5 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE INIBIDORES E INDUTORES DA VIA AUTOFÁGICA NA VIABILIDADE DAS FORMAS PROMASTIGOTAS AXÊNICAS DE *L. AMAZONENSIS* E *L. MAJOR*

Antes da avaliação do papel dos moduladores (cloreto de amônio, wortmanina, cloroquina, VPS34-IN1, rapamicina ou EBSS) da via autofágica sobre a infecção por cada uma das espécies de *Leishmania* em macrófagos, verificamos se estes moduladores alteram diretamente a viabilidade do parasito em culturas axênicas. A incubação com cloreto de amônio, wortmanina, cloroquina, VPS34-IN1 ou EBSS não alterou a viabilidade das formas promastigotas dos parasitos, no entanto rapamicina na concentração de 50 µg/mL reduziu a viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. major* em 40,4 e 76,2%, respectivamente (Figura 12 A e B).

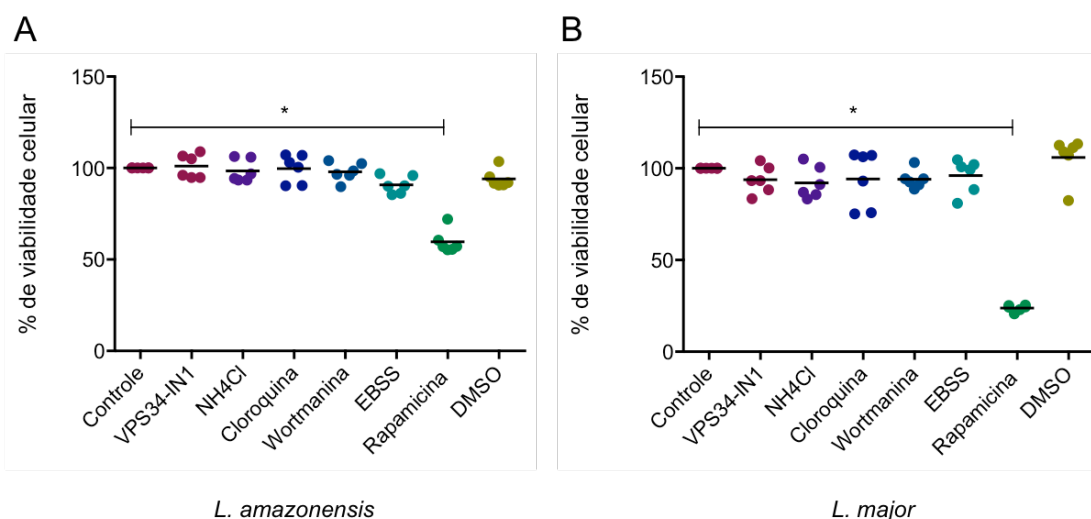


Figura 12 – Determinação do efeito de inibidores e indutores da via autofágica na viabilidade de promastigotas axênicas de *L. amazonensis* e *L. major*. Culturas axênicas de (A) *L. amazonensis* ou (B) *L. major* foram incubadas com NH₄Cl (10 mM), wortmanina (100nM), VPS34-IN1 (1 µM), cloroquina (1 µM), rapamicina (50 µg/mL) ou EBSS. Após o tempo de incubação, foi adicionado alamarBlue e a viabilidade foi obtida utilizando cálculo do percentual de redução do alamarBlue. Os pontos representam o dado de cada réplica de um de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata (teste Kruskal-Wallis, pós teste de Dunns * $p < 0,05$).

Visto que a rapamicina na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ reduz a viabilidade dos parasitas, um novo ensaio, com diferentes concentrações desta droga, foi realizado a fim de identificar qual concentração não possui efeito direto na viabilidade do parasito, para ser testada, posteriormente, em macrófagos infectados com intuito apenas de modular a autofagia. Os resultados encontrados mostraram que apenas o tratamento com 50 $\mu\text{g/mL}$ reduz significativamente a viabilidade de *L. amazonensis* ou *L. major*. No entanto, apesar de não encontrarmos diferença estatisticamente significativa, a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 20,4 e 26,6 % a viabilidade de *L. amazonensis* e *L. major*, respectivamente (Figura 13 A e B). Deste modo, os ensaios seguintes para avaliar o efeito da indução da via autofágica em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foram realizados utilizando 10 $\mu\text{g/mL}$ de rapamicina, maior concentração que não demonstrou qualquer efeito sobre a viabilidade do parasito.

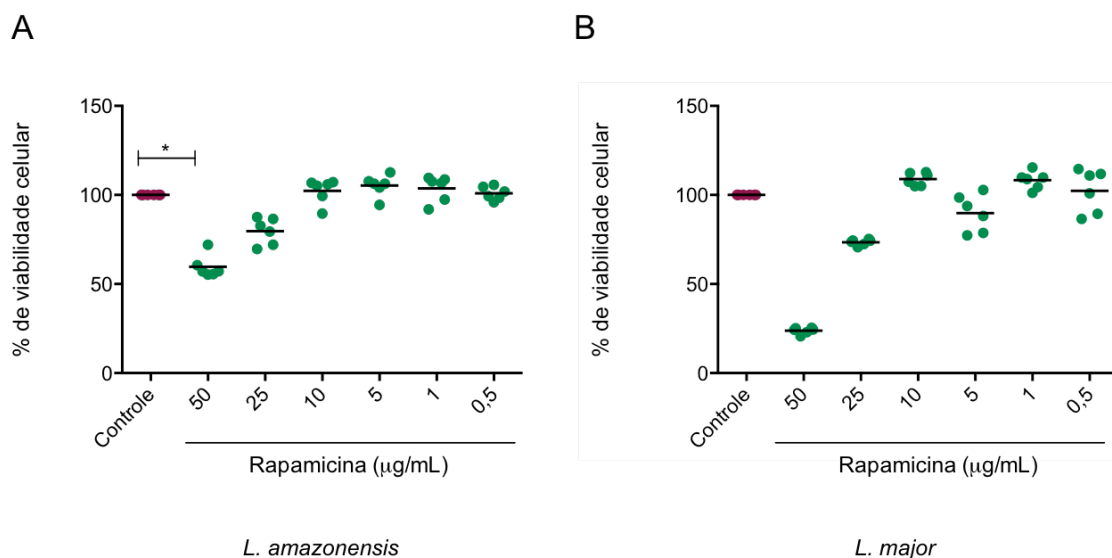


Figura 13 – Determinação do efeito da rapamicina na viabilidade de culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Culturas axênicas de (A) *L. amazonensis* (B) *L. major* foram incubadas com rapamicina (50; 25; 10; 5; 1 ou 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Após o tempo de incubação foi adicionado alamarBlue nos poços contendo as formas promastigotas dos parasitos. A viabilidade foi obtida utilizando cálculo do percentual de redução do alamarBlue. Os pontos representam o dado de cada réplica de um de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata (teste Kruskal-Wallis, pós teste de Dunns $*p < 0,05$).

5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INDUÇÃO E INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* E *L. MAJOR*

Posteriormente, a fim de avaliar o efeito da modulação da via autofágica sobre a infecção, macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* foram incubados com indutores ou inibidores da via autofágica. Foi observado, que a inibição da via autofágica por cloroquina, wortmanina, ou VPS34-IN1 não altera o percentual de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* (Figura 14 A e B) nem o número de *Leishmania* por célula infectada (Figura 14 C e D). Também foi observado que a indução da via autofágica, farmacológica ou fisiológica, não alterou o percentual de infecção (Figura 14 E e F) nem a carga parasitária (Figura 14 G e H) em macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* em comparação ao grupo controle não tratado.

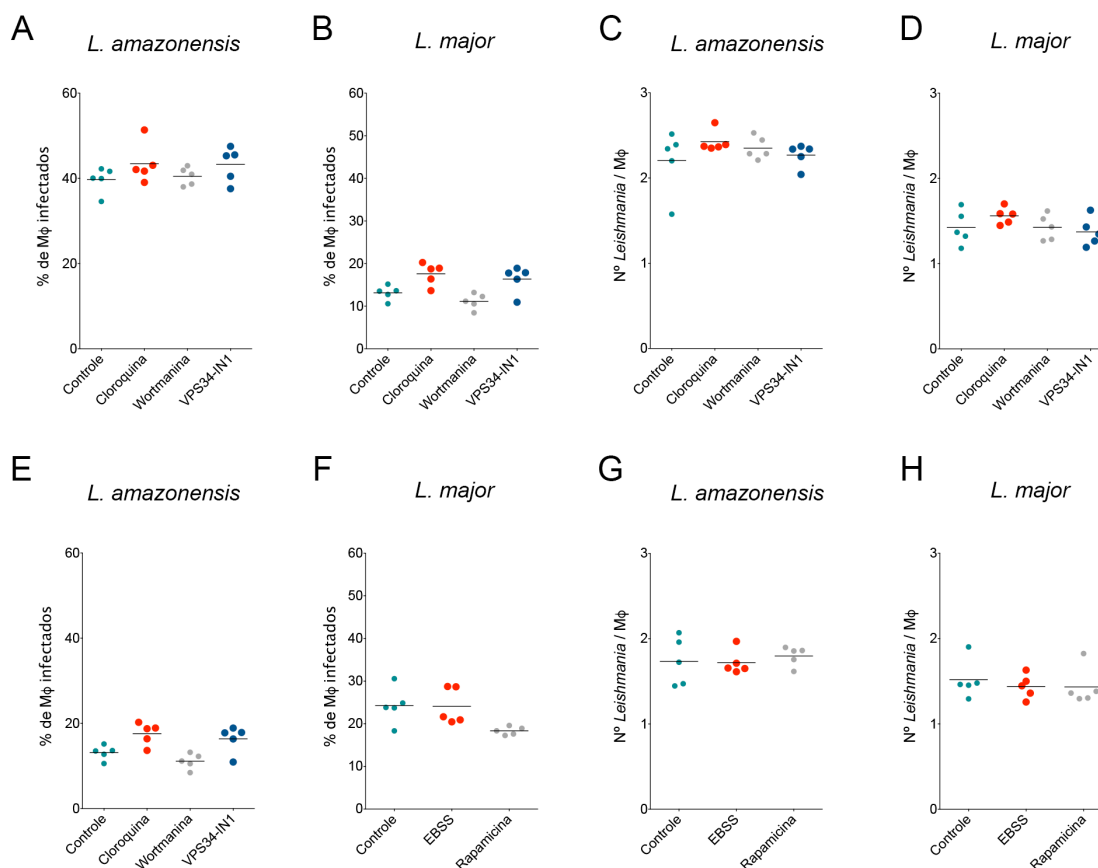


Figura 14 – Avaliação do efeito da modulação da via autofágica em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos de camundongo foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*, na proporção de 5:1, e incubados com (A - D) inibidores da autofagia: cloroquina (10 μ M), wortmanina (100 nM) ou VPS34-IN1 (1 μ M), ou com (E - H) indutores: EBSS, meio pobre em nutrientes, ou rapamicina (10 μ g/mL). As células foram observadas no microscópio Olympus BX 51 para determinação do percentual de células infectadas e da carga parasitária. Em cada lâmina no mínimo 400 células foram contadas. Os pontos representam o dado de cada réplica de um de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata (Teste Kruskal-Wallis, pós teste Dunns, $p > 0,05$).

5.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR* FRENTE AO TRATAMENTO DE CÉLULAS COM MODULADORES DA VIA AUTOFÁGICA

Em seguida, o efeito da ativação e inibição da via autofágica sobre a sobrevivência das formas intracelulares de *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos inflamatórios foi avaliada. Não foram observadas alterações na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* ou *L. major* após o tratamento com os inibidores da via autofágica (Figura 15 A e B). No entanto, observamos que a indução da autofagia através da incubação com meio EBSS ou tratamento com rapamicina aumentou o número de parasitas viáveis tanto de *L. major* quanto de *L. amazonensis* em comparação com controles infectados não tratados (Figura 15 C e D). A indução farmacológica levou ao aumento da viabilidade dos parasitos de *L. major* em 140,25%; 146,18% e 157,15% após 4, 10 e 16 h de infecção, respectivamente, em comparação aos macrófagos controle não tratados (Figura 15 D); e aumentou a viabilidade dos parasitos de *L. amazonensis*, em 61,7% e 76,39% após 4 h e 10 h de tratamento, respectivamente (Figura 15 C).

Interessantemente, foi observado que a indução fisiológica ou farmacológica por rapamicina da via autofágica levou a um maior aumento da viabilidade intracelular de *L. major* do que de *L. amazonensis* em comparação com células infectadas não tratadas (Figura 15 E e F). A indução fisiológica da autofagia aumentou em 2,5 e 1,5 vezes mais a viabilidade intracelular de *L. major* versus *L. amazonensis* após 10 e 16 horas de tratamento, respectivamente (Figura 15 E). Por sua vez, a indução farmacológica da autofagia por rapamicina aumentou em 2,17 vezes mais a viabilidade intracelular de *L. major* em comparação com a viabilidade de *L. amazonensis* 4 horas após o tratamento ($p < 0,05$) (Figura 15 F). Adicionalmente, foi observado maior aumento na viabilidade intracelular de *L. major* em comparação com *L. amazonensis* após 10 e 16 h em células tratadas com rapamicina (Figura 15 F).

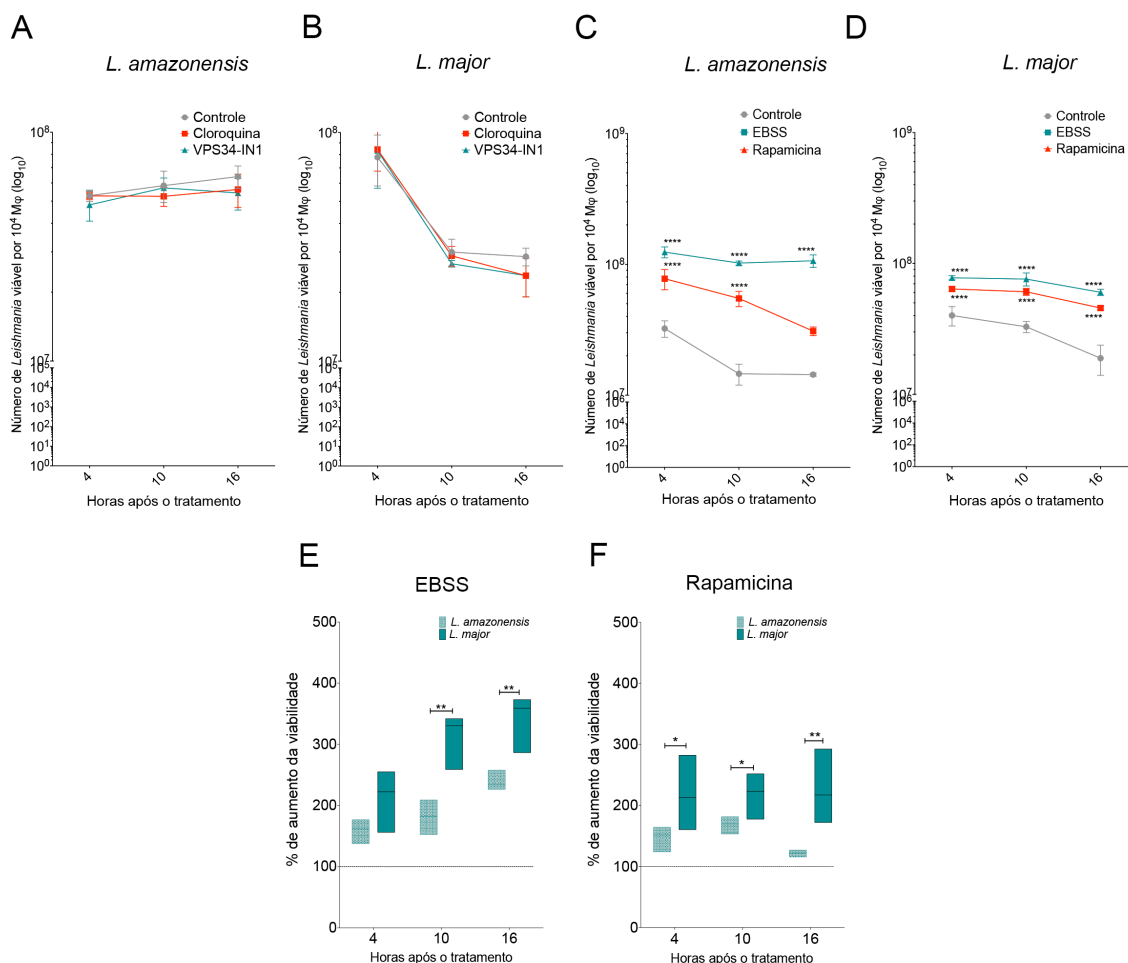


Figura 15 - Cinética da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. major* frente ao tratamento de macrófagos com moduladores da via autofágica. Para avaliar a viabilidade intracelular (A - C) de *L. amazonensis* ou (B - D) *L. major*, os macrófagos infectados foram incubados com os inibidores da via autofágica (A, B): cloroquina (10 μ M) ou VPS34-IN1 (1 μ M), ou indutores da via autofágica (C e D): meio pobre em nutrientes EBSS ou rapamicina (10 μ g mL). Após o tempo de incubação, as células foram reincubadas em meio de Schneider por 5 dias para determinar o número de parasitas viáveis. Os pontos correspondem à média de um de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata \pm SD (teste Two-Way ANOVA, pós teste de Tukey *** $p < 0,001$). (E e F) Análise do aumento na viabilidade intracelular de parasitos após incubação com (E) EBSS ou (F) rapamicina. As linhas representam valores medianos e as barras flutuantes mostram os quartis (25% e 75%) de um de dois experimentos independentes realizados em quintuplicata (teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

5.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MODULAÇÃO DA AUTOFAGIA NA PRODUÇÃO DE NO E NA ATIVIDADE DA ARGINASE EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* OU *L. MAJOR*

Para determinar se a via da arginase está envolvida no aumento da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e *L. major* induzido pela autofagia, avaliamos o efeito da indução da via autofágica por rapamicina na produção de NO e na atividade da arginase em macrófagos infectados. Células controle não estimuladas, não infectadas e infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*, produziram NO em níveis indetectáveis. Macrófagos não infectados estimulados com IFN- γ liberaram 2,30 μM de NO no meio de cultura. A adição de rapamicina ou VPS24-IN1 a esta cultura celular alterou a produção de NO para 0,74 ou 4,61 μM , respectivamente (Figura 16 A). A adição de rapamicina levou à diminuição da produção de NO em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (4,33 μM) em comparação ao grupo controle não tratado (11,40 μM) ($p < 0,05$, Figura 16 A). Além disso, o VPS34-IN1 aumentou a produção de NO por macrófagos infectados por *L. amazonensis* (35,55 μM) em comparação com as células controle (11,40 μM) ($p < 0,05$, Figura 16 A). Similarmente, em macrófagos infectados com *L. major*, a adição de VPS34-IN1 aumentou os níveis de NO para 22,17 μM , enquanto que a adição de rapamicina reduziu a produção de NO para 1,46 μM em comparação com 6,35 μM de NO liberado por macrófagos não tratados infectados com *L. major* ($p < 0,05$, Figura 16 A). Curiosamente, não foram observadas diferenças significativas na atividade de arginase entre os macrófagos infectados por *Leishmania* tratados com rapamicina ou VPS34-IN1 e macrófagos controle não tratados ($p > 0,05$, Figura 16 B).

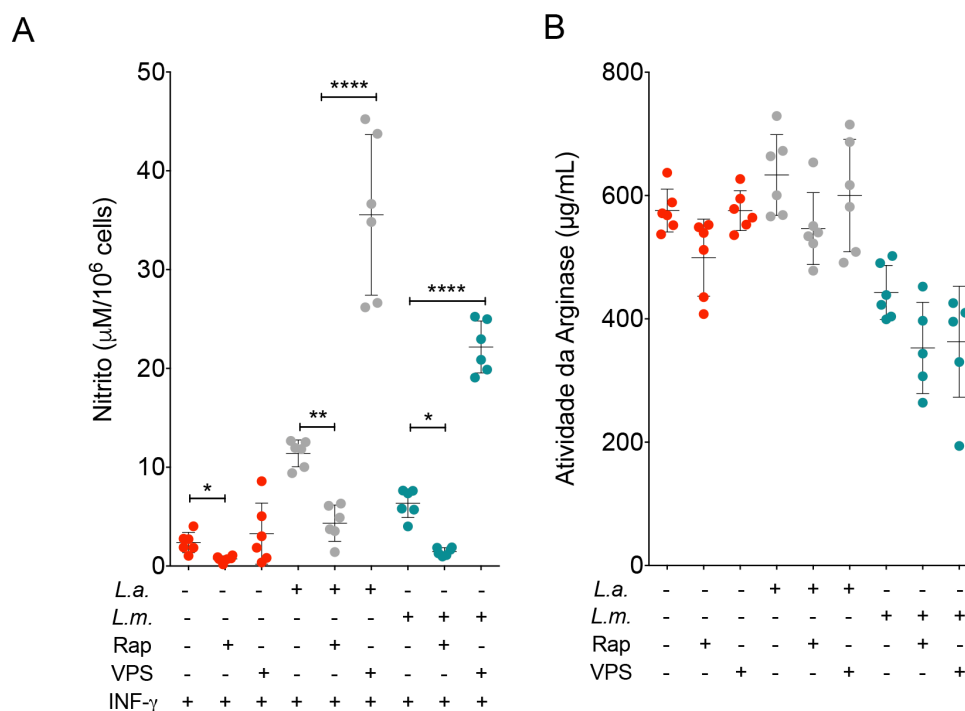


Figura 16 – Efeito da modulação da autofagia na produção de NO e atividade da arginase, em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* e incubados com VPS34-IN1 (1 μM) ou rapamicina (10 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Após 4 h, todos os grupos celulares foram reincubados em meio isento de modulador por mais 24 h. (A) A produção de NO de macrófagos foi medida pela detecção de nitrito em sobrenadantes de cultura. (B) A atividade da arginase foi determinada pelo ensaio de produção de uréia. Os círculos correspondem a cada réplica de um experimento representativo de dois realizados em sextuplicata \pm SD (One-way ANOVA, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). *L.a.*: *L. amazonensis*; *L.m.*: *L. major*; Rap: rapamicina; VPS: VPS34-IN1.

5.9 MARCADORES AUTOFÁGICOS DISCRIMINAM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *L. AMAZONENSIS* DAQUELES INFECTADOS POR *L. MAJOR*

Para verificar se os parâmetros acima avaliados: caracterização dos vacúolos parasitóforos quanto às características autofágicas e percentual de macrófagos infectados, carga parasitária e viabilidade intracelular dos parasitas poderiam discriminar a infecção por *L. amazonensis* e *L. major* realizamos análise de principal componente (Figura 17 A e B). Os parâmetros analisados permitiram a diferenciação de dois grandes grupos separando os macrófagos infectados por *L. amazonensis* daqueles infectados por *L. major* (Figura 17 A e B). Além disso, análises de mapa de calor revelaram que macrófagos infectados por *L. amazonensis* são agrupados em um *cluster* associado a maior percentual de vacúolos decorados com LC3, maior porcentagem de macrófagos infectados e maior viabilidade de parasitas intracelulares, enquanto que macrófagos infectados por *L. major* se agrupam em um *cluster* associado a maior porcentagem de vacúolos positivos para DQ-BSA e LysoTracker (Figura 17 B).

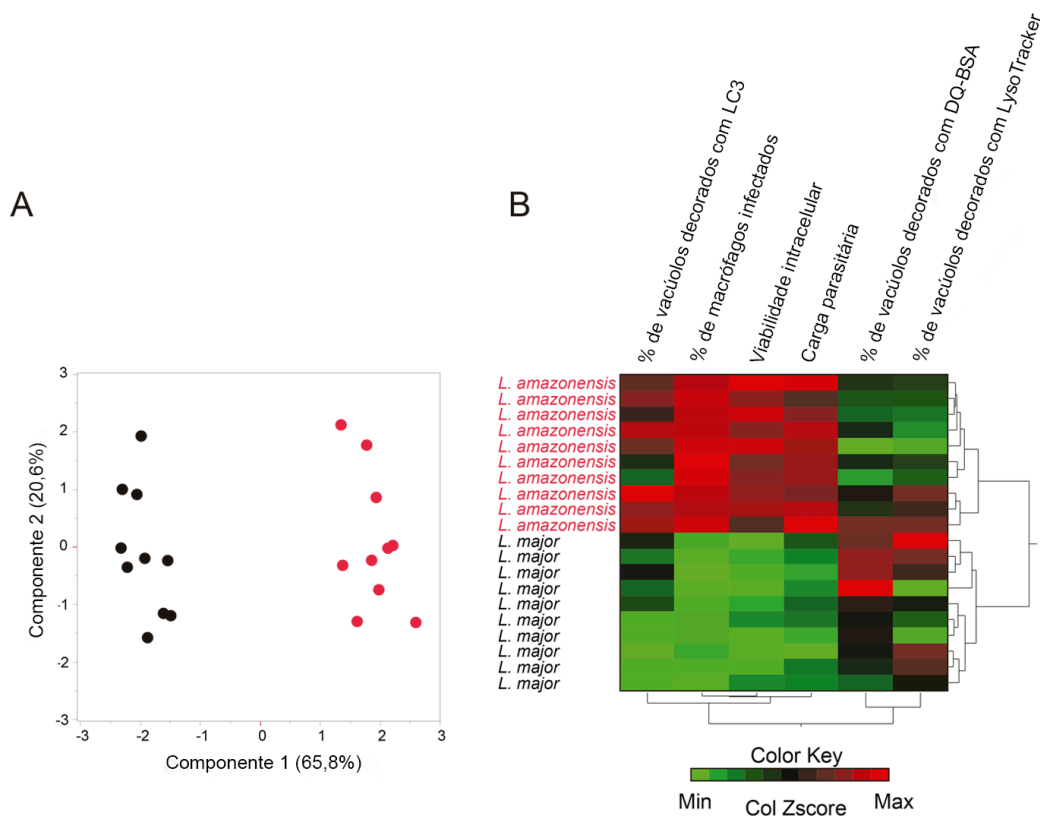


Figura 17 – Agrupamento de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* em clusters quanto às características autofágicas e parâmetros de infecção. A análise de agrupamento foi realizada utilizando as seguintes variáveis: porcentagem de macrófagos infectados, viabilidade intracelular, número de *Leishmania* por macrófagos infectados, porcentagem de vacúolos com *Leishmania* decorados com LC3 e porcentagem de vacúolos positivos para DQ BSA ou LysoTracker. (A) Análise de componentes principais. Os pontos pretos representam macrófagos infectados por *L. major* e os pontos vermelhos representam os macrófagos infectados por *L. amazonensis*. (B) Agrupamento hierárquico de clusters (método de Ward). Vermelho representa o máximo na escala de cor, verde representa o mínimo e os valores médios são mostrados em preto.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que apesar da infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* alterar diferentemente a expressão de genes relacionados à autofagia, tanto a infecção por *L. amazonensis* quanto por *L. major* induz a ativação do fluxo autofágico em macrófagos de CBA. Apesar dessas células infectadas ativarem similarmente da via autofágica medida pela relação LC3II/Act, os vacúolos parasitóforos induzidos por estas duas espécies de *Leishmania* apresentam características autolisossomais distintas. A infecção por *L. amazonensis* levou a um maior percentual de vacúolos parasitóforos decorados por LC3 endógeno, enquanto que, os compartimentos induzidos por *L. major* apresentaram maior positividade para o marcador degradativo DQ-BSA. Adicionalmente, apesar da modulação da autofagia não alterar o percentual de células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major* nem a carga parasitária, a indução exógena da autofagia aumentou a viabilidade intracelular dos parasitas.

Inicialmente demonstramos que a infecção por *L. amazonensis* leva a uma maior regulação positiva de vários genes relacionados à autofagia em comparação com macrófagos infectados com *L. major* (1) (Figura 18). Até o momento, nenhum estudo buscou comparar a expressão de genes relacionados à autofagia em células infectadas por diferentes espécies de *Leishmania*. Estudos anteriores relataram que a expressão de genes relacionados à autofagia tais como: beclina 1, Atg3 e Atg9 em células infectadas por *Leishmania* é regulada por um conjunto diferenciado de micro RNAs da célula hospedeira (miRNAs), incluindo miR-101c, mir-210-5p e miR-129-5p em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c infectados por *L. major* (FRANK *et al.*, 2015) e miR-30A-3p (SINGH *et al.*, 2016) em células de linhagem THP-1 infectadas por *L. donovani*. Para melhor avaliar o papel dos genes relacionados à autofagia diferentemente expressos na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* iremos i) validar os dados encontrados por PCR em tempo real ou por *western blot* e ii) determinar o efeito da modulação dos genes relacionados à autofagia previamente validados na infecção de macrófagos por essas duas espécies de *Leishmania*.

O presente trabalho também mostrou aumento similar na relação LC3-II/Act em macrófagos inflamatórios peritoneais de camundongos CBA infectados por *L. amazonensis* ou por *L. major* em comparação com as células controle não infectadas. Adicionalmente, demonstramos que os níveis aumentados de LC3-II estavam associados com a indução da autofagia *per se* e não devido ao bloqueio do fluxo autofágico, uma vez que foi observado um menor nível de LC3-II em células infectadas em comparação àquelas tratadas com cloroquina, inibidor do fluxo autofágico. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que relataram aumento da expressão de LC3 em células RAW, macrófagos de medula óssea BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. amazonensis* (CYRINO *et al.*, 2012) ou *L. major* (FRANCO *et al.*, 2017), e em macrófagos de medula óssea BALB/c infectados com *L. major* (FRANK *et al.*, 2015) em comparação com células não infectadas. Consistente com nosso resultado e os relatados por outros estudos *in vitro*, Mitroulis *et al.* (2009) observaram uma maior conversão de LC3-I para LC3-II em uma amostra de macrófagos de medula óssea de um paciente do sexo masculino com leishmaniose visceral infectado por *L. donovani* em comparação a uma amostra de medula óssea de um paciente saudável. Esses achados sugerem que, independente da espécie, a infecção por *Leishmania* provoca a ativação da via autofágica em células hospedeiras *in vitro* e *in vivo*. No entanto, diferenças na regulação e interação das células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major* com a via autofágica, incluindo o perfil distinto de expressão de genes relacionadas à autofagia e a interação dos vacúolos induzidos por estes parasitos com compartimentos autofágicos, agrupam os macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* em dois clusters completamente distintos (resultado PCA).

Diversos estudos demonstraram com sucesso que os vacúolos induzidos por microrganismos intracelulares podem ser marcados com DQ-BSA ou LysoTracker (GUTIERREZ *et al.*, 2004; AGUILERA *et al.*, 2009; LERENA E COLOMBO, 2011). Embora estes marcadores solúveis não sejam específicos da autofagia, seu uso em conjunto com o de outros marcadores de compartimentos autofágicos representam uma ferramenta adequada e confiável para monitorar a acidificação e a atividade degradativa em compartimentos como os autolisossomos (KLIONSKY *et al.*, 2007; MITOU *et al.*, 2009; VAZQUEZ E COLOMBO, 2009).

Nossa análise não demonstrou diferença significativa no percentual de vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com LysoTracker. A marcação dos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* com este corante lisossomal foi previamente demonstrada por Real e Mortara (2012). Embora estes autores não tenham quantificado o percentual de vacúolos induzidos por *Leishmania* marcados com LysoTracker, a comparação da intensidade desta sonda revelou que os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* apresentaram menor intensidade que aqueles induzidos por *L. amazonensis* (REAL E MORTARA, 2012), sugerindo que a acidez desses compartimentos é distinta. No presente estudo, foi observado uma maior positividade para DQ-BSA nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* comparados àqueles induzidos por *L. amazonensis* tanto em 4 quanto em 24 horas após a infecção. Anteriormente, Beron *et al.* (2002) e Aguilera *et al.* (2009) marcaram com sucesso os grandes vacúolos induzidos por *Coxiella burnetii* com DQ-BSA. Estes vacúolos apresentam semelhanças morfológicas com aqueles induzidos por *L. amazonensis* (ANTOINE *et al.*, 1990; MAURIN *et al.*, 1992; VERAS *et al.*, 1994; VERAS *et al.*, 1995). No entanto, diferente de *C. burnetii*, *L. amazonensis* talvez impeça a fusão com compartimentos degradativos em tempos tardios de infecção o que favoreceria sua sobrevivência e multiplicação no interior dos vacúolos parasitóforos.

O recrutamento de LC3 para os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* foi previamente demonstrado (CRAUWELS *et al.*, 2015; MATTE *et al.*, 2016). Crauwels *et al.* (2015) também relataram que os vacúolos parasitóforos induzidos por promastigotas apoptóticas de *L. major* ($92 \pm 0,7\%$) recrutam mais LC3 em comparação àqueles induzidos por *L. major* viáveis ($7 \pm 1\%$) após 3 h de infecção. Demonstramos que, após 30 min de infecção, o percentual de vacúolos parasitóforos positivos para LC3 é similar nas células infectadas por *L. amazonensis* ou *L. major*. No entanto, após 24 h, foi observado uma maior positividade de LC3 nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* do que naqueles induzidos por *L. major*. Curiosamente, não foi observada alteração na positividade de LC3 nos vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos tratados com os moduladores da autofagia, o inibidor, VPS34-IN1, ou a indutora, rapamicina, quando comparados com macrófagos controle não

tratados. Resultado semelhante foi descrito por Thomas *et al.* (2017), que não encontraram diferenças nos níveis de LC3 entre células de linhagem humana THP-1 infectadas por *L. donovani* e aquelas infectadas e tratadas com rapamicina. Esses autores hipotetizaram que o fato do tratamento com rapamicina não alterar o percentual de vacúolos induzidos por *L. donovani* positivos para LC3 poderia ser devido a uma inibição da ativação da autofagia clássica pela via PI3K-Akt-mTOR, e indução deste processo por meio de outra via independente de mTOR em células infectadas por esta espécie de *Leishmania*. Assim, é possível que em nosso modelo de macrófagos de camundongos CBA, esta mesma via independente de mTOR tenha sido usada para ativar a autofagia tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. major*. Alternativamente, é plausível sugerir que o tratamento com rapamicina resultou em uma ausência de aumento na porcentagem de vacúolos decorados com LC3 em macrófagos infectados por *Leishmania*, associada à marcação mais intensa de DQ-BSA também encontrada em vacúolos das espécies de *Leishmania* utilizadas nesse estudo, poderia ser resultado do acúmulo previamente descrito de enzimas hidrolíticas e, subsequentemente, aumento da clivagem de LC3-II na membrana interna desses compartimentos (KIRISAKO *et al.*, 2000; TANIDA *et al.*, 2004).

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de determinar se a autofagia favorece a sobrevivência de *Leishmania*, ou se ela funciona como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Vale ressaltar que análises de PCA e *heat map* realizadas no presente estudo, discriminaram completamente os macrófagos infectados por *L. major*, que foram agrupados em um *cluster* associado a maior positividade para marcadores de compartimentos degradativos: DQ-BSA e LysoTracker, enquanto que macrófagos infectados por *L. amazonensis* foram agrupados em um *cluster* associado a maior intensidade de infecção e positividade para LC3. De maneira inesperada, a inibição da via autofágica não exerceu efeito na infecção por *Leishmania* spp, enquanto que a indução exógena da autofagia favoreceu a viabilidade intracelular de ambos os parasitas, embora em maior extensão para *L. major* do que *L. amazonensis*. Em conjunto, esses achados sugerem que o desencadeamento do processo autofágico pela via PI3K-Akt-mTOR parece ser benéfico para a sobrevivência intracelular de *Leishmania* spp. Assim, a indução da autofagia após a infecção seria prejudicial ao

hospedeiro, uma vez que favorece a viabilidade intracelular de *Leishmania*. Consistentemente com nossos achados, Pinheiro *et al.* (2009) demonstraram que a indução da autofagia por privação de aminoácidos, após a infecção, levou a um aumento na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos de camundongo BALB/c e A/J, bem como em células de linhagem macrofágica J774. No entanto, em contraste com nossos achados, esses mesmos autores mostraram que a indução da autofagia não alterou a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos de camundongo C57BL/6 ou de *L. major* em macrófagos de camundongos BALB/c (PINHEIRO *et al.*, 2009). Além disso, também foi demonstrado que a inibição da via autofágica pré-infecção por meio do silenciamento de Atg5 em macrófagos de medula óssea resultou em um aumento da carga parasitária de *L. major* (FRANK *et al.*, 2015). No presente estudo, a autofagia foi modulada após a infecção, uma vez que demonstramos previamente que a indução da autofagia antes da infecção inibe a capacidade fagocítica de células de mamíferos de maneira não específica (LIMA *et al.*, 2011). É possível que a redução na expressão de Atg5 induzida por Frank *et al.* (2015) em macrófagos de medula óssea provocaram um aumento na infecção por *L. major* devido a um aumento na fagocitose destes parasitas, como descrito anteriormente para *M. tuberculosis* (BONILLA *et al.*, 2013). Nesse sentido, propomos que os resultados relatados por esses estudos anteriores, que procuraram avaliar os efeitos do silenciamento de genes relacionados à autofagia no contexto da infecção por *Leishmania*, servem para reforçar a noção de que inibir ou induzir a autofagia antes da infecção interfere profundamente na capacidade fagocítica de células, em vez de afetar a sobrevivência intracelular de patógenos.

Investigando como a indução exógena da autofagia favorece a viabilidade intracelular de *Leishmania*, demonstramos que a rapamicina diminui os níveis de NO, mas não altera significativamente a atividade da arginase. Consistente com nossos achados, Pinheiro *et al.* (2009) demonstraram anteriormente que a indução da autofagia por privação de nutrientes diminui a produção de NO por macrófagos infectados por *L. amazonensis* em associação com o aumento da viabilidade intracelular do parasita. Esse mecanismo parece ser universal, pois já foi demonstrado que a ativação da via autofágica reduz a produção de NO por

microglia (HAN *et al.*, 2013), por células de linhagem macrófaga RAW 264.7 (JIN *et al.*, 2009), e também por miocárdio isquêmico/reperfundido (MA *et al.*, 2018). Nós especulamos que, em nosso modelo, a rapamicina pode aumentar a viabilidade do parasita via redução da produção de NO, por meio de um dos dois mecanismos a seguir: diminuição da expressão do RNAm da óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês inducible nitric oxide synthase) (HAN *et al.*, 2013) ou indução da degradação proteasomal da iNOS (JIN *et al.*, 2009).

Em conjunto, os presentes achados indicam que, embora ambas as espécies de *Leishmania* avaliadas ativem a via autofágica de forma semelhante nos macrófagos de camundongos CBA (2) (Figura 18), os vacúolos parasitóforos resultantes apresentam características diferentes: maior recrutamento de LC3 é observado em vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* em comparação àqueles induzidos por *L. major* (4) (Figura 18), que apresentam características mais degradativas (3) (Figura 18). Apesar dessas diferenças, demonstramos que a indução autofágica favorece a sobrevivência intracelular tanto de *L. amazonensis* quanto de *L. major*, embora mais pronunciada em *L. major*, o que parece estar relacionado à diminuição da produção de NO (5) (Figura 18). Alternativamente, é possível que os autofagossomos possam fornecer metabólitos e aminoácidos aos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* e *L. amazonensis*, o que pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento intracelular da *Leishmania*. Um desses metabólitos pode ser o ferro, desde que armazenado dentro da ferritina, pode ser mobilizado e liberado através da autofagia (LINDER, 2013; NIU *et al.*, 2016) e então transportado para o citosol de *Leishmania* pelo LIT1 (HUYNH *et al.*, 2006).

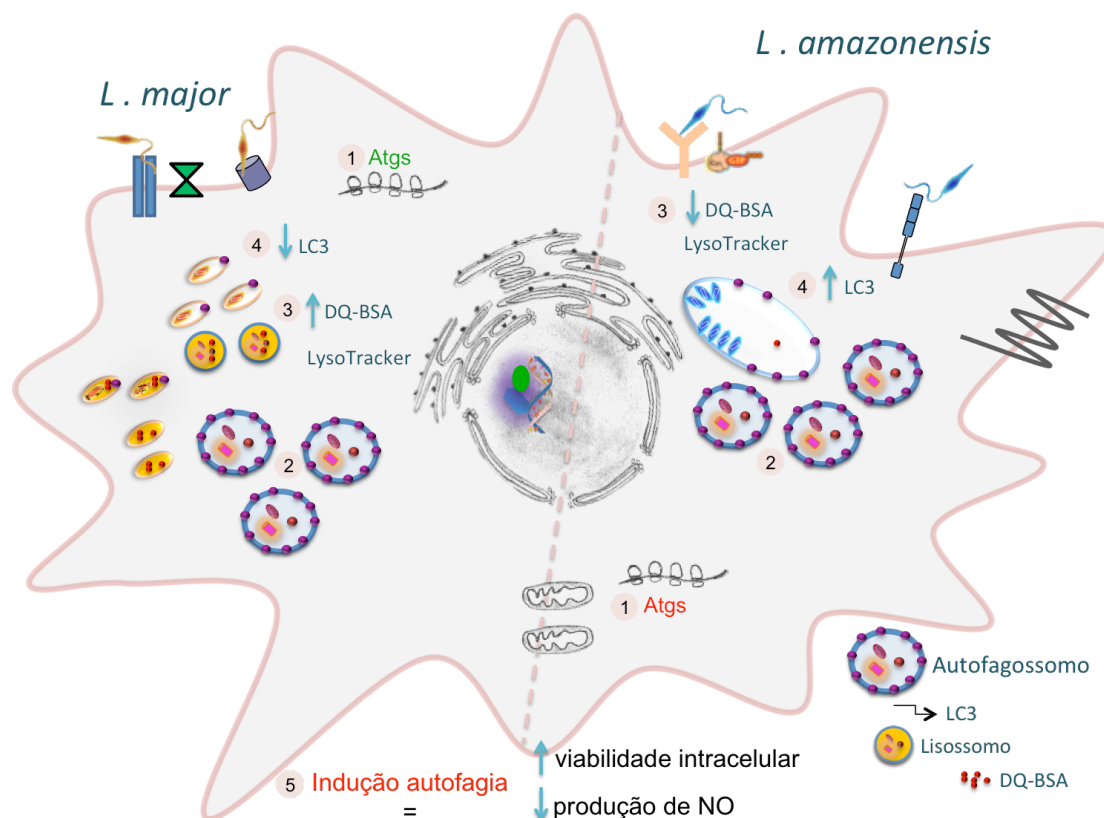


Figura 18 – Resumo esquemático dos resultados. Macrófagos de camundongo CBA infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* (1) apresentaram expressão diferenciada de genes relacionados à autofagia (Atg), (2) ativaram de maneira similar o fluxo autofágico em MΦs infectadas e (3 e 4) os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* e *L. major* apresentaram interação distinta com vacúolos autofágicos. (5) Além disso, a viabilidade intracelular de ambos os parasitas foi favorecida pela indução exógena da autofagia, o que parece estar relacionado à diminuição da produção de NO. Essas diferenças foram capazes de discriminar os macrófagos infectados por *L. amazonensis* das células infectadas por *L. major*.

7 CONCLUSÃO

A infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, apesar de ativar similarmente o fluxo autofágico em macrófagos infectados e os parasitos terem sua viabilidade favorecida pela indução da autofagia, promove expressão diferenciada de genes relacionados à autofagia e interação distinta dos vacúolos parasitóforos com compartimentos autofágicos. Essas diferenças são capazes de separar completamente os macrófagos infectados por *L. amazonensis* daqueles por *L. major*.

8 PRÓXIMAS ETAPAS

1. Validar os dados de modulação dos genes relacionados à autofagia em de macrófagos infectados ou não por *L. amazonensis* ou *L. major*
2. Avaliar o efeito da modulação de genes relacionados à autofagia na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* ou *L. major*

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- AGUILERA, M. et al. Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4609-4620, 2009.
- ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **The Journal of Protozoology**, v. 22, n. 4, p. 502-508, 1975.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE, Z. A. et al. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**, v. 114, n. 1, p. 137-148, 1984.
- ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779-787, 1990.
- ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ANTONIOU, T.; GOUGH, K. A. Early-onset pentamidine-associated second-degree heart block and sinus bradycardia: case report and review of the literature. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 6, p. 899-903, 2005.
- ARANGO DUQUE, G. et al. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 5, p. 2363-2372, 2014.
- ARAUJO-SANTOS, T. et al. Anti-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4334, 2017.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

ASSAN, R. et al. Pentamidine-induced derangements of glucose homeostasis. Determinant roles of renal failure and drug accumulation. A study of 128 patients. **Diabetes Care**, v. 18, n. 1, p. 47-55, 1995.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AXE, E. L. et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. **The Journal of Cell Biology**, v. 182, n. 4, p. 685-701, 2008.

BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 505-510, 2005.

BAGO, R. et al. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. **Biochemical Journal**, v. 463, n. 3, p. 413-427, 2014.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BEJARANO, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, n. 1, p. 29-39, Feb 2010.

BERGAMINI, E. Autophagy: a cell repair mechanism that retards ageing and age-associated diseases and can be intensified pharmacologically. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 403-140, 2006.

BERON, W. et al. *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5816-5821, 2002.

BEVERLEY, S. M.; TURCO, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 35-40, 1998.

BIYANI, N.; MADHUBALA, R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* isolates identifies novel proteins having a role in Leishmania differentiation and intracellular survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 12, p. 1342-1350, 2012.

BLACKWELL, J. M. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding Leishmania parasites to host macrophages. **Immunology Letters**, v. 11, n. 3-4, p. 227-232, 1985.

BONILLA, D. L. et al. Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 537-547, 19 2013.

CHANG, C. S.; CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of *leishmania*-macrophage binding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 100-104, 1986.

CHANG, H. K. et al. Oxidant generation by single infected monocytes after short-term fluorescence labeling of a protozoan parasite. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 2, p. 1017-1024, 2007.

CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania donovani*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 147, n. 2, p. 515-530, 1978.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Review Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHAUDHURI, G. et al. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 13, p. 7483-7489, 1989.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt 11, p. 2303-2316, 2002.

CRAUWELS, P. et al. Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. **Autophagy**, v. 11, n. 2, p. 285-297, 2015.

CUERVO, A. M. Autophagy: many paths to the same end. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 263, n. 1-2, p. 55-72, 2004.

CYRINO, L. T. et al. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. **Tissue & Cell**, v. 44, n. 6, p. 401-408, 2012.

DE DUVE, C.; WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. **Annual Review of Physiology**, v. 28, p. 435-492, 1966.

DE SOUZA LEO, S. et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, Pt 10, p. 3219-3231, 1995.

DEGENHARDT, K. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2006.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

DESCOTEAUX, A. et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 8, p. 2747-2753, 1991.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DICE, J. F. Chaperone-mediated autophagy. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 295-299, 2007.

DILLON, L. A. et al. Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. **BMC Genomics**, v. 16, p. 1108, 2015.

DUCLOS, S.; DESJARDINS, M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 365-377, 2000.

DUNN, W. A., JR. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 6, p. 1923-1933, 1990a.

DUNN, W. A., JR. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. **The Journal of Cell Biology**, v. 110, n. 6, p. 1935-1945, 1990b.

DUSZENKO, M. et al. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, n. 2, p. 127-158, 2011.

EL FAKHRY, Y.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. **Proteomics**, v. 2, n. 8, p. 1007-1017, 2002.

FERNANDES, M. C. et al. Dual Transcriptome Profiling of *Leishmania*-Infected Human Macrophages Reveals Distinct Reprogramming Signatures. **MBio**, v. 7, n. 3, 10 2016.

FIORINI, M.; MESSINA, M. F.; BARRACCHIA, A. Peripheral intramonocytic and intraneutrophil leishmanias observed in a chronic myelomonocytic leukemia (CMMoL) patient. **Haematologica**, v. 87, n. 8, p. EIM21, 2002.

FRANCO, L. H. et al. Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 32, p. 13087-13096, 11 2017.

FRANK, B. et al. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 404, 31 2015.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 439-454, 2006.

GOMES, I. N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 4, p. 251-260, 2003.

GOMES, L. C.; DIKIC, I. Autophagy in antimicrobial immunity. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 224-233, 2014.

GOUGH, P. J.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 3, p. 305-311, 2000.

GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753-766, 2004.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 981-993, 2005.

HAILEY, D. W. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-667, 2010.

HAN, H. E. et al. Activation of Autophagy Pathway Suppresses the Expression of iNOS, IL6 and Cell Death of LPS-Stimulated Microglia Cells. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 21-28, 2013.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HANDMAN, E. et al. Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 137, n. 11, p. 3608-3013, 1986.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 67-93, 2009.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HEMELAAR, J. et al. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 51841-51850, 2003.

HIRSIMAKI, P.; REUNANEN, H. Studies on vinblastine-induced autophagocytosis in mouse liver. II. Origin of membranes and acquisition of acid phosphatase. **Histochemistry**, v. 67, n. 2, p. 139-153, 1980.

HOWARD, J. G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tropica* in mice. **Parasite Immunology**, v. 2, n. 4, p. 303-314, 1980.

HUMINIECKI, L.; LLOYD, A. T.; WOLFE, K. H. Congruence of tissue expression profiles from Gene Expression Atlas, SAGEmap and TissueInfo databases. **BMC Genomics**, v. 4, n. 1, p. 31, 2003.

HUYNH, C.; SACKS, D. L.; ANDREWS, N. W. A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2363-2375, 02 2006.

ILG, T.; DEMAR, M.; HARBECKE, D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 7, p. 4988-4997, 2001.

JIN, H. K. et al. Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 6, p. 988-992, 2009.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 21, p. 5720-5728, 2000.

KABEYA, Y. et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2805-2812, 2004.

KIRISAKO, T. et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 2, p. 2632-76, 2000.

KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 1, p. 7-18, 2005.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1-222, 2016.

KLIONSKY, D. J.; CUERVO, A. M.; SEGLEN, P. O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. **Autophagy**, v. 3, n. 3, p. 181-206, 2007.

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1717-1721, 2000.

KOPITZ, J. et al. Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 3, p. 941-953, 1990.

KUO, W. P. et al. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. **Bioinformatics**, v. 18, n. 3, p. 405-412, 2002.

LANG, T. et al. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. **Journal of Cell Science**, v. 107, Pt 8, p. 2137-2150, 1994.

LEMOS DE SOUZA, V. et al. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, 2000.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007.

LERENA, M. C.; COLOMBO, M. I. *Mycobacterium marinum* induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. **Cell Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 814-835, 2011.

LEVINE, B.; DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 7, n. 10, p. 767-777, 2007.

LIMA, J. G. et al. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 4, p. 604-609, 25 2011.

LIOTTA, L. A.; PETRICOIN, E. F. Beyond the genome to tissue proteomics. **Breast Cancer Research**, v. 2, n. 1, p. 13-14, 2000.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunology Today**, v. 12, n. 3, p. A58-61, 1991.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, n. 3, p. 759-766, 1993.

MA, L. L. et al. Mammalian target of rapamycin inhibition attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury in hypertrophic heart. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1708-1719, 2018.

MARINO, G.; LOPEZ-OTIN, C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 12, p. 1439-1454, 2004.

MARINO, G. et al. Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3671-3678, 2003.

MATHEOUD, D. et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 1, p. 15-25, 2013.

MATTE, C. et al. *Leishmania* major Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005690, 2016.

MAURIN, M. et al. Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 12, p. 5013-5016, 1992.

MCNEELY, T. B.; TURCO, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2745-2750, 1990.

MEIJER, A. J.; CODOGNO, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2445-2462, 2004.

MENEZES, J. P. et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes Infection**, v. 15, n. 8-9, p. 579-591, 2013.

MESTRE, M. B. et al. Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 110-125, 2010.

MIKLOS, G. L.; MALESZKA, R. Microarray reality checks in the context of a complex disease. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 615-621, 2004.

MILLS, J. C. et al. DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. E175-178, 2001.

MITOU, G.; BUDAK, H.; GOZUACIK, D. Techniques to study autophagy in plants. **International Journal of Plant Genomics**, v. 2009, p. 451357, 2009.

MITROULIS, I. et al. In vivo induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. **Parasitology International**, v. 58, n. 4, p. 475-477, 2009.

MIZUSHIMA, N. et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. Pt 9, p. 1679-1688, 2003.

MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-1075, 2008.

MIZUSHIMA, N. et al. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 51, p. 33889-33892, 1998.

MOLL, H. et al. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 7, p. 1595-1601, 1993.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785-2789, 1985.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 315-322, 1993.

NAKAGAWA, I. et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1037-1040, 2004.

NAZARKO, V. Y. et al. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. **Autophagy**, v. 7, n. 4, p. 375-385, 2011.

NDJAMEN, B. et al. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480-1494, 2010.

OSORIO Y FORTEA, J. et al. Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes. **BMC Genomics**, v. 10, p. 119, 2009.

PEREZ, H.; LABRADOR, F.; TORREALBA, J. W. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. **International Journal for Parasitology**, v. 9, n. 1, p. 27-32, 1979.

PERINOTO, A. C. et al. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9763-9768, 2010.

PINHEIRO, R. O. et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 2, p. 181-190, 2009.

PRINA, E. et al. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1730-1737, 1990.

RABHI, I. et al. Comparative analysis of resistant and susceptible macrophage gene expression response to *Leishmania major* parasite. **BMC Genomics**, v. 14, p. 723, 2013.

RABHI, I. et al. Transcriptomic signature of *Leishmania* infected mice macrophages: a metabolic point of view. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1763, 2012.

RABINOVITCH, M. et al. Receptor-mediated entry of peroxidases into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania Mexicana amazonensis*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 37, n. 3, p. 247-261, 1985.

RABINOVITCH, M.; VERAS, P. S. Cohabitation of *Leishmania amazonensis* and *Coxiella burnetii*. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 158-161, 1996.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p. e1518, 2012.

RHODES, D. R. et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 25, p. 9309-9314, 2004.

ROMANO, P. S. et al. The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 891-909, 2007.

RUSSELL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2613-2620, 1986.

RUSSELL, D. G.; XU, S.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 103, Pt 4, p. 1193-1210, 1992.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

_____. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infectious Agents and Disease**, v. 1, n. 4, p. 200-206, 1992.

SANTOS, D. O. et al. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 596-603, 2005.

SCHAIBLE, U. E. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. **Journal of Cell Science**, v. 112, Pt 5, p. 681-693, 1999.

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

SCHNAITH, A. et al. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2695-2706, 2007.

SHEPHERD, V. L. et al. Receptor-mediated entry of beta-glucuronidase into the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 157, n. 5, p. 1471-1482, 1983.

SINGH, A. K. et al. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. **Autophagy**, v. 12, n. 10, p. 1817-1831, 2016.

SINGH, A. K. et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853-1568, 2015.

SOLCA, M. S. et al. Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32619, 6 2016.

SOUSA-FRANCO, J. et al. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 2, p. 390-400, 2006.

SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 97-103, 2001.

SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

STRAUS, A. H. et al. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. Immunogenicity and role in parasite binding and invasion of macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 18, p. 13723-13730, 1993.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health** v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001.

SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104-1107, 2000.

SUZUKI, K. et al. Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 39, p. 30019-30025, 2010.

SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 11, p. 2156-2161, 2007.

TAN, P. K. et al. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 19, p. 5676-5684, 2003.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2503-2518, 2004.

THOMAS, S. A. et al. Countervailing, time-dependent effects on host autophagy promotes intracellular survival of *leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, 21 2017.

VAZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. **Methods in Enzymology**, v. 452, p. 85-95, 2009.

VERAS, P. S.; BEZERRA DE MENEZES, J. P. Using Proteomics to Understand How *Leishmania* Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.

VERAS, P. S. et al. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells. **Journal of Cell Science**, v. 107, Pt 11, p. 3065-3076, 1994.

VERAS, P. S.; DE CHASTELLIER, C.; RABINOVITCH, M. Transfer of zymosan (yeast cell walls) to the parasitophorous vacuoles of macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 3, p. 639-646, 1992.

VERAS, P. S. et al. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3502-3506, 1995.

VINET, A. F. et al. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000628, 2009.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WORLD HEALTH, O. Control of the leishmaniases. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 949, p. xii-xiii, 1-186, back cover, 2010.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Permeases recycle amino acids resulting from autophagy. **Autophagy**, v. 3, n. 2, p. 149-150, 2007.

YU, W. H. et al. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 1, p. 87-98, 2005.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994.

APÊNDICE



Autophagic Induction Greatly Enhances *Leishmania major* Intracellular Survival Compared to *Leishmania amazonensis* in CBA/j-Infected Macrophages

Beatriz R. S. Dias¹, Carina S. de Souza¹, Niara de Jesus Almeida¹, José G. B. Lima¹, Kiyoshi F. Fukutani², Thiale B. S. dos Santos², Jaqueline França-Cost^{2,3}, Claudia I. Brodskyn¹, Juliana P. B. de Menezes¹, Maria I. Colombo⁴ and Patricia S. T. Veras^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Celio Geraldo Freire-de-Lima,
Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Mario Alberto Flores-Valdez,
Centro de Investigación y Asistencia
en Tecnología y Diseño del Estado
de Jalisco (CIATEJ - CONACYT),
Mexico
Roberta Olmo Pinheiro,
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz),
Brazil

*Correspondence:

Patricia S. T. Veras
patricia.veras@fiocruz.br;
pstveras@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 25 March 2018

Accepted: 27 July 2018

Published: 15 August 2018

Citation:

Dias BRS, de Souza CS, Almeida NJ,
Lima JGB, Fukutani KF,
dos Santos TBS, França-Cost J,
Brodskyn CI, de Menezes JPB,
Colombo MI and Veras PST (2018)
Autophagic Induction Greatly
Enhances *Leishmania major*
Intracellular Survival Compared
to *Leishmania amazonensis*
in CBA/j-Infected Macrophages.
Front. Microbiol. 9:1890.
doi: 10.3389/fmicb.2018.01890

¹ Laboratory of Parasite-Host Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ² Laboratory of Inflammation and Biomarkers, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, Brazil, ³ Department of Biointeraction, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, ⁴ Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Institute of Histology and Embryology-CONICET, National University of Cuyo, Mendoza, Argentina

CBA mouse macrophages control *Leishmania major* infection yet are permissive to *Leishmania amazonensis*. Few studies have been conducted to assess the role played by autophagy in *Leishmania* infection. Therefore, we assessed whether the autophagic response of infected macrophages may account for the differential behavior of these two parasite strains. After 24 h of infection, the LC3-II/Act ratio increased in both *L. amazonensis*- and *L. major*-infected macrophages compared to uninfected controls, but less than in chloroquine-treated cells. This suggests that *L. amazonensis* and *L. major* activate autophagy in infected macrophages, without altering the autophagic flux. Furthermore, *L. major*-infected cells exhibited higher percentages of DQ-BSA-labeled parasitophorous vacuoles (50%) than those infected by *L. amazonensis* (25%). However, *L. major*- and *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles accumulated LysoTracker similarly, indicating that the acidity in both compartment was equivalent. At as early as 30 min, endogenous LC3 was recruited to both *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles, while after 24 h a greater percentage of LC3 positive vacuoles was observed in *L. amazonensis*-infected cells (42.36%) compared to those infected by *L. major* (18.10%). Noteworthy, principal component analysis (PCA) and an hierarchical cluster analysis completely discriminated *L. major*-infected macrophages from *L. amazonensis*-infected cells accordingly to infection intensity and autophagic features of parasite-induced vacuoles. Then, we evaluated whether the modulation of autophagy exerted an influence on parasite infection in macrophages. No significant changes were observed in both infection rate or parasite load in macrophages treated with the autophagic inhibitors wortmannin, chloroquine or VPS34-IN1, as well as with the autophagic inducers rapamycin or physiological starvation, in comparison to untreated control cells. Interestingly, both autophagic inducers enhanced intracellular *L. amazonensis* and *L. major* viability, while

the pharmacological inhibition of autophagy exerted no effects on intracellular parasite viability. We also demonstrated that autophagy induction reduced NO production by *L. amazonensis*- and *L. major*-infected macrophages but not alters arginase activity. These findings provide evidence that although *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles recruit LC3 more markedly, *L. amazonensis* and *L. major* similarly activate the autophagic pathway in CBA macrophages. Interestingly, the exogenous induction of autophagy favors *L. major* intracellular viability to a greater extent than *L. amazonensis* related to a reduction in the levels of NO.

Keywords: *Leishmania*, macrophages, autophagy, LC3, parasitophorous vacuole

INTRODUCTION

Leishmaniasis, a disease caused by trypanosomatids of the genus *Leishmania*, represents an emerging disease that continues to present a major public health problem, especially due to elevated incidence in developing countries (Santos et al., 2008; Perinoto et al., 2010). According to the World Health Organization, around 15 million people are affected worldwide in 98 countries, including 72 developing nations (World Health Organization, 2010; Alvar et al., 2012). *Leishmania* spp. are obligate intracellular parasites that live and multiply within modified phagolysosome compartments, denominated parasitophorous vacuoles, in macrophages, the main host cell in vertebrate hosts (Russell and Wilhelm, 1986).

Since the early 2000s, many fields of study have focused research efforts on the physiological process of autophagy. This evolutionarily conserved process is responsible for the degradation of organelles and proteins during cell differentiation and under stress conditions (Meijer and Codogno, 2004; Levine and Deretic, 2007; Duszenko et al., 2011). During the autophagic degradative process, cytosolic components become trapped into compartments called autophagosomes, which subsequently fuse with lysosomes to form autolysosomes in consecutively coordinated steps: initiation, nucleation, expansion, completion, docking and fusion, thereby resulting in intravacuolar cargo degradation. These events are dependent on the family of autophagy related genes (Atg) and proteins that play specific roles during each stage of the autophagic process (Suzuki and Ohsumi, 2007; Suzuki et al., 2010; Nazarko et al., 2011). The initiation step results in phagophore formation, which is mostly dependent on the assembling of the Beclin 1-Vps34 class III PI(3)K complex in autophagosomal membranes of differing origin (Levine and Deretic, 2007). Two conjugation systems can be subsequently recruited to support the expansion of the phagophore: the Atg12-Atg5-Atg16 complex, or the Atg8 protein conjugated to phosphoethanolamine (PE), which is referred as LC3-II in mammals. This protein, central in the autophagic process, is generated by site-specific proteolysis and lipidation occurring near the C-terminus of the cytosolic protein Atg8 (LC3-I) (Lang et al., 1998). As LC3-II is integrated into the membranes of newly formed autophagosomes, levels of LC3-II correlate positively with numbers of cellular autophagosomes (Kabeya et al., 2000). Thus, LC3-II has been employed as a useful marker for studies investigating the dynamics of autophagic pathway activation.

In recent decades, the role played by autophagy in mammalian cells during infection arising from a variety of pathogens has been extensively investigated (Gutierrez et al., 2004; Levine and Deretic, 2007; Schnaith et al., 2007; Mestre et al., 2010). Several studies have implicated autophagic pathway activation in the triggering of an innate immune response, which results in the protection of host cells against infections arising from intracellular microorganisms, such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Streptococcus pyogenes* (Gutierrez et al., 2004; Nakagawa et al., 2004; Gutierrez et al., 2005; Levine and Deretic, 2007). On the other hand, autophagic pathway activation can also favor the survival of some species of intracellular pathogens, such as *Staphylococcus aureus* and *Coxiella burnetii* (Gutierrez et al., 2005; Schnaith et al., 2007; Mestre et al., 2010).

To date, few studies have attempted to assess the role of autophagy in infection by parasites of the *Leishmania* genus. A seminal work by Schaible and colleagues demonstrated that large *L. mexicana*-induced parasitophorous vacuoles acquired macromolecules from the host cell cytoplasm via microautophagy (Schaible et al., 1999). These authors suggested that these macromolecules, once transferred from the host cell cytoplasm to the lumen of *L. mexicana*-induced parasitophorous vacuoles, seemed to be endocytosed by parasites (Russell et al., 1992). More recently, it has been demonstrated that both *L. amazonensis* and *L. major* infection induces autophagic pathway activation in susceptible BALB/c mouse macrophages (Cyrino et al., 2012; Frank et al., 2015). Investigations in the literature regarding the role played by autophagy in *Leishmania* infection have led to controversial data. Pinheiro et al. (2009) showed that in macrophages from susceptible BALB/c mice, but not in macrophages of *L. amazonensis*-resistant C57BL/6 mice, the autophagic induction resulted in increased intracellular load of *L. amazonensis* (Pinheiro et al., 2009). Also, these authors demonstrated that autophagy induced by starvation did not alter intracellular *L. major* parasitic load in susceptible BALB/c mouse macrophages (Pinheiro et al., 2009). Studies employing the genetic modification of autophagic-related genes have also presented inconclusive results. Thomas et al. (2017) demonstrated that Atg5 and Atg9 knockdown in the human monocytic cell-line, THP-1, reduced *L. donovani* survival, suggesting that autophagy is beneficial to *Leishmania* infection. This stands in contrast to BALB/c macrophages knocked-down for Atg5, which served to enhance *L. major* parasitic load (Frank et al., 2015). Consistent with these authors'

findings, another study recently showed that Atg5 knockdown in the *L. major*-resistant C57BL/6 macrophages resulted in increased parasite replication (Franco et al., 2017), which suggests that the activation of an Atg5-dependent autophagic process could result in the elimination of *L. major* intracellular parasites.

The CBA mouse model has demonstrated susceptibility to *L. amazonensis*, while controlling *L. major* infection *in vivo* (Lemos de Souza et al., 2000). Moreover, while CBA mouse macrophages were shown to be permissive to *L. amazonensis in vitro*, these same cells also reduced *L. major* infection (Gomes et al., 2003). Therefore, we addressed whether the autophagic response of infected macrophages may account for the differential behavior of these two parasite strains in CBA macrophages. Accordingly, the present study took advantage of the *in vitro* CBA infection model to comparatively characterize *L. major* and *L. amazonensis*-induced compartments with respect to autophagic features, in addition to investigating the effects of autophagic modulation on *Leishmania* infection outcome using a pharmacological approach.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

The CBA mice used in the present study were provided by the animal care facility at the Gonçalo Moniz Institute - FIOCRUZ/BA, following approval by the Institutional Animal Experimentation Review Board (CEUA) under protocol number 015/2014. Animals were kept and handled in accordance with the norms recommended by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals; all experimental protocols complied with these guidelines, as well as all resolutions established by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

All protocols, analytic methods and material used in the present study are available upon request to all interested researchers.

Macrophage Culture

To obtain inflammatory peritoneal macrophages, 2.5 mL of 3% thioglycolate (Sigma, St. Louis, MO, United States) was injected into the peritoneal cavities of CBA mice, as previously described by Gomes et al. (2003). After 96 h, mice were euthanized, and peritoneal cavities were washed twice using 10 mL of 0.9% NaCl with heparin (20 U.I./mL) (Cristália, Itapira, SP, BR). Next, macrophages were centrifuged at $300 \times g$ under 4°C for 10 min and plated in complete DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco, Grand Island, NY, United States) supplemented with 25 mM HEPES (N-2-hydroxyethyl piperazine-*N'*-2-ethane-sulfonic acid) (Sigma, St. Louis, MO, United States) adjusted to pH 7.4, 2 mM glutamin (Gibco, Grand Island, NY, United States), 20 g/mL ciprofloxacin (Isufarma, Precabura, CE, BR) and 10% inactivated fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, United States), then incubated overnight at 37°C under 5% CO_2 and 95% humidity.

Leishmania Culturing

Axenic cultures of *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) or *L. major* (MHOM/RI/-/WR-173) promastigotes were maintained for up to six successive passages in Schneider's Insect Medium (Sigma, St. Louis, MO, United States) supplemented with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin (Gibco, Grand Island, NY, United States) and 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, United States), following a slightly modified previously described protocol (Gomes et al., 2003). Promastigotes were grown in an incubator at 24°C and monitored daily by counting in a Neubauer chamber. Upon reaching the stationary phase, the promastigotes were subjected to separation of infective metacyclic forms using a Ficoll-Paque gradient as described by Spath and Beverley (2001).

Labeling of *L. amazonensis* and *L. major* Promastigotes With Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)

For some experiments, *L. amazonensis* and *L. major* were labeled with CFSE (21888) (Sigma, St. Louis, MO, United States) as described by Chang et al. (2007). Parasites (10^8) were suspended in 2 mL of 0.9% NaCl solution containing 1 μM CFSE for 10 min at 37°C , protected from light. To stop the reaction, a similar volume (2 mL) of fetal bovine serum was added to each parasite suspension. After 1 min of incubation, parasite suspensions were washed twice with 0.9% NaCl solution and centrifuged at $1,800 \times g$ for 10 min under 4°C . After counting with a Neubauer chamber, parasites were used at the experimental concentrations described below.

Macrophage Infection With *L. amazonensis* or *L. major*

CBA mouse macrophages were plated in either 6-well plates ($2 \times 10^6/2$ mL) or 24-well plates ($2 \times 10^5/\text{mL}$) containing coverslips for 24 h at 37°C , and then infected with metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* or *L. major* at a 5:1 (parasite:macrophage) ratio in accordance with one of the following protocols:

- (i) macrophages were either infected for 30 min, or infected for 4 h followed by a 24 h-incubation period to evaluate autophagic activation and flux, as described below in **Evaluation of autophagic induction and flux in macrophages infected by *L. amazonensis* or *L. major***;
- (ii) macrophages were either infected for 30 min or 4 h to characterize the autophagic features within *Leishmania* parasitophorous vacuoles at early stages of infection. All macrophages were then washed and fixed. Alternatively, to compare *L. amazonensis* and *L. major* parasitophorous vacuole characteristics at later stages of infection, another group of macrophages was infected for 4 h and then washed with saline to remove any non-internalized promastigotes. After an additional 24 h-incubation period, these macrophages were then washed and fixed. Autophagic features were then evaluated at both early and late stages of infection as described below in

Evaluation of hydrolytic activity in *L. amazonensis*- or *L. major*-induced parasitophorous vacuoles; LysoTracker labeling of *L. amazonensis* or *L. major* parasitophorous vacuoles and Evaluation of the recruitment of LC3-II to *L. amazonensis* or *L. major* parasitophorous vacuoles;

- (iii) macrophages were first infected for 30 min, treated with different autophagic modulators for an additional 4 h, then washed and reincubated in modulator-free medium as described below in **Modulation of the autophagic process in *L. amazonensis* or *L. major* infection**. Following each infection protocol, all plates were washed to remove non-internalized parasites. Finally, all plates containing cells infected with *L. amazonensis* were reincubated at 35°C, while those infected with *L. major* were incubated at 37°C, both supplemented with 5% CO₂ and 95% humidity.

Evaluation of Autophagic Induction and Flux in Macrophages Infected by *L. amazonensis* or *L. major*

For these experiments, western blotting was used to measure the ratio between the amount of membrane bound LC3-II and actin (Act) in extracts of CBA mouse macrophages. Cells were plated and infected in accordance with the protocol (i) described above in **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***. To evaluate autophagic flux, either uninfected or cells infected with *L. amazonensis* or *L. major* were treated with chloroquine (10 µM), a drug that blocks the fusion of autophagosomes with lysosomes (Klionsky et al., 2016), for an additional 4 h. Upon the completion of infection or treatment protocols, cells were scraped, recovered and centrifuged at 720 × g for 10 min under 4°C. Cells were then resuspended in RIPA buffer [1 M Tris HCl pH 8, 1 M NaCl, Substitute Nonidet P40 (Sigma, St Louis, MO, United States), 10% Sodium Dodecyl Sulfate (Riedel-de-Haen, Seelge, GER), 5% DOC, Mili-Q Water and Protease Inhibitor (Roche)] and incubated for 30 min at 4°C. Next, cellular extracts were sonicated 3x for 10 s at 127V in a Branson Sonifier apparatus. Samples were then centrifuged at 13,000 × g under 4°C for 20 min and quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

Initially, 60 µg of protein from each extract was subjected to electrophoresis in a Bio-Rad Mini-Protean Tetra System. After 1 h 30 min of gel running, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a Bio-RAD Trans-blot Turbo apparatus for a period of 30 min at 25 V, 1A. The membrane was then blocked with 5% skim milk in PBST (1x PBS + 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with anti-LC3 antibody (NB600-1384, Novus Biologicals, Littleton, CO, United States) or anti-actin (Sigma) diluted in PBST + 3% milk solution. Each membrane was subsequently incubated with HRP-coupled anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG secondary antibodies. Blots were then developed with an ECL Chemiluminescence Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, United States) and detected using a Luminescent Image Analyzer and Image Quant Las 4000 software. Densitometry quantification of the bands was performed using Image J software.

Evaluation of Hydrolytic Activity in *L. amazonensis*- or *L. major*-Induced Parasitophorous Vacuoles

Hydrolytic activity in the parasitophorous vacuoles within macrophages infected by *L. amazonensis* or *L. major* was evaluated using a degradative compartment marker, DQ-BSA (DQ™ Red BSA; Molecular Probes, Eugene, OR, United States), as described by Lerena and Colombo (2011). CBA mouse macrophages were plated and, after 24 h, cells were washed and incubated with 10 µg/mL of DQ-BSA for 4 h at 37°C. Next, cells were rewashed and infected with metacyclic promastigotes of *L. amazonensis* or *L. major* labeled with CFSE (λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 517 nm) at a ratio of 5:1 (parasite:macrophage) in accordance with the infection protocol (ii) described above in **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***. Following infection, cells infected for 4 h or more were incubated with 10 µg/mL rapamycin or 1 µM VPS34-IN1 (Bago et al., 2014), a specific PI3K class III inhibitor, for 2 h to evaluate the effect of autophagy modulation on DQ-BSA-labeled *Leishmania* parasitophorous vacuoles. Finally, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and coverslips were mounted using a ProLong Gold Antifade kit containing DAPI (Life Technologies). Images were acquired via a Leica SP8 (Leica) confocal fluorescence microscope using a 63x/1.4 objective.

LysoTracker Labeling of *L. amazonensis* or *L. major* Parasitophorous Vacuoles

LysoTracker® Red DND-99 (Molecular Probes, Eugene, OR, United States), a weakly basic amine that selectively accumulates in cellular compartments with low internal pH, was used to characterize the parasitophorous vacuoles induced by *L. amazonensis* or *L. major* with respect to the acidity present in autophagosome compartments. Cells were labeled in accordance with a protocol previously described by Aguilera et al. (2009). CBA mouse macrophages were plated and infected as described above in the protocol (ii) of **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***. After 24 h of infection, macrophages were incubated with 100 nM of LysoTracker® for 2 h. Cells were then fixed and coverslips were mounted as described in **Evaluation of hydrolytic activity in *L. amazonensis*- or *L. major*-induced parasitophorous vacuoles**. Images were acquired as described above.

Evaluation of the Recruitment of LC3 to *L. amazonensis* or *L. major* Parasitophorous Vacuoles

Macrophages were infected as described above in the protocol (ii) of **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***. After infection procedures, labeling for the autophagic membrane marker LC3 was performed in accordance with the protocol described by Matte et al. (2016) using antibodies against LC3B (1:200) (NB600-1384, Novus Biologicals, Littleton, CO, United States), followed by AlexaFluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) (ThermoScientific). Following infection, cells infected for 4 h or more were incubated with 10 µg/mL

rapamycin or 1 μM VPS34-IN1 for 2 h to evaluate the effect of autophagy modulation on LC3-labeled *Leishmania* parasitophorous vacuoles. Cells were then fixed and mounted on coverslips as described above in **Evaluation of hydrolytic activity in *L. amazonensis*- or *L. major*-induced parasitophorous vacuoles**. Images were acquired as described above.

Modulation of the Autophagic Process in *L. amazonensis* or *L. major* Infection

The effects of autophagy on *Leishmania* infection were assessed by quantifying the percentage of infected cells and the number of parasites per infected cell using optical fluorescence, or by determining the number of viable intracellular parasites by microscopy. For these assays, macrophages were first infected as described above in protocol (iii) of **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***.

To determine the percentage of infected cells and the number of parasites per infected cell, cells infected for 30 min were reincubated with either: (i) one of the following autophagic inhibitors: 10 μM chloroquine (Sigma, St Louis, MO, United States), 100 nM wortmannin (Sigma, St Louis, MO, United States) or 1 μM VPS34-IN1; (ii) or one of the following autophagic inducers: 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rapamycin (Sigma, St. Louis, MO, United States), or nutrient-poor EBSS medium (Sigma, St. Louis, MO, United States). After 4 h, all cells were washed and reincubated in complete DMEM for an additional 24 h. Cells were then subsequently fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min and coverslips were mounted using a ProLong Gold Antifade kit with DAPI (Life Technologies). The percentage of infected cells and the number of parasites per infected macrophage were determined by counting no less than 400 cells in random fields under an Olympus BX 51 fluorescence microscope using an 100x/1.4 objective in accordance with a protocol previously described by Huynh et al. (2006).

Intracellular parasite viability was assessed by determining the number of viable intracellular amastigotes. After a 30-min infection period, cells were incubated with either one of the two autophagy inhibitors (10 μM chloroquine or 1 μM VPS34-IN1) or an autophagic inducer (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rapamycin) or by starvation, incubating cells in nutrient-poor medium (EBSS). After 4 h, all cells were washed and incubated in complete DMEM medium for 0, 6, or 12 h, followed by a 5-day period of reincubation in Schneider's medium at 23°C. Finally, the viable intracellular amastigotes that had transformed into motile extracellular promastigotes were collected and counted in a Neubauer chamber.

As determined by AlamarBlue® assays, the autophagy modulators employed in the present study did not present direct effects on axenic *Leishmania* viability at the concentrations employed in this study (data not shown).

Quantification of Nitric Oxide (NO) Production and Arginase Activity

To determine whether autophagic modulation interferes with NO production by infected macrophages and/or arginase

activity, cells were primed with 50 UI/mL IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States) for 24 h and subsequently infected as described above in protocol (iii) of **Infection of macrophages with *L. amazonensis* or *L. major***. Next, macrophages were treated with 1 μM VPS34-IN1 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rapamycin. After 4 h, all cells were washed and reincubated in DMEM medium containing IFN- γ for an additional 24 h. Infected cells incubated in IFN- γ -free medium were used as a negative control. NO production was measured in culture supernatants by determining the accumulation of nitrite using the Griess reaction. Arginase activity was quantified by a colorimetric assay for the detection of urea as previously described (Abebe et al., 2013).

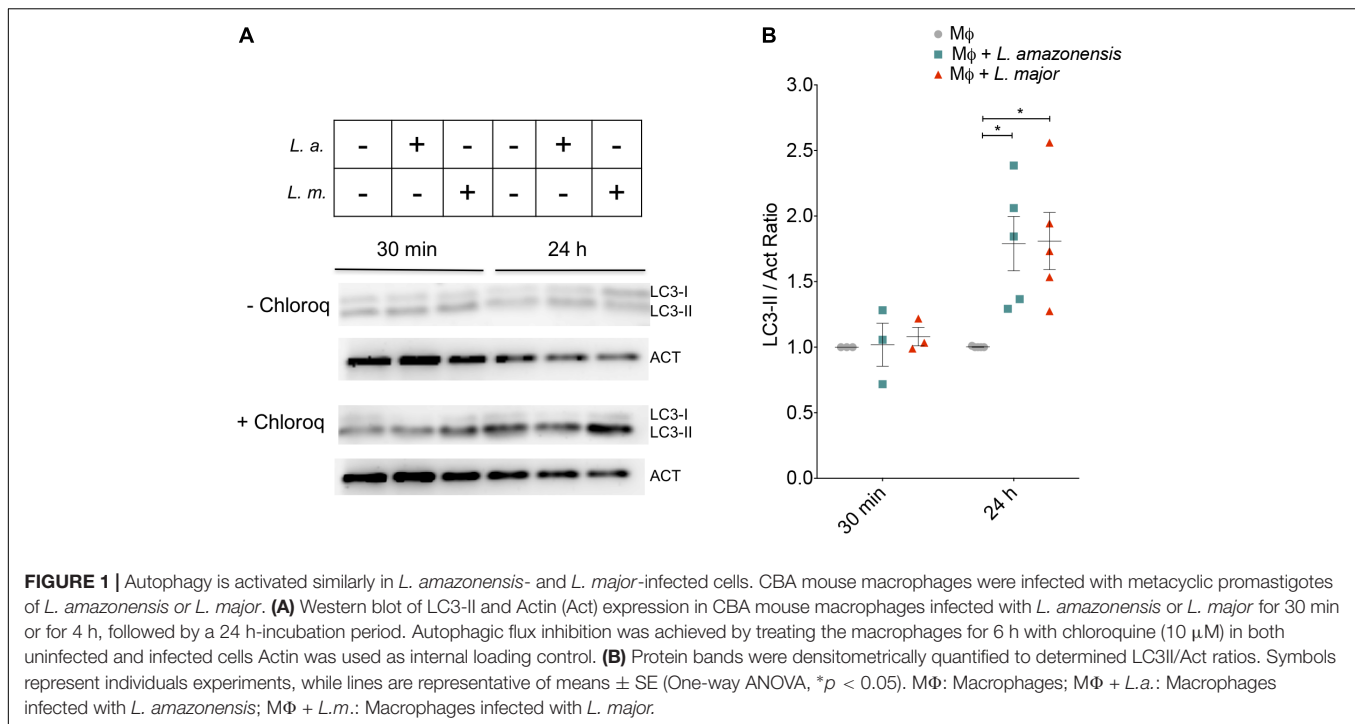
Statistical Analysis

Graphing and statistical analysis were performed using the GraphPad Prism program (version Mac 5.0c). After verifying data normality, the unpaired Student's *t*-test or the Mann-Whitney test were used for comparisons between two groups. For Gaussian distributions, one-way ANOVA was used, while for non-Gaussian distribution, the Kruskal-Wallis non-parametric test was employed for comparisons among three or more groups. Differences among groups were considered statistically significant when $p < 0.05$. Principal component analysis (PCA) and Hierarchical cluster analysis (Ward's method) were used to test whether *L. amazonensis* and *L. major* could be clustered separately by the percentage of infected macrophages, parasite load, intracellular viability, percentage of LC3-decorated vacuoles as well as percentage of DQ-BSA and LysoTracker positives vacuoles. These data analyses were performed using JMP 11.0 (SAS) software.

RESULTS

L. amazonensis and *L. major* Induce Autophagy in Infected Macrophages

The LC3-II/Act ratio was employed as an approach to evaluate activation of the autophagic pathway. At 30 min of infection, no changes in the LC3-II/Act ratio were found under either *L. amazonensis* or *L. major* infection (**Figure 1**). After 24 h, similar increases in the LC3-II/Act ratio were seen in both *L. amazonensis*- and *L. major*-infected macrophages (1.79- and 1.80-fold, respectively) in comparison to uninfected macrophages (**Figure 1**). LC3-II/Act ratio was found to be higher in positive controls compared to control untreated macrophages: 2.1-fold in macrophages treated with rapamycin and 3.2-fold in cells incubated under nutritional stress conditions (data not shown). Autophagic flux was evaluated by comparing the LC3-II band intensity in cells treated with chloroquine that blocks autophagic flux. As shown in **Figure 1** in *L. amazonensis*- or *L. major*-infected cells the levels of LC3-II are increased in chloroquine treated cells, indicating that the autophagic flux was normal in the infected cells.



L. amazonensis-Induced Parasitophorous Vacuoles Recruit More LC3 Than *L. major*

The characteristics of parasitophorous vacuoles were evaluated to determine whether dissimilarities in the capacity of *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles to interact with the autophagic pathway can account to differences in parasite survival inside host cells (Alexander and Vickerman, 1975; Antoine et al., 1998; Wilson et al., 2008; Real and Mortara, 2012). First, the hydrolytic activity inside these compartments was assessed by determining the percentage of parasitophorous vacuoles labeled with DQ-BSA. After 30 min of infection, the percentage of *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles labeled with DQ-BSA was similar (Figures 2A–C). By contrast, after 4 h of infection, *L. major* vacuoles (46%) exhibited greater positivity for DQ-BSA than those induced by *L. amazonensis* (33.33%) (Figure 2C). Similarly, after 24 h of infection, 50% of the *L. major*-induced parasitophorous vacuoles were positive for DQ-BSA versus only 25% of the *L. amazonensis* vacuoles ($p < 0.01$, Figure 2C). The positivity in DQ-BSA was enhanced by 27.58% for *L. amazonensis*- and 57.33% for *L. major*-induced parasitophorous vacuoles in macrophages in which autophagy was induced by rapamycin, as compared to untreated cells ($p < 0.01$, Figure 2D). In spite of this, DQ-BSA positivity was statistically similar in both the vacuoles induced by *L. amazonensis* and *L. major* ($p > 0.05$, Figure 2D), which indicates that *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles similarly acquire degradative features in macrophages in which autophagy was induced via mTOR inhibition by rapamycin. In addition, LysoTracker labeling after

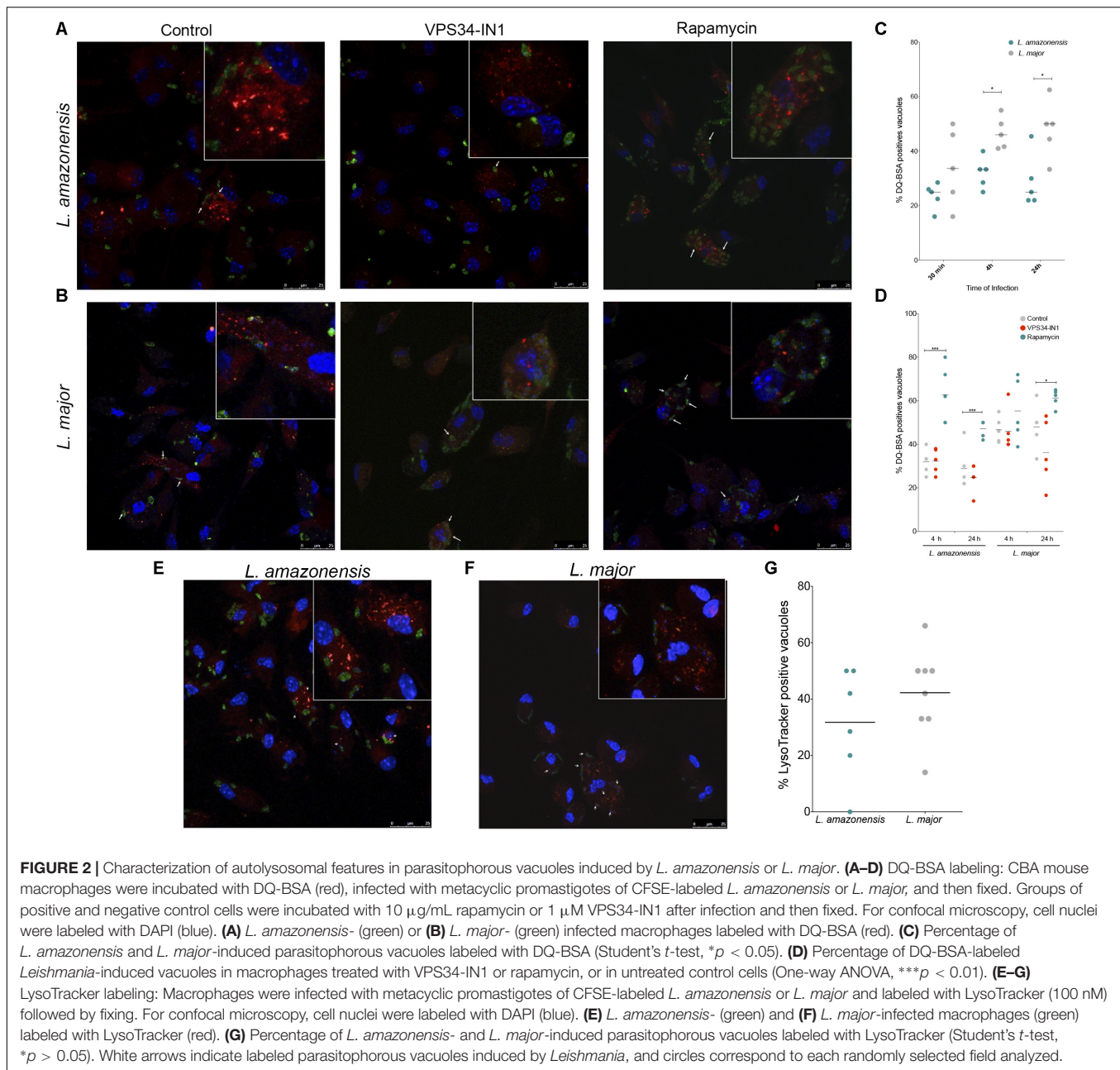
24 h of infection revealed that the percentages of parasitophorous vacuoles that accumulated this fluorescent probe are different in *L. major*-infected cells (42.25%) and *L. amazonensis*-infected macrophages (31.75%), although this difference is not statistically significant ($p > 0.05$, Figures 2E–G).

LC3 labeling showed positivity even at early stages of infection, i.e., 30 min, as *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles were decorated with endogenous LC3. In fact, at 30 min and 4 h after infection, both *L. amazonensis*- and *L. major*-infected macrophages exhibited similar percentages of LC3 decorated parasitophorous vacuoles (Figures 3A–C). Only after 24 h of infection differences were observed in endogenous LC3 labeling in these compartments, with 42.36% of positivity detected in *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles versus only 18.10% in *L. major* ($p < 0.01$, Figure 3C).

Additional control experiments using macrophages in which autophagy was inhibited by VPS34-IN1, a specific PI3K class III inhibitor, or induced by rapamycin showed no alterations in LC3 positivity as measured by the percentage of *L. amazonensis*- or *L. major*-induced vacuoles decorated with LC3 in comparison to infected untreated macrophages (Figure 3D). This result indicates that LC3-recruitment to *Leishmania*-induced parasitophorous vacuoles seems to be independent of the PI3k-Akt-mTOR pathway.

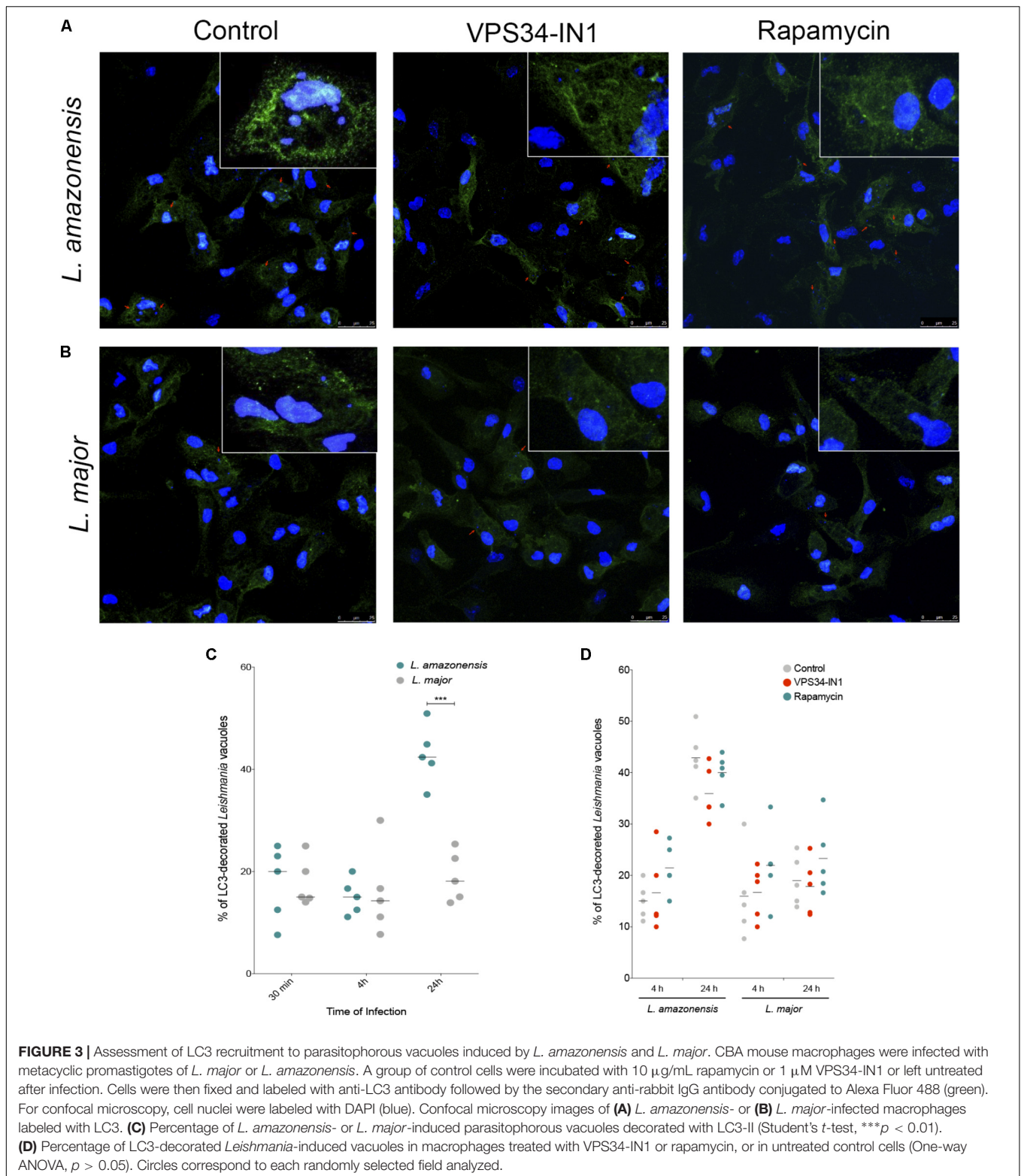
Autophagy Induction Favors *L. amazonensis* and *L. major* Intracellular Viability

The role played by autophagy in *Leishmania* infection was evaluated using autophagic modulators, followed by the determination of the percentage of infected macrophages and



number of viable intracellular parasites. No alterations were seen in the percentage of macrophages infected with *L. amazonensis* or *L. major* (**Figures 4A–D**) or in the numbers of *Leishmania* per infected cell (**Supplementary Figure S1**) in comparison to untreated macrophages, regardless of autophagic inhibition by chloroquine, wortmannin or VPS34-IN1 or induction by rapamycin or starvation. Also, none of the autophagic inhibitors influenced the number of viable intracellular *L. amazonensis* or *L. major* parasites (**Figures 4E,F**). However, we observed that induction by starvation or treatment with rapamycin enhanced the number of recovered viable parasites of both *L. major* and *L. amazonensis* species in comparison to infected untreated controls (**Figures 4G,H**). Pharmacologically induced autophagy

by rapamycin led to significant increases of 140.25, 146.18, and 157.15% in the number of viable *L. major* intracellular parasites after 4, 10, and 16 h of infection, respectively, in comparison to controls (**Figure 4H**) for *L. amazonensis*, differences of 61.7 and 76.39% were seen in the number of viable parasites at 4 and 10 h after treatment, respectively (**Figure 4G**). Interestingly, we observed that the physiological induction of autophagy by starvation or pharmacological induction by rapamycin led to a greater enhancement in *L. major* intracellular parasite viability than *L. amazonensis* in comparison to untreated infected cells (**Figures 4I,J**). The physiological induction of autophagy was shown to enhance intracellular viability by 2.5 and 1.5 times in *L. major* versus *L. amazonensis*,



respectively, at 10 and 16 h after treatment ($p < 0.05$) (**Figure 4I**). Additionally, the pharmacological induction of autophagy by rapamycin enhanced *L. major* intracellular viability by 2.17 times as compared to *L. amazonensis* viability at as early as 4 h

after treatment ($p < 0.05$) (**Figure 4J**). Additionally, similar enhancements in intracellular parasite viability were seen in *L. major* compared to *L. amazonensis* at both 10 and 16 h after treatment (**Figure 4J**).

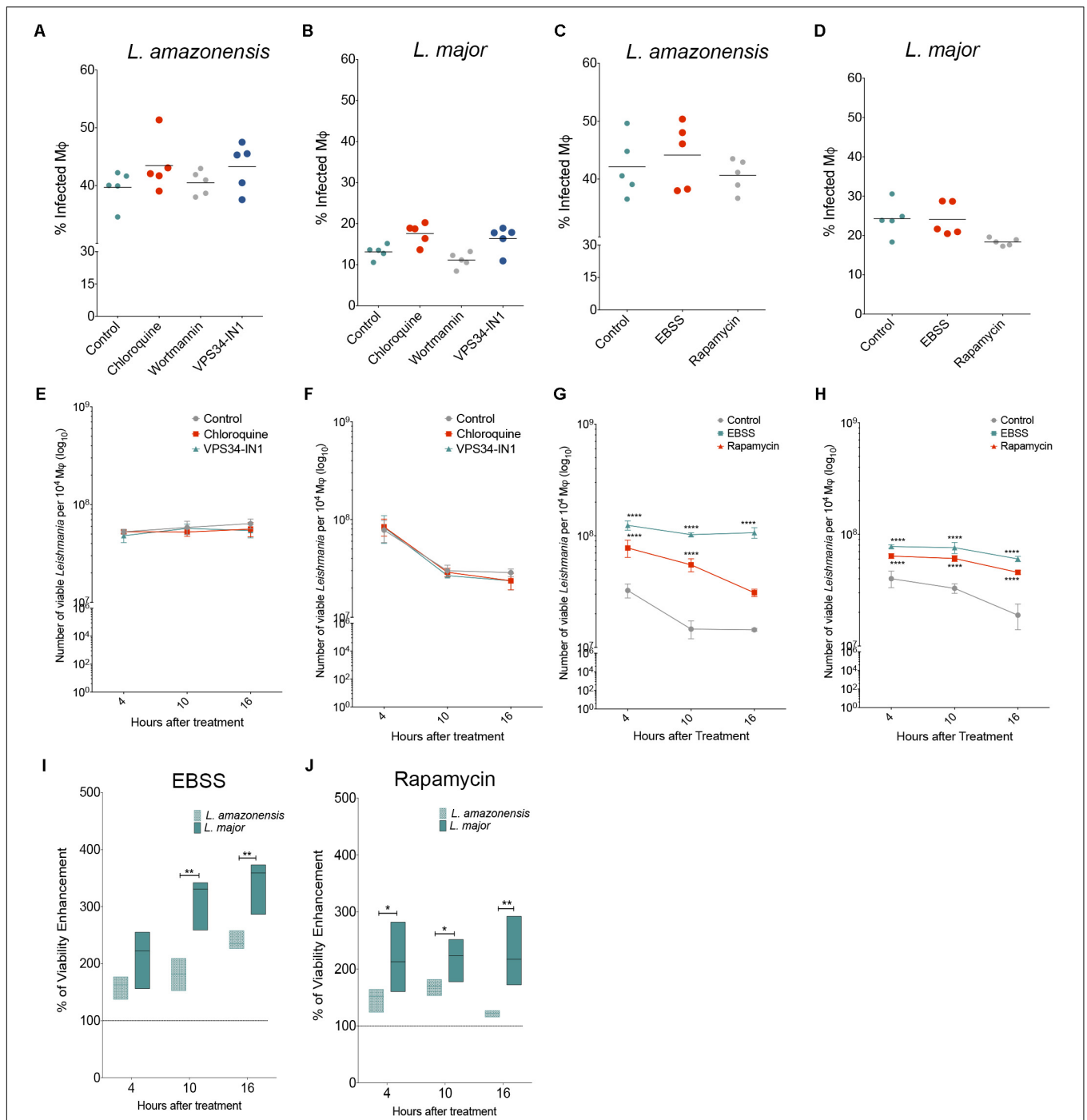


FIGURE 4 | Effect of autophagy modulation on *Leishmania* infection. CBA mouse macrophages were infected with *L. amazonensis* or *L. major* and incubated with different autophagic modulators. **(A–D)** To determine the percentage of *L. amazonensis*- or *L. major*-infected cells were incubated with autophagic inhibitors **(A,B)**: chloroquine (10 μM), wortmannin (100 nM) or VPS34-IN1 (1 μM), or with autophagic inducers **(C,D)**: nutrient-poor EBSS medium or rapamycin (10 μg/mL). After 4 h, all cell groups were reincubated for an additional 24 h, fixed and stained with DAPI. Circles represent data from each replicate of one of two independent experiments performed in quintuplicate (Kruskal–Wallis test, Dunns post-test, $p > 0.5$). **(E–J)** To assess intracellular **(E,G)** *L. amazonensis* or **(F,H)** *L. major* viability, infected macrophages were incubated with the **(E,F)** autophagic inhibitors: chloroquine (10 μM) or VPS34-IN1 (1 μM) or **(G,H)** autophagic inducers: nutrient-poor EBSS medium or rapamycin (10 μg/mL). After incubation, cells were reincubated in Schneider’s medium to determine the number of viable parasites. **(I,J)** Percentage of enhancement in intracellular parasite viability after incubation with **(I)** EBSS or **(J)** rapamycin. Circles correspond to the mean of one representative out of two independent experiments performed in quintuplicate ± SD (Two-Way ANOVA test, Tukey’s multiple comparisons post-test **** $p < 0.0001$). Lines represent median values and floating bars show quartiles (25% and 75%) of one representative experiment out of two independent experiments performed in quintuplicate (Mann–Whitney Test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

Autophagic Induction Reduces NO Production by *L. major*- and *L. amazonensis*-Infected Macrophages

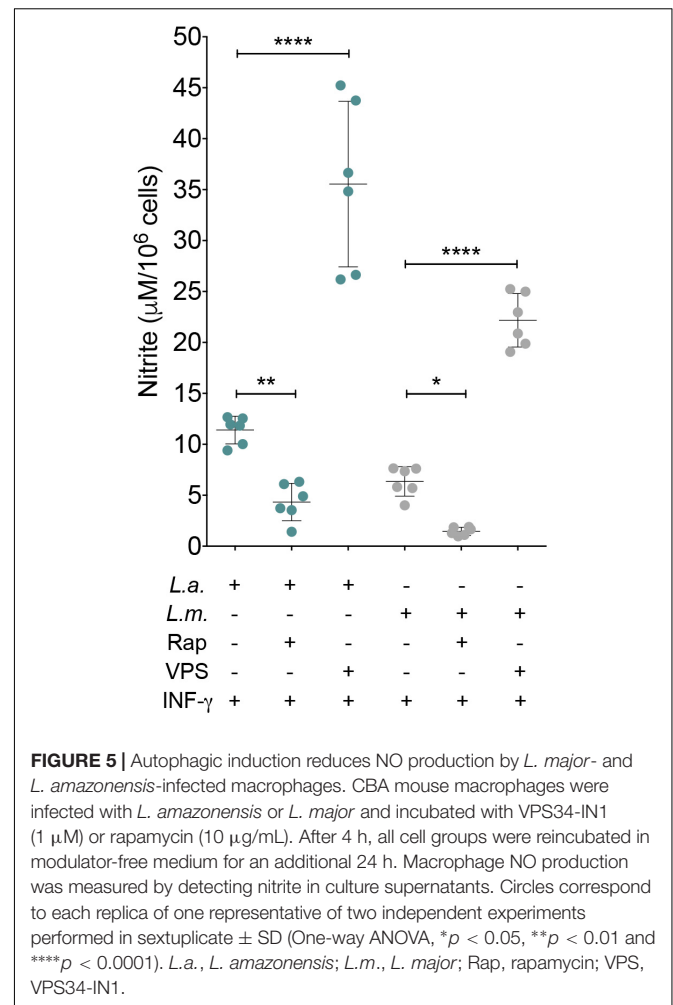
To determine whether NO and arginase are involved in the enhanced *L. amazonensis* and *L. major* intracellular viability induced by autophagy, we evaluated the effect of rapamycin-induced autophagy on NO production and arginase activity in infected macrophages. Unstimulated control cells, both uninfected and infected with *L. amazonensis* or *L. major*, produced NO at undetectable levels. Uninfected macrophages stimulated with IFN- γ released 2.30 μM of NO in the culture medium (data not shown). The addition of rapamycin or VPS24-IN1 to these cell cultures altered NO production to 0.74 or 4.61 μM , respectively (data not shown). The addition of rapamycin to *L. amazonensis*-infected macrophages resulted in a NO production level of 4.33 μM in comparison to controls (11.40 μM) ($p < 0.05$, **Figure 5**). Additionally, VPS34-IN1 enhanced NO production by *L. amazonensis*-infected macrophages (35.55 μM) in comparison to control cells (11.40 μM) ($p < 0.05$, **Figure 5**). Similarly, in *L. major*-infected macrophages, the addition of VPS34-IN1 to cell cultures increased NO levels to 22.17 μM , while the addition of rapamycin reduced NO production to 1.46 μM in comparison to 6.35 μM of NO released by untreated *L. major*-infected macrophages ($p < 0.05$, **Figure 5**). Interestingly, no significant differences were observed in arginase activity between the *Leishmania*-infected macrophages treated with rapamycin or VPS34-IN1 and untreated control macrophages ($p > 0.05$, **Supplementary Figure S2**). This seems to suggest that the induction of autophagy favors *Leishmania* intracellular viability by reducing NO production.

Autophagic Markers Can Discriminate *L. amazonensis*- and *L. major*-Infected Macrophages

A PCA was used to verify whether the parameters above evaluated: characterization of parasitophorous vacuoles regarding autophagic features and the percentage of infected macrophages, parasitic load and intracellular parasite viability, could discriminate *L. amazonensis* and *L. major* infection (**Figures 6A–C**). The analyzed parameters allowed differentiation of two major groups separating the *L. amazonensis*-infected macrophages from those infected by *L. major* (**Figures 6A,B**). Additionally, heatmap analysis revealed that *L. amazonensis*-infected macrophages are grouped into a cluster associated to infected cells presenting higher percentage of LC3-decorated vacuoles, higher percentage of infected macrophages and higher intracellular parasite viability, while *L. major*-infected macrophages clustered in a group associated to higher percentage of vacuoles positive for DQ-BSA and LysoTracker (**Figure 6B**).

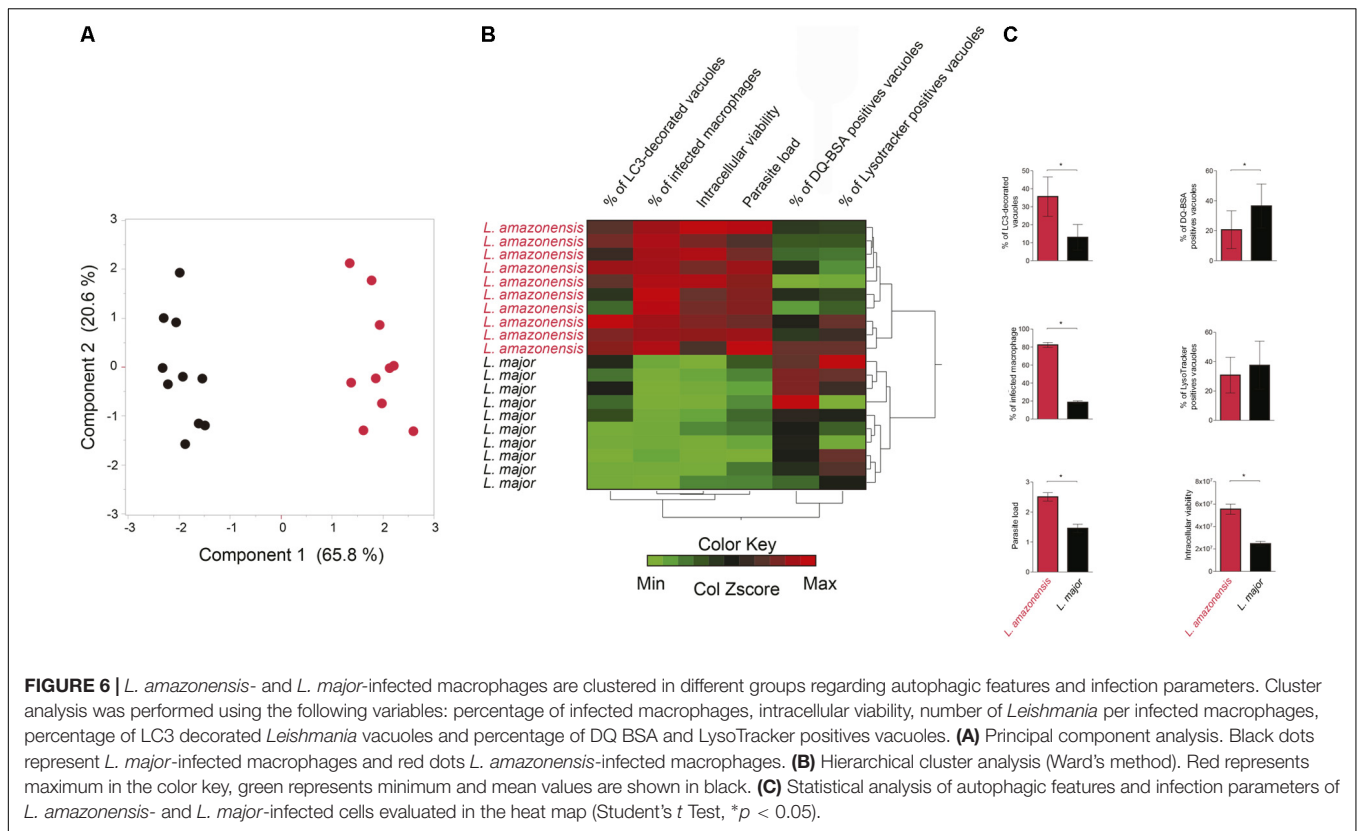
DISCUSSION

The present study demonstrated that *L. amazonensis* and *L. major* both induce autophagy in CBA macrophages, yet *L. amazonensis*



infection was shown to produce a higher percentage of parasite-induced vacuoles decorated by endogenous LC3-II. On the other hand, the compartments induced by *L. amazonensis* presented lower positivity for the degradative marker DQ-BSA. With respect to autophagy modulation in *L. amazonensis* and *L. major* infection *in vitro*, no changes were seen in the percentage of *L. amazonensis* or *L. major* infected cells or parasite load when autophagy was induced or inhibited, either physiologically or pharmacologically. While the inhibition of autophagy did not affect *Leishmania* intracellular viability, exogenously induced autophagy was shown to enhance intracellular parasite viability.

The present study also found comparatively similar increases in the LC3-II/Act ratio in inflammatory peritoneal CBA mouse macrophages infected with *L. amazonensis* or *L. major*. We further demonstrated that increased levels of LC3-II were associated with the induction of autophagy *per se*, i.e., not via the blockage of autophagic flux, since lower levels of LC3-II were seen in infected cells compared to those treated with chloroquine, an inhibitor of autophagic flux. These findings stand in agreement with previous studies reporting increased LC3 expression in RAW cells, BALB/c and C57BL/6 bone marrow macrophages



infected by *L. amazonensis* (Cyrino et al., 2012) or *L. major* (Franco et al., 2017), and BALB/c bone marrow macrophages infected with *L. major* (Frank et al., 2015) in comparison to uninfected cells. Consistent with our results and those reported in other *in vitro* studies, Mitroulis et al. (2009) observed a greater conversion of LC3-I to LC3-II in a sample of bone marrow macrophages from a male patient with visceral leishmaniasis infected with *L. donovani* in comparison to a bone marrow sample from a healthy patient. These findings seem to suggest that, regardless of species, *Leishmania* infection provokes the activation of the autophagic pathway in host cells *in vitro* and *in vivo*.

Several studies have successfully demonstrated that vacuoles induced by intracellular microorganisms can be loaded with DQ-BSA or LysoTracker (Gutierrez et al., 2004; Aguilera et al., 2009; Lerena and Colombo, 2011). While these soluble markers are not specific to autophagy, their use in labeling in conjunction with other autophagic compartment markers represents a suitable and reliable tool to monitor acidity and degradative activity in compartments, such as autolysosomes (Klionsky et al., 2007; Mitou et al., 2009; Vazquez and Colombo, 2009). Our analysis found no significant differences in the percentages of LysoTracker-labeled vacuoles induced by either *L. amazonensis* or *L. major*. Labeling of both *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles with this lysosomal dye was previously demonstrated by Real and Mortara (2012). While these authors did not quantify the percentage of *Leishmania*-induced vacuoles labeled with LysoTracker, comparisons of

the intensity of this probe revealed that the parasitophorous vacuoles induced by *L. major* presented lower intensity than *L. amazonensis*-induced compartments (Real and Mortara, 2012) suggesting that the acidity of these compartments was somehow diminished. In the present report, a higher percentage of DQ-BSA positivity was seen in *L. major*-induced vacuoles compared to those induced by *L. amazonensis* at both 4 and 24 h after infection. Previously, Beron et al. (2002) and Aguilera et al. (2009) successfully marked the large vacuoles induced by *Coxiella burnetii* with DQ-BSA. These vacuoles have been described as presenting morphological similarities to those induced by *L. amazonensis* (Antoine et al., 1990; Maurin et al., 1992; Veras et al., 1994, 1995). However, different from *C. burnetii*, *L. amazonensis* at later infection times maybe somehow preventing fusion with degradative compartments.

The recruitment of LC3 to *L. major*-induced parasitophorous vacuoles has been previously demonstrated (Crauwels et al., 2015; Matte et al., 2016). Crauwels et al. (2015) also reported greater percentages ($92 \pm 0.7\%$) of LC3-positive parasitophorous vacuoles induced by apoptotic *L. major* in comparison to those induced by viable *L. major* ($7 \pm 1\%$). Herein, we found similar percentages of LC3-decorated membranes of both *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles as early as 30 min after infection. However, after 24 h, greater LC3-positivity was detected in *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles than in those induced by *L. major*. Interestingly, no changes in the percentage of LC3 positivity were seen in the vacuoles induced by *L. amazonensis* or *L. major*

in macrophages treated with VPS34-IN1 or rapamycin when compared to untreated control macrophages. A similar result was described by Thomas et al. (2017), who found no differences in LC3-II levels between *L. donovani*-infected human THP-1 cells and those infected and treated with rapamycin. These authors hypothesized that the lack of an increase in LC3-II positivity observed in *L. donovani*-infected cells previously treated with rapamycin could be due to the fact that this parasite species inhibits classical autophagy activation via the PI3k-Akt-mTOR pathway, instead inducing this process via another pathway independent of mTOR. Accordingly, it is possible that in our CBA mouse macrophage model, this same mTOR-independent pathway was used to activate autophagy by both *L. amazonensis* and *L. major*. Alternatively, it is plausible to suggest that treatment with rapamycin resulted in a lack of enhancement in the percentage of LC3-II-decorated vacuoles in *Leishmania*-infected macrophages, associated with the more intense DQ-BSA labeling also found in *Leishmania* vacuoles, could be a result of the previously described accumulation of hydrolytic enzymes and, subsequently, increased cleavage of LC3-II in the inner membrane of these compartments (Kirisako et al., 2000; Tanida et al., 2004).

Many studies have been carried out in an attempt to determine whether parasite survival is favored by host cell autophagy under infection by different *Leishmania* species, or whether it functions as a defense mechanism. Of note, PCA and heat map analyses performed in the present study, completely discriminated *L. major*-infected macrophages, which grouped for higher positivity for markers of degradative compartments, DQ-BSA and LysoTracker, from *L. amazonensis*-infected cells that clustered for higher intensity of infection and LC3 positivity. Unexpectedly, autophagic inhibition exerted no effects on *Leishmania* spp infection, while exogenously induced autophagy was shown to favor intracellular viability of both parasites, although in a higher extent for *L. major* than *L. amazonensis*. In conjunction, these findings suggest that triggering autophagic process by PI3k-Akt-mTOR pathway seems to be beneficial to *Leishmania* spp intracellular survival, more intensely for those species that survive in a compartment presenting degradative characteristics. Thus, autophagy induction after infection would be detrimental to the host, since it would favor the intracellular viability of *Leishmania*. Consistently with our findings, Pinheiro et al. (2009) demonstrated that autophagy induced by starvation after infection led to an increase in the intracellular viability of *L. amazonensis* in BALB/c and A/J macrophages, as well as in the J774 cell-line. However, in contrast to our findings, these same authors found that starvation-induced autophagy did not alter the intracellular viability of *L. amazonensis* in infected C57BL/6 macrophages or that of *L. major* in infected BALB/c macrophages (Pinheiro et al., 2009). Moreover, it has also been demonstrated that pre-infection autophagic inhibition via Atg5 knockdown in bone-marrow macrophages resulted in an increase in *L. major* parasite burden (Frank et al., 2015). In the present study, autophagy has been modulated after infection, since, previously, we found that the induction of autophagy prior to infection inhibited the phagocytic capacity of mammalian cells in a non-specific manner (Lima et al., 2011).

It is possible that the reduction in Atg5 expression induced by Frank et al. (2015) in bone marrow macrophages provoked an enhancement in *L. major* infection due to an increase in parasite uptake, as previously described for *M. tuberculosis* (Bonilla et al., 2013). Accordingly, we propose that results reported by these previous studies, which sought to assess the effects of knocking down autophagy-related genes in the context of *Leishmania* infection, serve to reinforce the notion that inhibiting or inducing autophagy prior to infection profoundly interferes with phagocytic capacity of cell, rather than affecting the intracellular survival of pathogens.

By investigating how the exogenous induction of autophagy favors *Leishmania* intracellular viability, we have demonstrated that rapamycin decreases NO levels but does not significantly alter arginase activity. Consistent with our finding, Pinheiro et al. (2009) previously demonstrated that starvation-induced autophagy decreased NO production by *L. amazonensis*-infected macrophages in association with enhanced parasite intracellular viability. This mechanism seems to be universal, since it has already been shown that autophagic induction reduces NO generation by microglia (Han et al., 2013), the RAW 264.7 macrophage cell line (Jin et al., 2009), and also by ischaemic/reperfused myocardium (Ma et al., 2018). We speculate that, in our model, rapamycin may enhance parasite viability via reduced NO production, by way of one of the two following mechanisms: the suppression of mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Han et al., 2013) or the induction of iNOS proteasomal degradation (Jin et al., 2009).

Taken together, the present findings seem to indicate that although both of the evaluated species of *Leishmania* activate the autophagic pathway similarly in CBA mouse macrophages, the resulting parasitophorous vacuoles present different characteristics: enhanced LC3 recruitment is observed in *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles in comparison to *L. major*-induced vacuoles, which present more degradative features (result PCA). Despite these differences, we demonstrated that autophagic induction favors intracellular parasite survival in both *L. amazonensis* and *L. major*, albeit more pronounced in *L. major*, which seems to be related to decreased NO production. Alternatively, it is possible that autophagosomes may provide metabolites and amino acids to *L. major*- and *L. amazonensis*-induced vacuoles, which can favor the growth and intracellular development of *Leishmania*. One of these metabolites may be iron, since stored within ferritin, can be mobilized and released through autophagy (Linder, 2013; Niu et al., 2016) and then transported into the leishmanial cytosol by LIT1 (Huynh et al., 2006).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BD and PV conceived and designed the experiments. BD, CS, JL, NJA, TS, and JF-C performed the experiments. BD, KE, CB, JM, MC, and PV analyzed the data. PV contributed reagents, materials, and analysis tools. BD and PV wrote the manuscript. All the authors contributed to manuscript elaboration and revision and approved the final version prior to submission.

FUNDING

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (PV <http://www.fapesb.ba.gov.br>), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (PV <http://www.cnpq.br>) and National Institute of Science and Technology of Tropical (PV <http://inct.cnpq.br/web/inct-dt>). PV holds a grant from CNPq for productivity in research (307832/2015-5). The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Adriana Lanfredi Rangel, Dr. Claudio Pereira Figueira, and Marcio Ferreira dos Santos for technical support in confocal microscopy imaging. Finally, we are grateful to Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

REFERENCES

- Abebe, T., Takele, Y., Weldegebreal, T., Cloke, T., Closs, E., Corset, C., et al. (2013). Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2134. doi: 10.1371/journal.pntd.0002134
- Aguilera, M., Salinas, R., Rosales, E., Carminati, S., Colombo, M. I., and Beron, W. (2009). Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* 77, 4609–4620. doi: 10.1128/IAI.00301-09
- Alexander, J., and Vickerman, K. (1975). Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Protozool.* 22, 502–508. doi: 10.1111/j.1550-7408.1975.tb05219.x
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., et al. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., and Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* 58, 779–787.
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., and Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 6, 392–401. doi: 10.1016/S0966-842X(98)01324-9
- Bago, R., Malik, N., Munson, M. J., Prescott, A. R., Davies, P., Sommer, E., et al. (2014). Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 463, 413–427. doi: 10.1042/BJ20140889
- Beron, W., Gutierrez, M. G., Rabinovitch, M., and Colombo, M. I. (2002). *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect. Immun.* 70, 5816–5821. doi: 10.1128/IAI.70.10.5816-5821.2002
- Bonilla, D. L., Bhattacharya, A., Sha, Y., Xu, Y., Xiang, Q., Kan, A., et al. (2013). Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity* 39, 537–547. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.026
- Chang, H. K., Thalhoffer, C., Duerkop, B. A., Mehling, J. S., Verma, S., Gollob, K. J., et al. (2007). Oxidant generation by single infected monocytes after short-term

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01890/full#supplementary-material>

FIGURE S1 | Effect of autophagic modulation on the number of *Leishmania* per infected macrophage. CBA mouse macrophages were infected with *L. amazonensis* or *L. major* and incubated with different autophagic modulators. To determine parasite load, *L. amazonensis* or *L. major*-infected cells were incubated with (A) autophagic inhibitors: chloroquine (10 μ M), wortmannin (100 nM) or VPS34-IN1 (1 μ M), or with (B) autophagic inducers: nutrient-poor EBSS medium or rapamycin (10 μ g/mL). After 4 h, all cell groups were reincubated for an additional 24 h, fixed and stained with DAPI. Circles represent data from each replicate of one of two independent experiments performed in quintuplicate (Kruskal–Wallis test, Dunns post-test, $p > 0.5$).

FIGURE S2 | Effect of autophagic modulation on arginase activity. CBA mouse macrophages were infected with *L. amazonensis* or *L. major* and incubated with VPS34-IN1 (1 μ M) or rapamycin (10 μ g/mL). After 4 h, all cell groups were reincubated in modulator-free medium for an additional 24 h. Arginase activity was determined by urea production assay. Circles correspond to each replica of one experiment performed in sextuplicate \pm SD (One-way ANOVA). L.a., *L. amazonensis*; L.m., *L. major*; Rap, rapamycin; VPS, VPS34-IN1.

- fluorescence labeling of a protozoan parasite. *Infect. Immun.* 75, 1017–1024. doi: 10.1128/IAI.00914-06
- Crauwels, P., Bohn, R., Thomas, M., Gottwalt, S., Jackel, F., Kramer, S., et al. (2015). Apoptotic-like *Leishmania* exploit the host's autophagy machinery to reduce T-cell-mediated parasite elimination. *Autophagy* 11, 285–297. doi: 10.1080/15548627.2014.998904
- Cyrino, L. T., Araujo, A. P., Joazeiro, P. P., Vicente, C. P., and Giorgio, S. (2012). In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue Cell* 44, 401–408. doi: 10.1016/j.tice.2012.08.003
- Duszenko, M., Ginger, M. L., Brennand, A., Gualdrón-Lopez, M., Colombo, M. I., Coombs, G. H., et al. (2011). Autophagy in protists. *Autophagy* 7, 127–158. doi: 10.4161/auto.7.2.13310
- Franco, L. H., Fleuri, A. K. A., Pellison, N. C., Quirino, G. F. S., Horta, C. V., de Carvalho, R. V. H., et al. (2017). Autophagy downstream of endosomal Toll-like receptor signaling in macrophages is a key mechanism for resistance to *Leishmania major* infection. *J. Biol. Chem.* 292, 13087–13096. doi: 10.1074/jbc.M117.780981
- Frank, B., Marcu, A., de Oliveira Almeida Petersen, A. L., Weber, H., Stigloher, C., Mottram, J. C., et al. (2015). Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. *Parasit. Vectors* 8:404. doi: 10.1186/s13071-015-0974-3
- Gomes, I. N., Calabrich, A. F., Tavares Rda, S., Wietzerbin, J., de Freitas, L. A., and Veras, P. S. (2003). Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 5, 251–260. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00025-X
- Gutierrez, M. G., Master, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., and Deretic, V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753–766. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.038
- Gutierrez, M. G., Vazquez, C. L., Munafo, D. B., Zoppino, F. C., Beron, W., Rabinovitch, M., et al. (2005). Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* 7, 981–993. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00527.x
- Han, H. E., Kim, T. K., Son, H. J., Park, W. J., and Han, P. L. (2013). Activation of autophagy pathway suppresses the expression of iNOS, IL6 and cell death of LPS-stimulated microglia cells. *Biomol. Ther.* 21, 21–28. doi: 10.4062/biomolther.2012.089

- Huynh, C., Sacks, D. L., and Andrews, N. W. (2006). A *Leishmania amazonensis* ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes. *J. Exp. Med.* 203, 2363–2375. doi: 10.1084/jem.20060559
- Jin, H. K., Ahn, S. H., Yoon, J. W., Park, J. W., Lee, E. K., Yoo, J. S., et al. (2009). Rapamycin down-regulates inducible nitric oxide synthase by inducing proteasomal degradation. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 988–992. doi: 10.1248/bpb.32.988
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., et al. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., et al. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151, 263–276. doi: 10.1083/jcb.151.2.263
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Acevedo Arozana, A., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222. doi: 10.1080/1548627.2015.1100356
- Klionsky, D. J., Cuervo, A. M., and Seglen, P. O. (2007). Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy* 3, 181–206. doi: 10.4161/autophagy.3.678
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D. H., and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* 17, 3597–3607. doi: 10.1093/emboj/17.13.3597
- Lemos de Souza, V., Ascencao Souza, J., Correia Silva, T. M., Sampaio Tavares Veras, P., and Rodrigues de Freitas, L. A. (2000). Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2, 1807–1815. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01340-X
- Lerena, M. C., and Colombo, M. I. (2011). *Mycobacterium marinum* induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell. Microbiol.* 13, 814–835. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01581.x
- Levine, B., and Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 767–777. doi: 10.1038/nri2161
- Lima, J. G., de Freitas Vinhas, C., Gomes, I. N., Azevedo, C. M., dos Santos, R. R., Vannier-Santos, M. A., et al. (2011). Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 604–609. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.01.076
- Linder, M. C. (2013). Mobilization of stored iron in mammals: a review. *Nutrients* 5, 4022–4050. doi: 10.3390/nu5104022
- Ma, L. L., Ma, X., Kong, F. J., Guo, J. J., Shi, H. T., Zhu, J. B., et al. (2018). Mammalian target of rapamycin inhibition attenuates myocardial ischaemia-reperfusion injury in hypertrophic heart. *J. Cell Mol. Med.* 22, 1708–1719. doi: 10.1111/jcmm.13451
- Matte, C., Casgrain, P. A., Seguin, O., Moradin, N., Hong, W. J., and Descoteaux, A. (2016). *Leishmania major* promastigotes evade LC3-associated phagocytosis through the action of GP63. *PLoS Pathog.* 12:e1005690. doi: 10.1371/journal.ppat.1005690
- Maurin, M., Benoliel, A. M., Bongrand, P., and Raoult, D. (1992). Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect. Immun.* 60, 5013–5016.
- Meijer, A. J., and Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2445–2462. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.002
- Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C., and Colombo, M. I. (2010). Alpha-hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* 6, 110–125. doi: 10.4161/autophagy.6.1.10698
- Mitou, G., Budak, H., and Gozuacik, D. (2009). Techniques to study autophagy in plants. *Int. J. Plant Genomics* 2009:451357. doi: 10.1155/2009/451357
- Mitroulis, I., Kourtellos, L., Papadopoulos, V. P., Mimidis, K., Speletas, M., and Ritis, K. (2009). In vivo induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. *Parasitol. Int.* 58, 475–477. doi: 10.1016/j.parint.2009.07.002
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037–1040. doi: 10.1126/science.1103966
- Nazarko, V. Y., Nazarko, T. Y., Farre, J. C., Stasyk, O. V., Warnecke, D., Ulaszewski, S., et al. (2011). Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris*. *Autophagy* 7, 375–385. doi: 10.4161/autophagy.7.4.14369
- Niu, Q., Li, S., Chen, D., Chen, Q., and Chen, J. (2016). Iron acquisition in *Leishmania* and its crucial role in infection. *Parasitology* 143, 1347–1357. doi: 10.1017/S0031182016000858
- Perinoto, A. C., Maki, R. M., Colhone, M. C., Santos, F. R., Migliaccio, V., Daghestanli, K. R., et al. (2010). Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. *Anal. Chem.* 82, 9763–9768. doi: 10.1021/ac101920t
- Pinheiro, R. O., Nunes, M. P., Pinheiro, C. S., D'Avila, H., Bozza, P. T., Takiya, C. M., et al. (2009). Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 11, 181–190. doi: 10.1016/j.micinf.2008.11.006
- Real, F., and Mortara, R. A. (2012). The diverse and dynamic nature of *Leishmania* parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1518. doi: 10.1371/journal.pntd.0001518
- Russell, D. G., and Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.* 136, 2613–2620.
- Russell, D. G., Xu, S., and Chakraborty, P. (1992). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J. Cell Sci.* 103(Pt 4), 1193–1210.
- Santos, D. O., Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., et al. (2008). Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* 103, 1–10. doi: 10.1007/s00436-008-0943-2
- Schaible, U. E., Schlesinger, P. H., Steinberg, T. H., Mangel, W. F., Kobayashi, T., and Russell, D. G. (1999). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J. Cell Sci.* 112(Pt 5), 681–693.
- Schnaith, A., Kashkar, H., Leggio, S. A., Addicks, K., Kronke, M., and Krut, O. (2007). *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *J. Biol. Chem.* 282, 2695–2706. doi: 10.1074/jbc.M609784200
- Spath, G. F., and Beverley, S. M. (2001). A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.* 99, 97–103. doi: 10.1006/expr.2001.4656
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., and Ohsumi, Y. (2010). Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. *J. Biol. Chem.* 285, 30019–30025. doi: 10.1074/jbc.M110.143511
- Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 581, 2156–2161. doi: 10.1016/j.febslet.2007.01.096
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2503–2518. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009
- Thomas, S. A., Nandan, D., Kass, J., and Reiner, N. E. (2017). Countervailing, time-dependent effects on host autophagy promotes intracellular survival of *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 293, 2617–2630. doi: 10.1074/jbc.M117.808675
- Vazquez, C. L., and Colombo, M. I. (2009). Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods Enzymol.* 452, 85–95. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03606-9
- Veras, P. S., de Chastellier, C., Moreau, M. F., Villiers, V., Thibon, M., Mattei, D., et al. (1994). Fusion between large phagocytic vesicles: targeting of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells. *J. Cell Sci.* 107(Pt 11), 3065–3076.

- Veras, P. S., Moulia, C., Dauguet, C., Tunis, C. T., Thibon, M., and Rabinovitch, M. (1995). Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. *Infect. Immun.* 63, 3502–3506.
- Wilson, J., Huynh, C., Kennedy, K. A., Ward, D. M., Kaplan, J., Aderem, A., et al. (2008). Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog.* 4:e1000179. doi: 10.1371/journal.ppat.1000179
- World Health Organization (2010). Control of the leishmaniases. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* 949, xii–xiii, 1–186, back cover.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Dias, de Souza, Almeida, Lima, Fukutani, dos Santos, França-Cost, Brodskyn, de Menezes, Colombo and Veras. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

***In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195**

Carlos Eduardo Sampaio Guedes¹, Beatriz Rocha Simões Dias¹, Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen¹, Kercia Pinheiro Cruz¹, Niara de Jesus Almeida¹, Daniela Rodrigues Andrade², Juliana Perrone Bezerra de Menezes¹, Valéria de Matos Borges², Patricia Sampaio Tavares Veras^{1/+}

¹Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório de Patologia e Biointervenção, Salvador, BA, Brasil

²Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunoregulação, Salvador, BA, Brasil

BACKGROUND Leishmaniasis, one of the most neglected diseases, is a serious public health problem in many countries, including Brazil. Currently available treatments require long-term use and have serious side effects, necessitating the development of new therapeutic interventions. Because translocator protein (TSPO) levels are reduced in *Leishmania amazonensis*-infected cells and because this protein participates in apoptosis and immunomodulation, TSPO represents a potential target for *Leishmania* chemotherapy. The present study evaluated PK11195, a ligand of this protein, as an anti-leishmanial agent.

OBJECTIVE To evaluate the leishmanicidal activity of PK11195 against *L. amazonensis* in infected CBA mouse macrophages *in vitro*.

METHODS The viability of axenic *L. amazonensis*, *Leishmania major*, and *Leishmania braziliensis* promastigotes was assessed after 48 h treatment with PK11195 (0.2-400 μ M). Additionally, intracellular parasite viability was evaluated to determine IC₅₀ values and the number of viable parasites in infected macrophages treated with PK11195 (50-100 μ M). Infected macrophages were then treated with PK11195 (25-100 μ M) to determine the percentage of *L. amazonensis*-infected cells and the number of parasites per infected cell. Electron microscopy was used to investigate morphological changes caused by PK11195. The production of free oxygen radicals, nitric oxide, and pro-inflammatory cytokines was also evaluated in infected macrophages treated with PK11195 and primed or not primed with IFN- γ .

FINDINGS Median IC₅₀ values for PK11195 were 14.2 μ M for *L. amazonensis*, 8.2 μ M for *L. major*, and 3.5 μ M for *L. braziliensis*. The selective index value for *L. amazonensis* was 13.7, indicating the safety of PK11195 for future testing in mammals. Time- and dose-dependent reductions in the percentage of infected macrophages, the number of parasites per infected macrophage, and the number of viable intracellular parasites were observed. Electron microscopy revealed some morphological alterations suggestive of autophagy. Interestingly, MCP-1 and superoxide levels were reduced in *L. amazonensis*-infected macrophages treated with PK11195.

MAIN CONCLUSIONS PK11195 causes the killing of amastigotes *in vitro* by mechanisms independent of inflammatory mediators and causes morphological alterations within *Leishmania* parasites, suggestive of autophagy, at doses that are non-toxic to macrophages. Thus, this molecule has demonstrated potential as an anti-leishmanial agent.

Key words: PK11195 - *Leishmania amazonensis* - macrophage - chemotherapy

Leishmaniasis, one of the most challenging neglected diseases faced by developing countries, has an estimated incidence of approximately two million new cases per year and afflicts 98 countries and territories, placing ~310 million people at risk of infection (Alvar et al. 2012). Taking this into consideration, together with the increasing number of reported HIV-*Leishmania* co-infections, it is unsurprising that the World Health Organization has labelled this disease a 'serious public health problem' (WHO 2010).

Leishmaniasis treatment necessitates the use of highly toxic drugs with extended courses of administration, which sometimes leads patients to abandon treatment, increasing the chance of treatment failure. Moreover, co-infection with HIV has been shown to undermine the effectiveness of available treatments (Croft & Olliaro 2011),

making the search for new pharmaceutical compounds an imperative in the ongoing effort to control this disease.

We have previously demonstrated that CBA mouse macrophages can control *Leishmania major* infection, yet are susceptible to *Leishmania amazonensis*, and present different immune-inflammatory profiles in response to *L. amazonensis* and *L. major* infection, indicating the importance of macrophages in controlling infections arising from these parasites (de Souza et al. 2000, Gomes et al. 2003). We have previously used proteomic analysis to identify proteins that are differentially abundant in CBA mouse macrophages infected with either of these *Leishmania* spp., and we hypothesised that some of these proteins could serve as novel targets for chemotherapeutic treatment of leishmaniasis (Menezes et al. 2013).

One of the 162 proteins identified in our proteomic analysis, the translocator protein (TSPO), is associated with a lower relative abundance of peptides in cells infected with *L. amazonensis* compared with those infected with *L. major* (Menezes et al. 2013), possibly indicating that this protein has a role in controlling *Leishmania* infection. TSPO is a component of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR), which is composed of three subunits: the 18 kDa isoquinoline-binding protein

doi: 10.1590/0074-02760170345

Financial support: FAPESB, CNPq.

PSTV holds a grant from CNPq for productivity in research (307832/2015-5).

CESG and BRSD contributed equally to this work.

+ Corresponding author: pveras@bahia.fiocruz.br

Received 24 August 2017

Accepted 30 November 2017

(IBP), which has been renamed TSPO (Papadopoulos et al. 2006), the 32 kDa voltage-dependent anion channel (VDAC), and the 30 kDa adenine nucleotide transporter (ANT) (McEnery et al. 1992). TSPO is involved in a range of cellular processes, including apoptosis, transport of cholesterol to the mitochondrial matrix, steroidogenesis, cell proliferation, chemotaxis, cellular respiration, and immune response (Veenman et al. 2007). The fact that TSPO is a fundamentally important protein for cell function and maintenance of cellular homeostasis provides compelling evidence for its potential as a chemotherapeutic target. Several specific ligands that modulate TSPO have been described, including benzodiazepines, 1-(2-chlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-(1-methylpropyl)-3-isquinolinecarboxamide (PK11195), and *N,N*-dihexyl-2-(4-fluorophenyl) indole-3-acetamide (FGIN-1-27) (Veenman et al. 2007). Studies have demonstrated that TSPO ligands, including PK11195, may act as agonists or antagonists depending on the ligand concentration and cell type (Totis et al. 1989). Although the underlying mechanisms of action of these TSPO ligands require further clarification, PK11195 and other ligands are currently being used as markers of neuroinflammation in PET imaging (Folkersma et al. 2011), and they also exhibit anticancer (Shoukrun et al. 2008) and immunomodulatory activities (Domingues-Junior et al. 2000). PK11195 has also been shown to increase free radical production in neuronal cells in a TSPO-dependent manner by promoting opening of the mitochondrial permeability transition pore (Jayakumar et al. 2002), and to reduce the proliferation rate of *Plasmodium falciparum* in infected cells (Dzierszynski et al. 2002, Bouyer et al. 2011). However, TSPO ligands have not been tested against trypanosomatids.

The present study aimed to assess the potential anti-leishmanial effects of a TSPO ligand, PK11195, on CBA mouse macrophages infected with *L. amazonensis* using an *in vitro* model. Considering that infected CBA macrophages are susceptible to *L. amazonensis* and express lower levels of TSPO than those infected with *L. major* (Menezes et al. 2013), we hypothesised that treatment of *L. amazonensis*-infected macrophages with PK11195, in association with host immune response modulation, would induce killing of the intracellular parasites.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement - CBA mice were obtained from the animal care facility at the Gonçalo Moniz Institute (IGM) - FIOCRUZ, housed in pathogen-free conditions, and fed a commercially available diet with water provided *ad libitum*. All mice were raised under conditions in accordance with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals; all experimental protocols complied with these guidelines, as well as the resolutions established by the Brazilian National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). The present study was approved by the Institutional Animal Experimentation Review Board (CEUA) under protocol number 18/2010.

Anti-leishmanial drug preparation - The TSPO ligand PK11195 was acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, MO,

USA), and a 50 mM stock solution was prepared in 100% ethanol (Sigma, St Louis, MO, USA), then aliquoted and stored at -20°C until use. For experimental purposes, this stock solution was diluted into culture medium at varying concentrations. Amphotericin B sodium deoxycholate (Fungizone, Gibco) was purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) as a ready-to-use solution (271 µM).

Leishmania culture - Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125), *L. braziliensis* (MHOM/BR/94/H3456), and *L. major* (MHOM/RI-/WR-173) were axenically cultured in Schneider's Insect Medium (Sigma, St Louis, MO, USA) supplemented with 50 µg/mL gentamycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) and 10% or 20% heat-inactivated foetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA) (Schneider's complete medium). Cultures were maintained in an incubator at 24°C, for no more than six consecutive passages, until parasites reached the stationary growth phase.

Viability of axenic Leishmania promastigotes - To determine IC₅₀/48 h, axenic promastigotes from stationary cultures of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. major* were cultivated at a density of 2 × 10⁶ cells/mL in 200 µL Schneider's complete medium in 96-well plates at 24°C. Parasites were treated with 12 two-fold serial dilutions of PK11195 at concentrations of 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, and 0.20 µM, or with the diluent (ethanol), for 48 h. Next, AlamarBlue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) cell viability reagent was added to the parasite cultures to a final concentration of 10% v/v, and the cultures were incubated at 24°C for 4 h. Reagent absorbance at wavelengths of 570 and 600 nm was measured using a spectrophotometer (SpectraMax 340 PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). All experiments were performed in triplicate and individually repeated at least four times.

Macrophage cultivation - Peritoneal washing was performed to harvest macrophages from CBA mouse cavities injected with 3% sodium thioglycolate (Sigma, St Louis, MO, USA). All cells were cultured according to the protocol described by Gomes et al. (2003). The peritoneal lavage was first centrifuged at 300 × g, then resuspended in complete Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 20 mM HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA), 42 mM sodium bicarbonate (Sigma, St Louis, MO, USA), 10% foetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 2 mM glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA), and 10 µg/mL ciprofloxacin (Isotarma, Precabura, CE, BR). Next, cells were plated and incubated at 37°C in a 5% CO₂, 95% humidity atmosphere for 4 to 6 h, then washed to remove any non-adherent cells. Cells were maintained in 1 mL complete DMEM for further experiments.

Macrophage viability - The AlamarBlue® assay was used to determine the cytotoxic concentration 50 (CC₅₀) of PK11195 in uninfected macrophages. Uninfected thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were cultivated at a density of 2 × 10⁵ cells/mL in 200 µL complete DMEM in 96-well plates at 37°C, and then treated with PK11195 for 48 h at concentrations of 400, 200, 100,

50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, and 0.20 μM , in parallel with cultures incubated with the diluent (ethanol) as a negative control. Next, AlamarBlue[®] was added to the macrophage cultures to a final concentration of 10% v/v, and the plates were then incubated at 37°C for an additional 4 h. Reagent absorbance was measured as described above in *Viability of axenic Leishmania promastigotes*. All experiments were performed in triplicate and individually repeated at least four times.

Infection and treatment - To evaluate the anti-leishmanial effect of the TSPO ligand PK11195 on intracellular *L. amazonensis* parasites, CBA mouse macrophages were infected with stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* at a ratio of 10:1 for 6 h. The cells were then washed with saline to remove any non-internalised promastigotes. To assess the effect of PK11195 on intracellular parasites at early stages of infection, macrophages were subsequently treated with PK11195 at concentrations of 25, 50, 75, or 100 μM for 6, 24, or 48 h, whereas control cells were incubated in complete DMEM containing ethanol as a diluent. Additionally, a second control group remained untreated. To evaluate the treatment at later stages of infection, cells that had been washed to remove any non-internalised promastigotes were incubated in fresh DMEM medium for a further 96 h, a period of time sufficient to ensure that all parasites had completed the transformation to the amastigote form inside peritoneal macrophages, as previously shown by Courret et al. (2001). Infected cells were then treated with 50 or 75 μM PK11195, or 2.1 μM amphotericin B sodium deoxycholate, for an additional 24, 48, or 72 h, whereas control cells were incubated with ethanol.

To determine the percentage of infected cells and the number of parasites per infected macrophage at early stages of infection, all cells were fixed and stained with haematoxylin and eosin (H & E). Cell counts were determined by counting no less than 400 cells in random fields under light microscopy at 1000 \times magnification.

To assess inhibitory concentration 50 (IC_{50}) values for intracellular parasites at early stages of infection, CBA mouse macrophages were infected with stationary-phase promastigotes of *L. amazonensis* at a ratio of 10:1 for 6 h. Cells were then washed with saline to remove non-internalised parasites and treated with PK11195 at concentrations of 6.25, 12, 25, 50, 75, 100, 125, 150, and 175 μM for 48 h, whereas a control group remained untreated. All cells were then fixed and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). The percentage of infected cells was determined by counting cells under fluorescence microscopy as described above. All experiments were performed in quintuplicate and individually repeated at least twice.

Next, the effect of the TSPO ligand on intracellular parasite viability was assessed at early and later stages of infection by measuring the number of viable intracellular parasites in treated and untreated cells as described below in *Intracellular parasite viability*.

Intracellular parasite viability - To assess the effect of PK11195 on intracellular parasite viability at early and latest stages of infection, 2×10^5 thioglycolate-elicited

peritoneal macrophages from CBA mice were cultivated and infected as described above in *Infection and Treatment*. After treatment, the cells were washed and the medium was replaced with Schneider's complete medium to release amastigotes, which, if viable, later transformed into promastigotes. Finally, the cells were incubated at 24°C for five days, and viable promastigotes were counted in a Neubauer chamber.

Reversibility of the effect of PK11195 treatment - To evaluate whether the effect of the TSPO ligand on parasite viability was reversible, thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* for 6 h and treated with 75 μM PK11195 for 6, 12, 24, or 48 h. All cells were subsequently washed and incubated with PK11195-free complete DMEM for an additional 48 h, and then the reversibility of the effect of TSPO ligand treatment was assessed by counting the number of viable parasites as described above in *Intracellular parasite viability*.

Quantification of superoxide production - The influence of PK11195 on the production of superoxide ions ($\text{O}_2^{\bullet-}$) by NADPH oxidase in the macrophage plasma membrane was assessed using a lucigenin (*N,N'*-dimethyl-9,9'-bisacridinium nitrate)-enhanced chemiluminescence assay to monitor $\text{O}_2^{\bullet-}$ production during phagocytosis. For this assay, $\text{O}_2^{\bullet-}$ production was evaluated in untreated inflammatory peritoneal CBA mouse macrophages and cells pre-treated for 24 h at 37°C with 75 μM PK11195, 500 ng/mL LPS (Sigma, St Louis, MO, USA), or both 75 μM PK11195 and 500 ng/mL LPS.

To quantify $\text{O}_2^{\bullet-}$ production by NADPH oxidase in the plasma membrane, baseline $\text{O}_2^{\bullet-}$ release during phagocytosis was initially measured for 2 min in a luminometer by real-time counting of the number of photons emitted per second due to the reaction of $\text{O}_2^{\bullet-}$ with lucigenin (25 μM) (Sigma, St Louis, MO, USA) prior to the addition of parasites. Next, *L. amazonensis* promastigotes were added, and photon emissions were measured for a further 20 min, after which 2.5 UI/mL of the enzyme superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) was added to convert $\text{O}_2^{\bullet-}$ to H_2O_2 . The presented results are representative of four independent experiments.

Quantification of cytokine and NO production - To assess cytokine production in PK11195-treated cells, 10^6 thioglycolate-elicited peritoneal macrophages were primed with 50 UI/mL IFN- γ for 24 h and subsequently infected as described above in *Infection and treatment*. Next, infected cells were treated with 50 μM PK11195 for 24 or 48 h in the presence or absence of IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Culture supernatants were subsequently collected to measure levels of cytokine and nitric oxide (NO) production. Cytokine levels were quantified using a CBA Mouse Inflammation Kit (BD Biosciences) in accordance with the manufacturer's guidelines; this method enables the detection of cytokines in a single tube using antibody-coated beads in a flow cytometric multiplexed bead-based immunoassay. NO production was determined by measuring the accumulation of nitrite in the culture supernatants using the Griess reaction.

IC₅₀, CC₅₀ and selectivity index calculations - After determining parasite (axenic promastigote and intracellular amastigote) and uninfected macrophage viability as described above, IC₅₀/48 h and CC₅₀/48 h values were calculated using GraphPad Prism software v6.0. Data were normalised and then subjected to nonlinear regression analysis (curve fitting) (de Sá et al. 2009). Selectivity index (SI) values were obtained by calculating the ratio of CC₅₀:IC₅₀.

Transmission electron microscopy - Ultrastructural alterations in infected peritoneal macrophages arising from treatment with the TSPO ligand were assessed by electron microscopy using 75 µM PK11195 for 24 or 48 h. After treatment, all infected macrophages were fixed with Karnovsky fixative (2.5% glutaraldehyde grade II, 2% formaldehyde, and 2.5 mM CaCl₂ in 0.1 M sodium cacodylate buffer adjusted to pH 7.4) for at least 1 h, and subsequently post-fixed with 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferrocyanide, and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4. All cells were subsequently dehydrated using a graded acetone series and embedded in Polybed resin. Ultrathin sections were cut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined under a JEM-1230 transmission electron microscope (JEOL USA, Peabody, MA, USA).

Statistical analysis - GraphPad v6.0 software was used to perform all statistical analyses. Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk normality test to determine whether the obtained results followed a Gaussian distribution. The Student's *t*-test and one-way

analysis of variance (ANOVA) were used to evaluate results with normal distributions, whereas the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were applied to non-normally distributed data. Results were considered statistically significant when *p* < 0.05.

RESULTS

PK11195 kills L. promastigotes - The median IC₅₀ value for axenic *L. amazonensis* promastigotes was 14.22 µM [interquartile range (IQR) 10.18-18.02] for parasites treated for 48 h with concentrations of PK11195 ranging from 0.20 to 400 µM (Fig. 1A, Supplementary data, Figure A). PK11195 was observed to have similar effects on the viability of promastigotes of two other *Leishmania* species (*L. braziliensis* and *L. major*) treated for 48 h under identical conditions. The most marked inhibition was observed for *L. braziliensis*, with a median IC₅₀/48 h value of 3.51 µM (IQR = 2.34-5.89; Fig. 1A, Supplementary data, Figure B), followed by *L. major*, with a median IC₅₀/48 h value of 8.23 µM (IQR = 6.17-9.83; Fig. 1A, Supplementary data, Figure C). Altogether, PK11195 was found to reduce the viability of axenic promastigotes of three *Leishmania* species, which are known to cause cutaneous leishmaniasis, in a dose-dependent manner with low IC₅₀/48 h values (Fig. 1A).

The safety of the TSPO ligand was assessed at the same concentrations that were used for treatment of the axenic promastigotes (0.20 to 400 µM), and host cell viability was evaluated using the AlamarBlue® assay. Treatment of macrophages with PK11195 for 48 h led

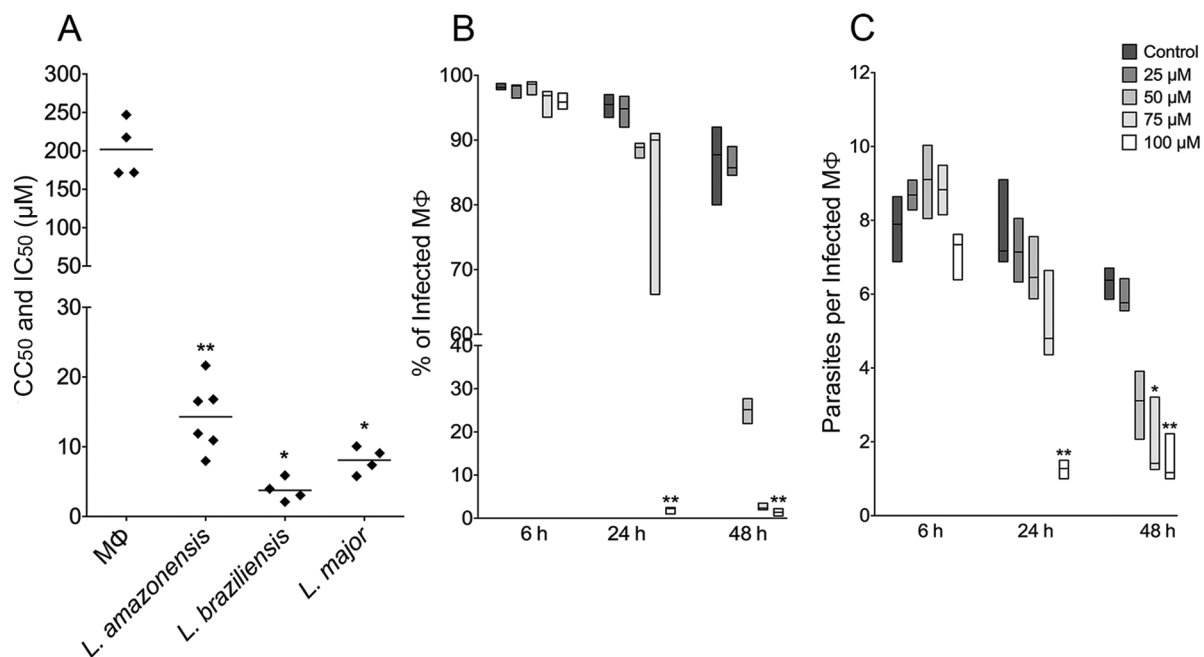


Fig. 1: inhibition of the viability of axenic *Leishmania* promastigotes and reduction of parasite load by PK11195. (A) CC₅₀ of macrophages and IC₅₀ of log-phase promastigotes of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, and *L. major* treated with PK11195. Lines represent the mean of four to six independent experiments (symbols) performed in triplicate. Differences between treated and control cells were considered significant when *p* < 0.05 (Student's *t* test). (B, C) Drug effects at early stages after infection. Infected macrophages were treated with 400, 200, 100, 50, or 25 µM of PK11195 for different periods of time. The percentage of infected macrophages (B) and the number of parasites per infected macrophage (C) were estimated by cell counting using light microscopy. Lines represent the median and floating bars quartiles (25% and 75%) of four independent experiments performed in quintuplicate (Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01).

to a decrease in viability, with a corresponding median $CC_{50}/48\text{ h}$ value of $194.4\ \mu\text{M}$ (IQR = 171.5-239.7; Fig. 1A, Supplementary data, Figure D), giving an SI value of 13.7 for *L. amazonensis*.

PK11195 reduces parasite infection - The TSPO ligand also demonstrated an anti-leishmanial effect against intracellular parasites, causing a significant reduction in the percentage of infected macrophages at ear-

ly stages of infection. A pronounced reduction of 97.75% (IQR = 98.69-97.58) was observed in the percentage of infected macrophages treated with $100\ \mu\text{M}$ PK11195 for 24 h (Fig. 1B). Moreover, a significant reduction in the percentage of infected cells was also observed after 48 h, with a median value of 1.37% (IQR = 0.68-2.05) for cells treated with $100\ \mu\text{M}$ PK11195, compared with 86.88% (IQR = 81.5-90.94) for the control group (Fig. 1B).

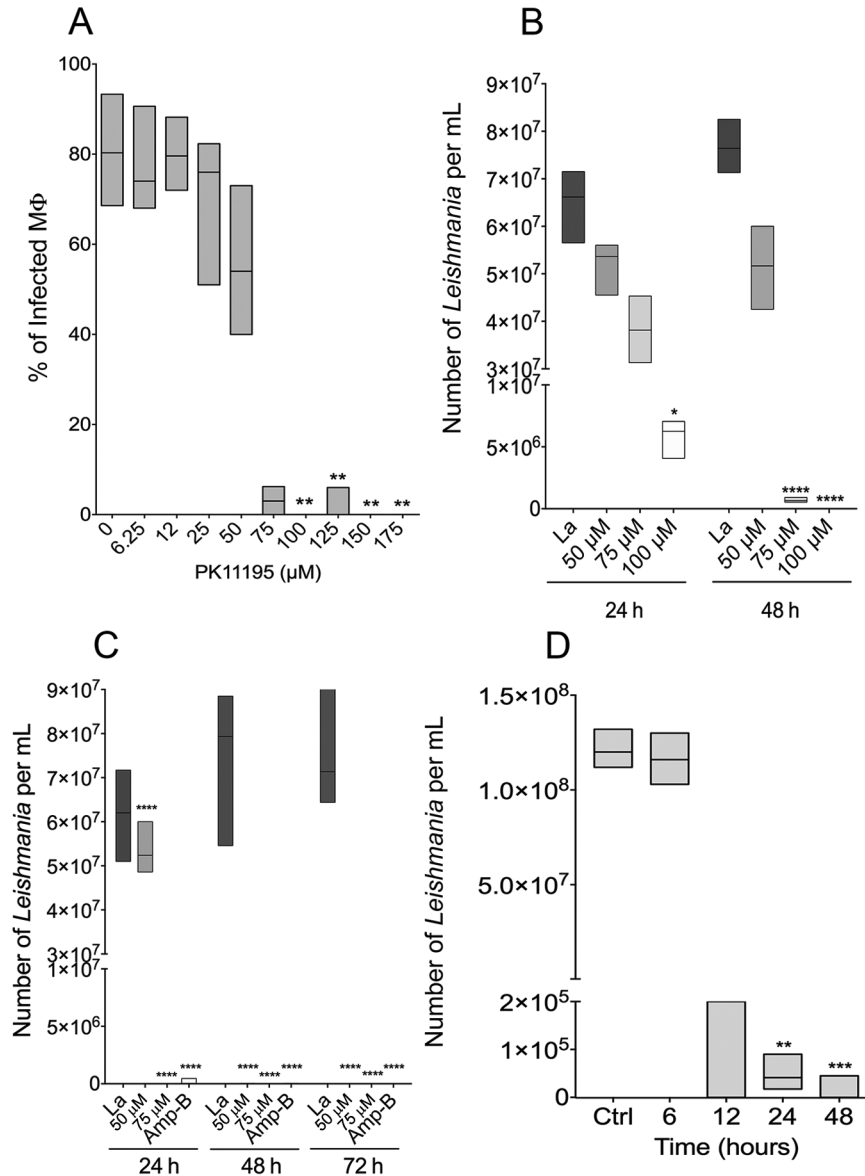


Fig. 2: effect of PK11195 on intracellular *Leishmania amazonensis* parasites in infected macrophages. (A) Percentage of infected macrophage. Infected macrophage were treated with varying concentrations of PK11195 for 48 h in order to calculate intracellular parasites $IC_{50}/48\text{ h}$. All experiments were performed in quintuplicate and independently repeated twice. (B) Intracellular parasite viability at the early stages of infection. Macrophages were infected for 6 h and then treated with PK11195 for 24 h or 48 h. (C) Intracellular parasite viability at the later stages of infection. Macrophages were infected for 96 h and then treated with PK11195 for 24 h, 48 h, or 72 h. At each treatment time point, the effect of PK11195 treatment was compared with the effect of amphotericin B sodium deoxycholate treatment. (D) Reversibility of the effect of treatment with PK11195 on the viability of intracellular *Leishmania* parasites. Macrophages were infected for 6 h and treated with $75\ \mu\text{M}$ PK11195. After 6, 12, 24, or 48 h of exposure, macrophages were washed and incubated in PK11195-free complete medium for an additional 48 h, and then the reversibility of the effect of treatment was assessed by counting the number of viable parasites. Lines represent the median and floating bars quartiles (25% and 75%) for independent experiments performed three times in at least in triplicate (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Similar reductions were also seen in the number of parasites per infected macrophage, with median values of 1.41 parasites per macrophage (IQR = 1.28-2.77) and 1.16 parasites per macrophage (IQR = 1.00-2.22) at PK11195 concentrations of 75 and 100 μM , respectively, compared with 6.37 parasites per macrophage (IQR = 5.95-6.65) for the control group (Fig. 1C). The $\text{IC}_{50}/48\text{ h}$ value pertaining to the effect on intracellular amastigotes of treatment with PK11195 at concentrations ranging from 6.25 to 175 μM was $46.55 \pm 11.88\ \mu\text{M}$ (Fig. 2A, Supplementary data, Figure E), almost four times lower than the $\text{CC}_{50}/48\text{ h}$ value obtained in macrophages (Fig. 1A).

The effect of PK11195 on parasite load was also assessed at early and later stages of infection by comparing the viability of intracellular parasites in PK11195-treated macrophages and ethanol-treated macrophages. At early stages of infection, cells treated with 100 μM PK11195 showed a significant reduction (91.08%) in the number of live intracellular parasites detected after treatment for 24 h (Fig. 2B). Moreover, treatment with PK11195 for 48 h resulted in more pronounced reductions in the number of viable intracellular parasites: 99.09% and 100% in cells treated with 75 μM and 100 μM , respectively (Fig. 2B).

Macrophage cultures were then treated with PK11195 for 24 h and 48 h after a long-term incubation period of 96 h to ensure that all *L. amazonensis* parasites had completed the intracellular transformation into amastigotes. We observed a 100% reduction in the number of viable intracellular parasites in cells treated with 75 μM PK11195 for 48 h and in cells treated with either 50 or 75

μM of this TSPO ligand for 72 h (Fig. 2C). An identical reduction in the number of viable intracellular parasites was also observed in macrophages treated with 2.1 μM amphotericin B at 48 and 72 h (Fig. 2C).

Irreversibility of the effect of PK11195 on *Leishmania* parasites - Next, we assessed the reversibility of the effect of PK11195 treatment (75 μM) on intracellular parasite survival. A pronounced irreversible reduction in parasite viability of 97.15% ($p < 0.001$) was achieved as early as 24 h after commencing treatment when infected macrophages were cultured for an additional 48 h following removal of the TSPO ligand. The irreversibility of the effect of PK11195 on parasite viability was found to be 100% ($p < 0.0001$) after treatment for 48 h (Fig. 2D).

PK11195 reduces the oxidative response of *Leishmania*-infected macrophages - Pre-treatment of macrophages with 75 μM PK11195 prior to *Leishmania* infection resulted in a significant (3.5-4.5-fold) reduction in $\text{O}_2^{\bullet-}$ production by plasma-membrane NADPH-dependent oxidase compared with untreated controls. Similarly, when macrophages were pre-treated with LPS (500 ng/mL), pre-treatment with 75 μM PK11195 resulted in a 5.0-fold reduction in $\text{O}_2^{\bullet-}$ production by plasma-membrane NADPH-dependent oxidase in comparison with positive-control macrophages treated with LPS alone, resulting in $\text{O}_2^{\bullet-}$ levels similar to those produced by untreated control macrophages (Fig. 3A).

PK11195 reduces MCP-1 production by infected macrophages - Neither changes in the production of NO

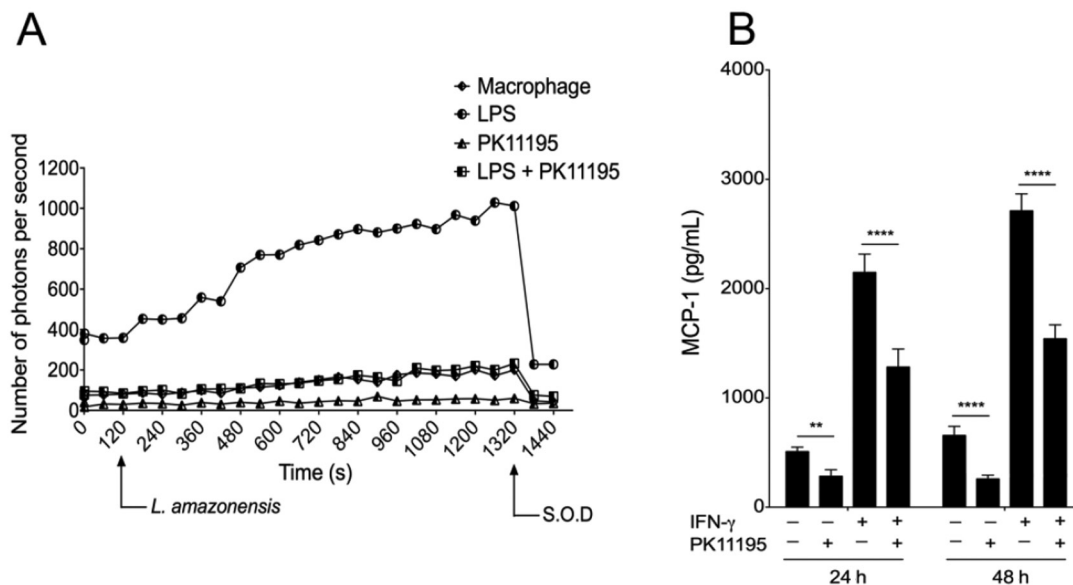


Fig. 3: production of inflammatory mediators by macrophages treated with PK11195. (A) NADPH-dependent $\text{O}_2^{\bullet-}$ production during phagocytosis. Macrophages were pre-treated for 24 h with PK11195 (75 μM), LPS (500 ng/mL), or both PK11195 (75 μM) and LPS (500 ng/mL). Photon emissions per second were measured prior and after the addition of *Leishmania amazonensis* promastigotes to the culture. Data are derived from one representative experiment out of four independently performed experiments, each with a single replicate (Mann-Whitney test, $p = 0.028$). (B) MCP-1 production was assessed in cell supernatants of infected macrophages, either primed or not primed with 50 UI/mL IFN- γ for 24 h, and then treated with 50 μM PK11195 for a further 24 or 48 h. Bars represent means \pm SD of one representative experiment out of three independently performed experiments in sextuplicate (one-way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$).

nor changes in the levels of the inflammatory cytokines evaluated (IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12, IFN- γ) were detected in infected macrophages treated with PK11195 for 24 or 48 h. However, PK11195 inhibited production of the chemokine MCP-1 at each time point, with significant reductions in MCP-1 levels observed after 24 h (55.69%, $p < 0.0001$) and 48 h (39.39%, $p < 0.0001$) of treatment. This inhibitory effect of PK11195 also occurred in infected macrophages primed with IFN- γ (50 UI/mL), even after treatment for only 24 h (59.69%, $p < 0.0001$) or 48 h (56.82%, $p < 0.0001$) (Fig. 3B).

Ultrastructural alterations in *L. amazonensis* exposed to PK11195 - Treatment of infected macrophages with PK11195 caused ultrastructural alterations in intracellular parasites suggestive of autophagy induction, including the appearance of double membrane vesicles, compared with parasites within untreated infected control macrophages, Fig. 4A, B, C). In addition, treatment with PK11195 was associated with enhanced mitochondrial size (Fig. 4B), marked cytosolic disorganisation, and the appearance of multivesicular bodies after 24 h (Fig. 4B) and 48 h (Fig. 4C) of treatment; these features were not observed in intracellular parasites within untreated macrophages (Fig. 4A). In addition, debris suggestive of dead parasites was observed inside parasitophorous vacuoles (Fig. 4D), whereas remarkably high electrodensity was observed in the cytosol (Fig. 4B).

DISCUSSION

The present study, which endeavoured to assess the anti-leishmanial effect of a specific TSPO ligand *in vitro*, found that treatment with PK11195 reduced, in a time- and dose-dependent manner, not only the proliferation of axenic promastigotes and the proportion of infected macrophages in CBA mouse macrophages, but also the number of parasites per infected macrophage and the quantity of viable intracellular parasites. The reduction in axenic promastigote proliferation was observed to be generic, as similar results were seen in species causative of tegumentary leishmaniasis belonging to subgenera *Leishmania* (*L. amazonensis* and *L. major*) and *Vianinia* (*L. braziliensis*) (Banuls et al. 2007). With $IC_{50}/48$ h values of 14.22 μ M for *L. amazonensis*, 3.51 μ M for *L. braziliensis*, and 8.23 μ M for *L. major*, which are lower than the $CC_{50}/48$ h value of 194.4 μ M observed in treated macrophages, PK11195 was found to be capable of inhibiting the growth of all three *Leishmania* species tested (with SI values of 13.67 for *L. amazonensis*, 55.38 for *L. braziliensis*, and 23.62 for *L. major*), indicating the potential of PK11195 as a chemotherapeutic agent for treatment of cutaneous leishmaniasis.

Although PK11195 exhibits high-affinity binding to TSPO with a reported binding affinity of 9.3 nM (Selleri et al. 2001), its therapeutic anti-parasitic effects (Dzierszinski et al. 2002, Bouyer et al. 2011) and cyto-

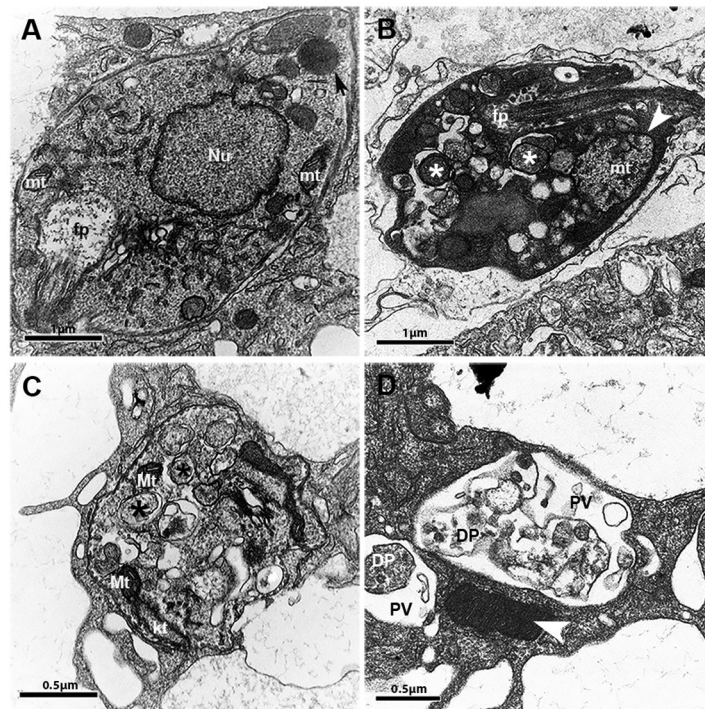


Fig. 4: effects of PK11195 on the ultrastructure of *Leishmania amazonensis*. Macrophages were infected and then not treated (A) or treated (B-D) with 75 μ M PK11195 for 24 h (B) or 48 h (C and D). Black and white asterisks indicate examples of vacuoles with double membranes, black arrows indicate lipid droplets in normal cells, and white arrowheads indicate mitochondria with increased volume or high electrodensity. Nu: nucleus; kt: kinetoplast; mt: mitochondria; fp: flagellar pocket; PV: parasitophorous vacuoles; DP: dead parasite.

toxic effects on a variety of cancer cell types (Shoukrun et al. 2008) have been shown to occur only at elevated (micromolar) concentrations. The fact that PK11195 exhibited therapeutic effect only at higher concentrations may be explained by the hydrophobicity of PK11195, which is known to bind other proteins, such as alpha-1-acidglycoprotein, which it binds with a high affinity (Lockhart et al. 2003), and albumin, which it binds with low affinity (Dougherty et al. 2002, Lockhart et al. 2003). Our current findings and previous report (Lockhart et al. 2003) support the notion that PK11195 must be employed at relatively high concentrations or be associated with a delivery system (Vaghela et al. 2017) to exert therapeutic effects (Tanimoto et al. 1999).

PK11195 has been used as a marker of cerebral lesions (Folkersma et al. 2011) and as an immunomodulator (Zavala & Lenfant 1987), and has been considered, owing to its pro-apoptotic properties, as a potential chemotherapeutic anticancer agent (Shoukrun et al. 2008). Nonetheless, the literature contains scarce reports on the use of PK11195 as an anti-parasitic molecule. Dzierszinski et al. (2002) demonstrated that PK11195 reduces the proliferation of *P. falciparum* and *Toxoplasma gondii* *in vitro*. A study by Bouyer et al. (2011) found a reduced proliferation rate of *P. falciparum* parasites in infected erythrocytes treated with PK11195, showing results similar to those described by Dzierszinski et al. (2002). The effects of PK11195 on these parasites from the protozoan phylum Apicomplexa (Dzierszinski et al. 2002, Bouyer et al. 2011) and on trypanosomatids, as demonstrated in the present study, indicate that PK11195 could potentially have an anti-parasitic effect on a wide range of protozoan species.

The direct effect of PK11195 on axenically cultured promastigotes of *Leishmania* cannot be attributed to interaction of PK11195 with TSPO or homologues of TSPO, because there is no evidence that TSPO or homologues of TSPO are present within the *Leishmania* genome. Recently, Hatty et al. (2014) showed that PK11195 interacts with lipids and is incorporated into lipid bilayers, and that incorporation of PK11195 into lipid bilayers alters membrane fluidity. This finding leads us to speculate that the leishmanicidal effect of PK11195 may be in some way associated with alterations in the dynamic properties of the parasite plasma membrane; this possibility deserves further investigation. In addition, it has already been demonstrated that PK11195 has functional effects that are independent of interaction with TSPO (Hatty et al. 2014). However, the exact mechanisms by which this TSPO ligand acts against *Leishmania* infection require further investigation.

In contrast with the observations of Jayakumar et al. (2002) that PK11195 increases free radical productions on neuronal cells, in the present study, PK11195 caused a reduction in the release of $O_2^{\bullet-}$ by plasma-membrane NADPH oxidase. Our observations are similar to those of Zavala and Lenfant (1987), who demonstrated that production of $O_2^{\bullet-}$ by P388D₁ macrophages was attenuated by treatment with arachidonic acid. In addition, we observed that treatment of infected CBA macrophages with PK11195 significantly reduced production of the macrophage attractant chemokine MCP-1; this finding is consis-

tent with a report published by Bribes et al. (2003), which showed that treatment of MRL/lpr mice with PK11195 reduced the amount of inflammatory infiltrate in a mouse model of pulmonary inflammation. In the future, it will be necessary to use an *in vivo* model of *Leishmania* infection to evaluate whether treatment with PK11195 reduces both $O_2^{\bullet-}$ and MCP-1 levels and, as a result, dampens the inflammatory response via reduction of $O_2^{\bullet-}$ toxicity and inflammatory cell recruitment, respectively. This effect could be particularly beneficial in treating lesions resulting from *L. braziliensis* infection, in which ulceration and intense inflammation are observed.

The morphological alterations seen in intracellular *L. amazonensis* promastigotes following treatment with PK11195 suggest that cell death may have occurred via multiple mechanisms. The observed swelling of mitochondria and kinetoplasts is suggestive of apoptosis or necrosis, whereas the appearance of double-membrane vacuoles containing degraded material, the presence of multivesicular bodies, and the presence of vesicles in flagellar pockets are alterations suggestive of autophagy. Similar alterations have been described in *L. amazonensis* (Rodrigues et al. 2005), *Trypanosoma cruzi* (Braga et al. 2004), and *Leishmania infantum* (Granthon et al. 2007) treated either with 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine, a potent inhibitor of squalene synthase, which is a key enzyme in the metabolism of ergosterol (Granthon et al. 2007), or with ketoconazole, another drug that affects the availability of protozoan ergosterol (Vannier-Santos et al. 1995). In the present study, ultrastructural analysis showed that the intracellular parasites also exhibited double-membrane vesicles, marked cytosolic disorganization, and the presence of multivesicular bodies, in addition to remarkably high electron density in the cytosol and increased amounts of debris suggestive of dead parasites.

Although relatively high doses of PK11195 are required to treat *Leishmania* infection *in vitro*, these levels are much lower than those that cause toxicity to macrophages. In conclusion, the present *in vitro* study has demonstrated the potential of PK11195 as an anti-leishmanial candidate. Further studies are required to evaluate the activity of this TSPO ligand *in vivo*.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Drs Adriana Lanfredi Rangel, Claudio Pereira Figueira, and Maria Lucia Vieira Moreno, for technical support with electron microscopy imaging and analysis. Finally, we are grateful to Andris K Walter for providing English revision and consulting services.

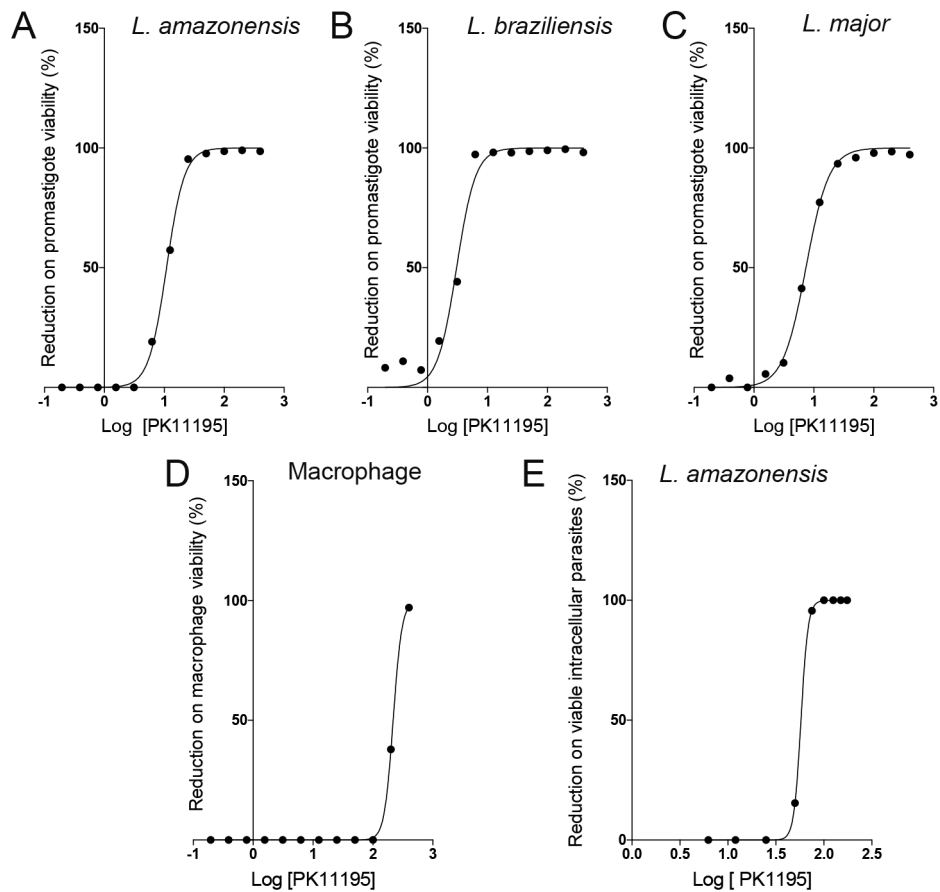
AUTHORS' CONTRIBUTION

CESG, BRSD and PSTV - Conceived and designed the experiments; CESG, BRSD, ALOAP, KPC, NJA and DRA - performed the experiments; CESG, BRSD, ALOAP, JPB, VMB and PSTV - analysed the data; VMB and PSTV - contributed reagents/materials/analysis tools; CESG, BRSD and PSTV - wrote the paper.

REFERENCES

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*. 2012; 7(5): e35671.

- Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007; 64: 1-109.
- Bouyer G, Cueff A, Egee S, Kmiecik J, Maksimova Y, Glogowska E, et al. Erythrocyte peripheral type benzodiazepine receptor/voltage-dependent anion channels are upregulated by *Plasmodium falciparum*. *Blood.* 2011; 118(8): 2305-12.
- Braga MV, Urbina JA, de Souza W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 24(1): 72-8.
- Bribes E, Bourrie B, Casellas P. Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor have therapeutic effects in pneumopathies in vivo. *Immunol Lett.* 2003; 88(3): 241-7.
- Courret N, Frehel C, Prina E, Lang T, Antoine JC. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. *Parasitology.* 2001; 122(Pt 3): 263-79.
- Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy - challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(10): 1478-83.
- de Sá MS, Costa JF, Krettli AU, Zalis MG, Maia GL, Sette IM, et al. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. *Parasitol Res.* 2009; 105(1): 275-9.
- de Souza VL, Souza JA, Silva TMC, Veras PST, de-Freitas LAR. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2000; 2(15): 1807-15.
- Domingues-Junior M, Pinheiro SR, Guerra JL, Palermo-Neto J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on *Mycobacterium bovis*-induced infection in hamsters. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2000; 22(3): 555-74.
- Dougherty TJ, Sumlin AB, Greco WR, Weishaupt KR, Vaughan LA, Pandey RK. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic activity of certain pyropheophorbide ether photosensitizers: albumin site II as a surrogate marker for activity. *Photochem Photobiol.* 2002; 76(1): 91-7.
- Dzierszinski F, Coppin A, Mortuaire M, Dewailly E, Slomianny C, Ameisen JC, et al. Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor are potent inhibitors of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(10): 3197-207.
- Folkersma H, Boellaard R, Yaqub M, Kloet RW, Windhorst AD, Lammertsma AA, et al. Widespread and prolonged increase in (R)-(11)C-PK11195 binding after traumatic brain injury. *J Nucl Med.* 2011; 52(8): 1235-9.
- Gomes IN, Calabrich AF, Tavares RS, Wietzerbin J, de Freitas LA, Veras PS. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. *Microbes Infect.* 2003; 5(4): 251-60.
- Granthon AC, Braga MV, Rodrigues JC, Cammerer S, Lorente SO, Gilbert IH, et al. Alterations on the growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* induced by squalene synthase inhibitors. *Vet Parasitol.* 2007; 146(1-2): 25-34.
- Hatty CR, Le Brun AP, Lake V, Clifton LA, Liu GJ, James M, et al. Investigating the interactions of the 18kDa translocator protein and its ligand PK11195 in planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838(3): 1019-30.
- Jayakumar AR, Panickar KS, Norenberg MD. Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J Neurochem.* 2002; 83(5): 1226-34.
- Lockhart A, Davis B, Matthews JC, Rahmoune H, Hong G, Gee A, et al. The peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 binds with high affinity to the acute phase reactant alpha1-acid glycoprotein: implications for the use of the ligand as a CNS inflammatory marker. *Nucl Med Biol.* 2003; 30(2): 199-206.
- McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(8): 3170-4.
- Menezes JP, Almeida TF, Petersen AL, Guedes CE, Mota MS, Lima JG, et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 2013; 15(8-9): 579-91.
- Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27(8): 402-9.
- Rodrigues JC, Urbina JA, de Souza W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2005; 111(4): 230-8.
- Selleri S, Bruni F, Costagli C, Costanzo A, Guerrini G, Ciciani G, et al. 2-Arylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl acetamides. New potent and selective peripheral benzodiazepine receptor ligands. *Bioorg Med Chem.* 2001; 9(10): 2661-71.
- Shoukrun R, Veenman L, Shandalov Y, Leschiner S, Spanier I, Karry R, et al. The 18-kDa translocator protein, formerly known as the peripheral-type benzodiazepine receptor, confers proapoptotic and antineoplastic effects in a human colorectal cancer cell line. *Pharmacogenomics.* 2008; 18(11): 977-88.
- Tanimoto Y, Onishi Y, Sato Y, Kizaki H. Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential. *Jpn J Pharmacol.* 1999; 79(2): 177-83.
- Totis M, Kremers P, Batt AM, Van Cantfort J, Siest G, Gielen J. Induction of liver microsomal cytochrome P-450 isozymes by 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide. *Xenobiotica.* 1989; 19(8): 857-66.
- Vaghela R, Kulkarni PK, Osmani RA, Bhosale RR, Varma VNSK. Recent advances in nanosystems and strategies for managing leishmaniasis. *Curr Drug Targets.* 2017; 18(14): 1598-1621.
- Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, de Souza W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *J Eukaryot Microbiol.* 1995; 42(4): 337-46.
- Veenman L, Papadopoulos V, Gavish M. Channel-like functions of the 18-kDa translocator protein (TSPO): regulation of apoptosis and steroidogenesis as part of the host-defense response. *Curr Pharm Des.* 2007; 13(23): 2385-405.
- WHO - World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2010; 949: xii-xiii, 1-186, back cover.
- Zavala F, Lenfant M. Peripheral benzodiazepines enhance the respiratory burst of macrophage-like P388D1 cells stimulated by arachidonic acid. *Int J Immunopharmacol.* 1987; 9(3): 269-74.



Effect of PK11195 on macrophage and *Leishmania* viability. Log-phase promastigotes of (A) *L. amazonensis*, (B) *L. braziliensis*, and (C) *L. major*, as well as (D) macrophages, were treated for 48 h with 12 two-fold serial dilutions of PK11195 at the following concentrations: 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, and 0.20 μ M. Macrophage and parasite viabilities were measured using the AlamarBlue[®] assay. (E) To determine intracellular parasite viability, macrophages infected with parasites at a 10:1 ratio were treated with 25, 50, 75, or 100 μ M PK11195 for 48 h. At the end of the incubation time, all groups of cells were fixed and stained with DAPI, and at least 400 cells were counted in random fields under fluorescence microscopy.