

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**Efeito de anticorpos bloqueadores de fosfatidilserina na infecção por
*Leishmania amazonensis***

Aluna: Arieli Bernardo Portugal
Orientador: João Luiz Mendes Wanderley
Coorientador: Renato Augusto DaMatta

Campos dos Goytacazes
Fevereiro – 2018

ARIELI BERNARDO PORTUGAL

**Efeito de anticorpos bloqueadores de fosfatidilserina na infecção por
*Leishmania amazonensis***

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em biociências e biotecnologia”

Área de concentração: Biologia celular

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley

Coorientador: Renato Augusto DaMatta

Campos de Goytacazes

Fevereiro de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P853 Portugal, Arieli Bernardo.

Efeito de anticorpos bloqueadores de fosfatidilserina na infecção por *Leishmania amazonensis*. / Arieli Bernardo Portugal. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

108 f. : il.

Bibliografia: 96 - 108.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2019.

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley.

Coorientador: Renato Augusto da Matta.

1. interação patógeno - hospedeiro. 2. macrófagos. 3. *Leishmania amazonensis*. 4. fosfatidilserina. 5. anticorpos anti - fosfatidilserina . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

PORTUGAL, Arieli Bernardo. **Efeito de anticorpos bloqueadores de fosfatidilserina na infecção por *Leishmania amazonensis***. 2018. Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação de biociências e biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense- Darcy Ribeiro, para obtenção do título de mestre em biotecnologia e biociência.

Examinada em: ____/____/____

Banca examinadora

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____ Assinatura _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha mãe Acacia, minha irmã Aline e todos da família que me deram forças para conseguir realizar meu sonho. Foram capazes de entender a minha ausência em diversos momentos e mesmo na distância sempre me apoiaram.

Agradecimento especial ao meu orientador João Wanderley por ter aceitado me orientar e confiado em mim desde a iniciação científica, mesmo sabendo de todas as minhas limitações. Obrigada por ter confiado este projeto a mim, por todas as conversas, ajudas e ensinamentos. Obrigada por toda a paciência, incentivo e confiança durante todo esse período, sem essas coisas não seria possível eu estar aqui. Obrigada por me fazer ficar encantada pela *Leishmania* e a imuno.

Aos colegas e professores do LIP que compartilharam todas as experiências e dramas de laboratórios. Em especial as meninas da Imuno que sempre me auxiliaram nos experimentos, perrengues com os camundongos e com as culturas e a amizade ultrapassou o laboratório.

A professora Suzana Chaves, obrigada por sua amizade e sua constante ajuda, que independente de qual fosse o problema, estava disposta a conversar e me ajudar, contribuindo significativamente na minha formação.

Aos amigos, em especial, Luana, Mariane e Thais que me incentivaram e apoiaram mesmo com a distância. Aos amigos de Macaé, em especial a Nathália e Tais, por serem família em meio ao caos de Macaé e a Fer, Fran e Thays as quais as amigas superaram os limites do laboratório.

A Talita, em especial, obrigada pelo acompanhamento nesses dois anos e por ter me ajudado a tornar esse caminho mais sábio e leve.

As famílias “Cardoso” e “Luiz”, que em momentos distintos me acolheram, me ajudaram, me apoiaram e me fizeram sentir em casa. Ajudaram a amenizar a saudades da minha família e foram fundamentais para a minha permanência e persistência.

Aos colegas e técnicos do LBCT, que sempre estavam dispostos a me ajudar. Ao professor Renato DaMatta, em especial, que aceitou me orientar e me auxiliou em diversos momentos. Ao professor Eulógio Carlos Q. Carvalho e a todos do laboratório de morfologia e patologia animal do hospital veterinário - UENF, que me auxiliaram na produção das lâminas de histologia.

A Indústria Peregrine Pharmaceuticals, que doaram os anticorpos anti-fosfatidilserina.

Aos colegas, professores e funcionários da Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia- UENF

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos

E a Deus, por ter me dado força para persistir em meio às adversidades e ter permitido eu concluir esse sonho.

RESUMO

PORTUGAL, Arieli Bernardo. Efeito de anticorpos bloqueadores de fosfatidilserina na infecção por *Leishmania amazonensis*. 2018. (Mestrado em

biociências e biotecnologia) - Centro de biociências e biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacases, 2019.

A leishmaniose é uma doença negligenciada, endêmica em 97 países, leva a óbito mais de 20 mil pessoas por ano, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Durante o ciclo de vida, o parasito assume duas formas morfológicas: promastigota e amastigota. Amastigotas infectam e proliferam no interior de macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Como estratégia de infecção, os parasitos necessitam que fatores de patogenicidade sejam reconhecidos por receptores de macrófagos, para que ocorra a endocitose do patógeno e a regulação da atividade leishmanicida da célula hospedeira. Destaca-se entre os fatores de patogenicidade a fosfatidilserina (PS) que é um fosfolípido exposto na camada externa da membrana plasmática do parasito, em um mecanismo denominado mimetismo apoptótico. A PS medeia a internalização do patógeno e induz a produção de TGF β , IL-10 e PGE $_2$. Estas citocinas têm ação anti-inflamatória e imunossupressora no macrófago infectado e em células adjacentes. Considerando que a PS é um importante alvo terapêutico na infecção, avaliamos os efeitos de anticorpos bloqueadores de PS na interação patógeno-macrófago durante a infecção por *Leishmania amazonensis*. Foram utilizados anticorpos monoclonais completos e apenas a porção Fab que reconhecem e bloqueiam de forma específica a PS. Analisamos a carga parasitária, desenvolvimento da lesão, produção de citocinas e a resposta macrofágica e linfocitária *in vitro* e *in vivo*. Em culturas de macrófagos *in vitro* o índice de infecção tende a ser reduzido com o uso dos anticorpos após 2 horas de infecção e diminui significativamente após 48 horas de infecção. Em 48h o índice de infecção foi maior que o controle de anexina. Não houve diferença entre o anticorpo completo ou apenas a porção Fab purificada. Em camundongos tratados com anticorpos de forma sistêmica, podemos identificar modificações histológicas como: diminuição da área dos vacúolos parasitóforos, aumento do infiltrado inflamatório, hiperemia, aumento da ocorrência de necrose e alterações celulares nos linfonodos, quando comparados com camundongos que não receberam tratamento. Com isso, concluímos que *in vitro* os anticorpos anti-PS foram capazes de diminuir a infecção por *L. amazonensis* nos testes iniciais, mas não foram capazes de modular a resposta inflamatória do macrófago em 48h. *In vivo* os anticorpos foram capazes de modular a resposta inflamatória local e alterar via de endocitose do parasito. Indicando que o uso de anticorpos anti-PS pode ser uma alternativa terapêutica importante, principalmente como adjuvante em tratamentos quimioterápicos contra a infecção por *L. amazonensis*.

Palavras-chaves: *Leishmania amazonensis*, fosfatidilserina, anticorpos.

ABSTRACT

PORTUGAL, Arieli Bernardo. **Effect of phosphatidylserine blocking antibodies in *Leishmania amazonensis* infection.**2018. (MSc in Biosciences and Biotechnology) - Centro de biociências e biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacases, 2019.

Leishmaniasis is a neglected tropical disease, endemic in 97 countries, causing more than 20.000 deaths annually. The disease is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. During the life cycle, the parasite shows two morphological forms: promastigotes and amastigotes. Amastigotes infect and proliferate in macrophages from the vertebrate host. As an infection strategy, parasites require the recognition of pathogenicity factors by macrophage receptors, so that endocytosis of the pathogen and the regulation of the leishmanicidal activity of the host cell occurs. Among the pathogenicity factors, phosphatidylserine (PS) is a phospholipid exposed on the outer layer of the parasite's plasma membrane, in a mechanism called apoptotic mimicry. Phosphatidylserine mediates the internalization of the pathogen and induces the production of TGF β , IL-10 and PGE2. These cytokines have anti-inflammatory and immunosuppressive action on infected macrophage and adjacent cells. Considering that phosphatidylserine is an important therapeutic target for infection, we evaluated the effects of PS blocking antibodies on the pathogen-host interaction during *Leishmania amazonensis* infection. Full-length monoclonal antibodies and only the Fab portion were used. These antibodies recognize and specifically block phosphatidylserine. We analyzed parasite load, lesion development, cytokine production and macrophagic and lymphocyte response *in vitro* and *in vivo*. In *in vitro* macrophage cultures, the infection rate was likely to be reduced with the use of the antibodies during the analyzed time period when compared to untreated control parasites. In 48h the infection rate was significantly higher than the Annexin V control. There was no infectivity differences between complete antibodies and the Fab portion treatment. In mice treated with antibodies in a systemic way, we can identify lesion histological modifications such as: reduction of the area of the parasitophores vacuoles, increase of the inflammatory infiltrate, hyperemia and increased occurrence of necrosis and cellular alterations in the lymph nodes, when compared with mice that did not receive treatment. We concluded that, *in vitro* the anti-PS antibodies were able to decrease the infection by *L. amazonensis* in the initial tests, but it was not able to modulate the inflammatory response of the macrophage in 48h. *In vivo* the antibodies were able to modulate the local and secondary inflammatory response and alter the endocytic pathway of the parasite's uptake. Indicating that the use of anti-PS antibodies may be an important therapeutic alternative, especially as adjuvant in chemotherapeutic treatments against *L. amazonensis* infection.

key words: *Leishmania amazonensis*, phosphatidylserine, antibody.

Figuras	Pág.
Figura 1 - Ciclo da <i>Leishmania</i> .	20
Figura 2 - Vacuolos parasitóforos de macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> .	30
Figura 3 - Estrutura da fosfatidilserina.	32
Figura 4 - Biossíntese de fosfatidilserina.	32
Figura 5 - Biossíntese de fosfatidilserina no retículo endoplasmático e membrana mitocondrial.	33
Figura 6 - Remoção de células apoptóticas.	35
Figura 7 - Mimetismo apoptótico viral clássico.	36
Figura 8 - Mimetismo apoptótico viral não – clássico.	37
Figura 9 - Morte apoptótica e mimetismo apoptótico durante infecção e estabelecimento da infecção por <i>Leishmania</i> .	40
Figura 10 - Exposição de fosfatidilserina em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c.	52
Figura 11 - Índice de infectividade de macrófagos infectados com amastigotas tratadas previamente com anticorpos anti-fosfatidilserina.	54
Figura 12 - Porcentagem de macrófagos infectados com amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas previamente com anticorpos anti-fosfatidilserina.	55
Figura 13 - Proporção de amastigota por macrófagos infectados.	56
Figura 14 - Produção de NO por macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	57
Figura 15 - Lesões de camundongos infectados com <i>L. amazonenses</i> .	58
Figura 16 - Cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com PBS.	60
Figura 17 - Cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpo C44.	61
Figura 18 - Cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpo 11:31.	62
Figura 19 - Cortes histológicos das orelhas de camundongos	63

infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpo 11:31 Fab.	
Figura 20 - Quantificação morfométrica da área dos vacúolos parasitóforos em lesões de camundongos.	64
Figura 21 - Estratégia de <i>gate</i> para distinguir entre populações de células dos linfonodos cervicais.	65
Figura 22 - Análise morfológica das células de linfonodos cervicais de camundongos infectados e tratados com anticorpos antifosfatidilserina.	66
Figura 23 - Quantidades absolutas de células derivadas de linfonodos cervicais de camundongos infectados e tratados com anticorpos antifosfatidilserina.	67
Figura 24 - Produção <i>ex vivo</i> de mediadores imunológicos.	69
Figura 25 - Fragmentos de anticorpos obtidos por clivagem enzimática e utilizados terapeuticamente.	75

.
.

Tabelas	Pág.
Tabela 1 - Manifestações clínicas e principais espécies de <i>Leishmania</i> envolvidas.	21
Tabela 2 - Mecanismos de evasão de <i>Leishmania</i> .	28
Tabela 3 - Infecções virais ocasionados por vírus que realizam o mimetismo apoptótico.	38
Tabela 4 - Concentração dos mediadores imunológicos das células ativadas.	70

Abb - Tampão de ligação de anexina
ADN- Ácido desoxirribonucleico
Alo - Arabino-1,4-lactona Oxidase
ANX - Anexina V
Ap-1 - Proteína Ativadora 1
B.O.D - Demanda Bioquímica de Oxigênio
Cpb - Cisteína Protease
Crk- Proteínas Adaptadoras que Ligam Proteínas Fosforiladas Em Tirosina
Crs - Receptores De Complementos
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DN- Durante a noite
Elisa - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Fcγrs - Receptores Fcγ
FL1 - canal de fluorescência 1
FL2 - canal de fluorescência 2
FSC - Forward Scatter - Tamanho Relativo Da Célula
SSC - Side scatter - Complexidade relativa da célula
Gas6 - Gene Específico De Crescimento 6
Gp63 - Glicoproteína Protease 63
H&E - Hematoxilina E Eosina
Hsp70 - Proteína De Choque Térmico 70
IgG1 - Imunoglobulina G da subclasse 1
IgG2 - Imunoglobulina G da subclasse 2
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
IL-23 - Interleucina 23
IL-4 - Interleucina 4
IFN-γ - Interferon Gama
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida
IP- Iodeto de Propídeo
Iscl - Atividade da Fosfodiesterase Pela Esfingomielina
Isp - Inibidores de Serina Proteases

L929 - Linhagem Celular De Fibroblasto Produtora De M-csf
Llacs1 - Isoforma 1 de Cisteíno-protease de *Leishmania amazonensis*
LPG - Lipofosfoglicano
LPS- Lipopolissacarídeo
M1- Macrófagos Ativados Clásicamente
M2- Macrófagos Ativados Alternativamente
M-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
Mertk - Proto-oncogene Tirosina Quinase
MFG-E8 - *milk fat globule protein E8*
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
miRNA-122 - Micro rna 122
Msra - Metionina Sulfóxido Redutase
MTA - *material transfer agreement*
Mtor - Alvo de Rapamicina em Mamíferos
NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina
Neg - negativa
NO - Óxido Nítrico
Nramp-1 - Proteína Macrofágica Associada à Resistência Natural 1
P130cas - Proteína Substrato Associada A *Crk*
PBS - Tampão Fosfato
PC - Fosfatidilcolina
PCR - Reação Em Cadeia Da Polimerase
PE - Fosfatidiletanolamina
PGE₂ - Prostaglandina E₂
pH - Potencial Hidrogeniônico
Pkc- *like* - Proteína Cinase C - *Like*
Pos- Positiva
PSD - Fosfatidilserina Descarboxilase
PS - Fosfatidilserina
PSG - *Promastigote Secretory Gel*
PSS - Fosfatidilserina Sintase
Ptps - Proteína Tirosina Fosfatase
RNA - Ácido Ribonucleico

RNI - Reativos Intermediários de Nitrogênio
ROS - Espécie Reativa de Oxigênio
RPM - Rotação por Minuto
Scarf - Receptores Scavenger da Classe F
SFB - Soro Fetal Bovino
Shp-1 - Proteína Tirosina Fosfatase 1
SNC - Soro Normal de Camundongo
Sod - Enzima Superóxido Dismutase
TGF- β - Fator De Crescimento e Transformação Beta
TIM - Domínios de Imunoglobulina e Mucina de Células T
TLR4 - Receptor do Tipo Toll 4
TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa
Txnpx - Triparedoxina Peroxidase
UCP2 - Proteína de Desacoplamento Mitocondrial 2
VP - Vacúolo Parasitóforo
 β 2-GPI - β 2-Glicoproteína I

SUMÁRIO

1 - Introdução	17
2 - Revisão Bibliográfica	19
2.1 – <i>Leishmania</i>	19
2.1.1 - Parasito	19
2.1.2 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	19
2.2 – Leishmaniose	22
2.3 – Interação entre <i>Leishmania</i> e macrófagos	25
2.3.1 - Vacúolo parasitóforo	29
2.4 - Fosfatidilserina	32
2.4.1 – Apoptose	35
2.4.2 – Mimetismo apoptótico	36
2.4.3 – Fosfatidilserina e <i>Leishmania</i>	40
2.5 - Anticorpos anti – fosfatidilserina	41
3 – Justificativa	45
4 – Objetivos	46
4.1 - Objetivo geral	46
4.2 - Objetivos Específicos	46
5 – Material e métodos	47
5.1 – Animais	47
5.2 - Células	47
5.2.1 – Macrófagos derivados de medula óssea	47
5.2.2 – Linhagem de fibroblastos L929	47
5.3 - Parasitos	48
5.3.1 - Promastigotas	48
5.3.2 – Amastigotas	48
5.4 – Anticorpos anti-PS	49
	14

5.5 - Infecção	49
5.5.1 – Infecção em macrófagos com parasitos tratados com anticorpos monoclonais anti-PS	49
5.5.2 – Infecção <i>in vivo</i> e tratamento com anticorpos	50
5.6 - Avaliação de exposição de fosfatidilserina	50
5.7 – Produção de óxido nítrico	50
5.8 – Preparação de antígeno	50
5.9 - Ativação das células derivadas dos linfonodos cervicais	51
5.10 - Detecção de citocinas	51
5.11 - Análise da carga parasitária <i>in vitro</i>	51
5.12 - Histopatologia	52
5.13 – Análise do tamanho dos vacúolos parasitóforos.	52
5.14 - Análise morfológicas das células do Linfonodos cervicais	52
5.15 - Análise estatística	52
6 - Resultados	53
6.1- Exposição de fosfatidilserina em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c	53
6.2 - Inibição de infecção <i>in vitro</i> por amastigotas com uso de anticorpos anti-PS	54
6.3 - Produção de óxido nítrico em infecções com amastigotas tratadas com anticorpos anti-PS	57
6.4 - alterações nas lesões de camundongos c57bl/6 e tratados com anticorpos anti-PS	58
6.4.1 - Alterações histopatológicas	59
6.5 - alterações na resposta imune <i>in vivo</i> no tratamento com anticorpos anti-PS	66
6.5.1 - Análise das populações celulares dos linfonodos cervicais	66

6.5.2 - Análise do perfil imunológico das células derivadas dos linfonodos cervicais	68
7 - Discussão	72
8 - Conclusões	82
Anexo 1	83
Referências Bibliográficas	96

1 - INTRODUÇÃO

Doenças negligenciadas são denominadas dessa forma pela Organização Mundial de Saúde devido ao pouco investimento no desenvolvimento de novos fármacos, vacinas e terapias para o controle da infecção (OMS, 2018). A leishmaniose, embora esteja presente em diversos países e continentes, se enquadra nessa categoria. É uma zoonose, transmitida para humanos por insetos vetores flebotomíneos e pode levar ao desenvolvimento de manifestações clínicas brandas e sem maiores consequências para o hospedeiro, assim como manifestações com alta morbidade e relativa mortalidade. O tratamento atual envolve fármacos altamente tóxicos e pouco eficientes devido ao surgimento de cepas parasitárias resistentes (AKILOV, 2007).

O estabelecimento e disseminação da infecção em humanos depende do sucesso das formas infectivas do parasita se estabelecerem no interior de células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos. Promastigotas metacíclicas e amastigotas desenvolveram uma série de adaptações evolutivas que permitem que macrófagos reconheçam esses parasitas e os fagocitem, levando ao estabelecimento da infecção (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). Além disso, principalmente as formas amastigotas, parasitas intracelulares obrigatórios, possuem mecanismos complexos de evasão da resposta macrofágica e imunológica em geral (KIMA, 2007). O desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de bloquear ou inibir os fatores parasitários relacionados com o estabelecimento da infecção e com a evasão da resposta imune é fundamental para controlar o avanço da infecção.

Dentre as moléculas descritas como fator de patogenicidade está a fosfatidilserina (PS), que é um fosfolípido de membrana exposto na superfície de promastigotas metacíclicas e, especialmente, amastigotas de *Leishmania amazonensis*, uma das principais espécies do parasito envolvida com casos de leishmaniose no Brasil (DE FREITAS BALANCO, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006). O reconhecimento de PS por macrófagos medeia a endocitose do parasito e induz a produção de citocinas e mediadores lipídicos anti-inflamatórios e imunossupressores pelo macrofago, permitindo não só a infecção como a proliferação intracelular do parasito. Esse mecanismo de patogenicidade é conhecido como mimetismo apoptótico (BIRGE *et al.*, 2006)

Existem moléculas já conhecidas que podem inibir a PS em *L. amazonensis*, como a anexina V e anticorpos bloqueadores de PS. No entanto estas moléculas possuem limitações, já que a anexina V depende de altas, e não-fisiológicas, concentrações de cálcio para se ligar a PS (TAIT; GIBSON, 1992); e os anticorpos bloqueadores anteriormente disponíveis ou causavam reações adversas por serem proteínas de origem em outros animais, ou dependiam de proteínas séricas para bloquear PS (ALVING, 2006; WANDERLEY *et al.*, 2013). Dessa forma, avaliamos, neste trabalho, anticorpos específicos contra PS, que reconhecem este fosfolípido independente de proteínas auxiliares e sua capacidade de bloquear este fosfolípido na superfície de amastigotas de *L. amazonensis*. Para isso, avaliamos a infecção *in vitro* e *in vivo*, os parâmetros histopatológicos das lesões em camundongos, a celularidade e perfil de produção de citocinas em linfonodos periféricos e a modulação da atividade macrofágica.

Com isso, esperamos contribuir no entendimento da relação patógeno-hospedeiro e no desenvolvimento de novas estratégias que permitam estimular o sistema imune de indivíduos infectados a combater a infecção por *L. amazonensis*.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – LEISHMANIA

2.1.1 - Parasito

O agente etiológico responsável pela leishmaniose são os parasitos do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) pertencentes à ordem Kinetoplastidae família Trypanosomatidae (GARNHAM, 1971). Atualmente existem aproximadamente 53 espécies descritas, das quais 31 são parasitos de humanos e apenas 20 são patogênicas (AKHOUNDI *et al.*, 2016). Características biológicas, bioquímicas e imunológicas são determinantes para a divisão do gênero em dois grupos: Euleishmania e Paraleishmania (CUPOLILLO *et al.*, 2000). Euleishmania é o grupo que possui espécies patogênicas a humanos e é composto pelos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. O grupo Paraleishmania não possui classificação definida e a maioria das espécies não são patogênicas a humanos.

Parasitos do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares, flagelado e normalmente se reproduzem de forma assexuada, através de divisão binária, porém existem relatos de espécies que são capazes de realizarem reprodução sexuada no interior do intestino do inseto vetor (AKOPYANTS *et al.*, 2009). Possui uma organela rica em ácido desoxirribonucleico (ADN), denominada cinetoplasto, característica determinante da ordem Kinetoplastidae. Nesta organela localiza-se única mitocôndria do parasito e é o local onde a bolsa flagelar se ancora com seu flagelo (LAURENT; STEINERT, 1970; WEBSTER; RUSSELL, 1993).

2.1.2 – Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Durante o ciclo de vida o parasito apresenta duas formas evolutivas principais: amastigotas e promastigotas. Elas apresentam diferenças bioquímicas, morfológicas, habitam diferentes ambientes celulares e infectam hospedeiros distintos (BRUN; BERENS; KRASSNER, 1976). A amastigota possui o corpo celular arredondado, flagelo curto e interno e ausência de motilidade. É uma forma intracelular obrigatória e prolifera no interior de células fagocíticas dos hospedeiros vertebrados, sendo os macrófagos as células preferenciais para o parasitismo. A promastigota possui a forma alongada, com um flagelo aparente na região anterior, vive em ambiente extracelular, parasitando o intestino do hospedeiro invertebrado.

Os principais hospedeiros vertebrados são os mamíferos como roedores, edentados, primatas e cães. Os humanos não pertencem ao ciclo silvestre do parasito e são infectados por eventos acidentais devido a destruição de habitat dos principais hospedeiros (LAINSON *et al.*, 1994). Os hospedeiros invertebrados são os insetos da ordem *Diptera*, da família *Psychodidae* e os gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomia* (Novo Mundo).

A fêmea do flebotomíneo ao realizar hematofagia no hospedeiro infectado, aspira macrófagos parasitados com amastigotas. Estas formas são liberadas no intestino do flebotomíneo após a lise do macrófago. Após 6-8 horas inicia-se a diferenciação de amastigotas para promastigotas (GARNHAM, 1971). Durante a estadia da promastigota no intestino do flebotomíneo os parasitos passam por um processo chamado metaciclogênese (SACKS; PERKINS, 1984; LAINSON; RYAN; SHAW, 1987). Este processo ocorre devido a redução de nutrientes disponíveis e leva a uma série de transformações celulares e bioquímicas nos parasitos como a diminuição do corpo celular, alongamento do flagelo e aumento da motilidade. Estas modificações geram as formas promastigotas metacíclicas, que são as formas do parasito capazes de infectar células do hospedeiro vertebrado (SACKS; PERKINS, 1984). As promastigotas metacíclicas diferenciadas migram para a região anterior do inseto, onde ficam sequestradas em um gel de glicoconjugados produzido pelo próprio parasito, chamado PSG (*promastigote secretory gel*) (ROGERS; CHANCE; BATE, 2002). O PSG realiza o bloqueio da válvula cardíaca, impedindo a deglutição pelo inseto vetor. Consequentemente, em um novo repasto sanguíneo, as formas metacíclicas são regurgitadas no local da picada do flebotomíneo, sendo transmitidas para o hospedeiro vertebrado (figura 1) (STIERHOF *et al.*, 1999; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Ao infectar o hospedeiro vertebrado as promastigotas metacíclicas são fagocitadas rapidamente por células fagocíticas como macrófagos residentes, neutrófilos e monócitos que migraram da circulação sanguínea para o local da infecção. No interior de fagolisossomas os parasitos se transformam em amastigotas e; este processo de diferenciação pode levar de 1 até 5 dias, dependendo da espécie (COURRET *et al.*, 2001). Após o final da diferenciação, ocorre a multiplicação das amastigotas até a lise da célula infectada. As amastigotas livres são fagocitadas por novos macrófagos adjacentes, estabelecendo e disseminando a infecção (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

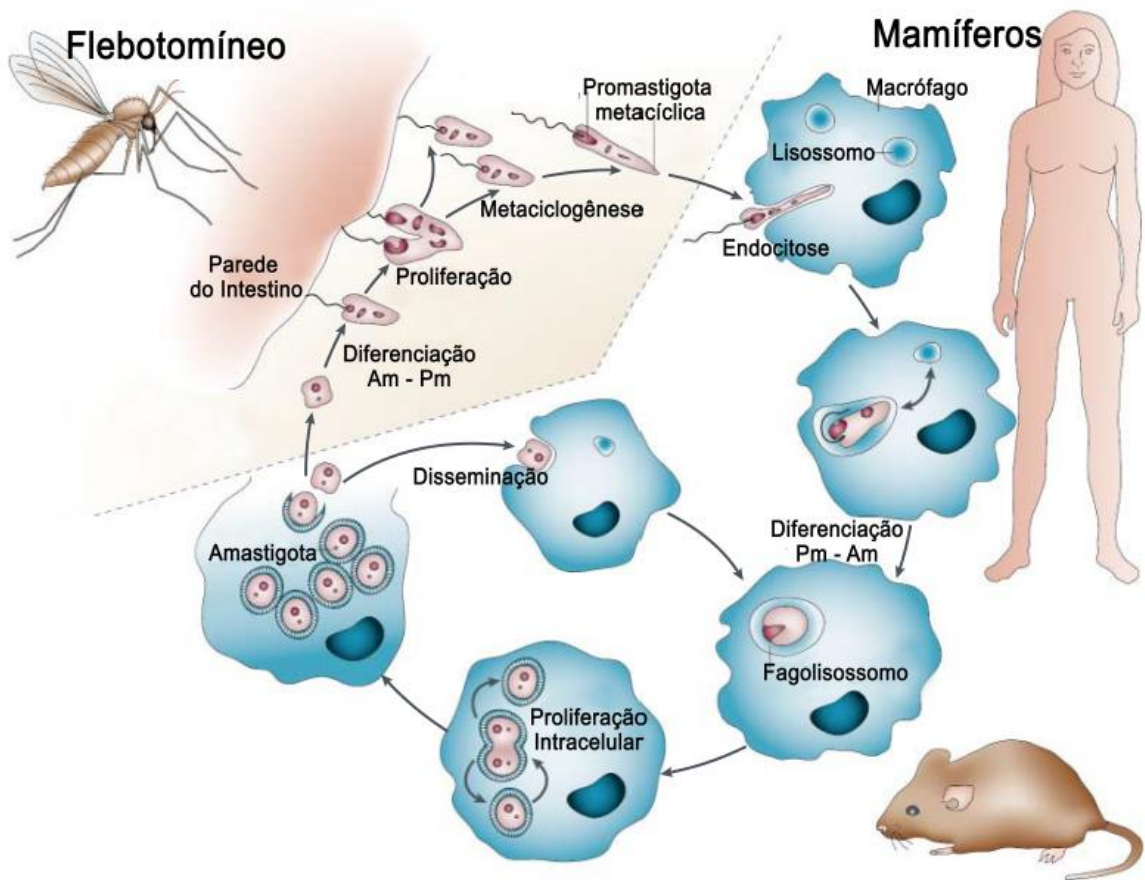


FIGURA 1 – Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (Adaptada de Sacks; Noben-Trauth, 2002).

2.2 – LEISHMANIOSE

A leishmaniose se caracteriza como um conjunto de manifestações clínicas ocasionadas por parasitos do gênero *Leishmania* (DESJEUX, 1996). Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença negligenciada e endêmica em 97 países, dentre eles o Brasil. A ocorrência está relacionada diretamente a questões sociais, ambientais e climatológicas.

Estima-se que cerca 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorram por ano, desses 20 mil casos levam ao óbito, é estimado também que 1 bilhão de pessoas estejam em áreas de risco (OMS, 2018). As manifestações clínicas da leishmaniose são bastante heterogêneas e são dependentes da espécie do parasito responsável pela infecção (tabela 1) e o estado imunológico do hospedeiro (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). São divididas em leishmaniose cutânea e visceral.

Tabela 1 - Manifestações clínicas e principais espécies de *Leishmania* envolvidas (AKILOV, 2007; MCMAHON-PRATT, 2004; GOTO, 2012).

Manifestações clínicas		Novo Mundo	Velho Mundo
Cutânea	Localizada	Complexo <i>L. (L) mexicana</i> <i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. pifanoi</i> ; <i>L. venezuelensis</i> . Complexo <i>L. (Vianna)</i> <i>L. braziliensis</i> ; <i>L. peruviana</i> ; <i>L. lansonii</i> ; <i>L. naiff</i> ; <i>L. lansonii</i> ; <i>L. panamensis</i> ; <i>L. guyanensis</i> ; <i>L. infantum</i>	Complexo <i>L. (L) major</i> <i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. aethiopica</i>
	Disseminada	<i>L. amazonensis</i> ; <i>L. pifanoi</i>	<i>L. aethiopica</i>
	Mucosa	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. amazonensis</i>	<i>L. major</i> <i>L. infantum</i>
	Recidiva cútis	<i>L. braziliensis</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. panamensis</i>	<i>L. (L) tropica</i>
Mucocutânea		<i>L. braziliensis</i> .	
Visceral		<i>L. chagasi</i>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> .
	Pós-kalasar	<i>L. donovani</i>	

A lesão inicial surge no local onde o inseto vetor realizou hematofgia. Neste sítio ocorrem o aparecimento de lesões, podendo surgir de 1 a 10 lesões. As lesões são indolores, em formato circular, com coloração rosada e bordas delimitadas e protuberantes, contendo grande quantidade de amastigotas. Em muitos casos ocorre cura espontânea da lesão, porém em alguns casos, após o desaparecimento da úlcera de forma espontânea, ocorre a evolução para outras manifestações da infecção (GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose visceral afeta cerca de 300 mil pessoas por ano com estimativa de 20 mil mortes anuais, podendo esse número ser relativamente maior devido a negligência em relação a doença e erros de diagnóstico. Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorre em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR *et al.*, 2012). Esta manifestação clínica ocorre de 4 a 6 meses após a lesão inicial. Neste período os parasitos ficam incubados no interior de células hospedeiras e disseminam através da corrente sanguínea e linfática até sítios como baço, fígado, medula óssea e gânglios linfáticos, órgãos que são ricos em macrófagos. Os sintomas característicos são perda de peso, hepatoesplenomegalia, febre e, em estágios mais avançados da doença, pode ainda ocorrer anemia, edemas e hemorragias internas. Alguns casos podem levar ao óbito devido a perda de função nos órgãos acometidos e infecções secundárias oportunistas que se estabelecem (BADARO *et al.*, 1986)

A leishmaniose tegumentar americana é a forma mais branda da doença e pode ser subdividida em: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose difusa e leishmaniose recidiva cútis (GOTO; LINDOSO, 2012). Estas manifestações afetam atualmente cerca de 220 mil pessoas por ano e cerca de 75% dos casos ocorrem em dez países: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (OMS, 2018).

A leishmaniose cutânea localizada é caracterizada pelo aparecimento da lesão inicial, não ocorrendo disseminação e lesões secundárias. A leishmaniose mucocutânea aparece após o desaparecimento da lesão inicial e é caracterizada pela disseminação do parasito e destruição das mucosas, principalmente nasais e orofaríngeas, podendo ser fatal devido ao comprometimento das vias respiratórias. Os sintomas iniciais são inespecíficos, o que dificulta o diagnóstico precoce e o seu tratamento. A maior complicação é devido ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica, com potencial desfigurativo e com presença de infecções bacterianas secundárias. Cerca de 10% a 25% dos pacientes que apresentam a lesão inicial em até 5 anos desenvolvem leishmaniose mucocutânea. A leishmaniose cutânea disseminada é o tipo de manifestação mais rara. Nessa manifestação são observadas centenas de lesões papulares e de aparência acneiforme, que podem acometer o corpo todo, porém ocorre com mais frequência na face e no tronco. Os

parasitos após a lesão inicial, migram por via hemática ou linfática e estabelecem em poucos dias, causando lesões afastadas. A carga parasitária é baixa nas lesões. O tratamento atual é capaz de controlar a infecção após várias séries do tratamento (BRASIL, 2007)

A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada pela ausência de resposta celular específica, intensiva proliferação dos parasitos e disseminação da infecção. Normalmente o indivíduo acometido não apresenta resposta imunológica celular e não sente dor no local das lesões. Na maioria dos casos o tratamento quimioterápico não é eficiente na eliminação dos parasitos, o que acaba possibilitando a reincidência da doença (TURETZ *et al.*, 2002; GOTO; LINDOSO, 2012; BRASIL, 2007).

Os casos de leishmaniose recidiva cútis são predominantes nos países do Velho Mundo, porém também ocorrem em países do Novo Mundo. A principal característica é o surgimento de úlceras próximas a cicatrizes derivadas da lesão inicial da leishmaniose e está associada a ausência ou erro no tratamento (CALVOPINA *et al.*, 2006).

2.3 – INTERAÇÃO ENTRE *LEISHMANIA* E MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células do sistema imunológico inato que possuem grande importância para o controle de infecções intra e extracelulares, e para o desenvolvimento e homeostase do organismo. São derivados de monócitos circulantes e podem ser resultado da diferenciação dessas células durante o desenvolvimento embrionário ou devido a uma resposta inflamatória (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2014).

A polarização da resposta inflamatória pode estimular de diferentes maneiras os macrófagos, que podem se diferenciar em fenótipos funcionais distintos, denominados de M1 e M2. Os macrófagos M1, também denominados macrófagos ativados classicamente, são ativados por citocinas inflamatórias ou produtos microbianos, como o interferon-gama (IFN- γ) e o lipopolissacarídeo (LPS), respectivamente. Quando ativados expressam a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e utilizam a L-arginina para a produção de óxido nítrico (NO). Além de produzir as citocinas interleucina-12 (IL-12), IL-23 e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são de extrema importância para a eliminação de infecções e tumores.

Os macrófagos M2 são denominados de macrófagos ativados alternativamente e são ativados por citocinas anti-inflamatórias ou reguladoras como IL-4 e a IL-10. São primordiais para a eliminação de debris celulares, na reconstrução tecidual, deposição de matriz extracelular e também auxiliam no crescimento tumoral. Quando ativados produzem citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, Fator de Crescimento e Transformação beta (TGF- β) e expressam a enzima arginase I, que utiliza a L-arginina para a produção de poliaminas, mecanismo antagonista do M1 (LABONTE; TOSELLO-TRAMPONT; HAHN, 2014; PATEL *et al.*, 2017).

Apesar da grande importância para a eliminação de diversas infecções, patógenos intracelulares como as bactérias *Shigella flexner*, *Lysteria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*, os vírus *Flavivírus* e os parasitos *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp parasitam preferencialmente os macrófagos.

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos são as células preferenciais das amastigotas para o estabelecimento da infecção. A persistência do parasito no organismo está relacionada com a sua capacidade de desenvolver estratégias de

escape à atividade antiparasitária do macrófago que impede uma resposta imune efetiva contra a infecção, possibilitando a proliferação do parasito e estabelecimento da infecção no organismo (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A interação entre o parasito e o macrófago inicia-se após as promastigotas metacíclicas serem transmitidas durante a hematofagia no local da picada, junto com uma substância gelatinosa denominada *promastigote secretory gel* (PSG). Em conjunto, as promastigotas e o PSG induzem a formação de uma resposta inflamatória, com produção de quimiocinas responsáveis pela migração de monócitos para o local da picada (ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; RACOOSIN; BEVERLEY, 1997).

Os dois principais fatores de patogenicidade expressos na *Leishmania* são as moléculas GP63 e o lipofosfoglicano (LPG). A GP63 é uma cisteína protease, expressa nas formas promastigotas, reconhecidas principalmente pelo receptor 3 do complemento (CR3). Esta enzima é importante para que o parasita resista a ação das enzimas lisossomais do macrófago (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). O LPG é o principal glicoconjugado expresso na superfície de *Leishmania*, é expresso em maior quantidade nas formas promastigotas do que nas amastigotas, é reconhecido pelos receptores Toll-like 2 (TLR2) (NOGUEIRA *et al.*, 2016), participando dessa forma da regulação de processos endocíticos e inflamatórios. Além disso, o LPG é capaz de proteger as promastigotas metacíclicas da ação lítica do sistema complemento (SPÄTH, 2003).

A interação entre metacíclicas e macrófagos é mediada por receptores dos macrófagos e ligantes do parasito, que induzem a fagocitose. Existem diversos receptores envolvidos com essa interação, dentre eles se destacam: receptores de complemento (CRs), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores da fração constante de anticorpos IgG (FcγRs). Porém, devido a heterogeneidade genética, essa interação depende das espécies envolvidas, tanto do parasito quanto da célula hospedeira (UENO; WILSON, 2012).

O receptor utilizado no momento da infecção é importante para o direcionamento da resposta macrofágica contra o parasito. Caso a interação ocorra através dos CRs, especificamente CR3 e CR1, ocorre redução da resposta inflamatória e produção de superóxido, que possibilita a sobrevivência do parasito dentro do fagolisossomo (MOSSER; EDELSON, 1987). No entanto, quando a

interação ocorre através de receptores de manose, fibronectina ou Fcy, ocorre maior ativação da resposta inflamatória, produção mais eficiente de enzimas hidrolíticas e uma maior ativação de enzimas NADPH oxidase, levando a um maior dano ao parasito (UENO; WILSON, 2012).

Após o reconhecimento pelos macrófagos as promastigotas podem ser internalizadas através de cavéolas, que são microdomínios lipídicos ricos em colesterol. A degradação do colesterol e a subsequente ruptura deste microdomínio compromete a fagocitose de promastigotas (RODRÍGUEZ *et al.*, 2011). A formação de microdomínios na membrana plasmática da célula hospedeira podem ser induzidas por promastigotas por meio da ativação da enzima ácido esfingomielinase, responsável em converter esfingomielina em ceramida (GHOSH *et al.*, 2001). O aumento da formação de ceramida resulta, além do aumento da fagocitose de promastigotas, também no rompimento de plataformas lipídicas e o aumento da fluidez da membrana. Em estágios posteriores da infecção, a concentração aumentada de ceramida prejudica a apresentação de antígenos, demonstrando a importância dos microdomínios lipídicos na interação patógeno-hospedeiro (MAJUMDER *et al.*, 2012)

Outra estrutura celular importante para o momento da infecção na célula hospedeira é o citoesqueleto de actina. Células que apresentam citoesqueleto desorganizado apresentam carga parasitária menor quando comparadas com células com citoesqueleto íntegro (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Após a fagocitose do parasito, irá ocorrer a fusão do fagossoma com o lisossoma, dando origem ao vacúolo parasitóforo, local onde ocorre a diferenciação de promastigota para amastigota e proliferação intracelular. A formação do vacúolo parasitóforo proporciona a diminuição do pH, que em conjunto com a temperatura elevada do hospedeiro vertebrado e a geração de peróxido de hidrogênio mediada pela absorção de ferro, irão possibilitar a diferenciação do parasito (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; FLANNERY; RENBERG; ANDREWS, 2013).

Durante a diferenciação ocorrem alterações no metabolismo parasitário como a redução de absorção e utilização de glicose e aminoácidos e o aumento de beta oxidação de ácidos graxos. Estas modificações proporcionarão substratos para a síntese de glutamato, um aminoácido essencial para o crescimento e sobrevivência de amastigota (SAUNDERS *et al.*, 2014). Os parasitos dentro da célula hospedeira

tem necessidade nutritiva especial, constituída principalmente por aminoácidos e poliaminas como fonte de carbonos e nutrientes e precursores de bases nitrogenadas. À longo prazo, a disponibilidade de nutrientes é limitada pelo ambiente celular e fusões do vacúolo parasitóforo com endossomos ou vacúolos provenientes do retículo endoplasmático se tornam fontes importantes de obtenção de nutrientes (NDJAMEN *et al.*, 2010).

Macrófagos ativados são capazes de controlar a infecção através de dano oxidativo ao parasito, gerado a partir da produção de ROS e NO, que afetam a sobrevivência do parasito na célula hospedeira (MURRAY; NATHAN, 1999). Os parasitas inibem a resposta inflamatória dos macrófagos, induzindo a produção de IL-10 e inibindo a produção de IFN- γ . Tais alterações resultam em baixa expressão de complexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC) II e iNOS (MUKBEL *et al.*, 2007) resultando em menor apresentação de antígeno aos linfócitos T e menor produção de NO. Além disso, ocorre o aumento da indução de arginase 1, que utiliza a L-arginina para a produção de poliaminas, que são essenciais para o crescimento do parasito (MUXEL *et al.*, 2018).

A arginase 1 e iNOS são induzidas em processos antagonistas nos macrófagos. Citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, como o IFN- γ , induzem a ativação da iNOS, enquanto que citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-10 e TGF β induzem a ativação da arginase e inibem a ativação de NO. Tal mecanismo está diretamente relacionado com a resistência e suscetibilidade à infecção, visto a importância do NO na eliminação do parasito e das poliaminas na sua sobrevivência (ACUÑA *et al.*, 2017).

Um dos mecanismos de proteção contra danos oxidativos gerados pelos macrófagos é a indução da proteína de desacoplamento mitocondrial 2 (UCP2), que inibe o recrutamento de NADPH para o vacúolo parasitóforo (VP) através da inserção de LPG nos microdomínios lipídicos desta organela (BALL *et al.*, 2014). Ao realizar este processo, a apoptose também é suprimida, possibilitando o aumento da sobrevivência da célula hospedeira e do parasito. Algumas espécies como *L. donovani* e *L. braziliensis* expressam a enzima superóxido dismutase (SOD), que age como agente antioxidante ao quebrar o íon superóxido (MEHLOTRA, 1996). Espécies de *Leishmania* são capazes de expressar múltiplos fatores para auxiliar a

sua sobrevivência (tabela 2), que podem variar de acordo com a espécie e o estágio do ciclo de vida.

Tabela 2 – Mecanismos de evasão em *Leishmania*. Adaptado de PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015.

Nome	Descrição	Papel na interação parasito-hospedeiro
LPG	Lipofosfoglicano	Ativa MAPK, perturba plataformas lipídicas, ↑ TNF, ↑ IL-1 β , ↑ IL-6, ↓ TLR9, ↓ recrutamento de Syntaptotagmin V, NADPH oxidase e V-ATPase em PV, captura ROS, ↑ HO-1
GP63	Metaloprotease dependente de zinco	Ativa PTPs, p130Cas, Cortactin, Caspase 3 ↓ miRNA-122, ↓ TNF, ↓ IL-12, ↓ NO, ↓ mTOR, ↓ AP-1
ISP	Inibidor da serina peptidase	↓ Elastase de neutrófilos, ↓ tripsina, ↓ quimiotripsina, ↓ ativação de TLR4, ↓ ativação de proteína cinase R
Proibitina	Ortologos Proibitina	Interage com HSP70 do hospedeiro, ↑ absorção do parasito
PKC-like	Proteína C cinase ortóloga	↑ fagocitose parasitária
ISCL	Inositol fosfoesfingolípídios fosfolipase C-like	↑ sobrevivência e replicação
Aldolase	Aldose frutose-bifosfato	Ativa SHP-1, ↓ acidificação
MsrA	Metionina sulfóxido redutase A	↑ Resistência para ROS/RNI
ALO	Biosíntese de arabino-1,4-lactona oxidase / vitamina C	↑ Resistência para ROS/RNI, ↓ IL-12, ↓ TNF
TXNPx	Triparedoxina peroxidase	Detoxifica ROS/RNI, ↓ NRAMP-1, redistribuição de Fe
Tioredoxina	Enzima de eliminação de ROS	Estabiliza PTPs, ↓ vias pró-inflamatórias
CPB	Protease cisteína	Ativa PTPs, ↓ ativação, ↓ NO

2.3.1 - Vacúolo parasitóforo

Uma vez dentro do macrófago o parasito necessita resistir ao meio hidrolítico, evitar ativar o sistema imune e adquirir nutrientes para a sua sobrevivência. Para isso, amastigotas de *Leishmania* residem dentro dos macrófagos em uma organela denominada VP (RUSSELL; XU; CHAKRABORTY, 1992).

Os VPs são formados pelas membranas dos macrófagos e são resultados de diversos eventos sucessivos e coordenados de fusão/fissão de vesículas da via endocítica, lisossomos, retículo endoplasmático e possivelmente vesículas

autofágicas, que resultam em um compartimento ácido semelhante ao fagolisossomas (REAL; MORTARA, 2012).

As promastigotas de *Leishmania* são capazes de modular a fusão do fagossoma e lisossoma. O LPG expresso pelas promastigotas é capaz de adiar a fusão das organelas, para que ocorra a diferenciação para as formas amastigotas. O atraso na fusão possibilita a sobrevivência do parasito, pois amastigotas são melhores adaptadas ao microambiente do VPs (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994; DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997). A diferenciação de promastigotas para amastigotas ocorre devido às condições geradas pela diferenciação da organela e formação do VP como a redução do pH (ALEXANDER; RUSSELL, 1992).

As formas amastigotas possuem diversas adaptações que proporcionam a sua sobrevivência dentro do VPs. Além de serem organismos acidófilos, são capazes também de modular a resposta imunológica da célula hospedeira, degradando moléculas de MHC de classe II e diminuindo a apresentação de antígeno do parasito para os linfócitos T (LANG *et al.*, 1994, ANTOINE *et al.*, 1998).

A formação dos VPs ocorre de maneira semelhante na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*. Porém, a morfologia dos vacúolos varia entre as espécies envolvidas com a infecção. Parasitos pertencentes ao complexo mexicana, como a *L. mexicana* e *L. amazonensis*, induzem vacúolos grandes e com vários parasitos dentro de um único VP (figura 2A). Ao contrário *L. brasiliensis* ou *L. major*, também espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, induzem a formação de um vacúolo pequeno e individual para cada parasito (figura 2B), indicando que mesmo que ocorra da maneira igual, a taxa de fusão e fissão dos PVs variam em macrófagos infectados com diferentes espécie de leishmania (ANTOINE *et al.*, 1998).

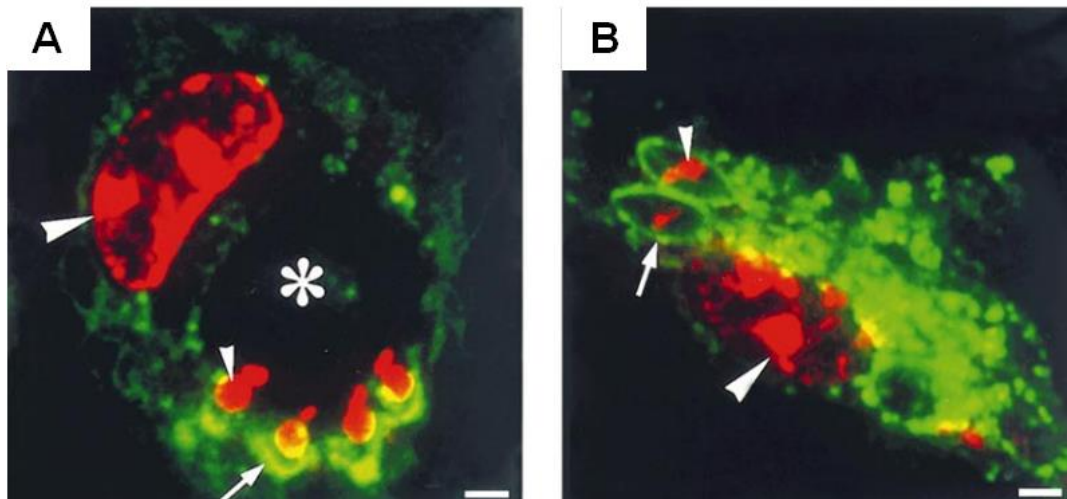


Figura 2 - Vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados com *Leishmania* spp. Diferenças estruturais dos vacúolos parasitóforos de macrófagos infectados com (A) *Leishmania mexicana* e (B) *Leishmania major*. Espécies do complexo mexicana induzem a formação de um vacúolo parasitóforo amplo e com grandes quantidades de parasitos, enquanto que a infecção com *Leishmania major* induz a formação de um vacúolo parasitóforo individualizado e reduzido. Vermelho - lodeto de propídeo. Cabeça de setas grandes indicam o núcleo do macrófago, cabeças de setas pequenas núcleo dos parasitos, setas indicam membrana do VP. Asterisco indica o meio do vacúolo parasitóforo (ANTOINE *et al.*, 1998).

2.4 - FOSFATIDILSERINA

As membranas celulares são constituídas por lipídios, proteínas e carboidratos, possuindo composição variável dependendo da localização e função. Os principais lipídios de membranas celulares são: fosfolipídios, colesterol e glicolipídios. Sendo responsáveis pela estrutura, sinalização celular, fluidez e permeabilidade seletiva da membrana (EDIDIN; VAN VORIS SESSIONS, 1983).

Os fosfolipídios majoritários presentes na membrana são a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol e esfingomiélin. A distribuição desses lipídios é irregular onde a PC representa 40-50%, a PE 20-45% dos fosfolipídios totais. Enquanto que o fosfatidilinositol e a PS estão em menor quantidade, podendo ser responsáveis por até 15 e 10%, respectivamente, dos lipídios totais (VANCE; STEENBERGEN, 2005).

Na membrana plasmática, a monocamada citosólica possui elementos diferentes da monocamada voltada para o ambiente extracelular. Essa assimetria na composição entre as monocamadas proporciona diferença de potencial elétrico, e condições importantes para vários processos biológicos (KIHARA; IGARASHI, 2004). A assimetria da composição de fosfolipídios é mantida ativamente por enzimas denominadas de fosfolipídio-translocases. As enzimas são divididas em três grupos: as flipases, responsáveis pelo transporte de fosfolipídios da face externa para a face interna; as flopases, fazem o movimento contrário; e as escramblases, capazes de realizar os dois tipos de movimento igualando os fosfolipídeos nas duas monocamadas (DIAZ; SCHROIT, 1996). A diferença do potencial elétrico pode ser atribuída principalmente a PS, devido a sua carga negativa e estar majoritariamente na face citosólica da bicamada. Estruturalmente a PS é semelhante a outros fosfolipídios, possui duas caudas de hidrocarbonos hidrofóbicas, glicerol, e um grupo polar (figura 3). O grupo polar é composto deo grupamento fosfato e é o responsável pela diferença entre os fosfolipídios, pois é onde se encontra o resíduo de serina (VANCE; STEENBERGEN, 2005).

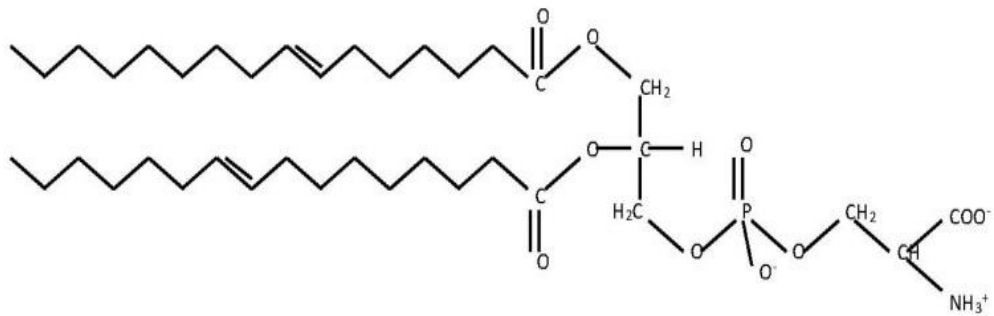


Figura 3 - Estrutura da fosfatidilserina- A fosfatidilserina é composta por duas caudas de hidrocarbonos hidrofóbicas, glicerol, grupo fosfato, e a serina (FONTE: CASSILLY, 2018).

A biosíntese de PS em células de mamíferos é realizada no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial pela fosfatidilserina sintase (PSS). A PSS possui dois isotipos: a PSS1 e a PSS2 e são responsáveis pela substituição do grupo polar de PC ou PE por serina, respectivamente (figuras 4 e 5).

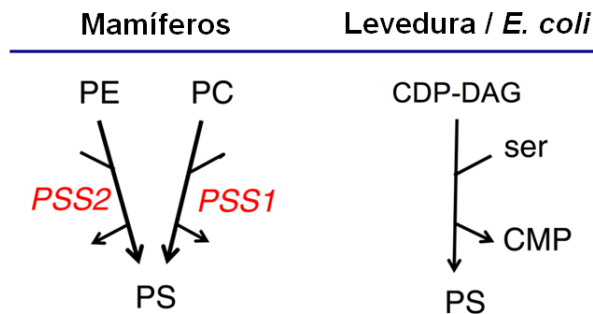


Figura 4 – Biosíntese de PS. Em mamíferos PS é sintetizada por uma reação de troca de base entre um fosfolipídio pré-formado e o aminoácido L-serina. A enzima PSS1 realiza essa reação utilizando PC enquanto que a PSS2 utiliza PE. Essa reação é dependente de cálcio e ocorre no retículo endoplasmático e na membrana mitocondrial. Em fungos e células procariotas a molécula citidina difosfato-diacilglicerol (CDP-DAG) reage com L-serina (ser), em uma reação catalizada por uma PS sintase não relacionada com as enzimas de mamíferos. PS- Fosfatidilserina; PC- fosfatidilcolina; PE - fosfatidiletanolamina; PSS - fosfatidilserina sintase; CMP – monofosfato de citidina. (FONTE: VANCE; TASSEVA, 2013).

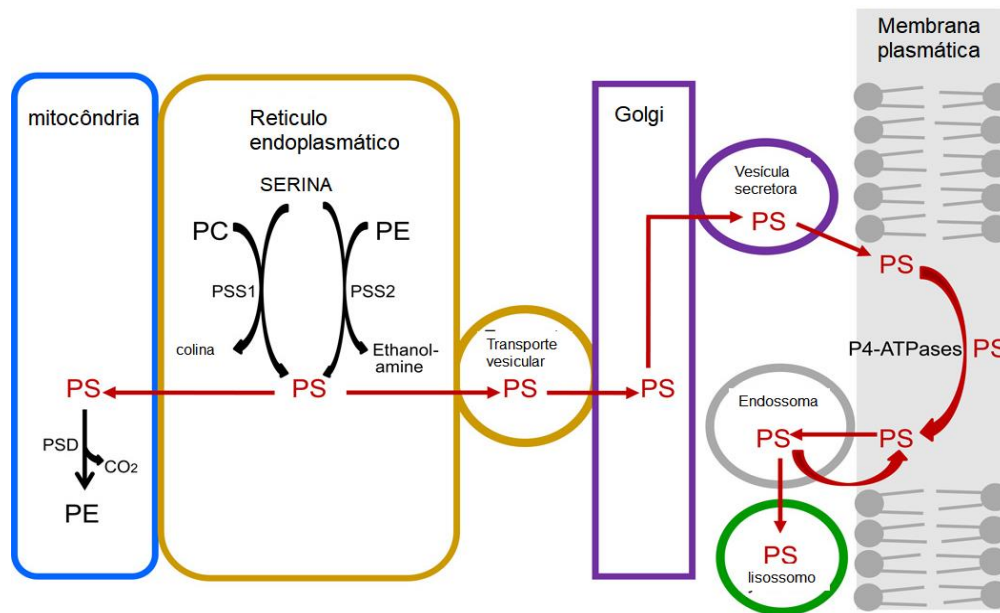


Figura 5 – Biossíntese de PS no retículo endoplasmático e degradação na membrana mitocondrial. A biossíntese de PS nas células de mamíferos ocorre através da troca do grupo polar de PC ou PE por serina. O PSS1 medeia a liberação de colina do PC, enquanto o PSS2 libera etanolamina do PE, com a inserção concomitante de serina e geração de PS em ambas as situações. A degradação de PS é realizada pela única PS descarboxilase em mamíferos, transformando PS em PE. PS- fosfatidilserina; PC- fosfatidilcolina; PE - fosfatidiletanolamina; PSS - fosfatidilserina sintase (Traduzido de KIM; HUANG; SPECTOR, 2014)

A degradação de PS pode ocorrer pela reação de descarboxilação, na qual a PS é convertida em PE. Esta reação é realizada pela fosfatidilserina descarboxilase (PSD) e ocorre na mitocôndria, no complexo de Golgi e em membranas de vacúolos. Outra forma de ocorrer a degradação é através de fosfolipases localizadas na membrana, que realizam a hidrólise de PS, gerando ácido araquidônico e lisofosfatidilserina (VANCE; STEENBERGEN, 2005)

A PS é importante mesmo em baixas concentrações em diversos processos celulares, como no recrutamento e ativação de enzimas e componentes estruturais e a sinalização de células e corpos apoptóticos para a fagocitose (LEVENTIS; GRINSTEIN, 2010).

Em *Leishmania* e outros protozoários, as membranas possuem composição semelhante às demais células de mamíferos, sendo majoritariamente composto por PC, seguindo por PE e PI e com traços de PA, CL, PG e PS. A síntese e degradação dos fosfolipídios também ocorre de maneira semelhante a células mamíferas, porém com algumas particularidades nas vias e enzimas envolvidas. Uma das diferenças

entre as células de mamíferos e *Leishmania* é a síntese de PS, os parasitos utilizam apenas a PE para a produção de PS, utilizando apenas a via PSS2, atualmente não há descrição de enzimas ou proteínas da via PSS1. Ou seja, todas as espécies apenas sintetizam PS através da substituição da etanolamina por serina (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2013).

2.4.1 – Apoptose

Apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada pelo arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de bolhas na membrana plasmática (HACKER, 2000). Todas essas modificações celulares são realizadas por reações dependentes de caspases (KROEMER *et al.*, 2009). As transformações sofridas pelas células apoptóticas não servem apenas para o processo de morte, mas também para preparar a célula para que ocorra a remoção de seus detritos sem ativar resposta imune (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). A eliminação dos corpos apoptóticos é muito importante para a homeostase do tecido em organismo multicelulares, sendo as células fagocitárias, como os macrófagos, as células responsáveis por essa eliminação (FADOK *et al.*, 1998). IL-10 e TGF- β são responsáveis pela resposta imunossupressora na eliminação dos detritos celulares e pelo controle da reação inflamatória, para que não ocorra de maneira exacerbada (FADOK *et al.*, 1998).

Para que ocorra a eliminação das células apoptóticas é necessário que as células, ao entrarem em processo de morte, emitam sinais para serem encontradas (*find-me signals*) e para serem reconhecidas e endocitadas (*eat-me signals*) (LAUBER *et al.*, 2004). Um dos principais *find-me signals* conhecidos é a liberação de lisofosfatidilcolina e o ácido araquidônico, ambos após a ativação de fosfolipases dependentes de caspases (LAUBER *et al.*, 2003). Os sinais para reconhecimento mais conhecidos são a exposição de PS, alterações na oxidação e modificações nos açúcares e cargas da membrana plasmática (LAUBER *et al.*, 2004; SARTER *et al.*, 2007). Essas alterações na membrana precisam ser reconhecidas pelas células fagocitárias.

Existem diversos receptores nos macrófagos capazes de reconhecer PS, como: Mertk, TIM-1, TIM-2, TIM-3, *scavenger* e SCARF-1. Estes receptores formam um sistema de reconhecimento redundante e muito potente, capaz de perceber

eficientemente essa modificação na membrana das células (BIRGE *et al.*, 2016). Porém em certas circunstâncias, para que ocorra a interação entre PS e o receptor, é necessária a mediação por moléculas séricas, chamadas moléculas-ponte (*bridging molecules*). As principais moléculas séricas são a glicoproteína MFG-E8, proteína S, Gas6 (*Growth Arrest Specific Gene 6*) e a glicoproteína β 2-GPI (HANAYAMA *et al.*, 2002; ISHIMOTO *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2003; BALASUBRAMANIAN; SCHROIT, 1998). Após o reconhecimento e a fagocitose da célula apoptótica o macrófago é induzido a produzir citocinas anti-inflamatórias, transformando o meio onde a célula estava em um meio imunossuprimido (figura 6).

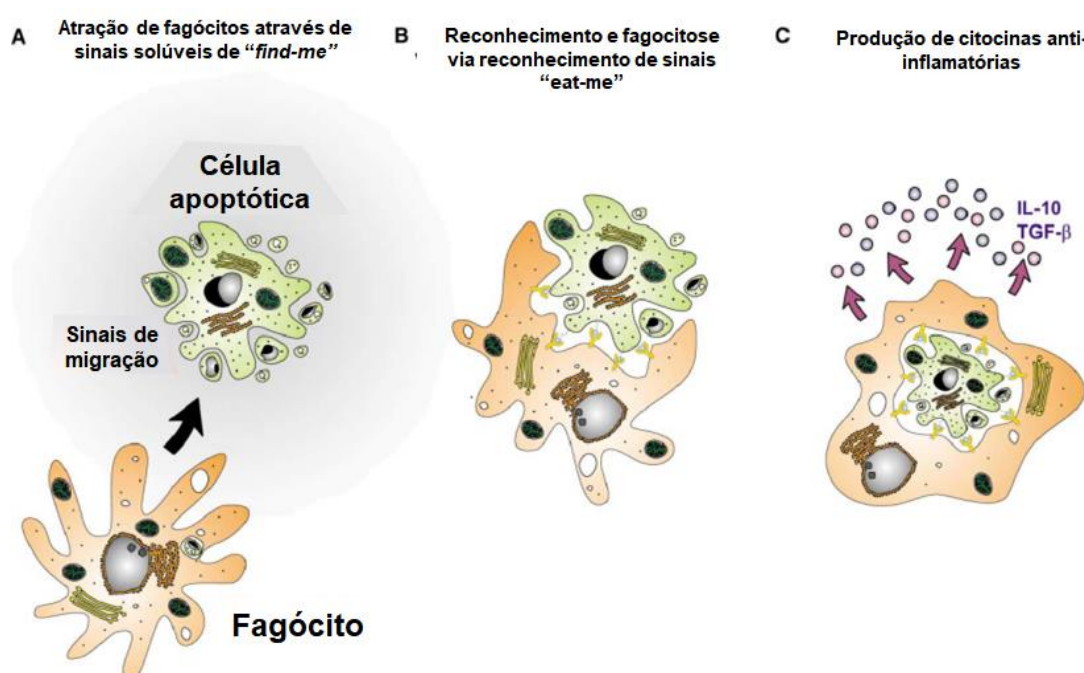


Figura 6 – Remoção de células apoptóticas. (A) Ao entrar em apoptose as células liberam “*find-me signals*”, que são responsáveis por atrair os fagócitos. (B) Os fagócitos são capazes de reconhecer e fagocitar as células apoptóticas devido aos “*eat-me signals*” expressos na superfície celular. (C) O reconhecimento e a fagocitose da célula apoptótica induz a produção de citocinas anti-inflamatórias por fagócitos (Traduzido de LAUBER *et al.*, 2004).

2.4.2 – Mimetismo apoptótico

O mimetismo apoptótico é o mecanismo em que células tumorais, vírus, bactérias e parasitos intracelulares expõem PS nos folhetos externos de suas membranas, sem apresentar outras características de apoptose, e regulam a resposta inflamatória, estabelecendo a infecção no organismo (BIRGE *et al.*, 2016). A exposição de PS nos patógenos e nas células tumorais exerce papel similar a das

células apoptóticas. Ao serem fagocitados são capazes de ativar a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β e imunossuprimir o microambiente. Com o meio modificado as células fagocitárias não conseguem responder adequadamente, possibilitando assim o estabelecimento e a disseminação infecção (DE FREITAS BALANCO, 2001; BIRGE *et al.*, 2016).

Os vírus utilizam diversos mecanismos para infectar as células hospedeiras sem ativar a resposta imunológica. Devido a essa diversidade o mimetismo apoptótico em vírus é classificado como clássico e não clássico. O mimetismo apoptótico clássico é realizado por vírus envelopados que expõe a PS no folheto externo da membrana (figura 7), enquanto que o mimetismo apoptótico não clássico ocorre em vírus não envelopados que adquirem receptores de apoptose ao sequestrar a membrana da célula hospedeira (figura 8). (AMARA; MERCI, 2015)

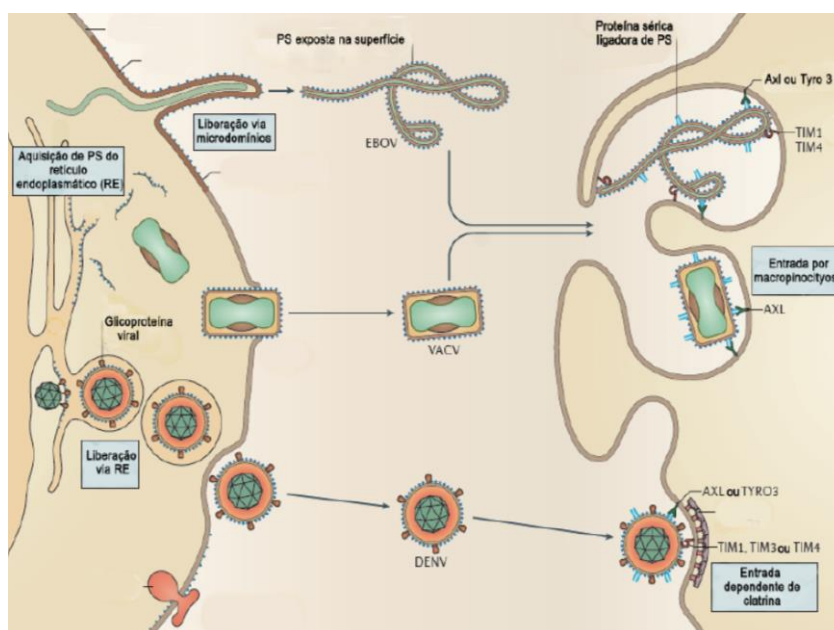


Figura 7 – Mimetismo apoptótico viral clássico. Vírus envelopados expõem PS nos folhetos externos de suas membranas como fator de patogenicidade para a infecção da célula alvo e estabelecimento da doença. É o caso das infecções por EBOV (vírus ébola), VACV (vírus vaccinia) e DENV (vírus da dengue). Estes vírus são reconhecidos via receptores TAM (Tyro 3, Axl e Mer) e são endocitados pela célula hospedeira por endocitose mediada por clatrina ou macropinocitose (adaptado de AMARA; MERCER, 2015).

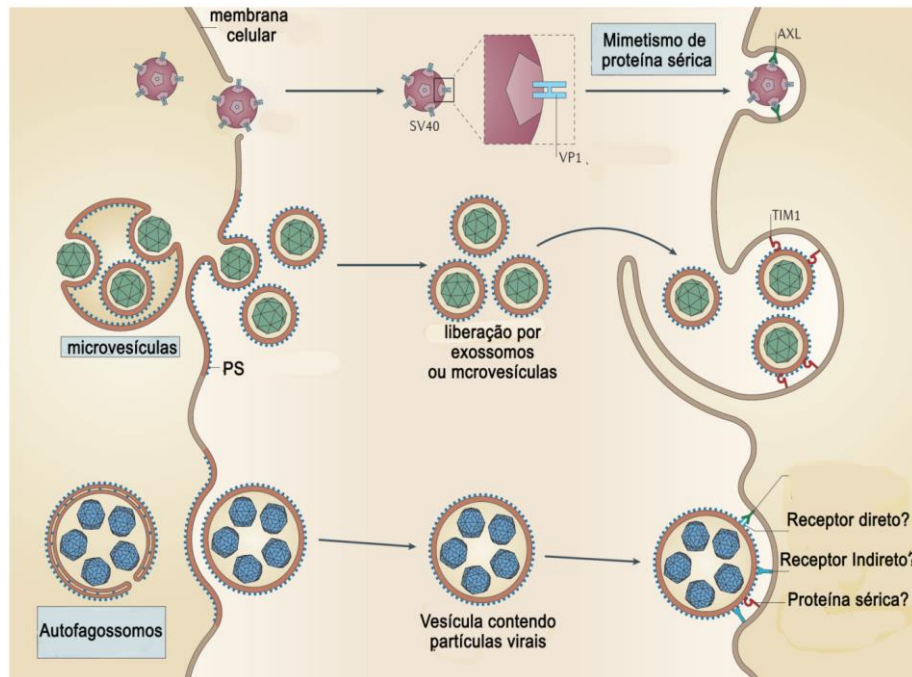


Figura 8 – Mimetismo apoptótico viral não clássico. Vírus não envelopados como o vírus SV40 (vírus vacuolante símio) e HAV (vírus da hepatite A) sequestram a membrana da célula hospedeira contendo PS exposto e conseguem infectar novas células, sem manifestar resposta inflamatória. O sequestro das membranas pode ser tanto por formação de exossomos, microvesículas ou autofagossomos. AXL – receptor tirosina cinase, TIM1 - Domínio mucina 1 da imunoglobulina de células T, (adaptado de AMARA; MERCER, 2015).

Diversas infecções virais estão relacionadas ao mimetismo apoptótico, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 – Infecções virais ocasionados por vírus que realizam o mimetismo apoptótico (AMARA; MERCER, 2015)

Doenças	Vírus	Função de PS	Tipo de mimetismo apoptótico
Encefalite	Alphavirus	Ligação, endocitose e infecção	Clássico
Vírus Pichinde	Arenavirus	Ligação, endocitose e infecção	Clássico
Ebola	Ebolavirus e Marburgvirus	Ligação, endocitose, infecção e evasão sistema imune	Clássico
Dengue/ febre amarela	Flavivirus	Ligação, endocitose, infecção e evasão sistema imune	Clássico
Varíola	Orthopoxvirus	Sinalização, endocitose e infecção	Clássico
Poliomielite	Enterovirus	Infecção	Não clássico
Hepatite A	Hepatovirus	Desconhecida	Não clássico

No microambiente tumoral a PS é externalizada nas células apoptóticas (tumoriais ou não), na vasculatura tumoral imatura, nos exossomos derivados de tumor e nas células tumorais viáveis. Com a realização de quimioterapia e radioterapia ocorre um aumento da externalização de PS (SATTENTAU; KARAJI, 2017). A exposição de PS além de suprimir a resposta imunológica com a produção de citocinas anti-inflamatórias, promove um fenótipo imaturo das células dendríticas, o que reflete na menor expressão das moléculas co-estimulatórias que são necessárias para apresentação eficiente de antígenos, afetando a ativação de linfócito T (KELLEHER, 2015). As linhagens celulares tumorais que externalizam a PS, mesmo viáveis, são: linfoma de Hodgkin's L540, câncer de pulmão H358, câncer de cólon HT29, melanoma B16, câncer de próstata ATI, glioma 9L, glioma F98, câncer de mama MDA-MB-231, câncer de mama MDA-MB-435, câncer de pâncreas Rip-Tag, câncer de próstata Tramp e câncer de mama PyMT (BIRGE *et al.*, 2016).

Em bactérias gram-negativas e em *Mycobacterium tuberculosis* o processo de mimetismo apoptótico ocorre de maneira semelhante ao mimetismo não clássico de vírus. As bactérias induzem a apoptose em células infectadas, os macrófagos as fagocitam juntamente com as bactérias intracelulares, disseminando a infecção (SATTENTAU; KARAJI, 2017).

2.4.3 – Fosfatidilserina e Leishmania

Os protozoários *Trypanosoma cruzi* (DAMATTA *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (SEABRA *et al.*, 2004; DOS SANTOS, 2011) e *Leishmania* (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001) são capazes de realizar o mimetismo apoptótico a fim de suprimir a resposta inflamatória do hospedeiro e assim conseguir estabelecer e disseminar a infecção.

A exposição de PS no folheto externo da membrana de *L. amazonensis* ocorre nas duas formas evolutivas do parasito de maneiras distintas. As formas promastigotas que expõem PS são promastigotas metacíclicas que entraram em morte por apoptose. A morte das promastigotas ocorre de maneira semelhante às células de organismos multicelulares, sendo induzida pela falta de nutrientes e alterações na temperatura (MOREIRA *et al.*, 1996). As formas promastigotas que não expõem PS são as células que estabelecem a infecção. Porém, foi demonstrado que sem a presença de promastigotas apoptóticas PS-positivas não ocorre o estabelecimento da infecção (WANDERLEY *et al.*, 2009), demonstrando assim a importância da PS na infecção por promastigotas. A exposição de PS foi observada tanto em metacíclicas que se diferenciam *in vitro*, quanto em experimentos *in vivo* com o inseto vetor. Diferentemente, a exposição de PS na membrana de formas amastigotas não ocorre como resultado de morte por apoptose. Todas as formas amastigotas realizam mimetismo apoptótico e, portanto, possuem PS exposta em sua superfície de membrana, são células viáveis, sem características morfológicas de apoptose e capazes de estabelecer infecção. Na verdade, existe uma correlação positiva entre a exposição de PS em amastigotas e sua capacidade infectiva. O modo como ocorre o mimetismo apoptótico no parasito ainda não está estabelecido, porém hipóteses como o sequestro da membrana da célula hospedeira, resíduo da sinalização apoptótica ou o resgate por mecanismo desconhecido da morte por apoptose são as principais suspeitas (WANDERLEY *et al.*, 2006; WANDERLEY; BARCINSKI, 2010).

A externalização de PS em ambas as formas de *Leishmania* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro para que o parasito consiga infectar e estabelecer a doença. As promastigotas PS-positivas são responsáveis por regular negativamente a produção de NO nos macrófagos que fagocitam promastigotas PS-negativas, permitindo assim que as promastigotas consigam entrar, permanecer e

diferenciar nos macrófagos. A PS na superfície de amastigotas permite que a infecção se dissemine, pois além de controlar a produção de NO no macrófago infectado é capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF- β e PGE₂ que irá suprimir a resposta inflamatória local (figura 9).

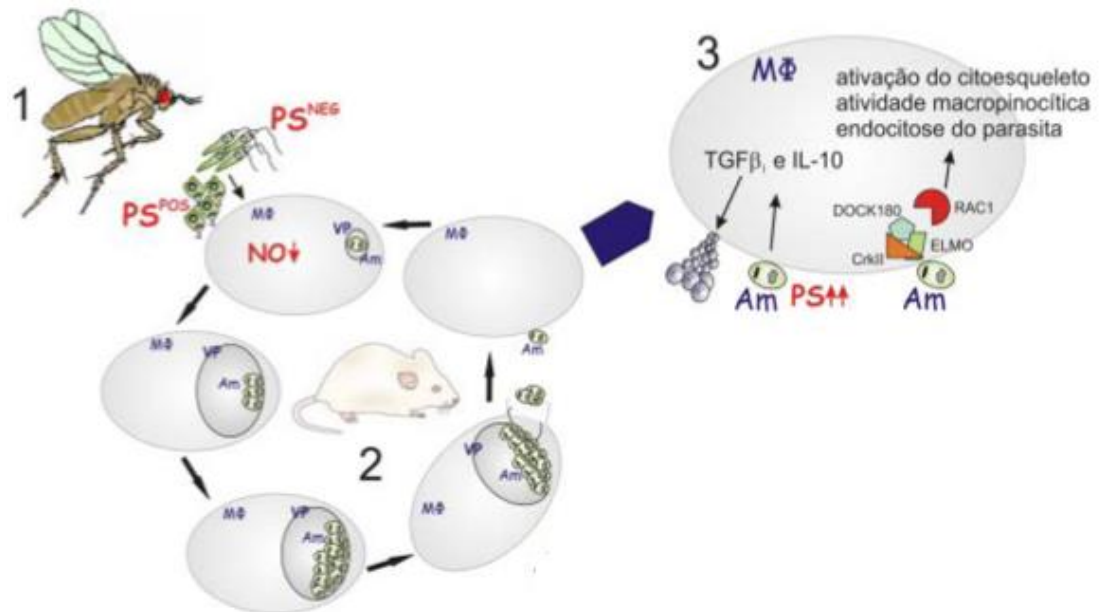


Figura 9 - Morte apoptótica e mimetismo apoptótico durante infecção e estabelecimento da infecção por *Leishmania*. (1) Na infecção pelo flebotômio são inoculados promastigotas que entram em apoptose (expondo PS) e as metacíclicas aptas a infectar. As promastigotas mortas têm a capacidade de modular a resposta de NO do macrófago, enquanto as metacíclicas vivas são responsáveis pela infecção. (2 e 3) O reconhecimento por macrófagos da PS exposta por amastigotas é capaz de induzir uma resposta anti-inflamatória e imunossupressora local. Após a fagocitose do parasito é induzida a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β . O que ocasiona a diminuição da atividade microbicida dos macrófagos e proporciona o meio ideal para o crescimento do parasito. Na parte central da figura observa-se que no hospedeiro vertebrado as amastigotas expõem a PS de forma constitutiva, o que permite a infecção constante em novos macrófagos (adaptado de BIRGE *et al.*, 2016).

2.5 - ANTICORPOS ANTI – FOSFATIDILSERINA

A exposição da PS no folheto externo da membrana de tumores e de patógenos para o estabelecimento e a disseminação das doenças, propõe a PS como importante alvo de quimioterapia para o controle da disseminação das manifestações clínicas.

Os primeiros trabalhos que avaliaram o bloqueio de PS em modelos de infecção utilizaram a ANX. A ANX é uma proteína pertencente à família das anexinas, e possui alta afinidade a fosfolipídios aniônicos, principalmente a PS. A ligação entre ANX e PS é dependente da presença de altas concentrações de íons de cálcio, pois os íons de cálcio são responsáveis por uma mudança estrutural na ANX, induzindo a formação de um sítio de ligação que interage especificamente com o resíduo de serina do fosfolipídio (SWAIRJO *et al.*, 1995). Dessa forma para melhorar a afinidade entre PS e ANX é necessário aumentar a concentração de cálcio, acima dos níveis fisiológicos desse íon (TAIT; GIBSON, 1992), o que é uma limitação para o uso em modelos *in vivo*.

A ANX foi utilizada em diversos modelos experimentais para auxiliar o diagnóstico e como estratégia de direcionamento terapêutico no tratamento em alguns tumores. O uso de ANX em modelos tumorais resultou na melhora da imunidade tumoral mediada por células T e melhora na sobrevivência de camundongos (YAN *et al.*, 2012). Em modelos experimentais de toxoplasmose, o bloqueio de PS com ANX *in vitro* foi capaz de reduzir a quantidade de parasitos e aumentar a produção de NO por macrófagos (SEABRA; DE SOUZA; DAMATTA, 2004). Em *Leishmania* o uso de ANX em infecções *in vitro* com amastigotas, resultou na redução da infecção de macrófagos, retenção no crescimento intracelular do parasito, aumento da produção de TGF- β e aumento da atividade inflamatória de macrófagos. (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006).

Com a identificação do potencial terapêutico do bloqueio de PS com ANX em diversas doenças, grupos de pesquisa buscaram o desenvolvimento de anticorpos capazes de interagir e bloquear a PS de maneira mais específica e eficiente, que fossem capazes de reduzir os possíveis efeitos inespecíficos *in vivo* e fossem independentes da presença de altas concentrações de cálcio.

Os primeiros anticorpos produzidos foram baseados na capacidade do próprio organismo em produzir anticorpos antifosfolipídios. Pacientes com a doença auto-imune síndrome do anticorpo antifosfolipídico (SAA) são capazes de produzir anticorpos anti-PS com alta especificidade. Camundongos quando estimulados com micelas de fosfolipídios específicos, são capazes de produzir anticorpo antifosfolipídico, de maneira similar aos pacientes com SAA. O anticorpo 3SB9b foi um dos primeiros anticorpos anti-fosfolipídicos produzidos utilizando micelas de PS

para induzir a produção. O 3SB9b é uma imunoglobulina de classe M (IgM), com alta afinidade a PS, a ligação necessita da presença de soro e em testes *in vitro*, apresentou atividade anti-plaquetária (ROTE *et al.*, 1993). O anticorpo subsequentemente produzido foi o 9D2 produzido a partir da imunização de ratos com células expondo PS. Este anticorpo também é IgM com alta afinidade a PS e maior especificidade. Interessantemente, o anticorpo 9D2 não compete com ANX V, visto que não ocorre competição pelo sítio de ligação (RAN; DOWNES; THORPE, 2002).

A produção de anticorpos IgM que se ligam a PS confere certas limitações (REDDY; CORLEY, 1999). Isto foi resolvido com o desenvolvimento do anticorpo 3G4, produzido de maneira semelhante ao 9D2, porém uma IgG3. Este tem alta afinidade a fosfolípidios aniônicos, principalmente a PS, e necessita de soro ou da proteína ponte β 2 glicoproteína (β 2-GPI) para que ocorra a ligação. De forma semelhante ao anticorpo 9D2 e a ANX V, o anticorpo 3G4 é capaz de se associar em PS em aglomerados na superfície celular. Este anticorpo é estruturalmente relacionado com os anticorpos utilizados neste trabalho.

O desenvolvimento do anticorpo 3G4 deu início ao melhoramento dos anticorpos anti-PS para uso terapêutico em humanos. Por ser um anticorpo murino, o uso de 3G4 era limitado em humanos, então foi desenvolvida uma versão quimérica, composta da porção variável (Fv) de 3G4 e a cadeia pesada de um IgG1k humano, chamado Bavituximab. Este anticorpo também necessita da presença de β 2-GPI para que ocorra a ligação com PS. O complexo β 2-GPI e PS possui constante de dissociação maior que o complexo PS e ANX, e seu uso *in vivo* é favorável, devido a molécula de β 2-GPI já estar presente no organismo. Em testes *in vivo*, Bavituximab foi capaz de provocar regressão tumoral através da ruptura vascular tumoral e modulação da resposta imune no microambiente (DEROSE; THORPE; GERBER, 2011). Um anticorpo semelhante, o mch1N11 foi utilizado em modelo experimental *in vivo* com *L. amazonensis*. Este anticorpo é um anticorpo quimérico com a região constante da cadeia leve de IgG2a de camundongo com e a região variável da cadeia leve e pesada de humano. A interação PS e anticorpo é dependente de β 2-GPI e a afinidade do complexo PS/ β 2-GPI com o anticorpo é similar à do anticorpo Bavituximab. O tratamento de camundongos infectados com mch1N11 promoveu redução da quantidade de parasitos na lesão, porém de

maneira heterogênea, com alguns camundongos apresentando carga parasitária semelhante a camundongos não tratados. As lesões dos camundongos tratados eram menores quando comparados ao não tratados, porém todos os camundongos apresentavam lesões progressivas (WANDERLEY *et al.*, 2013).

Embora os resultados observados no tratamento da infecção *in vivo* com os anticorpos mch1N11 tenham sido promissores, não houve reversão da progressão da doença, apenas atraso. Isto sugere que PS não tem papel preponderante na infecção, ou que o anticorpo não está funcionando da forma correta. A utilização de anticorpos de IgG ao invés de IgM permite a aumento da taxa de fagocitose das células que expõem PS, pelo reconhecimento da porção Fc do anticorpo. Esta funcionalidade dos anticorpos IgG é favorável no que diz respeito ao tratamento de doenças tumorais e mesmo de algumas infecções virais. No entanto, não é uma característica interessante no tratamento da infecção por *Leishmania*, já que este é um parasito intracelular obrigatório. Além disso, a necessidade de β 2-GPI na interação entre PS e o anticorpo pode ser um complicador, já que existem outras proteínas séricas que se ligam a PS fisiologicamente, como MFG-E8 (*milk fat globule protein E8*) ou fator XII e anticorpos que se ligam diretamente a PS se encontram normalmente no organismo e não estão relacionados com a ocorrência de nenhuma doença, e podem ser usados sem restrições (ALVING, 2006).

Dessa forma, utilizamos uma nova geração de anticorpos anti-PS, derivados do clone 11:31 e denominados PGN632, tanto na forma completo quanto a porção Fab purificada. O anticorpo PGN632 é uma IgG2 que realiza interação específica com PS, independente de β 2-GPI (MOODY *et al.*, 2010)

3 – JUSTIFICATIVA

O mimetismo apoptótico é um mecanismo largamente utilizado por patógenos intracelulares para estabelecimento e disseminação da infecção. O estudo de novas estratégias terapêuticas e suas implicações no desenvolvimento de infecções é fundamental, visto que as terapias atuais possuem diversas limitações, como toxicidade e resistência. A utilização de anticorpos como fármacos, os chamados biofármacos, já é eficiente no tratamento de alguns tumores, doenças virais, autoimunes, inflamatórias, entre outras (TOVEY; LALLEMAND, 2012). Portanto é promissora a possibilidade de utilizar esta abordagem em doenças parasitárias, utilizando como alvo um mecanismo de patogenicidade bem conhecido. Estes estudos são particularmente importantes em doenças negligenciadas, como é o caso da leishmaniose.

4 – OBJETIVOS

4.1 - OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ação de anticorpos monoclonais bloqueadores de PS no controle da infecção por *Leishmania amazonensis*.

4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência de anticorpos anti-PS independentes de β 2GPI e suas respectivas porções Fab purificadas no controle da infecção *in vitro*;
 - Avaliar a inibição da infecção de amastigota *L. amazonensis* após o tratamento com anticorpos monoclonais anti-PS em cultura de macrófagos *in vitro*;
 - Avaliar resposta inflamatória de macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratadas com anticorpos monoclonais anti-PS *in vitro*;
 - Avaliar a eficiência de anticorpos anti-PS independentes de β 2GPI e suas respectivas porções Fab purificadas no controle da infecção *in vivo*;
 - Avaliar alterações de lesão em camundongos tratados de forma sistêmica com anticorpos monoclonais anti-PS;
 - Avaliar alterações nas populações celulares de linfonodos cervicais *ex vivo*;
 - Identificar alterações histopatológicas em lesões de camundongos tratados com anticorpos monoclonais anti-PS;

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1 – ANIMAIS

Foram utilizados camundongos C57BL/6 e BALB/C com até 8 semanas, derivados do biotério da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Biotério Central - UENF) e da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB - UNICAMP). Os animais ficaram mantidos no biotério de experimentação do Instituto de Macaé de Ciência e Tecnologia, em gaiolas contendo com água e ração *ad libitum*. O uso dos animais foi aprovado pelo comitê de ética e uso de animais da UFRJ (MAC047). Foram realizados dois experimentos com infecção *in vivo* utilizando os camundongos C57BL/6, com cinco animais em cada tratamento (11:31, 11:31 Fab, C44 e PBS), totalizando o uso de 40 animais.

5.2 - CÉLULAS

5.2.1 – Macrófagos derivados de medula óssea

Os macrófagos foram obtidos através de lavado da medula óssea dos ossos fêmur e tíbia de camundongos C57BL/6 com meio *Dulbecco's Modified Eagle* (DMEM - Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1% de piruvato de sódio (SIGMA), 1% de L-glutamina (SIGMA), 1% de penicilina (SIGMA) 1000 unidades/mL e estreptomicina (SIGMA) 1000 unidades/ml e 50 µM B-mercaptoetanol. Nas placas de Petri tratadas TPP foram colocados 1 mL do meio com medula óssea e mais 9 mL de DMEM completo suplementado com 30% de sobrenadante de L929. Após o quinto dia de cultura foi realizado a troca de 5 mL do meio por DMEM completo contendo 30% de sobrenadante de L929. Os macrófagos foram utilizados após 10 dias de diferenciação.

5.2.2 – Linhagem de fibroblastos L929

Os fibroblastos foram cedidos pela Prof^a. Bartira Bergman do IBCCF/UFRJ. As culturas foram mantidas em DMEM completo, em estufa de CO₂ à 37°C. Foram plaqueados 5x10⁵ de células em uma garrafa de cultura de 25 cm² que foi mantida por 4 - 5 dias em estufa, posteriormente as células foram transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm² e mantidas em estufa por 4 – 5 dias. Após esse período

as células foram transferidas para 4 garrafas de 150 cm² e deixadas por 15 dias ou até o meio de cultura adquirir a coloração alaranjada. O sobrenadante foi colhido, filtrado e armazenado para o uso.

5.3 - PARASITOS

Foram utilizados parasitos da espécie *Leishmania amazonensis* da linhagem LV78 (MPRO/BR/72/M1845).

5.3.1 - Promastigotas

Promastigotas foram cultivadas em meio Schneider drosophila (Gibco) contendo 10% de SFB (Cultilab), em estufa B.O.D. à 23°C. Os parasitos foram mantidos em cultura por até 6 passagens *in vitro*. As passagens foram feitas sempre ao final da fase logarítmica de crescimento.

5.3.2 – Amastigotas

Camundongos BALB/c foram infectados na pata com 2×10^6 de promastigotas. As formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c por no máximo 12 semanas. A purificação de amastigotas foi realizada com a homogeneização da lesão em DMEM em homogeneizador de tecido de vidro tipo Grinder. A solução formada foi centrifugada a 50 g por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 1750 g por 17 minutos à 4°C. O *precipitado* foi ressuspenso e centrifugado a 1750 g por 17 minutos à 4°C por 3 vezes com 10 mL de DMEM contendo 1% de antibiótico. Após a última centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *precipitado* foi ressuspenso em 10 mL de DMEM contendo 4% de SFB e 1% de antibiótico e incubado por 2 horas com 100 rpm de agitação, à 34°C. Após a incubação as amastigotas foram centrifugadas a 1750 g por 17 minutos à 4°C por duas vezes e incubadas durante a noite em DMEM contendo 4% de SFB e antibióticos, à 34°C. Após esta incubação as amastigotas foram centrifugadas a 1750 g por 17 minutos à 4°C por 3 vezes e o precipitado final foi ressuspenso em DMEM contendo 4% de SFB e 1% de penicilina (SIGMA) 1000 unidades/ml e estreptomicina (SIGMA) 1000 unidades/ml

5.4 – ANTICORPOS ANTI-PS

Foram utilizados os anticorpos monoclonais IgG2 PNG632 (11:31) anti-PS completo e sua respectiva fração Fab purificada (11:31 Fab), ambos são independentes da presença de β 2-glicoproteína. O anticorpo C44 foi utilizado como controle do isotipo de anticorpo, por ser um isotipo de IgG2. Os anticorpos foram doados pela empresa Peregrine Pharmaceuticals (MTA 27829). Como controle do bloqueio de PS *in vitro* foi utilizado ANX (BD) 1:10 diluída em tampão de ligação de ANX (ABB). O tampão ABB é preparado com 10 mM de sal de sódio de HEPES, 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 2,5 mM cloreto de sódio bi-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), em água

5.5 - INFECÇÃO

Para infecções *in vitro* foram utilizados macrófagos e amastigotas na proporção 5:1.

5.5.1 – Infecção em macrófagos com parasitos tratados com anticorpos monoclonais anti-PS

Para adesão foram plaqueados 2×10^5 macrófagos derivados da medula óssea em placas de 24 poços, contendo lamínulas de 13 mm², e incubados em meio DMEM suplementado, durante a noite em estufa de CO₂ á 37°, para adesão nas laminulas. Após o período de adesão, foi retirado o meio dos macrófagos e repuxado PBS (pH 7,3) com pipetas automáticas de 1000 μL , para realizar a lavagem dos poços. Os parasitos que foram adquiridos conforme o item 3.2 foram incubados com os anticorpos 11:31 e 11:31 Fab nas concentrações 1,25 e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e com os controles, C44 e anexina V, por 30 minutos em geladeira (4 - 8°C). Em seguida da incubação, os parasitos foram centrifugados e resuspendidos em meio DMEM suplementado e adicionados nos poços com macrófagos. Após 2 horas de infecções todos os poços foram lavados com PBS. Os poços destinados as análises da infecção de 2 horas foram fixados com metanol e os poços destinados as analises 48 horas de infecção tiveram acréscimo de meio DMEM suplementado, após as 48 horas de infecção os poços foram novamente lavados com PBS e fixados com metanol. Foram realizados três experimentos, com duplicadas em cada.

5.5.2 – Infecção *in vivo* e tratamento com anticorpos

Os camundongos C57BL/6 foram anestesiados com quetamina (1 µL / peso) e cloridrato de xilasina (0,75 µL / peso) e inoculados de forma intradérmica no pavilhão auricular com 10 µL de solução salina com 1×10^6 promastigotas. Os anticorpos 11:31, 11:31 Fab e C44 foram aplicados na concentração de 100 µg por via intraperitoneal um dia após a infecção e de três em três dias, durante sete semanas.

5.6 - AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

Formas amastigotas purificadas das lesões de camundongos BALB/c foram incubadas com anexina V conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 34 Oregon, EUA) em 20 µL de tampão ABB o e 0,7 µg/ml de iodeto de propídio (PI - Sigma, Saint Louis, EUA), um indicador de viabilidade. Os parasitas foram analisados por citometria de fluxo (FACS Calibur/ Cytex, N/S E3591). A análise foi feita utilizando software FlowJo CE (Cytex).

5.7 – PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os parasitos obtidos conforme o item 3.2 foram tratados com anticorpos na concentração de 5 µg/mL e os respectivos controles e foram incubados por 30 minutos na geladeira. Após a incubação foram lavados com DMEM contendo SFB e utilizados para infectar macrófagos. Após 2 horas de infecção os macrófagos foram lavados com PBS e ativados com 100 ng/mL de IFN- γ e 1 µg/mL de LPS. O sobrenadante da cultura foi colhido em 8h, 24h e 48h após a infecção.

A quantidade NO liberado pela célula, foi mensurada indiretamente pela reação de Griess (Sigma) e analisado por espectrofotometria (EspectraMax 190) no comprimento de onda de 540nm.

5.8 – PREPARAÇÃO DE ANTÍGENO

Promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio Schneider, suplementado com glutamina, antibióticos e SFB. O repique (renovação de meio) era realizada a cada 3 dias. O antígeno de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de culturas de promastigotas em fase estacionária de crescimento. As promastigotas

foram lavados três vezes em 5 mL de PBS estéril e submetidas a cinco ciclos de congelamento (-18°) e descongelamento (t.a), a suspensão foi centrifugada a 8.000 × g por 20 min a 4° C e o sobrenadante contendo SLA foi coletado e armazenado. As concentrações de proteína foram estimadas pelo método de Bradford.

5.9 - ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DOS LINFONODOS CERVICAIS

Linfonodos cervicais dos camundongos infectados foram obtidos após eutanásia dos animais. Foi obtida uma suspensão celular a partir da maceração dos linfonodos em um filtro. As células foram quantificadas em uma câmara de Neubauer e separadas em dois grupos: ativadas com LSA e não ativadas. 2×10^6 de células foram colocadas em placas de cultura de 96 poços com fundo U com meio DMEM, nas células ativadas foram adicionados 50 µg de SLA em cada poço. Após cinco dias de incubação os sobrenadantes foram retirados e armazenado para análise das citocinas.

5.10 - DETECÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes das culturas das células não ativadas foram agrupados em uma única amostra e os sobrenadantes das células re-estimuladas com LSA foram agrupadas em duas amostras. As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes das culturas foram determinadas pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA - BD), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram analisadas as citocinas IL-12p70, TNF-α, MCP-1, IL-6, IL-10 e IFN-γ.

5.11 - ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA *IN VITRO*

Macrófagos infectados em cultura foram fixados em metanol, corados com Giemsa e a infecção foi avaliada através de microscopia ótica. A infecção foi expressa através do índice de infectividade. Foram contados 300 macrófagos totais e analisados o produto da porcentagem de macrófagos infectados pela proporção de amastigotas por macrófago infectado. (Índice de infectividade= [macrófagos totais/macrófagos infectados] *[amastigotas/macrófagos infectados]).

5.12 - HISTOPATOLOGIA

As orelhas infectadas foram coletadas e fixadas em paraformoldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M t, a fim de serem encaminhadas para o Laboratório de Morfologia e Patologia Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Em sequência, foi selecionado a região exata onde se localizava a lesão causada pela infecção. Estes fragmentos de tecido foram desidratados em soluções seriadas de álcool etílico nas concentrações de 70%, 80%, 90% e 100%, clarificada em xilol, embebidas e incluídas em parafina. Logo após, foram seccionadas em micrótomo, obtendo cortes histológicos de 5 µm. Estes cortes foram fixados em lâminas de microscopia, corados com hematoxilina (Wcor) e eosina (Wcor) e analisadas por microscopia óptica (Olympus BX41).

5.13 – ANÁLISE DO TAMANHO DOS VACÚOLOS PARASITÓFOROS.

Os tamanhos vacúolos parasitóforos de lesões de camundongos tratados com anticorpo anti-PS, isotipo ou PBS foram observados no microscópio Axioplan (Zeiss) e as imagens foram capturadas com câmera digital MRC5 AxioCam e processadas com o software ImageJ versão 1.47t (Wayne Rasband - NIH). Foram contados 200 VPs e os valores são referentes a área em µm².

5.14 - ANÁLISE MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS DO LINFONODOS CERVICAIS

Linfonodos cervicais dos camundongos infectados foram obtidos após eutanásia dos animais. Foi obtida uma suspensão celular a partir da maceração dos linfonodos em um filtro. As células foram quantificadas em uma câmara de Neubauer e avaliadas por citometria de fluxo (FACS Calibur/ Cytex, N/S E3591). A análise foi feita utilizando software FlowJo CE (Cytex), utilizando apenas os parâmetros não-fluorescentes FSC (*forward scatter*) e SSC (*side scatter*).

5.15 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas no programa GraphPad Prism 6.01. Múltiplas comparações com distribuição normal foram analisadas pelo teste de ANOVA. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

6 - RESULTADOS

6.1- EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA EM AMASTIGOTAS EXTRAÍDAS DE LESÕES DE CAMUNDONGOS BALB/C

Formas amastigotas de *L. amazonensis* expõem fosfatidilserina em sua superfície, como já demonstrado anteriormente (DE FREITAS BALANCO *et al.*, 2001; WANDERLEY, 2006). Para confirmar esta exposição, amastigotas que utilizamos neste trabalho foram obtidas de lesões de camundongo BALB/c com infecções de oito semanas. A exposição de PS por marcação com ANX e iodeto de propídeo (PI) foi realizada por citometria de fluxo. Os parâmetros FSC e SSC foram avaliados para seleção da população que apresentou as características de amastigotas viáveis (figura 10A). Os eventos fora da área de seleção (*gate*) foram referentes a outros componentes da lesão como hemácias, células mortas e debris celulares. No *gate* de amastigotas foram avaliados os parâmetros de FL1 e FL2. Média de 80% das células ANX positivas (pos) e IP negativa (neg) foram obtidas, confirmando que as formas amastigotas majoritariamente expõem PS em sua superfície (figura 10B).

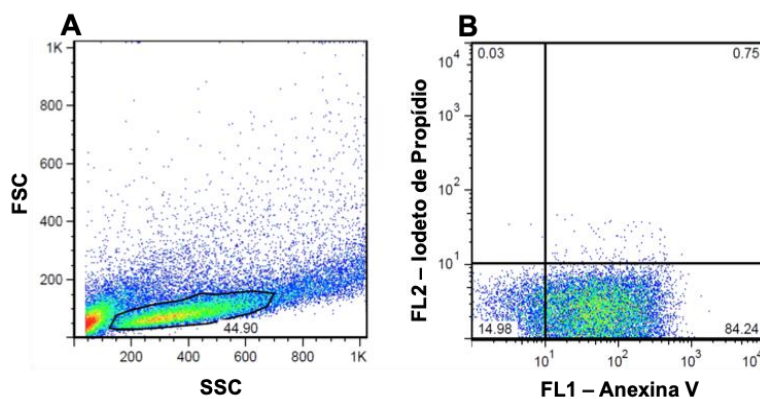


Figura 10 - Exposição de PS em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c. Amastigotas foram extraídas de lesões de camundongos BALB/c infectados, purificadas e analisadas por citometria de fluxo. **(A)** análise de FSC e SSC das células extraídas e *gate* na população com parâmetros característicos de amastigotas viáveis. **(B)** Marcação com ANX conjugada com Alexa Flúor 488 e iodeto de propídeo da população do *gate* selecionado (amostra representativa). FSC - (*Forward Scatter*) tamanho. SSC - (*Side Scatter*) granulosidade FL1 – canal de fluorescência 1. FL2 – canal de fluorescência 2.

6.2 - INIBIÇÃO DE INFECÇÃO *IN VITRO* POR AMASTIGOTAS COM USO DE ANTICORPOS ANTI-PS

A importância de PS para a infecção de amastigotas em macrófagos foi descrita por De Freitas Balanco *et al.* em 2001. Neste trabalho, foi feito o bloqueio de PS com ANX, que é uma proteína que se liga em fosfolípidios aniônicos em geral. Devido a isso avaliamos a capacidade de anticorpos monoclonais (11:31) ou apenas a porção Fab (11:31 Fab) dos anticorpos anti-PS de inibir o índice de infecção em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 após interação com amastigotas de *L. amazonensis*.

Os macrófagos foram infectados com amastigotas tratadas previamente com 11:31 ou 11:31 Fab e analisado o índice de infecção. Após 2 horas de infecção o tratamento com o anticorpo ou a porção Fab tende a bloquear a infecção de maneira dose-dependente, já que amastigotas tratadas com 5 µg/mL de anticorpos apresentaram maior redução do índice de infectividade (figura 11) quando comparado com PBS ou os anticorpos na concentração de 1,25 µg/mL. Não foi possível identificar diferenças significativas entre os anticorpos 11:31 e 11:31 Fab. O uso de 5 µg/mL de anticorpo ou seu Fab foi capaz de inibir a infecção de maneira semelhante a inibição com uso de ANX (figura 11). Nas infecções de 48 horas, os anticorpos foram capazes de reduzir significativamente o índice de infectividade quando comparados com o tratamento controle com PBS. Porém, o índice de infectividade é maior quando comparado com a infecção com amastigotas tratadas com ANX (figura 11).

Ao contrário do que foi encontrado em infecções de 2 horas, o efeito dos anticorpos após 48 horas de infecção não foi semelhante quando comparado o anticorpo 11:31 e sua porção Fab purificada. O anticorpo 11:31 inibiu de maneira dose dependente, e na maior concentração observou-se redução da infecção de maneira significativa quando comparado ao PBS. Esse efeito foi semelhante ao observado com ANX. Ao contrário, os anticorpos 11:31 Fab não apresentaram efeito nas concentrações utilizadas e não apresentaram diferenças estáticas quando comparados com o PBS (figura 11).

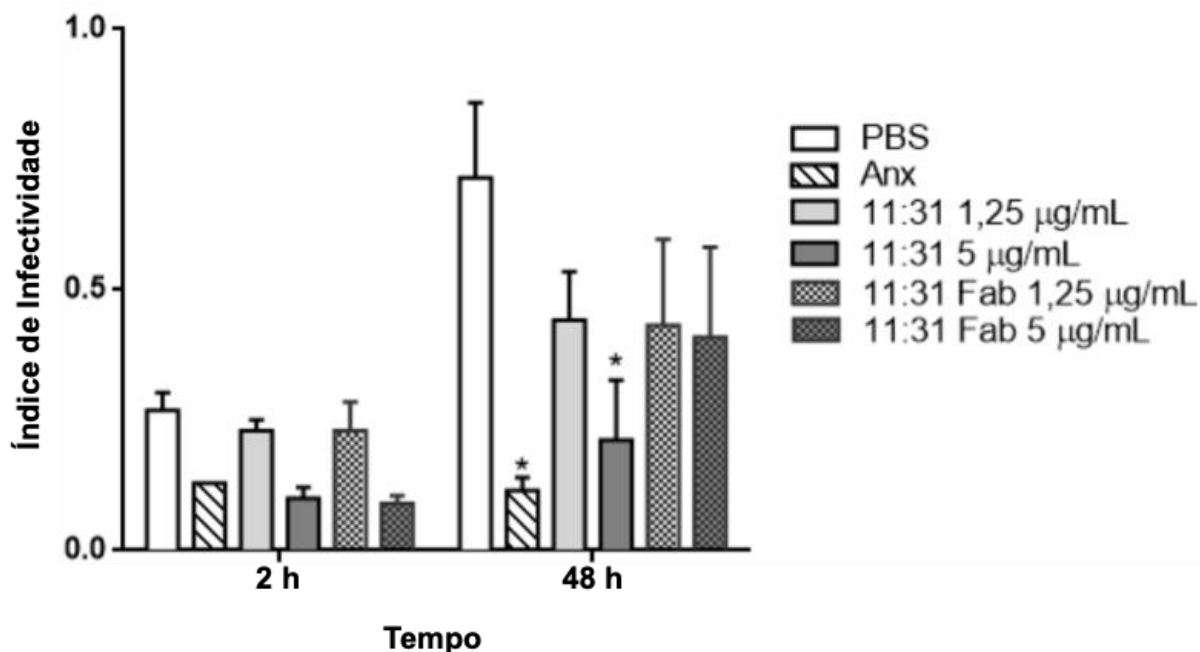


Figura 11- Índice de infectividade de macrófagos após o tratamento com os anticorpos anti-PS. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/c foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpo anti-fosfatidilserina (11:31) ou apenas a porção Fab (11:31 Fab), nas concentrações de 5 e 1,25 µg/mL. O índice de infectividade foi observado em culturas com 2 e 48 horas após a infecção. Foram utilizados como controle negativo PBS e como controle positivo do bloqueio de fosfatidilserina anexina V (ANX). * $p=0,05$: comparação com o índice de infectividade de macrófagos infectados com amastigotas tratadas com PBS em culturas de 48h após a infecção.

O índice de infectividade é o produto entre a porcentagem de macrófagos infectados e a média do número de amastigotas por macrófago. Dessa forma, os dois fatores podem contribuir para alterações na avaliação da infecção. Portanto, avaliamos a porcentagem de macrófagos infectados (figura 12) e o número médio de amastigotas por macrófagos infectados (figura 13), separadamente.

O uso dos anticorpos anti-PS alterou a porcentagem de macrófagos infectados (figura 12). Observamos tendência de redução na porcentagem de macrófagos infectados, de forma dose dependente, após tratamento de amastigotas com os anticorpos anti-PS 11:31 e 11:31 Fab. Não observamos diferenças entre os anticorpos utilizados e nos dois intervalos de tempos observado, 2 e 48 horas, perfil semelhante de índice de infectividade foram encontrados. Em 48 horas os anticorpos reduziram a porcentagem de macrófagos infectados quando comparados com os infectados com amastigota sem tratamento, porém apresentaram porcentagem maior do que os infectados com amastigotas tratadas com ANX (figura 12).

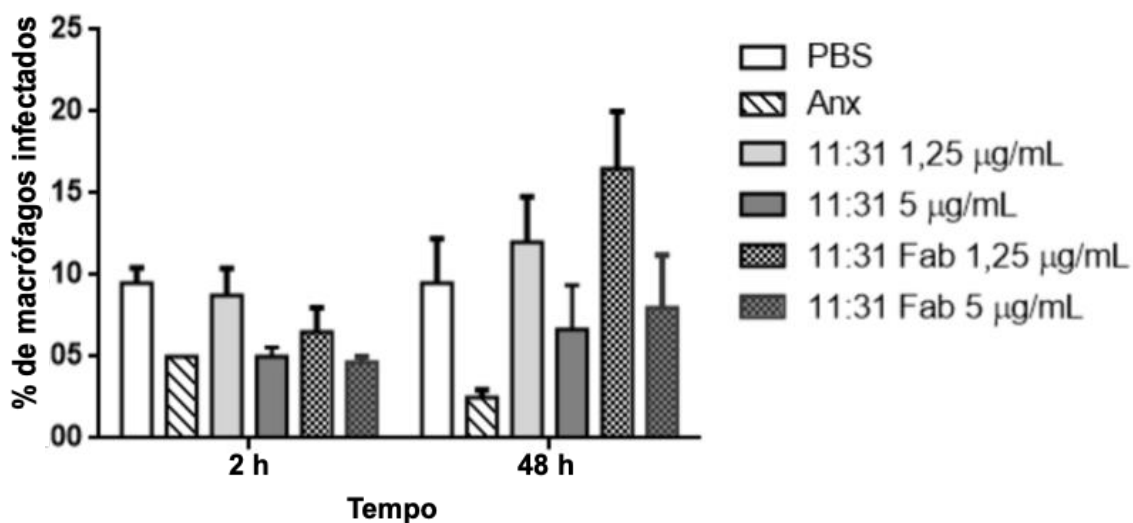


Figura 12 - Porcentagem de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpo anti-fosfatidilserina (11:31) ou a porção Fab purificada (11:31 Fab), nas concentrações de 5 e 1,25 µg/mL. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada em culturas de 2 e 48 horas após a infecção. Foram contados 300 macrófagos para ser determinada a porcentagem. Foram utilizados como controle negativo PBS e como controle positivo do bloqueio de fosfatidilserina, anexina V (ANX).

O número médio de amastigotas por macrófagos após 2 horas de infecção não foi significativamente diferente entre os tratamentos. Porém, percebemos que os macrófagos infectados com amastigotas tratadas com a concentração de 5 µg/mL de 11:31 Fab, continham menos amastigotas que os outros tratamentos, traço não encontrado em nenhuma outra situação experimental (figura 13).

Em infecções de 48 horas não foi observado um padrão claro na média do número de amastigotas por macrófago infectado (figura 13). Macrófagos infectados com amastigotas tratadas com PBS ou ANX apresentaram número de amastigotas semelhantes. Macrófagos infectados com amastigotas tratadas com o anticorpo 11:31 apresentaram tendência de menor número médio de amastigotas quando comparado ao tratamento dos parasitos com PBS ou ANX. Macrófagos infectados com amastigotas tratadas com anticorpo 11:31 Fab apresentaram número menor de amastigotas quando comparado ao tratamento com PBS na concentração de 1,25 µg/mL do anticorpo. No entanto, número semelhante de amastigotas por macrófago

foram observados quando comparado o tratamento com PBS ou ANX e o tratamento com 5 µg/mL do anticorpo.

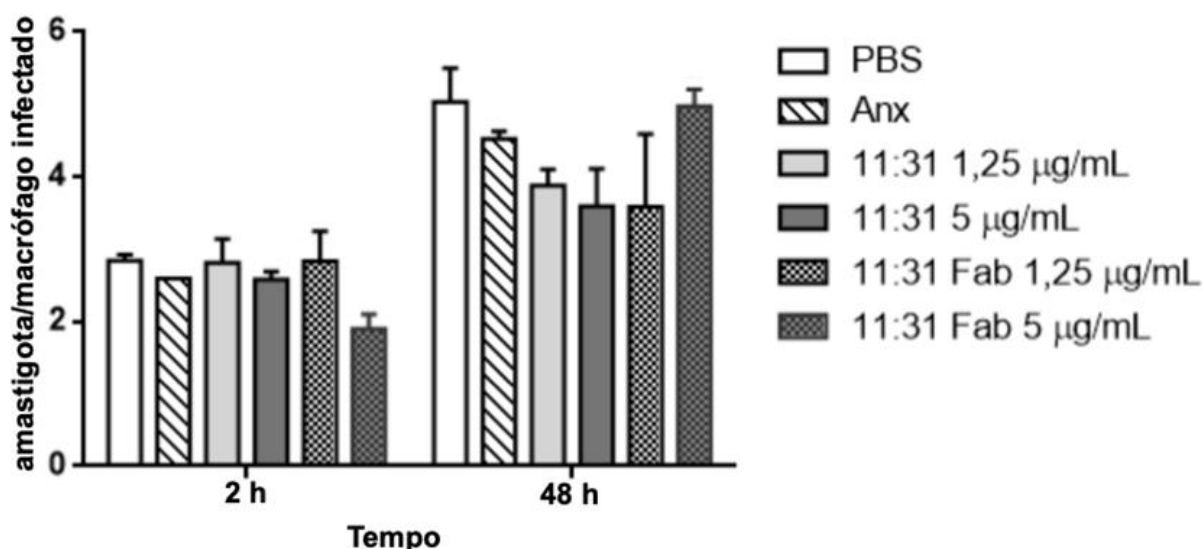


Figura 13 – Número médio de amastigotas por macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpo anti-fosfatidilserina (11:31) ou a porção Fab purificada (11:31 Fab), nas concentrações de 5 e 1,25 µg/mL. A proporção de amastigotas por macrófago infectado foi determinada em culturas de 2 e 48 horas após a infecção. Foram contados 300 macrófagos totais para ser determinada a proporção. Foram utilizados como controle negativo PBS e como controle positivo do bloqueio de fosfatidilserina, anexina V (ANX).

6.3 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM INFECÇÕES COM AMASTIGOTAS TRATADAS COM ANTICORPOS ANTI-PS

A produção de óxido nítrico é o principal mecanismo leishmanicida dos macrófagos (MAUËL, 1996). Em nossos experimentos podemos identificar que macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* produzem NO após 8 horas de infecção, sendo encontrados nitrito apenas em culturas com 24 e 48 horas após a infecção. Além disso foi identificado que os anticorpos anti-PS não foram capazes de acentuar a produção de NO após o bloqueio com PS, pois os macrófagos infectados com amastigotas previamente tratadas com os anticorpos apresentaram produção de NO similar aos das amastigotas não tratadas (figura 14).

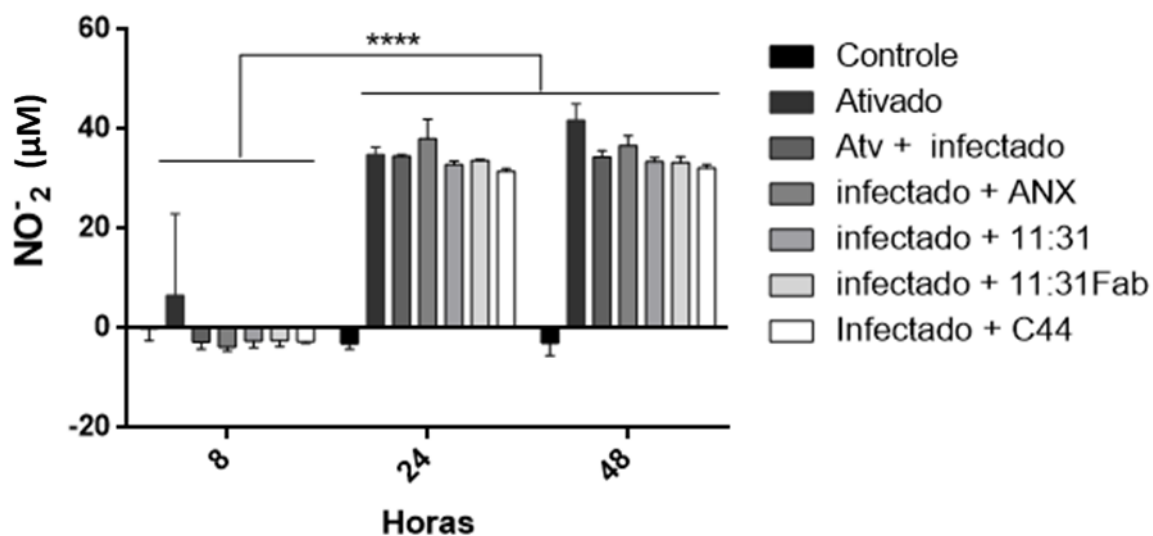


Figura 14 - Produção de NO por macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44). Foram utilizados como controle negativo do bloqueio de fosfatidilserina a incubação com PBS e como controle positivo a anexina V (ANX). Após duas horas de infecção os macrófagos foram ativados com LPS e IFN- γ , exceto o macrófago controle. Os sobrenadantes foram colhidos em 8, 24 e 48 horas após o início da infecção, para a mensuração da produção de NO₂⁻ (nitrito). Para determinação de NO₂⁻ produzido foi utilizado o reagente de Griess. Atv - ativado

6.4 - ALTERAÇÕES NAS LESÕES DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E TRATADOS COM ANTICORPOS ANTI-PS

Para avaliar as características histológicas e imunológicas da lesão, camundongos C57BL/6 foram infectados na orelha com formas promastigotas de *L. amazonensis* e tratados de forma sistêmica (i.p.) durante 7 semanas, com anticorpo 11:31, 11:31 Fab e o isotipo (C44). Lesões nos pavilhões auriculares de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* apresentaram padrões morfológicos distintos após o tratamento com os anticorpos anti-PS (figura 15). Camundongos tratados com PBS e C44 apresentaram lesões com perfis semelhantes, nas quais após 7 semanas as lesões eram pequenas, não apresentaram vestígios de ulceração e nem rubor local (figura 15 A – B). Ao contrário, camundongos tratados com os anticorpos 11:31 e 11:31 Fab

apresentaram lesão desenvolvida, túrgida, com rubor local e em alguns camundongos foi encontrado sinais de ulceração na lesão (figura 15 C- D).

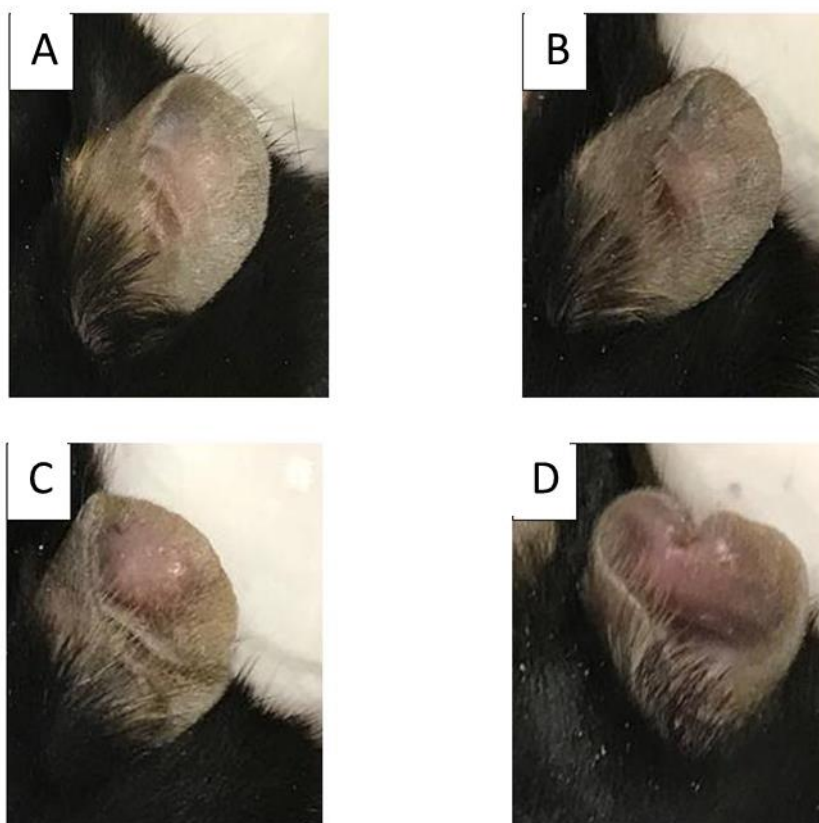


Figura 15 - Lesões de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*. Camundongos foram infectados com 1×10^6 promastigotas no pavilhão auricular e tratados de forma sistêmica (i.p) durante 7 semanas com PBS (A); C44 (B); 11:31 (C), 11:31 Fab (D).

6.4.1 - Alterações histopatológicas

Os tratamentos com os anticorpos anti-PS foram capazes de causar alterações histopatológicas nas lesões de *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6 (figura 16 - 19). Nossos resultados demonstraram que as duas versões do anticorpo anti-PS 11.31 foram capazes de induzir o aumento do infiltrado inflamatório granulomatoso, hiperplasias, necrose tecidual e a redução nos tamanhos dos vacúolos parasitóforos,

Orelhas de camundongos tratados com PBS (figura 16) e C44 (figura 17) apresentaram perfis histopatológicos clássicos da infecção por *L. amazonensis*, com grande quantidade de infiltrado inflamatório granulomatoso, sendo formado

principalmente por células mononucleares, principalmente macrófagos. Os macrófagos apresentavam citoplasma vesiculado, devido a formação dos vacúolos parasitóforos espaçosos e com presença de várias amastigotas em um único vacúolo (figura 16 e 17).

Orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS 11:31 (figura 18) e 11:31 Fab (figura 19) apresentaram alterações histopatológicas quando comparados com as orelhas dos camundongos controles (PBS e C44). As alterações encontradas foram o aumento do infiltrado inflamatório granulomatoso, hiperplasia, aumento de células necróticas e redução no tamanho dos vacúolos parasitóforos (figura 20).

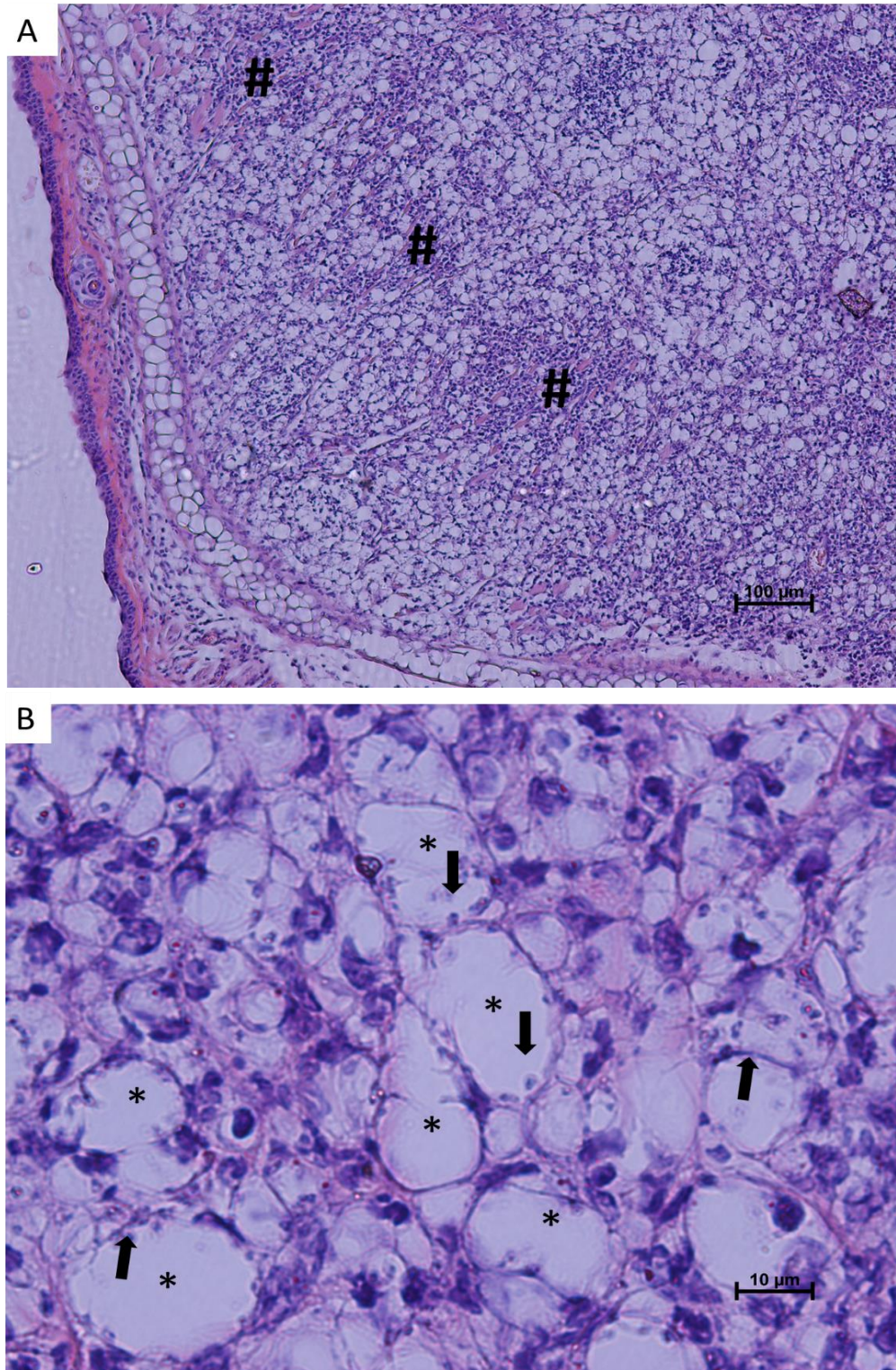


Figura 16 – Cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com PBS. A – Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* no pavilhão auricular e tratados de formas sistêmica (i.p.) durante 7 semanas, apresentam infiltrado inflamatório mononuclear e com presença de grandes vacúolos parasitóforos. B- Detalhe. # - infiltrado inflamatório mononuclear. * - vacúolo parasitóforo. Setas – parasito.

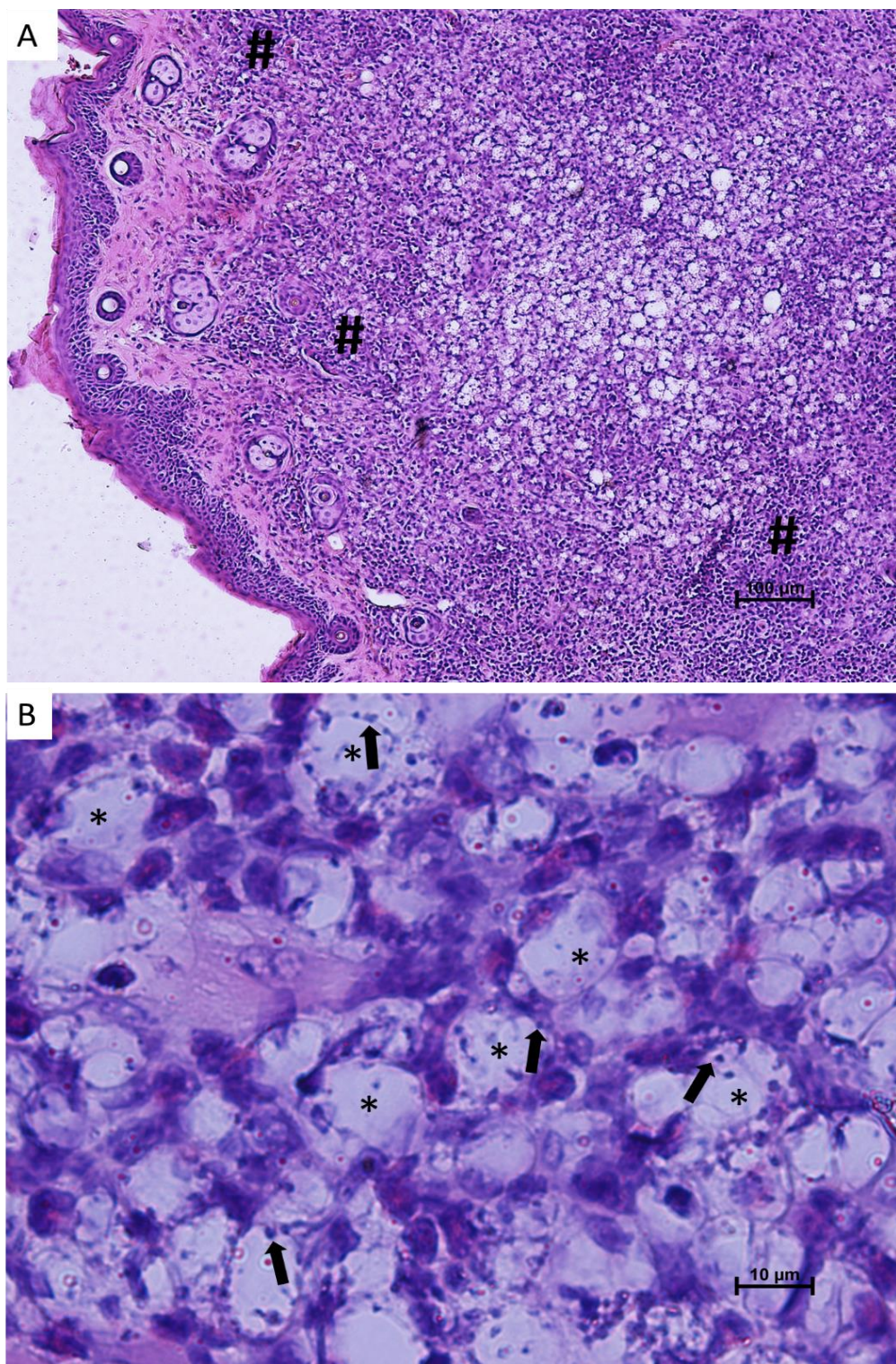


Figura 17 – Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com isotipo C44. A – Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* no pavilhão auricular e tratados de formas sistêmica (i.p.) durante 7 semanas, apresentam infiltrado inflamatório mononuclear e com presença de grandes vacúolos parasitóforos. B- Detalhe. # - infiltrado inflamatório mononuclear. * - vacúolo parasitóforo. Setas – parasito.

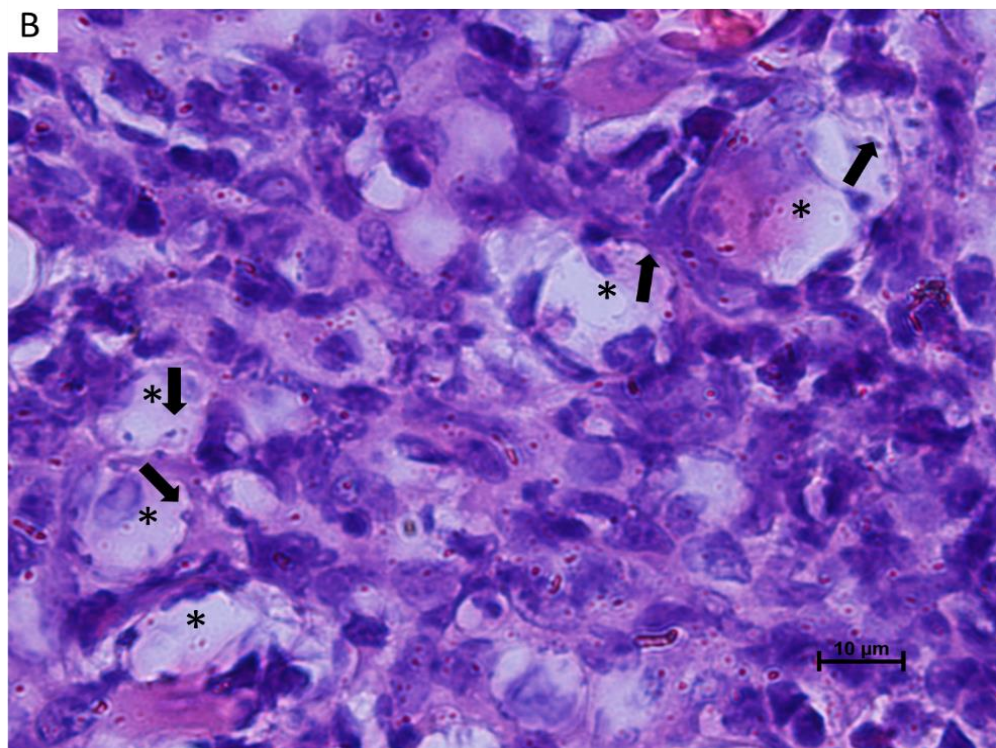
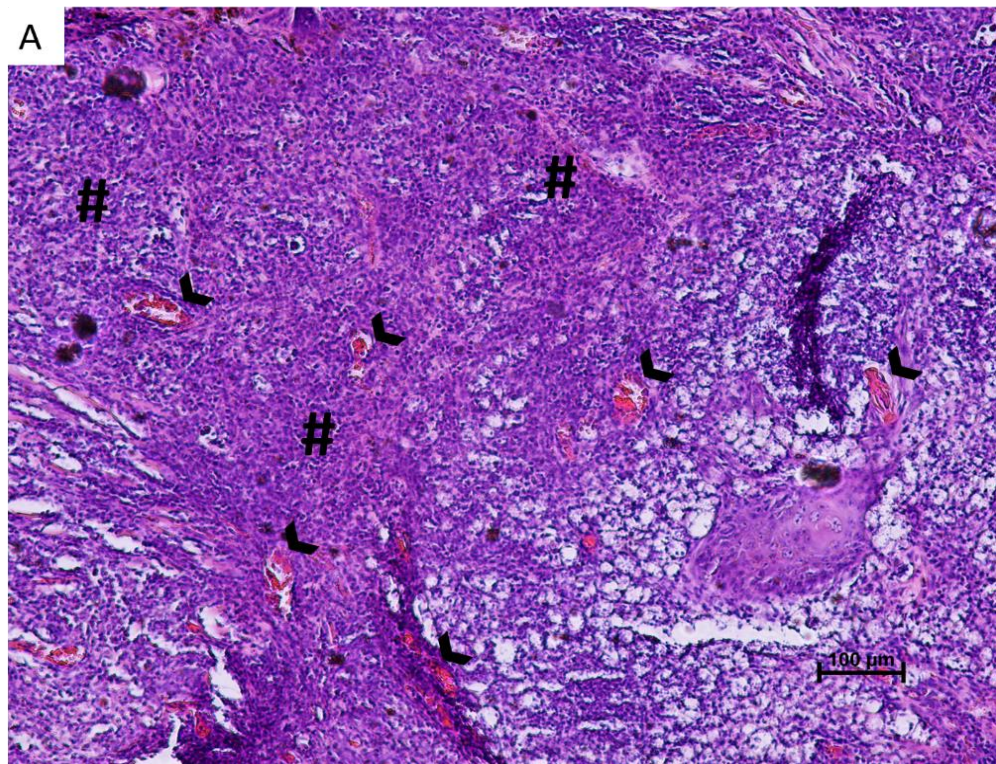


Figura 18 – Cortes histológicos das orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 11:31. A – Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* no pavilhão auricular e tratados de formas sistêmica (i.p.) durante 7 semanas, apresentam infiltrado inflamatório mononuclear, com redução no tamanho dos vacúolos parasitóforos, aumento de necrose e hiperemia. B- Detalhe. # - infiltrado inflamatório mononuclear. * – vacúolo parasitóforo. Setas – parasito. Cabeça de seta – vasos sanguíneos.

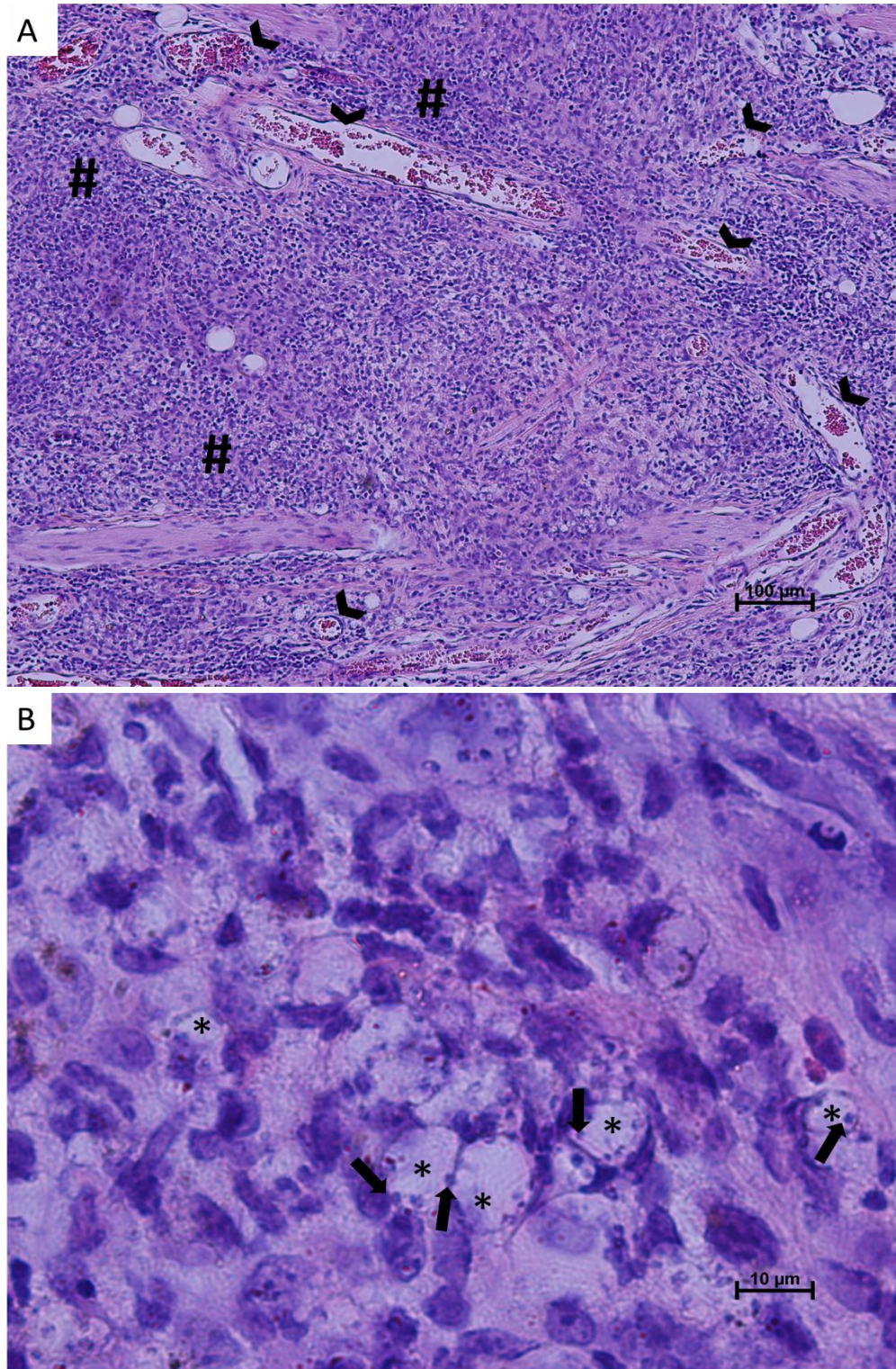


Figura 19 – Cortes histológicas das orelhas de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 11:31 Fab. A – Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* no pavilhão auricular e tratados de formas sistêmica (i.p.) durante 7 semanas. Apresentam infiltrado inflamatório mononuclear, com redução no tamanho dos vacúolos parasitóforos, aumento de necrose, hiperemia e matriz extracelular. B- Detalhe. # – infiltrado inflamatório mononuclear. Cabeça de seta – vasos sanguíneos. * – vacúolo parasitóforo. Setas – parasito.

Embora a diferença no tamanho dos vacúolos parasitóforos seja percebida nas análises morfológicas, a área dos vacúolos parasitóforos foi morfometricamente determinada através do programa ImageJ, com a medida de 200 vacúolos parasitóforos contendo amastigotas. O uso do anticorpo 11:31 e 11:31 Fab resultou na diminuição na área dos vacúolos parasitóforos nos macrófagos quando comparados com o grupo que recebeu apenas PBS e o anticorpo isotipo, de maneira significativa. Porém entre os tratamentos, o anticorpo 11:31 Fab reduziu o tamanho dos vacúolos parasitóforos de maneira significativa até mesmo quando comparado com o tratamento 11:31, se mostrando mais eficiente (figura 20).

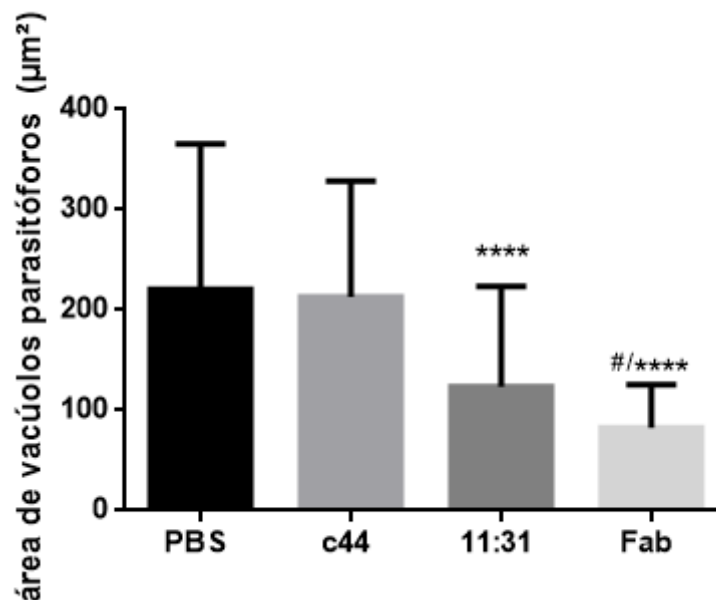


Figura 20 - Quantificação morfométrica da área dos vacúolos parasitóforos em lesões de camundongos. Tamanho de vacúolos parasitóforos das lesões de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* tratados com PBS, anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44). **** $p < 0,0001$ comparado ao PBS; # $p < 0,05$ comparado ao 11:31.

6.5 - ALTERAÇÕES NA RESPOSTA IMUNE IN VIVO NO TRATAMENTO COM ANTICORPOS ANTI-PS

Com o intuito de avaliar alterações provocadas pelos anticorpos anti-PS na resposta imune dos camundongos C57BL/6 contra infecção de *L. amazonensis*, avaliamos as populações das células nos linfonodos cervicais (LFC) e o direcionamento da resposta imune, através da identificação do padrão de citocinas produzidas pelas células de linfonodos, ativadas com LSA e mantidas em culturas.

6.5.1 - Análise das populações celulares dos linfonodos cervicais

A celularidade nos linfonodos drenantes de um sítio lesionado é um indicativo da ativação da resposta imune tecidual. Dessa forma, realizamos a análise morfológica das células dos LFCs através de citometria de fluxo, onde foram discriminadas as diferentes populações celulares através do perfil observado pelos parâmetros FSC e SSC. As populações foram diferenciadas em células polimorfonucleares (PMN), monocíticas e linfocíticas (figura 21).

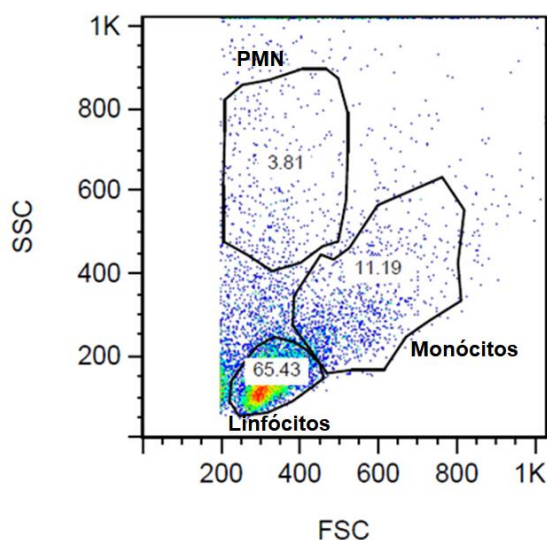


Figura 21 - Estratégia de gate para distinguir entre populações de células dos linfonodos cervicais. Análise da população de células dos linfonodos de camundongos infectados com *L. amazonensis*, por citometria de fluxo e o perfil FSC e SSC utilizado para distinguir células monocíticas, linfocíticas e granulocíticas (PMN). FSC - (*Forward Scatter*) tamanho. SSC - (*Side Scatter*) granulosidade

As análises das populações celulares apresentaram alterações nas proporções das células dos LFC após os tratamentos com os anticorpos anti-PS. As

populações de linfócitos foram reduzidas nos LFCs de camundongos tratados com os anticorpos anti-PS, em relação aos camundongos tratados com PBS. Porém apenas nos camundongos tratados com o anticorpo 11:31 foi notada diferenças estatísticas (figura 22 A). Os tratamentos com os anticorpos anti-PS foram capazes de estimular o aumento da população granulocítica, quando comparado aos tratados com PBS, sendo identificado apenas nos camundongos tratados com 11:31 a diferença estatística (figura 22 B). As populações de macrófagos não apresentaram alterações nos camundongos tratados com o anticorpo em relação aos tratados com PBS (figura 22 C).

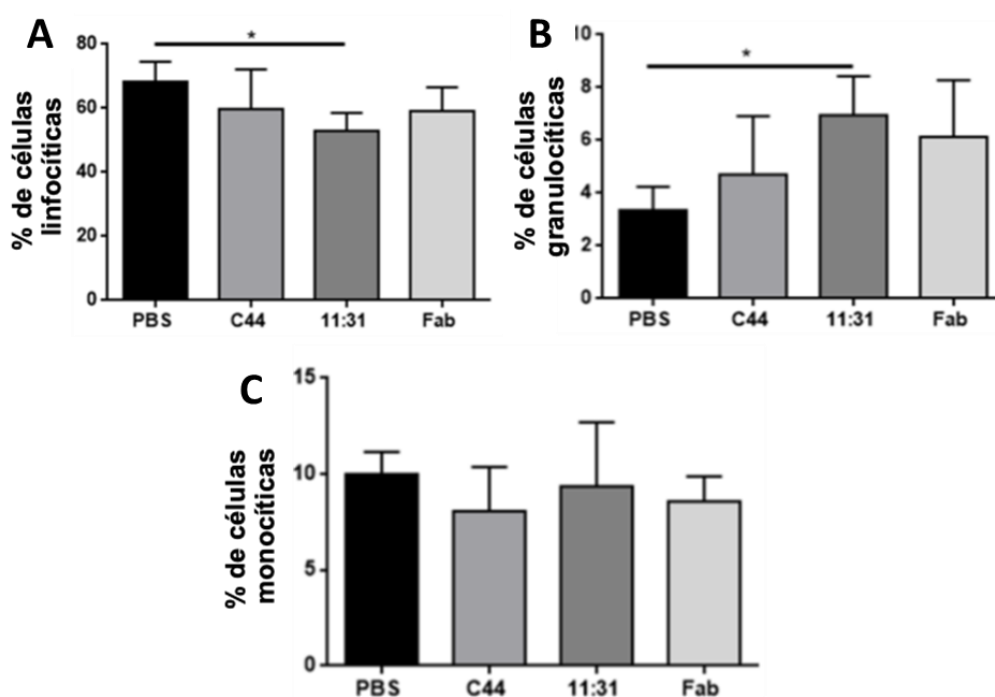


Figura 22 - Análise morfológica das células de linfonodos cervicais de camundongos infectados e tratados com anticorpos anti-PS. Porcentagem de células derivadas de linfonodos cervicais de camundongos C57BL/6 infectados na orelha com *L. amazonensis* e tratados i.p. durante 7 semanas com 100 µg de anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44), 2 vezes na semana. (A)% de linfócitos. (B)% de granulocíticas (PMN). (C)% de monócitos. * P <0,05.

Determinados a quantidade de células absolutas nos LFCs dos camundongos após os tratamentos com o anticorpo anti-PS, foi identificado que os tratamentos os camundongos aumentaram as populações celulares de linfócitos, monócitos e PMN de maneira similar com o uso dos dois anticorpos anti-PS (figura 23).

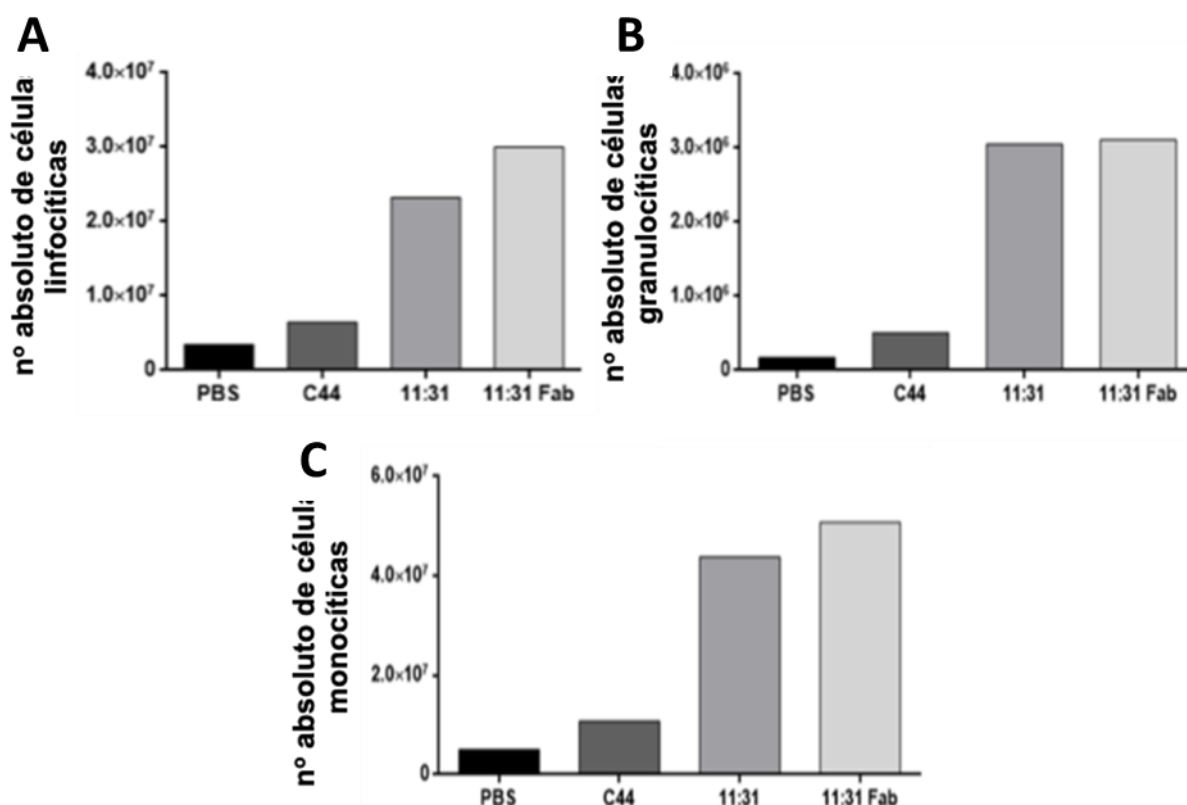


Figura 23 - Quantidades absolutas de células derivadas de linfonodos cervicais de camundongos infectados e tratados com anticorpos anti-PS. Quantidade absolutas de células derivadas de linfonodos cervicais de camundongos C57BL/6 infectados na orelha com *L. amazonensis* e tratados i.p. durante 7 semanas com 200 µg/mL de anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44), 2 vezes na semana. (A) células linfocíticas, (B) células granulocíticas (PMN), (C) células monocíticas.

6.5.2 - Análise do perfil imunológico das células derivadas dos linfonodos cervicais

Para analisar se anticorpos anti-PS são capazes de modular a resposta inflamatória na infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6, foram analisadas citocinas produzidas pelas células derivadas dos LFCs.

As células foram extraídas dos LFCs e mantidas em DMEM com presença ou não de antígenos de leishmania (LSA) por 5 dias, em triplicatas, os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a dosagem da quimiocina MCP-1 e as citocinas IL12p-70, TNFα, TGFβ MCP-1, IFNγ, IL-10 e IL-6 pelo kit CBA-BD (*cytokine bead array*). Para a dosagem dos mediadores imunológicos as amostras foram agrupadas para as análises. Os sobrenadantes das células não ativadas de cada grupo de

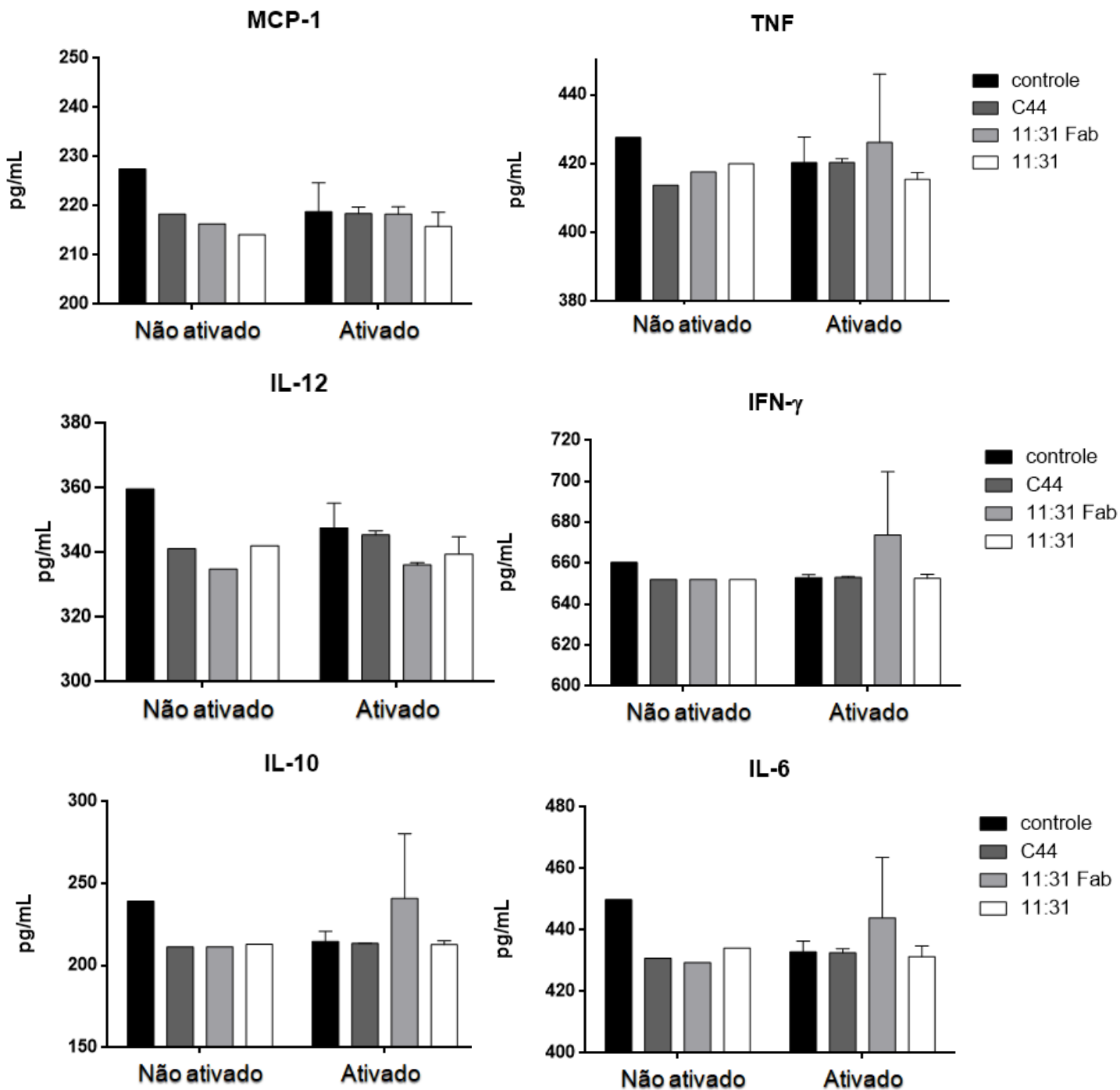
tratamento foram agrupados em uma amostra e os sobrenadantes das células ativadas foram agrupadas em duas amostras respectivo ao grupo do tratamento.

Foram observadas pequenas alterações na produção de mediadores imunológicos entre os grupos que receberam os tratamentos com anticorpos anti-PS, em comparação com o grupo que recebeu PBS. A produção da quimiocina MCP-1 e citocinas TNF α , IFN γ , IL12p-70, IL-10 e IL-6 por células não ativadas, apresentaram uma pequena redução na produção, em células derivadas de camundongos que receberam os tratamentos dos anticorpos anti-PS, quando comparados com os tratados com PBS, porém sem diferenças estatísticas.

Nas células mantidas em meio com LSA, apenas as células derivadas dos camundongos tratados com o anticorpo 11:31 Fab apresentaram alterações quando comparadas com as células derivadas dos camundongos controle (PBS). Nota-se o aumento de TNF α , IFN γ , IL-10 e IL-6 e diminuição na produção de IL-12. Mesmo não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos, quando avaliamos separadamente as amostras, uma amostra do grupo 11:31 Fab destaca-se com alterações relativas às outras amostras na produção de TNF α , IFN γ , IL-10 e IL-6 e com alterações significativas na produção de IFN γ , com $p < 0,001$ e na produção de IL-1, com $p < 0,001$ (tabela 4).

Não foram encontradas diferenças estatísticas nas produções dos mediadores imunológicos, quando comparamos células não ativadas com as ativadas com LSA (figura 24).

Figura 24 - Produção *ex vivo* de mediadores imunológicos. Células derivadas de linfonodos cervicais de camundongos C57BL/6 infectados com *L.*



amazonensis e tratados i.p. com anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44), foram mantidas em culturas com meio + LSA (ativado) ou apenas meio (não ativado). Os sobrenadantes das culturas foram retirados após 5 dias e utilizados para determinação de MCP-1, IL-12p70, TNF α , IFN γ , IL-10 e IL-6, através de citometria de fluxo com o kit CBA-BD. LSA - antígeno de leishmania.

**Tabela 4 - Concentração dos mediadores imunológicos das células
ativadas (pg/mL)**

	Il-12p70	TNF	IFN- γ	MCP-1	IL-10	IL-6
Controle	353,06	415,19	652,02	214,64	210,56	430,38
Controle	342,15	425,56	654,05	222,95	219,11	435,38
C44	344,58	421,11	652,83	217,53	213,47	431,73
C44	346,39	419,63	653,47	219,39	213,65	433,56
11:31 Fab	335,79	412,22	652,02	217,36	213,11	430,00
11:31 Fab	336,70	440,19	695,72 **	219,39	268,93 ***	457,88
11:31	343,36	416,85	654,05	217,86	214,38	433,85
11:31	335,79	414,07	651,27	213,80	211,29	428,94

Amostras individuais das produções de mediadores imunológicos pelas células dos linfonodos cervicais de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com anticorpo completo anti-fosfatidilserina (11:31), porção Fab purificada (11:31 Fab) e o anticorpo isotipo (C44). Destaque na amostra de 11:31 Fab que apresentou alterações significativas comparadas às outras amostras. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

7 - DISCUSSÃO

Diversos parasitos intracelulares como *Toxoplasma gondii* e *Leishmania* spp. e algumas células tumorais expõem PS na superfície da membrana plasmática. Este fosfolipídio funciona como fator de patogenicidade participando do processo de estabelecimento da infecção no organismo. Coletivamente, o mecanismo no qual PS participa no estabelecimento da infecção é chamado de mimetismo apoptótico, pois é similar ao processo de reconhecimento e endocitose de células apoptóticas e seus corpos apoptóticos por células eucarióticas. No início do processo de morte programada por apoptose, as células expõem PS na sua membrana externa como um dos sinais de “eat-me”. Estes sinais são essenciais para que células fagocíticas reconheçam e eliminem células apoptóticas sem ocasionar inflamação e dano às células viáveis próximas (BIRGE *et al.*, 2016). Visto que PS é uma importante molécula para o estabelecimento de diversos tipos de tumores, infecções virais, bacterianas e parasitárias, é importante determinar a influência do bloqueio de PS no desenvolvimento de doença e de possíveis novas estratégias terapêuticas.

Os primeiros trabalhos que avaliaram o bloqueio de PS em modelos de infecção utilizaram a ANX e o bloqueio foi capaz reprogramar a resposta imunológica, ativando-a e tornando-a capaz de inibir o crescimento tumoral (HUANG; BENNETT; THORPE, 2005), extinguir infecções virais (SOARES; KING; THORPE, 2008) e diminuir a taxa de infecção por *Leishmania* (DE FREITAS BALANCO, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006; WANDERLEY; BARCINSKI, 2010). Atualmente são produzidos anticorpos monoclonais anti-PS para realizar o bloqueio de PS nas células tumorais (HUANG; BENNETT; THORPE, 2005). O primeiro anticorpo produzido foi o 3G4. O Bavituximab é a versão quimérica de 3G4 e demonstrou ser capaz de reativar a resposta imunológica contra tumores (YIN *et al.*, 2013) e vírus (SOARES; KING; THORPE, 2008), controlando o crescimento tumoral e desenvolvendo uma resposta imunológica eficiente contra os vírus. Tem sido usado como monoterapia ou em terapias combinadas com outros agentes quimioterapêuticos para o tratamento de tumores no pulmão, mama e outros.

O uso de anticorpos na infecção por *Leishmania amazonensis* foi avaliado através do anticorpo mch1N11 por Wanderley *et al.* (2013). Foi possível perceber uma redução da quantidade de parasitos na lesão, porém de forma heterogênea e insuficiente para impedir a progressão da infecção (WANDERLEY *et al.*, 2013).

Dessa forma, utilizamos uma nova geração de anticorpos anti-PS, derivados do clone 11:31 e denominados PGN632, tanto na forma completa quanto a porção Fab purificada, que realiza interação específica com PS, independente de β 2-GPI (MOODY *et al.*, 2010).

No presente trabalho, foi demonstrado que o uso do anticorpo completo (11:31) e porção Fab purificada (Fab) foi capaz de induzir uma redução na carga parasitária de maneira similar e dose dependente, em infecções *in vitro* de 2 horas (figura 9). A redução da carga parasitária em duas horas está relacionada com a capacidade do anticorpo em se ligar a PS e inibir a internalização do parasito. Devido a relação dose dependente não ter atingido o platô, outras concentrações devem ser testadas para conseguir identificar o IC₅₀ do anticorpo. Porém a concentração máxima utilizada nos experimentos de 5 μ g/mL bloquearam a internalização do parasito de maneira bastante similar a ANX. A inibição observada está de acordo com o modelo descrito para a infecção de macrófagos por amastigotas de *L. amazonensis* de modo dependente de PS. Este modelo foi denominado, em células apoptóticas de eferocitose (KUMAR; CALIANESE; BIRGE, 2017) e depende de um ligante que promova adesão entre a célula fagocítica e a célula alvo, que no caso de amastigotas normalmente são anticorpos anti-amastigotas (WANDERLEY *et al.*, 2006); e de um ligante que promova ativação do citoesqueleto e macropinocitose, normalmente PS (HOFFMANN *et al.*, 2001; WANDERLEY *et al.*, 2006).

No entanto, por não termos observado diferenças entre o tratamento com o anticorpo completo e a porção Fab purificada, podemos deduzir que a porção Fc do anticorpo 11:31 não é capaz de induzir a opsonização e internalização do parasito via Fc γ Rs (*Fc gamma receptors*). Os receptores Fc γ R são importantes mediadores da resposta imune celular e humoral e são capazes de reconhecer a porção Fc dos anticorpos IgG. São responsáveis por diversos mecanismos imunes para a eliminação de antígenos como a fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC: *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), geração de espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas lisossomais, eliminação de imunocomplexos e regulação da produção de anticorpos. Sua atividade funcional é determinada pelo tipo celular, tipo do Fc γ R e a classe da IgG. Considerando que o anticorpo utilizado foi uma IgG2 e as células utilizadas no experimentos eram

macrófagos, os principais FcγRs relacionados com a participação do reconhecimento do anticorpo são os FcγRIIIa- R131 e FcγRIIIa- H131, ambos induzem a fagocitose, ADCC, endocitose, internalização, produção de ROS e TNF-α e inibem a produção IL-4. No entanto, consultando trabalhos anteriores que relataram a importância da interação de anticorpos para opsonização do parasito e fagocitose via FcγRs em macrófagos (PETERS *et al.*, 1995; GUY; REBECCA; BELOSEVIC, 1993), observamos que é relatado que a IgG2 reconhecida por FcγRI não é utilizada para a entrada de amastigotas (GUY; REBECCA; BELOSEVIC, 1993), podendo esse ser um dos motivos do anticorpo 11:31 não ter induzido maior fagocitose da amastigota, em comparação com a porção Fab.

Em infecções de macrófagos por 48 horas encontramos diferenças na carga parasitária nos distintos tipos de tratamento. O 11:31, inibiu a infecção de forma dose dependente, padrão não encontrado nas infecções bloqueadas com 11:31 Fab. O controle da carga parasitária observada no tratamento com o 11:31 após 48 horas de infecção, pode ser devido ao reconhecimento da porção Fc do anticorpo pelos receptores FcRγs e a estimulação da produção de TNF-α, que é uma molécula que ativa o macrófago para a eliminação do parasito (LIEW *et al.*, 1990), mesmo não ocorrendo intensificação na produção de NO (figura 14) a maior concentração do anticorpo 11:31 foi capaz de reduzir a carga parasitária de maneira significativa quando comparado com as infecções sem tratamento.

Nas infecções *in vitro*, tratadas com o anticorpo 11:31 Fab não observamos redução significativa na carga parasitária após 48 horas de infecção (figura 11), porém a porcentagem de macrófagos infectados teve a tendência de reduzir de maneira dose dependente (figura 12). Estes resultados podem estar relacionados com o restabelecimento da atividade microbicida do macrófago. Sabe-se que um dos papéis fundamentais da exposição de PS na infecção de *Leishmania* é supressão da resposta imune, com a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10, TGF-β e PGE₂, ativação da arginase-1 e inibição da iNOS, o que possibilita a sobrevivência e disseminação do parasito dentro dos macrófagos.

O bloqueio de PS nas amastigotas em infecções de macrófagos de camundongos BALB/c restaura a atividade microbicida do macrófago e reduz a carga parasitária (WANDERLEY *et al.*, 2006; WANDERLEY *et al.*, 2019, [submetido, anexo 1]). Porém, não encontramos esse padrão em infecções de macrófagos de

camundongos C57BL/6, já que o bloqueio de PS com os anticorpos não intensificou a produção de NO (figura 14), indicando que o anticorpo não é capaz de estimular a produção de NO do macrófago através do bloqueio de PS. Devido a porção Fab não induzir fagocitose pelo receptor de FcyR nem a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , os parasitos que conseguiram entrar por outras vias de endocitose, como a opsonização por anticorpos oriundos da lesão ou via complemento (GUY; BELOSEVIC, 1993) conseguem sobreviver e proliferar dentro dos macrófagos.

Interessantemente, macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 quando ativados e infectados com *L. amazonensis* são capazes de responder e controlar a infecção, devido a produção de citocinas inflamatórias como IL-1 β e a consequente estimulação de NO. A produção de IL-1 β nesse caso está relacionada com a ativação do inflamassoma associado a Nlrp3, que é ativado pela infecção por *L. amazonensis* (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2013). Considerando que as amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS (figura 10) e os macrófagos obtidos de camundongos C57BL/6 ainda assim produziram NO, mais estudos devem ser realizados para determinar a relação de PS e as infecções de macrófagos desta linhagem, principalmente no que diz respeito à relação entre a inibição da via o reconhecimento de PS e a ativação da produção de citocinas via inflamassomas.

Em nossos experimentos foram utilizados macrófagos derivados de medula óssea de C57BL/6 e o uso dos anticorpo anti-PS não foi capaz de aumentar a produção de NO (figura 14), porém como não está claro como a PS exposta pela amastigota participa na infecção dessa linhagem de macrófagos, não podemos confirmar que os anticorpos falharam ao modular a resposta macrofágica. Mais experimentos devem ser realizados para confirmar a importância de PS na infecção desse modelo celular e a capacidade dos anticorpos em modular a resposta macrofágica. Além disso, este foi o primeiro trabalho utilizando os anticorpos da versão PGN632 para observar o bloqueio de PS na superfície de amastigotas de *L. amazonensis*. Wanderley *et al.* (2013) utilizaram o anticorpo mch1N11, o qual tinha estrutura diferente e dependência de β 2-GPI para a ligação à PS. Dessa forma, alguns parâmetros ainda precisam ser estabelecidos como a ligação do anticorpo com PS na superfície de formas amastigotas, ensaios de competição com ANX e

com mch1N11 e análise da capacidade do anticorpo bloquear a sinalização via reconhecimento de PS.

Outra consideração a ser feita é sobre a eficiência da porção Fab no bloqueio do reconhecimento de PS. A porção Fab dos anticorpos é formada pela cadeia leve completa, ligada a porção variável (Fv) e um fragmento constante (Fc) da cadeia pesada (figura 25). Este fragmento tem vantagens do ponto de vista terapêutico como maior penetrância nos tecidos, maior facilidade de excreção e ausência de ativação de FcγR (CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2016). No entanto, este fragmento pode apresentar especificidade e afinidade menor ou diferente do anticorpo completo (CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2016). Alternativas a isso podem ser o fragmento Fab', que consiste no fragmento Fab, mas com a ligação das duas subunidades por uma ponte dissulfeto (figura 25). Além disso, é possível obter também o fragmento F(ab')₂. Este fragmento consiste em um anticorpo completo sem as porções constantes (Fc) da cadeia pesada (figura 25). Ou seja, nesse caso, é incomum a perda de especificidade e afinidade (CRIVIANU-GAITA, THOMPSON, 2016), já que todas as porções do anticorpo original, envolvidas com o reconhecimento do antígeno são mantidas. Todos estes fragmentos podem ser obtidos através de clivagem enzimática do anticorpo inteiro.

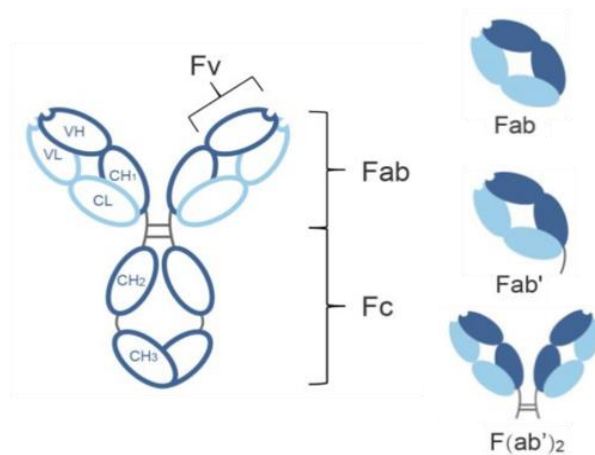


Figura 25 - Fragmentos de anticorpos obtidos por clivagem enzimática e utilizados terapêuticamente. Anticorpos são proteínas formadas por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias pesadas (*heavy chain* - H) e duas cadeias leves (*light chain* - L). Cada uma dessas cadeias é formada por porções constantes (C) e variáveis (V). O fragmento Fab é composto pela cadeia leve (VL+CL) e por duas porções da cadeia pesada (VH e CH). O fragmento Fab' tem a mesma composição, no entanto as duas subunidades são conectadas por pontes dissulfeto. O fragmento F(ab')₂ é formado pelo anticorpo completo sem as duas porções constantes terminais da cadeia pesada (CH2 e CH3).

Camundongos infectados e tratados sistemicamente (i.p.) com os anticorpos anti-PS apresentaram intensificação nos sinais inflamatórios quando comparados aos controles como aumento da lesão, eritema e necrose (figura 15). Nas análises histológicas foi possível verificar o aumento do infiltrado inflamatório PMN, aumento de células em necrose e aumento da quantidade de vasos sanguíneos (figuras 16 a 19), corroborando os sinais morfológicos que os anticorpos intensificaram a resposta inflamatória no local na lesão. Vale ressaltar que é necessário confirmação das populações celulares quantificadas morfolologicamente, tanto por imunohistoquímica quanto por citometria de fluxo.

Ambos os tratamentos induziram aumento nos sinais inflamatórios, porém as orelhas tratadas com o anticorpo anti-PS completo (figura 18) apresentaram infiltrado inflamatório mais denso e maior quantidade de células em necrose do que as orelhas dos camundongos tratados com a porção Fab (figura 19). Estes resultados corroboram o trabalho de De Freitas Balanco *et al.* (2001) sobre a importância de PS não apenas na internalização do parasito, mas também na inibição da atividade inflamatória de macrófagos. A resposta inflamatória pode também ter sido estimulada devido o anticorpo utilizado ser da classe IgG, pois estes são capazes de aumentar o infiltrado inflamatório de monócitos e macrófagos no local da lesão devido o reconhecimento da porção Fc do anticorpo pelos receptores Fcγ (RAN *et al.*, 2005).

O anticorpo 11:31 Fab não é capaz de ativar mecanismos inflamatórios induzidos por FcγRs e o complemento (KOCHI; JOHNSON; DALMASSO, 1993). No entanto, em nossos resultados, foi observado o aumento do infiltrado inflamatório nas lesões dos camundongos tratados com a porção Fab do anticorpo, contradizendo alguns trabalhos anteriores que relatam que o uso da porção Fab de anticorpo é capaz de inibir a resposta inflamatória local (YOSHINO; MIZUTANI, 2016). Camundongos geneticamente modificados com ausência da cadeia gama de FcγRs, infectados com *L. amazonensis* apresentaram redução no tamanho da lesão e na população de macrófagos no local da infecção quando comparados aos controles (KIMA *et al.*, 2000). De forma semelhante, camundongos geneticamente modificados com a ausência de FcγRs e infectados com *L. major* apresentaram tamanho de lesão menor e a carga parasitária menor do que o camundongo controle (PADIGEL; FARRELL, 2005). Isso sugere que a indução de resposta inflamatória

observada *in vivo* pode estar diretamente relacionada ao bloqueio de PS e não a modulação da atividade de FcγRs. Estes resultados abrem novos questionamentos, como se a porção Fab do anticorpo anti-PS fosse capaz de ativar a resposta imunológica no local da lesão, através da ativação do macrófago por outras moléculas expressas pelo parasito. Análises no local da lesão como dosagem da expressão de citocinas, imunofenotipagem e até mesmo a avaliação da carga parasitária devem ser realizadas para melhor esclarecermos os resultados promissores encontrados.

Os VPs formados na infecção por *L. amazonensis* são amplos contendo, muitas vezes, vários parasitos (figura 2). Porém seu tamanho é mantido mesmo quando tem poucas amastigotas, e podem ser visualizados em macrófagos já nas horas iniciais pós-infecção. São semelhantes aos macropinosomas, que são as estruturas formadas após a macropinocitose. Ramos (2014) demonstrou que a internalização da *L. amazonensis* ocorre através da fagocitose, no entanto pode também acontecer através de receptores de macropinocitose, reforçando o trabalho de Wanderley (2006) onde foi observado que o reconhecimento da PS das formas amastigotas induz a internalização através de processos macropinocíticos (DE CARVALHO; BARRIAS; DE SOUZA, 2015).

Em nosso trabalho, anticorpos anti-PS foram capazes de alterar o tamanho dos VPs nas lesões dos camundongos infectados com *L. amazonensis* (figura 20), demonstrando que o bloqueio de PS induz a internalização do parasito por outra via endocítica que não a macropinocitose. O tamanho aumentado do VP das amastigotas da espécie *L. amazonensis*, assim como das outras espécies do complexo mexicana é importante para a infecção. De acordo com Wilson *et al.* (2008) essa característica está associada a nutrição do parasito, já que o aumento do tamanho do VP ocorre através da fusão de vesículas endocíticas do macrófago, levando a disponibilização de nutrientes externos para o parasito. Além disso, o tamanho aumentado do VP possibilita a diluição das substâncias tóxicas produzidas pelo macrófago, como ROS e NO, possibilitando a sobrevivência das amastigotas (SACKS; SHER, 2002). Dessa forma, nossos dados sugerem haver uma correlação entre a modulação do tamanho do VP e as alterações inflamatórias observadas na lesão (WANDERLEY, 2019, [submetido, anexo 1])

A resistência e suscetibilidade à infecção por leishmania em camundongos estão relacionadas ao tipo de resposta inflamatória desenvolvida no momento da infecção e o direcionamento da resposta de linfócitos T. O IFN- γ está relacionada com a resposta Th1 e a resistência à infecção, enquanto que IL-4 e IL-10 estão relacionadas com a resposta Th2 e com a suscetibilidade à infecção. Camundongos resistentes são caracterizados pela alta produção de IFN- γ e baixa quantidade de IL-4, enquanto que camundongos suscetíveis se comportam de forma contrária. Em modelos experimentais, este paradigma é particularmente correto na infecção por *L. major*. Porém em modelos de infecção por *L. amazonensis*, os camundongos desenvolvem uma resposta inflamatória heterogênea e não polarizada (AFONSO; SCOTT, 1993; DE SOUZA *et al*, 2000; JI; SUN; SOONG, 2002).

As citocinas desempenham papéis determinantes no perfil de resistência ou suscetibilidade a infecções, pois são responsáveis pela diferenciação e propagação das células do sistema imune contra o patógeno. Dessa forma, obtivemos células de linfonodos dos camundongos infectados e tratados com anticorpos anti-PS, reestimulamos as células *in vitro* e quantificamos algumas citocinas importantes para a resposta inflamatória e adaptativa. As células de linfonodo de camundongos tratados com a porção Fab do anticorpo apresentaram alterações na produção de algumas citocinas, como uma singela tendência no aumento na produção de TNF, IFN- γ , IL-10 e IL-6 e uma pequena tendência redução na produção de IL-12 (figura 24). Uma amostra específica deste grupo de animais apresentou diferenças significativas no aumento da produção de IFN- γ e IL-10 (tabela 4).

Em infecções com *L. brasiliensis* a intensificação da produção de IFN- γ e TNF- α está relacionada o aumento da lesão tecidual e o desenvolvimento de lesões progressivas, porém sua produção é importante para o controle do parasito (ANTONELLI *et al*, 2005; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). A IL-12 possui papel semelhante ao IFN- γ no controle do parasito, pois é uma citocina essencial para a diferenciação de células Th1 na leishmaniose. Ao contrário, a produção de IL-6 está relacionada com a suscetibilidade da infecção com *L. amazonensis*. A IL-10 por sua vez, possui papéis divergentes na infecção, pois é responsável por suprimir a resposta imune celular e a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , e permitir à persistência do parasito no local da infecção. Porém, é responsável também por inibir uma imunopatologia exagerada, como graves danos teciduais

após o aumento da produção de citocinas inflamatórias e desempenha um papel central na regulação do remodelamento tecidual durante a cicatrização das lesões (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). A MCP-1 é uma quimiocina importante na imunidade precoce em infecções cutâneas, sendo responsável pelo recrutamento de macrófagos, monócitos e células NK, em conjunto com IFN- γ é capaz de ativar macrófagos para eliminarem os parasitos (OGHUMU *et al*, 2010).

Assim como observado em outros trabalhos, o perfil geral de produção de citocinas das células de linfonodo de animais infectados com *L. amazonensis* não foi alterado significativamente (JI; SUN; SOONG 2002; WANDERLEY *et al.*, 2013). No entanto, as alterações encontradas nos grupos de camundongos tratados com a porção Fab sugerem que essa porção é capaz de modular a resposta inflamatória. As duas principais alterações observadas estão relacionadas com as citocinas IFN- γ e IL-10, que são citocinas que estão relacionadas com o desenvolvimento da lesão. Em conjunto com os resultados da histologia e da análise morfológica, podemos sugerir que a porção Fab do anticorpo é capaz de alterar a resposta inflamatória na lesão. Contudo, mais experimentos devem ser realizados para identificar o padrão da alteração e a relação com tamanho da lesão e carga parasitária, para podermos confirmar se a alteração na resposta inflamatória está relacionada com o controle da infecção.

Nos órgãos linfóides secundários acontece o direcionamento da resposta imunológicas contra patógenos, pois são neles que ocorre a interação entre sistema imune inato e o adaptativo. Células dendríticas e macrófagos são as principais células relacionadas com o transporte de antígeno do local da infecção para os linfonodos. Na infecção por *L. amazonensis*, ocorre a inibição da migração de células dendríticas do sítio da lesão para o linfonodo, como forma de escape da resposta adaptativa (HERMIDA *et al*, 2014). No entanto a blastogênese, que é uma das formas de medição da ativação linfocitária é mantida de forma relativamente normal nos primeiros meses de infecção (PÉREZ; BOLIVAR, 1985). Isso significa que ocorre ativação de linfócitos e geração de células diferenciadas para atuar no sítio lesionado. Isso pode ser visualizado na histopatologia mostrada nas figuras 16 e 17, com a presença de infiltrado inflamatório mononuclear, assim como a intensificação da resposta com tratamento com os anticorpos anti-PS, mostrada nas figuras 18 e 19. Além disso, observamos também um aumento do número total de

células linfocíticas, monocíticas e granulocíticas nos linfonodos cervicais, drenantes do sítio de infecção, nos camundongos tratados com anticorpos anti-PS, tanto completos quanto a porção Fab (figura 23). Isto indica que a resposta sistêmica está sendo estimulada, já que linfocitose, monocitose e neutrofilia são esperadas durante a infecção por *L. amazonensis* e a intensidade dessas alterações leucocitárias é diretamente proporcional à resposta contra a infecção (DE OLIVEIRA CARDOSO *et al* 2010). Além disso, observamos que percentualmente, o número relativo de células linfocíticas diminuiu nos mesmos linfonodos dos camundongos tratados, indicando que o tratamento está aumentando a migração destas células para o sítio de infecção (figura 22A). Podemos observar o efeito contrário na população de células granulocíticas (figura 22b). Este resultado reflete o aumento do número total dessa população celular nos linfonodos drenantes dos animais tratados com anticorpos anti-PS, já que os neutrófilos e outros PMNs não são preferencialmente atraídos para a lesão causada por *L. amazonensis*, pelo contrário, estas células tendem a diminuir quantitativamente, devido ao bloqueio da atividade inflamatória exercido pelo parasito (POMPEU *et al.*, 1990).

8 - CONCLUSÕES

- Os anticorpos anti-PS PGN632 são capazes de inibir parcialmente a internalização de amastigotas de *L. amazonensis in vitro*;
- O anticorpo completo foi capaz de controlar a multiplicação intracelular do parasito, em infecções de 48h;
- O bloqueio de PS com os anticorpos PGN 632, não foi capaz de modular a produção NO, nas infecções de macrófagos de camundongos C57BL/6;
- Os anticorpos anti-PS foram capazes de modular a resposta imune local da lesão e de forma sistêmica dos camundongos infectados, pois foi responsável pelo aparente aumento da lesão, do infiltrado inflamatório de células granulocíticas, da ocorrência de morte por necrose e por hiperemia, sustentando a inflamatória aguda, mesmo depois de 7 semanas de infecção.
- Nos linfonodos cervicais, o tratamento com anticorpos anti-PS expandiu a população celular de linfócitos, monócitos e granulócitos e o anticorpo completo reduziu a porcentagem de linfócitos e aumentou a porcentagem de granulócitos.



CD4⁺ T Cell-Dependent Macrophage Activation Modulates Sustained PS Exposure on Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*

OPEN ACCESS

Edited by:

Claudia Ida Brodskyn,
Gongalo Moniz Instituto (IGM), Brazil

Reviewed by:

Veronica Jilmanaz,
California State University, Fullerton,
United States
Fabiano Oliveira,
National Institute of Allergy and
Infectious Diseases (NIH),
United States

*Correspondence:

Joao Luiz Mendes Wanderley
jmwjoo@macae.ufjf.br
Lynn Soong
lsoong@utmb.edu

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and Infection
Microbiology

Received: 16 December 2018

Accepted: 26 March 2019

Published: 12 April 2019

Citation:

Wanderley JLM, Deolindo P,
Carlson E, Portugal AB, DaMatta FA,
Barcinski MA and Soong L (2019)
CD4⁺ T Cell-Dependent Macrophage
Activation Modulates Sustained PS
Exposure on Intracellular Amastigotes
of *Leishmania amazonensis*.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 9:106.
doi: 10.3389/fcimb.2019.00106

Joao Luiz Mendes Wanderley^{1*}, Poliana Deolindo², Eric Carlson³,
Arieli Bernardo Portugal¹, Renato Augusto DaMatta⁴, Marcello Andre Barcinski^{5†} and
Lynn Soong^{6†}

¹Laboratório de Imunoparasitologia, Unidade de Pesquisa Integrada em Produtos Biotivos e Biotécnicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, Brazil, ²Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, ³Department of Pathology, University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh, PA, United States, ⁴Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brazil, ⁵Instituto de Biologia Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁶Department of Microbiology and Immunology, Center for Tropical Diseases, Institute for Human Infections and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, United States

Leishmania amazonensis amastigotes can make use of surface-exposed phosphatidylserine (PS) molecules to promote infection and non-classical activation of macrophages (M Φ), leading to uncontrolled intracellular proliferation of the parasites. This mechanism was quoted as apoptotic mimicry. Moreover, the amount of PS molecules exposed on the surface of amastigotes correlates with the susceptibility of the host. In this study, we tested whether host cellular responses influence PS expression on intracellular amastigotes. We found that the level of PS exposure on intracellular amastigotes was modulated by CD4⁺ T cell and M Φ activation status *in vitro* and *in vivo*. *L. amazonensis* infection generated a Th1/Th2-mixed cytokine profile, providing the optimal M Φ stimulation that favored PS exposure on intracellular amastigotes. Maintenance of PS exposed on the parasite was dependent on low, but sustained, levels of nitric oxide and polyamine production. Amastigotes obtained from lymphopenic nude mice did not expose PS on their surface, and adoptive transfer of CD4⁺ T cells reversed this phenotype. In addition, histopathological analysis of mice treated with anti-PS antibodies showed increased inflammation and similarities to nude mouse lesions. Collectively, our data confirm the role of pathogenic CD4⁺ T cells for disease progression and point to PS as a critical parasite strategy to subvert host immune responses.

Keywords: phosphatidylserine, amastigote, T cell, parasitophorous vacuole, macrophage, immune evasion

INTRODUCTION

Leishmania amazonensis (*L. amazonensis*) is the causative agent of cutaneous leishmaniasis in South America. This species is associated with most cases of diffuse/disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL), a very severe clinical manifestation (Leon et al., 1990). Experimentally, most inbred mouse strains develop progressive cutaneous lesions, although the disease severity varies among mice of different genetic backgrounds (Terabe et al., 2004). Both DCL patients and experimentally infected mice show deficient cellular immune responses to the pathogen, as judged by delayed-type hypersensitivity (DTH) responses or cytokine/chemokine profiles (Ji et al., 2003; Silveira et al., 2005). In fact, when compared to the classical *L. major* infection models, *L. amazonensis*-infected mice failed to elicit a polarized Th response because activated CD4⁺ T cells produced a mix of Th1/Th2/Th17 and modulatory cytokines (Ji et al., 2003; Ramer et al., 2006; Vargas-Inchaustegui et al., 2009). This phenotype is consistent with the poor activation presented by infected dendritic cells, which is not sufficient to turn these cells into efficient, functional antigen-presenting cells (Xin et al., 2008; Wanderley et al., 2013). Consequently, macrophages (MΦs), the preferential host cells for parasite growth, are not efficiently activated and not capable of controlling the infection. Competent MΦ activation is necessary for disease control, since these cells are the main effector cells for parasite killing, usually dependent on the expression of nitric oxide synthase (iNOS) (Xie et al., 1993) or the production of reactive oxygen species (Carneiro et al., 2018). On the other hand, alternative or non-classical MΦ activation leads to an increased activation of arginase I, an enzyme responsible for the first step of polyamine synthesis, which is mandatory for parasite growth (Franca-Costa et al., 2015) and restrains NO production by competing for the same substrate, L-arginine (Wanasen and Soong, 2008). Those intracellular pathways control the fate of the intracellular parasite.

Apoptotic cells are known to display several distinctive molecular patterns, which are recognized by phagocytic cells for efficient internalization (Poon et al., 2014). In addition, phagocytes stimulated by apoptotic cell recognition are prompted to produce modulatory cytokines such as TGF-β and IL-10 (Fadok et al., 1998). Phosphatidylserine (PS) is a structural phospholipid that is actively maintained in the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane but is translocated to the surface at the early stages of apoptotic death (Fadok et al., 1992). Recognition of PS exposed at the surface of apoptotic cells is sufficient to induce apoptotic cell clearance and non-classical activation of phagocytic cells (Hoffmann et al., 2001). We had previously shown that the amastigote forms of *L. amazonensis*, when purified from mice lesions, exposed PS at their surface without additional signs of apoptotic death. Since PS-exposing amastigotes are fully viable and highly competent in infecting and maintaining a productive disease in mice, we termed this phenotype apoptotic mimicry (de Freitas Balanco et al., 2001). As in the case of apoptotic cell/phagocyte interactions, the host cell is induced to produce immunosuppressive cytokines, which, in turn, signal for MΦ non-classical activation and consequent

parasite growth (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006). PS exposure on *L. amazonensis* amastigotes correlates with the severity of the disease, since amastigotes purified from BALB/c mice, which are highly susceptible to the infection, exhibit a higher density of PS moieties than do those from parasites purified from semi-resistant C57BL/6 mice (Wanderley et al., 2006). In addition, *in vivo* treatment of infected mice with anti-PS monoclonal antibodies delays disease progression and up-regulates the efficiency of dendritic cells to present antigen and activate parasite-specific T cells (Wanderley et al., 2013). PS exposure on pathogens operates in several different models of infection, such as those using *Trypanosoma cruzi* (Damatta et al., 2007), *Toxoplasma gondii* (Seabra et al., 2004), enveloped and non-enveloped viruses in which they confirm PS as a strategy to silently invade host cells (Seabra et al., 2004; Damatta et al., 2007; Mercer and Helenius, 2008; Feng et al., 2013). Additionally, by inducing transient PS exposure on the surface of host cells, viral infections can spread signals derived from PS recognition, such as TGF-β and IL-10 production by neighbor phagocytes, to avoid full activation of the immune system (Soares et al., 2008).

In this study, we tested whether PS exposure is an adaptive response of *L. amazonensis* amastigotes to the hostile environment of the parasitophorous vacuole generated by MΦ immune activation. We observed that intracellular amastigotes infecting activated MΦs are able to increase PS exposure. This is dependent on iNOS and arginase I concomitant expression. We confirmed our findings by demonstrating that PS exposure on amastigotes purified from lesions of T cell-deficient nude mice was nearly absent, but the adoptive transfer of primed CD4⁺ T cells recovered this phenotype. We also demonstrated that lesions of anti-PS antibody-treated infected mice were similar to lesions of immunodeficient mice. Our data lead us to conclude that PS exposed by intracellular amastigotes of *L. amazonensis* is a phenotype acquired as a response to host immune activation, and thus an important adaptive strategy employed by those intracellular parasites.

MATERIALS AND METHODS

Mice and Parasites

Female nude BALB/c mice (*C.Cg/AnNTac-Foxn1tm* NE9), C57BL/6 mice deficient in iNOS (*C57BL/6NTac-Nos2tm* 1N12), and their corresponding wide-type (WT) controls were purchased from Taconic Farms (Germantown, NY) or Harlan Sprague Dawley (Indianapolis, IN), respectively. All mice were maintained under specific pathogen-free conditions and used at 6–8 weeks of age, according to the protocols approved by the Animal Care and Use Committee of the University of Texas Medical Branch (#9803016A). Promastigotes of *L. amazonensis* (LV78) were cultured at 23°C in Schneider's *Drosophila* medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), pH 7.0, supplemented with 20% FBS (Sigma, St. Louis, MO) and 50 μg/ml of gentamicin. Axenic amastigotes of *L. amazonensis* (LV78) were cultured at 33°C in complete Grace's insect cell culture medium (Invitrogen), pH 5.0, supplemented with 20% FBS. Parasite infectivity was maintained by *in vivo* passages in BALB/c mice, and cultures of <6 passages were used for infection.

Reagents

Otherwise stated, all recombinant cytokines were purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Superoxide scavenger MnTBAP (Mn³⁺ tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride) was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA), iNOS inhibitor L-NIL- [L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine], and (ODC) decarboxylase inhibitor DFMO (DL- α -Difluoromethylornithine, Hydrochloride) were purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

Amastigote Purification

Infected tissues or infected M Φ s were finely minced and homogenized with a tissue grinder (Thomas Scientific, NJ). The cell suspension was centrifuged at 50 g for 10 min at 4°C. The supernatant was carefully collected, and further centrifuged and washed for 3 more times at 1,450 g for 17 min at 4°C. After 2 h incubation under rotation at 34°C to liberate endocytic membranes (Saraiva et al., 1983), amastigotes were further centrifuged and incubated for 16 h at 34°C to complete release of endocytic membranes and to test for bacterial contamination. After this time, they were centrifuged and washed 3 times before use. Prior to amastigote purification from *in vitro* infected cells, M Φ s were thoroughly washed with HBSS.

Generation of Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM Φ s)

BMM Φ s were generated from mice by cultivating fresh bone marrow cells in complete IMDM (Invitrogen) containing 10% FBS, supplemented with 20 ng/ml of recombinant M-CSF (eBioscience, San Diego, CA). To generate BMM Φ s, we replaced the medium at 5–6 days of culture and harvested adhered cells after 10–12 days. To recover adhered M Φ s, we washed the petri dishes twice with warm PBS (Invitrogen) and incubated the cells with 5 ml of cell dissociation solution (CellGro, Manassas, VA) for 20 min at room temperature. We detached the cells by pipetting up and down and washed the cell pellet twice with complete medium prior to use.

Flow Cytometry

Parasites were quantified and 10⁶ amastigotes were washed and suspended in annexin V binding buffer, which contains 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl₂, at pH 7.2. Cells were incubated at room temperature for 15 min with annexin V-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR) at the concentration indicated by the manufacturer and diluted in the binding buffer. All incubation procedures were performed on ice. At the time of acquisition, 0.4 μ g/ml of propidium iodide (PI, Sigma) was added to the control and Annexin V-FITC-labeled samples to determine parasite viability. Data were collected in a BD FACSCalibur[®] (20,000 gated events per sample) and analyzed by Cellquest Pro[®] (BD Biosciences, San Jose, CA) and FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR).

Generation of Supernatant (SN) From Stimulated Lymph Node Cells

Mice were infected in the footpad with 2 \times 10⁶ promastigote forms of *L. amazonensis*. After 5–7 weeks of infection, popliteal

lymph nodes (LNs) were harvested, and a single-cell suspension was obtained. Total LN cells from infected or naïve mice were plated in U-bottomed, 96-well plates, 4 \times 10⁵ cells per well, in the presence of 40 μ g/ml of soluble *Leishmanial* antigens (SLA). After 4 days of culture, supernatants from stimulated LN cells from naïve mice or infected mice were pooled, filtered, and stored in aliquots at –70°C. To generate SLA, promastigote forms were submitted to 5 cycles of freeze-and-thaw and centrifugation to dispose of insoluble materials.

Adoptive Cell Transfer

BALB/c WT or nude mice were infected in the footpad with 1–2 \times 10⁶ promastigote forms of *L. amazonensis*. After 6–8 weeks of infection, popliteal LNs from WT mice were harvested and a single-cell suspension was obtained. CD4⁺ or CD8⁺ T cells were purified by selected cell isolation kits (Miltenyi Biotec, Alburn, CA), following the manufacturer's instructions. Infected BALB/c nude mice were i.v. injected with 1–3 \times 10⁶ purified CD4⁺ or CD8⁺ T cells. At 2–3 weeks post-transfer, mice were euthanized to obtain popliteal LNs and lesion-derived amastigotes to evaluate T cell activation and PS exposure on amastigotes, respectively.

Macrophage Infection

Thioglycolate-elicited peritoneal M Φ s or BMM Φ s were placed on 24-well plates and allowed to attach overnight. Cells were incubated with axenic amastigotes or promastigotes in a 3:1 ratio. After 4 h at 33°C, free parasites were removed by washing and, if necessary, cells were activated and/or treated with SNs, cytokines or drugs. Cultures proceeded for an additional 24-h period. In some cases, M Φ s were attached on 13-mm² glass coverslips (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and, after infection and activation/treatment, were stained with Giemsa (Sigma) to evaluate host cell morphology and infection efficiency.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total RNA was extracted from 1 \times 10⁶ M Φ s 24 h post-infection and/or activation by using the RNeasy system (QIAGEN, Valencia, CA). Immediately cDNA was generated by using up to 5 μ g of total RNA and the Superscript III Synthesis System (Invitrogen) and following the manufacturer's instructions. Amplifications of specific cDNAs were performed by using the GoTaq[®] Green Master Mix system (Promega, San Luis Obispo, CA). Briefly, Arginase I cDNA was subsequently amplified by use of the following cDNA primers: sense, 5'-AGACATCGTGATACATTG-3' and antisense, 5'-GAGTTCCGAAGCAAGCCAAG-3'. Amplification occurred over 30 cycles, with the first cycle for primary denaturing at 95°C for 2 min; the next 28 cycles each comprising three steps for denaturing (94°C, 35 s), primer annealing (59°C for 45 s) and primer extension (72°C, 45 s); and a final cycle of denaturing (95°C, 30 s), annealing (69°C, 30 s), and extension (72°C, 5 min). To amplify inducible nitric oxide synthase (iNOS) and β -actin cDNA, we used the following cDNA primers: iNOS sense, 5'-GTTTCTGGCAGCAGCGGCTC-3'; antisense, 5'-GCTCCTCGCTCAAGTTCAGC-3'. β -actin sense, 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGG-3'; antisense,

5'-GGGAGGAAGAGGATGCCGCAGTGG-3'. Amplification occurred over 36 cycles, by using the following approaches: the first cycle for primary denaturing at 95°C for 2 min; 34 cycles each comprising three steps for denaturing (95°C, 30 s), annealing (69°C, 30 s), extension (72°C, 20 s); and a final cycle of denaturing (95°C, 30 s), annealing (69°C, 30 s), and extension (72°C, 5 min). All reactions were performed by using a GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), and the PCR products were separated by electrophoresis on 1.2% agarose gels. Real-time RT-PCR assays were performed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using the following primer-probe sets purchased from Applied Biosystems: *inos* (Mm00440502_m1), *arginase I* (Mm00475988_m1), and β -*actin* endogenous control. The reactions were performed using Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR detection system. Data were normalized to the expression of β -*actin*.

Cytokine Production

Cytokine production was measured in the supernatant of LN cell or M Φ cultures by using the Bio-Plex Pro-Mouse Cytokine 23-plex Assay from Bio-Rad (Hercules, CA) and following the manufacturer's instructions. Total and biologically reactive TGF- β_1 were measured by using the ELISA Ready-SET-Go system (eBioscience), and data for biological reactive TGF- β_1 are presented. The level of nitric oxide was measured by using a Griess assay (Caymann Chemical, Ann Arbor, MI).

Parasite Quantification by Real-Time PCR

Parasite loads were quantified by measuring the gene of *L. amazonensis* cysteine proteinase isoform 1 (*Llacys1*), which is a single-copy gene per haploid genome and expressed in both developmental stages (Lasakosvitsch et al., 2003). Infected M Φ s were collected for DNA extraction with a DNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA). DNA (10 ng) was used for parasite detection by the UTMB Real-time PCR Core Facility (all reagents were purchased from Applied Biosystems, Foster City, CA). Each sample was run in duplicate and normalized by the amount of total DNA extracted. The number of parasites per sample was calculated based on a standard curve, as described in our previous studies (Xin et al., 2010).

Histopathological Analysis

Mice were infected i.d. in the right ear with 10⁶ promastigotes. After 2 weeks of infection and every 3 days thereafter they were given i.p. injections of 100 μ g of PGN635, a second-generation fully humanized anti-PS monoclonal antibody (Zhou et al., 2014). Other groups of mice received PBS or the isotype control C44 antibody that binds to colchicine (Edmond Rouan et al., 1989). Mice were treated for 6 weeks and the infected ears were collected, fixed in 4% paraformaldehyde, dehydrated, embedded in paraffin, and mounted slides were stained with hematoxylin and eosin.

Parasitophorous Vacuole Morphometric Evaluation

The sizes parasitophorous vacuoles from lesions of mice treated with anti-PS, isotype antibodies or PBS were observed under an Axioplan (Zeiss) microscopy and images were captured using a MRc5 AxioCam digital camera and processed with the software ImageJ version 1.47f (Wayne Rasband–NIH). Values are shown as the area in μ m² for at least 200 PVs in each tested sample.

Western Blot

BMM Φ s (1×10^6) were infected with axenic amastigotes at a 3:1 parasite-to-cell ratio. At 24 h post-infection and/or indicated treatments, cells were harvested, washed, and suspended in 10 μ l of PBS and 10 μ l of 2X lysis buffer (2% Triton X-100, 100 mM Tris-Cl, 600 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM PMSE, 250 mM sucrose) that contained an inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN). Protein concentrations were determined by using the BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology). Equal amounts of proteins were loaded onto 10% SDS-polyacrylamide gels, and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Rabbit anti-mouse iNOS and arginase I antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mouse anti-actin mAb (Sigma) was obtained from Dr. Jiaren Sun (Department of Microbiology and Immunology, UTMB, TX). Membranes were incubated with primary Abs (diluted 1:200 in TBS buffer containing 5% non-fat milk and 0.05% Tween-20) at 4°C overnight, washed, and incubated with an HRP-conjugated secondary Ab (1:2000) for 1 h. Blots were developed with the enzyme chemiluminescence kit ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Statistical Analysis

One- or two-way ANOVA was used for multiple group comparisons (GraphPad Software v5.0, San Diego, CA). Statistically significant values are referred to as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

RESULTS

Increase of PS Exposure on Intracellular Amastigotes Depends on Macrophage Interactions With Lymph Node Cells

We previously showed that lesion-derived amastigotes purified from BALB/c mice expose higher amounts of PS than do those parasites derived from C57BL/6 mice (Wanderley et al., 2006), a finding that may indicate that the host can modulate this phenotype of the parasite. To evaluate the role of host macrophages (M Φ s) in modulating PS exposure on the parasite, we obtained thioglycollate-elicited peritoneal M Φ s from BALB/c and C57BL/6 mice, infected them either with promastigotes or lesion-derived amastigotes and collected intracellular amastigotes every 24 h to evaluate PS exposure by flow cytometry. We found no major differences between parasites derived from BALB/c vs. C57BL/6 M Φ s (Figure 1A), regardless of the form of parasite used for infection or the time

post-infection. Consequently, we suspected that the interaction between MΦs and other types of immune cells was responsible for the differential levels of PS on lesion-derived parasites *in vivo*. To investigate this possibility, we obtained lymph node (LN) cells from infected BALB/c mice and incubated them with peritoneal MΦs infected with lesion-derived amastigotes. These interactions stimulated an about 30% higher PS exposure on intracellular amastigotes compared to that in parasites obtained from isolated MΦs, in a dose-dependent manner (Figure 1B).

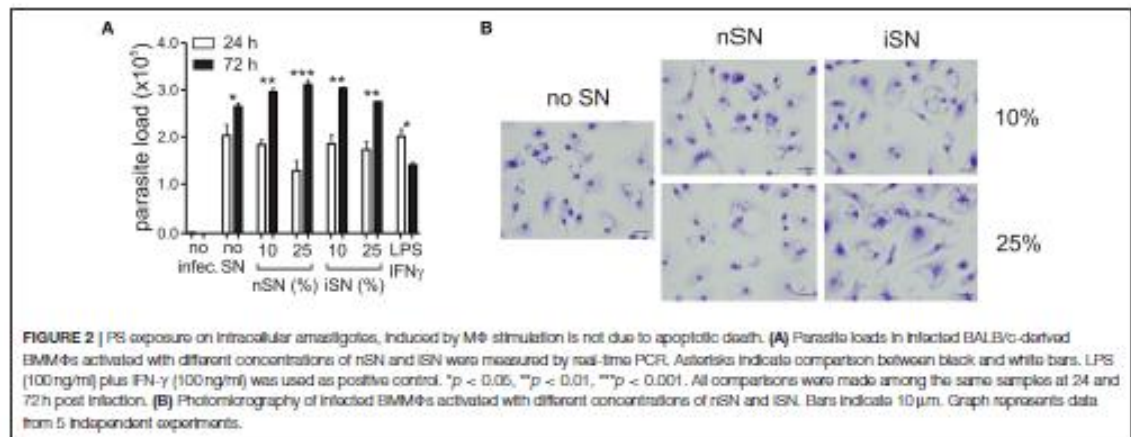
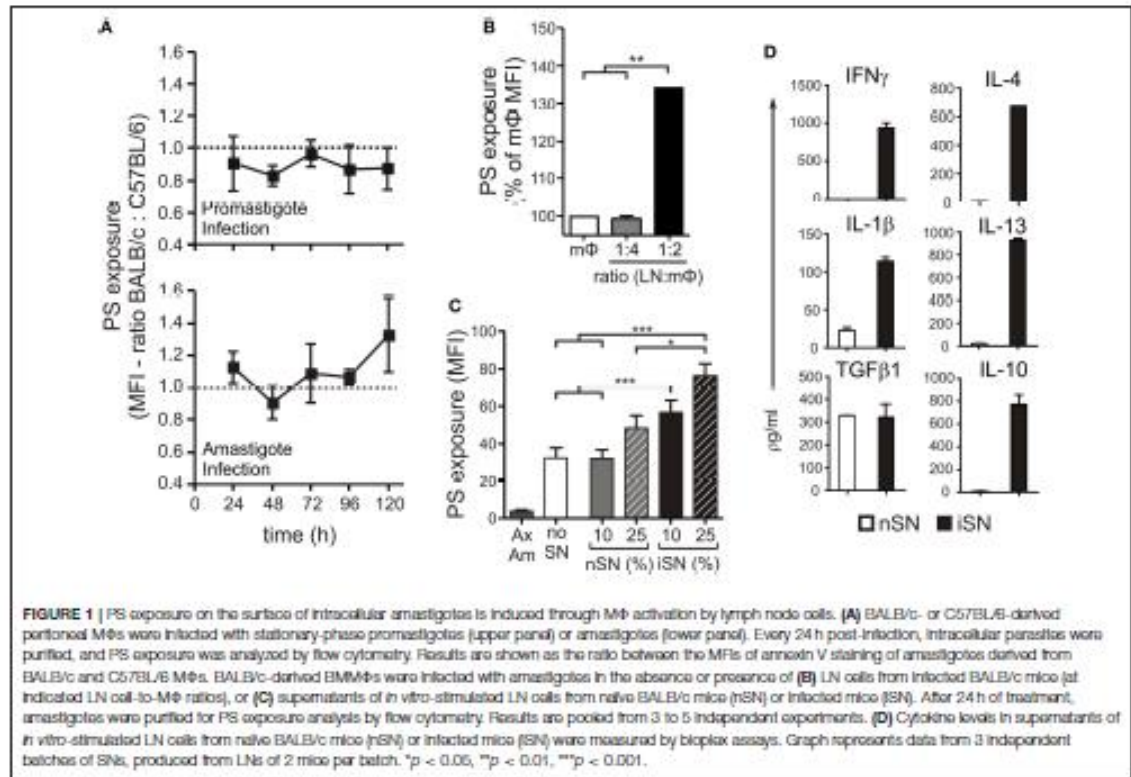
To determine whether cytokine production by LN cells was a requirement to induce PS exposure on intracellular parasites, we generated supernatants from LN cells obtained from naïve (nSN) or infected (iSN) mice and stimulated with SLA for 4 days. We treated MΦs infected with axenic amastigotes with different concentrations of those supernatants (SNs) and evaluate PS exposure on intracellular amastigotes 24 h post-infection and stimulation. As shown in Figure 1C, axenic amastigotes exposed very low amounts of PS, which represented a technical advantage for minimizing background levels of PS exposure and indicated that parasite-host interactions should be necessary to stimulate PS exposure on amastigotes. Indeed, intracellular amastigotes from unstimulated MΦs ("no SN") increased PS on their surface, 24 h post-infection. In addition, treatment of infected MΦs with iSNs induced PS exposure on intracellular amastigotes. This effect was dependent on the activation of those LN cells, since iSN was significantly more efficient than nSN and a clear positive correlation with the concentration of SN was observed: 10% of iSN added to the culture induced a 50% increase, while 25% of iSN induced about a 70% increase in PS exposure on intracellular amastigotes (Figure 1C).

As expected, the cytokine profile of those SNs corroborated the previous data regarding T cell activation during *L. amazonensis* infection in the mice (Ji et al., 2003). Moderate amounts of Th1, Th2, and modulatory cytokines such as IL-4, IL-13, IFN γ , IL-1 β , TGF- β ₁, and IL-10 (Figure 1D), were present, especially in the SN generated from re-stimulated, *in vivo*-primed cells (iSN), which indicates that this response is antigen-specific. One of the hallmarks of the apoptotic mimicry, described to operate during amastigote infection, is the fact that amastigotes exposing PS are perfectly viable and infective and do not display any other sign of apoptotic death (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006). To evaluate whether MΦ activation leads to PS exposure on intracellular amastigotes due to apoptotic mimicry, we measured parasite loads on infected MΦs at 24 and 72 h post-infection. As shown in Figure 2A, MΦ activation with SNs derived from stimulated LN cells from either infected or naïve mice promoted parasite proliferation 72 h post-infection, as opposed to LPS and IFN γ activation. In addition, the morphological characteristics of *L. amazonensis* infection are maintained, and include, for example, enlarged parasitophorous vacuoles with parasites attached to the vacuole internal membrane (Figure 2B). Our data suggest that MΦ activation through interactions with primed LN cells and their soluble products modulate active PS exposure by intracellular amastigotes in an apoptotic mimicry fashion.

Balanced Expression of iNOS and Arginase I Controls cytokine-Dependent PS Exposure on Amastigotes and Parasite Survival

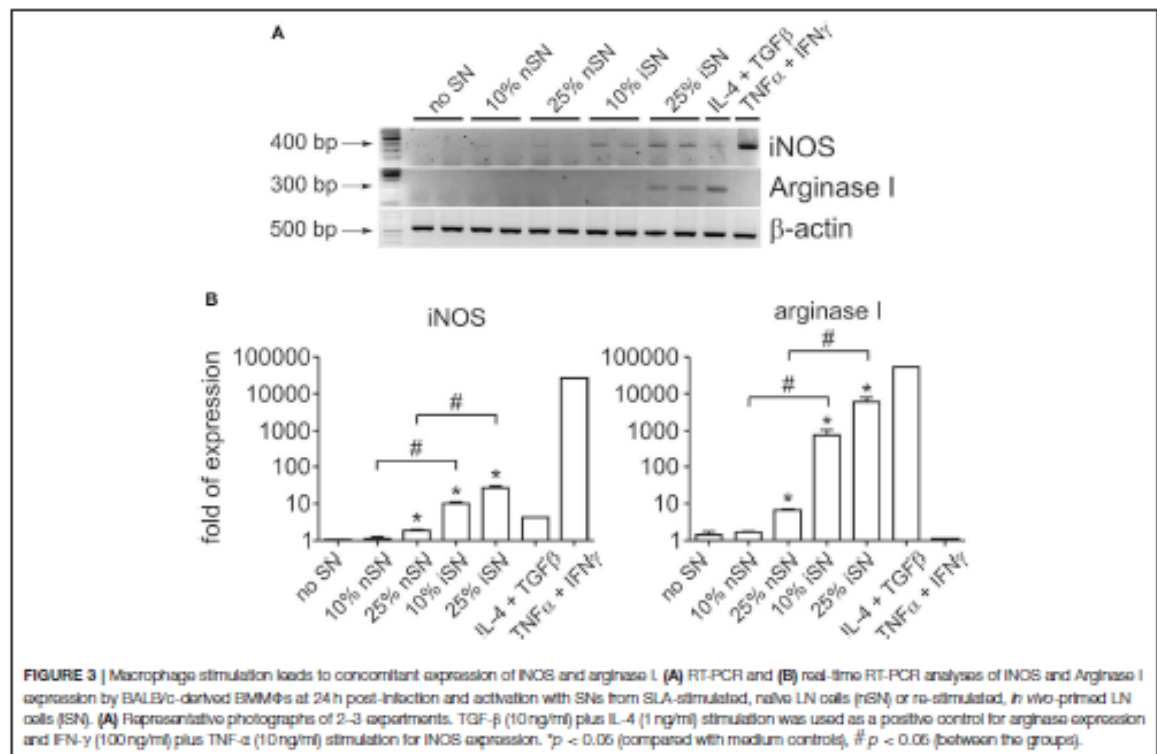
It is known that the survival of *Leishmania* parasites inside macrophages (MΦs) is mostly mediated by the balance between iNOS and arginase I activation. These are induced enzymes and therefore their activity is directly related to their cellular expression. Arginase I is the first enzyme in the polyamine synthesis pathway, while iNOS is the enzyme responsible for all steps of NO synthesis. Those intracellular signaling pathways compete with each other, since they depend on the same substrate. In addition, some molecules, produced as secondary metabolites, act as cross-inhibitors (Wanasen and Soong, 2008). Interactions between infected MΦs and other immune cells determine which pathway is activated, since inflammatory cytokines stimulate iNOS expression and decrease mRNA levels of arginase I and vice-versa (Corraliza et al., 1995; Modolell et al., 1995). Since MΦ activation seems to be important for the cytokine-dependent PS exposure by intracellular parasites, we aimed to understand the role of those pathways in this mechanism. We observed that SN from re-stimulated, *in vivo*-primed LN cells induced the expression of both arginase I and iNOS at the mRNA and protein levels (Figures 3A,B and Figure S1). The expression of both enzymes was the highest when 25% of iSN was used to stimulate infected MΦs, the same concentration that induced an optimal increase of PS exposure on intracellular amastigotes. However, iSN stimulation was weak, when compared to that in the positive controls for arginase I and iNOS expression, TGF β ₁+IL-4 or IFN γ +TNF α , respectively (Figures 3A,B). The expression of both enzymes by activated MΦs correlates with the profile of cytokines present on those SNs, since they are constituted by a mix of Th1/Th2/modulatory cytokines (Figure 1D).

To understand the contribution of both pathways individually, we activated infected MΦs in the presence of L-NIL, a relatively selective inhibitor of iNOS, or, as a control, we used MnTBAP, a superoxide scavenger molecule. L-NIL has IC₅₀ values of 0.4–3.3 μ M for iNOS as opposed to 8–38 and 17–92 μ M for eNOS and nNOS, respectively (Moore et al., 1994; Stenger et al., 1995). At 24 h of infection, we evaluated PS exposure on purified intracellular amastigotes. The iNOS inhibitor abrogated the cytokine-dependent induction of PS exposure, while scavenging superoxide molecules had no effect (Figure 4A). Treatment with both inhibitors brought the levels of PS exposure on amastigotes to the same levels of L-NIL alone, indicating that there was no synergistic effect between NO and superoxide to induce PS exposure on the parasite (Figure 4A). To further demonstrate the role of iNOS expression by MΦs in the induction of PS exposure on amastigotes, we generated BMMΦs from wild-type (WT) and iNOS^{-/-} C57BL/6 mice, infected them, and purified intracellular amastigotes from activated MΦs to evaluate PS exposure on the parasite. C57BL/6-derived MΦs were more sensitive to activation, since 25% of nSN was able to induce the same levels of PS on the parasite when compared with iSN (Figure 4B). Activation



of infected *iNOS*^{-/-} MΦs did not increase PS exposure on amastigotes regardless of the source or the concentration of SN (Figure 4B). Similar to what happened in BALB/c-derived MΦs, the differences observed on amastigotes purified from WT or *iNOS*^{-/-} C57BL/6 MΦs were not related to the death of the

amastigotes, since parasite loads 72 h post-infection were not altered among the different SN treatments (Figure 4C). Despite the increased *iNOS* expression, MΦ activation with 10 or 25% of iSN or nSN did not induce detectable amounts of NO, evaluated by Griess reaction (Figure 4D). To test whether polyamines



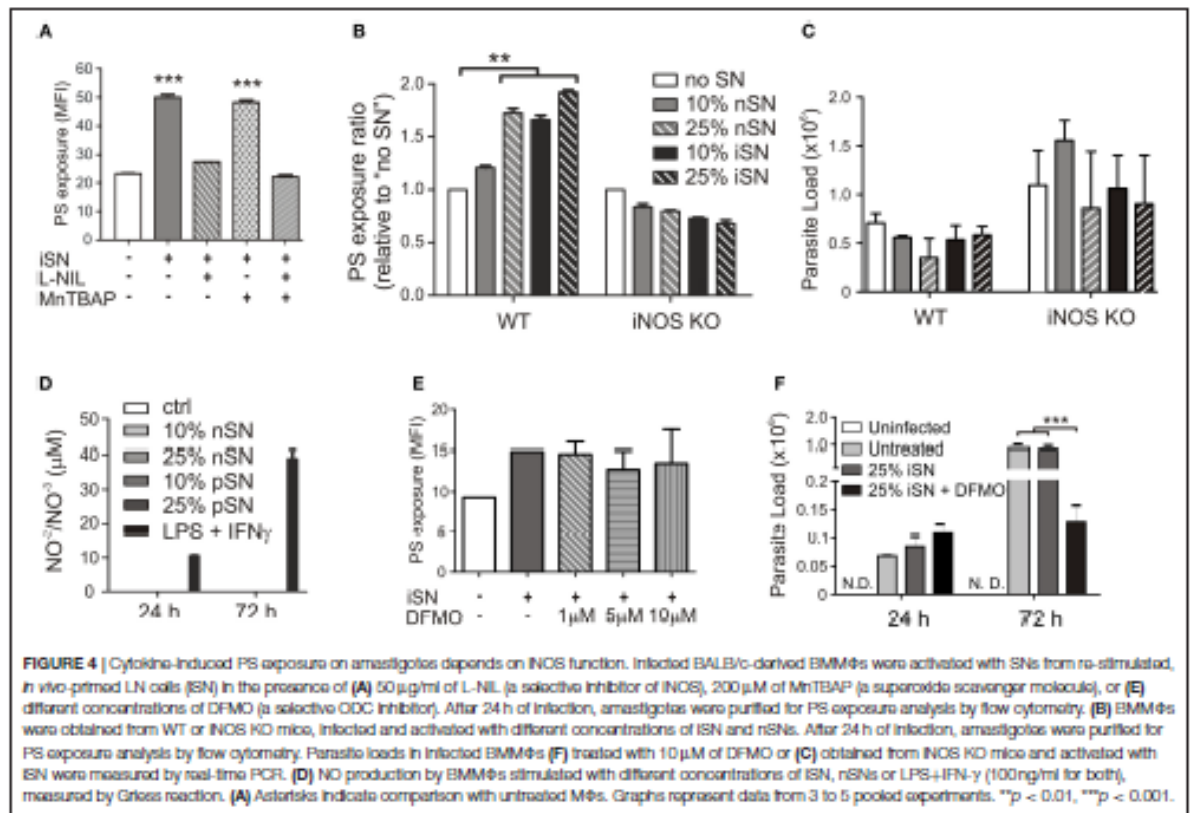
play a role in the induction of PS exposure on amastigotes, we purified amastigotes from infected- and activated-MΦs treated with different concentrations of difluoromethylornithine (DFMO), an specific and irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, the enzyme responsible for metabolizing L-arginine-derived ornithine into the polyamine putrescine (Canellakis et al., 1979). Independent on the concentration of DFMO used, this drug had no effect on the PS exposure on the amastigotes (Figure 4E). However, when we quantified parasite loads on infected-MΦs activated with 25% of iSN, we observed that DFMO treatment was detrimental for the proliferation of intracellular parasites at 72 h post-infection (Figure 4F). This finding may indicate that polyamine synthesis is a requirement for parasite proliferation and maintenance in these conditions, as described in other models (Majumder and Kierszenbaum, 1993; Vannier-Santos et al., 2008). Nevertheless, our data imply that PS exposure on intracellular amastigotes is modulated by cytokine-mediated, iNOS-dependent MΦ activation, rather than by arginase I expression. Arginase I, however, is necessary for parasite proliferation and survival in activated MΦs.

CD4⁺ T Cells Are Required for PS Exposure on Intracellular Amastigotes *in vivo*

To further understand the role of different cellular populations present in the lymph nodes (LNs) for the modulation of PS exposure on intracellular amastigotes, we infected WT

or nude BALB/c mice in the footpad and purified lesion-derived amastigotes to evaluate PS exposure on a weekly basis. Confirming previous data from the literature, we observed a delay in the development of lesions in immunodeficient mice, which, eventually, reached the same size of lesions from WT mice (Soong et al., 1997; Figure 5A). PS exposure on lesion-derived amastigotes purified from WT mice was 2- to 6-times higher than on parasites obtained from nude mice, depending on the time post infection (Figure 5B), confirming previous results (Franca-Costa et al., 2012). Since CD4⁺ T cells are the major regulators of host immune response to *Leishmania* infection, we hypothesized that the modulation of PS exposure on intracellular parasites observed by incubating infected MΦs with LN cells or culture SNs was due to CD4⁺ T cell-dependent MΦ activation. To test this hypothesis, we purified CD4⁺ T cells from draining LNs of infected WT mice and adoptively transferred these cells to infected nude mice. After 2–3 weeks post-transfer, we purified lesion-derived amastigotes to evaluate PS exposure. The adoptive transfer of CD4⁺ T cells increased PS exposure on the amastigotes by 2- or 3-fold, whereas transfer of CD8⁺ T cells, used as a control, did not alter the parasite phenotype (Figures 5C,D).

In addition to the decreased PS exposure on amastigotes derived from nude mice (Franca-Costa et al., 2012; Figure 5B), histopathological analysis of BALB/c nude mice lesions showed a marked decrease in the size of the parasitophorous vacuoles of



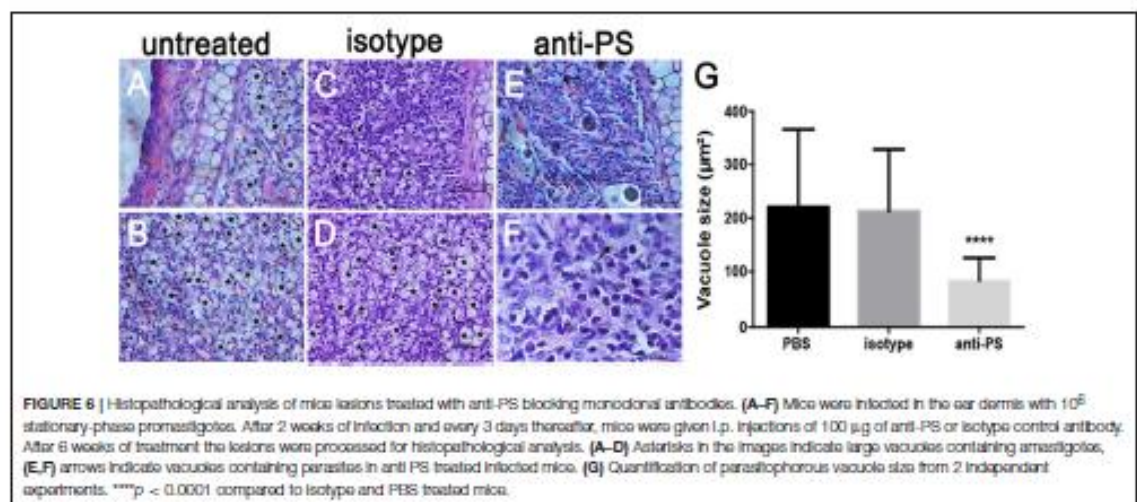
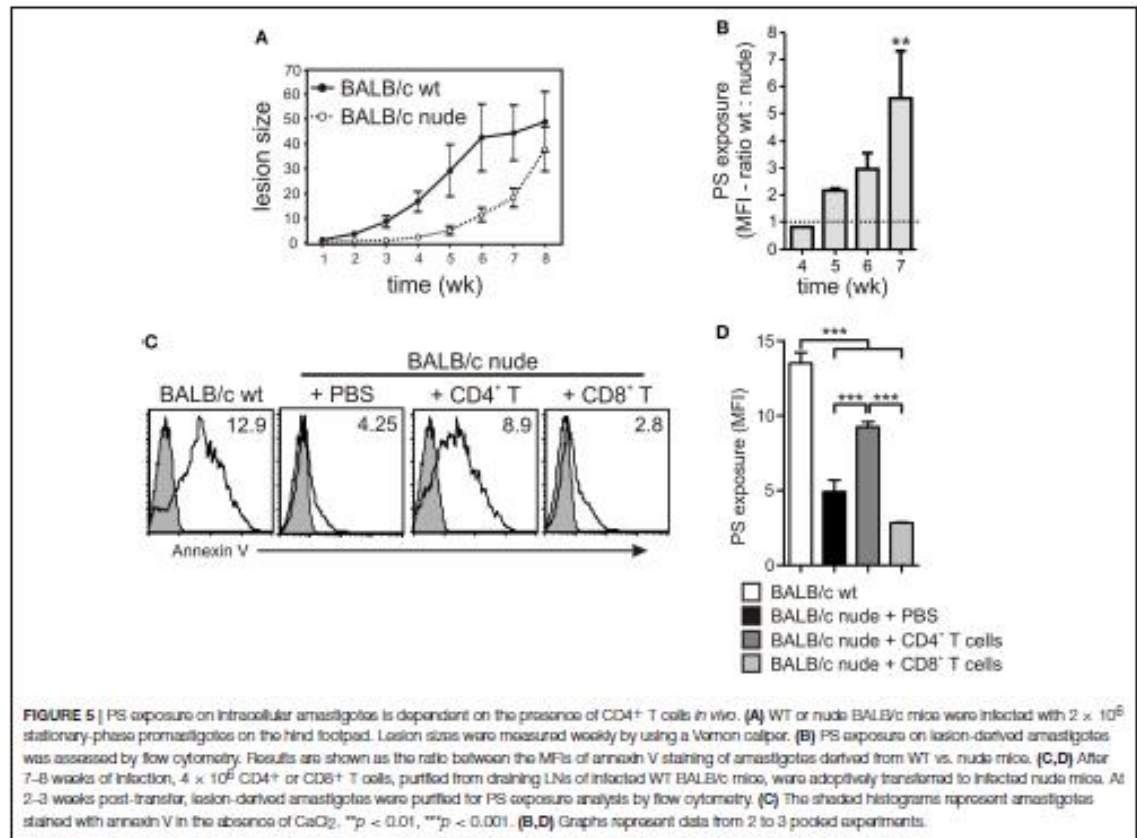
infected Mφs (Franca-Costa et al., 2012). This is also observed in lesions from MHC class II^{-/-} mice (Soong et al., 1997). We observed that infected mice treated intraperitoneally with anti-PS mAb displayed decreased parasitophorous vacuole size (Figures 6D–F) when compared to untreated mice (Figures 6A–C). The difference in the vacuole size was not observed in infected mice treated with isotype control antibodies (Figure 6G and Supplementary Table 1). Our data demonstrate that PS exposure on intracellular amastigotes is a response of the parasite when it senses Mφ activation through primed CD4⁺ T cells.

DISCUSSION

L. amazonensis, particularly its amastigotes, can infect host cells without triggering overt cellular activation. Actually, those parasites are able to down-modulate signaling pathways involved in dendritic cell activation, suppress cytokine production and expression of MHC class II molecules and, therefore, to inhibit antigen presentation (Prina et al., 2004; Xin et al., 2008). In addition, the inhibitory effects of *L. amazonensis* amastigotes on macrophages (Mφs) are also well known, including sequestration and degradation of MHC class II molecules, inhibition of endosomal proteases and blocking of NO production (Prina et al., 1990, 1993; Antoine et al., 1999). Consequently, *L. amazonensis*

infection models are typically characterized by presenting a weak and non-polarized T cell response that is not sufficient to induce proper Mφ activation and control of parasite loads (Soong et al., 1997; Ji et al., 2002, 2003).

Our group has previously shown that the ability of amastigotes of *L. amazonensis* to silently infect host cells is mainly due to the exposure of PS molecules at their surface in a mechanism referred to as apoptotic mimicry (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006). The recognition of this molecule and opsonizing ligands such as antibodies and complement factors mediate amastigote uptake by Mφs. In addition PS is highly effective in triggering anti-inflammatory cytokine production by Mφs, creating a permissive environment for parasite intracellular proliferation (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006; Birge et al., 2016). Interestingly, PS exposure on amastigotes is correlated with disease severity, since amastigotes derived from BALB/c mice, which develop a more severe disease when exposed to higher amounts of PS than do those obtained from moderately susceptible C57BL/6 mice (Wanderley et al., 2006). In the context of parasite/host interactions, there are several reports showing a similar effect in the opposite direction: infection modulating host cell functions such as apoptosis, and expression of molecules involved with microbicidal effects or immune functions (Osorio y Fortea et al., 2007; Soong, 2008; Lecoer et al., 2010; Muxel et al., 2017b).



However, the presence of this phenotype suggests that, in the case of BALB/c mice infection, the host is able to modulate parasite virulence by inducing or selecting amastigotes with an increased capacity to expose PS. Definitely, this modulation depends on host cell types and activation status, since the internalization of axenically-cultured amastigotes by MΦs induces a basal level of PS exposure on these parasites, which is absent *in vitro*. However, MΦs with different genetic backgrounds are not able, by themselves, to differentially modulate PS exposure by the intracellular parasites. Differential modulation only occurs in the presence of lymph node (LN) cells or soluble molecules produced by antigen-stimulated LN cells.

PS recognition is clearly related to the internalization of amastigotes by MΦs (de Freitas Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2006) and to the modulation of dendritic cells and MΦ responses by both promastigotes and amastigotes (Wanderley et al., 2006, 2009, 2013; Franca-Costa et al., 2012). These events are dependent on PS recognition by surface receptors expressed by MΦs and other phagocytic cells. However, our results indicate that PS exposure on intracellular amastigotes is a counteraction of MΦ activation, suggesting that the parasite is able to modulate the host cells from within the parasitophorous vacuole. Therefore it should be determined whether there are endosomal PS receptors expressed by the MΦ, especially those ones involved in the regulation of host cell inflammatory activation such as TAM receptors (Axl, Tyro3, and Mer; Rothlin et al., 2007). Since signal transduction can be mediated by endosomal receptors it is likely to assume that PS receptors either coopted from the plasma membrane during parasite uptake or specifically trafficked to the parasitophorous vacuole.

It is known that the T cells response elicited by *L. amazonensis* infection is not sufficient to induce parasite killing, which was confirmed by our results. Cytokines produced by both *in vivo* primed (iSNs) or naive LN cells (nSNs) stimulated with SLA were able to induce increased PS exposure, although this effect is prominent when *in vivo* primed cells were used, due to higher cytokine concentrations. In addition to this effect, we are demonstrating that MΦ stimulation with soluble factors produced by LN cells stimulated with *L. amazonensis* antigens generates a unique condition that triggers PS exposure on intracellular amastigotes, thereby increasing parasite virulence (Wanderley et al., 2006). We tried to activate infected MΦs with different combinations of cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , in an attempt to create the exact conditions that drive PS exposure on the intracellular parasites. Although some induction of PS exposure was observed, it did not reach the same efficiency when compared to iSN (data not shown). We understand that PS exposure depends on a very unique combination of time-dependent and concentration-dependent cytokines, which favor parasite survival over parasite killing, but maintain stress-signals sufficient to induce PS exposure. This issue could be addressed by using SNs from LN cells from other infected mice strains, such as C57BL/6 or C3H.He mice (de Oliveira Cardoso et al., 2010). There are several reports demonstrating that CD4⁺ T cells are pathogenic for *L. amazonensis* infection; however, the mechanisms underlying this effect are not fully understood. It is well known that C57BL/6 mice deficient in the CIITA, MHC

class II, and RAG2 genes or nude C57BL/6 mice exhibit a delay in lesion development and smaller parasite loads in infected tissues, indicating that CD4⁺ T cells play a role in lesion pathology and disease progression (Soong et al., 1997). However, those mice are persistently infected, developing lesions at later time points. The administration of competent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is capable of transiently inhibiting those pathogenic effector cells, ameliorating the disease (Ji et al., 2005). Actually, amastigotes derived from BALB/c nude mice expose low amounts of PS, when compared to those in parasites obtained from their WT counterparts (Franca-Costa et al., 2012). The adoptive transfer of CD4⁺ T cells to infected nude mice stimulated PS exposure on lesion-derived amastigotes. These data reinforce the assertion that pathogenic CD4⁺ T cells affect *Leishmania* infection and suggest that these cells are necessary to generate amastigotes with high amounts of PS at their surface that, therefore, are highly capable of re-infecting new host cells, modulating MΦ functions and avoiding immune surveillance.

The outcome of *Leishmania* infection is determined by the efficiency of MΦ activation and by the enzyme metabolizing the aminoacid L-arginine. Classical MΦ activation through inflammatory cytokines leads to iNOS expression, NO production and parasite killing, whereas regulatory or anti-inflammatory cytokines lead to non-classical MΦ activation, arginase I expression, polyamine production and parasite survival and growth (Wanzen and Soong, 2008; Acuna et al., 2017; Muxel et al., 2017a). Both pathways use L-arginine as a primary substrate. Infected MΦs stimulated with supernatants from re-stimulated LN cells led to the simultaneous expression of iNOS and arginase I. This activation provides the necessary stimuli to increase PS exposure on intracellular amastigotes without interfering with the parasites' viability and proliferative capacity. The presence of very low concentrations of NO as a result of iNOS activation was sensed by intracellular amastigotes, triggering PS exposure, while arginase I expression and possible polyamine synthesis were necessary for maintenance of parasite viability and persistence in the host. NO is known to induce apoptosis in intracellular amastigotes (Murray and Nathan, 1999). However, it is possible that the low levels of NO produced, undetected by the Griess reaction, are sufficient to trigger PS exposure that does not lead to cell death due to the simultaneous presence of polyamines derived from arginase I/ODC activity. The latter can act as a protective factor, through DNA stabilization, protecting cells from DNA degradation or inducing autophagic processes, as shown in other models (Rowlatt and Smith, 1981; Ha et al., 1998; Madeo et al., 2010). However, our data do not exclude a possible participation polyamines derived from the parasite, since treatment with DFMO could block ODC expressed by the parasite. We are currently determining the optimal concentration of different NO-donor molecules, to induce PS exposure on axenic amastigotes. This information is necessary to study both the ability of NO to induce this phenotype and to better understand the role of polyamines for parasite survival. This mechanism configures a positive feedback cycle that is beneficial for the parasite. The poor activation of specific CD4⁺ T cell responses generates stimulatory conditions that induce non-classical MΦ

activation, leading to concomitant and low expression of both iNOS and arginase I. Non-classical M Φ activation in turn, stimulates increased and sustained PS exposure on intracellular amastigotes, generating parasites more competent to infect new host cells and spread the anti-inflammatory signals derived from PS recognition. This mechanism seems to operate in BALB/c mice. The differential activation of CD4⁺ T cells in other mouse strains, such as C57BL/6, can explain the variations on PS exposure described in lesion-derived parasites from different mouse strains (Wanderley et al., 2006), and need to be further investigated. In addition, it is important to determine the impact of PS-dependent infection in human infections. Previous work showed that there is a positive correlation between PS exposure on parasites isolated from patients and the development of diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL). This correlation is also observed when comparing the level of PS on the surface of the isolated parasites and the number of lesions in the patient and the duration of the disease (Franca-Costa et al., 2012). DCL patients are characterized by low inflammatory and T cell response that leads to uncontrolled parasite dissemination and lesion development (Barroso et al., 2018). It is possible to suppose that in DCL patients, there is a unique combination of cytokines that induce augmented PS exposure on the parasite therefore leading to more severe disease.

One of the hallmarks of *L. amazonensis* infection is the peculiar parasitophorous vacuoles formed in infected M Φ s. These vacuoles are large organelles shared by several parasites that continuously undergo fusion with lysosomes, exosomes and endosomes (Veras et al., 1996; Real et al., 2008). This feature is important for amastigotes to uptake nutrients (Borges et al., 1998), to dilute microbicidal molecules (Sacks and Sher, 2002; Wilson et al., 2008) and to evade the immune response (Antoine et al., 1999). Interestingly, different authors showed that enlarged vacuoles are less present in immunodeficient mice (Soong et al., 1997; Franca-Costa et al., 2012), suggesting that vacuole enlargement is also a counteractive response from amastigotes against a stressful environment. We observed that mice treated with anti-PS antibodies showed a marked and significant decrease in vacuole size when compared to untreated or isotype-treated mice. Surely, the antibodies are binding to released amastigotes since they do not have access to the parasitophorous vacuole. PS blockade could lead to a deviation in the endocytic pathway of parasite internalization since PS-dependent amastigote internalization occurs by macropinocytosis (Wanderley et al., 2006), which is characterized by the formation of enlarged endosomes (Basagiannis et al., 2016). The effect of anti-PS blocking antibodies on vacuole size provides a further explanation for the decreased parasite load of mice treated with anti-PS blocking antibodies (Wanderley et al., 2013). These results suggest that M Φ activation by T lymphocytes stimulate PS exposure and the consequences of this exposure are the alternative activation of M Φ s, increase amastigote infectivity and enlargement of the parasitophorous vacuoles. The direct mechanism that link PS exposure and vacuole enlargement warrant further investigation.

In summary, this work describes that cytokine-dependent interactions between CD4⁺ T cells and infected M Φ s are

sensed by intracellular parasites, which counteract by exposing PS. Exposed PS, in turn, down-regulates the M Φ microbicidal capacity (Wanderley et al., 2006, 2013). Such cross-talk is obtained by a fine-tuned balance between iNOS activation, sufficient for stress-induced PS exposure, and arginase I activation, required for maintaining parasite survival and proliferation. We provide evidence that the increased PS exposure observed on amastigotes *in vitro* or from mouse lesions is due to M Φ stimulation by cytokines produced by CD4⁺ T cells. Therefore, the cellular immune response against the parasite can be exploited by the pathogen, generating amastigotes that are more competent to disseminate the disease and to escape from the host's immune system (Wanderley et al., 2006). In addition, we have provided further explanation for the pathogenic role of CD4⁺ T cells during *L. amazonensis* infection.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of University of Texas Medical Branch Animal Care and Use Committee. The protocol was approved by the University of Texas Medical Branch Animal Care and Use Committee under the number #9803016A.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JW and PD performed *in vitro* infections, cell cultures, and *in vivo* adoptive transfer experiments. EC performed qPCR and western blot analysis of iNOS and arginase I expression. AP performed the anti-PS *in vivo* treatment and histopathological analysis. JW, RD, MB, and LS designed experiments, wrote the manuscript, and made helpful critiques.

FUNDING

This study was supported by NIH grant AI043003 to LS, NIH training grant T32AI007526 to EDC, a Brazilian National Research Council Scholarship (CNPq) to JW, a scholarship to AP (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, a MCT/CNPq grant 471144/2008 and a CNPq senior investigator grant to MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Lijun Xin and Dr. Yingwei Wang for technical assistance and helpful discussion, Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho for assistance with histopathology sample processing, and Peregrine Pharmaceuticals for kindly donate anti-PS antibodies.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00105/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Acuna, S. M., Aoki, J. I., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Fernandes, J. C. R., Muxel, S. M., et al. (2017). Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS ONE* 12:e0187186. doi: 10.1371/journal.pone.0187186
- Antoine, J. C., Lang, T., Prina, E., Courret, N., and Hello, R. (1999). H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J. Cell. Sci.* 112(Pt 15), 2559–2570.
- Barroso, D. H., Falcao, S. A. C., da Motta, J. O. C., Sevilha Dos Santos, L., Takano, G. H. S., Gomes, C. M., et al. (2018). PD-L1 may mediate T-cell exhaustion in a case of early diffuse leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Front. Immunol.* 9:1021. doi: 10.3389/fimmu.2018.01021
- Basagntanis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., et al. (2016). VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *J. Cell. Sci.* 129, 4091–4104. doi: 10.1242/jcs.188219
- Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calanese, D., et al. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell. Death Differ.* 23, 962–978. doi: 10.1038/cdd.2016.11
- Borges, V. M., Vannier-Santos, M. A., and de Souza, W. (1998). Subverted transferrin trafficking in *Leishmania*-infected macrophages. *Parasitol. Res.* 84, 811–822. doi: 10.1007/s004360050493
- Canellakis, E. S., Vices-Madure, D., Kyriakidis, D. A., and Heller, J. S. (1979). The regulation and function of ornithine decarboxylase and of the polyamines. *Curr. Top. Cell. Regul.* 15, 155–202. doi: 10.1016/B978-0-12-152815-7.50009-0
- Carneiro, M. B. H., Roma, E. H., Ranson, A. J., Doria, N. A., Debrañani, A., Sacks, D. L., et al. (2018). NOX2-derived reactive oxygen species control inflammation during *Leishmania amazonensis* infection by mediating infection-induced neutrophil apoptosis. *J. Immunol.* 200, 196–208. doi: 10.4049/jimmunol.1700899
- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K., and Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthase (IL-4, IL-10 and PGIE2) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 667–673. doi: 10.1006/bbrc.1995.1094
- Damatta, R. A., Seabra, S. H., Deolindo, P., Arnoldi, A. C., Maranhães, L., Goldenberg, S., et al. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol. Lett.* 266, 29–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00495.x
- de Freitas Balanco, J. M., Moreira, M. E., Bonomo, A., Bozza, P. T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., et al. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr. Biol.* 11, 1870–1873. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00563-2
- de Oliveira Cardoso, F., de Souza Cda, S., Mendes, V. G., Abreu-Silva, A. L., Gonçalves da Costa, S. C., and Calabrese, K. S. (2010). Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J. Infect. Dis.* 201, 1933–1940. doi: 10.1086/652870
- Edmond Rouan, S. K., Otierness, I. G., Cunningham, A. C., and Rhodes, C. T. (1989). Specific, high affinity colchicine binding monoclonal antibodies: development and characterization of the antibodies. *Hybrisoma* 8, 435–448. doi: 10.1089/hyb.1989.8.435
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *J. Clin. Invest.* 101, 890–898. doi: 10.1172/JCI1112
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216.
- Feng, Z., Hensley, L., McKnight, K. L., Hu, F., Madden, V., Ping, L., et al. (2013). A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. *Nature* 496, 367–371. doi: 10.1038/nature12029
- Franca-Costa, J., Vin Weyenbergh, J., Boaventura, V. S., Luz, N. F., Malta-Santos, H., Oliveira, M. C., et al. (2015). Arginase 1, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 211, 426–435. doi: 10.1093/infdis/jtu455
- Franca-Costa, J., Wanderley, J. L., Deolindo, P., Zarattini, J. B., Costa, J., Soong, L., et al. (2012). Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS ONE* 7:e36595. doi: 10.1371/journal.pone.0036595
- Ha, H. C., Yager, J. D., Woster, P. A., and Casero, R. A. Jr. (1998). Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 298–303. doi: 10.1006/bbrc.1998.8258
- Hoffmann, P. R., deCathelneau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daloke, D. L., et al. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J. Cell. Biol.* 155, 649–659. doi: 10.1083/jcb.200108080
- Ji, J., Masterson, J., Sun, J., and Soong, L. (2005). CD44-CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 174, 7147–7153. doi: 10.4049/jimmunol.174.11.7147
- Ji, J., Sun, J., Qi, H., and Soong, L. (2002). Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 338–345. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.338
- Ji, J., Sun, J., and Soong, L. (2003). Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 71, 4278–4288. doi: 10.1128/IAI71.8.4278-4288.2003
- Lasaknsvitsch, F., Gentil, L. G., dos Santos, M. R., da Silveira, J. F., and Barbieri, C. L. (2003). Cloning and characterisation of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 445–454. doi: 10.1016/S0020-7519(03)00010-9
- Lecoeur, H., de La Llave, E., Osorio, Y. F. J., Goyard, S., Kiefer-Bastazo, H., Balazuc, A. M., et al. (2010). Sorting of *Leishmania*-bearing dendritic cells reveals subtle parasite-induced modulation of host-cell gene expression. *Microbes Infect.* 12, 46–54. doi: 10.1016/j.micinf.2009.09.014
- Leon, L. L., Machado, G. M., Paes, L. E., and Grimaldi Junior, G. (1990). Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84, 678–680. doi: 10.1016/0035-9203(90)90144-4
- Madeo, F., Tavernarakis, N., and Kroemer, G. (2010). Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell. Biol.* 12, 842–846. doi: 10.1038/ncb0910-842
- Majumder, S., and Kierszenbaum, F. (1993). Inhibition of host cell invasion and intracellular replication of *Trypanosoma cruzi* by N,N'-bis(benzyl)-substituted polyamine analogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2235–2238. doi: 10.1128/AAC.37.10.2235
- Mercot, J., and Helentus, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531–535. doi: 10.1126/science.1155164
- Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., and Eichmann, K. (1995). Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 25, 1101–1104. doi: 10.1002/eft.1830250436
- Moore, W. M., Webber, R. K., Jerome, G. M., Tjoeng, F. S., Misko, T. P., and Currie, M. G. (1994). L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J. Med. Chem.* 37, 3886–3888. doi: 10.1021/jm00049a007
- Murray, H. W., and Nathan, C. F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189, 741–746. doi: 10.1084/jem.189.4.741
- Muxel, S. M., Aoki, J. I., Fernandes, J. C. R., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuna, S. M., et al. (2017a). Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. *Front. Microbiol.* 8:2682. doi: 10.3389/fmicb.2017.02682
- Muxel, S. M., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., and Hoerter-Winter, L. M. (2017b). *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci. Rep.* 7:44141. doi: 10.1038/srep44141
- Osorio y Fortea, J., Prina, E., de La Llave, E., Lecoeur, H., Lang, T., and Milon, G. (2007). Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol. Rev.* 219, 66–74. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00559.x

- Poon, I. K., Lucas, C. D., Bossi, A. G., and Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 166–180. doi: 10.1038/nri3607
- Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Wimler, N., and Antoine, J. C. (2004). Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell. Sci.* 117(Pt 2), 315–325. doi: 10.1242/jcs.00860
- Prina, E., Antoine, J. C., Wiederanders, B., and Kirschke, H. (1990). Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Infect. Immun.* 58, 1730–1737.
- Prina, E., Jouanne, C., de Souza Loo, S., Szabo, A., Gullet, J. G., and Antoine, J. C. (1993). Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J. Immunol.* 151, 2050–2061.
- Ramer, A. E., Vanloubbeek, Y. F., and Jones, D. E. (2006). Antigen-responsive CD4+ T cells from C3H mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* are impaired in the transition to an effector phenotype. *Infect. Immun.* 74, 1547–1554. doi: 10.1128/IAI.74.3.1547-1554.2006
- Real, F., Pouchet, M., and Rabinovitch, M. (2008). *Leishmania* (L.) *amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Exp. Parasitol.* 119, 15–23. doi: 10.1016/j.exppara.2007.12.013
- Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zaniga, E. I., Oldstone, M. B., and Lemke, G. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 131, 1124–1136. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.034
- Rowlati, C., and Smith, G. J. (1981). Ultrastructural studies on chromatin digestion by micrococcal nuclease in the presence of polyamines. *J. Cell. Sci.* 48, 171–179.
- Sacks, D., and Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat. Immunol.* 3, 1041–1047. doi: 10.1038/nri102-1041
- Saravia, E. M., Pimenta, P. F., Pereira, M. E., and de Souza, W. (1983). Isolation and purification of amastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis* by a gradient of Melittinamide. *J. Parasitol.* 69, 627–629. doi: 10.2307/3281388
- Saiz, S. H., de Souza, W., and Damatta, R. A. (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 744–752. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.114
- Silveira, F. T., Laimson, R., and Corbett, C. E. (2005). Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100, 525–534. doi: 10.1590/S0074-02762005000500013
- Soares, M. M., King, S. W., and Thorpe, P. E. (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nat. Med.* 14, 1357–1362. doi: 10.1038/nm.1885
- Soong, L. (2008). Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J. Immunol.* 180, 4355–4360. doi: 10.4049/jimmunol.180.7.4355
- Soong, L., Chang, C. H., Sun, J., Longley, B. J. Jr., Ruddle, N. H., Flavell, R. A., et al. (1997). Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 158, 5374–5383.
- Stenger, S., Thuring, H., Rollinghoff, M., Manning, P., and Bogdan, C. (1995). L-N6-(1-iminoethyl)-lysine potently inhibits inducible nitric oxide synthase and is superior to NG-monomethyl-L-arginine in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 294, 703–712. doi: 10.1016/0014-2999(95)00618-4
- Terabe, M., Wakana, S., Katakura, K., Onodera, T., Matsumoto, Y., and Ito, M. (2004). Influence of H2 complex and non-H2 genes on progression of cutaneous lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Int.* 53, 217–221. doi: 10.1016/j.parint.2003.12.002
- Vannier-Santos, M. A., Menezes, D., Oliveira, M. F., and de Mello, F. G. (2008). The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology* 154(Pt 10), 3104–3111. doi: 10.1099/mic.0.2007/013896-0
- Vargas-Inchaustegui, D. A., Tat, W., Xin, L., Hogg, A. E., Corry, D. B., and Soong, L. (2009). Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 77, 2948–2956. doi: 10.1128/IAI.00154-09
- Veras, P. S., Topilko, A., Gouhler, N., Moreau, M. F., Rabinovitch, M., and Pouchet, M. (1996). Fusion of *Leishmania amazonensis* parasitophorous vacuoles with phagosomes containing zymosan particles: cinemicrographic and ultrastructural observations. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1009–1018.
- Wanzen, N., and Soong, L. (2008). L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. *Immunol. Res.* 41, 15–25. doi: 10.1007/s12026-007-8012-y
- Wanderley, J. L., Moreira, M. E., Benjamin, A., Bonomo, A. C., and Barcinski, M. A. (2006). Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. *J. Immunol.* 176, 1834–1839. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1834
- Wanderley, J. L., Pinto da Silva, L. H., Deolindo, P., Soong, L., Borges, V. M., Prates, D. B., et al. (2009). Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of *Leishmania* spp. *PLoS ONE* 4:e5733. doi: 10.1371/journal.pone.0005733
- Wanderley, J. L. M., Thorpe, P. E., Barcinski, M. A., and Soong, L. (2013). Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol.* 35, 109–119. doi: 10.1111/pi.m.12019
- Wilson, J., Huynh, C., Kennedy, K. A., Ward, D. M., Kaplan, J., Aderem, A., et al. (2008). Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog.* 4:e1000179. doi: 10.1371/journal.ppat.1000179
- Xie, Q. W., Whisnant, R., and Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 1779–1784. doi: 10.1084/jem.177.6.1779
- Xin, L., Li, K., and Soong, L. (2008). Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol. Immunol.* 45, 3371–3382. doi: 10.1016/j.molimm.2008.04.018
- Xin, L., Vargas-Inchaustegui, D. A., Ramer, S. S., Kelly, B. C., Hu, J., Zhu, L., et al. (2010). Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. *J. Immunol.* 184, 7047–7056. doi: 10.4049/jimmunol.0903273
- Zhou, H., Stafford, J. H., Hallac, R. R., Zhang, L., Huang, G., Mason, R. P., et al. (2014). Phosphatidylserine-targeted molecular imaging of tumor vasculature by magnetic resonance imaging. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 846–855. doi: 10.1166/jb.2014.1851

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

Copyright © 2019 Wanderley, Deolindo, Carlsen, Fortugal, DaMatta, Barcinski and Soong. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, Stephanie Maia *et al.* Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187186, 2017.

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.

AKHOUNDI, M *et al.* A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **International journal of dermatology**, v. 46, n. 2, p. 132-142, 2007

AKOPYANTS, N. S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265-268, 2009.

ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 1992. p. 175-254.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ALVING, C. R. Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety. **Journal of liposome research**, v. 16, n. 3, p. 157-166, 2006.

AMARA, A.; MERCER, J. Viral apoptotic mimicry. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 461, 2015.

ANDERSON, H. A. *et al.* Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. **Nature immunology**, v. 4, n. 1, p. 87, 2003.

ANTOINE, Jean-Claude *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, 1998

ANTONELLI, L. R. V *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 101, n. 2, p. 226-230, 2005.

BADARO, R. *et al.* A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.

BALASUBRAMANIAN, K.; SCHROIT, A. J. Characterization of Phosphatidylserine-dependent β 2-Glycoprotein I Macrophage Interactions IMPLICATIONS FOR APOPTOTIC CELL CLEARANCE BY PHAGOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 44, p. 29272-29277, 1998

BALL, W. B. *et al.* Leishmania donovani activates uncoupling protein 2 transcription to suppress mitochondrial oxidative burst through differential modulation of SREBP2, Sp1 and USF1 transcription factors. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 48, p. 66-76, 2014

BIRGE, R. B. *et al.* Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. **Cell death and differentiation**, v. 23, n. 6, p. 962, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRUN, R.; BERENS, R. L.; KRASSNER, S. M. Inhibition of Leishmania donovani transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. **Nature**, v. 262, n. 5570, p. 689, 1976.

CALVOPINA, M. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis due to Leishmania (Viannia) panamensis in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. **International journal of dermatology**, v. 45, n. 2, p. 116-120, 2006.

CASSILLY, C.; REYNOLDS, T. Ps, it's complicated: The roles of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the pathogenesis of *Candida albicans* and other microbial pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 28, 2018.

COURRET, N. *et al.* Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 263-279, 2001.

CRIVIANU-GAITA, V, THOMPSON, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. **Biosens Bioelectron.** v. 15, n. 85, p. 32, 2016.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

DAMATTA, R. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS microbiology letters**, v. 266, n. 1, p. 29-33, 2007.

DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S.; DE SOUZA, Wanderley. Macropinocytosis: a pathway to protozoan infection. **Frontiers in physiology**, v. 6, p. 106, 2015.

DE FREITAS BALANCO, J. M. *et al.* Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1870-1873, 2001.

DE OLIVEIRA CARDOSO F. *et al.* Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. **J Infect Dis.** v. 201, n. 12, p. 1933, 2010.

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

DEROSE, P.; THORPE, P. E.; GERBER, D. E. Development of bavituximab, a vascular targeting agent with immune-modulating properties, for lung cancer treatment. **Immunotherapy**, v. 3, n. 8, p. 933-944, 2011.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061-2068, 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in dermatology**, v. 14, n. 5 417-423, 1996

DIAZ, C.; SCHROIT, A. J. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. **The Journal of membrane biology**, v. 151, n. 1, p. 1-9, 1996.

DOS SANTOS, T. A. T. *et al.* Phosphatidylserine exposure by Toxoplasma gondii is fundamental to balance the immune response granting survival of the parasite and of the host. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27867, 2011.

EDIDIN, M.; VAN VORIS SESSIONS, A. Heterogeneity in the plasma membrane lipids of eukaryotic cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 414, n. 1, p. 8-18, 1983.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 2014.

FADOK, V. A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 4, p. 890-898, 1998

FLANNERY, A. R.; RENBERG, R. L.; ANDREWS, N. W. Pathways of iron acquisition and utilization in Leishmania. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 6, p. 716-721, 2013.

GARNHAM, P. C. C. The genus leishmania. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 44, n. 4, p. 477, 1971.

GHOSH, S. *et al.* Generation of ceramide in murine macrophages infected with Leishmania donovani alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 223, n. 1-2, p. 47-60, 2001.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and immunity**, v. 61, n. 4, p. 1553-1558, 1993.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and tissue research**, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HANAYAMA, R. *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. **Nature**, v. 417, n. 6885, p. 182, 2002.

HERMIDA MD, *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC Infect Dis.** n. 20, n. 14, p. 450, 2014.

HOFFMANN, P. R., *et al.* Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. **J. Cell. Biol.** v. 155, p.649-659, 2001.

HUANG, X.; BENNETT, M.; THORPE, P. E. A monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on tumor blood vessels enhances the antitumor effect of docetaxel on human breast tumors in mice. **Cancer research**, v. 65, n. 10, p. 4408-4416, 2005.

ISHIMOTO, Y. *et al.* Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. **The Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 3, p. 411-417, 2000.

ISNARD, A; SHIO, M. Ti; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 72, 2012.

JI, J., J. SUN, H. QI; L. SOONG. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am J Trop Med Hyg.** n. 66, p.338, 2002.

JUDY, B. F. *et al.* Vascular endothelial-targeted therapy combined with cytotoxic chemotherapy induces inflammatory intratumoral infiltrates and inhibits tumor relapses after surgery. **Neoplasia**, v. 14, n. 4, p. 352-359, 2012

KELLEHER, Raymond J. et al. Extracellular vesicles present in human ovarian tumor microenvironments induce a phosphatidylserine-dependent arrest in the T-cell signaling cascade. **Cancer immunology research**, v. 3, n. 11, p. 1269-1278, 2015.

KIHARA, A.; IGARASHI, Y. Cross talk between sphingolipids and glycerophospholipids in the establishment of plasma membrane asymmetry. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 11, p. 4949-4959, 2004.

KIMA, P. E. *et al.* Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 6, p. 1063-1068, 2000.

KOCHI, S. K.; JOHNSON, R. C.; DALMASSO, A. P. Facilitation of complement-dependent killing of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by specific immunoglobulin G Fab antibody fragments. **Infection and immunity**, v. 61, n. 6, p. 2532-2536, 1993.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KUMAR, Sushil; CALIANESE, David; BIRGE, Raymond B. Efferocytosis of dying cells differentially modulate immunological outcomes in tumor microenvironment. **Immunological reviews**, v. 280, n. 1, p. 149-164, 2017.

LABONTE, A. C.; TOSELLO-TRAMPONT, Annie-Carole; HAHN, Y. S. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. **Molecules and cells**, v. 37, n. 4, p. 275, 2014.

LAINSON, R. *et al.* The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 435-443, 1994.

LAINSON, R; RYAN, L; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

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

LAUBER, K. *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. **Cell**, v. 113, n. 6, p. 717-730, 2003.

LAUBER, K. *et al.* Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. **Molecular cell**, v. 14, n. 3, p. 277-287, 2004.

LAURENT, M.; STEINERT, M. Electron microscopy of kinetoplastic DNA from *Trypanosoma mega*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 66, n. 2, p. 419-424, 1970.

LEVENTIS, P. A.; GRINSTEIN, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. **Annual review of biophysics**, v. 39, p. 407-427, 2010.

LIEW, F. Y. *et al.* Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, v. 69, n. 4, p. 570, 1990.

LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature medicine**, v. 19, n. 7, p. 909, 2013.

MAJUMDER, S. *et al.* *Leishmania*-induced biphasic ceramide generation in macrophages is crucial for uptake and survival of the parasite. **The Journal of infectious diseases**, v. 205, n. 10, p. 1607-1616, 2012.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, Fathemeh. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease?. **Immunological reviews**, v. 201, n. 1, p. 206-224, 2004.

MAUËL, J. Intracellular Survival of Protozoan Parasites with Special Reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 1996. p. 1-51

MEHLOTRA, R. K. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. **Critical reviews in microbiology**, v. 22, n. 4, p. 295-314, 1996

MEYER, J. *et al.* A Phase I clinical trial of the phosphatidylserine-targeting antibody bavituximab in combination with radiation therapy and capecitabine in the preoperative treatment of rectal adenocarcinoma. **American journal of clinical oncology**, v. 41, n. 10, p. 972-976, 2018.

MOODY, M. A. *et al.* Anti-phospholipid human monoclonal antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce β -chemokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 4, p. 763-776, 2010.

MOREIRA, M. E. C. *et al.* Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 1996.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature**, v. 327, n. 6120, p. 329, 1987.

MUKBEL, R. M. *et al.* Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669-675, 2007.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999

MUXEL, S. M. *et al.* Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2682, 2018.

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

OGHUMU, S. *et al.* Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 126, n. 3, p. 389-396, 2010.

OMS, Leishmaniasis: Situation and Trends, World Health Organization, 2018, http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/.

PADIGEL, U. M.; FARRELL, Jay P. Control of infection with *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice lacking the common γ -chain for FcR is associated with reduced production of IL-10 and TGF- β by parasitized cells. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 10, p. 6340-6345, 2005.

PATEL, U. *et al.* Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug discovery today**, v. 22, n. 1, p. 186-193, 2017.

PÉREZ H; BOLÍVAR J. Lymph node cell responsiveness in BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 80, n.2, p. 135, 1985.

PETERS, C. *et al.* The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **Journal of cell science**, v. 108, n. 12, p. 3715-3724, 1995.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.

POMPEU ML, *et al.* Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Trop.** v. 48, n. 3, p.185, 1990.

RACOOSIN, E. L.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 85, n. 3, p. 283-295, 1997.

RAMAKRISHNAN, S. *et al.* Lipid synthesis in protozoan parasites: a comparison between kinetoplastids and apicomplexans. **Progress in lipid research**, v. 52, n. 4, p. 488-512, 2013.

RAMOS, P. K. S. *et al.* In vitro cytokines profile and ultrastructural changes of microglia and macrophages following interaction with *Leishmania*. **Parasitology**, v. 141, n. 8, p. 1052-1063, 2014.

RAN, S. *et al.* Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1551-1562, 2005.

RAN, S.; DOWNES, A.; THORPE, P. E. Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. **Cancer research**, v. 62, n. 21, p. 6132-6140, 2002.

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

REDDY, PS.; CORLEY R. B. The contribution of ER quality control to the biologic functions of secretory IgM. **Immunol Today**. v. 20, n. 12, p. 582, 1999.

RODRÍGUEZ, N. E. *et al.* Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19000, 2011.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **British medical journal**, v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROTE, N. S. *et al.* Immunologic detection of phosphatidylserine externalization during thrombin-induced platelet activation. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 66, n. 3, p. 193-200, 1993.

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

SACKS D, SHER A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol** v. 3, p. 1041, 2002.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, 1984.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845, 2002.

SARTER, K. *et al.* Sweet clearance: Involvement of cell surface glycans in the recognition of apoptotic cells: Minireview. **Autoimmunity**, v. 40, n. 4, p. 345-348, 2007.

SATTENTAU, Q. J.; KARAJI, N. Efferocytosis of pathogen infected cells. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1863, 2017.

SAUNDERS, E. C. *et al.* Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003888, 2014

SEABRA, S. H.; DE SOUZA, W.; DAMATTA, R. A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF- β 1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 2, p. 744-752, 2004.

SOARES, M. M.; KING, S. W.; THORPE, P. E. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. **Nature medicine**, v. 14, n. 12, p. 1357, 2008.

KIM, Hee-Yong; HUANG, Bill X.; SPECTOR, Arthur A. Phosphatidylserine in the brain: metabolism and function. **Progress in lipid research**, v. 56, p. 1-18, 2014

STIERHOF, York-Dieter *et al.* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European journal of cell biology**, v. 78, n. 10, p. 675-689, 1999.

SPÄTH, G. F. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n.16, p. 9536, 2003.

SWAIRJO, M. A. *et al.* Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 2, n. 11, p. 968, 1995.

TAIT, J. F.; GIBSON, D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 298, n. 1, p. 187-191, 1992.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, Seamus J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231, 2008.

TOVEY M. G, LALLEMAND C. Improved analytical methods for the detection and quantification of neutralizing antibodies to biopharmaceuticals. **Bioanalysis**. v. 4, n. 17, p.2179, 2012

TURETZ, M. L. *et al.* Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.

VANCE, J. E.; STEENBERGEN, R. Metabolism and functions of phosphatidylserine. **Progress in lipid research**, v. 44, n. 4, p. 207-234, 2005.

VANCE, J. E.; TASSEVA, G. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 3, p. 543-554, 2013.

WANDERLEY, J. L. M *et al.* Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of Leishmania (L) amazonensis in mammalian hosts. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006.

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PloS one**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009

WANDERLEY, J. L. M. *et al.* Phosphatidylserine exposure on the surface of Leishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. **Parasite immunology**, v. 35, n. 3-4, p. 109-119, 2013.

WANDERLEY, J. L. M.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 10, p. 1653-1659, 2010

WEBSTER, P.; RUSSELL, D.G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 9, n. 6, p. 201-206, 1993.

WILSON J, *et al.* Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of Leishmania amazonensis. **PLoS Pathog.** v. 4, n. 10, p.e1000179, 2008.

YAN, X. *et al.* Annexin-V promotes anti-tumor immunity and inhibits neuroblastoma growth in vivo. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 11, p. 1917-1927, 2012.

YIN, Y. *et al.* Phosphatidylserine-targeting antibody induces M1 macrophage polarization and promotes myeloid-derived suppressor cell differentiation. **Cancer immunology research**, v. 1, n. 4, p. 256-268, 2013.

YOSHINO, S.; MIZUTANI, N. Intranasal exposure to monoclonal antibody Fab fragments to Japanese cedar pollen Cry j1 suppresses Japanese cedar pollen-induced allergic rhinitis. **British journal of pharmacology**, v. 173, n. 10, p. 1629-1638, 2016.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 449-470, 1994.