



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS CONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR
Leishmania amazonensis E *Leishmania major*
INTERAGEM DE FORMA DISTINTA COM A VIA
AUTOFÁGICA

BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS

Salvador – Brasil

2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa

VACÚOLOS PARASITÓFOROS INDUZIDOS POR *Leishmania amazonensis* E
***Leishmania major* INTERAGEM DE FORMA DISTINTA COM A VIA**
AUTOFÁGICA

BEATRIZ ROCHA SIMÕES DIAS

Orientadora: Dra. PATRÍCIA SAMPAIO TAVARES VERAS

Co-orientador: Dr. CARLOS EDUARDO SAMPAIO GUEDES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Ba

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tânia e Louro,
pelo amor incondicional e pelo
incentivo diário. Vocês são a
base de tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho;

À minha orientadora Dra. Patrícia Veras pela confiança, discussões entusiasmadas, amizade e principalmente por me mostrar como a pesquisa de qualidade deve ser desenvolvida;

Ao meu co-orientador Dr. Carlos Eduardo Guedes por ter confiado em mim desde minha iniciação científica, pelo apoio, dedicação, paciência, discussões científicas e pela grande amizade que foi construída ao longo desses cinco anos;

À minha grande amiga de laboratório, Niara Almeida, pelas noites e fins de semanas realizando experimentos, por estar sempre do meu lado me dando força e apoio e por me confortar nos momentos frustrantes;

À José Geraldo Bomfim Lima pela amizade, discussões científicas, ensinamentos de análises estatísticas e pelo bom humor contagiante;

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 “família” LPBI: Antônio Petersen, Bruna Macedo, Camila Victória, Deborah Fraga, Isaac Queiroz, Junior Guedes, Kercia Cruz, Laiane Barbosa, Leila Bastos, Livia Brito, Luciano Vasconcellos, Manuela Solcà, Marcos Farias, Marcelo Uzêda, Yuri Silva pela ajuda diária e por tornarem meus dias mais divertidos;

Aos ex-membros do LPBI: Christiana Vinhas, Juliana Perrone, Luana Palma, Mateus Mota, Roberto Teixeira, Rodrigo Araújo que junto com todos os outros me receberam de braços abertos;

À Flávia Paixão e Ana Patrícia pela amizade e eficiência em resolver questões burocráticas

À Dra. Adriana Lanfredi e ao Dr. Cláudio Figueiredo pelos ensinamentos em microscopia de fluorescência e por serem sempre tão solícitos em me auxiliar;

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

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

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

DIAS, Beatriz Rocha Simões. Vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* interagem de forma distinta com a via autofágica. 115 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório que vive e se multiplica dentro dos vacúolos parasitóforos em macrófagos no hospedeiro vertebrado. Apesar dos vacúolos induzidos por diferentes espécies de *Leishmania* apresentarem semelhanças bioquímicas, esses compartimentos apresentam diferenças significativas nos seus tamanhos. Os vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania mexicana* e *Leishmania amazonensis* apresentam grandes dimensões e contêm uma grande quantidade de amastigotas, enquanto que os induzidos por *Leishmania major* e *Leishmania donovani* são pequenos e com pouco espaço ao redor das amastigotas. Estudos recentes demonstraram que compartimentos induzidos por microrganismos intracelulares são capazes de interagir com a via autofágica e esta pode controlar ou promover o estabelecimento da infecção a depender da natureza do microrganismo. Até o momento, poucos estudos foram realizados para avaliar o papel da autofagia na biogênese e maturação dos vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania*. Recentemente, foi demonstrado que em macrófagos de camundongos BALB/c, a indução de autofagia provoca um aumento na carga parasitária de *L. amazonensis*, no entanto, não é capaz de aumentar a carga parasitária de *L. major*. Além disso, estudos indicam que vacúolos parasitóforos de *L. mexicana* adquirem macromoléculas do citoplasma da célula hospedeira por meio de microautofagia. Uma vez que *L. amazonensis* integra o mesmo complexo que *L. mexicana*, nossa hipótese é que vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* interagem com a via autofágica. Assim, o presente estudo tem como objetivo verificar e comparar a participação da autofagia na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos murinos. Para este fim, avaliamos quanto a características autofágicas, os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos de camundongo CBA e analisamos a influência da superexpressão de LC3 sobre a sobrevivência de *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos infectados. Inicialmente, macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* e incubados com LysoTracker, marcador de compartimentos lisossomais, ou DQ-BSA, marcador de compartimentos degradativos. Além disso, foi avaliada a presença de LAMP, proteína lisossomal, e LC3, proteína específica de autofagossomo, na membrana destes vacúolos. Em seguida, a co-localização dos parasitos com os vacúolos parasitóforos contendo estes marcadores foi quantificada. Nossos resultados demonstraram um maior percentual de co-localização tanto do LysoTracker como do DQ-BSA com parasitos em vacúolos no interior de macrófagos infectados com *L. major* em comparação com aqueles infectados

com *L. amazonensis*. No entanto, não houve diferença no percentual de co-localização de LAMP com *L. major* ou *L. amazonensis* e foi observado um maior percentual de co-localização do LC3 com parasitos em macrófagos infectados com *L. amazonensis* em comparação com aqueles infectados com *L. major*. Posteriormente, avaliamos o efeito da superexpressão da LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Células de linhagem macrofágica RAW foram transfectadas com o plasmídeo contendo a sequência codificante para a LC3 e infectadas com *L. amazonensis* ou *L. major*. Nós observamos uma redução no percentual de infecção por *L. amazonensis* e *L. major* nas células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às controle. Essa diminuição na infecção se deu por inibição da fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major* pois os parasitos continuam a interagir com a membrana das células RAW-pmRFP-LC3, mas não são internalizadas. Em conjunto, estes dados demonstram que os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* e *L. major* interagem com compartimentos da via autofágica de forma distinta e que a superexpressão de LC3 reduz a fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major* por células RAW, o que resulta na redução da infecção.

Palavras-chave: *Leishmania*, vacúolo parasitóforo, macrófago, autofagia, LC3

DIAS, Beatriz Rocha Simões. Parasitophorous vacuoles induced by *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* interact differently with the autophagic pathway. 115 f. il. Thesis (Master) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Leishmania is an intracellular parasite that lives and multiplies within parasitophorous vacuoles in macrophages in the vertebrate host. Despite the fact that vacuoles induced by different species of *Leishmania* present biochemical similarities, these compartments have significant differences in their sizes and composition. The parasitophorous vacuoles induced by *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis* are large and contain a large number of amastigotes, while vacuoles induced by *Leishmania major* and *Leishmania donovani* are small and tight. Recent studies have demonstrated that depending on the type of intracellular microorganism, the induced compartments can interact with the autophagic pathway and control or promote the establishment of infection. To date, few studies have been conducted to evaluate the role autophagic process plays in the biogenesis and maturation of parasitophorous vacuoles induced by *Leishmania*. Recently, it has been demonstrated that in macrophages of BALB/c mice, the induction of autophagic causes an increase in parasitic load of *L. amazonensis*, but not *L. major*. Furthermore, other studies indicate that *L. mexicana*-induced parasitophorous vacuoles acquire macromolecules from the cytoplasm of the host cell through microautophagy. Once *L. amazonensis* belongs to the same complex that *L. mexicana*, our hypothesis is that *L. amazonensis*-induced parasitophorous vacuoles interact with the autophagic pathway. Thus, the present study aims to evaluate and compare the role autophagic process plays in *Leishmania* infection. We evaluated *L. amazonensis*- or *L. major*-induced parasitophorous vacuoles regarding their autophagic characteristics and we analyzed the influence of the overexpression of LC3 on the survival of parasites in infected macrophages. Initially, macrophages of CBA mice were infected with *L. amazonensis* or *L. major* and incubated with a marker of lysosomal compartments, LysoTracker, or a marker of degrading compartments, DQ-BSA. In addition, we evaluated the presence of the lysosomal membrane protein, LAMP-1, and a protein specific of autophagosomes, LC3 in the membrane of these vacuoles. Then, the colocalization of parasites with the marker labeled-compartments was quantified. Our results demonstrated a higher percentage of colocalization of both LysoTracker and DQ-BSA with parasites in vacuoles within macrophages infected with *L. major* in comparison with those infected with *L. amazonensis*. However, there was no difference in the percentage of colocalization of LAMP with *L. major* or *L. amazonensis*. We also observed a higher percentage of LC3-co-localizing with parasites in macrophages

infected with *L. amazonensis* in comparison with those infected with *L. major*. Subsequently, we evaluated the effect of overexpression of LC3 in macrophages infected with *L. amazonensis* or *L. major*. RAW cells were transfected with the plasmid containing the coding sequence for the LC3 (RAW-pmRFP-LC3) and then were infected with *L. amazonensis* or *L. major* stationary phase promastigotas. A reduction was observed in the percentage of infected RAW-pmRFP-LC3 cells with *L. amazonensis* and *L. major* compared to control cells. This decrease in the percentage of infected cells is due to the inhibition of phagocytic ability of RAW-pmRFP-LC3 cells, since the parasites continue to interact with cell membrane, but is not internalized. Together, these findings show that *L. amazonensis*- and *L. major*-induced parasitophorous vacuoles interact differently with compartments of the autophagic pathway and that the overexpression of LC3 reduces phagocytosis of both *L. amazonensis* and *L. major* by RAW-pmRFP-LC3 cells resulting in the reduction of infection.

Keywords: Leishmania, parasitophorous vacuole, macrophage, autophagy, LC3

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da <i>Leishmania</i>	22
Figura 2	Representação esquemática da autofagia.....	32
Figura 3	Marcação com DQ-BSA™ de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por microscopia de fluorescência.....	49
Figura 4	Percentual de co-localização de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com vacúolos contendo DQ-BSA™ hidrolisado.....	52
Figura 5	Marcação com LysoTracker® de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por microscopia de fluorescência.....	53
Figura 6-	Percentual de co-localização de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> marcados com vacúolos contendo LysoTracker®.....	56
Figura 7-	Marcação com anti-LAMP de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por microscopia de fluorescência.....	57
Figura 8-	Percentual de co-localização de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com a proteína LAMP.....	60
Figura 9-	Marcação com anti-LC3 de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por microscopia de fluorescência	61
Figura 10-	Percentual de co-localização de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com a proteína LC3.	64
Figura 11	Marcação com anti-LC3 de macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	65
Figura 12	Células RAW transfectadas.	67
Figura 13-	Efeito da superexpressão de LC3 na infecção de células RAW pmRFP-LC3.	69
Figura 14	Efeito da superexpressão de LC3 na interação de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com células RAW.	71
Figura 15	Efeito da super-expressão de LC3 na fagocitose de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por células RAW	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados em imucitoquímicas de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	43
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATG	Proteínas relacionadas à autofagia (<i>autophagy-related proteins</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
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
gp63 -	Glicoproteína de 63 Kda
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
IgG	Imunoglobulina G
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
MΦ-	Macrófago
MARCO	Receptor de macrófago com estrutura de colágeno
MDC -	Monodancylcadaverina
MSR1	Receptor scavenger de macrófago tipo 1
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NaCl	Cloreto de sódio
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com Tween 20
PE	Fosfatidiletanolamina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-fosfato cinase
PKC	Proteína cinase C
PtdIns	Fosfatidilinositol
SD	Desvio padrão
Th	Células T auxiliares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	A leishmaniose	19
2.2	O parasito	20
2.3	Modelo Murino	22
2.4	Reconhecimento e fagocitose	23
2.5	Formação de vacúolo Parasitóforo	25
2.6	Autofagia	27
2.7	Participação da autofagia na formação dos compartimentos induzidos por microrganismos	32
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	Geral	36
4.2	Específicos	36
5	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1	Abordagem Geral	37
5.2	Obtenção de macrófagos peritoneais	37
5.3	Cultivo de células	38
5.4	Cultura de <i>Leishmania</i>	38
5.5	Separação de promastigotas metacíclicas de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	39
5.6	Avaliação da atividade hidrolítica do vacúolo parasitóforo de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> por degradação do DQ-BSA	39
5.7	Marcação de vacúolos parasitóforos induzidos por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com a sonda lisossomal LysoTracker	40
5.8	Avaliação da presença de LAMP e LC3 nos vacúolos parasitóforos induzidos por <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	41
5.9	Marcação de <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i> com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE)	41
5.10	Imunomarcação	41
5.11	Análise das imagens	44
5.12	Produção de bactérias quimicamente competentes	44
5.13	Transformação de bactéria <i>E. coli</i> quimicamente competente	44
5.14	Extração do plasmídeo das colônias transformadas	45
5.15	Transfecção	45
5.16	Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 no curso da infecção	46
5.17	Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 na interação (<i>binding</i>) e fagocitose	47
5.18	Análise estatística	47
6	RESULTADOS	49
6.1	Caracterização do vacúolo parasitóforo quanto a características autofágicas	49
6.2	Expressão LC3	66

6.3	Efeito da superexpressão da LC3 em células RAW infectadas com <i>L. amazonensis</i> ou <i>L. major</i>	68
7	DISCUSSÃO.....	73
8	CONCLUSÕES.....	79
9	PERSPECTIVAS.....	80
10	REFERÊNCIAS.....	81
11	Apêndice - ESBOÇO DO ARTIGO CIENTÍFICO.....	92

1 INTRODUÇÃO

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, devido à alta incidência em países em desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose acomete cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo e está presente em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (ALVAR *et al.*, 2012).

Esta doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que pode desenvolver-se nas formas cutânea, mucocutânea e visceral (PEARSON *et al.*, 1983). 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; TESH, 1993). Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida, a forma de promastigota, flagelada, encontrada no vetor (*Lutzomyia* – nas Américas; *Phlebotomus* – no continente europeu, africano e asiático) e a forma de amastigota, com flagelo contido na bolsa flagelar em células do sistema monocítico fagocitário no hospedeiro vertebrado (CHANG; CHANG, 1986; GRIMALDI; TESH, 1993; LASKAY *et al.*, 2003).

A infecção de macrófagos por *Leishmania* resulta da interação entre ligantes presentes na superfície do parasito e múltiplos receptores presentes na célula, como os receptores para frações do complemento, CR1 e CR3 (BLACKWELL *et al.*, 1985; MOSSER; EDELSON, 1985), e os de reconhecimento de padrão como receptores fucose-manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH; GORDON, 2000). Os ligantes mais abundantes presentes na superfície do parasito são LPG (lipofosfoglicano) e gp63 (glicoproteína de 63 KDa) (BEVERLEY; TURCO, 1998; RUSSELL; WILHELM, 1986).

Após o contato entre receptores da célula hospedeira e ligantes do parasito, promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* são internalizadas e passam a localizar-se dentro de vacúolos parasitóforos. Estudos evidenciaram que a biogênese desses compartimentos ocorre em diferentes etapas: i) inicialmente, fusionam com endossomos tardios (CHANG; DWYER, 1978; RABINOVITCH *et al.*, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1983) ii) posteriormente, fusionam com lisossomos da célula hospedeira, tornando-se fagolisossomos, que são ácidos ($\text{pH} \leq 5$), ricos em enzimas hidrolíticas e suas membranas apresentam proteínas características de endossomos tardios, lisossomos (ALEXANDER; VICKERMAN, 1975; CHANG; DWYER, 1978; RABINOVITCH *et al.*, 1985). Existem evidências que os vacúolos parasitóforos também apresentam proteínas das membranas do retículo endoplasmático (NDJAMEN *et al.*, 2010). Dentre as proteínas adquiridas nas membranas dos vacúolos parasitóforos destacam-se a bomba vacuolar H^+ -ATPase (ANTOINE *et al.*, 1998; STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994), a proteína G monomérica rab 5 e rab 7 (COURRET *et al.*, 2002; DUCLOS; DESJARDINS, 2000), Catepsina D (PRINA *et al.*, 1990), LAMP-1 (LANG *et al.*, 1994; RUSSEL *et al.*, 1992), LAMP-2 (RUSSEL *et al.*, 1992), calnexina (NDJAMEN *et al.*, 2010) e Sec22b (NDJAMEN *et al.*, 2010). Apesar dos vacúolos parasitóforos induzidos por diferentes espécies de *Leishmania* compartilharem tais características, há diferenças significativas no tamanho desses compartimentos. Vacúolos parasitóforos resultantes da infecção por espécies de *Leishmania* do complexo Mexicana, *Leishmania mexicana* e *L. amazonensis*, apresentam grandes dimensões e contêm uma grande quantidade de amastigotas (RABINOVITCH *et al.*, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1983; VERAS *et al.*, 1992), enquanto *L. major* e *Leishmania donovani* induzem a formação de vacúolos parasitóforos pequenos, com pouco espaço ao redor das amastigotas (ANTOINE *et al.*, 1998; CHANG; DWYER, 1978). Até o presente momento, as razões dessas diferenças não encontram-se esclarecidas.

Foi demonstrado que compartimentos induzidos por microrganismos celulares são capazes de interagir com a via autofágica, adquirindo características autofagossomais (BÉRON *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*,

2005). A autofagia é um processo conservado evolutivamente, responsável pela degradação de organelas e proteínas durante a diferenciação celular e em situações de estresse (PINHEIRO *et al.*, 2009). Nesse processo, os componentes citosólicos são englobados por um compartimento denominado de autofagossomo que, posteriormente, se funde com lisossomos. As fases iniciais de formação do autofagossomo dependem da associação da proteína VPS34 em um complexo, que se associa a uma outra proteína chamada beclina (LEVINE; DERETIC, 2007). A expansão da membrana autofagossomal é um processo mediado por proteínas denominadas Atg (do inglês *autophagy-related proteins*), uma delas é a Atg8 que, em mamíferos, é denominada de LC3 (LANG *et al.*, 1998; KIRISAKO *et al.*, 2005).

Estudos sugerem que a via autofágica desempenha um papel na resposta imune inata protegendo a célula hospedeira contra infecções causadas por microrganismos intracelulares (GUTIERREZ *et al.*, 2005; LEVINE; DERETIC, 2007). Gutierrez e colaboradores (2004) demonstraram que a indução de autofagia pode funcionar como um mecanismo de defesa em macrófagos humanos na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, inibindo a sobrevivência deste microrganismo dentro da célula hospedeira. No entanto, alguns patógenos intracelulares desenvolveram mecanismos distintos para sobreviver e se multiplicar dentro dos autofagossomos (BÉRON *et al.*, 2002). Outro estudo demonstrou que a indução de autofagia favorece a infecção e replicação da bactéria *Coxiella burnetii* em células de linhagem CHO (GUTIERREZ *et al.*, 2005). Assim, a via autofágica pode controlar ou promover o estabelecimento da infecção a depender da natureza do microrganismo (GUTIERREZ *et al.*, 2004; LEVINE; DERETIC, 2007).

Pouco se sabe sobre a interação de compartimentos da via autofágica com os vacúolos parasitóforos de *Leishmania*. Recentemente, Pinheiro e colaboradores (2009) mostraram que em macrófagos de diferentes linhagens de camundongos, a indução da autofagia exerce papéis distintos sobre a infecção por *L. amazonensis*. 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 esta espécie de parasito (PINHEIRO *et al.*, 2009).

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 (RUSSEL *et al.*, 1992). Em conjunto, esses dados sugerem que a via autofágica pode ser ativada pela infecção por *L. mexicana*, favorecendo o fornecimento de nutrientes e, conseqüentemente, a sobrevivência deste parasito no interior dos vacúolos parasitóforos.

Poucos trabalhos realizados descrevem o papel da interação de compartimentos da via autofágica com os vacúolos parasitóforos de *Leishmania*. Uma maior compreensão deste aspecto da infecção por *Leishmania* é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que incluam a modulação da fagocitose e da autofagia. No presente estudo, com o objetivo de esclarecer o papel da autofagia na maturação dos vacúolos parasitóforos de *Leishmania*, utilizamos o modelo de macrófagos de camundongos CBA. Nossa hipótese é que vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* interagem com compartimentos da via autofágica, favorecendo a sobrevivência do parasito em macrófagos de camundongos CBA. Por outro lado, em macrófagos infectados por *L. major* haveria interação restrita dos vacúolos parasitóforos com a via autofágica.

Assim, investigamos de forma comparativa a possível participação da proteína de compartimentos da via autofágica, LC3, na formação/biogênese e maturação dos vacúolos parasitóforos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. Primeiramente, avaliamos a presença de LAMP e LC3 bem como a marcação de LysoTracker[®] e DQ-BSA[™] nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major*, em macrófagos de camundongos CBA. Posteriormente, analisamos a influência da superexpressão de LC3 sobre a sobrevivência de *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos de CBA infectados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 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 (PERINOTO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, essa doença acomete cerca de 15 milhões de pessoas em todo mundo e está presente em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2010). 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 (WHO, 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 *L. braziliensis* e *L. amazonensis*; enquanto que as principais espécies causadoras dessa doença no continente europeu e na África sub-Sahariana são *L. tropica* e *L. major* (GRIMALDI; 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) e leishmaniose cutâneo-difusa (LCD). 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, LMC é secundária à lesão cutânea e surge após a cura espontânea ou ao tratamento inadequado da LC. Esta forma clínica de leishmaniose tegumentar é caracterizada por uma lesão inicial no local da picada do flebotomo e pelo surgimento posterior de lesões metastáticas nas mucosas das vias aéreas superiores: nariz, boca e, eventualmente, faringe e laringe. A LCD é uma forma rara, porém grave, de apresentação da doença, que no Brasil é causada pela *L. amazonensis*. Essa manifestação clínica inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e evolui com formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados por todo o corpo do paciente.

No Brasil, o número de casos de leishmanioses vem crescendo progressivamente nos últimos 20 anos, observando-se surtos epidêmicos nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica. No período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos de leishmaniose tegumentar e um predomínio nos indivíduos maiores de 10 anos, 90% dos casos, e do sexo masculino, 74% (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.2 O parasito

A leishmaniose é causada por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Estes parasitas apresentam duas fases distintas em seu ciclo de vida: um estágio flagelado no vetor (*Lutzomyia* – nas Américas; *Phlebotomus* – no continente europeu, africano e asiático) e um estágio amastigota no hospedeiro vertebrado (GRIMALDI; 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 (1) ingerem macrófagos parasitados (2). A lise dos macrófagos infectados resulta

na liberação das formas amastigotas (3) no estômago dos flebotomíneos, estas rapidamente se diferenciam em promastigotas procíclicas (4) que migram para a região anterior do trato digestivo do vetor, onde se multiplicam por fissão binária (5) (BATES; ROGERS, 2004). No intestino dos flebotomíneos ocorre a metaciclogênese (6), isto é, a transição das formas promastigotas não-infecciosas procíclicas em promastigotas metacíclicas infectivas (SACKS, 1992). Nesse processo, as promastigotas procíclicas sofrem um conjunto de alterações morfológicas, ultraestruturais e também na expressão gênica. Promastigotas metacíclicas apresentam redução e estreitamento do corpo celular, são extremamente móveis e possuem um longo flagelo, duas vezes maior que o tamanho do corpo celular (SACKS, 1989). Além disso, ocorrem alterações bioquímicas na molécula de superfície lipofosfoglicana (LPG) resultando na perda de adesão das formas metacíclicas ao epitélio do intestino do flebótomo (SACKS, 1989; McCONVILLE *et al.*, 1992). Consequentemente, as promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do flebótomo e durante o novo repasto sanguíneo (7) são inoculadas na pele do hospedeiro mamífero, juntamente com a saliva (8). As promastigotas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (9), onde se transformam na forma amastigota (10, 11). À medida que as formas amastigotas multiplicam-se (12,13), os macrófagos se rompem e liberam os parasitos (14 e 15), que podem ser fagocitados por outros macrófagos (16), dando continuidade ao seu ciclo de vida (BATES; ROGERS, 2004).

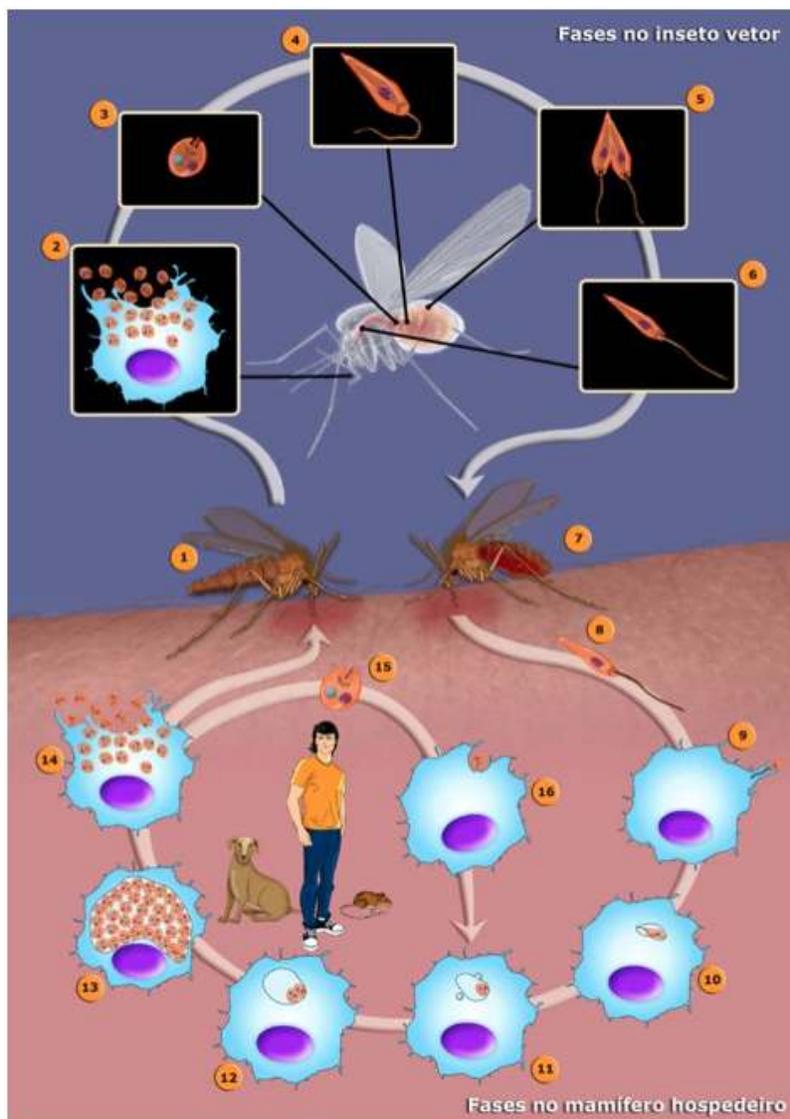


Figura 1 -Diagrama esquemático do ciclo de vida digenético da *Leishmania*(TEIXEIRA, 2013).

2.3 Modelo Murino

Apesar de não reproduzir fielmente a doença em humanos (HANDMAMet *al.*, 2001), modelos experimentais de leishmaniose são utilizados com objetivo de caracterizar o efeito da doença sobre o hospedeiro (AFONSO; SCOTT, 1993; AWASTHI *et al.*, 2004; HEINZEL *et al.*, 1989; HOWARDet *al.*, 1980; PEREZ *et al.*, 1979). Em modelos animais é possível mimetizar a resposta imuno-inflamatória observada em seres humanos quando expostos a uma variedade de espécies de *Leishmania* (GARG; DUBE, 2006). Assim, como em humanos, a leishmaniose murina 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).

Resistência ou susceptibilidade de uma linhagem de camundongo a uma determinada espécie de *Leishmania* está intimamente 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; SCOTT, 1991). No entanto, estudos posteriores demonstraram que a polarização Th1/Th2 não explica a resistência ou suscetibilidade a todas espécies de *Leishmania* (AFONSO; 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* (GOMES *et al.*, 2003; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000). Camundongos da linhagem CBA são susceptíveis a *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 *L. amazonensis*, em contraste a *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 *Leishmania* ssp. é suficiente para ativar a resposta imune do hospedeiro favorecendo ou não a infecção. Adicionalmente, esses dados indicam a importância dos macrófagos na resolução da infecção e dos parasitas no direcionamento da resposta imune do hospedeiro (GOMES *et al.*, 2003; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

2.4 Reconhecimento e fagocitose

Leishmania é um parasito intracelular obrigatório que vive e se

multiplica dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (RUSSELL; 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 (AWASTHI *et al.*, 2004; MOSSER; ROSENTHAL, 1993)

A ligação dos parasitos com a superfície celular dos macrófagos ocorre através de receptores CR1 e CR3 (BLACKWELL *et al.*, 1985; MOSSER; EDELSON, 1985) e de receptores de reconhecimento de padrão como receptores fucose-manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH; GORDON, 2000). Esses receptores reconhecem ligantes presentes na superfície do parasito, sendo LPG e gp63 (glicoproteína de 63 KDa) as principais moléculas envolvidas na interação macrófago-*Leishmania* (BEVERLEY; TURCO, 1998; RUSSELL; WILHELM, 1986).

gp63 e LPG são as moléculas mais abundantes na superfície das formas promastigotas e encontram-se ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana da *Leishmania*. gp63 auxilia na entrada da *Leishmania* na célula hospedeira e favorece a sobrevivência das formas promastigotas fagocitadas (CHANG; CHANG, 1986; CHAUDHURI *et al.* 1989). Em parasitos da espécie *L. amazonensis*, a molécula de ligação à heparina e os glicosíngolipídios específicos de amastigota têm sido associados ao processo de entrada desta espécie de *Leishmania* na célula hospedeira (LOVE *et al.*, 1993; STRAUS *et al.*, 1993). Por sua vez, LPG é necessário para o estabelecimento da infecção nos macrófagos e sobrevivência do parasito nos flebotomíneos. Estudos já demonstraram que LPG protege as formas promastigotas contra espécies reativas de oxigênio produzidas durante a fagocitose, da digestão dentro do fagolisossomo e da atividade da proteína cinase C (PKC) (DESCOTEAUX *et al.* 1991; HANDMAN *et al.*, 1986; SPATH *et al.*, 2003).

A sobrevivência das formas promastigotas de *L. major* e *L. donovani* após a fagocitose parece ser dependente da presença de LPG (HANDMAN *et al.*, 1986; McNEELY; 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* deficientes nessa molécula prolonga significativamente a sobrevivência do parasito dentro dos macrófagos (HANDMAN *et al.*, 1986; McNEELY; TURCO, 1990). Recentemente, Vinet e colaboradores (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. No entanto, estudos demonstraram que o LPG não é um importante fator de virulência de *L. mexicana* (ILG *et al.*, 2001)

2.5 Formação de vacúolo Parasitóforo

Após o contato entre receptores da célula hospedeira e ligantes do parasito, promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* são internalizadas e passam a localizar-se 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.*, 1998; STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994), a proteína G monomérica rab 5 e rab 7 (COURRET *et al.*, 2002; DUCLOS *et al.*, 2000), Catepsina D (PRINA *et al.*, 1990), LAMP-1 (LANG *et al.*, 1994; RUSSELL *et al.*, 1992), 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 fagossoma primário a endossoma tardio/fagolisossoma, que são ácidos (pH ≤ 5) e ricos em enzimas hidrolíticas (ALEXANDER; VICKERMAN, 1975; CHANG; DWYER, 1978; RABINOVITCH *et al.*, 1985). Recentemente, Ndjamen e colaboradores (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 (RABINOVITCH *et al.*, 1985; SHEPHERD *et al.*, 1983; VERAS *et al.*, 1992), enquanto *L. major* e *L. donovani* produzem vacúolos parasitóforos pequenos, com pouco espaço ao redor das amastigotas (ANTOINE *et al.*, 1998; CHANG; DWYER, 1978). Os mecanismos que resultam nessas diferenças entre os vacúolos parasitóforos não foram claramente demonstrados.

Os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* são capazes de fundir com fagossomas 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 fundem-se com fagossomas contendo bolas de látex e eritrócitos fixados (VERAS *et al.*, 1992, 1995; RABINOVITCH; VERAS, 1996). Real e Mortara (2012) demonstraram que os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* apresentam LAMP-1 já nas primeiras horas de infecção e que 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; 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; MORTARA, 2012).

Poucos estudos foram realizados afim 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. Em estudo

recente, foi evidenciado 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® (REAL; MORTARA, 2012). 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; MORTARA, 2012).

As formas amastigotas são resistentes 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; 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 anti-*Leishmania* eficiente, facilitando a sobrevivência do parasito e a manutenção da infecção.

2.6 Autofagia

O processo autofágico é conservado evolutivamente e ocorre de forma constitutiva em todos os tipos de células. 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; 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 assim a sobrevivência da célula (DUSZENKO *et al.*, 2011; LEVINE; DERETIC, 2007). Esse processo degradativo tem papel importante em células eucariotas, com reflexo em outros processos fisiológicos, tais como, 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; LEE *et al.*, 2012), 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; WATTIAUX, 1966). Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas com motivos pentapeptídeos ligadas a chaperonas são entregues aos lisossomos para degradação (BEJARANO; CUERVO, 2010; DICE, 2007). Por fim, no processo de macroautofagia, os componentes citosólicos são englobados por um compartimento denominado de autofagossomo que, posteriormente, se funde com lisossomos (KLIONSKY; EMR, 2000). O objeto de estudo da presente dissertação compreende a avaliação 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-quinase classe I e III (PI3Ks). A via de regulação da autofagia mais bem estudada em mamíferos é a da mTOR. Essa cinase 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). Interessantemente, a autofagia pode ser induzida farmacologicamente em células de mamífero tratadas com uma droga que inibe a atividade de mTOR, a rapamicina (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). Além do mais, Blommaert e colaboradores (1995) demonstraram que em hepatócitos de ratos tratados com rapamicina a autofagia pode ser induzida, mesmo na presença de aminoácidos.

As diferentes classes de PI3Ks podem inibir ou ativar o processo autofágico. Em presença de fatores de crescimento, PI3Ks 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; DERETIC, 2007). Já a PI3Ks classe 3 desempenha um papel essencial na nucleação da membrana do autofagossomo durante o processo autofágico (MARIÑO; LÓPEZ-OTÍN, 2004).

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; 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 (NAZARKO *et al.*, 2011; SUZUKI; OHSUMI, 2007; SUZUKI *et al.*, 2010).

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 PI3K de classe 3 (Vps 34), beclina 1 (Atg6), Atg 14 e p150 (1).

A expansão/elongação do fagóforo ocorre simultaneamente ao processo de nucleação (2). Dois sistemas de conjugação estão envolvidos na expansão do fagóforo, o sistema dependente de Atg12 (2a) e aquele de Atg8 (2b). No sistema de conjugação envolvendo Atg12, esta proteína é hidrolisada e ativada por Atg7 e, em seguida, transferida para associar-se a Atg10. Posteriormente, 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 associa-se à membrana do fagóforo em expansão e, após concluída a formação do autofagossomo, Atg12-Atg5-Atg16 dissocia-se da membrana desse compartimento (TANIDA *et al.*, 2004).

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. LC3 é sintetizada como uma forma precursora designada proLC3 e processada sequencialmente em LC3-I e -II (KABEYA *et al.*, 2000). ProLC3 é clivada por Atg4 na sua porção C terminal, aproximadamente 6 minutos após sua síntese no citoplasma (HEMELAAR *et al.*, 2003; MARINO *et al.*, 2003; KABEYA *et al.*, 2000, 2004; KIRISAKO *et al.*, 2000; 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) a qual 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.

Uma vez formado, o autofagossomo (3) amadurece por meio de fusão com lisossomos formando um compartimento com características lisossomais, denominado autolisossomo (4). Este compartimento apresenta ATPase vacuolar, pH ácido, LAMP1 e hidrolases lisossomais (HIRSIMAKI, 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) (DUNN, 1990b).

Estudos recentes demonstraram que compartimentos induzidos por microrganismos celulares são capazes de interagir com a via autofágica, adquirindo características autofagossomais (BÉRON *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2005).

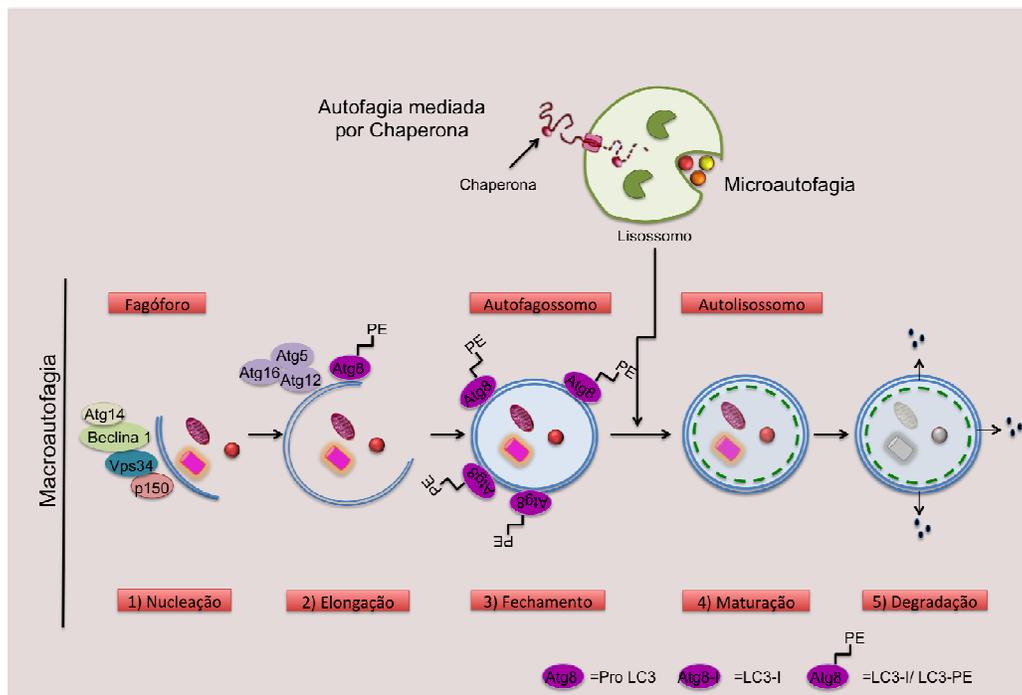


Figura 2-Representação esquemática da autofagia. Adaptado de YANG; KLIONSKY, 2010 e BAEHRECKE, 2005.

2.7 Participação da autofagia na formação dos compartimentos induzidos por microrganismos

Existem evidências que a autofagia pode participar do controle ou da multiplicação a depender da natureza do microrganismo. 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, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2004; LEVINE; DERETIC, 2007). No entanto, a interação com a via autofágica é favorável a alguns patógenos intracelulares, como *Staphylococcus aureus* e *Coxiella burnetii* (GUTIERREZ *et al.*, 2005; MESTRE *et al.*, 2010; SCHNAITH *et al.*, 2007; VAZQUEZ; COLOMBO, 2009).

Gutierrez e colaboradores (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 na infecção por esses microrganismos. Diferentemente, apesar dos vacúolos induzidos por *C. burnetti* serem permissivos à sua multiplicação, eles exibem características autofágicas. Berón e colaboradores (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. burnetti* 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 do vacúolo de *C. burnetti*.

Interessantemente, *C. burnetti* sobrevive e multiplica-se dentro de vacúolos de grande tamanho e composição semelhantes aos induzidos por *Leishmania* do complexo Mexicana, *L. amazonensis* ou *L. mexicana* (ANTOINE *et al.*, 1990; MAURIN *et al.*, 1992; VERAS *et al.*, 1994, 1995). Até o momento, poucos estudos foram realizados com o objetivo de investigar o papel da autofagia na biogênese do vacúolo parasitóforo induzido por *Leishmania*. Estudo pioneiro realizado por Schaible e colaboradores (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.

Recentemente, Pinheiro e colaboradores (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 a aumento da carga parasitária por *L. amazonensis*, enquanto que, em macrófagos de camundongos resistentes da linhagem C57BL/6, resulta em controle da infecção. Adicionalmente, esses autores 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).

Assim, no presente estudo, verificamos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, a possível participação de LC3 na gênese e maturação dos vacúolos parasitóforos destas espécies de *Leishmania*. Primeiramente, avaliamos quanto a características autofágicas, os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos de CBA. Posteriormente, avaliamos a influência da superexpressão de LC3 sobre a sobrevivência de *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos de CBA infectados.

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* interagem com compartimentos da via autofágica, favorecendo a sobrevivência do parasito em macrófagos de camundongos CBA. Por outro lado, em macrófagos infectados por *L. major* haveria interação restrita dos vacúolos parasitóforos com a via autofágica.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

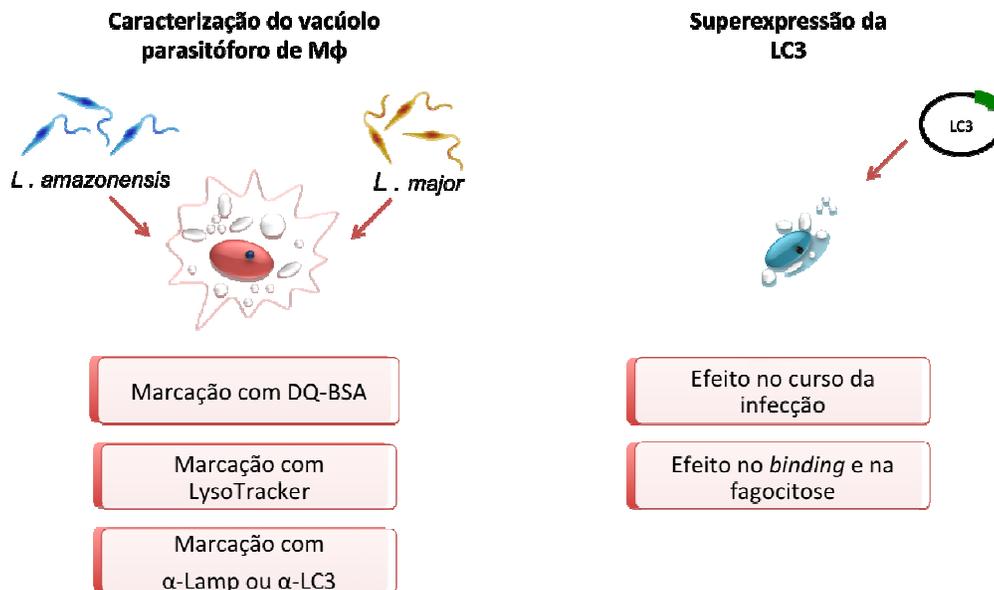
Verificar e comparar a participação da autofagia na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos murinos.

4.2 Específicos

- a) Avaliar comparativamente os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* ou *L. major*, quanto a características autofágicas, em macrófagos de camundongos CBA.
- b) Determinar o efeito da modulação da proteína LC3 na sobrevivência intracelular de *L. amazonensis* ou *L. major*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Abordagem Geral



5.2 Obtenção de macrófagos peritoneais

Para obtenção de macrófagos peritoneais inflamatórios, 2,5 mL de tioglicolato (3%) (Sigma-Aldrich) foram injetados na cavidade peritoneal de camundongos CBA, segundo protocolo modificado de Gomes e colaboradores 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) (Blausiegel). Em seguida, os macrófagos foram plaqueados em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*) completo [suplementado com 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico) pH 7,4, 2 mM de glutamina, bicarbonato de sódio 2 g/L e 10% de soro bovino fetal(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 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo 012/2012. Os animais foram

mantidos e manipulados dentro das normas preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais.

5.3 Cultivo de células

Células RAW foram utilizadas no presente trabalho, pois diferentemente dos macrófagos primários, podem ser transfectadas, o que permitiu avaliar o efeito da superexpressão de LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. As células RAW foram cultivadas em meio DMEM completo e mantidas em cultura por até sete passagens, em estufa a 37°C suplementada com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Ao atingirem 80 a 90% de confluência, as células foram incubadas com Tripsina-EDTA 1x (Gibco) e após 5 min, soltas com jatos de solução de tripsina 1x. As células foram então recolhidas e centrifugadas a 720 x g a 4°C por 10 min e o sedimento foi ressuspenso em meio DMEM completo. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na concentração de 2x10⁵ por poço, em placas de 24 poços, para execução dos experimentos.

5.4 Cultura de *Leishmania*

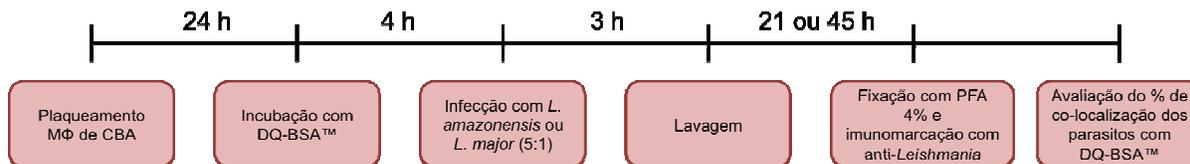
Culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) e *L. major* (MHOM/RI/-/WR-173) foram mantidas por passagens sucessivas em meio *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich) suplementado com 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) e 10% de sorobovino fetal (Gibco®), segundo protocolo modificado de Gomes e colaboradores 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 5x10⁵ e 5x10⁶ 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.

5.5 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 como descrito por Spath e Berveley (2001). Inicialmente, os parasitos foram recolhidos e lavados em meio DMEM completo a $1.781 \times g$ por 10 min a 25°C . Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspensionado 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) 10% diluído em Meio 199 (Sigma-Aldrich) e 2 mL de Ficoll-Paque a 40% diluído em PBS. O gradiente foi submetido à centrifugação a $365 \times g$ 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 $1.781 \times g$ por 10 min a 25°C . A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer e os parasitos foram utilizados em concentrações de acordo com os experimentos.

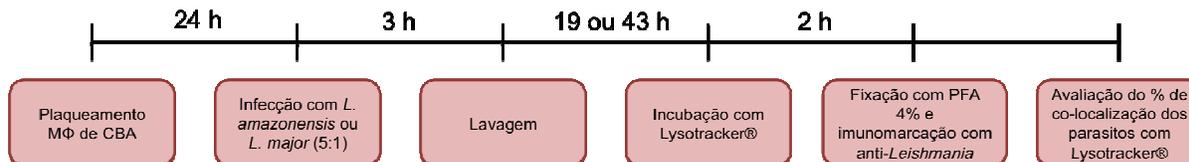
5.6 Avaliação da atividade hidrolítica do vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* ou *L. major* por degradação do DQ-BSA



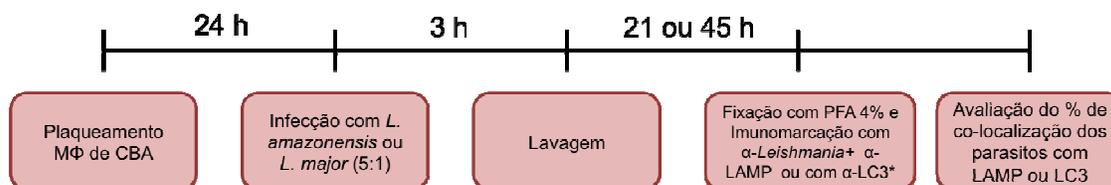
A capacidade hidrolítica de vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major* foi avaliada utilizando DQ-BSA™ (DQ™ Red BSA; Molecular Probes), que é internalizado pela via endocítica e uma vez hidrolisado por ação de enzimas hidrolíticas presentes nos endossomas tardios/lisossomas torna-se fluorescente, como descrito por Lerena e Colombo (2011). Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5) foram plaqueados em poços de placas de 24 poços em meio DMEM completo.

Após 24h, as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% e incubadas com 10mg/mL de DQ-BSA por 4h 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*, na proporção de 5:1. Transcorridas 3 horas de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 3, 21 e 45 h, totalizando 6, 24 e 48h respectivamente. Após os diferentes tempos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e armazenadas a 4°C.

5.7 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), como descrito por Aguilera e colaboradores (2009). Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5) 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*, na proporção de 5:1. Transcorridas 3 h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 19 e 43 h. Em seguida, os macrófagos foram incubados com 1 μ M de LysoTracker® Red DND-99 (Molecular Probes) por 2 h, totalizando 24 e 48 h de infecção. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e armazenadas a 4°C.



5.8 Avaliação da presença de LAMP e LC3 nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major*

Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5) 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*, na proporção de 5:1. Transcorridas 3 h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 19 e 43 h. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e armazenadas a 4°C. Posteriormente, foi realizada marcação para Lamp-1 e LC3, seguindo o protocolo descrito em 4.10 *Imunomarcação*.

5.9 Marcação de *L. amazonensis* ou *L. major* com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE)

Para avaliar a presença de LC3 nos vacúolos parasitóforo de *L. amazonensis* ou *L. major* foi realizada a marcação dos parasitos com CFSE (Sigma-Aldrich, 21888), segundo protocolo modificado de Chang e colaboradores (2007). A marcação com CFSE foi necessária uma vez que, tanto o anti-LC3 quanto o anti-*Leishmania* são produzidos em coelho, inviabiliza a distinção entre as duas marcações. Os parasitos (10^8) foram incubados em 4 mL de solução de NaCl 0,9% contendo 1 μ M de CFSE, por 15 minutos 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 1.781 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.

5.10 Imunomarcação

As células fixadas com solução de paraformaldeído 4% foram lavadas 3 vezes com PBS (do inglês *Phosphate Buffered Saline*) e incubadas com

NH₄Cl 50mM durante 15min. Posteriormente, as células foram lavadas com PBSe permeabilizadas durante 30min, utilizando PBST 2% (2% de Tween 20 em PBS). Em seguida, as células foram lavadas com PBST 0,1% e foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com PBST 0,1% contendo 10% de soro de camundongo (abcam, ab7486) inativado e 0,1% de gelatina de teleósteos (Sigma-Aldrich) por 40 min. Após o tempo de bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 1) diluído em PBST-gelatina 0,1%, por 16h a 4°C. Como controle negativo da imunomarcção, as células foram incubadas com soro ou 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 PBST 0,1% e expostas ao anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor (1:200). Por fim, as células foram lavadas três vezes com PBST 0,1% seguidas de três lavagens com PBS e as lâminas foram então montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x. Todos os passos, em que a temperatura não foi mencionada, foram realizados à temperatura ambiente.

Tabela 1: Anticorpos utilizados em imucitoquímicas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*

Anticorpo primário	Fabricante	Diluição	Origem	Controle negativo	Fabricante	Anticorpo secundário	Fabricante
anti- <i>Leishmania</i>	FIOCRUZ Rio de Janeiro	1:1000	Coelho	Soro de coelho	FIOCRUZ Rio de Janeiro	anti-IgG de coelho AlexaFluor 488	Molecular Probes (A21206)
anti-LC3	Sigma-Aldrich (L7543)	1:200	Coelho	IgG de Coelho	Sigma-Aldrich (I-8140)	anti-IgG de coelho AlexaFluor 568	Molecular Probes (A11011)
anti-LAMP	Santa Cruz (sc-8098)	1:250	Cabra	IgG de Cabra	Sigma-Aldrich (I-9140)	anti-IgG de cabra AlexaFluor 568	Molecular Probes (A11057)

5.11 Análise das imagens

As imagens do núcleo corado com DAPI (azul), *Leishmania* marcada com anticorpo anti-*Leishmania* (verde), dos marcadores estudados (vermelho) e da fase foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus). Em seguida, as imagens foram montadas no programa Adobe Photoshop CS6 e a quantificação de células infectadas e da co-localização (amarelo) dos parasitos com o marcador foi realizada manualmente no programa Image-Pro[®] Plus Version 6.2 (Media Cybernetics). O percentual de co-localização foi determinado pela razão do número de células com co-localização dos parasitos com o marcador pelo número de células infectadas.

5.12 Produção de bactérias quimicamente competentes

Bactérias *E. coli* DH5- α [™] foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (1% de triptona; 0,5% de extrato de levedura e 170 mM de NaCl) 37°C, a 250 rpm por 18 h. Decorrido este intervalo, 50 μ l da cultura foram transferidos para um tubo com 10 mL de meio LB e submetido à agitação, nas condições anteriormente citadas, por 2h e 30min. Após mensuração da densidade óptica (D.O.) da cultura em espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) sob comprimento de onda de 600 nm e obtido um valor entre 0,2 e 0,3, as bactérias foram colocadas no gelo por 10 min e, em seguida, submetidas a uma centrifugação de 5 min a 1800xg a 4°C. Para tornar as bactérias quimicamente competentes, o sedimento foi ressuspensão em 10mL de CaCl₂ (50 mM) e a solução centrifugada por 5min a 1800xg e 4°C. O sedimento foi novamente ressuspensão em 1 mL de CaCl₂ (50 mM) e aliquoteado em volumes de 100 μ L. As bactérias quimicamente competentes foram então transformadas com o plasmídeo de interesse.

5.13 Transformação de bactéria *E. coli* quimicamente competente

Uma alíquota de 100 μ L de bactérias DH5- α competentes foi transformada com cerca de 100ng do plasmídeo de interesse: pmRFP-LC3

(Addgene plasmid 21075) ou pmRFP-C1 (plasmídeo gentilmente cedido por Tamotsu Yoshimori, Universidade de Osaka). Em seguida, esta ressuspensão foi mantida em gelo por 30 min, submetida a um choque térmico na temperatura de 42°C por 90 seg e recolocada em gelo. Após 30seg, 1 mL de LB foi adicionado em cada uma das alíquotas e estas foram incubadas a 37°C por 1 h para permitir que a bactéria expressasse o gene de resistência ao antibiótico de seleção. Cerca de 100 µL das bactérias transformadas foram distribuídas em placas de Petri contendo meio LB-ágar e o antibiótico de seleção kanamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 h e alocadas em geladeira a 4°C.

5.14 Extração do plasmídeo das colônias transformadas

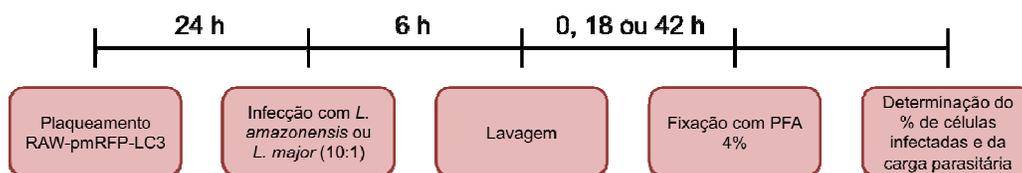
As colônias transformadas foram cultivadas em 25 mL de meio LB com 50 µg/mL de kanamicina a 37°C, 250 rpm por 18h. Após o crescimento, foi realizada a extração dos plasmídeos por meio do Plasmid® Mini Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Os plasmídeos foram quantificados utilizando o NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) e visualizado em gel de agarose a 1,5%. Uma alíquota de 800 µL do meio de cultura contendo as bactérias foram semeados em criotubos contendo 70 µL de DMSO e preservados a -70°C.

5.15 Transfecção

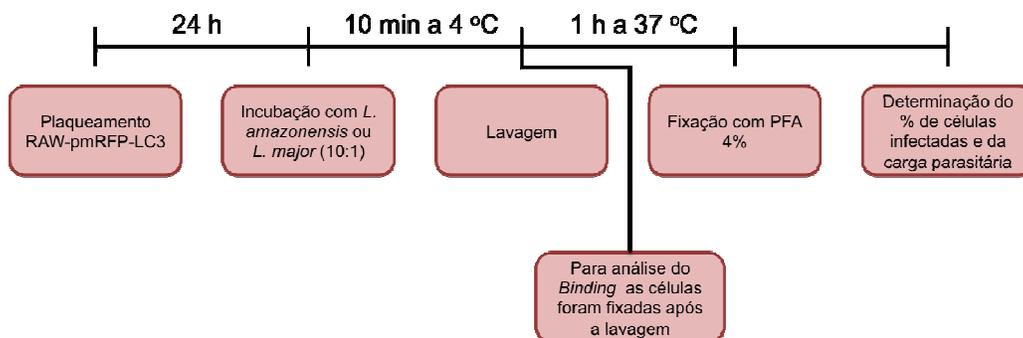
Células de linhagem macrofágica RAW 264.7 foram transfectadas com os plasmídeo pmRFP-LC3 ou pmRFP-C1 pelo método Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). As células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^5 células por poço com meio DMEM sem antibiótico. Após 24h, o meio de cultura foi removido e foi adicionado 500 µL de meio sem antibiótico e sem soro bovino fetal. Cerca de 800 ng da solução contendo o plasmídeo de interesse foi diluída em 50 µL de meio DMEM sem antibiótico e sem soro bovino fetal e paralelamente 0,8 µL da solução de lipofectamine foi diluída no mesmo volume de meio, as soluções foram então combinadas e incubadas por 30min à temperatura ambiente. Após o tempo

de incubação, 100 µL dessa solução de lipossoma contendo o plasmídeo de interesse foi adicionada às células que foram incubadas por 5h a 37°C. Decorridas 5h, foram adicionados 400 µL de meio DMEM completo. No dia seguinte, foi iniciado o processo de seleção das células com expressão estável dos plasmídeos com a adição do antibiótico G418 (Sigma-Aldrich) na concentração de 600 µg/mL ao meio de cultura.

5.16 Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 no curso da infecção



Células RAW superexpressando LC3 foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1. Após 6h, tempo zero, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por 18 e 42 h, totalizando 6, 24 e 48 h de infecção. Após os diferentes tempos de incubação, as células foram fixadas com PFA 4% durante 15 min e montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR), como descrito por Huynh e colaboradores (2006). Em seguida, as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x. A porcentagem de células infectadas e a carga parasitária foi determinada por meio de contagem utilizando o programa Image-Pro[®] Plus Version 6.2 (Media Cybernetics).



5.17 Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 na interação (*binding*) e fagocitose

Com intuito de avaliar o efeito da superexpressão de LC3 no *binding* e fagocitose de *L. amazonensis* ou *L. major*, células RAW superexpressando LC3 foram plaqueadas em poços de 24 poços em meio DMEM completo. Após 24h, as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% e incubadas com meio DMEM [suplementado com 25 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico) pH 7,4, 2 mM de glutamina, bicarbonato de sódio 0,2 g/L e 10% de soro bovino fetal] por 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de 10:1 e centrifugadas a 4°C por 5 min a 720 x ge incubadas a 4°C por mais 5 min, esta etapa permite a interação sem que haja fagocitose dos parasitos. Após esse período as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados. Para o estudo de interação as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e para estudo da fagocitose as células foram reincubadas com meio DMEM completo em estufa suplementada com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após 1 h, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15min e montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR), como descrito por Huynh e colaboradores (2006). Em seguida, as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 (Olympus) no aumento de 400x.

5.18 Análise estatística

Os gráficos e a análise estatística foram realizados utilizando o programa GraphPad Prism, versão Mac 5.0c - GraphPad Software. Os gráficos em barra representam as médias \pm SD (desvio padrão) dos grupos dentro de um experimento. 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. As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significante quando o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização do vacúolo parasitóforo quanto a características autofágicas

Com intuito de avaliar a presença de atividade hidrolítica no vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* ou *L. major*, macrófagos de camundongo CBA foram incubados com DQ-BSA™, marcador funcional de compartimentos degradativos, conforme descrito em Material e Métodos (item 4.6). A figura 3 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização dos parasitos marcados em verde com os vacúolos parasitóforos marcados com DQ-BSA™ em vermelho. Após 24 h de infecção, foi observado que em 20,97% dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* houve co-localização dos parasitos marcados com vacúolos contendo DQ-BSA™ hidrolisado. Por outro lado, nos macrófagos infectados com *L. major* o percentual de co-localização foi de 59,47% ($p < 0,01$, Figura 3). Resultado similar foi observado no tempo de 48 h, no qual houve 20,75% de co-localização nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, enquanto que a co-localização foi de 47,14% em macrófagos infectados com *L. major* ($p < 0,01$, Figura 4).

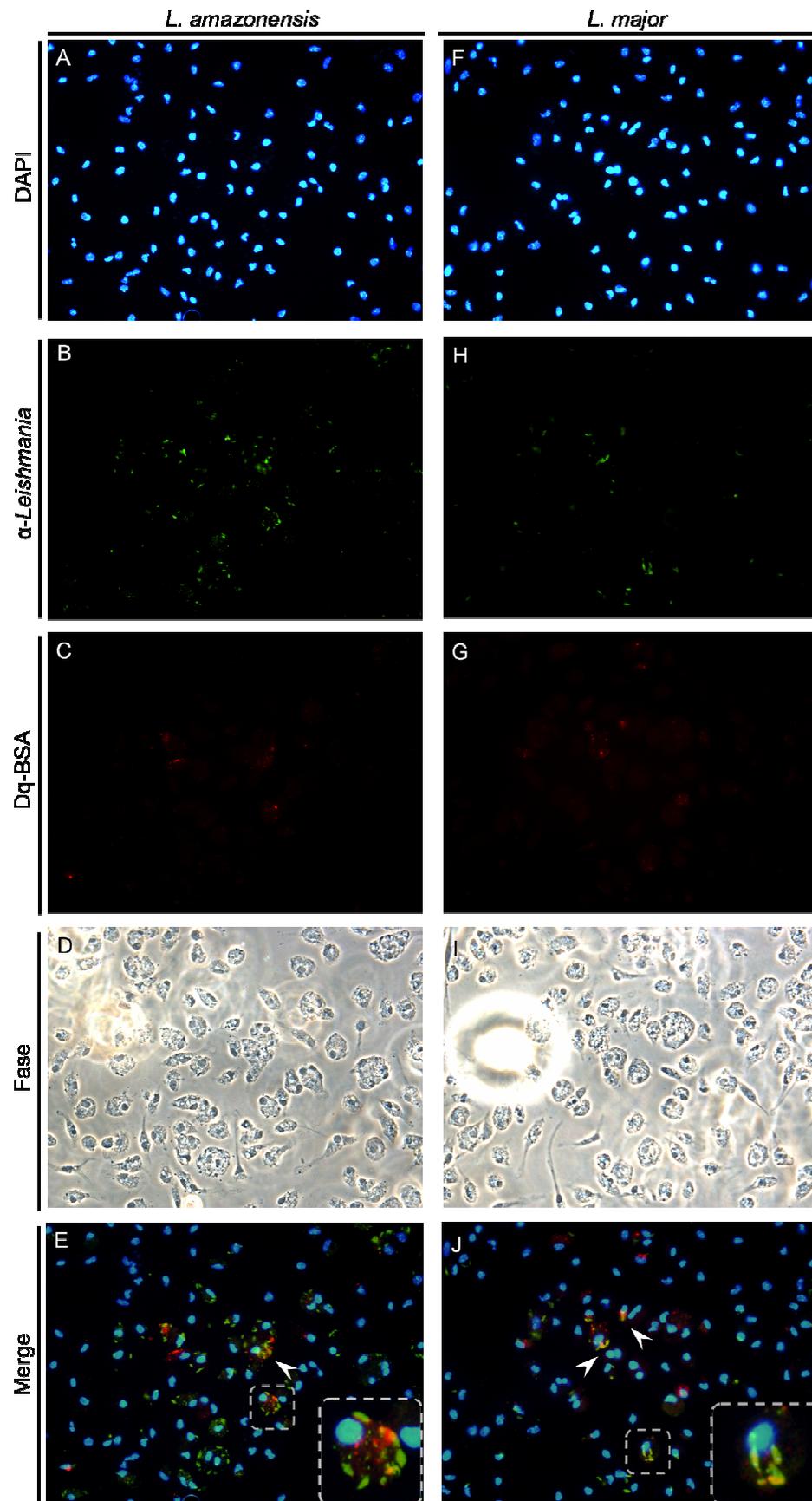


Figura 3—Marcação com DQ-BSA™ de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por microscopia de fluorescência. Macrófagos de camundongos CBA foram incubados por 4 h com 10 mg/mL de DQ-BSA™ (vermelho) e em seguida infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J), na proporção de 5:1. Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 21 e 45 h. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta brancas correspondem a co-localização de *Leishmania* com DQ-BSA™. As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

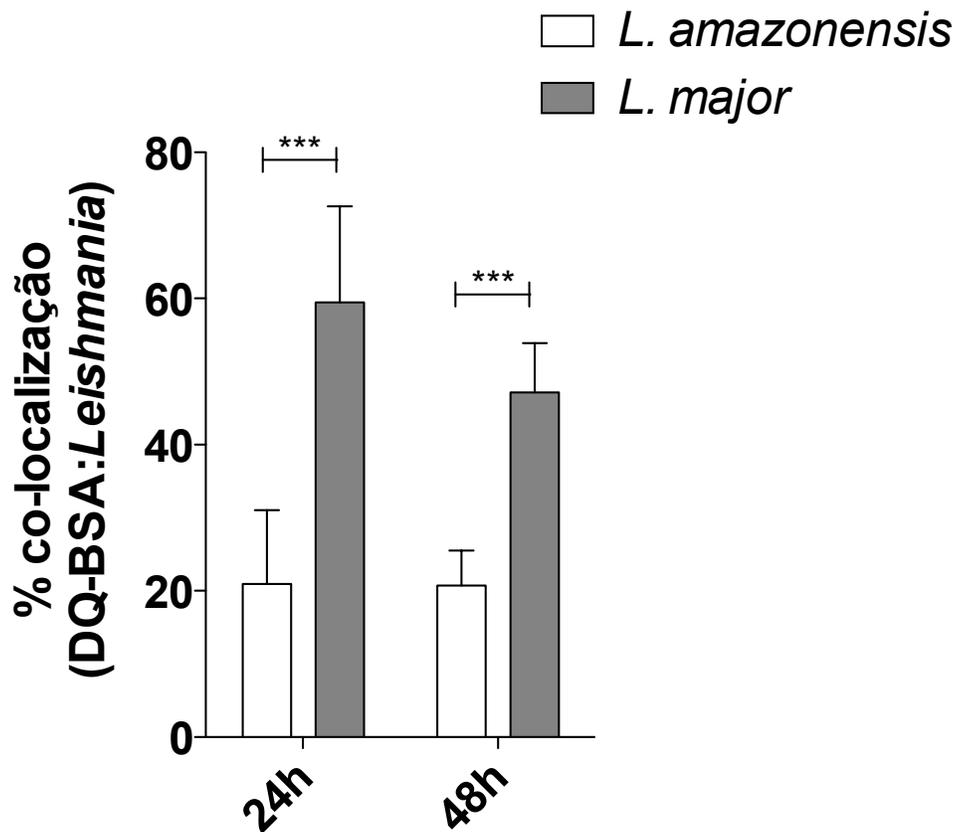


Figura 4-Percentual de co-localização de *L. amazonensis* ou *L. major* com vacúolos contendo DQ-BSA™ hidrolisado. Macrófagos de camundongos CBA, previamente incubados com DQ-BSA™, foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 48. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com o DQ-BSA™. Experimento representativo de três realizados realizados em quintuplicata. Teste *t* de Student *** $p < 0,001$.

Adicionalmente, foi estimada a co-localização dos vacúolos marcados com LysoTracker[®], que se acumula em compartimentos lisossomais, e os parasitos. A figura 5 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização dos parasitos marcados em verde com os vacúolos parasitóforos marcados com LysoTracker[®] em vermelho. A co-localização dos vacúolos marcados com LysoTracker[®] e os parasitos foi quantificada e observou-se que, em 31,62% dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, houve co-localização dos parasitos marcados com vacúolos contendo LysoTracker[®]. Por outro lado, em macrófagos infectados por *L. major*, foi observada co-localização em 50,74% ($p < 0,01$, Figura 6). Essa diferença no percentual de co-localização foi mantida após 48h de infecção, observada em 31,91% dos macrófagos infectados por *L. amazonensis* e em 46,88% daqueles infectados por *L. major* ($p < 0,01$, Figura 6).

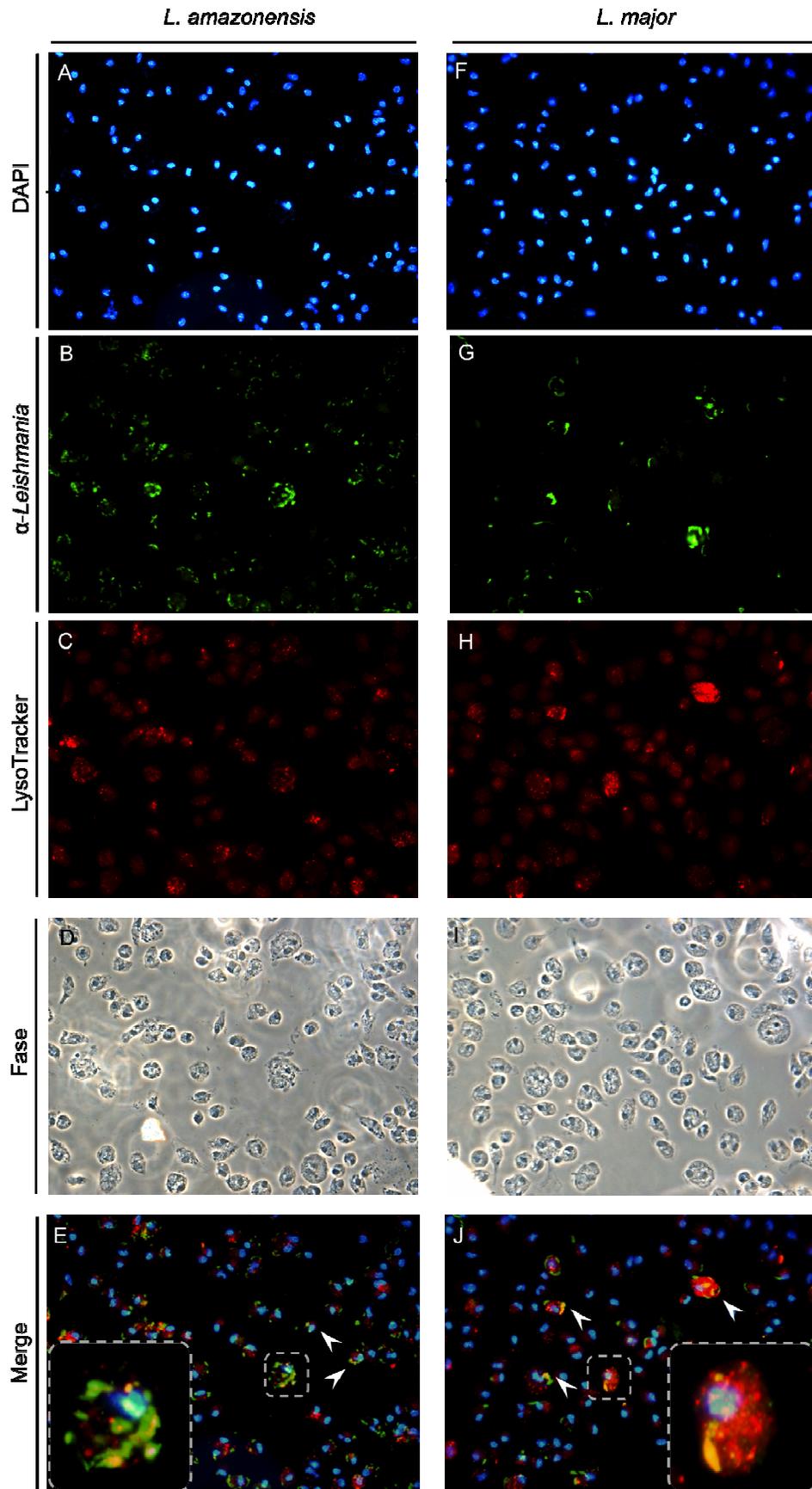


Figura 5– Marcação com LysoTracker® de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por microscopia de fluorescência. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J), na proporção de 5:1. Após 3h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 19 ou 43 h. Após este período, as células foram incubadas com LysoTracker® (vermelho). Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta branca correspondem a co-localização de *Leishmania* com LysoTracker®. As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

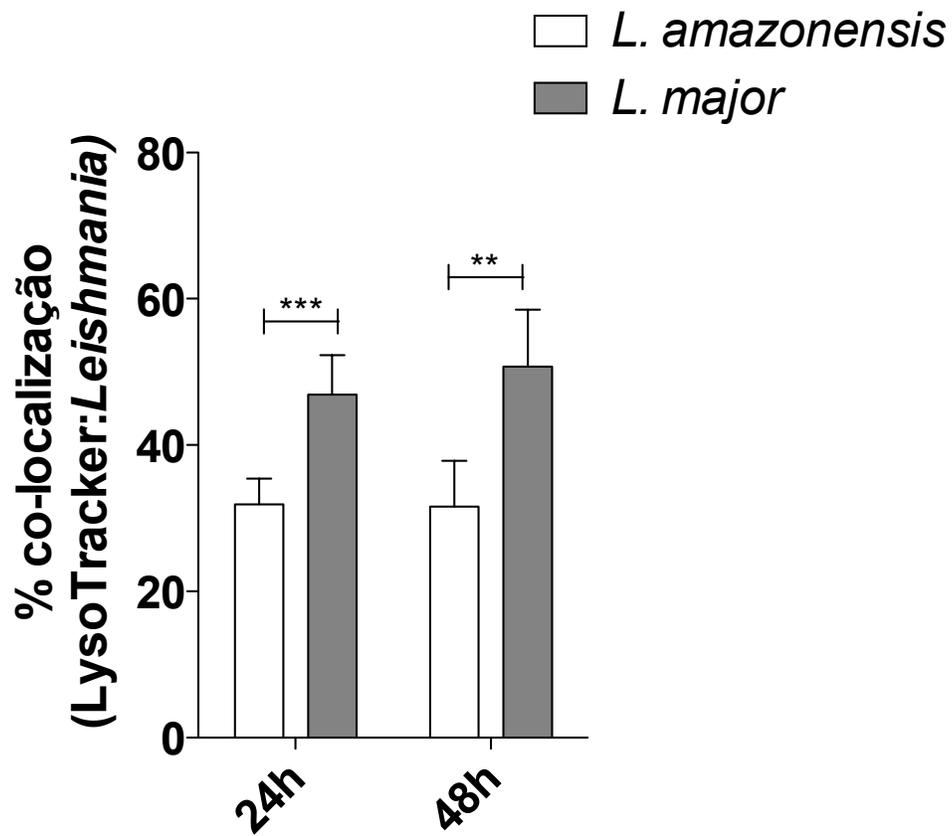


Figura 6-Percentual de co-localização de *L. amazonensis* ou *L. major* marcados com vacúolos contendo LysoTracker®. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*, na proporção de 5:1. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* e, em seguida, incubados com LysoTracker®. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos anti-*Leishmania* seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com o LysoTracker®. Experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste *t* de Student *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Após caracterizarmos os vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major* utilizando marcadores solúveis, avaliamos a presença dos marcadores de membrana: LAMP, proteína de compartimento lisossomal, e LC3, proteína específica de autofagossomo. A figura 7 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização dos parasitos marcados em verde com a proteína LAMP marcada em vermelho. Pelo fato de LAMP ser uma proteína de compartimento lisossomal, esperávamos uma marcação pontual, no entanto a observação das imagens 7C e H demonstraram uma marcação difusa presente em todo citoplasma das células. Com intuito de obter uma marcação de LAMP com padrão característico (KÖRNER *et al.*, 2006; LANG *et al.*, 1994; REAL e MORTARA, 2012; RUSSELL *et al.*, 1992) diminuimos a concentração do anticorpo utilizado no processo de imunomarkação. No entanto, o padrão de marcação manteve-se o mesmo, diminuindo apenas em intensidade (dado não mostrado). Assim, a quantificação da co-localização dos vacúolos marcados com anti-LAMP e os parasitos foi determinada na maior concentração de anticorpo anti-LAMP. Não foi observada diferença no percentual de co-localização de LAMP com *L. major* ou *L. amazonensis*,(Figura 8).

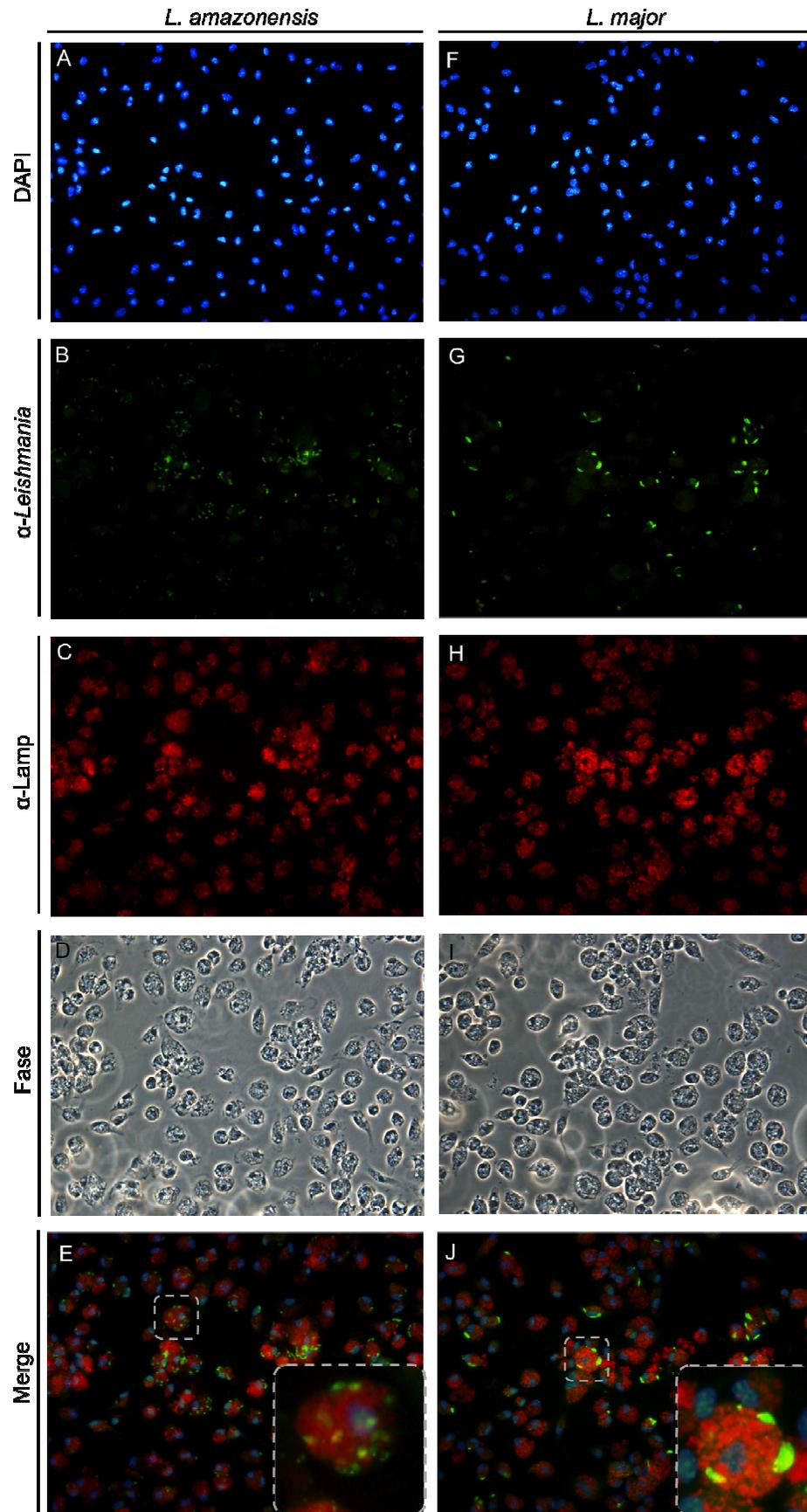


Figura 7- Marcação com anti-LAMP de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por microscopia de fluorescência. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J), na proporção de 5:1. Após 3h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 21 ou 45h. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmaniae* anti-LAMP seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (verde) e anti-IgG de cabra conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (vermelho), respectivamente. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta branca correspondem a colocalização de *Leishmania* com LAMP. As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

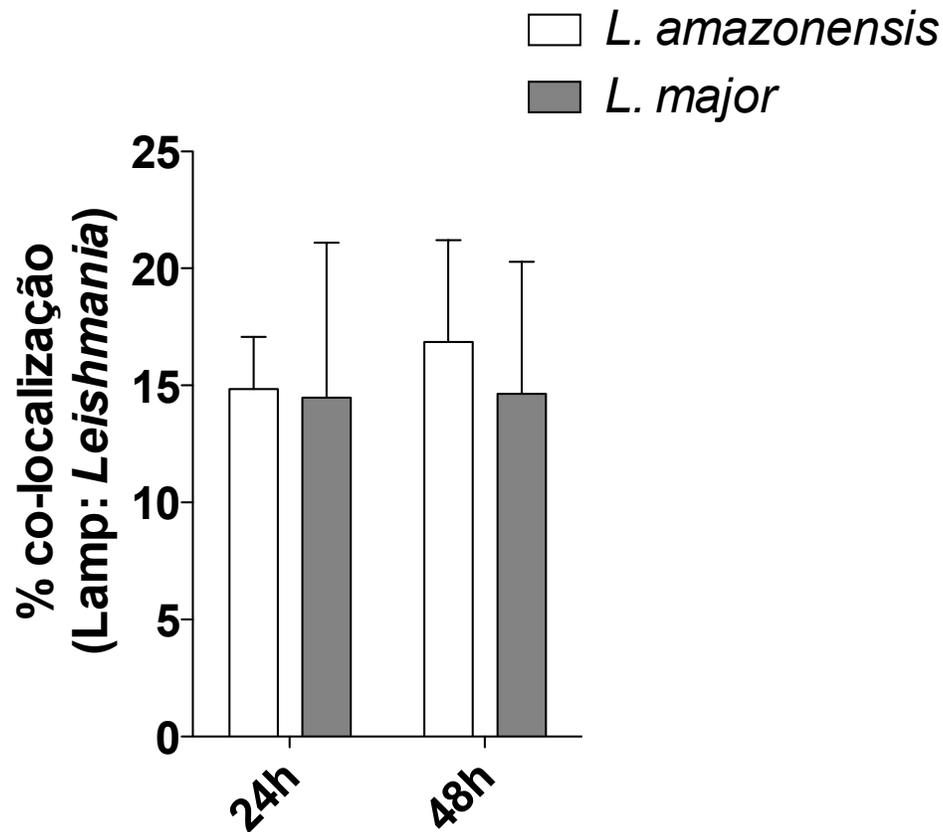


Figura 8-Percentual de co-localização de *L. amazonensis* ou *L. major* com a proteína LAMP. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* e anti-LAMP seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 e anti-IgG de cabra conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488, respectivamente. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com LAMP. Um experimento realizado em quintuplicata. Teste *t* de Student.

Em seguida, para melhor investigar a possível interação dos vacúolos parasitóforos de *Leishmania* com a via autofágica, avaliamos a marcação de LC3 endógeno em vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major*. A figura 9 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização dos parasitos marcados em verde com a proteína LC3 marcada em vermelho. Foi observada a expressão de LC3 endógeno tanto nos vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis* quanto aqueles induzidos por *L. major*. No entanto, houve maior percentual de co-localização de LC3 com parasitos em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, 28,39%, em comparação com aqueles infectados com *L. major*, 7,02% ($p < 0,01$, Figura 10).

Uma análise mais cuidadosa das imagens revelou que algumas células marcadas com o anti-LC3 exibem padrão de marcação similar ao observado com a marcação do parasito com carboxifluoresceína (Figura 11). Assim, há a possibilidade desse achado ter interferido na quantificação da co-localização dos parasitos marcados com carboxifluoresceína, em verde, e pela proteína LC3, em vermelho.

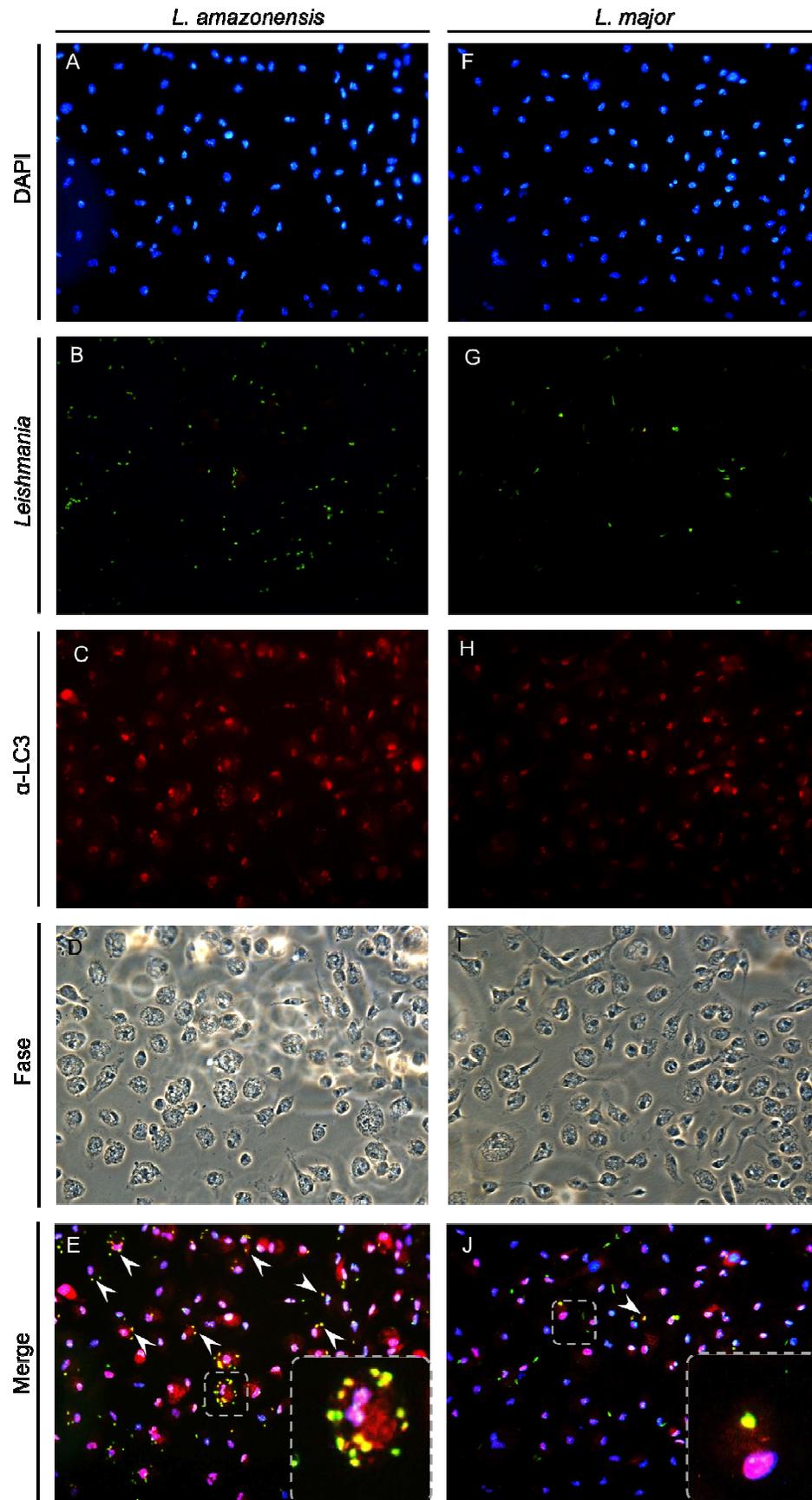


Figura 9– Marcação com anti-LC3 de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. major* por microscopia de fluorescência. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) previamente marcadas com carboxifluoresceína (verde). Após 3h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 21 ou 45 h. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-LC3 seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 568 (vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta branca correspondem à co-localização de *Leishmania* com LC-3. As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

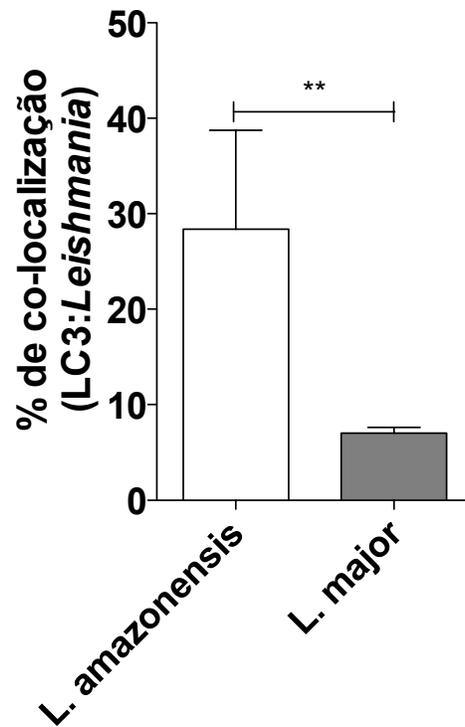


Figura 10- Percentual de co-localização de *L. amazonensis* ou *L. major* com a proteína LC3. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*, na proporção de 5:1. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou *L. major*. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-LC-3 seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 568. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com LC-3. Experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney, * $p < 0,01$.

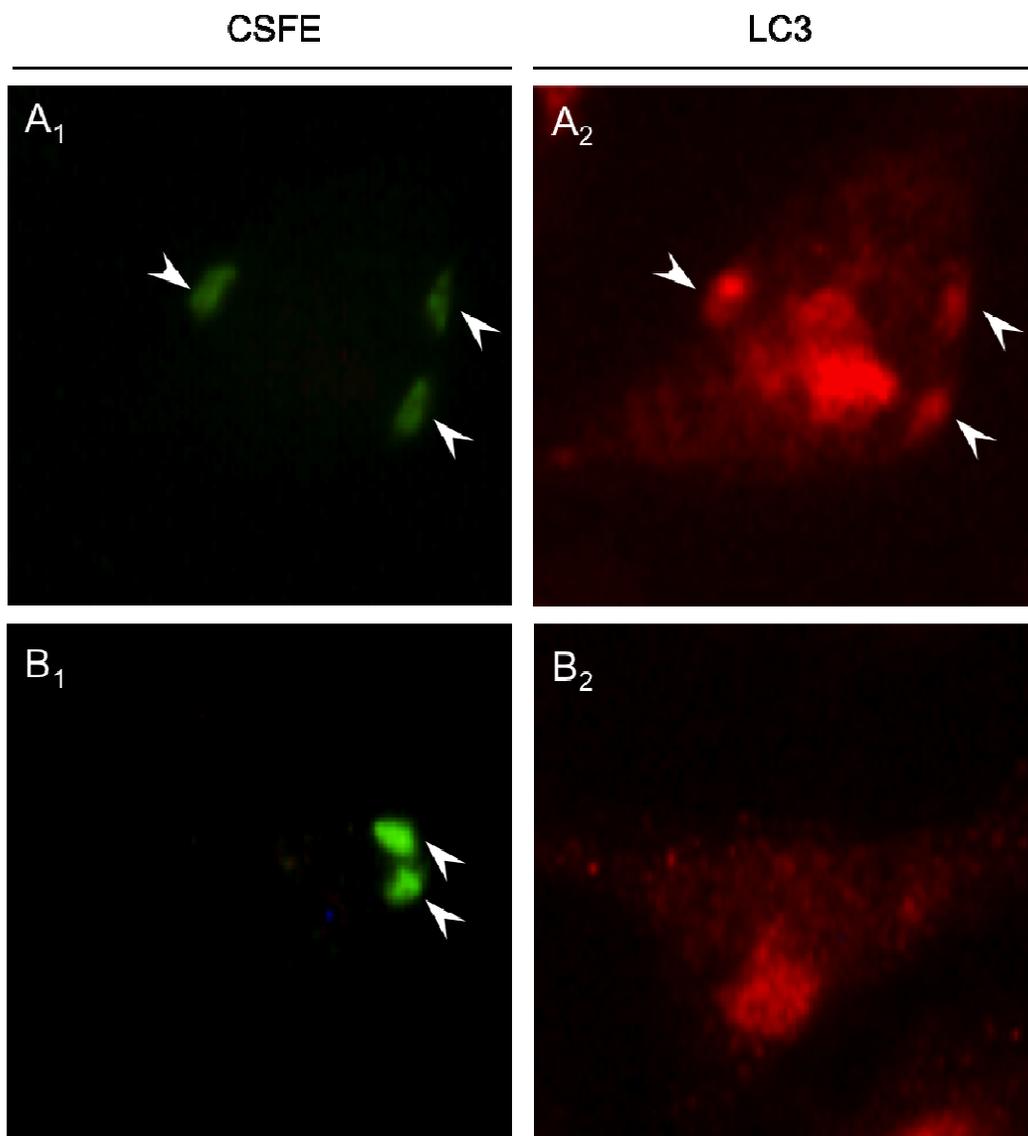


Figura 11–Marcação com anti-LC3 de macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*. **A** - Macrófago marcado com o anti-LC3 com padrão de marcação similar ao do parasito com carboxifluoresceína. **B** -Macrófago marcado com o anti-LC3 com padrão de marcação distinto ao do parasito com carboxifluoresceína. Macrófagos de camundongos CBA foram infectados com promastigotas metacíclicas de *L.amazonensis* ou *L. major* previamente marcadas com carboxifluoresceína (verde), na proporção de 5:1..Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-LC3 seguido pelo anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 568 (vermelho).As cabeças de seta branca correspondem à marcação similar do macrófago marcado com o anti-LC3 e do parasito com carboxifluoresceína. As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

6.2 Expressão LC3

Com intuito de se obter células superexpressando LC3 de maneira estável, foi realizada a transfecção de células J774 com o plasmídeo pmRFP-LC3. Após o processo de seleção não foi observada células J774 superexpressando a proteína recombinante LC3-RFP. Assim, células RAW foram utilizadas nos experimentos de transfecção, uma vez que, são mais fáceis de serem transfectadas. A análise em microscópio de fluorescência revelou que apenas cerca de 1% das células estavam expressando a proteína recombinante. Assim, afim de realizar o isolamento de clones superexpressando LC3 e obter culturas mais homogêneas, as células transfectadas foram plaqueadas após diluição limitante em placas de 96 poços, para obter uma concentração aproximada de uma célula por poço. Após 15 dias de incubação com o antibiótico de seleção, a expressão da proteína recombinante LC3-RFP foi novamente analisada por microscópio de fluorescência e obtivemos 2 clones superexpressando a LC3. Como é possível observar na figura 12, as células transfectadas com o plasmídeo pmRFP-LC3 apresentaram um padrão característico de marcação pontual enquanto que as transfectadas com o pmRFP-C1, plasmídeo controle, apresentaram uma marcação difusa no citoplasma das células.

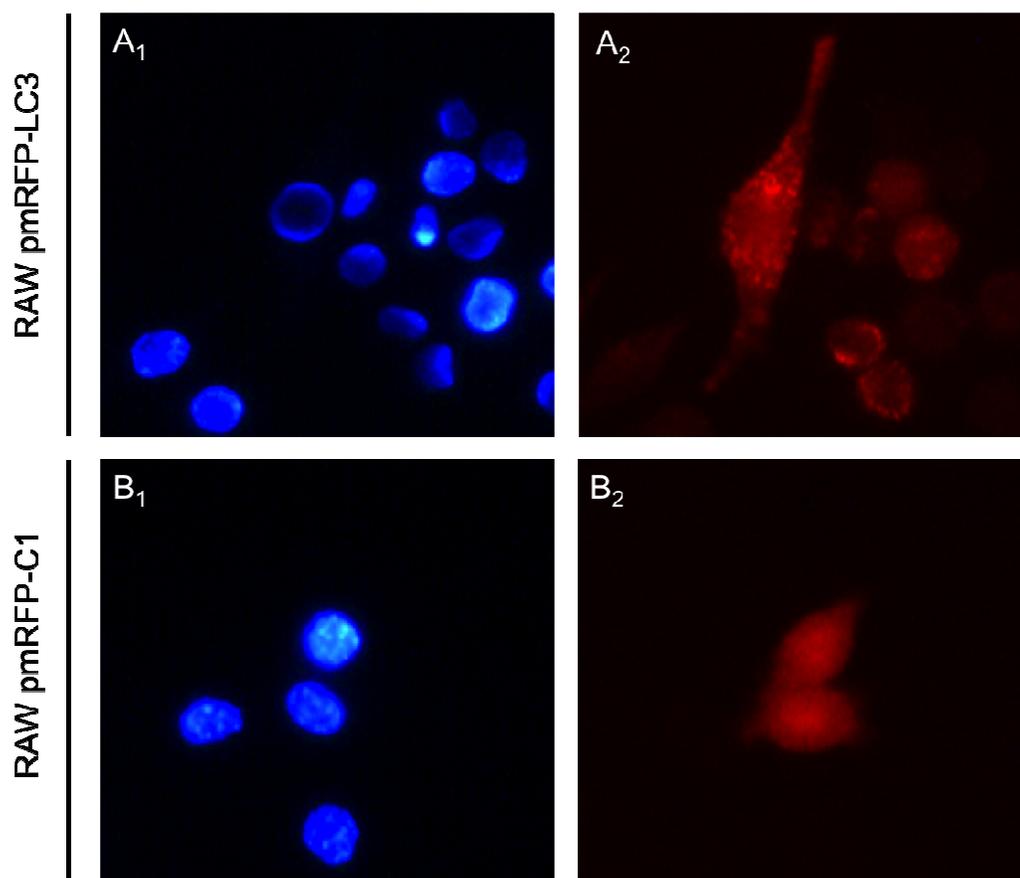


Figura 12– CélulasRAW transfetadas. Células RAW foram transfetadas com o plasmídeo (A) pmRFP-LC3 e (B)pmRFP-C1. Em seguida, foram cultivadas em placas de 24 poços e fixadas com PFA 4%. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As micrografias foram obtidas sob a magnificação de 400x.

6.3 Efeito da superexpressão da LC3 em células RAW infectadas com *L. amazonensis* ou *L. major*

Afim de avaliar o efeito da LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*, células RAW-pmRFP-LC3 foram infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Após diferentes tempos de infecção as células foram fixadas e tiveram o número de células infectadas e o número de parasitos por células determinados. Foi observada uma redução estatisticamente significante, de 68,75%, no percentual de infecção com *L. amazonensis* nas células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às RAW pmRFP-C1, no tempo de 6 h (Figura 13 A). Esta diferença reduziu para 62,55 e 40,2% nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente. Similarmente, houve uma redução estatisticamente significante no número de parasitos internalizados por célula de 35 e 13,4% nas células RAW-pmRFP-LC3 em relação às células controle RAW pmRFP-C1, nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente (Figura 13 B).

Como nos ensaios com *L. amazonensis*, a superexpressão de LC3 reduziu o percentual de células RAW-pmRFP-LC3 infectadas com *L. major* quando comparado ao controle. Observou-se uma redução de 88 e 72% no percentual de células infectadas nas células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às células controle RAW pmRFP-C1, nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente (Figura 13 C). No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa na carga parasitária (Figura 13 D).

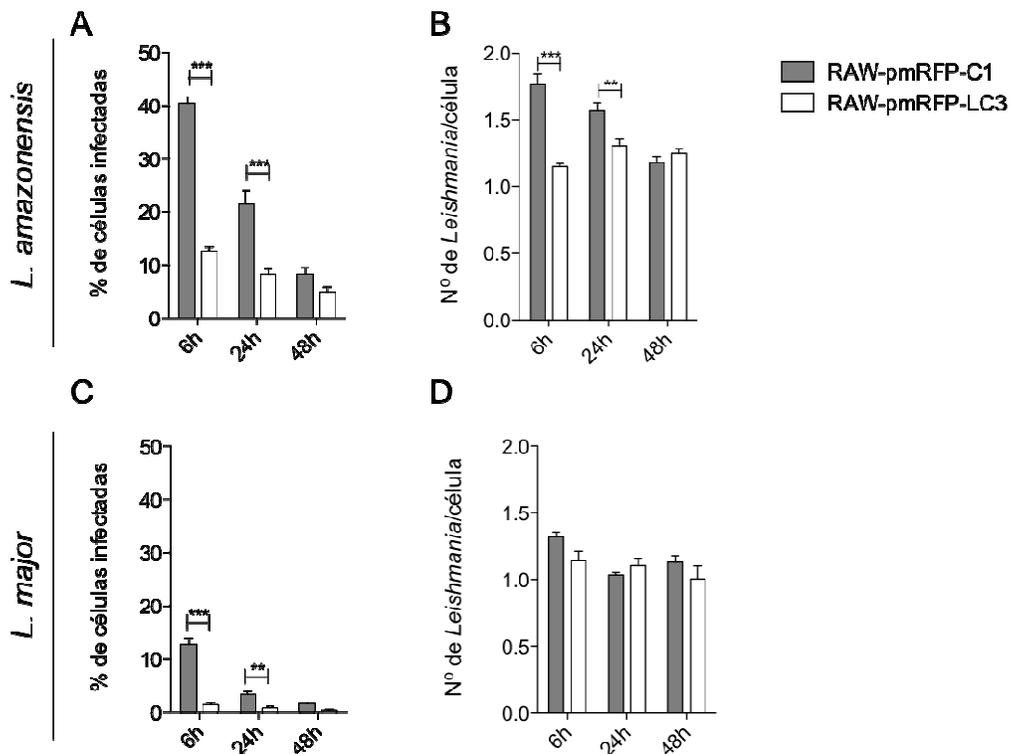


Figura 13- Efeito da superexpressão de LC3 na infecção de células RAW pmRFP-LC3. Células RAW pmRFP-LC3 e RAW pmRFP-C1 foram cultivadas em placas de 24 poços e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A e B) ou *L. major* (C e D), na proporção de 10:1. Após 6 h de infecção as células foram lavadas e re-incubadas por um período adicional de 18 e 42 horas, totalizando 6, 24 e 48h. Após estes períodos, as células foram lavadas e fixadas. Em seguida, as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI e micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência sob a magnificação de 400x. Posteriormente, foi quantificado o percentual de células infectadas e o número de parasitos por célula. Em cada lamínula no mínimo 400 células foram contadas. A e C – Percentual de células infectadas; B e D – Número de *Leishmania* por células. Um experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

Em seguida, avaliamos se a redução na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major* nas células RAW-pmRFP-LC3 estava associada com uma redução na interação, *binding*, dessas espécies de *Leishmania* com as células. Para isso, as células foram incubadas com *L. amazonensis* ou *L. major* por 10 min a 4°C conforme descrito em Material e Métodos (item 4.17). A superexpressão de LC3 não reduziu a interação de *L. amazonensis* com as células RAW-pmRFP-LC3 em relação às RAW pmRFP-C1 (Figura 14 A). Similarmente, não foi observada diferença quando as células foram infectadas com *L. major* (Figura 14 B).

Visto que não houve diferença no *binding*, buscamos avaliar o papel da LC3 na capacidade fagocítica das células RAW-pmRFP-LC3. A superexpressão de LC3 provocou uma diminuição de 70,87% na capacidade das células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às RAW-pmRFP-C1 em fagocitar *L. amazonensis* (Figura 15 A), apesar do número de *L. amazonensis* por célula infectada não ter sido diferente (Figura 15 B). Resultado semelhante foi observado nas células infectadas com *L. major*, em que houve uma redução de 77,13% na capacidade fagocítica das células RAW-pmRFP-LC3 em relação às células controle (Figura 15 C), sem redução do número de parasitos fagocitados por célula infectada (Figura 15 D).

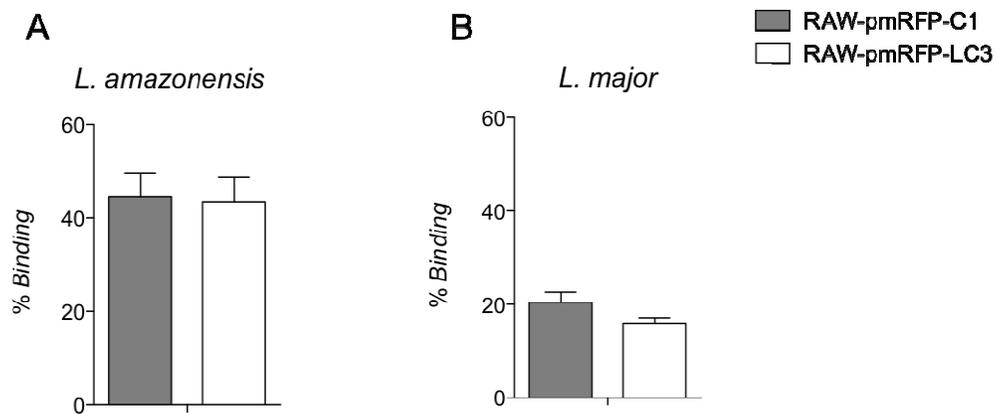


Figura 14-Efeito da superexpressão de LC3na interação de *L. amazonensis* ou *L. major* com células RAW. Células RAW pmRFP-LC3 e RAW pmRFP-C1 foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Após 10 min de incubação a 4°C as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e fixadas. Em seguida, as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI e micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência sob a magnificação de 400x. Posteriormente, foi quantificado o *binding* de **A**-*L. amazonensis* ou **B** - *L. major* com células RAW. Em cada lamínula no mínimo 400 células foram contadas. Um experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney, $p > 0,05$.

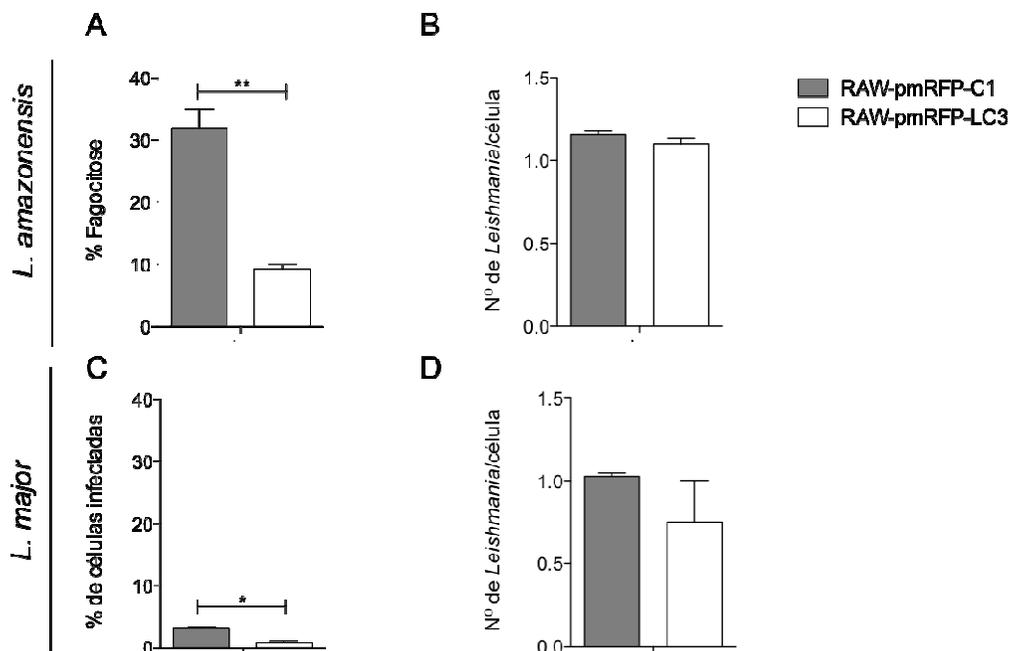


Figura 15-Efeito da super-expressão de LC3 na fagocitose de *L. amazonensis* ou *L. major* por células RAW. Células RAW pmRFP-LC3 e RAW pmRFP-C1 foram cultivadas em placas de 24 poços e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A e B) ou *L. major* (C e D). Após 10 min de *binding* a 4°C, as células foram lavadas e re-incubadas por um período adicional de 1 h. Após estes período, as células foram lavadas e fixadas. Em seguida, as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI e micrografias foram obtidas em microscópio de fluorescência sobre a magnificação de 400x. Posteriormente, foi quantificado o percentual de células RAW infectadas e o número de parasitos por célula. Em cada lamínula no mínimo 400 células foram contadas. A e C – Percentual de células RAW infectadas; B e D – Número de *Leishmania* por células. Um experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* e *L. major* foram caracterizados quanto a marcação de LysoTracker e DQ-BSA bem como quanto a presença de LAMP e LC3 na membrana desses compartimentos. Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de LC3 reduz a fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major* por células RAW, o que resulta na redução da infecção.

O DQ-BSA e LysoTracker não são marcadores específicos de autofagia, contudo, seu uso em conjunto com outros marcadores de compartimentos autofágicos é uma ferramenta adequada e importante para monitorizar compartimentos ácidos e degradativos como autofagolisossomo (KLIONSKY *et al.*, 2007; MITOU *et al.*, 2009; VASQUEZ; COLOMBO, 2009). Diversos estudos tem demonstrado que os vacúolos induzidos por microrganismos intracelulares podem ser carregados com estes marcadores solúveis (AGUILERA *et al.*, 2009; BERON *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2004; LERENA; COLOMBO, 2011). No presente estudo foi demonstrado que *L. amazonensis* e *L. major* residem em vacúolos que apresentam diferenças na marcação pelo DQ-BSA, marcador de compartimento hidrolítico, e com LysoTracker, marcador de compartimento lisossomal. Foi observada uma maior co-localização desses marcadores com parasitos em macrófagos infectados com *L. major* em comparação com aqueles infectados com *L. amazonensis*.

Previamente, Real e Mortara (2012) demonstraram que os vacúolos de *L. amazonensis* e *L. major* são marcados com a sonda LysoTracker. Esses autores não compararam a co-localização desse marcador de compartimentos ácidos com os parasitos, eles compararam a intensidade dessa sonda e mostraram que os vacúolos parasitóforos induzidos por *L. major* apresentam menor intensidade de LysoTracker em relação aos de *L. amazonensis*. Real e Mortara (2012) acreditam que isso se deva a um ambiente menos ácido nos vacúolos parasitóforos de *L. major* que seria explicado por uma menor abundância da bomba vacuolar H⁺-ATPase em

comparação ao vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis*. No entanto, quando analisamos nossos achados e aqueles apresentados por Real e Mortara (2012), sugerimos que apesar dos vacúolos induzidos por *L. major* terem uma menor quantidade absoluta de LysoTracker no seu interior, devido ao tamanho, sua concentração seria maior do que no vacúolo de *L. amazonensis*. Em contradição aos achados demonstrados por nós e por Real e Mortara (2012), Cyrino e colaboradores (2012) não observaram marcação com LysoTracker no interior do vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis*, a marcação foi observada apenas no citoplasma celular e na periferia externa do vacúolo parasitóforo. A ausência de marcação do vacúolo parasitóforo pode dever-se a concentração utilizada dez vezes menor que a usada no presente estudo.

Evidências suportam a noção que as grandes dimensões dos vacúolos parasitóforos formados por parasitos do complexo Mexicana, diminuem a concentração de enzimas hidrolíticas e de espécies reativas de oxigênio, funcionando como estratégia contra o sistema de defesa da célula hospedeira (SACKS; SHER, 2002; WILSON *et al.*, 2008). Assim, acreditamos que a menor co-localização de ambos os marcadores solúveis em vacúolos contendo *L. amazonensis* em comparação com aqueles contendo *L. major* está associada a maior dimensão dos vacúolos parasitóforos induzidos por essa espécie de *Leishmania* e, como consequência, diluição dos marcadores. Em contradição a essa hipótese, Berón (2002) e Aguilera e colaboradores (2009) demonstraram que os vacúolos de grande tamanho induzidos por *C. burnetti*, que apresentam semelhanças morfológicas aos induzidos por *L. amazonensis* (ANTOINE *et al.*, 1990; MAURIN *et al.*, 1992; VERAS *et al.*, 1994, 1995), são marcados com LysoTracker, DQ-BSA e MDC, indicando que o fato de apresentar grande dimensão não impede que esses compartimentos apresentem marcadores solúveis característicos de lisossomas e autofagossomas. Diferente de nós os autores não objetivaram a quantificação do percentual de co-localização desses marcadores com *C. burnetti*.

Além de demonstrarmos a presença de marcadores solúveis no vacúolo parasitóforo de *L. amazonensis* e *L. major*, apresentamos evidências

que estes vacúolos expressam em sua membrana a proteína: LAMP-1, que é uma proteína característica de compartimento lisossomal. A presença de LAMP-1 no vacúolo parasitóforo de *Leishmania* já foi descrita por diferentes autores (ANTOINE *et al.*, 1998; COURRET *et al.*, 2002; REAL; MORTARA, 2012; RUSSEL *et al.*, 1992). No presente estudo, avaliamos tanto a presença quanto a co-localização de LAMP com parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* ou *L. major*, contudo, não foi observada diferença no percentual de co-localização, indicando que a expressão dessa proteína é similar nos dois tipos de vacúolos. Uma possível explicação para não termos detectado diferença no percentual de co-localização é o fato do anticorpo utilizado no estudo ao contrário do esperado ter marcado, de maneira inadequada, todo o citoplasma das células e não apenas os compartimentos lisossomais. Assim, estudos adicionais utilizando outro anticorpo contra a proteína LAMP serão realizados para melhor investigar e comparar a presença de LAMP-1 nos vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* e *L. major*.

LC3 é uma proteína expressa especificamente em autofagossomos, sendo o melhor marcador disponível para caracterizar compartimentos autofágicos (GUTIERREZ *et al.*, 2005). No presente estudo, além de evidenciarmos pela primeira vez a presença de LC3 endógeno em vacúolos induzidos por duas espécies diferentes de *Leishmania*, *L. amazonensis* ou *L. major*, demonstramos uma maior co-localização da LC3 com *L. amazonensis* do que com *L. major*. No entanto, existe a possibilidade desses achados refletirem a dupla marcação do parasito com carboxifluoresceína em verde e pelo anti-LC3 em vermelho. O anti-LC3 utilizado no presente trabalho é específico para a proteína humana e murina, contudo, por ser um anticorpo policlonal pode estar reconhecendo epítomos comuns de LC3 no parasito. Para responder a questão se LC3 expressa nos vacúolos parasitóforos de macrófagos estão co-localizando com os parasitos, serão realizados experimentos adicionais utilizando células RAW-pmRFP-LC3 que superexpressam LC3 de forma permanente. Iremos avaliar a co-localização da LC3 com parasitos em células infectadas com *L. amazonensis* em comparação com aquelas infectadas com *L. major*. A presença da LC3 já foi

demonstrada em vacúolos induzidos por diferentes espécies de bactéria: *Listeria monocytogenes* (BIRMINGHAM *et al.*, 2007), *M. tuberculosis* (GUTIERREZ *et al.*, 2004), *C. burnetti* (BÉRON *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*, 2005), *M. marinum* (LERENA; COLOMBO, 2011), *Salmonella enterica* (BIRMINGHAM *et al.*, 2006), *Streptococcus pyogenes* (NAKAGAWA *et al.*, 2004) e *Anoplasma phagocytophilum* (NIU *et al.*, 2008), indicando que existe interação entre os vacúolos contendo bactérias com compartimentos da via autofágica. A presença de LC3 na infecção por *Leishmania* foi demonstrada anteriormente por Cyrino e colaboradores (2012), eles observaram uma maior expressão de LC3 em células RAW e em macrófagos de medula óssea de BALB/c e C57Bl/6 infectados por *L. amazonensis* em comparação com as células não infectadas. No entanto, os autores não investigaram a expressão da LC3 em vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis*.

Em resumo, foi observado maior percentual de co-localização tanto do marcador de compartimento hidrolítico, Dq-BSA, como do marcador de compartimento lisossomal, LysoTracker, com parasitos em macrófagos infectados por *L. major* em comparação com aqueles infectados por *L. amazonensis*. Por outro lado, houve maior co-localização de LC3 endógeno com *L. amazonensis* em relação a *L. major*, sugerindo que há maior interação do vacúolo de *L. amazonensis* com compartimentos autofágicos e menor interação com compartimentos lisossomais. É possível que a interação com compartimentos autofágicos funcione tanto como fonte de membrana para o desenvolvimento do vacúolo parasitóforo, diminuindo a concentração de enzimas hidrolíticas e espécies reativas de oxigênio neste compartimento, como fonte direta de metabólitos e aminoácidos que favoreceriam o crescimento e desenvolvimento intracelular de *L. amazonensis*. Os achados do presente estudo estão em concordância com um estudo prévio que mostrou que vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania mexicana*, similares aos induzidos por *L. amazonensis*, interagem com a via autofágica pois adquirem macromoléculas do citosol da célula hospedeira através de microautofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1999).

Em seguida, o papel de LC3 na infecção por *Leishmania* foi investigado, avaliando o efeito da superexpressão dessa proteína em células de linhagem macrófaga sobre a infecção por *Leishmania*. A superexpressão de LC3, ao contrário da nossa hipótese, reduziu o percentual tanto de células infectadas por *L. amazonensis* como aquelas infectadas por *L. major* em relação às células controle. Em estudo anterior foi demonstrado que células induzidas à autofagia tanto fisiológica como farmacológica inibem a capacidade fagocítica de células de mamífero (LIMA *et al.*, 2011). Assim, nos questionamos se a inibição da infecção observada em células superexpressando a LC3, estaria relacionada à inibição na capacidade fagocítica das células macrófagas. Similarmente, ao efeito da indução de autofagia em macrófagos, a superexpressão de LC3 em macrófagos de linhagem, promove inibição da fagocitose sem alterar o *binding* dos parasitos. No estudo anterior, foi observado que a indução de autofagia inibe a capacidade fagocítica de forma inespecífica, pois tem efeito independente de ser macrófago primário ou de linhagem, e independente do tipo de partícula testada. Gutierrez e colaboradores (2005) avaliaram o efeito da superexpressão de LC3 na infecção por *C. burnetti* e, em contraste ao resultado obtido por nós, mostraram que a superexpressão de LC3 em células de linhagem CHO favorece a infecção por *C. burnetti*, aumenta o número de vacúolos por célula além de acelerar a biogênese/maturação dos vacúolos contendo esta bactéria. É possível que a indução da autofagia ou superexpressão de LC3 tenha efeito inibitório sobre a fagocitose apenas de fagócitos profissionais, mas não de células não macrófagas.

Uma possível explicação para a redução na capacidade fagocítica das células RAW superexpressando LC3 é a falta de membrana plasmática disponível para fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major*, como sugerido por Lima e colaboradores (2011). Estudos já demonstraram a comunicação entre as vias autofágica e fagocítica (SHUI *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2007) e que estas vias podem ser ativadas por moléculas em comum como: PI3K cinase (PETIOT *et al.*, 2000; VIEIRA *et al.*, 2001) e por agonistas dos receptores Toll-like (SANJUAN *et al.*, 2007). Assim, a superexpressão de LC3 estaria induzindo autofagia nas células RAW o que poderia levar a um recrutamento

de parte da membrana plasmática para a formação de autofagossomas, impedindo assim, a internalização de *L. amazonensis* ou *L. major* pela via fagocítica. Para corroborar esta hipótese, observações em microscopia eletrônica e em microscopia de fluorescência serão realizadas para avaliar se as células RAW superexpressando LC3 encontram-se em autofagia. Adicionalmente, planejamos superexpressar LC3 em células previamente infectadas para avaliar o verdadeiro papel de LC3 em fases mais tardias da infecção.

Corroborando nossa hipótese que a autofagia interfere negativamente na fagocitose, recente estudo de Bonilla e colaboradores (2013) demonstrou que macrófagos de medula óssea de camundongos *knockout* para Atg7, proteína importante na elongação do autofagossomo, apresentam um maior infecção por *M.tuberculosis* em comparação às células controle. Adicionalmente, foi mostrado que esses macrófagos apresentam uma redução na conjugação de LC3 à fosfatidiletanolamina formando LC3-II e que o aumento na capacidade fagocítica está associado a uma maior expressão dos receptores *scavenger*: MARCO (do inglês *macrophage receptor with collagenous structure*) e MSR1 (do inglês *macrophage scavenger receptor 1*).

Em nosso estudo, é possível que a redução da capacidade fagocítica das células RAW-pmRFP-LC3 esteja relacionada a uma redução na expressão de receptores de membrana importantes na fagocitose de *Leishmania*, como os receptores para frações do complemento, CR1 e CR3 (BLACKWELL *et al.*, 1985; MOSSER; EDELSON, 1985), e os de reconhecimento de padrão como receptores fucose-manose, *toll-like* e *scavenger* (GOUGH; GORDON, 2000).

Novos ensaios, com o silenciamento da LC3, serão necessários para a maior compreensão da autofagia na fagocitose de *L. amazonensis* ou *L. major* por macrófagos. Além disso, iremos avaliar se a alteração na capacidade fagocítica nas células superexpressando LC3 está associada a uma modulação na expressão de receptores envolvidos no reconhecimento e internalização de *Leishmania*.

8 CONCLUSÕES

Vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis*, em relação aos de *L. major*, apresentam maior interação com compartimentos autofágicos e menor interação com compartimentos lisossomais

A superexpressão de LC3 reduz a infecção de células RAW por *L. amazonensis* ou *L. major* por meio da inibição da capacidade fagocítica destas células

9 PERSPECTIVAS

- a) Verificar por microscopia eletrônica de transmissão se as células superexpressando LC3 estão em autofagia
- b) Avaliar a co-localização de LC3 com *L. amazonensis* ou *L. major* em células RAW-pmRFP-LC3
- c) Avaliar o efeito do silenciamento de LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*

10 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, jul. 1993.
- AGUILERA, M.; SALINAS, R.; ROSALES, E. *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, oct. 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, nov. 1975.
- ANDRADE, Z. A.; REED, S. G.; ROTERS, S. B. *et al.* Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Pathology**, v. 114, n. 1, p. 137-148, jan. 1984.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C. *et al.* Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 3, p. 779-787, mar. 1990.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T. *et al.* The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392-401, oct. 1998.
- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- AXE, E. L.; WALKER, S. A.; MANIFAVA, M. *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, aug. 2008.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 119, n. 6, p. 238-58, jun. 2004.
- BAEHRECKE, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 6, p. 505-510, jun. 2005.
- 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. 601-619, sep. 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. 403-410, oct-dec 2006.

BERON, W.; GUTIERREZ, M. G.; RABINOVITCH, M. *et al.* *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5816-5821, oct 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, jan 1998.

BIRMINGHAM, C. L.; CANADIEN, V.; GOUIN, E. *et al.* *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. **Autophagy**, v. 3, n. 5, p. 442-451, sep-oct 2007.

BIRMINGHAM, C. L.; SMITH, A. C.; BAKOWSKI, M. *et al.* Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11374-11383, apr 21 2006.

BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A.; ROBERTS, M. B. *et al.* Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 1, p. 324-331, jul 1 1985.

BLOMMAART, E. F.; LUIKEN, J. J.; BLOMMAART, P. J. *et al.* Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 5, p. 2320-2326, feb 3 1995.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 2 edição, 2007.

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, jan 1986.

CHANG, H. K.; THALHOFER, C.; DUERKOP, B. A. *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, feb 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, feb 1 1978.

CHAUDHURI, G.; CHAUDHURI, M.; PAN, A. *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, may 5 1989.

COURRET, N.; FREHEL, C.; GOUHIER, N. *et al.* Biogenesis of Leishmania-harboured 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, jun 1 2002.

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

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

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

de SOUZA LEAO, S.; LANG, T.; PRINA, E. *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, oct 1995.

DEGENHARDT, K.; MATHEW, R.; BEAUDOIN, B. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51-64, jul 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, feb 1998.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L. *et al.* *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 146, n. 8, p. 2747-2753, apr 15 1991.

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

DUCLOS, S.; DESJARDINS, M. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 365-377, oct 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, jun 1990a.

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

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

158, feb 2011.

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, mar 2006.

GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES RDA, S. *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 / Institut Pasteur**, v. 5, n. 4, p. 251-260, apr 2003.

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, mar 2000.

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

GUTIERREZ, M. G.; MASTER, S. S.; SINGH, S. B. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 753-766, dec 17 2004.

GUTIERREZ, M. G.; VAZQUEZ, C. L.; MUNAFO, D. B. *et al.* Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 981-993, jul 2005.

HAILEY, D. W.; RAMBOLD, A. S.; SATPUTE-KRISHNAN, P. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 656-667, may 14 2010.

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

HANDMAN, E.; SCHNUR, L. F.; SPITHILL, T. W. *et al.* Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. **Journal of Immunology**, v. 137, n. 11, p. 3608-3613, dec 1 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.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. *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, jan 1 1989.

HEMELAAR, J.; LELYVELD, V. S.; KESSLER, B. M. *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, dec 19 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.

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, oct 2 2006.

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.

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, feb 16 2001.

KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.; UENO, T. *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, nov 1 2000.

KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.; YAMAMOTO, A. *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, jun 1 2004.

KIRISAKO, T.; ICHIMURA, Y.; OKADA, H. *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. 263-276, oct 16 2000.

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

KLIONSKY, D. J.; EMR, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1717-1721, dec 1 2000.

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, may-jun 2007.

KOPITZ, J.; KISEN, G. O.; GORDON, P. B.; BOHLEY, P.; SEGLEN, P. O. Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes. **The Journal of cell biology**, v. 111, n. 3, p. 941-53, Sep 1990.

KORNER, U.; FUSS, V.; STEIGERWALD, J. *et al.* Biogenesis of *Leishmania* major-harboring vacuoles in murine dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1305-1312, feb 2006.

LANG, T.; HELLIO, R.; KAYE, P. M. *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, aug 1994.

LANG, T.; SCHAEFFELER, E.; BERNREUTHER, D. *et al.* Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 13, p. 3597-3607, jul 1 1998.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-214, may 2003.

LEE, H.; NOH, J. Y.; OH, Y. *et al.* IRE1 plays an essential role in ER stress-mediated aggregation of mutant huntingtin via the inhibition of autophagy flux. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 1, p. 101-114, jan 1 2012.

LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T. M. *et al.* Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 15, p. 1807-1815, dec 2000.

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. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 814-835, jun 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, oct 2007.

LIMA, J. G.; DE FREITAS VINHAS, C.; GOMES, I. N. *et al.* Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 405, n. 4, p. 604-609, feb 25 2011.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunology Today**, v. 12, n. 3, p. 58-61, mar 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, nov 1993.

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, jun 2004.

MARINO, G.; URIA, J. A.; PUENTE, X. S. *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, feb 7 2003.

MAURIN, M.; BENOLIEL, A. M.; BONGRAND, P. *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, dec 1992.

McCONVILLE, M. J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M. A. *et al.* Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3593-3600, oct 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, apr 1 1990.

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

MESTRE, M. B.; FADER, C. M.; SOLA, C. *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, jan 2010.

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

MIZUSHIMA, N.; KUMA, A.; KOBAYASHI, Y. *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, may 1 2003.

MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B.; CUERVO, A. M. *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069-1075, feb 28 2008.

MIZUSHIMA, N.; SUGITA, H.; YOSHIMORI, T. *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, dec 18 1998.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785-2789, oct 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, oct 1993.

NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; MIZUSHIMA, N. *et al.* Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1037-1040, nov 5 2004.

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

NDJAMEN, B.; KANG, B. H.; HATSUZAWA, K. *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, oct 2010.

NIU, H.; YAMAGUCHI, M.; RIKIHISA, Y. Subversion of cellular autophagy by *Anaplasma phagocytophilum*. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 593-605, mar 2008.

PEARSON, R. D.; WHEELER, D. A.; HARRISON, L. H.; KAY, H. D. The immunobiology of leishmaniasis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 907-927, sep-oct 1983.

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, feb 1979.

PERINOTO, A. C.; MAKI, R. M.; COLHONE, M. 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, dec 1 2010.

PETIOT, A.; OGIER-DENIS, E.; BLOMMAART, E. F. *et al.* Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 992-998, jan 14 2000.

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

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

RABINOVITCH, M.; TOPPER, G.; CRISTELLO, P. *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, mar 1985.

RABINOVITCH, M.; VERAS, P. S. Cohabitation of *Leishmania amazonensis* and *Coxiella burnetii*. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 158-161, apr 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. 1518, 2012.

ROMANO, P. S.; GUTIERREZ, M. G.; BERON, W. *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, apr 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, apr 1

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, dec 1992.

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

SACKS, D. L. 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, aug 1992.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, nov 2002.

SANJUAN, M. A.; DILLON, C. P.; TAIT, S. W. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 1253-1257, dec 20 2007.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, jun 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, dec 2005.

SCHAIBLE, U. E.; SCHLESINGER, P. H.; STEINBERG, T. H. *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, mar 1999.

SCHNAITH, A.; KASHKAR, H.; LEGGIO, S. 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, jan 26 2007.

SHEPHERD, V. L.; STAHL, P. D.; BERND, P. *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, may 1 1983.

SHUI, W.; SHEU, L.; LIU, J. *et al.* Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 16952-16957, nov 4 2008.

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, oct 2001.

SPATH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J. *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, aug 5 2003.

SOUSA-FRANCO, J.; ARAUJO-MENDES, E.; SILVA-JARDIM, I.; J, L. S. *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 / Institut Pasteur**, v. 8, n. 2, p. 390-400, feb 2006.

STRAUS, A. H.; LEVERY, S. B.; JASIULIONIS, M. G. *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, jun 25 1993.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; CHAKRABORTY, P. *et al.* Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-681, feb 4 1994.

SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 11, p. 2156-2161, may 22 2007.

SUZUKI, K.; KONDO, C.; MORIMOTO, M. *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, sep 24 2010.

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

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M. P., J. C. F. R.; PAULO, A. H. C. *et al.* **Atlas Didático: Ciclo de Vida da Leishmania**. 1a. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64.

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.; 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, sep 1 1992.

VERAS, P. S.; DE CHASTELLIER, C.; MOREAU, M. F. *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, nov 1994.

VERAS, P. S.; MOULIA, C.; DAUGUET, C. *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. 3502-6, sep 1995.

VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; RAMEH, L. *et al.* Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. **The Journal of Cell Biology**, v. 155, n. 1, p. 19-25, oct 1 2001.

VINET, A. F.; FUKUDA, M.; TURCO, S. J. *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. 1000628, oct 2009.

WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K. A. *et al.* Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, p. 1000179, oct 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Contém informações científicas, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en_>.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, feb 10 2006.

XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X. D. *et al.* Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135-144, jul 2007.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 814-822, sep 2010.

YU, W. H.; CUERVO, A. M.; KUMAR, A. *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, oct 10 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.

1 **11 Apêndice- ESBOÇO DO ARTIGO CIENTÍFICO**

2

3 **Título**

4 CARACTERIZAÇÃO DO VACÚOLO PARASITÓFORO DE *LEISHMANIA*
5 QUANTO A CARACTERÍSTICAS AUTOFÁGICAS

6

7 **Nome dos autores e Afiliações**

8 Beatriz Rocha Simões Dias¹; Carlos Eduardo Sampaio Guedes¹; Niara de Jesus Almeida¹;
9 José Geraldo Bomfim Lima^{1,2}; Patrícia Sampaio Tavares Veras¹

10

11 ¹*Centro de pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz*

12 ²*Universidade Federal da Bahia*

13

14 ***Autor correspondente**

15 Patrícia Sampaio Tavares Veras, PhD, MD

16 Laboratório de Patologia e Biointervenção, CPqGM, FIOCRUZ

17 Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal

18 Salvador/BA, Brazil; CEP 40296-710

19 Tel: + 55 (71) 3176-2263

20 Fax: + 55 (71) 3176-2290

21 E-mail: pveras@bahia.fiocruz.br

22 **Resumo**

23 Estudos recentes demonstraram que compartimentos induzidos por
24 microrganismos intracelulares são capazes de interagir com a via autofágica
25 e esta pode controlar ou promover o estabelecimento da infecção a depender
26 da natureza do microrganismo. Até o momento, poucos estudos foram
27 realizados para avaliar o papel da autofagia na biogênese e maturação dos
28 vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania*. Recentemente, foi
29 demonstrado que em macrófagos de camundongos BALB/c, a indução de
30 autofagia provoca um aumento na carga parasitária de *L. amazonensis*, no
31 entanto, não é capaz de aumentar a carga parasitária de *L. major*. Além
32 disso, estudos indicam que vacúolos parasitóforos de *L. mexicana* adquirem
33 macromoléculas do citoplasma da célula hospedeira por meio de
34 microautofagia. Uma vez que *L. amazonensis* integra o mesmo complexo que
35 *L. mexicana*, nossa hipótese é que vacúolos parasitóforos induzidos por *L.*
36 *amazonensis* interagem com a via autofágica. Assim, o presente estudo tem
37 como objetivo verificar e comparar a participação da autofagia na infecção
38 por *L. amazonensis* ou *L. major* em macrófagos murinos. Inicialmente,
39 macrófagos de camundongos CBA foram infectados com *L. amazonensis* ou
40 *L. major* e incubados com LysoTracker ou DQ-BSA. Além disso, foi avaliada
41 a presença de LC3 na membrana destes vacúolos. Em seguida, a co-
42 localização dos parasitos com os vacúolos parasitóforos contendo estes
43 marcadores foi quantificada. Nossos resultados demonstraram um maior
44 percentual de co-localização tanto do LysoTracker como do DQ-BSA com
45 parasitos em vacúolos no interior de macrófagos infectados com *L. major* em
46 comparação com aqueles infectados com *L. amazonensis*. No entanto, foi
47 observado um maior percentual de co-localização do LC3 com parasitos em
48 macrófagos infectados com *L. amazonensis* em comparação com aqueles
49 infectados com *L. major*. Posteriormente, avaliamos o efeito da
50 superexpressão da LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L. major*. Células
51 RAW foram transfectadas com o plasmídeo contendo o inserto do LC3 e
52 infectadas com *L. amazonensis* ou *L. major*. Nós observamos uma redução
53 no percentual de infecção por *L. amazonensis* e *L. major* nas células RAW-
54 pmRFP-LC3 em comparação às controle. Essa diminuição na infecção se

55 deu por inibição da fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major*. Em conjunto,
56 estes dados demonstram que os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* e
57 *L. major* interagem com compartimentos da via autofágica de forma distinta e
58 que a superexpressão de LC3 reduz a fagocitose de *L. amazonensis* e *L.*
59 *major* por células RAW, o que resulta na redução da infecção.

60 Palavras-chave: *Leishmania*, vacúolo parasitóforo, macrófago, autofagia, LC3

61

62 **Introdução**

63 *Leishmania* ssp. são parasitos intracelulares obrigatório que vivem e
64 se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos em macrófagos no
65 hospedeiro vertebrado (RUSSELLEt al., 1986). Apesar dos vacúolos
66 induzidos por diferentes espécies de *Leishmania* apresentarem semelhanças
67 bioquímicas, esses compartimentos apresentam diferenças significativas nos
68 seus tamanhos. Os vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania*
69 mexicana e *Leishmania amazonensis* apresentam grandes dimensões e
70 contêm uma grande quantidade de amastigotas (RABINOVITCHEt al., 1985;
71 SHEPHERDEt al., 1983; VERAS et al., 1994), enquanto que os induzidos por
72 *Leishmania major* e *Leishmania donovani* são pequenos e com pouco espaço
73 ao redor das amastigotas (ANTOINE et al., 1998; CHANG; DWYER, 1978).

74 Estudos recentes demonstraram que compartimentos induzidos por
75 microrganismos celulares são capazes de interagir com a via autofágica,
76 adquirindo características autofagossomais (BÉRONet al., 2002;
77 GUTIERREZet al., 2005). A autofagia é um processo conservado
78 evolutivamente, responsável pela degradação de organelas e proteínas
79 durante a diferenciação celular e em situações de estresse (PINHEIROet al.,
80 2009). Nesse processo, os componentes citosólicos são englobados por um
81 compartimento denominado de autofagossomo que, posteriormente, se
82 funde com lisossomos. As fases iniciais de formação do autofagossomo
83 dependem da associação da proteína VPS34 em um complexo, que se
84 associa a uma outra proteína chamada beclina (LEVINE; DERETIC, 2007). A
85 expansão da membrana autofagossomal é um processo mediado por

86 proteínas denominadas Atg (do inglês *autophagy-related proteins*), uma delas
87 é a Atg8 que, em mamíferos, é denominada de LC3 (LANG *et al.*, 1998;
88 KIRISAKO *et al.*, 2005).

89 Estudos sugerem que a via autofágica desempenha um papel na
90 resposta imune inata protegendo a célula hospedeira contra infecções
91 causadas por microrganismos intracelulares como é o caso de
92 *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pyogenes* (GUTIERREZ *et al.*,
93 2004, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2004; LEVINE; DERETIC, 2007). No entanto,
94 a interação com a via autofágica é favorável a alguns patógenos
95 intracelulares, como *Staphylococcus aureus* e *Coxiella burnetti* (GUTIERREZ
96 *et al.*, 2005; MESTRE *et al.*, 2010; SCHNAITH *et al.*, 2007; VAZQUEZ;
97 COLOMBO, 2009).

98 Pouco se sabe sobre a interação de compartimentos da via autofágica
99 com os vacúolos parasitóforos de *Leishmania*. Recentemente, Pinheiro e
100 colaboradores (2009) mostraram que em macrófagos de diferentes linhagens
101 de camundongos, a indução da autofagia exerce papéis distintos sobre a
102 infecção por *L. amazonensis*. Em macrófagos de camundongos susceptíveis
103 da linhagem BALB/c, mas não em macrófagos de camundongos resistentes
104 da linhagem C57BL/6, a indução de autofagia provoca um aumento na carga
105 parasitária por esta espécie de parasito (PINHEIRO *et al.*, 2009).
106 Adicionalmente, estudos indicam que vacúolos parasitóforos de *L. mexicana*
107 adquirem macromoléculas do citoplasma da célula hospedeira por meio de
108 autofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1995) e que, essas macromoléculas uma vez
109 transferidas do citoplasma da célula hospedeira para o lúmen do vacúolo
110 parasitóforo, podem ser endocitadas pelo parasita (RUSSEL *et al.*, 1992). Em
111 conjunto, esses dados apontam que a via autofágica pode ser ativada pela
112 infecção por *L. mexicana*, favorecendo o fornecimento de nutrientes e,
113 consequentemente, a sobrevivência deste parasito no interior dos vacúolos
114 parasitóforos.

115 Uma maior compreensão deste aspecto da infecção por *Leishmania* é
116 fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que
117 incluam a modulação da fagocitose e da autofagia. No presente estudo, com

118 o objetivo de esclarecer o papel da autofagia na maturação dos vacúolos
119 parasitóforos *Leishmania*, utilizaremos o modelo de macrófagos de
120 camundongos CBA. Nossa hipótese é que vacúolos parasitóforos induzidos
121 por *L. amazonensis* interagem com compartimentos da via autofágica,
122 favorecendo a sobrevivência do parasito em macrófagos de camundongos
123 CBA. Por outro lado, em macrófagos infectados por *L. major* haveria
124 interação restrita dos vacúolos parasitóforos com a via autofágica.

125 **Metodologia**

126 **Obtenção de macrófagos peritoneais e cultivo de células**

127 Macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal de camundongos CBA
128 de acordo com o protocolo estabelecido por Gomes e colaboradores (2003).
129 Os camundongos da linhagem CBA utilizados no estudo foram fornecidos
130 pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz/BA, após
131 aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), protocolo
132 012/2012. Os animais foram mantidos e manipulados dentro das normas
133 preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais.

134 As células RAW foram cultivadas em meio DMEM completo e
135 mantidas em cultura por até sete passagens, em estufa a 37°C suplementada
136 com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Ao atingirem 80 a 90% de confluência,
137 as células foram incubadas com Tripsina-EDTA 1x (Gibco). As células foram
138 então recolhidas e centrifugadas a 720 x g a 4°C por 10 min e o sedimento foi
139 ressuspensão em meio DMEM completo.

140 **Cultura de *Leishmania***

141 Culturas axênicas de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-
142 125) e *L. major* (MHOM/RII/-WR-173) foram cultivadas sucessivas em meio
143 *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich) por 3 a 5 dias em estufa B.O.D. a
144 24°C. Para realização dos experimentos foram utilizadas promastigotas
145 metacíclicas separadas de acordo com o protocolo de Spath e Berveley
146 (2011).

147 **Avaliação da atividade hidrolítica do vacúolo parasitóforo de *L.***
148 ***amazonensis* ou *L. major* por degradação do DQ-BSA**

149 Macrófagos de camundongos CBA (2×10^5) foram plaqueados em meio
150 DMEM completo e após 24 h, as células incubadas com 10 mg/mL de DQ-
151 BSA por 4 h a 37°C. As células foram então lavadas e infectadas com
152 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*, na proporção de
153 5:1. Transcorridas 3 horas de infecção, as células foram lavadas para
154 remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional
155 de 3, 21 e 45 h.

156 **Marcação de vacúolos parasitóforos induzidos por *L.***
157 ***amazonensis* ou *L. major* com a sonda lisossomal LysoTracker**

158 Macrófagos de camundongos CBA foram plaqueados em meio DMEM
159 completo e infectadas com promastigotas metacíclicas, na proporção de 5:1.
160 Transcorridas 3 h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos
161 parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 19 e 43 h.
162 Em seguida, os macrófagos foram incubados com 1 μ M de LysoTracker[®] Red
163 DND-99 (Molecular Probes) por 2 h.

164 **Avaliação da presença de LC3 nos vacúolos parasitóforos**
165 **induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major***

166 Macrófagos de camundongos CBA foram semeados em poços de placas
167 de 24 poços em meio DMEM completo e infectadas com promastigotas
168 metacíclicas na proporção de 5:1. Transcorridas 6 h de infecção, as células
169 foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas
170 por tempo adicional de 19 e 43 h. Posteriormente, foi realizada marcação
171 para LC3.

172 **Imunomarcação**

173 As células fixadas com solução de paraformaldeído 4% foram e
174 incubadas com NH_4Cl 50 mM durante 15 min. Posteriormente, as células
175 foram permeabilizadas durante 30 min, utilizando PBST 2% e foi realizado o
176 bloqueio de ligações inespecíficas com PBST 0,1% contendo 10% de soro de
177 camundongo (abcam, ab7486) inativado e 0,1% de gelatina de teleósteos
178 (Sigma-Aldrich) por 40 min. Posteriormente, as células foram incubadas com

179 o anticorpo primário. Subsequentemente, as células foram expostas ao
180 anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor e as lâminas foram
181 então montadas utilizando o kit Vectashield com DAPI. As imagens foram
182 adquiridas em microscópio de fluorescência Olympus-BX51 no aumento de
183 400x.

184 **Transfecção**

185 Células de linhagem macrófágica RAW foram transfectadas com os
186 plasmídeo pmRFP-LC3 ou pmRFP-C1 pelo método Lipofectamine™ 2000
187 (Invitrogen). Para geração de linhagem estáveis, o antibiótico G418 (Sigma-
188 Aldrich) na concentração de 600 µg/mL foi adicionado ao meio de cultura.

189 **Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 no curso da** 190 **infecção**

191 Células RAW superexpressando LC3 foram infectadas com
192 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de
193 10:1. Após 6h, tempo zero, as células foram lavadas para remoção dos
194 parasitos não internalizados e reincubadas por 18 e 42 h. Após os diferentes
195 tempos de incubação, as células foram fixadas com PFA 4% e montadas
196 utilizando o kit Vectashield com DAPI (VECTOR).

197 **Avaliação do efeito da superexpressão de LC3 na interação** 198 **(binding) e fagocitose**

199 Células RAW superexpressando LC3 foram plaqueadas em poços de
200 24 poços em meio DMEM completo. Após 24h, as células foram lavadas com
201 solução de NaCl 0,9% e incubadas com meio DMEM [suplementado com 25
202 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) pH 7,4,
203 2 mM de glutamina, bicarbonato de sódio 0,2 g/L e 10% de soro bovino fetal]
204 por 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com
205 promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major* na proporção de
206 10:1 e centrifugadas a 4°C por 5 min a 720 x g e incubadas a 4°C por mais 5
207 min, esta etapa permite a interação sem que haja fagocitose dos parasitos.
208 Após esse período as células foram lavadas para remoção dos parasitos não
209 internalizados. Para o estudo de interação as células foram fixadas com

210 paraformaldeído 4% e para estudo da fagocitose as células foram
211 reincubadas por 1 h,

212 **Análise estatística**

213 Para comparação entre dois grupos entre si, com distribuição normal, foi
214 utilizado o teste *t* de Student não pareado e como teste não paramétrico o de
215 Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos foram consideradas
216 estatisticamente significante quando o valor de $p < 0,05$.

217 **Resultados**

218 Com intuito de avaliar a presença de atividade hidrolítica no vacúolo
219 parasitóforo de *L. amazonensis* ou *L. major*, macrófagos de camundongo
220 CBA foram incubados com DQ-BSA™, marcador funcional de
221 compartimentos degradativos. A figura 1 ilustra as imagens de culturas de
222 macrófagos infectados por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde
223 observa-se a co-localização dos parasitos marcados em verde com os
224 vacúolos parasitóforos marcados com DQ-BSA™ em vermelho. Após 24 h de
225 infecção, foi observado que em 20,97% dos macrófagos infectados com *L.*
226 *amazonensis* houve co-localização dos parasitos marcados com vacúolos
227 contendo DQ-BSA™ hidrolisado. Por outro lado, nos macrófagos infectados
228 com *L. major* o percentual de co-localização foi de 59,47% ($p < 0,01$, Figura
229 3). Resultado similar foi observado no tempo de 48 h, no qual houve 20,75%
230 de co-localização nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, enquanto
231 que a co-localização foi de 47,14% em macrófagos infectados com *L. major*
232 ($p < 0,01$, Figura 1L).

233 Adicionalmente, foi estimada a co-localização dos vacúolos marcados
234 com LysoTracker®, que se acumula em compartimentos lisossomais, e os
235 parasitos. A figura 2 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados
236 por *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização
237 dos parasitos marcados em verde com os vacúolos parasitóforos marcados
238 com LysoTracker® em vermelho. A co-localização dos vacúolos marcados
239 com LysoTracker® e os parasitos foi quantificada e observou-se que, em
240 31,62% dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, houve co-
241 localização dos parasitos marcados com vacúolos contendo LysoTracker®.

242 Por outro lado, em macrófagos infectados por *L. major*, foi observada co-
243 localização em 50,74% ($p < 0,01$, Figura 2L). Essa diferença no percentual de
244 co-localização foi mantida após 48h de infecção, observada em 31,91% dos
245 macrófagos infectados por *L. amazonensis* e em 46,88% daqueles infectados
246 por *L. major* ($p < 0,01$, Figura 2L).

247 Após caracterizarmos os vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L.*
248 *major* utilizando marcadores solúveis, avaliamos a presença dos marcadores
249 de membrana: LAMP, proteína de compartimento lisossomal, e LC3, proteína
250 específica de autofagossomo. Não foi observada diferença no percentual de
251 co-localização de LAMP com *L. amazonensis* ou *L. major*, dado não
252 mostrado.

253 Em seguida, para melhor investigar a possível interação dos vacúolos
254 parasitóforos de *Leishmania* com a via autofágica, avaliamos a marcação de
255 LC3 endógeno em vacúolos induzidos por *L. amazonensis* ou *L. major*. A
256 figura 3 ilustra as imagens de culturas de macrófagos infectados por *L.*
257 *amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) onde observa-se a co-localização dos
258 parasitos marcados em verde com a proteína LC3 marcada em vermelho. Foi
259 observada a expressão de LC3 endógeno tanto nos vacúolos parasitóforos
260 induzidos por *L. amazonensis* quanto aqueles induzidos por *L. major*. No
261 entanto, houve maior percentual de co-localização de LC3 com parasitos em
262 macrófagos infectados com *L. amazonensis*, 28,39%, em comparação com
263 aqueles infectados com *L. major*, 7,02% ($p < 0,01$, Figura 3 L).

264 Afim de avaliar o efeito da LC3 na infecção por *L. amazonensis* ou *L.*
265 *major*, células RAW-pmRFP-LC3 foram infectadas com promastigotas
266 metacíclicas de *L. amazonensis* ou *L. major*. Foi observada uma redução
267 estatisticamente significativa, de 68,75%, no percentual de infecção com *L.*
268 *amazonensis* nas células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às RAW
269 pmRFP-C1, no tempo de 6 h (Figura 4 A). Esta diferença reduziu para 62,55
270 e 40,2% nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente. Similarmente, houve
271 uma redução estatisticamente significativa no número de parasitos
272 internalizados por célula de 35 e 13,4% nas células RAW-pmRFP-LC3 em
273 relação às células controle RAW pmRFP-C1, nos tempos de 6 e 24 h,

274 respectivamente (Figura 4 B). Como nos ensaios com *L. amazonensis*, a
275 superexpressão de LC3 reduziu o percentual de células RAW-pmRFP-LC3
276 infectadas com *L. major* quando comparado ao controle. Observou-se uma
277 redução de 88 e 72% no percentual de células infectadas nas células RAW-
278 pmRFP-LC3 em comparação às células controle RAW pmRFP-C1, nos
279 tempos de 6 e 24 h, respectivamente (Figura 4 C). No entanto, não foi
280 observada diferença estatisticamente significativa na carga parasitária (Figura
281 4 D).

282 Em seguida, avaliamos se a redução na infecção por *L. amazonensis* ou
283 *L. major* nas células RAW-pmRFP-LC3 estava associada com uma redução
284 na interação, *binding*, dessas espécies de *Leishmania* com as células. A
285 superexpressão de LC3 não reduziu a interação de *L. amazonensis* ou *L.*
286 *mahjor* com as células RAW-pmRFP-LC3 em relação às RAW pmRFP-C1,
287 dado não mostrado. Visto que não houve diferença no *binding*, buscamos
288 avaliar o papel da LC3 na capacidade fagocítica das células RAW-pmRFP-
289 LC3. A superexpressão de LC3 provocou uma diminuição de 70,87% na
290 capacidade das células RAW-pmRFP-LC3 em comparação às RAW-pmRFP-
291 C1 em fagocitar *L. amazonensis* (Figura 5 A), apesar do número de *L.*
292 *amazonensis* por célula infectada não ter sido diferente (Figura 5 B).
293 Resultado semelhante foi observado nas células infectadas com *L. major*, em
294 que houve uma redução de 77,13% na capacidade fagocítica das células
295 RAW-pmRFP-LC3 em relação às células controle (Figura 5 C), sem redução
296 do número de parasitos fagocitados por célula infectada (Figura 5 D).

297 **Discussão**

298 No presente estudo os vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* e *L.*
299 *major* foram caracterizados quanto a marcação de LysoTracker e DQ-BSA
300 bem como quanto a presença de LC3 na membrana desses compartimentos.
301 Além disso, foi demonstrado que a superexpressão de LC3 reduz a
302 fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major* por células RAW.

303 O DQ-BSA e LysoTracker não são marcadores específicos de
304 autofagia, contudo, seu uso em conjunto com outros marcadores de
305 compartimentos autofágicos é uma ferramenta adequada e importante para

306 monitorizar compartimentos ácidos e degradativos como autofagolisossomo
307 (KLIONSKY *et al.*, 2007; MITOU *et al.*, 2009; VASQUEZ; COLOMBO, 2009).
308 Diversos estudos tem demonstrado que os vacúolos induzidos por
309 microrganismos intracelulares podem ser carregados com estes marcadores
310 solúveis (AGUILERA *et al.*, 2009; BERON *et al.*, 2002; GUTIERREZ *et al.*,
311 2004; LERENA; COLOMBO, 2011). No presente estudo foi observada uma
312 maior co-localização de DQ-BSA, marcador de compartimento hidrolítico, e
313 de LysoTracker, marcador de compartimento lisossomal, com parasitos em
314 macrófagos infectados com *L. major* em comparação com aqueles infectados
315 com *L. amazonensis*.

316 Previamente, Real e Mortara (2012) demonstraram que os vacúolos de
317 *L. amazonensis* e *L. major* são marcados com a sonda LysoTracker. Esses
318 autores não compararam a co-localização desse marcador de
319 compartimentos ácidos com os parasitos, eles compararam a intensidade
320 dessa sonda e mostraram que os vacúolos parasitóforos induzidos por *L.*
321 *major* apresentam menor intensidade de LysoTracker em relação aos de *L.*
322 *amazonensis*. Real e Mortara (2012) acreditam que isso se deva a um
323 ambiente menos ácido nos vacúolos parasitóforos de *L. major* que seria
324 explicado por uma menor abundância da bomba vacuolar H⁺-ATPase em
325 comparação ao vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis*. No entanto,
326 quando analisamos nossos achados e aqueles apresentados por Real e
327 Mortara (2012), sugerimos que apesar dos vacúolos induzidos por *L. major*
328 terem uma menor quantidade absoluta de LysoTracker no seu interior, devido
329 ao tamanho, sua concentração seria maior do que no vacúolo de *L.*
330 *amazonensis*.

331 Evidências suportam a noção que as grandes dimensões dos vacúolos
332 parasitóforos formados por parasitos do complexo Mexicana, diminuem a
333 concentração de enzimas hidrolíticas e de espécies reativas de oxigênio,
334 funcionando como estratégia contra o sistema de defesa da célula hospedeira
335 (SACKS; SHER, 2002; WILSON *et al.*, 2008). Assim, acreditamos que a
336 menor co-localização de ambos os marcadores solúveis em vacúolos
337 contendo *L. amazonensis* em comparação com aqueles contendo *L. major*
338 está associada a maior dimensão dos vacúolos parasitóforos induzidos por

339 essa espécie de *Leishmania* e, como consequência, diluição dos marcadores.
340 Em contradição a essa hipótese, Berón (2002) e Aguilera e colaboradores
341 (2009) demonstraram que os vacúolos de grande tamanho induzidos por *C.*
342 *burnetti*, que apresentam semelhanças morfológicas aos induzidos por *L.*
343 *amazonensis* (ANTOINE *et al.*, 1990; MAURIN *et al.*, 1992; VERAS *et al.*,
344 1994), são marcados com LysoTracker, DQ-BSA e MDC, indicando que o
345 fato de apresentar grande dimensão não impede que esses compartimentos
346 apresentem marcadores solúveis característicos de lisossomas e
347 autofagossomas. Esses achados são aparentemente contraditórios aos
348 nossos, mas diferente de nós os autores não objetivaram a quantificação do
349 percentual de co-localização desses marcadores com *C. burnetti*.

350 No presente estudo, além de evidenciarmos pela primeira vez a
351 presença de LC3 endógeno em vacúolos induzidos por duas espécies
352 diferentes de *Leishmania*, *L. amazonensis* ou *L. major*, demonstramos uma
353 maior co-localização da LC3 com *L. amazonensis* do que com *L. major*. A
354 presença da LC3 já foi demonstrada em vacúolos induzidos por diferentes
355 espécies de bactéria: *Listeria monocytogenes* (BIRMINGHAM *et al.*, 2007),
356 *M. tuberculosis* (GUTIERREZ *et al.*, 2004), *C. burnetti* (BÉRON *et al.*, 2002;
357 GUTIERREZ *et al.*, 2005), *M. marinum* (LERENA; COLOMBO, 2011),
358 *Salmonella enterica* (BIRMINGHAM *et al.*, 2006), *Streptococcus pyogenes*
359 (NAKAGAWA *et al.*, 2004) e *Anoplasma phagocytophilum* (NIU *et al.*, 2008),
360 indicando que existe interação entre os vacúolos contendo bactérias com
361 compartimentos da via autofágica. A presença de LC3 na infecção por
362 *Leishmania* foi demonstrada anteriormente por Cyrino e colaboradores
363 (2012), eles observaram uma maior expressão de LC3 em macrófagos
364 infectados por *L. amazonensis* em comparação com os macrófagos não
365 infectados. No entanto, os autores não investigaram a expressão da LC3 em
366 vacúolos parasitóforos induzidos por *L. amazonensis*.

367 Em resumo, foi observado maior percentual de co-localização tanto do
368 marcador de compartimento hidrolítico, Dq-BSA, como do marcador de
369 compartimento lisossomal, LysoTracker, com parasitos em macrófagos
370 infectados por *L. major* em comparação com aqueles infectados por *L.*
371 *amazonensis*. Por outro lado, houve maior co-localização de LC3 endógeno

372 com *L. amazonensis* em relação a *L. major*, sugerindo que há maior interação
373 do vacúolo de *L. amazonensis* com compartimentos autofágicos e menor
374 interação com compartimentos lisossomais. É possível que a interação com
375 compartimentos autofágicos funcione tanto como fonte de membrana para o
376 desenvolvimento do vacúolo parasitóforo, diminuindo a concentração de
377 enzimas hidrolíticas e espécies reativas de oxigênio neste compartimento,
378 como fonte direta de metabólitos e aminoácidos que favoreceriam o
379 crescimento e desenvolvimento intracelular de *L. amazonensis*. Os achado
380 do presente estudo estão em concordância com um estudo prévio que
381 mostrou que vacúolos parasitóforos induzidos por *Leishmania mexicana*,
382 similares aos induzidos por *L. amazonensis*, interagem com a via autofágica
383 pois adquirem macromoléculas do citosol da célula hospedeira através de
384 microautofagia (SCHAIBLE *et al.*, 1999).

385 Em seguida, o papel de LC3 na infecção por *Leishmania* foi
386 investigado, avaliando o efeito da superexpressão dessa proteína em células
387 de linhagem macrófaga sobre a infecção por *Leishmania*. A superexpressão
388 de LC3, ao contrário da nossa hipótese, reduziu o percentual tanto de células
389 infectadas por *L. amazonensis* como aquelas infectadas por *L. major* em
390 relação às células controle. Em estudo anterior foi demonstrado que células
391 induzidas à autofagia tanto fisiológica como farmacológica inibem a
392 capacidade fagocítica de células de mamífero (LIMA *et al.*, 2011). Assim, nos
393 questionamos se a inibição da infecção observada em células
394 superexpressando a LC3, estaria relacionada à inibição na capacidade
395 fagocítica das células macrófagas. Similarmente, ao efeito da indução de
396 autofagia em macrófagos, a superexpressão de LC3 em macrófagos de
397 linhagem, promove inibição da fagocitose sem alterar o binding dos parasitos.
398 Gutierrez e colaboradores (2005) avaliaram o efeito da superexpressão de
399 LC3 na infecção por *C. burnetti* e, em contraste ao resultado obtido por nós,
400 mostraram que a superexpressão de LC3 em células de linhagem CHO
401 favorece a infecção por *C. burnetti*, aumenta o número de vacúolos por
402 célula além de acelerar a biogênese/maturação dos vacúolos contendo esta
403 bactéria. É possível que a indução da autofagia ou superexpressão de LC3

404 tenha efeito inibitório sobre a fagocitose apenas de fagócitos profissionais,
405 mas não de células não macrofágicas.

406 Uma possível explicação para a redução na capacidade fagocítica das
407 células RAW superexpressando LC3 é a falta de membrana plasmática
408 disponível para fagocitose de *L. amazonensis* e *L. major*, como sugerido por
409 Lima e colaboradores (2011). Estudos já demonstraram a comunicação entre
410 as vias autofágica e fagocítica (SHUI *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2007) e que estas
411 vias podem ser ativadas por moléculas em comum (SANJUAN *et al.*, 2007;
412 VIEIRA *et al.*, 2001). Assim, a superexpressão de LC3 estaria induzindo
413 autofagia nas células RAW o que poderia levar a um recrutamento de parte
414 da membrana plasmática para a formação de autofagossomas, impedindo
415 assim, a internalização de *L. amazonensis* ou *L. major* pela via fagocítica.

416 Corroborando nossa hipótese que a autofagia interfere negativamente
417 na fagocitose, recente estudo de Bonilla e colaboradores (2013) demonstrou
418 que macrófagos de medula óssea de camundongos knockout para Atg7,
419 proteína importante na elongação do autofagossomo, apresentam um maior
420 infecção por *M. tuberculosis* em comparação às células controle.
421 Adicionalmente, foi mostrado que esses macrófagos apresentam uma
422 redução na conjugação de LC3 à fosfatidiletanolamina formando LC3-II e que
423 o aumento na capacidade fagocítica está associado a uma maior expressão
424 dos receptores scavenger: MARCO e MSR1. Em nosso estudo, é possível
425 que a redução da capacidade fagocítica das células RAW-pmRFP-LC3 esteja
426 relacionada a uma redução na expressão de receptores de membrana
427 importantes na fagocitose de *Leishmania*, como os receptores para frações
428 do complemento (BLACKWELL *et al.*, 1985; MOSSER; EDELSON, 1985), e
429 os de reconhecimento de padrão (GOUGH; GORDON, 2000).

430 Em conjunto, estes dados demonstram que os vacúolos parasitóforos de
431 *L. amazonensis* e *L. major* interagem com compartimentos da via autofágica
432 de forma distinta e que a superexpressão de LC3 reduz a fagocitose de *L.*
433 *amazonensis* e *L. major* por células RAW, o que resulta na redução da
434 infecção.

435 **REFERÊNCIAS**

- 436 AGUILERA, M.; SALINAS, R.; ROSALES, E.; CARMINATI, S.; COLOMBO, M. I.;
437 BERON, W. Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of
438 parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii*. **Infection and immunity**, v.
439 77, n. 10, p. 4609-20, Oct 2009.
- 440 ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous
441 vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH.
442 **Infection and immunity**, v. 58, n. 3, p. 779-87, Mar 1990.
- 443 BERON, W.; GUTIERREZ, M. G.; RABINOVITCH, M.; COLOMBO, M. I. *Coxiella*
444 *burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics.
445 **Infection and immunity**, v. 70, n. 10, p. 5816-21, Oct 2002.
- 446 BIRMINGHAM, C. L.; CANADIEN, V.; GOUIN, E.; TROY, E. B.; YOSHIMORI, T.;
447 COSSART, P.; HIGGINS, D. E.; BRUMELL, J. H. *Listeria monocytogenes* evades
448 killing by autophagy during colonization of host cells. **Autophagy**, v. 3, n. 5, p. 442-
449 51, Sep-Oct 2007.
- 450 BIRMINGHAM, C. L.; SMITH, A. C.; BAKOWSKI, M. A.; YOSHIMORI, T.; BRUMELL,
451 J. H. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the
452 *Salmonella*-containing vacuole. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 16,
453 p. 11374-83, Apr 21 2006.
- 454 BLACKWELL, J. M.; EZEKOWITZ, R. A.; ROBERTS, M. B.; CHANNON, J. Y.; SIM,
455 R. B.; GORDON, S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind
456 *Leishmania* in the absence of serum. **The Journal of experimental medicine**, v.
457 162, n. 1, p. 324-31, Jul 1 1985.
- 458 BONILLA, D. L.; BHATTACHARYA, A.; SHA, Y.; XU, Y.; XIANG, Q.; KAN, A.;
459 JAGANNATH, C.; KOMATSU, M.; EISSA, N. T. Autophagy regulates phagocytosis
460 by modulating the expression of scavenger receptors. **Immunity**, v. 39, n. 3, p. 537-
461 47, Sep 19 2013.
- 462 CYRINO, L. T.; ARAUJO, A. P.; JOAZEIRO, P. P.; VICENTE, C. P.; GIORGIO, S. In
463 vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in
464 macrophages. **Tissue & cell**, v. 44, n. 6, p. 401-8, Dec 2012.
- 465 GOMES, I. N.; CALABRICH, A. F.; TAVARES RDA, S.; WIETZERBIN, J.; DE
466 FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. Differential properties of CBA/J mononuclear
467 phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different
468 species of *Leishmania*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 5, n. 4, p. 251-
469 60, Apr 2003.
- 470 GOUGH, P. J.; GORDON, S. The role of scavenger receptors in the innate immune
471 system. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 2, n. 3, p. 305-11, Mar 2000.
- 472 GUTIERREZ, M. G.; MASTER, S. S.; SINGH, S. B.; TAYLOR, G. A.; COLOMBO, M.
473 I.; DERETIC, V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and
474 *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v. 119, n. 6, p.
475 753-66, Dec 17 2004.
- 476 GUTIERREZ, M. G.; VAZQUEZ, C. L.; MUNAFO, D. B.; ZOPPINO, F. C.; BERON,
477 W.; RABINOVITCH, M.; COLOMBO, M. I. Autophagy induction favours the
478 generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. **Cellular**
479 **microbiology**, v. 7, n. 7, p. 981-93, Jul 2005.

- 480 KIRISAKO, T.; ICHIMURA, Y.; OKADA, H.; KABEYA, Y.; MIZUSHIMA, N.;
481 KLIONSKY, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions.
482 **Journal of cell science**, v. 118, n. Pt 1, p. 7-18, Jan 1 2005.
- 483 KLIONSKY, D. J.; CUERVO, A. M.; SEGLEN, P. O. Methods for monitoring
484 autophagy from yeast to human. **Autophagy**, v. 3, n. 3, p. 181-206, May-Jun 2007.
- 485 LANG, T.; SCHAEFFELER, E.; BERNREUTHER, D.; BREDSCHNEIDER, M.;
486 WOLF, D. H.; THUMM, M. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated
487 proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. **The EMBO**
488 **journal**, v. 17, n. 13, p. 3597-607, Jul 1 1998.
- 489 LERENA, M. C.; COLOMBO, M. I. Mycobacterium marinum induces a marked LC3
490 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1
491 secretion system. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 6, p. 814-35, Jun 2011.
- 492 LEVINE, B.; DERETIC, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive
493 immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 7, n. 10, p. 767-77, Oct 2007.
- 494 LIMA, J. G.; DE FREITAS VINHAS, C.; GOMES, I. N.; AZEVEDO, C. M.; DOS
495 SANTOS, R. R.; VANNIER-SANTOS, M. A.; VERAS, P. S. Phagocytosis is inhibited
496 by autophagic induction in murine macrophages. **Biochemical and biophysical**
497 **research communications**, v. 405, n. 4, p. 604-9, Feb 25 2011.
- 498 MAURIN, M.; BENOLIEL, A. M.; BONGRAND, P.; RAOULT, D. Phagolysosomes of
499 Coxiella burnetii-infected cell lines maintain an acidic pH during persistent infection.
500 **Infection and immunity**, v. 60, n. 12, p. 5013-6, Dec 1992.
- 501 MESTRE, M. B.; FADER, C. M.; SOLA, C.; COLOMBO, M. I. Alpha-hemolysin is
502 required for the activation of the autophagic pathway in Staphylococcus aureus-
503 infected cells. **Autophagy**, v. 6, n. 1, p. 110-25, Jan 2010.
- 504 MITOU, G.; BUDAK, H.; GOZUACIK, D. Techniques to study autophagy in plants. **Int**
505 **J Plant Genomics**, v. 2009, p. 451357, 2009.
- 506 MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3)
507 is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of**
508 **immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785-9, Oct 1985.
- 509 NAKAGAWA, I.; AMANO, A.; MIZUSHIMA, N.; YAMAMOTO, A.; YAMAGUCHI, H.;
510 KAMIMOTO, T.; NARA, A.; FUNAO, J.; NAKATA, M.; TSUDA, K.; HAMADA, S.;
511 YOSHIMORI, T. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus.
512 **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1037-40, Nov 5 2004.
- 513 NIU, H.; YAMAGUCHI, M.; RIKIHISA, Y. Subversion of cellular autophagy by
514 Anaplasma phagocytophilum. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 3, p. 593-605, Mar
515 2008.
- 516 PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.;
517 TAKIYA, C. M.; CORTE-REAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A.
518 Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania*
519 *amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes and infection /**
520 **Institut Pasteur**, v. 11, n. 2, p. 181-90, Feb 2009.
- 521 REAL, F.; MORTARA, R. A. The diverse and dynamic nature of Leishmania
522 parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. **PLoS neglected**
523 **tropical diseases**, v. 6, n. 2, p. e1518, 2012.
- 524 RUSSELL, D. G.; XU, S.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the

- 525 parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **Journal of**
526 **cell science**, v. 103 (Pt 4), p. 1193-210, Dec 1992.
- 527 SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat**
528 **Immunol**, v. 3, n. 11, p. 1041-7, Nov 2002.
- 529 SANJUAN, M. A.; DILLON, C. P.; TAIT, S. W.; MOSHIACH, S.; DORSEY, F.;
530 CONNELL, S.; KOMATSU, M.; TANAKA, K.; CLEVELAND, J. L.; WITHOFF, S.;
531 GREEN, D. R. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy
532 pathway to phagocytosis. **Nature**, v. 450, n. 7173, p. 1253-7, Dec 20 2007.
- 533 SCHAIBLE, U. E.; SCHLESINGER, P. H.; STEINBERG, T. H.; MANGEL, W. F.;
534 KOBAYASHI, T.; RUSSELL, D. G. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania*
535 *mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent
536 routes. **Journal of cell science**, v. 112 (Pt 5), p. 681-93, Mar 1999.
- 537 SCHNAITH, A.; KASHKAR, H.; LEGGIO, S. A.; ADDICKS, K.; KRONKE, M.; KRUT,
538 O. *Staphylococcus aureus* subvert autophagy for induction of caspase-independent
539 host cell death. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 4, p. 2695-706, Jan
540 26 2007.
- 541 SHUI, W.; SHEU, L.; LIU, J.; SMART, B.; PETZOLD, C. J.; HSIEH, T. Y.; PITCHER,
542 A.; KEASLING, J. D.; BERTOZZI, C. R. Membrane proteomics of phagosomes
543 suggests a connection to autophagy. **Proceedings of the National Academy of**
544 **Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 16952-7, Nov 4 2008.
- 545 SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for
546 isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient
547 centrifugation. **Experimental parasitology**, v. 99, n. 2, p. 97-103, Oct 2001.
548
- 549 VAZQUEZ, C. L.; COLOMBO, M. I. Assays to assess autophagy induction and fusion
550 of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using
551 monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. **Methods in enzymology**, v. 452, p.
552 85-95, 2009.
- 553 VERAS, P. S.; DE CHASTELLIER, C.; MOREAU, M. F.; VILLIERS, V.; THIBON, M.;
554 MATTEI, D.; RABINOVITCH, M. Fusion between large phagocytic vesicles: targeting
555 of yeast and other particulates to phagolysosomes that shelter the bacterium *Coxiella*
556 *burnetii* or the protozoan *Leishmania amazonensis* in Chinese hamster ovary cells.
557 **Journal of cell science**, v. 107 (Pt 11), p. 3065-76, Nov 1994.
- 558 VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; RAMEH, L.; BRACHMANN, S. M.; MATSUO, T.;
559 DAVIDSON, H. W.; SCHREIBER, A.; BACKER, J. M.; CANTLEY, L. C.; GRINSTEIN,
560 S. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome
561 formation and maturation. **The Journal of cell biology**, v. 155, n. 1, p. 19-25, Oct 1
562 2001.
- 563 WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K. A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J.; ADEREM,
564 A.; ANDREWS, N. W. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige
565 restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS pathogens**, v. 4,
566 n. 10, p. e1000179, Oct 2008.
- 567 XU, Y.; JAGANNATH, C.; LIU, X. D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K. E.;
568 EISSA, N. T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate
569 immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135-44, Jul 2007.

570 **Figura 1– Marcação com DQ-BSA™ de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L.***
571 ***major* por microscopia de fluorescência.** Macrófagos de camundongos CBA foram incubados
572 por 4 h com 10 mg/mL de DQ-BSA™ (vermelho) e em seguida infectados com promastigotas
573 metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J), na proporção de 5:1. Após 3 horas de
574 infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas
575 por tempo adicional de 21 e 45 h, totalizando 24 e 48 h de infecção. Posteriormente, as células
576 foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* (1:1000) seguido pelo anticorpo secundário anti-
577 IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:200, verde). Os núcleos celulares foram
578 marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta brancas correspondem a co-localização de
579 *Leishmania* com DQ-BSA™. As micrografias foram obtidas sobre a magnificação de 400x. Em
580 seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do percentual de
581 co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com o DQ-BSA™.
582 Experimento representativo de três realizados realizados em quintuplicata. Teste *t* de Student *** *p*
583 < 0,001

584 **Figura 2– Marcação com LysoTracker® de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou**
585 ***L. major* por microscopia de fluorescência.** Macrófagos de camundongos CBA foram infectados
586 com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J), na proporção de 5:1.
587 Após 3h de infecção, as células foram lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e
588 reincubadas por tempo adicional de 19 ou 43 h. Após este período, as células foram incubados
589 com 1 µM de LysoTracker® (vermelho) por 2 horas, totalizando 24 e 48 h. Posteriormente, as
590 células foram marcadas com anticorpo anti-*Leishmania* (1:1000) seguido pelo anticorpo
591 secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (1:200, verde). Os núcleos
592 celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta branca correspondem a co-
593 localização de *Leishmania* com LysoTracker®. As micrografias foram obtidas sobre a magnificação
594 de 400x. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a quantificação do
595 percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major* (barra cinza) com o
596 LysoTracker®. Experimento representativo de dois realizados realizados em quintuplicata. Um
597 experimento realizado. Teste *t* de Student *** *p* < 0,001, ** *p* < 0,01.

598 **Figura 3– Marcação com anti-LC3 de macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L.***
599 ***major* por microscopia de fluorescência.** Macrófagos de camundongos CBA foram infectados
600 com promastigotas metacíclicas de *L. amazonensis* (A-E) ou *L. major* (F-J) previamente marcadas
601 com carboxifluoresceína (verde), na proporção de 5:1. Após 3h de infecção, as células foram
602 lavadas para remoção dos parasitos não internalizados e reincubadas por tempo adicional de 21
603 ou 45 h. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpo anti-LC3 (1:200) seguido pelo
604 anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 568 (1:200,
605 vermelho). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (azul). As cabeças de seta branca
606 correspondem a co-localização de *Leishmania* com LC-3. As micrografias foram obtidas sobre a
607 magnificação de 400x. Em seguida, as imagens adquiridas foram montadas e foi realizada a
608 quantificação do percentual de co-localização de *L. amazonensis* (barra branca) ou *L. major*
609 (barra cinza) com LC-3. Experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste
610 Mann-Whitney, * *p* < 0,01.

611 **Figura 4 -Efeito da superexpressão de LC3 na infecção de células RAW pmRFP-LC3.**
612 Células RAW pmRFP-LC3 e RAW pmRFP-C1 foram semeadas em placas de 24 poços e
613 infectadas com promastigotas metacíclicas de *L.amazonensis* (A e B) ou *L. major* (C e D) , na
614 proporção de 10:1. Após 6 h de infecção as células as células foram lavadas e re-incubadas por
615 um período adicional de 18 e 42 horas, totalizando 6, 24 e 48h. Após estes períodos, as células
616 foram lavadas e fixadas. Em seguida, as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI e
617 micrografias foram oobtidas em microscópio de fluorescência sobre a magnificação de 400x.
618 Posteriormente, foi quantificado o percentual de células infectadas e o número de parasitos por
619 célula. Em cada lamínula no mínimo 400 células foram contadas. A e C – Percentual de células
620 infectadas; B e D – Número de *Leishmania* por células. Um experimento representativo de dois
621 realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$.

622 **Figura 5 - Efeito da super-expressão de LC3na fagocitose de *L. amazonensis* ou *L. major***
623 **por células RAW.** Células RAW pmRFP-LC3 e RAW pmRFP-C1 foram cultivadas em placas de
624 24 poços e infectadas com promastigotas metacíclicas de *L.amazonensis* (A e B)ou *L. major* (C e
625 D), na proporção de 10:1. Após 10 min de *binding* a 4°C, as células foram lavadas e re-incubadas
626 por um período adicional de 1 h. Após estes período, as células foram lavadas e fixadas. Em
627 seguida, as lamínulas foram montadas com Vectashield com DAPI e micrografias foram oobtidas
628 em microscópio de fluorescência sobre a magnificação de 400x. Posteriormente, foi quantificado o
629 percentual de fagocitose e o número de parasitos por célula. Em cada lamínula no mínimo 400
630 células foram contadas. A e C – Percentual de fagocitose; B e D – Número de *Leishmania* por
631 células. Um experimento representativo de dois realizados em quintuplicata. Teste Mann-Whitney
632 ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

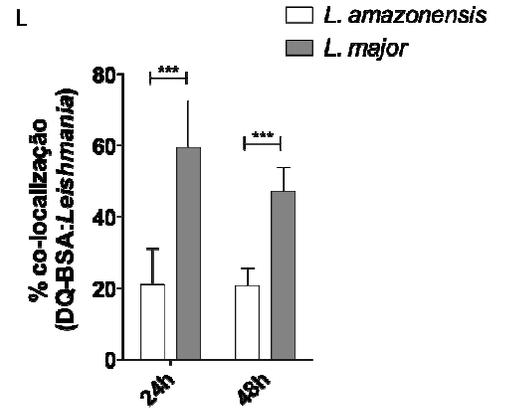
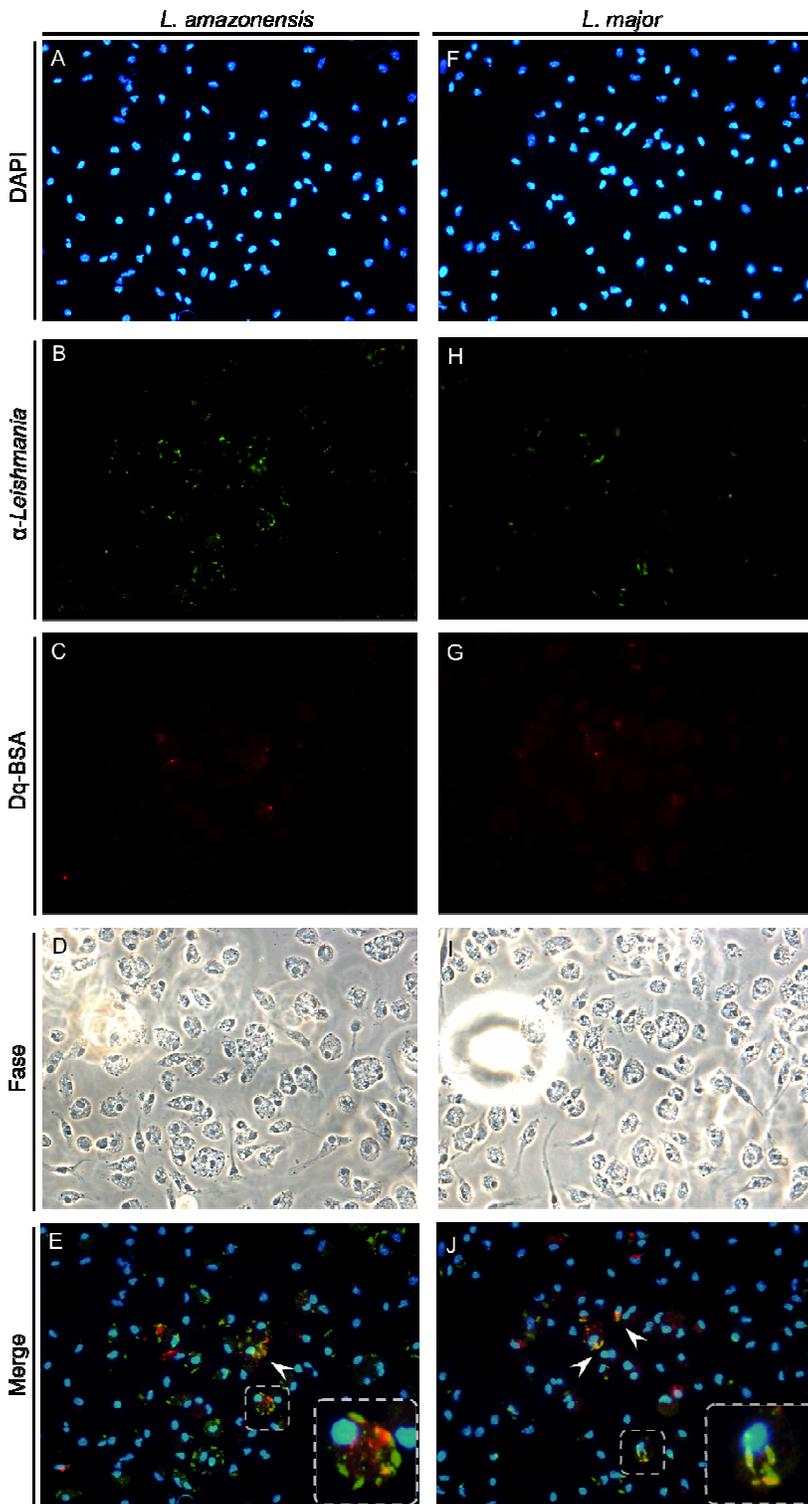
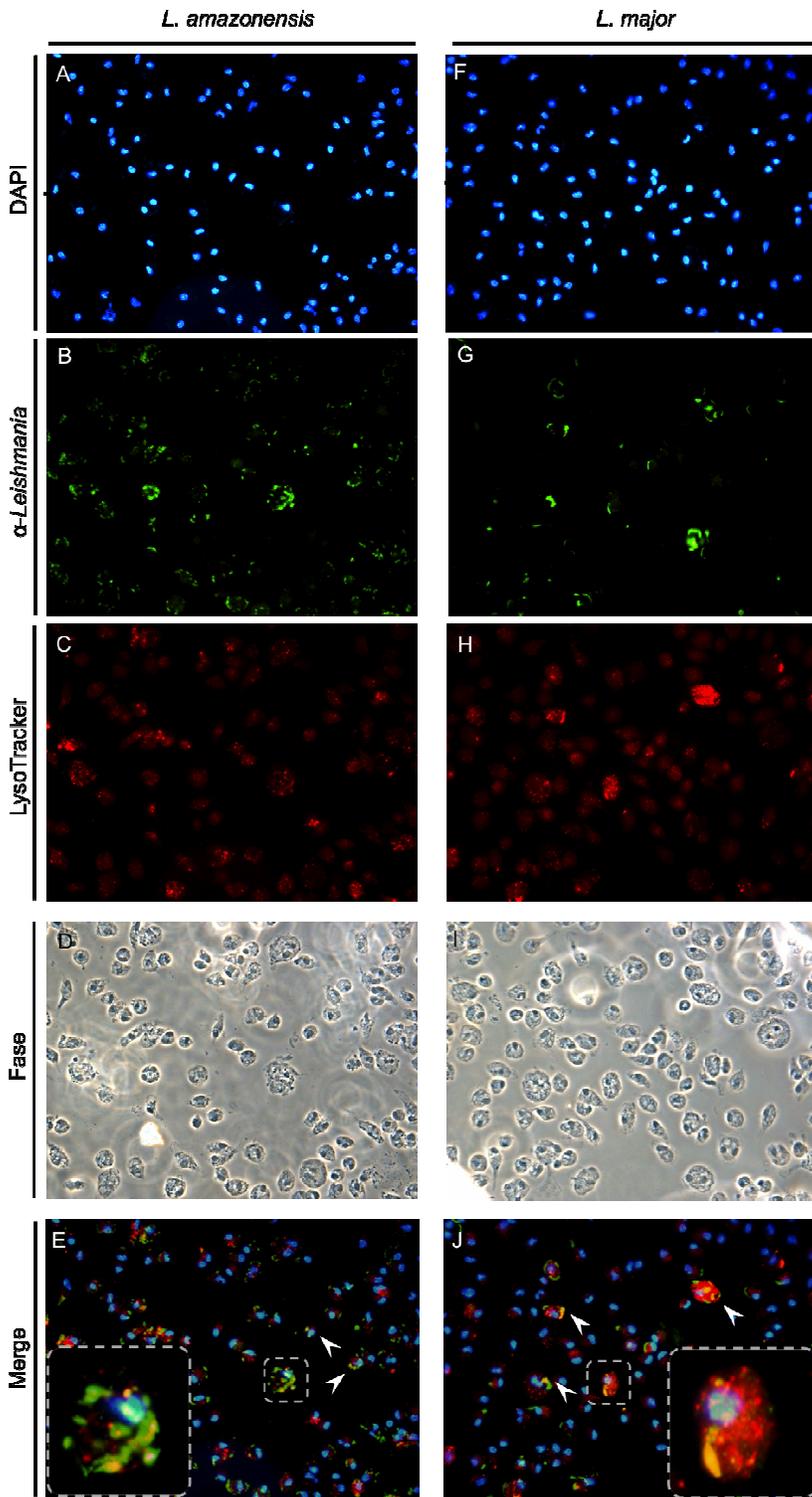


Figura 1
633



L

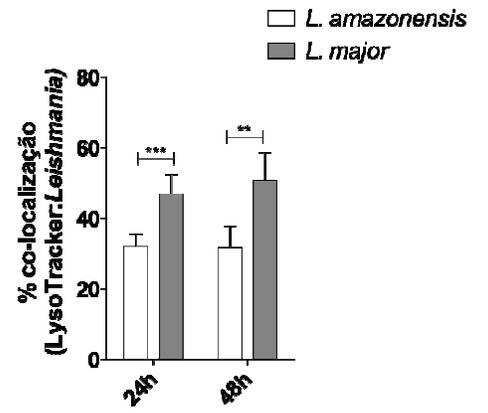
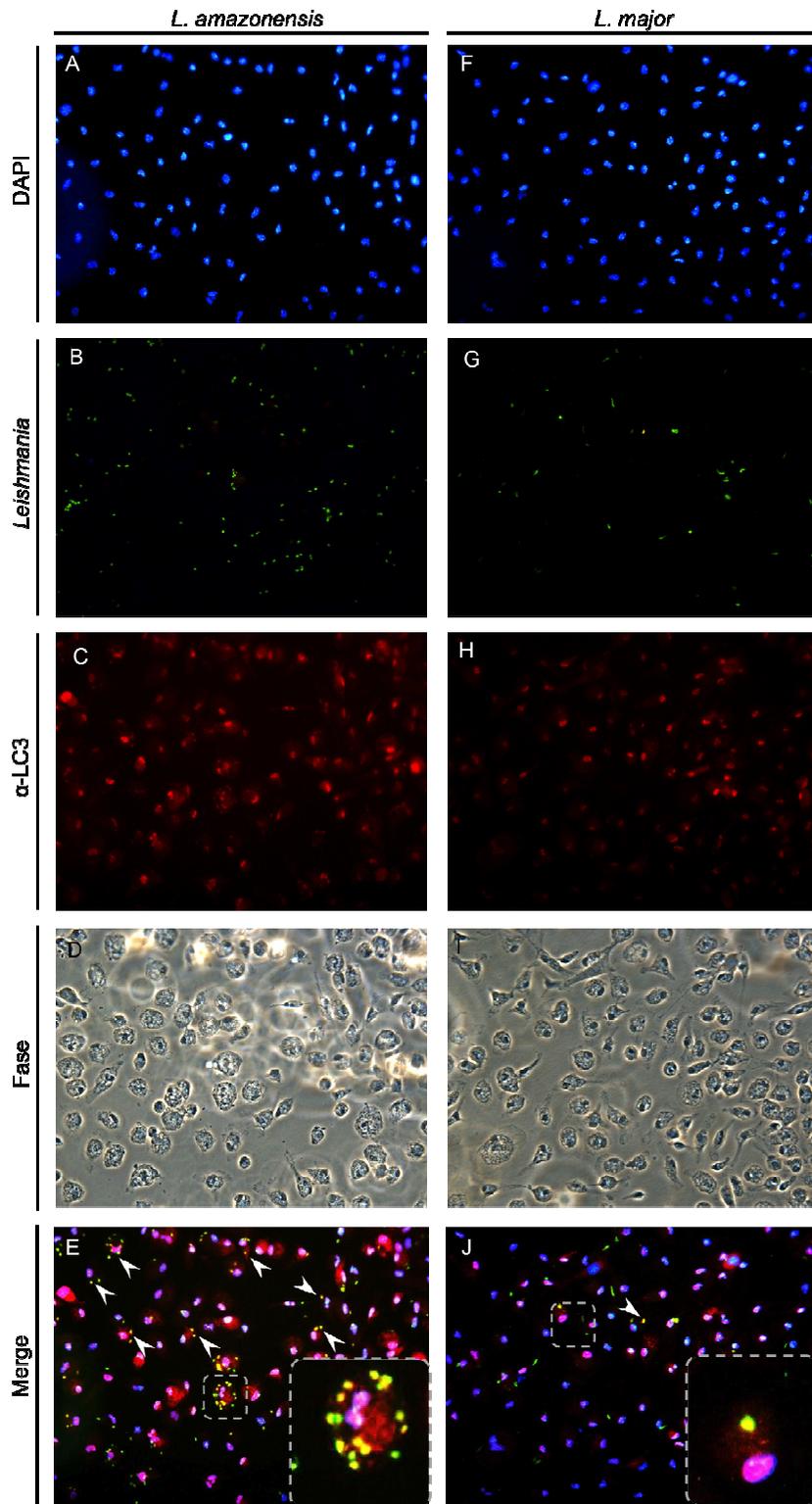


Figura 2



F

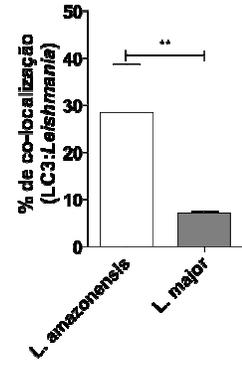


Figura 3

635

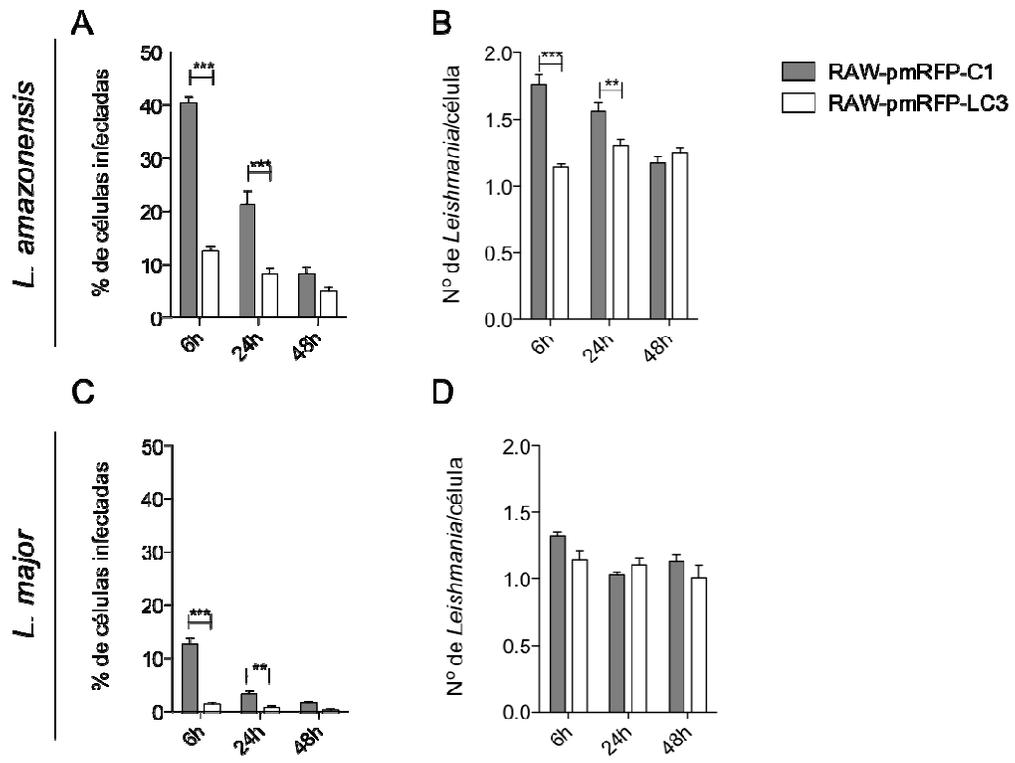


Figura 4

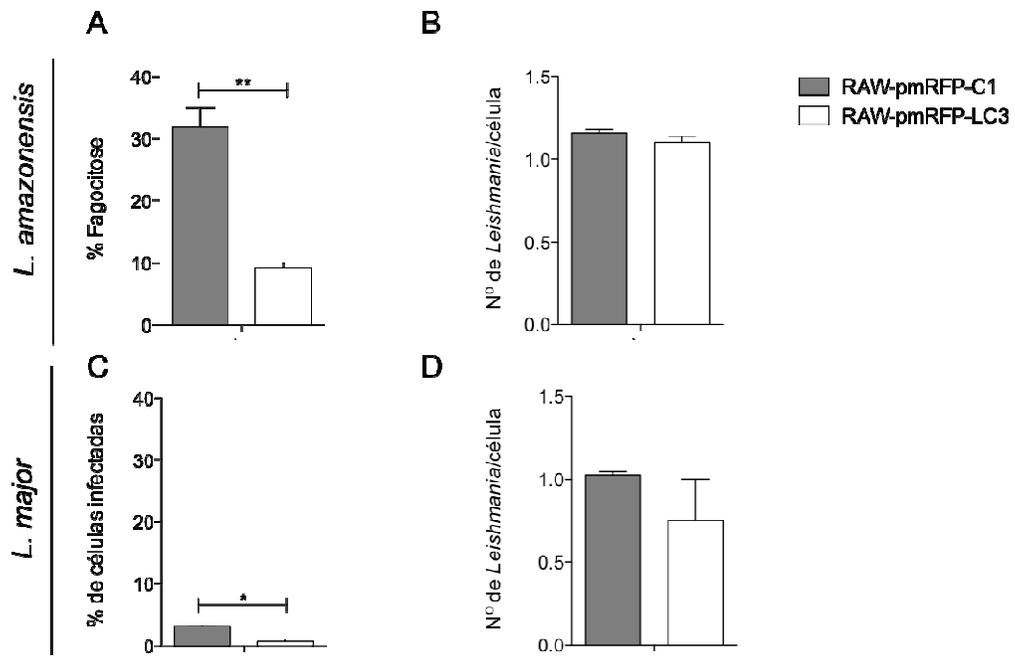


Figura 5