

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Papel do MHC de classe II na biogênese do vacúolo parasitóforo de
Leishmania amazonensis e seu impacto no curso da infecção *in vivo***

Fabiana Silva

Uberlândia
Junho – 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Papel do MHC de classe II na biogênese do vacúolo parasitóforo de
Leishmania amazonensis e seu impacto no curso da infecção *in vivo***

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre.

Fabiana Silva

Profª. Dr. Maria Aparecida Souza
Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

Uberlândia

Junho – 2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Fabiana Silva

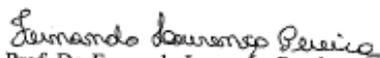
“Papel do MHC II na biogênese do Vácuolo Parasitóforo de *Leishmania amazonensis* e seu impacto no curso na infecção in vivo”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 9 de junho de 2014.


Prof. Dr. Fernando Lourenço Pereira – UFTM


Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa – ICBIM/UFU


Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza (orientadora) – ICBIM/UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586p
2014

Silva, Fabiana, 1980-

Papel do MHC de classe II na biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania amazonenses* e seu impacto no curso da infecção *in vivo* / Fabiana Silva. – 2014.

63 p. : il.

Orientadora: Maria Aparecida Souza.

Coorientador: Claudio Vieira da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Leishmania amazonensis - Teses. 3. Moléculas - Teses. I. Souza, Maria Aparecida. II. Silva, Claudio Vieira da. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

À Deus pelo Dom da vida e por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À minha mãe, pai e irmão pelo amor, carinho, paciência, apoio e motivação incondicional.

"O fracasso jamais me surpreenderá, se a minha decisão
de vencer for suficientemente forte."

Agradecimentos

Durante esse dois anos só tenho a agradecer a todos que passaram pelo meu caminho e que com certeza deixaram um pouco de si. Os momentos de alegria serviram para me permitir acreditar na beleza da vida, e os de sofrimento, serviram para um crescimento pessoal único. É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Agradeço a meus pais e irmão, sempre me apoiando e trazendo palavras de carinho e amor;

Agradeço aos, Profs. Dr. Claudio Vieira da Silva e Dra. Maria Aparecida de Souza pela oportunidade que me concederam e pela confiança;

A grande amiga/irmã Larissa pela sua dedicação, paciência e companheirismo sempre presente e disposta no desenvolvimento das práticas e interação constante com o grupo;

Agradeço também aos companheiros e amigos do Laboratório de Tripanosomatídeos (LATRI), pela convivência, aprendizado diário, pelas trocas de experiências, pela irreverência e alegria. Em especial aqueles que me "aguentaram", Adele Aud, Aline Silva, Thaise Lara, Samuel, Amanda, Paula e Rebeca, muito obrigada pela ajuda, paciência e compreensão;

À turminha da manhã do Setor de Transplante do HC, pela compreensão com minhas ausências e pelo apoio. Em especial a Márcia e a Deusdelia, minha coordenadora, pela colaboração e paciência.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Análise entre ensaios: média e desvio padrão dos valores da curva padrão.....	43
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação do tamanho da lesão na pata e medida da área do linfonodo poplíteo e baço.....	37
Figura 2: Detecção de citocinas por ELISA em patas, linfonodos poplíteo e baço de camundongos <i>mhci^{-/-}</i> e wild type infectados e não infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	39
Figura 3: Avaliação histopatológica.....	41
Figura 4: Quantificação de parasitas nas patas de camundongos <i>mhci^{-/-}</i> e wild type C57BL/6 infectados (PCR em tempo real).....	42
Figura 5: Dado representativo do qPCR em tempo real.....	43
Figura 6. Efeito da ausência das Moléculas de MHC classe II na expansão do VP e carga parasitaria de <i>L.amazonensis</i>	45

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	14
1.0 Introdução	11
1.1 Aspectos gerais dos protozoários pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i>	11
1.2 Interação entre <i>Leishmania</i> - hospedeiro vertebrado	14
1.3 Biogênese do vacúolo parasitóforo	17
1.3.1 Molécula MHC classe II e <i>L.amazonensis</i>	21
1.3.2 SNARES e <i>L.amazonensis</i>	24
1.3.3 LYST/Beige e <i>L.amazonensis</i>	25
2.0 Objetivos	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3.0 Material e Métodos	28
3.1 Aspectos éticos e local do estudo.....	28
3.2 Parasita.....	28
3.3 Purificação de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> a partir de patas de camundongos BALB/c	28
3.4 Animais.....	29
3.5 Ensaio <i>in vivo</i>	29
3.5.1 Medição e registro visual das patas.....	30
3.5.2 Coleta de órgãos.....	30
3.5.3 Medida da área dos órgãos dos animais infectados.....	30

3.5.4	Análise histológica.....	31
3.5.5	PCR em tempo real	31
3.5.6	Avaliação da resposta imune.....	33
4.0	Ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais.....	34
4.1	Coleta de macrófagos peritoneais.....	34
4.2	Análise por GIEMSA.....	35
4.3	Medida da área vacuolar de <i>L.amazonensis</i>	35
5.0	Análise estatística.....	35
6.0	Resultados.....	36
6.0	Efeito da ausência da molécula de MHC classe II no curso da infecção in vivo em camundongos <i>mhcii^{-/-}</i> e WT infectados por amastigota de <i>L.amazonensis</i>	36
6.1.1	Ausência do MHC levou a uma área menor do linfonodo e baço, e um aumento do volume das patas ao longo da infecção o que não foi maior em comparação aos animais selvagens.....	36
6.1.2	A ausência do MHC II alterou o padrão de resposta imune em camundongos infectados por <i>L.amazonensis</i>	38
6.1.3	Análise Histológica.....	40
6.1.4	A ausência do MHC II não levou ao aumento da carga parasitaria nos animais infectados.....	42
6.2	A ausência das Moléculas de MHC classe II reduziu o tamanho do vacúolo parasitoforo e a carga parasitaria em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i>	44
7.0	Discussão.....	46
8.0	Conclusão.....	50
9.0	Referências bibliográficas.....	51
Anexo I	63

Resumo

L. amazonensis são protozoários intracelulares obrigatórios, fagocitados por células de defesa do hospedeiro mamífero e se multiplicam em compartimentos ligados a membrana chamados de vacúolos parasitóforos (VP). Estes sofrem um processo de maturação que inclui fusões com vesículas da via endocítica conferindo uma natureza híbrida, induzindo a formação de vacúolos grandes que podem conter até 30 amastigotas. A biogênese do VP envolve aquisição de marcadores de membrana de endossomos tardios, como LAMPs, Rab GTPases, catepsina, próton ATPases, e MHC classe II. Nestes VPs as moléculas de MHC II se localizam no mesmo sítio de ligação da forma amastigota de *L. amazonensis*, as quais são capazes de degradar essa molécula dentro megassomo. Neste contexto, objetivamos verificar se a molécula de MHC II é importante na biogênese do VP e se sua ausência afetaria o curso da infecção. Para isso realizamos ensaios *in vivo* nos quais infectamos patas de camundongos C57BL/6 nocautes pra MHC II (*mhci2*^{-/-}) e wild type (WT), e após 6 semanas de infecção, coletamos baço, linfonodo poplíteo e pata para análise histopatológica, perfil de citocinas e carga parasitária. Além disso, realizamos ensaio de multiplicação, nos tempos de 72, 96 e 120 horas, com macrófagos peritoneais de camundongos *mhci2*^{-/-} e WT infectando-os via intraperitoneal, com a forma amastigota de *L. amazonensis*. Os resultados da análise histológica mostraram que os animais *mhci2*^{-/-} infectados não apresentaram diferença significativa em relação aos animais WT. Em relação a produção de citocinas, os resultados mostraram aumento na produção das citocinas IL-4 e IL-12 nos animais *mhci2*^{-/-} e aumento mais significativo na produção de IFN- γ nos animais WT, havendo ainda redução de TNF- α nos dois grupos analisados. Já no ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais houve diminuição na área do vacúolo parasitóforo e menor carga parasitária nos animais *mhci2*^{-/-} em comparação aos animais WT. Portanto, o processo de colocalização das moléculas de MHC II na membrana do VP parece não ser apenas um mecanismo de subversão do parasita, visto que na ausência desta molécula houve diminuição altamente significativa da área do VP e menor carga parasitária, caracterizando menor progressão da doença em comparação aos animais WT. Assim, acreditamos que a molécula de MHC II pode ter também um importante papel na biogênese deste VP.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, vacúolo parasitóforo, molécula MHC classe II.

Abstract

L. amazonensis are obligate intracellular protozoan, engulfed by host immune cells and multiply in membrane-bound compartments called parasitophorous vacuole (PV). These undergo a maturation process that includes the endocytic vesicles fusions conferring via a hybrid nature, inducing the formation of large vacuoles which may contain up to 30 amastigotes. The VP biogenesis involves acquisition of late endosomes membrane markers as lamps, Rab GTPases, cathepsin, proton ATPases, and MHC class II. In these VPs MHC II molecules are located in the same binding site of *L. amazonensis* amastigotes, which are able to degrade this molecule in megasomes. In this context, we aimed to verify whether the MHC II molecule is important in the VP biogenesis and his absence would affect the course of infection. For this we performed *in vivo* assays in which we infect Paws of MHC II (*mhci2*^{-/-}) knockouts and wild type (WT) C57BL / 6, and after 6 weeks of infection, we collected spleen, popliteal lymph node and paw for histopathological analysis, cytokine profile and parasitic load. In addition, we made a multiplication assay, in times of 72, 96 and 120 hours, with peritoneal macrophages of mice *mhci2*^{-/-} and WT infecting them via intraperitoneal, with amastigotes of *L. amazonensis*. The results of the histological analysis showed that infected animals *mhci2*^{-/-} showed no significant difference compared to WT mice. Regarding cytokine production, the results showed increased production of IL -4 and IL -12 in *mhci2*^{-/-} animal and more significant increase in IFN- γ in WT animals, even with a reduction of TNF- α in two groups analyzed. In the proliferation assay with peritoneal macrophages, it was observed decreased in the parasitophorous vacuole area and lower parasite load in *mhci2*^{-/-} animals compared to WT mice. Therefore , the process of colocalization of MHC II molecules on the membrane of the VP seems to be not only a mechanism of subversion of the parasite , whereas in the absence of this molecule was highly significant decrease in the VP area and lower parasite load , featuring less progression of disease compared to WT mice. Thus, we believe that the MHC II molecule may also play a role in the biogenesis of the VP.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, parasitophorous vacuole, MHC class II molecule.

1.0 Introdução

1.1 Aspectos gerais dos protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*.

Protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à Família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastea, compreendem um importante grupo de tripanosomatídeos que são transmitidos por vetores flebotômico e ocasionam uma gama de doenças denominada leishmanioses que afetam cerca de 150 milhões de pessoas no mundo (SHAW, 2006; KAYE; SCOTT, 2011). A classificação do gênero *Leishmania* foi historicamente baseada em critérios como distribuição geográfica, vetor, e manifestação clínica, podendo ser dividida em dois subgêneros: *Leishmania* (*L.*) e *Vianna* (*V.*). Esta subdivisão está relacionada ao desenvolvimento das formas promastigotas no inseto vetor, às características morfológicas das formas amastigotas e às propriedades infectivas. No subgênero *Vianna*, os promastigotas colonizam os intestinos médio e posterior do flebotômico, os amastigotas apresentam tamanho menor (2 a 4 μm) e poucos parasitos ocorrem nas lesões, enquanto no subgênero *Leishmania* os parasitos colonizam o intestino anterior, médio e posterior do invertebrado, os amastigotas são maiores (3 a 6 μm) e as lesões são densamente parasitadas (PRATT, 1981; SHAW, 2006; ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Leishmaniose é uma das mais significativas doenças tropicais negligenciadas, afetando principalmente regiões pobres e países em desenvolvimento, com mais de 350 milhões de pessoas em 88 países vivendo em risco de desenvolver uma das principais formas da doença (KEDZIERKI, 2010). A atual classificação reconhece 30 espécies de *Leishmania*, sendo que mais de 20 são responsáveis por causar doenças em humanos e apenas 12 são encontradas nas Américas. No Brasil, foram identificadas oito espécies, sendo seis do subgênero *Vianna* e duas do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies encontradas no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (BANULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; SHAW, 2006). O Brasil está entre os países de maior incidência das formas cutânea e mucocutânea (Alvar et al., 2012).

A apresentação clínica da leishmaniose é dependente tanto da espécie do parasito, quanto da resposta imune do hospedeiro. Na leishmaniose cutânea, mucocutânea e

cutâneo difusa os sintomas permanecem localizados na superfície da pele e mucosa. No caso da leishmaniose visceral ocorre disseminação para órgãos internos tais como, fígado, baço e medula óssea que leva aproximadamente 70.000 mortes por ano. Existem ao menos quatro formas clínicas distintas causadas pelas espécies encontradas no Brasil: Leishmaniose cutânea, mucocutânea, cutânea difusa, e visceral. Estas formas podem ser agrupadas em: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que engloba as formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, e Leishmaniose Visceral (LV). As espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* estão mais relacionadas às LTA enquanto a *L. infantum chagasi* provoca a LV. *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* causam principalmente lesões cutâneas, enquanto que *L. donovani* e *L. infantum* (conhecida como *Leishmania chagasi* na América do Sul) causa leishmaniose visceral. *L. amazonensis* é endêmica em muitos países da América Central e do Sul e está presente principalmente nas florestas úmidas da bacia amazônica (KEDZIERKI, 2010; KAYE, SCOTT, 2011).

Leishmaniose visceral, também conhecida como Kala-azar, é fatal se não tratada. Caracteriza-se por surtos de febres irregulares, queda de peso, aumento do baço e fígado, e anemia. É altamente endêmica na Índia e no sul da África. Há estimativa de que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorrem no mundo a cada ano. Mais de 90% dos casos ocorrem em cinco países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, e Sudão. Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose e causa úlcera nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida e incapacidade grave. Cerca de 95 % dos casos de LC ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. Há estimativas de que 0.7 a 1.3 milhões de novos casos ocorrem no mundo anualmente. Leishmaniose mucocutânea leva a destruição parcial ou total da mucosa do nariz, boca e garganta. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2014).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp é heteroxênico, envolvendo um hospedeiro invertebrado, inseto flebotômico; e vertebrado, incluindo mamíferos, dentre esses o homem (ALVAREZ-RUEDA et al., 2009). Tal protozoário apresenta, ao longo de seu ciclo, distintos estágios evolutivos. As formas móveis, flageladas, chamadas promastigotas, são encontradas dentro do intestino de flebotômicos e, através de progressivos estágios de diferenciação morfológica, diferenciam-se em formas

promastigotas metacíclicos, não replicativas, as quais são infectivas para o hospedeiro vertebrado, transmitidos durante a picada dos flebotomíneos. Formas amastigotas não tem exteriorização de flagelo e encontram-se intracelularmente em várias células do hospedeiro mamífero, mais notadamente dentro de fagócitos profissionais, tais como macrófagos (SACKS, 1980; ASSIS, et al., 2011).

A infecção do inseto vetor ocorre durante o repasto sanguíneo, quando a fêmea do flebotomíneo pica um hospedeiro infectado e ingere células sanguíneas e outras células, como fagócitos mononucleares contendo formas amastigotas. Na porção anterior do trato digestório do inseto, ocorre a transformação dos amastigotas em promastigotas procíclicos no interior da matriz peritrófica. Após o rompimento da matriz, os promastigotas migram para o epitélio do trato digestório, onde se multiplicam. Em seguida, vão para a região anterior do intestino, onde sofrem a metaciclogênese. Durante esse processo os promastigotas reduzem o tamanho corporal, aumentam o tamanho e o batimento flagelar e se tornam altamente infectivas, sendo denominados promastigotas metacíclicos. As formas metacíclicas migram para a probóscide e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada, onde recomeça o ciclo (MISHRA, et al., 2009).

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica o mamífero e inocula formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. Os promastigotas metacíclicos são regurgitados e penetram na pele do hospedeiro, aderindo e invadindo vários tipos celulares. Primeiramente as formas promastigotas são internalizadas por células fagocíticas e no interior do vacúolo parasitóforo sofrem diferenciação para a forma amastigota (STUART et. al., 2008). Estas se multiplicam no interior de macrófagos e provocam a lise da célula, liberando amastigotas no tecido, que poderão invadir outras células ou serem sugados por outra fêmea do inseto vetor, completando assim o ciclo de vida desse protozoário (MISHRA et. al., 2009).

O tratamento das leishmanioses consiste primordialmente na quimioterapia. A primeira linha de tratamento é baseada em antimoniais pentavalentes, principalmente nas áreas endêmicas (BORJA CABRERA, et. al., 2004; NAGILL; KAUR, 2011). Essas drogas atuam no mecanismo de produção de energia das formas amastigotas de *Leishmania*, interferindo na oxidação de ácidos graxos e na glicólise, causando uma

redução na produção de ATP e GTP (BERMAN, et. al., 1987). No entanto, sua utilização tem sido comprometida pelo aparecimento de cepas resistentes (NAGILL; KAUR, 2011).

A segunda linha de tratamento inclui drogas como a Anfotericina B e pentamidina, que são consideradas eficazes, mas são relativamente caras e provocam graves efeitos colaterais como: anemia, insuficiência renal, alterações cardiológicas, entre outros (BERMAN, 2003; DAVIS; KEDZIERSKI, 2005). Novas drogas, tais como formulações lipídicas de Anfotericina B, tem se mostrado eficazes no tratamento de leishmaniose visceral, mas o alto custo dessas drogas impossibilita sua disponibilidade para a maioria dos doentes (BERMAN, et al., 1998; MURRAY, 2004, NAGILL; KAUR, 2011).

1.2 Interação entre *Leishmania* - hospedeiro vertebrado

Leishmania tem habilidade de invadir macrófagos recrutados para destruí-los, podendo sobreviver e replicar no seu interior. Incapacidade de macrófagos para matar parasitas e ativar células do sistema imune adaptativo é um produto da capacidade do parasito de modular importantes vias de sinalização chave do hospedeiro. Algumas alterações na sinalização são vistas no curso de infecção, sugerindo que tem início com contato inicial entre o parasito e o macrófago. Alterações nas vias de sinalização tem, ao menos, duas principais funções: primeiramente, a inibição de mecanismos de toxicidade em macrófago, que são desencadeadas pela fagocitose de partículas estranhas (ex: produção de espécies reativas de oxigênio), e segundo, a inibição de funções leishmanicidas que podem ser desencadeadas para ativação de macrófagos em tecidos infectados, em resposta a estímulos tais como lipopolissacarídeo (LPS) ou interferon gama (exemplo: produção de óxido nítrico) (SHIO, et. al., 2011).

A picada do inseto flebotomíneo induz rápida infiltração de neutrófilos e substancial recrutamento de macrófagos na pele, independente da presença do parasita, devido ao resultado do processo de lesão do tecido (BEATTIE, KAYNE, 2011). A rápida infiltração de neutrófilos e sua associação com o local do dano tecidual sugere um papel para alarminas, que são moléculas endógenas que sinalizam dano à célula.

Fagócitos mononucleares infectados por *Leishmania* spp., produzem, em resposta, várias quimiocinas, conhecidas por atrair neutrófilos (KAYE, SCOTT, 2011). O processo de captação de parasitas por células dendríticas é um processo altamente dinâmico, que envolve extensão de pseudopodes (NG, 2008). Macrófagos residentes são rapidamente infectados, e tornam a população infectada dominante após 24 horas (PETERS, 2008).

Embora parasitos podem prontamente ser encontrados em neutrófilos, estes encontram-se, preferencialmente, em fagócitos mononucleares que exibem o melhor nicho para sua replicação e longo prazo de sobrevivência. Células inflamatórias, tais como macrófagos e células dendríticas, são as principais células hospedeiras de *Leishmania*. Além disso, monócitos infectados e células dendríticas derivadas de monócitos são frequentemente abundantes em lesões inflamatórias e em linfonodos de drenagem, enquanto outras células do hospedeiro nestes tecidos (eosinófilos, neutrófilos, e fibroblastos) podem ser infectadas. Ainda não está claro se células dendríticas ou macrófagos são capazes de transportar parasitos a partir do sítio inicial da infecção para o linfonodo de drenagem, onde se inicia a resposta imune adquirida, mas ambos fatores mostram-se importantes questionamentos futuros (KAYE; SCOTT, 2011).

Durante o processo de invasão, *Leishmania* liga-se a uma variedade de receptores (CR3, CR1, e Fc-yR) na superfície das células do hospedeiro e são internalizadas por via fagocítica (McCONVILLE, NADERER 2011), a qual é um mecanismo básico de endocitose do parasito, embora alguma participação ativa não é completamente excluída. Estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostram que *L.amazonensis* é capaz de invadir macrófagos fixados ou tratados com citocalasina D, vimos ainda, a invasão de células não fagocíticas como células caco, mioblastos e HeLa (TEIXEIRA, et al.; 2014, dados não mostrado).

A adesão do parasito na célula hospedeira ocorre principalmente pelo flagelo ou corpo celular e o reconhecimento do parasito envolve moléculas presentes na sua superfície como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína (gp63), que se ligam a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos. Os principais receptores dos macrófagos envolvidos na adesão e no reconhecimento de *Leishmania*

são os receptores do sistema complemento (CR1 e CR3), receptores Fc gama, receptores de Manose (MR) e receptores de fibronectina (FnRs) (CUNNINGHAM, 2002). Promastigota metacíclicos não apenas resistem a lise pelo complemento, mas também usam deste mecanismo para desencadear o processo de fagocitose mediando sua entrada nos macrófagos. Oponização com C3b e C3bi, que liga aos receptores CR1 e CR3 do macrófago, respectivamente, é o caminho predominante pelo qual promastigotas metacíclicos entram no macrófago hospedeiro (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSELL, 1999). Este método pode fornecer uma vantagem para sobrevivência, uma vez que CR1 e CR3 promove fagocitose sem ativar uma explosão oxidativa (DESCOTEAUX, TURCO, 1999; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983).

Captação de amastigotas por macrófagos utiliza vias celulares que são comuns para aqueles observados durante fagocitose mediada por receptor FC. A internalização de amastigotas envolve polimerização de actina em macrófagos. Estes dados sugerem que essa internalização por macrófagos segue uma cascata de eventos que são similares para aqueles envolvidos na fagocitose clássica mediada por receptor (LOVE, KANE, MOSSER, 1998).

Após o contato do parasito com o macrófago, longos pseudopodes tubulares firmemente circulando o seu corpo celular ou seu flagelo, são formados (COURRET, et al., 2002). Imediatamente após este processo de fagocitose, *Leishmania* são localizadas em compartimentos que são limitados por uma membrana originada da membrana celular dos macrófagos infectados chamados fagossomos. Estes então sofrem um processo de remodelamento via maturação e fusão com organelas endocíticas, resultando na formação do vacúolo parasitóforo (VP) (REAL, MORTARA, 2012; ANTOINE, et al, 1998).

Leishmania spp. é capaz de evadir a resposta imune inata do hospedeiro, havendo o crescente aumento de parasitos durante as primeiras semanas de infecção antes mesmo do desenvolvimento da imunidade adquirida. A imunidade adquirida é dependente de células T CD4 e CD8 com perfil de citocina T-helper tipo 1 (Th1). A liberação de citocinas pro-inflamatórias, tais como interferon-gama (IFN- γ), interleucina (IL-12), e fator de necrose tumoral (TNF), leva a ativação de potentes atividades anti-leishmania, tais como indução da síntese de óxido nítrico (NO), pela

indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e uma explosão oxidativa em células infectadas do hospedeiro e, conseqüentemente, induzindo um decréscimo na parasitemia. Reciprocamente, a indução de T-helper tipo 2 (Th2), com a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-13 e IL-10, pode levar à susceptibilidade do indivíduo e ao desenvolvimento da doença. Esta resposta imune permite ao parasito persistir em múltiplos tecidos após resolução espontânea ou tratamento de indução da doença clínica (KAYE, SCOTT, 2011).

A presença de citocinas, tais como IL-12, IFN- γ , IL-10 e IL-4 influenciam no curso clínico das leishmanioses (REINER; LOCKSLEY, 1995; JONES, ELLOSO, SCOTT, 1998, BELKAID, BUTCHER, SACKS, 1998; KANE, MOSSER, 2001). A produção precoce de IL-12 é importante para auxiliar no direcionamento da resposta imune para tipo TH1 (REINER, LOCKSLEY, 1995). Sinalização por IL1 é importante para restrição da replicação de *Leishmania spp* dependente de inflamassoma. Inflamassoma é um complexo proteico que tem um importante processo na resistência do hospedeiro contra infecções de várias espécies do gênero de leishmania. Tal plataforma proteica é requerida para produção eficiente de IFN- γ em macrófagos de medula óssea e importante para restrição dependente de NO da replicação do parasita, através de mecanismos envolvidos na produção de IL-1 β e IFN- γ . IL-1 β sozinha induz produção similar de óxido nítrico e restringe infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL6 (LIMA-JUNIOR, et al, 2013).

1.3 Biogênese do vacúolo parasitóforo de *L.amazonensis*

Vacúolo parasitóforo (VP) são compartimentos intracelular no hospedeiro no qual parasito *Leishmania* diferencia e multiplica. Eles são revestidos por uma membrana dinâmica originada da membrana plasmática da célula hospedeira e formado por sucessivas e coordenadas eventos de fusão e fissão com vesículas da via endocítica inicial e tardia, lisossomo secundário, retículo endoplasmático, e possivelmente vesículas autofágica, resultando em compartimentos ácidos similares ao fagolisossomos. A composição do VP pode diferir dependendo da espécie de *Leishmania spp.* e da célula do hospedeiro envolvida. Especificamente, enquanto a

maioria das espécies de *Leishmania* residem dentro de vacúolos estreitos e individuais, que segregam com células filhas em divisão, amastigotas do complexo de *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*) induzem vacúolos comunalmente grandes que podem conter até 20 a 30 amastigotas. Estes VPs largos contêm a mesma membrana plasmática e marcadores luminiais, assim como os VPs estreitos, e podem representar uma específica adaptação por membros desses complexos para minimizar os efeitos tóxicos dos reativos intermediários de nitrogênio (RNIs) gerados pelo hospedeiro (DESJARDINS, et al., 1994; ANTOINE, et al., 2004; NDJAMEN, et al., 2010).

Esse VP espaçoso também recruta marcadores de pH ácido. Estudos tem mostrado que o pH do VP *L. amazonensis* cai para aproximadamente 5,2 em 24 horas para 4,8 após 48 horas de infecção intracelular (ANTOINE, et al., 1988; ANTOINE, et al., 1990). O número de vesículas ácidas da célula do hospedeiro decresce com o aumento significativo do VP em macrófagos, ao longo do curso da infecção. Este resultado indica que o alargamento do VP de *L. amazonensis* é correlacionado com o decréscimo no reservatório de vesículas ácidas das células do hospedeiro (REAL; MORTARA, 2012).

Durante a biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania amazonensis*, imediatamente após a fagocitose (0-5 horas), parasitos são detectados, geralmente em compartimentos simples e relativamente estreito. Essas organelas tornaram-se dilatadas entre 5 e 12 horas e eles alcançaram um tamanho grande em 48 e 72 horas. Em 96 horas de infecção, há total desenvolvimento do VP com moderado alargamento deste, sugerindo uma fase estacionária no crescimento dessas estruturas. Este aumento no tamanho do VP é devido a fusão de vários vacúolos individuais abrigando parasito e pela fusão desses vacúolos com compartimentos da via endocítica do macrófago. Parasitos normalmente perdem seus flagelos externos com 5 hs após invasão e progressivamente torna-se ovóide e em 48 hs são amastigotas que estão claramente ligados na membrana do vacúolo parasitóforo, com 12 hs após a fagocitose. Essa ligação é fortemente polarizada, envolvendo uma porção limitada entre a membrana do vacúolo e o polo posterior do parasita. Esta região parece desprovida de microtúbulos cortical, ocorrendo invaginações mais ou menos profundas, da membrana plasmática do parasita. Projeções digitiformes da membrana do VP foram frequentemente detectados

nestas estruturas indicando interações complexas entre as duas células, neste nível (ANTOINE, et al., 1998; COURRET, et al., 2002; REAL; MORTARA, 2012).

Nos tempos iniciais, 12 horas após fagocitose, organelas precursoras de megassomos são observadas no polo posterior do parasita, em uma área perinuclear ou mesmo no polo anterior perto do complexo de Golgi e tem aparência de corpos multivesiculares (MVB), com conteúdo mais homogêneo (COURRET, et al., 2001). Em condições de crescimento, como mudanças gradual (temperatura e pH) e mudança na forma do parasita, estas estruturas também sofrem mudanças morfológicas e bioquímicas, resultando na biogênese de megassomos, passando a exibir características típicas, como tamanho relativamente grande, com localização preferencial no polo posterior e com conteúdos heterogêneos, incluído vesículas internas (RUSSELL; XU; CHAKRABORTY, 1992; LEAO, et al., 1995). Megassomos são lisossomos largos encontrados em amastigotas de espécies de *Leishmania* pertencente ao complexo mexicana, sendo essas organelas ricas em cisteína protease (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; SOUZA, 2001; LEAO, et al., 1995).

A membrana do VP e seus conteúdos modificam de acordo com as fusões com o Retículo Endoplasmático (RE), endossomos tardios, lisossomos ou outros elementos vesiculares da célula do hospedeiro, conferindo a eles propriedades distintas e uma natureza híbrida. A biogênese desse VP envolve aquisição de marcadores de membrana de endossomos tardio/lisossomos da célula do hospedeiro, como LAMPs, Rab GTPases, catepsina, próton ATPases, e MHC classe II (REAL, MORTARA, 2012).

Logo após a internalização de *L. amazonensis*, membranas de VP fundem com compartimentos endossomal inicial adquirindo Rab5 e EEA1(Antígeno Endossomal Inicial 1), dois marcadores de endossomo inicial; posteriormente, com o remodelamento de membrana, perdem estes marcadores e fundem com compartimentos endossomal tardio adquirindo rapidamente marcadores de endossomo tardio e lisossomo, como Rab7p, uma GTPase pequena associada a endossomos tardios/prelisossomos; macrosialina, uma glicoproteína específica de macrófagos, localizada principalmente em endossomos tardios; ATPase vacuolar (vATPase); proteína de membrana associada a lisossomos, LAMP-1 e proteases lisossomal (Ex: catepsinas); e exibem na sua membrana moléculas do RE, como calnexina e SNARES(Sec22, D12, Syntaxina(STX)

18 ou STX5 que medeiam a fusão de vesículas das vias excretoras inicial (RUSSELL, XU; CHAKRABORTY, 1992; NDJAMEN, et al., 2010; REAL; MORTARA, 2012).

Estudo da cinética de maturação do VP, demonstra que, após internalização de promastigota metacíclico 10 a 15% dos fagossomos exibem um marcador de endossomo inicial TfR (receptor de transferina) e EEA1, mesmo que em tempos iniciais (10-30 minutos). Em contraste, em 30 minutos, cerca de 95% desses comportamentos contém macrosialina e Lamp1, cerca de 75 a 90% deles adquirem catepsina B e D, respectivamente e 70% são Rab7p-positivo. Em macrófagos expressando moléculas MHC classe II, cerca de 50% dos fagossomos/fagolisossomos contém MHC classe II em 30 minutos. A partir de 1 hora após infecção, todos fagolisossomos são praticamente positivos para macrosialina, Lamp 1. A porcentagem de Rab7p e moléculas classe II em organelas contendo parasitas gradualmente aumenta, alcançando 100% em 48 horas pós infecção (COURRET, et al., 2002; COURRET, et al., 2001).

A cinética da maturação do VP para aquisição de marcadores de endossomos iniciais, tardio e lisossomos para a internalização de amastigotas de *L.amazonensis*, é bastante semelhante aquelas com promastigota metacíclico. Entretanto o recrutamento de diferentes moléculas é geralmente mais eficiente em amastigotas do que após ingestão de promastigotas, a porcentagem de Rab7p em compartimentos fagocíticos foram levemente maior após internalização de amastigotas. Em 30 minutos e 12 horas pós infecção, 90 e 100% de compartimentos abrigando amastigotas exibiram Rab7p na sua membrana, respectivamente. Similar resultados foram obtidos para Lamp1 e macrosialina em ambos estágios do parasita, exceto que a porcentagem de compartimento positivo foram maior em 10 minutos pós infecção com amastigotas, indicando uma aquisição levemente mais rápida dessas moléculas. Também, moléculas classe II foram adquiridas mais rapidamente após infecção com amastigotas (COURRET, et al., 2002)

Em conclusão foi demonstrado que ambos os fagossomos contendo promastigota e amastigota interagem com lisossomos/endossomos tardio nos minutos seguidos fagocitose do parasito. O alargamento do VP carregando esta espécie de *Leishmania* é atrasado quando promastigota são usados para iniciar infecção. Sugerindo que formação de VP é estágio dependente, pelo menos com certas espécies de *Leishmania* (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 2004; COURRET, et al., 2002).

Portanto, a aquisição desses marcadores é um evento coordenado que resulta na maturação do VP, que é presumivelmente requerido para a sobrevivência e multiplicação destes parasitas (REAL; MORTARA, 2012).

1.3.1 Moléculas MHC classe II e *Leishmania amazonensis*

O papel principal do MHC (Complexo de Principal de Histocompatibilidade) é o reconhecimento de proteínas estranhas, apresentação para células imunes especializadas resultando no início de uma resposta imune adaptativa (KLEIN, 1986). Em geral proteínas estranhas entram nas células por infecção ou pela fagocitose por células apresentadoras de antígenos tais como macrófago. Estas proteínas estranhas são divididas em pequenos peptídeos e carregados para moléculas MHC específica. Um subtipo desses complexos MHC/proteína são então transportados para a superfície celular e apresentados para população circulante de células T. Uma cascata complexa de resposta imune é desencadeada quando células T se ligam ao peptídeo apresentado (PIERTNEY; OLIVER; 2006).

A família do gene MHC engloba dois principais subgrupos de moléculas imunologicamente ativas. Moléculas classe I são expressas na superfície de todas as células nucleadas exceto espermatozóides e alguns neurônios. Eles apresentam peptídeos derivados endogenamente para células T citotóxica CD8, por isso são essencialmente associados com a defesa contra patógenos intracelulares tais como os vírus. Moléculas classe II (MHC II) estão presentes em células apresentadoras de antígenos como macrófagos, linfócitos B e células dentríticas, que apresentam antígenos exógenos processados para células T helper CD4. Como tal, moléculas classe II são associadas com insultos imunes, derivado de parasitas extracelular e patógenos. A molécula MHC compreende uma haste imunoglobulina, que ancora a molécula na superfície da célula e, receptor chamado região ligante de peptídeo (chamado de sulco ligante de peptídeo, sitio ligante de peptídeo, sitio de reconhecimento antígeno ou sítio de apresentação de antígeno). Este receptor que é responsável pelo reconhecimento de antígenos, e uma interação entre esses receptores, peptídeo antigênico e receptor da células T é requerido para produzir uma reação cascata imune. A molécula classe II é um heterodímero que consiste de duas proteínas transmembranas, uma cadeia alfa e

outra beta, que são codificados por dois genes separados. Sítios específicos dentro de ambas cadeias forma a região ligante de peptídeo (TEYTON; PETERSON, 1992; PIERTNEY; OLIVER; 2006).

Algumas células TCD4 reconhecem complexos de pequenos peptídeos de forma estável associado com moléculas MHCII, que são expressadas na membrana plasmática de células apresentadoras de antígeno. Formação desses complexos envolve principalmente novas moléculas sintetizadas de classe II e moléculas transitoriamente associada a elas, denominadas cadeia invariantes (Ii) e H-2M. Polipeptídeos não polimórficos chamados de cadeias invariante Ii são associados com moléculas MHC classe II durante seu transporte intracelular a partir do retículo endoplasmático rugoso para compartimentos endocíticos. Neste último, eles são degradadas e este processo correlaciona com a habilidade de moléculas MHC classe II para ligar peptídeos (Teyton and Peterson, 1992). Essa ligação requer uma previsível proteólise de Ii e é facilitado pela molécula H-2M, que tem afinidade por moléculas classe II vazia e por complexos entre moléculas classe II e fragmentos de cadeia Ii ou ligação do peptídeos exógenos instável. Esses complexos MHC II- peptídeos são alvos da membrana plasmática por um caminho desconhecido (ANTOINE, et. al. 1998; DENZIN, et al., 2005).

Após a infecção de macrófagos por *L.amazonensis*, moléculas MHC II sofrem redistribuição, onde uma significativa proporção dessas moléculas, cerca de 95% associa-se com os VPs, em 48 horas. Além disso, estas moléculas de MHC II, assim como as moléculas H-2M, são preferencialmente localizada no sítio de ligação das amastigotas na membrana do PV, o que poderia impedir o acesso das moléculas do MHC II a peptídeos exógenos (ANTOINE, et al., 2004; ANTOINE, et al., 1991). A co-localização destas moléculas fortemente sugere associação entre elas o que poderia ter uma relevância para a resposta imune contra o parasita. Ainda não tem relatado se são formados, dentro dos vacúolos, complexos antígeno do parasita-MHC II e se, neste caso, eles são capazes de alcançar a superfície da célula e ser reconhecidos por células T CD4 específicas. Estudos recentes indicam que MHC II e moléculas H-2M estão presentes em compartimentos que foram recentemente internalizados (menor que 5 horas) (ANTOINE, et al., 1998; LANG, et al., 1994).

Moléculas MHCII não são aparentemente associadas com cadeias invariantes. Uma vez que cadeias Ii associada à classe II são progressivamente degradadas, sugerem

que moléculas MHC classe II localizadas no VP são moléculas maduras completamente desprovidas de cadeia Ii e capaz de ligar peptídeos (ANTOINE et al, 1998 e 1991; LANG et al 1994). Não é conhecido se alguns desses antígenos peptídeos são de origem do parasita, mas existem várias linhas de evidência indicando que interações específicas entre parasito e MHC II ocorrem no VPs (LEÃO, et al., 1995).

A expressão de MHC classe II na superfície não é significativamente modificado em macrófagos infectados com 48 horas, sugerindo que a meia vida dessas moléculas não é grosseiramente afetada pela presença do parasito neste estágio de infecção (ANTOINE, et al., 1991; 1999; PRINA, et al., 1993).

Em contraste, moléculas MHC classe I não são detectadas na membrana do VP, apesar da forte expressão destas em macrófagos infectados por *Leishmania*. O sitio de interação entre antígenos do parasito e moléculas classe I ainda não é bem estabelecido (ANTOINE, et al.,1998). Estudos mostram que moléculas derivadas de *Leishmania* podem acessar a via do MHC classe I, de apresentação de antígeno, através do transporte associado com o mecanismo de processamento por complexo proteasoma e ligação do resultante peptídeos (BERTHOLET, et al., 2006), que implica que os peptídeos derivados do parasito nos VPs tem acesso direto as moléculas do MHC classe I (LANG, et al., 1994).

Durante o estudo de distribuição de moléculas MHC classe II macrófagos infectados com *L.amazonensis*, pequenas estruturas especificamente coradas com anticorpo monoclonal anti-classe 2(mAb) foram regularmente observada dentro de amastigotas sugerindo a internalização dessas moléculas dentro de estruturas do parasita. Como na região onde há colocação do MHC classe II com o polo posterior da amastigota, há a presença de megassomos, essas moléculas são internalizadas podendo ser degradadas dentro dessas estruturas considerada como grandes estruturas lisossomais, por proteases do parasito (PUPKIS, et al., 1986; ANTOINE, et al., 1998; LANG, et al., 1994; LEAO, et al.,1995). Enzimas como catepsina B e catepsina L foram identificadas em *Leishmania* do complexo mexicana e algumas dessas enzimas detectadas em megassomos (COOMBS; ROBERTSON; MOTTRAN, 1991; ROBERTSON; COOMBS, 1993). Esses dados são consistentes com o envolvimento dessas enzimas na degradação de moléculas classe II internalizadas (LEAO, et al., 1995).

Amastigota intracelular, portanto, são capazes de internalizar as moléculas MHC classe II (LEAO, et al., 1995). Moléculas MHC classe II que alcançam o VP estão associado com membrana plasmática de amastigotas e permaneceram assim mesmo após extração do parasito. Esses resultados provavelmente indicam que moléculas MHC II que alcança VP estão ainda associado com cadeia Ii ou fragmento de cadeia Ii mas que posteriormente são rapidamente degradada nessas organelas por cisteína protease do hospedeiro (PRINA, et al., 1990; LANG, et al.,1994; LEAO, et al.,1995).

Proteínas de membranas, exceto moléculas MHC classe II e cadeia Ii, não são detectados dentro do parasita, o que sugere que a internalização de moléculas classe II por amastigotas envolve um processo seletivo. Sendo assim a polarização de moléculas classe II associada ao VP junto com o sitio de ligação da amastigota (LANG et al 1994) e a internalização e degradação dessas moléculas classe II por amastigota de *L. amazonensis*, são muito provavelmente dois fenômenos ligados, que necessita ser considerado na evolução da capacidade de apresentação de antígeno de macrófagos infectados. Podendo este processo ser considerado um caminho pelo qual esta espécie de *Leishmania* lida com o processo de apresentação de antígeno (LEAO, et al.,1995).

1.3.2 SNARES e *Leishmania amazonensis*

Células eucarióticas contém organelas delimitadas por membrana que comunicam entre si através do tráfego de vesículas, que usualmente envolve a geração destas vesículas a partir de uma membrana precursora, o transporte para seu destino e, por ultimo, a fusão das vesículas com o compartimento alvo. Desde a descoberta das proteínas SNARES (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) em 1980, elas tem sido reconhecidas como componentes chave do complexo de proteínas que direcionam a fusão de membrana (JAHAN; SCHELLER, 2006). Proteínas SNARE funcionam por formação de complexos quaternários compostos tipicamente de molécula SNARE de uma vesícula doadora (também chamada de v-SNARE ou R-SNARE) e molécula SNARE de uma membrana alvo (também chamado t-SNARE ou Q (a, b ou c) SNARE) que combinam para formar uma estrutura como zipper que promove a fusão de duas membranas opostas de compartimento vacuolar ou vesicular (FASSHAEUER, et al., 1998).

Cerca de 90% do VP de *Leishmania* exibem moléculas de membrana residentes no retículo endoplasmático na sua membrana nos tempos iniciais após a formação deste VP. Essa interação com moléculas do retículo endoplasmático contribui para características do VP tais como distensão, sobrevivência do parasito e replicação dentro de células (NDJAMEN, et al., 2010). A distensão do VP é em parte resultado da fusão de VPs na célula e em outra parte fusão de VPs com vesículas celular e organelas (REAL; POUCHELET; RABINOVITCH; 2008).

VPs de *Leishmania* exibem Sec22 na sua membrana em tempos iniciais após infecção (NDJAMEN, et al., 2010). Em tempos mais tardios, 48 horas, cerca de 90% da membrana do VP de *L. amazonensis* são positivos para D12, STX18 e STX5 (CANTON, et al., 2012). Estudos mostraram que macrófagos de camundongos nocautes para Sec22, D12 ou STX5 infectados resultou numa significativa menor carga parasitaria por célula, e redução da distensão do VP, após 48 horas de infecção. O bloqueio dessas SNARES pode resultar num limitado desenvolvimento do VP e pobre sobrevivência do parasito e replicação em células infectadas. Nem todas SNARES que parecem produzir alguma redução no tamanho do VP necessariamente resultam na limitação da replicação do parasita, como no caso do STX18 (CANTON, et al., 2012; CANTON; KIMA; 2012).

Portanto a segmentação de SNARES RE/Golgi pode resultar na inibição da distensão do VP em células infectadas por *L. amazonensis* (CANTON, et al., 2012).

1.3.3 LYST/Beige e *Leishmania amazonensis*

O gene *lyst* inclui seis exons, e codifica uma grande proteína citosólica, LYST que é um regulador de tráfego lisossomal. A função desta proteína pode estar envolvida na distribuição de proteínas de membrana envolvidas no controle da morfologia lisossomal (FAIGLE, et al., 1998).

A mutação deste gene que codifica a proteína LYST, resulta em desordens imunológica e suscetibilidade para múltiplas infecções em crianças, como no caso da Síndrome Chediak-Higashi (SCH) que é uma doença autossômica recessiva, que gera células que apresentam lisossomos alargado (FAIGLE et al., 1998). Essa doença afeta a morfologia e a função de compartimentos endocíticos e este defeito em todas as células afetam principalmente importantes funções biológicas nas células hematopoiéticas.

Nestas, incluindo linfócitos T, NK, e granulócitos, a citotoxicidade é deficiente, provavelmente por causa do defeito na regulação da secreção (BAETZ, et al., 1995; RODER, et al., 1980). Ainda não está claro se o defeito na função secretória de lisossomos em células hematopoiéticas é uma consequência ou a causa de morfologia lisossomos anormal. Em adição LYST parcialmente co-localiza com microtúbulos, que tem previsivelmente apresentado um papel crítico no transporte a partir de endossomos inicial para tardio (COLE; SCHWARTZ, 1995; FLAIGE, et al., 1998).

O processo global de apresentação de antígeno é afetado em SCH. Este problema com a apresentação de antígeno pode resultar de diferentes mecanismos, carregamento deficiente de peptídeos para moléculas MHC classe II e ou ineficiente transporte do complexo MHCII-peptídeo na superfície da célula (FAIGLE, et al., 1998).

Portanto, em células SCH a ausência de proteínas endossomais residente em endossomos multivesicular tardio, bem como a localização mista de várias dessas proteínas para endossomos inicial/membrana plasmática ou lisossomos, sugerem um defeito na triagem/distribuição de proteínas de membrana em compartimentos endocíticos tardio, ao invés de defeito na fusão. A formação de macrolisossomos alargados poderia então representar a consequência indireta da falta de distribuição de proteína de membrana envolvida no controle da morfologia lisossomal (FAIGLE et al 1998).

Superexpressão de LYST/Beige (homólogo no camundongo) reduz o tamanho do lisossomos sugerindo que essa proteína citosólica é envolvida na regulação do tamanho das organelas (PEROU et al,1997).

A transcrição do gene LYST/Beige é regulada em macrófagos e fibroblastos infectados por *L. amazonensis*. Mutação neste gene causa uma maior expansão do VP e uma maior replicação do parasita. Em contraste, superexpressão do LYST/Beige leva a pequenos VPs que não sustentam o crescimento do parasita. Examinando o impacto da expansão VP no destino dos parasitas, evidencia-se que tamanho do VP é um importante determinante de sobrevivência intracelular. E o aumento da expressão de LYST/Beige funciona como uma resposta imune inata para restringir o crescimento de leishmania por conter a expansão do VP (WILSON et al,2008).

2.0 Objetivo

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do MHC de classe II na biogênese do vacúolo parasitóforo de *Leishmania amazonensis* e seu impacto no curso da infecção *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

1. Analisar se a ausência da expressão das moléculas de MHC classe II na membrana do vacúolo parasitóforo interfere na expansão deste VP, e na multiplicação do parasito.
2. Avaliar escore inflamatório, perfil de citocinas, e carga parasitária nos ensaios *in vivo* com camundongos *mhcii^{-/-}* e *Wild Type* C57BL/6 (WT).

3.0 Material e Métodos

3.1 Aspectos ético e local do estudo

Este estudo foi realizado respeitando-se todas as normas de biossegurança. Para execução dos experimentos descritos no presente trabalho envolvendo a utilização de animais, o projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU. A aprovação do projeto (Protocolo nº 085/12) segue em Anexo.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tripanosomatídeos e no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), localizado no bloco 6T sala 07.

3.2 Parasitos

Promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio BHI suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil), 100mg de gentamicina/mL e 2 mM L-glutamina (Gibco BRL, Life Technologies, de Nova York, EUA), a 26 °C. Parasitas na fase estacionária foram utilizados para a infecção de camundongos BALB/c. Cerca de 1×10^7 parasitos foram inoculados com Seringa de Insulina 1ml (bico slip com Agulha 13 x 3,8 – BD), nas patas desses camundongos, mantidos durante seis a oito semanas, e após este período os animais foram sacrificados e retirados as patas para recrutamento de amastigotas.

3.3 Purificação de amastigotas a partir de lesões de patas de camundongos BALB/c

Após 8 semanas do inóculo, os camundongos foram sacrificados, removidas as patas traseiras, imergido em álcool 70% por 5 minutos, lavado com RPMI sem soro fetal bovino por 3 vezes. A pata foi colocada em placa petri estéril, retirado a pele, adicionado meio RPMI na placa e iniciado processo de raspagem da lesão. Após este

processo, o material lavado foi transferido para um pistilo para rompimento das células, e transferido para um tubo falcon de 15 ml. Foram realizadas sucessivas centrifugações seriadas e diferenciais, sendo que na ultima centrifugação o pellet foi ressuspensão em PBS estéril, passado por 6 vezes em Seringa de insulina (1ml bico slip – BD), para dissociar os parasitos. Realizou-se a contagem na câmara de newbauer e foram utilizados conforme cada experimento.

3.4 Animais

Camundongos C57BL/6 *Wild Type* (WT) e nocautes para MHC classe II(*mhcii^{-/-}*); e BALB/c foram cuidados, manipulados e sacrificados conforme normas estabelecidas pela Universidade Federal de Uberlândia. Os animais *mhcii^{-/-}* foram fornecidos gentilmente pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e mantidos no Biotério da UFU em condição padrão de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, em isoladores, temperatura de 25± 2°C, com ração e água “*ad libitum*”, repostos periodicamente. Camundongos de 6 a 8 semanas foram utilizados nos experimentos.

3.5 Ensaio *in vivo*

Foram utilizados 2 grupos de camundongos WT e *mhcii^{-/-}*. Estes foram divididos em dois grupos principais: 10 não infectados e 20 infectados. Do grupo dos infectados foram 10 animais *mhcii^{-/-}*, e 10 animais WT. No grupo dos não infectados foram 5 animais *mhcii^{-/-}*, e 5 WT.

Para a infecção dos animais foram utilizados formas amastigota de *Leishmania amazonensis* na quantidade de 2×10^7 por animal. Com o auxílio de uma seringa de Insulina 1ml bico slip com Agulha 13 x 3,8 - BD, foram inoculados 40 µl, contendo 10^7 amastigota (diluídos em PBS 1x), nas patas posteriores direita e esquerda (via intradérmica) de cada camundongo.

3.5.1 Medição e registro visual das patas

A cada semana, foram medidas a altura e largura das patas direitas e esquerda de cada animal, com o auxílio de um paquímetro digital (Paquímetro digital universal, escala de medição: 0-150 mm/ 0-6 polegadas; resolução: 0,01 mm / 0,0005 polegadas); durante seis semanas. Com auxílio da câmera de um celular Android (Samsung Galaxy S4) foram fotografadas as patas direita e esquerda de um animal por grupo, com escala definida. Esse procedimento foi realizado no dia da inoculação e no dia do sacrifício.

3.5.2 Coleta de órgãos

Ao final das seis semanas, os animais foram eutanasiados e tiveram alguns órgãos coletados para posteriores análises. Foram coletadas as patas direita e esquerda, baço e linfonodos poplíteos direito e esquerdo.

Linfonodo poplíteo esquerdo, metade longitudinal do baço e raspado da pata esquerda foram macerados, partes foram armazenadas em 1 ml de solução de *complete* (inibidor de protease), presente no interior de tubos de polipropileno de 2 ml; parte foi armazenada em 1 ml de Ribozol em tubo de polipropileno de 2 ml; e a outra armazenada em tubo de polipropileno 2 ml para posterior realização de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Estes foram armazenados em *freezer* -80°C, para posterior realização dos ensaios de ELISA, qPCR e RT-PCR.

Linfonodo poplíteo Direito, metade longitudinal do baço e pata Direita foram armazenados no interior de tubos de polipropileno de 50 ml e fixados em formaldeído 4% para posterior confecção de lâminas histológicas.

Os baços, linfonodos e patas foram fotografados com câmera digital, e com escala definida, objetivando demonstrar o aumento do órgão ao longo da infecção.

3.5.3 Medida da área dos órgãos de animais *mhci1^{-/-}* e WT

Para avaliação morfológica da área do linfonodo poplíteo e baço de animais infectados e não infectados, a área foi delimitada com régua graduada em centímetros,

as imagens foram capturadas com câmera do celular, e posteriormente analisado pelo software Image J1.48.

3.5.4 Análise histológica

Os órgãos recolhidos, tais como linfonodo poplíteo direito, metade longitudinal do baço e pata direita foram processados para análise histológica. Foram fixados em formaldeído 4% (em PBS), posteriormente desidratados em álcoois de crescentes concentrações, diafanizados em xilol e finalmente incluídos em parafina. Foram feitos cortes de 5 μm de espessura e colocados em lâminas de vidro. Subsequentemente tais cortes foram corados com hematoxilina e eosina e fotos foram capturadas em microscópio de luz com câmara acoplada. Foi analisado a quantidade de células inflamatórias presentes nos tecidos e tamanho do vacúolo entre os diferentes grupos.

Para analisar quantidade de células inflamatórias foi estabelecido critério dos autores *Santos Lima and Minoprio, 1996*.

Scores:

- (0) 0 – ausente
- (1) \pm - raro e fraco
- (2) + - ocasional e atenuado
- (3) ++ - frequente e intenso
- (4) +++ - frequente e muito intenso

3.5.5 PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para quantificação de parasitos nas patas de camundongos infectados

Para a construção da curva padrão utilizou-se 10^8 formas promastigota de *L. amazonensis* que foram diluídas em solução salina de PBS 1x até completar o volume de 1000 μl . A partir deste, foram realizadas 12 diluições seriadas na base 10, objetivando a construção dos pontos da curva padrão. Essas soluções foram armazenadas em *freezer* a -20°C . Posteriormente, dois camundongos C57BL/6, com

oito semanas de vida, foram eutanasiados e tiveram ambas as patas coletadas. Para obtenção do tecido, foi feita a raspagem das patas em placas de petri, com o auxílio de lâmina cortante. O raspado de cada pata foi diluído em 1 ml de PBS 1x e armazenado em *freezer* a -20°C.

O DNA da pata de camundongo foi extraído utilizando o kit comercial *Genomic PureLink® (Invitrogen)*, de acordo com instruções do fabricante e foram amplificados utilizando o par 13A de iniciadores (5' - GGG GTG GAG TCT GGG CGT -3 ') e 13B (5'- ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT- 3'), conforme descrito por Rodgers et al . (1990), o que resulta na amplificação de um fragmento de 120 pb de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania spp.* Para a extração do DNA, foi adicionado o kit em cada tubo que continha o tecido da pata dos animais, 180 µl de tampão lise genômico e 20 µl de proteinase K. Em seguida, os tubos foram submetidos a banho seco a 55°C e deixados *overnight*. Após, os tubos foram centrifugados com rotação máxima por 3 minutos, onde o sobrenadante foi transferido para novos tubos de polipropileno estéreis. Foi adicionado ao sobrenadante 20 µl de RNase A, os quais foram homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por dois minutos. Após isso, as soluções, contendo o tecido, foram transferidas para os tubos de polipropileno que continham as diluições seriadas de *L. amazonensis*. Em seguida, foi adicionado 200 µl de tampão lise genômico e homogeneizado com o vortex por cinco segundos. Posteriormente, foi transferido o conteúdo para uma coluna específica do kit, a qual tem afinidade e se liga ao material genético para a sua posterior eluição. Seguiu-se a centrifugação dessa coluna a 13.500 RPM, por 1 minuto. Após, foram realizadas duas lavagens consecutivas da coluna com tampão WASH (próprio do kit), pela centrifugação a 13.500 RPM por 1 minuto. Após, realizou-se a eluição do DNA, adicionando-se elute buffer e centrifugando a coluna a 2000 RPM por 2 minutos.

O DNA da pata de camundongo foi extraído utilizando o kit comercial *Genomic PureLink® (Invitrogen)*, de acordo com instruções do fabricante e foram amplificados utilizando o par 13A de iniciadores (5' - GGG GTG GAG TCT GGG CGT -3 ') e 13B (5'- ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT- 3'), conforme descrito por Rodgers et al . (1990), o que resulta na amplificação de um fragmento de 120 pb de DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania spp.*

Para as reações de qPCR, com um volume final de 12,5 µL , foram adicionados 2 µL (~ 50 ng) de DNA extraído. Fizemos uso do reagente *SYBR ® Green PCR Master Mix*

(2X) (*Applied Biosystems*), contendo SYBR® Green Dye AmpliTaq Gold® DNA polimerase, dNTPs com dUTP, Rox referência passiva, tampão com componentes otimizados, e 10 µM de cada primer (*forward* e *reverse*). As reações foram realizadas na plataforma ABI7300 (*Applied Biosystems*) com o seguinte programa: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 63°C por 45 seg e 72°C por 30 segundos. Após o alongamento final da PCR, as amostras foram submetidas à variação de temperatura de 50 a 95°C, com um aumento gradual de 0,5 ° C / s para se obter a temperatura de fusão (T_m) e produtos não específicos .

Quantificação absoluta

Para realizar a PCR quantitativa (qPCR) , nós elaboramos uma curvas padrão com diluições seriadas a partir de uma amostra com promastigotas de *Leishmania amazonensis* (10⁶parasitas/mL) e 20 mg de amostra de tecido da pata de um camundongo C57BL / 6 não infectado , perfazendo um volume total de 100 µL. A extração do DNA, em seguida, foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para cada curva padrão, o *software* SDS 7300 (*Applied Biosystems*) procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculou a regressão linear e forneceu o R², o *slope* (inclinação da curva) e o *y-intercept*. O R² mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão (um valor de 1 indica uma juste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). O *slope* indica a eficiência da amplificação para o ensaio (um valor de 3,32 representa 100% de eficiência), e o *y-intercept* indica o valor esperado de Ct para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se o *slope* pode se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ (APPLIED BIOSYSTEMS, 2012).

3.5.6 Resposta imune

Foi feita a dosagem de citocinas IL-12, IFN-γ, IL-4, TNF em amostras de tecidos das patas, baço e linfonodo de camundongos *mhci1^{-/-}* e WT infectados por amastigotas de *L.amazonensis*. Todos os procedimentos e reagentes utilizados foram provenientes do kit BD Biosciences®. Primariamente, uma placa de ELISA de 96 poços foi sensibilizada com o anticorpo de captura da citocina em questão, diluído em tampão carbonato ou tampão fosfato constituído por 0.1 M de bicarbonato de sódio, 8.40 g NaHCO₃, 3.56 g Na₂CO₃, pH 9.5. Esse processo permaneceu “overnight”. Após, a

placa foi lavada e bloqueada com PBS suplementado com soro fetal bovino (10%) por 1 hora. Subsequentemente, as amostras foram adicionadas nos poços e para obter-se a curva padrão foi adicionado aos primeiros 16 poços 50 µL das citocinas recombinantes por 2 horas. Finalmente, foi adicionado o anticorpo de detecção a cada poço, e após 1 hora foi adicionada a solução enzima e substrato para revelação do resultado. A leitura foi feita em absorbância de 450 nm, e foi comparado a dosagem de citocinas nas células tipo selvagem e deficientes para moléculas MHC classe II para verificarmos as diferenças do perfil de citocinas nos gupos estudados.

4.0 Ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais

Foram utilizados 2 grupos de camundongos *mhcii^{-/-}* e WT. Estes foram divididos em 16 infectados, sendo 8 animais *mhcii^{-/-}* e 8 WT.

Para a infecção dos animais foram utilizados formas amastigota de *L. amazonensis* na quantidade de 5×10^7 por animal. Com o auxílio de uma seringa de Insulina 1ml bico slip Com Agulha 13 x 3,8 - BD, foram inoculados 1ml, contendo 5×10^7 amastigota (diluídos em PBS 1x), intraperitoneal em cada camundongo.

4.1 Coleta de macrófagos peritoneais

Nos tempos de 48, 72, 96, horas após o inoculo, animais foram eutanasiados e foram recrutados os macrófagos peritoneais. Para o recrutamento foram utilizados seringa 5 ml acoplada com agulha 25x6mm (BD) preenchida com 5 mls de meio DMEM a 10% de soro fetal bovino gelado. Este meio foi inoculado via intraperitoneal, aguardado 1 minuto, homogeneizado no abdômen e aspirado o conteúdo. Após, o material coletado foi transferido para tubo falcon, homogeneizado e realizado a contagem utilizando câmara de newbauer. Foram plaqueados em placas de 24 poços contendo lamínula, cerca de 2×10^5 célula por poço, deixado por 24 horas em estufa a 37 graus e 5% de CO₂, para aderência dos macrófagos. Após este período as lamínulas foram fixadas Bouin para coloração em Giemsa.

4.2 Análise por GIEMSA

Após a fixação e de cada tempo analisado, as lamínulas foram fixadas com Bouin, lavadas com PBS e coradas com Giemsa (SIGMA- ALDRICH) (1:20) por 40 minutos.

Após esse tempo as lamínulas foram descoradas com concentrações decrescentes de acetona e crescente de xilol (VALLADA, 2002). Colado lamínula em lâminas de vidro, com phermont, capturado imagem através de microscopia de luz com câmera acoplada. Foram quantificado numero de amastigotas em 100 macrófagos infectados, numero de parasitas por vacúolo parasitóforo, numero total e a área destes vacúolos.

4.3 Medida da área vacuolar de *L.amazonensis* em macrófagos

Para avaliar tamanho da área do VP de amastigotas em macrófagos *mhci1^{-/-}* e WT, imagens foram capturadas por microscópio de luz acoplado com câmera e a área foi delimitada, e analisada utilizando software Image J1.48.

5.0 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes, em triplicata. A comparação de dados entre os grupos foram analisadas pelo teste one way- ANOVA, com pós teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6.0 Resultados

6.1 Efeito da ausência da molécula de MHC classe II no curso da infecção *in vivo* em camundongos *mhci^{-/-}* e WT infectados por amastigota de *L.amazonensis*.

6.1.1 Ausência do MHC II levou a uma área menor do linfonodo e baço, e um aumento do volume das patas ao longo da infecção o que não foi maior em comparação aos animais selvagens.

Ensaio *in vivo* foram realizados infectando as patas de camundongos *mhci^{-/-}* e WT, para compreendermos melhor o efeito da ausência de moléculas de MHC classe II neste ensaio. Após período de 6 semanas de infecção, e ao fazer análise morfológica nós observamos que a área do linfonodo poplíteo e baço de camundongos WT mostrou um significativo aumento quando o animal foi infectado por amastigotas de *L.amazonensis*. Diferentemente, não foi observada alteração significativa em camundongos *mhci^{-/-}* infectados (Figura 2 A, B). O tamanho da lesão nas patas dos animais infectados foram monitoradas por 6 semanas. A figura 2 C mostra que houve uma aumento da área e do volume das patas em animais *mhci^{-/-}* e WT infectados com relação aos não infectados, porém não houve diferença significativa e nem presença de necrose entre os dois grupos analisados. Figura 2 D, mostra diferentes características apresentadas nos linfonodos, baços e patas dos dois grupos analisados, evidenciando uma menor área do linfonodo dos animais nocautes e uma maior vascularização e maior área deste órgão nos animais WT. O baço de camundongos *mhci^{-/-}* apresentando uma menor área e as patas não apresentando diferenças significativas entre os dois grupos e não houve presença de necrose.

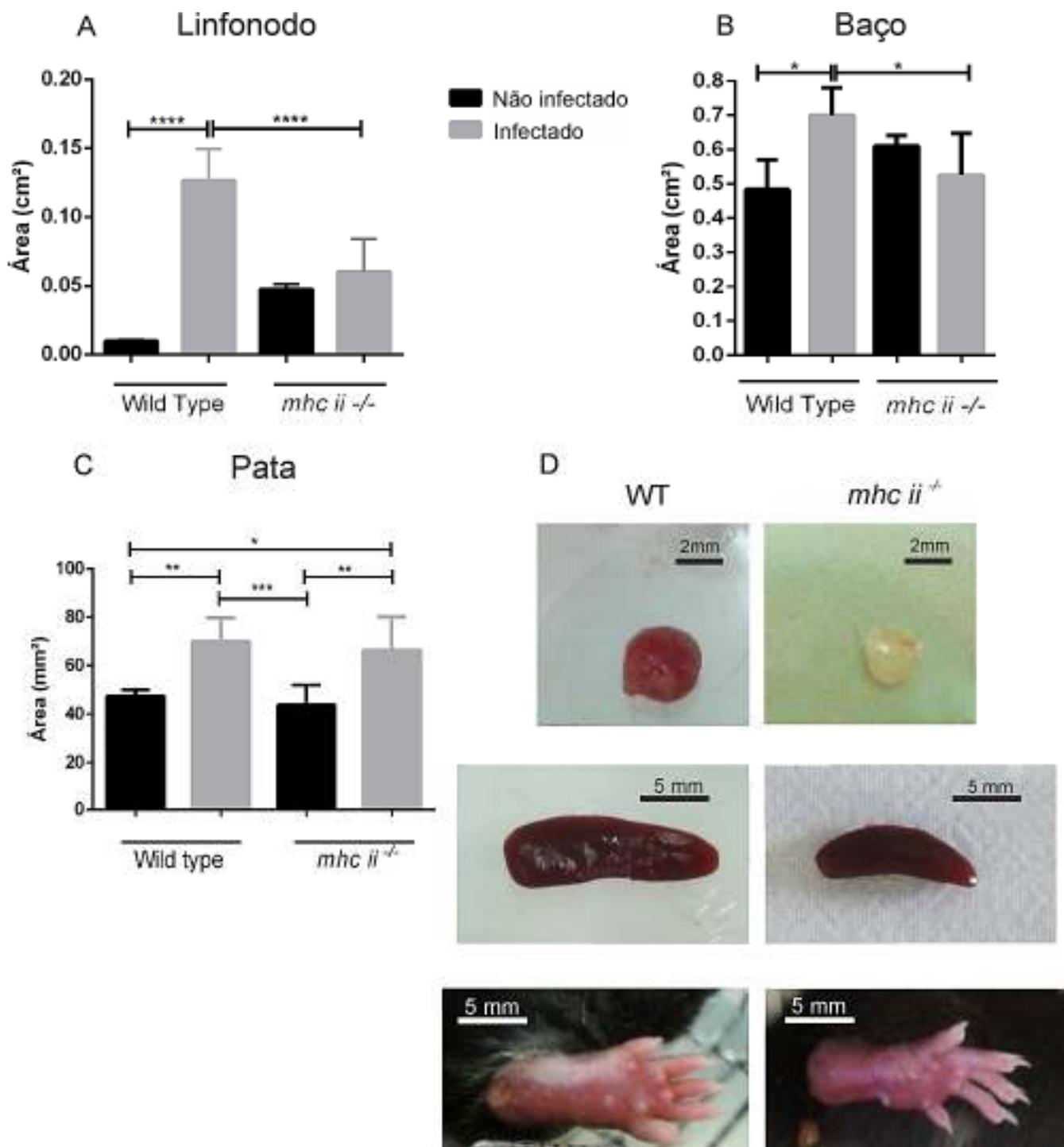


Figura 1: Avaliação do tamanho da lesão na pata e medida da área do linfonodo poplíteo e baço. Medida da área do linfonodo poplíteo (A), baço (B), pata (C) de camundongos *mhcii*^{-/-} e wild type C57BL/6 infectados e não infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. (D) Imagens ilustrando áreas dos linfonodo, baço e pata de animais infectados dos dois grupos. Note que camundongos KO não apresentaram alteração significativa na área dos órgãos. Asterisco indica diferentes significância, * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001, **** P < 0.0001.

6.1.2 A ausência do MHC II alterou o padrão de resposta imune em camundongos infectados por *L.amazonensis*.

Com relação ao perfil de citocinas produzidas nas patas, linfonodos poplíteos e baços, nossos resultados mostraram que nos animais WT, a produção de IL-4 e IL-12 foi aumentada no linfonodo. Em contraste, estas mesmas citocinas foram mais expressas nas patas e baço de camundongos *mhcii*^{-/-} (Figura 3 A, B, C, D, E, F). Houve um aumento na produção de IFN- γ nos dois grupos, porém esse aumento foi mais significativo nos WT.

Por outro lado, a expressão de TNF- α foi reduzida em linfonodos e baço de camundongos WT infectados (Figure 2 G, H, I).

Portanto, estes resultados sugerem que o efeito da não progressão da lesão/doença em animais *mhcii*^{-/-} não é devido ao aumento da resposta Th1.

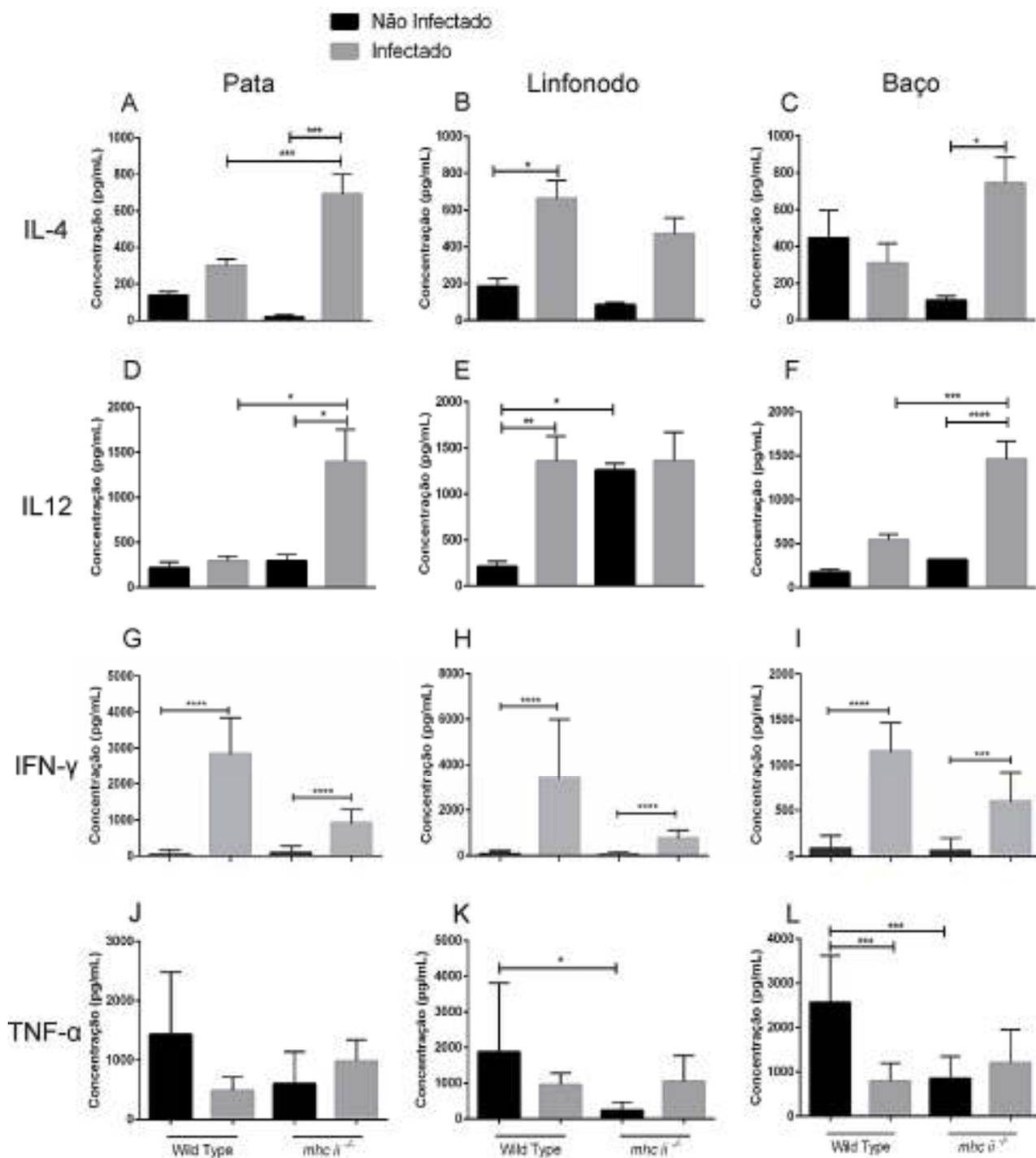


Figura 2: Detecção de citocinas por ELISA em patas, linfonodos poplíteo e baço de camundongos *mhcii*^{-/-} e wild type C57BL/6 infectados e não infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Níveis de IL-4 (A,B,C), IL-12 (D,E,F), INF- γ (G, H, I) e TNF- α (J, K, L) são expressos de acordo com a curva padrão. O resultado representa a média e o desvio padrão de dois experimentos realizado em triplicata usando 5 animais por grupo. * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001, **** P < 0.0001

6.1.3 Análise histológica

Após seis semanas de infecção, camundongos *mhcii*^{-/-} e WT foram eutanasiados e as patas, linfonodo poplíteo e baço foram fixadas em formol a 10% e emblocados em parafina, em seguida, avaliamos os cortes histológicos corados com HE por microscopia ótica. Durante a avaliação histológica do baço, linfonodo e pata de camundongos WT e *mhcii*^{-/-} observamos que 6 semanas após infecção, esses três órgãos distintos, de ambos os grupos de animais, apresentaram alterações histopatológica. A análise histológica de patas de camundongos WT infectados apresentou hiperplasia de macrófagos associado a moderado parasitismo, com amastigotas dentro de vacúolos de maior área, e um denso infiltrado inflamatório. Na pata de animais *mhcii*^{-/-} infectados observamos denso infiltrado inflamatório com presença de macrófagos infectados apresentando VPs menores com relação ao WT. O linfonodo apresentou-se repleto de macrófagos, isolados, alguns parasitados com formas amastigotas, em animais WT e *mhcii*^{-/-} infectados, Figura 4(A, B, C, D).

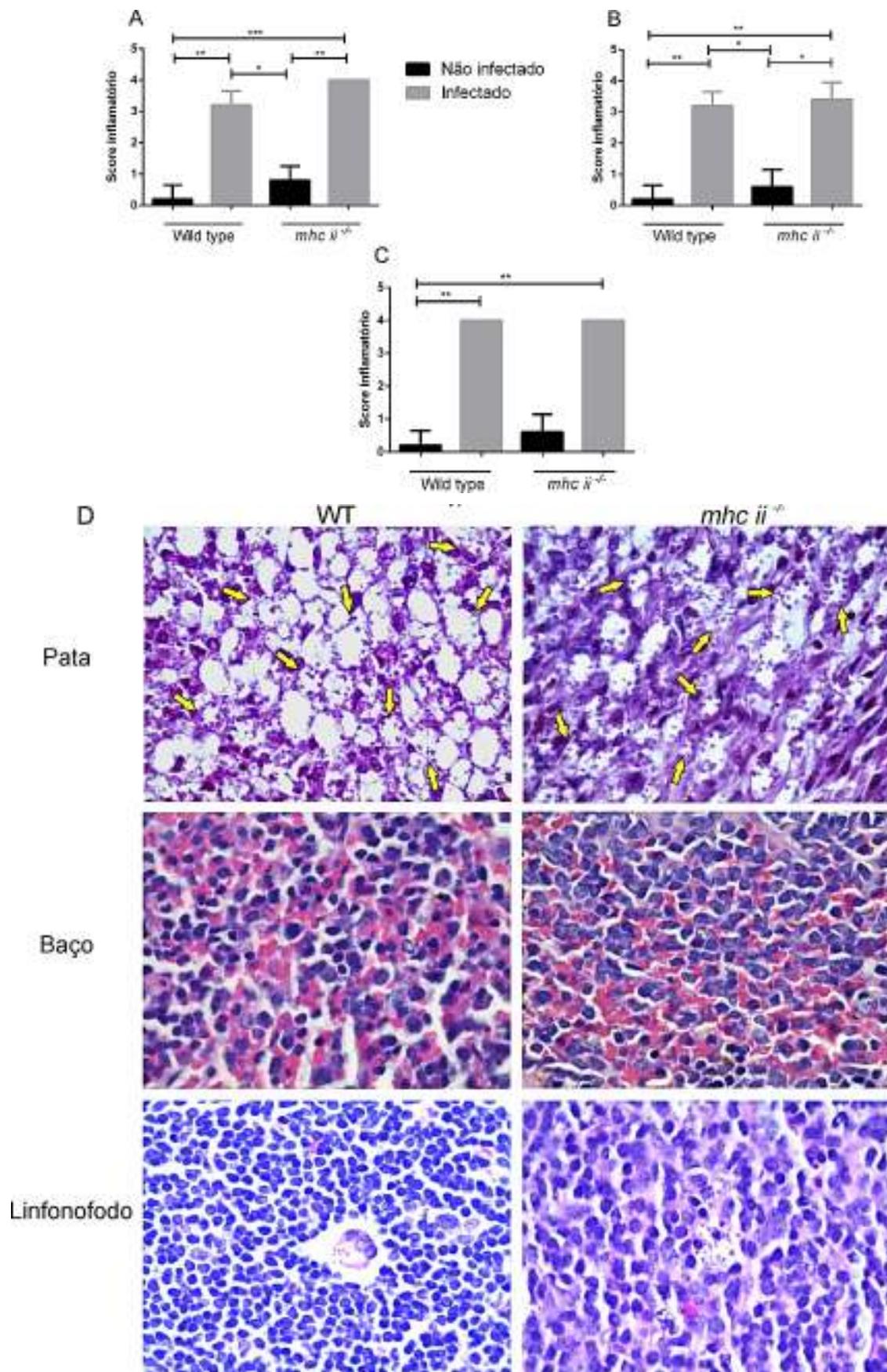


Figura 3. Avaliação histopatológica. Avaliação score inflamatório em patas (A), Baço (B) e linfonodos poplíteo (C) de camundongos wild type and *mhcii^{-/-}* infectados e não infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. (D) Imagens dos cortes histológicos mostrando áreas de inflamação dos linfonodo, baço e pata de animais infectados dos dois grupos. As setas indicam parasitas(amastigota). O resultado representa a media e o desvio padrão de dois experimentos realizado em triplicata usando 5 animais por grupo. Asterisco indica diferentes significância, * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001

6.1.4 A ausência do MHC II não levou ao aumento da carga parasitaria nos animais infectados em comparação aos animais selvagem.

Nas amostras de patas de três experimentos realizados independentes, a positividade de *L. amazonensis* de camundongos WT foi superior do que as patas de animais nocautes. Com relação à quantificação absoluta, houve maior carga parasitária nos animais WT dos que nos animais *mhcii^{-/-}*, Figura 5 (A) com baixa diferença estatística no teste T pareado de amostras independentes ($p=0,004$). Ainda houve uma boa inclinação de curva (slope = 3.6) e $R^2 = 0,998$ tendo como exemplo o experimento 01, plotado pelo termociclador qPCR Applied Biosystems Figura 5(B).

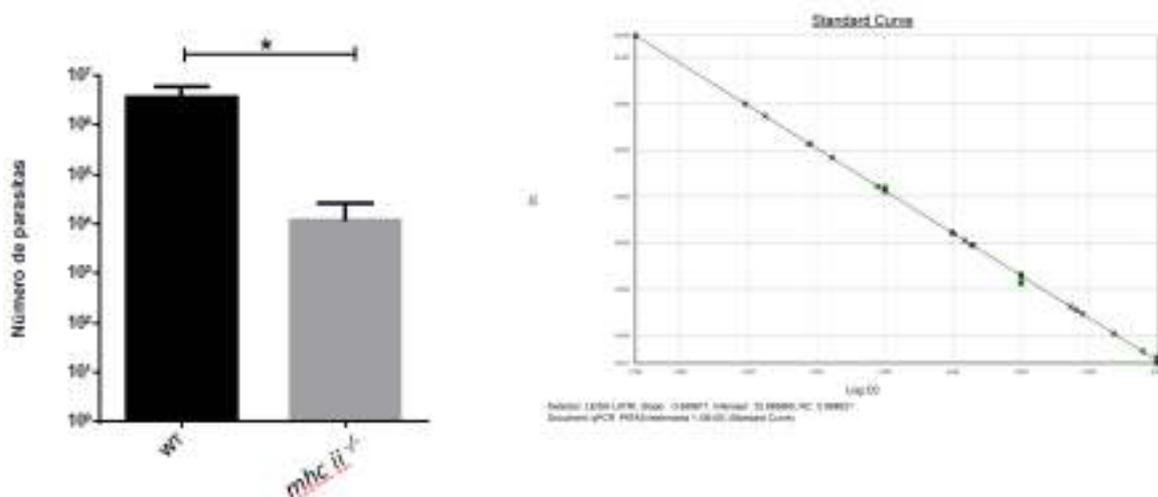


Figura 4: Quantificação de parasitas nas patas de animais infectados (PCR em tempo real). Após 6 semanas de infecção, realizamos análise da quantidade de parasito nas patas. (A) Número de parasitas nas patas de camundongos wild type and *mhcii^{-/-}* infectados por *L. amazonensis* ($P=0,004$) e (B) regressão linear da curva padrão com amostras, slope 3.6 e R^2 0,99.

Para avaliar a replicabilidade entre os ensaios da PCR quantitativa, avaliamos a media e desvio dos valores de Ct das curvas padrão, em triplicata, demonstrando uma boa eficiência entre as reações, em três pontos diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da replicabilidade entre os ensaios da PCR quantitativa. Análise entre ensaios: média e desvio padrão dos valores da curva padrão.

Media e desvio padrão ct	CURVA PADRÃO					
	10 ⁶		10 ⁵		10 ⁴	
	Media	DesvPad	Media	DesvPad	Media	DesvPad
Experimento 1	18,361	0,051	14,550	0,143	11,060	0,035
Experimento 2	19,066	0,043	15,338	0,216	11,593	0,108
Experimento 3	18,394	0,081	14,636	0,177	11,192	0,135
Todos experimentos	18,607	0,020	14,841	0,037	11	0,052

Ainda, para confirmar que cada amostra foi realmente positiva para *L. amazonensis* nas patas dos camundongos, procedeu-se a curva de dissociação, onde visualizamos a dissociação média em 80°C (Figura 6).

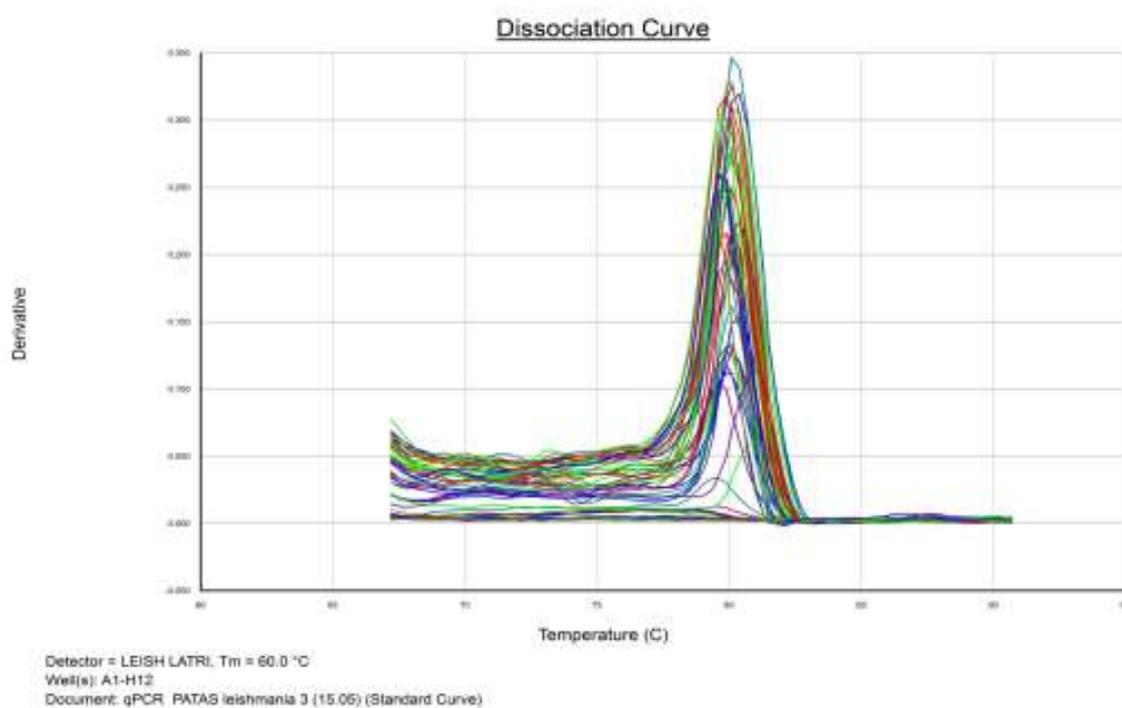


Figura 5: Dado representativo do qPCR em tempo real . Curva de dissociação, com temperatura média de 80°C.

6.2 A ausência das Moléculas de MHC classe II reduziu o tamanho do vacúolo parasitóforo e a carga parasitaria em macrófagos infectados por *L. amazonensis* em comparação aos selvagens.

Para compreendermos o papel das moléculas de MHCII no processo de biogênese do VP e carga parasitária de *L. amazonensis*, ensaios de multiplicação nos tempos 72, 96 e 120 horas, foram realizados com macrófagos peritoneais de camundongos *mhci^{-/-}* e WT. Os resultados mostraram uma redução significativa na carga parasitária em macrófagos de camundongos *mhci^{-/-}* ao longo do tempo de infecção, (Figura 1A). Houve uma aumento significativo no número de VPs nos tempos de 72 e 96 horas nos animais WT infectados, em comparação aos animais *mhci^{-/-}* infectados (Figura 1B), o que esteve congruente com demais resultados, que demonstram que macrófagos *mhci^{-/-}* abrigaram menos parasitas por vacúolo quando comparado a macrófagos WT (Figure 1C). Ao analisar o tamanho do vacúolo, observamos que a área foi significativamente menor ao longo do tempo de infecção, em macrófagos de camundongos *mhci^{-/-}* infectados com relação ao observado em macrófagos de camundongos WT (Figura D). Além disso, com 120 horas após infecção foi observado, apenas em macrófagos WT, uma ascendente curva considerando tamanho vacúolo parasitóforo por número de parasitas intravacuolar (Figura 1E). Figura 1F, mostra imagem de microscopia óptica, das características apresentadas pelos macrófagos infectados ao longo do tempo de infecção, evidenciando uma menor área do vacúolo parasitóforo e menor carga parasitaria nos animais *mhci^{-/-}*

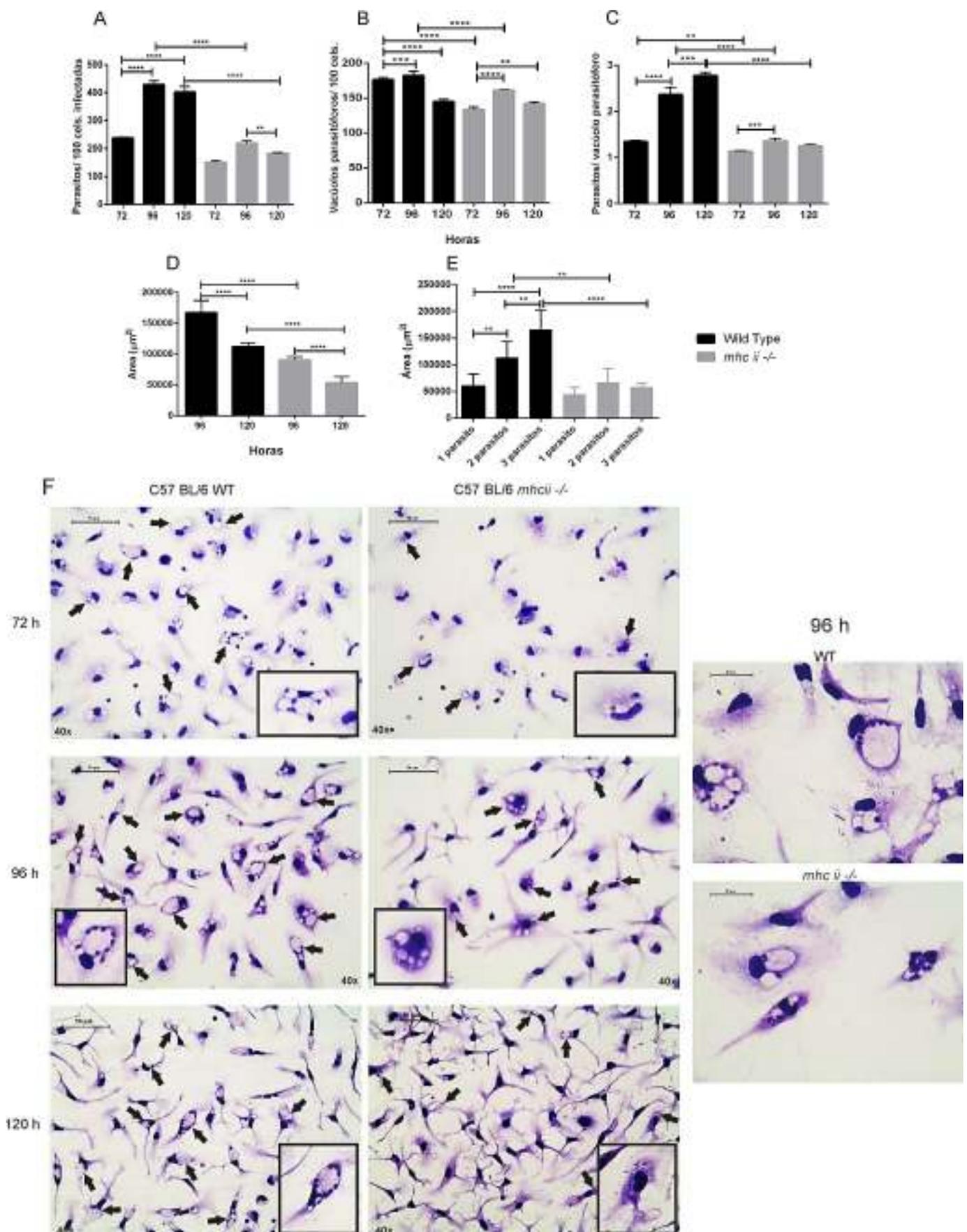


Figura 6. Efeito da ausência das Moléculas de MHC classe II na expansão do VP e carga parasitária. Ensaio de multiplicação com macrófagos peritoneais de C57/BL6 wild type e *mhcii*^{-/-} infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, nos tempos 72, 96 e 120 horas. Após cada tempo, as células foram fixadas e coradas com Giemsa (A) Número de amastigotas em 100 macrófagos infectados; (B) Número total de vacúolo parasitóforos; (C) Número de parasitas por vacúolo; (D) Área do vacúolo parasitóforo; (E) Correlação da área do vacúolo com número de parasitas; (F) Imagem de microscopia óptica mostrando diferentes características apresentadas pelos macrófagos, em aumento de 40x e 100x. Setas em amarelo indicam amastigota, e as setas verdes indicam vacúolo parasitóforo. Quadrado destaca célula infectada, presença de amastigota ancorada no vacúolo parasitóforo ** P < 0.01, ***P < 0.001 **** P < 0.0001

7.0 Discussão

As moléculas de MHC classe II na superfície de células apresentadoras de antígeno exibem uma gama de peptídeos para reconhecimento por receptores de células TCD4, tendo um papel central na resposta imune adaptativa. Sendo dessa forma essencial para a determinação do repertório de células T através das seleções conhecidas como positiva e negativa que ocorrem no timo; apresentação de antígenos para o reconhecimento e ativação de células T CD4 que levam ao desenvolvimento de mecanismos efetores contra patógenos; quando ativado, também pode mediar adesão celular, produção de citocinas, expressão de moléculas co-estimulatórias, proliferação celular e apoptose (JONES, et al., 2006; HASSAN, MOURAD, 2011). Nas infecções por *L. amazonensis*, ocorre uma redistribuição de MHC classe II passando a se localizar em maior quantidade na membrana do vacúolo parasitóforo, especificamente no mesmo sítio de ligação de amastigotas na membrana. Essas moléculas são internalizadas e degradadas dentro de megassomo, por cisteína-proteases do parasita. O processo de endocitose e degradação das moléculas MHC classe II poderia ser um meio de subversão da resposta imune do hospedeiro (LEÃO, et al., 1995; LANG, et al., 1994). Porém, neste estudo objetivamos verificar se esta interação seria somente um mecanismo de subversão do parasito contra a resposta imune ou se seria importante no processo de biogênese do vacúolo e progressão da doença.

A ausência do MHC classe II leva a deficiente ativação de células T CD4, uma vez que não há apresentação de antígeno via MHCII (ERB, et al., 1996). Sabendo que a resposta imune T helper tipo 1 (Th1) é importante para resposta imune contra parasitas intracelulares (MACEDO, et al., 2011), esperávamos ter uma progressão da doença nesses animais, como mostrado em experimentos com camundongos deficientes para MHC classe II infectados por *L. major* em que houve maior progressão da doença e morte de camundongos nocautes em comparação aos selvagens (ERB, et al., 1996). Entretanto nossos resultados demonstraram que não houve essa progressão no grupo nocaute em comparação ao selvagem, tendo em vista uma menor carga parasitária mostrado pela qPCR e lesões semelhantes nas patas dos dois grupos, sem presença de necrose. Este resultado corrobora os dados apresentados por Soong et al. (1997), no qual os autores verificaram que a deficiência na expressão de MHCII leva a uma resistência temporária à infecção por *L. amazonensis*.

O resultado da infecção com *L. amazonensis* é dependente da disponibilidade de INF- γ e da presença de IL4, IL10, TNF- α e IL12. Nos ensaios observamos que nos animais *mhcii*^{-/-} houve uma maior produção de IL4, justificando a menor produção de INF- γ nesses animais, visto que a maior produção de IL-4 leva a uma inibição da diferenciação para células Th1 (WURTZ; BAJENOFF; GUERDER, 2004).

A citocina IL-12 é produzida por macrófagos, atuando posteriormente em células NK e linfócitos, os quais, em contrapartida, produzem INF- γ , que atua novamente no macrófago induzindo-o a sintetizar óxido nítrico (compostos tóxicos para a eliminação dos agentes estranhos) (WOLF; SIEBURTH; SYPEK, 1995). Nos animais *mhcii*^{-/-} houve uma menor produção de INF- γ e aumento de IL-12. Portanto, com uma deficiência na resposta Th1, a superprodução de IL-12 talvez tenha sido para compensar a ausência de INF- γ , ou um mecanismo de tentar elevar essa produção. Essa menor produção também poderia estar relacionada com a ausência de ativação de células TCD4 nestes animais nocautes. Entretanto, menor produção de INF- γ e maior produção de IL-4, poderia levar a uma progressão da doença, o que não observamos.

Comparando histologicamente, observamos que os animais nocautes e WT infectados apresentaram inflamação. Analisando a área dos órgãos, observou-se uma área menor no linfonodo e baço dos animais nocautes infectados quando comparado com os animais WT. Essa menor área caracterizada provavelmente por uma menor inflamação, poderia levar a uma maior carga parasitária, o que não observamos quando avaliamos por qPCR, nos animais *mhcii*^{-/-}, que foi significativamente menor do que o WT. Além disso, a presença de amastigotas nos linfonodos de ambos os grupos nos indica que houve progressão do parasito. Contudo observamos que os macrófagos nas lesões das patas apresentaram um vacúolo maior com uma maior quantidade de parasitas nos WT, e nos animais *mhcii*^{-/-} houve menor número de macrófagos infectados e uma menor área do VP. Com isso, podemos inferir que a ausência da molécula MHC II teria um papel importante nesse processo.

Nos ensaios de multiplicação com macrófagos peritoneais observamos características da expansão do vacúolo e multiplicação dos parasitas semelhantes ao que foi visto nos tecidos. Nos animais WT houve um progressivo aumento da área do VP acompanhado pelo aumento do número de parasitos por vacúolo, enquanto que nos animais nocautes observamos vacúolos pequenos com uma quantidade pequena de

parasitos. Diante disso, podemos inferir que nos animais nocautes não houve maturação do VP, não apresentando um ambiente propício para multiplicação deste parasito.

Sabe-se que esta espécie de *Leishmania* desenvolve dentro de vacúolos grandes, os quais devem proteger o parasito de mecanismos de morte do hospedeiro, por diluição de moléculas microbicidas garantindo um ambiente favorável a sua sobrevivência e multiplicação (REAL, MORTARA, 2012). Neste contexto, vacúolos menores observados nos nossos experimentos de multiplicação com macrófagos peritoneais dos animais *mhcii*^{-/-} poderia justificar a menor multiplicação e sobrevivência intracelular do parasito.

Como a distensão do VP é resultado da fusão entre vacúolos e vesículas da via endocítica, algumas moléculas de membrana residente no retículo endoplasmático e que passam a ser exibidas na membrana desse VP contribuem para características tais como distensão, sobrevivência do parasito e replicação dentro de células (NDJAMEN, et al., 2010; REAL, et al., 2008). Algumas SNARES como sec22, D12 ou STX5 estão diretamente relacionada com a expansão desses VPs (CANTON, et al., 2012; CANTON; KIMA, 2012). A partir dessas informações e de nossos resultados o MHC II poderia estar envolvido, por um mecanismo ainda desconhecido, com a regulação da expressão dessas SNARES?

A proteína LYST, um regular de tráfego lisossomal, também está relacionada com a regulação do tamanho do vacúolo contendo *L. amazonensis*. A transcrição do gene LYST/Beige é regulada em macrófagos e fibroblastos infectados por este parasito, levando menor expansão do VP e uma menor replicação do parasito, em comparação aos nocautes pra esta proteina (WILSON, et al,2008). Nestes animais *mhcii*^{-/-} não poderia estar havendo super-expressão do LYST/Beige levando a pequenos VPs que não sustenta o crescimento do parasito?

Desta forma, observamos que as moléculas MHC classe II podem ter um papel importante na biogênese do vacúolo parasitóforo. Tal mecanismo envolvido não está claro e algumas questões podem ser levantadas: seria essa molécula responsável por algum mecanismo de fusão de vesículas com o vacúolo parasitóforo, de forma que tenha um papel direto na expansão do mesmo? A ausência desta molécula levaria a uma adaptação do hospedeiro levando uma maior expressão gênica de LYST e algumas SNARES que estão envolvidas diretamente na biogênese do vacúolo?

Assim, neste estudo mostramos que a expressão de MHCII desempenha um papel paradoxal importante na progressão da infecção por *L. amazonensis*. Contudo, os mecanismos subjacentes a este fenômeno, requerem novos estudos. Atualmente estamos trabalhando com a hipótese de alteração da expressão gênica de LYST e das SNARES que estão relacionadas na expansão desse VP, nestes camundongos *mhci^{-/-}*.

8.0 Conclusão

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, concluímos que a ausência das moléculas de MHC II provocou diminuição da área dos vacúolos parasitóforos, menor multiplicação e sobrevivência do parasita. Assim, acreditamos que a molécula de MHC II pode ter também um importante papel na biogênese deste vacúolo parasitóforo e na progressão da infecção. Dessa forma, o processo de degradação do MHC II não seria apenas um mecanismo utilizado pelo parasito para subverter a resposta imune do hospedeiro.

9. Referências

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSEL, D.G. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. *J. Cell Sci.* v.112, p.2993–3002, 1999.

ALVAREZ-RUEDA N., BIRON M., LE PAPE P. Infectivity of *Leishmania mexicana* is associated with differential expression of protein kinase C-Like Triggered during a Cell-Cell Contact. **PLoS ONE.** v. 4 (10), 2009.

ANDRADE, M.A.; BORK, P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. **Nat. Genet.** v. 11, p.115–116, 1995.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L. ; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v.31, p.109-118, 2012.

ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; COURRET, N, LANG. T. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. **Adv. Parasitol.** V. 58, p.1–68, 2004.

ANTOINE, J. C.; LANG, T.; PRINA, E.; COURRET, N.; HELLIO, R.. 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*. **Journal of Cell Science.** v. 112, p.2559-2570, 1999.

ANTOINE, J.C; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in microbiology.** V.7, n.10, p.392-401, 1998.

ANTOINE, J.C.; JOUANNE, C.; LANG, T.; PRINA, E.; CHASTELLIER, C. and FREHEL, C. Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.** v. 59, p.764-775, 1991.

ANTOINE, J.C.; PRINA, E.; JOUANNE, C.; BONGRAND, P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect Immunology**, v. 59, p. 764-775, 1990.

ANTOINE, J.; COLETTE, J.; RYTER, A.; BENICHO, J. *Leishmania amazonensis*: acid organelles in amastigotes. **Exp parasitol.** V.67, p. 287-300, 1988.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M. SOARES, R. P.; SALVATORE, J. T. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, p. 1354-1365, 2011.

BAETZ, K.; ISAAZ, S.; GRIFFITHS, G.M. Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. **J. Immunol.** v. 154, p.6122–6131; 1995.

BANULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol.** v.64, p.1–109, 2007.

BARBOSA, M.D.; BARRAT, F.J.; TCHERNEV, Q.A.; NGUYEN, V.S.; MISHRA, S.D.; COLMAN, E.; PASTURAL, R.; FISHER, A. Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse **Hum. Mol. Genet.** v. 6, p.1091–1098; 1997.

BARBOSA, M.D.; NGUYEN, Q.A.; TCHERNEV, V.T.; ASHLEY, J.A.; DETTER, J.C.; BLAYDES, S.M.; BRANDT, S.J.; CHOTAI, D.; HODGMAN, C.; SOLARI, R.C. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. **Nature.** v. 382, p.262–265, 1996.

BEATTIE, L.; KAYNE, P. M. *Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us? **Cellular Microbiology.** v.13, p.1659–1667, 2011.

BEIKAID, Y.B.; BUTCHER, B.; SACKS, D.L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. **European Journal of Immunology**, v. 28, p. 1389–1400, 1998.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion In Infectious Diseases**, v. 16, p. 397-401, 2003.

BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOE, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, K.; BRYCESON, A. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p. 25-32, 1998.

BERMAN, J. D.; GALLALE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem Pharmacol**, v. 36, p. 197-201, 1987.

BERTHOLET, S.; GOLDSZMID, R.; MORROT, A.; DEBRABANT, A. *Leishmania* antigens are presented to CD8⁺ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. **J Immunol**. v.177, p.3525–3533, 2006.

BORJA-CABRERA, G. P.; CRUZ MENDES, A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; HASHIMOTO OKADA, L. Y.; DE ATRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v. 22, p. 2234-2243, 2004.

CANTON, J.; KIMA, P.E. Targeting Host Syntaxin-5 preferentially blocks *Leishmania* parasitophorous vacuole development in infected cells and limits experimental leishmania infections. **The American Journal of pathology**. vol. 181, N 4, p.1348-1355; 2012.

CANTON, J.; NDJAMEN, B.; HATSUZAWA, K.; KIMA, P.E. Disruption of the fusion of *Leishmania* parasitophorous vacuoles with ER vesicles results in the control of the infection. **Cellular Microbiology**. v.14, p. 937-948; 2012.

COLE, N.B.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. **Curr. Opin. Cell Biol**. v. 7, p.55–64, 1995.

COOMBS, G.H.; ROBERTSON, C.D.; MOTTRAN, J.C. Cysteine proteinases of leishmanias. **In Biochemical Protozoology**. (ed G.H.Coombs e M.J.North), p. 208-220 ;1991.

COURRET, N.; FREHEL, C.; GOUHIER, N.; POUCHELET, M.; PRINA, E.; ROUX, P.; ANTOINE, J.C. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**. v.115, p.2303-2316; 2002.

COURRET, N.; FREHEL, C.; PRINA, E.; LANG, T.; ANTOINE, J.C. Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**. v.122, p. 263-279, 2001.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 72, p.132–141; 2002.

DAVIS, A. J.; KEDZIERSKI, L. Recent advances in antileishmanial drug development. **Current Opinion in Investigational Drugs**. v. 6, p. 163-169, 2005.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta** v.1455, p. 341–352, 1999.

DESJARDINS, M.; HUBER, L.A.; PARTON, R.G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **J Cell Biol**. v. 124, p. 677–88, 1994.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inibição da biogenese fagolisossomal pelo lipofosfoglicano da *Leishmania*. **J.Exp.Med**. 185, 2061-2068; 1997.

DENZIN, L. K.; FALLAS, J. L.; PRENDES, M.; Yi, W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. **Immunol**. v. 207, p 279–292, 2005.

ERB, K., BLANK, C., RITTER, U., BLUETHMANN, H., MOLL, H. *Leishmania Major* Infection in Major Histocompatibility Complex Class II-Deficient Mice: CD8+ T Cells Do not Mediate a Protective Immune Response. **Immunobiol.**, vol. 195, p. 243-260, 1996.

FAIGLE, W.; RAPOSP, G.; TENZA, D.; PINET, V.; VOGT, A.B.; KROPSHOFER, H.; FISCHER, A. Deficient Peptide Loading and MHC Class II Endosomal Sorting in a Human Genetic Immunodeficiency Disease: the Chediak-Higashi Syndrome. **The Journal of Cell Biology**. V. 141, p.1121–1134, 1998.

FASSHAUER, D., SUTTON, R. B., BRUNGER, A. T.; JAHN, R. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 15781–15786, 1998.

GAGNON, E.; DUCLOS, S.; RONDEAU, C.; CHEVET, E.; CAMERON, P.H; *et al.* Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. **Cell**. v. 110, p.119–131, 2002.

GUERRA, J. A. O.; RIBEIRO, J. A. S.; COELHO, L. I. A. R. C.; BARBOSA, M. G. V.; PAES, M. G. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar na comunidade de São João, Manaus, Amazonas, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 22, n. 11, p. 2319-2327, 2006.

HAYES, M.J.; RESCHER, U.; GERKE, V.; MOSS, S.E. Annexin-actin interactions. **Traffic**, v. 5, p. 571 – 576, 2004.

JAHN, R.; SCHELLER, R. SNAREs — engines for membrane fusion. **Nature reviews|Molecular Cell Biology**. v7, p. 631-643, 2006.

JONES, D.E; ELLOSO, M.M.; SCOTT, P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Bioscience**. v.3, pg.1171–1180, 1998.

KANE, M.M., MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.166, p.1141–1147, 2001

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p.604-615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis vaccine: where are we today? **J. Glob. Infect. Dis.** v.2, p.177–185, 2010.

KLEIN, J. Natural History of the Major Histocompatibility Complex, 1st edn. John Wiley & Sons: New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1986.

LANG, T.; CHASTELLIER, C.D; FREHEL, C.; HELLIO, R.; METEZEAU, P.; LEAO, S.S.; ANTOINE, J-C. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Cell Science**. v. 107, p. 69-82, 1994.

LEAO, D.S.; LANG, S.; PRINA, T.; ANTOINE, J.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**. v. 108, p. 3219-3231, 1995.

LIMA-JUNIOR, D.S.; COSTA, D. L; CARREGARO, V. ; CUNHA, L.D.; SILVA, A.L.N.; MINEO, T.W.P.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K.R.; FLAVELL, R.; BOZZA, M.T.; SILVA, J.S.; ZAMBONI, D.S. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature medicine**. v19, p.909-15 , 2013.

LOVE, D C.; KANE, M. M.; MOSSER, D M. *Leishmania amazonensis*: The Phagocytosis of Amastigotes by Macrophages. **EXPERIMENTAL PARASITOLOGY**. v.88, p.161–171, 1998.

MACEDO, A.B.B.; SANCHEZ-ARCILA, J.C.; SCHUBACH, A.O.; MENDONÇA, S.C.F.; MADEIRA F.M.; GAGINI, T.; PIMENTEL, M.I.F; LUCA, P.M. Multifunctional CD4+ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**. v.167, p. 505–513; 2011.

McCONVILLE M. J.; NADERER, T. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 6, p.543–561, 2011.

MISHRA, B. B.; SINGH, R. K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V. J.; TIWARI, V. K. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential antileishmanial agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, p. 107-123, 2009.

MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R., SARAVIA, N.G, 2005. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. v.366, p.1561–77, 2005.

MURRAY, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, p. 279-292, 2004.

NAGILL, R; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1464-1488, 2011.

NDJAMEN, B.; KANG, B-HO; HATSUZAWA, K.; KIMA, P. E. 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.

NG, L.G., HSU, A.; MANDELL, M.A.; ROEDIGER, B.; HOELLER, C.; MRASS, P.; IPARRAGUIRRE, A.; CAVANAGH, L.L; TRICCAS, J.A.; BEVERLEY, S.M.. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathog**. v.4, p.11, 2008.

PEROU, C.M.; LESLIE, J.D.; GREEN, W.; LI, L.; WARD, D.M. Ward DM, KAPLAN, J. The Beige/Chediak-Higashi syndrome gene encodes a widely expressed cytosolic protein. **J Biol Chem**. v. 272, 29790-4, 1997.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMblin, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAy, M.P; GERMAIN, R.N., SACKs D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**. v. 321, p.970–974, 2008.

PIERTNEY, S.B.; OLIVER, M.K. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. **Heredity**. v. 96, p.7–21, 2006.

PRATT, D.M.; DAVID, J.R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of Leishmania. **Nature**. v. 291, p.581–583, 1981.

PRINA, E.; JOUANNE, C.; LEAO, D.S.; SZABO, A.; GUILLET, A.; ANTOINE, J.C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with Leishmania amazonensis amastigotes. **J. Immunol**. v.151, p. 2050-2061, 1993.

PRINA, E.; ANTOINE, J.C.; WIEDERANDERS, B.; KIRSCHKE, H. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. **Infect. Immun.** v.58, p.1730-1737, .1990

PUPKIS, M.F.; TETLEY, L.; COOMBS, G.H. *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosomes. **Experimental Parasitology.** v.62, p.29-39, 1986.

REAL, F.; MORTARA, R. A. The Diverse and Dynamic Nature of *Leishmania* Parasitophorous vacuoles Studied by Multidimensional Imaging. **Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, p.1-13, 2012.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVICH, M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. **Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p.905-913, 2010.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M. *Leishmania (L.) amazonensis*: fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. **Exp Parasitol** v.119, p. 15–23, 2008.

REINER, S.L., LOCKSLEY, R.M. The Regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v.13, p.151–177, 1995.

ROBERTSON, C.D.; COOMBS, G.H.. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.62, p.271-279, 1993.

RODER, J.C., HALIOTIS, T.; KLEIN, M.;KOREC, S.; JETT, J.R; ORTALTO, J.; KATZ, P.; FAUCI, A.S. A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. **Nature.** v. 284, p.553–555, 1980.

RUSSEL, D.G; XU, S.M.; CHAKRABORTY, P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania Mexicana* infected macrophages. **J Cell Sci**, v.103, p.1193–1210, 1993.

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

SHAW, J. J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* for the aetiological agente of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, p. 577-579, 2006

SHIO, M.T.; HASSANI, K.; ISNARD, A.; RALPH, B.; CONTRERAS, I.; GOMEZ M.A.; DAYYEH, I.A.; OLIVIER, M.. Host Cell Signalling and *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **Journal of Tropical Medicine**. V. 2012, 14 p , 2011.

SOONG, L.; CHANG, C.H.; SUN, J.; LONGLEY, B.J.; RUDDLE, N.H.; FLAVELL, R.A.; McMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**. v.158, p.5374-83, 1997.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

TEYTON, L.; PETERSON, P.A.(1992). Invariant chain-A regulator of antigen presentation. **Trends Cell Biol**. v.2, p.52-56, 1992.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. Megosomes biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitol Res**. v.87, p. 89-97, 2001.

VALLADA, E. P. Manual de técnicas hematológicas. São Paulo: Atheneu, 2002.

WARD, D.M.; GRIFFITHS, G.M.; STINCHCOMBE, J.C.; KAPLAN, J. Analysis of the lysosomal storage disease Chediak-Higashi syndrome. **Traffic**. v. 1: 816-822, 2000.

WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K.A.; WARD, D.M.; Kaplan, J.; ADEREM, A.; ANDREWS, N.W. Control of Parasitophorous Vacuole Expansion by LYST/ Beige Restricts the Intracellular Growth of *Leishmania amazonensis*. **Plos Pathogens**. v. 4, 2008.

WHITE, J.G. The Chediak-Higashi syndrome: a possible lysosomal disease. **Blood**. v.28, p.143–156, 1966

WHO 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> acessado em 15/05/14.

WOLF, S.F.; SIEBURTH, D.; SYPEK, J. Interleukin 12: a key modulator of immune function. **Stem Cells**. v.12, p.154-68, 1995.

WRIGHT, S.D.; SILVERSTEIN, S.C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **J. Exp. Med**. v.158, p.2016–2023,. 1983.

WURTZ, O., BAJENOFF, M., GUERDER, S. IL-4 mediated inhibition of IFN-gamma production by CD4+ T cells proceeds by several developmentally regulated mechanisms. **Int. Immunol**. v.16 p.501-8, 2004.

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 111/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 085/12**

Projeto Pesquisa: "Estudos de moléculas envolvidas na invasão e tráfego intracelular das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* in vitro".

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva

O adendo ao protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de outubro de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU