

EDNA BARBOSA DE SOUZA

Vias de inibição da apoptose em macrófagos J774 infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. HIRO GOTO

SÃO PAULO

2006

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Universidade de São Paulo

Apoio financeiro:

- *Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES)*
- *Laboratório de Investigação Médica, Laboratório de Soroepidemiologia (LIM 38)*
- *Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) – CT Infra-Clima-Bio*

Ao nosso bom Deus,

Toda Honra

Poder

E

Glória!

*“Se não podes entender, crê para que entendas;
A fé precede, o intelecto segue.”*

Santo Agostinho
Teólogo cristão

É preciso ter uma grande dose de humanidade,
uma grande dose de sentido de Justiça e verdade,
para não cair em dogmatismos extremos, em escolasticismos frios,
em isolamento de massas. É preciso lutar todos os dias para que esse amor à
humanidade viva se transforme em fatos concretos, em atos que sirvam de exemplo,
de mobilização.

CHE GUEVARA

Sem perder a ternura.

*“O semeador, depois de realizar a tarefa,
Afasta-se e deixa a semente germinar.”*

Goethe

Poeta, dramaturgo e escritor alemão.

Aos meus amados pais “in memoriam”, José Antônio de Souza e Irany Barbosa de Souza posso dizer que ainda sinto o calor de teus abraços, e me direciono pelo o brilho de teus olhos e de que hoje concretizo um entre tantos de teus sábios conselhos, paltados muito mais pelo exemplo do que por palavras.

*E agora vejo mais do que nunca de que todas as coisas são possíveis quando trazemos **na alma** o maior de todos os gestos, a verdadeira herança, aquela que a traça não corrói e a ferrugem não consome e que o tempo fiel juiz de todas as horas propaga e recolhe o que só podemos dar se tivermos recebido: o **AMOR**, sem o qual a vida seria insípida.*

Obrigada por tudo.

A toda a minha família, em especial cada um em particular.

Porque é impossível ser feliz sozinho.

Obrigada por tudo.

A voces meu amor, meu amor, meu amor.

“A ninguém fiqueis devendo coisa alguma a não ser o AMOR recíproco.”

(Romanos: 13:8)

À todos os meus amigos que são muitos e que os são todos.

Ah se eu pudesse contar as estrelas e quem sabe os grãos de areia do mar, abraçar o vento e guardar em um pequeno copo toda àgua que neste mar há....

Conter o riso e deixar o pranto rolar...

Ah quem sabe então poderia dizer te o que verdadeiramente significas.

Vou tentar: EU TE AMO!

Agradeço a todas as pessoas que me acompanharam durante a realização deste trabalho, por me proporcionarem um ambiente de estímulo, de amor e de partilha, respeito e seriedade.

Por me ajudarem a converter toda a grandiosidade de cada minuto, cada dia, cada mês, cada ano, cada pensar e agir, nesta tese que guarda muito mais do que sua valiosa contribuição científica.

A Profa Dra Hiro Goto, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, pela calorosa acolhida, pela enorme competência e valiosa orientação, por todo apoio e alegria frente aos resultados obtidos com este trabalho e por permitir debater minhas idéias especulativas em um ambiente informal e contribuir enormemente para o meu amadurecimento científico. Acreditando em meus sonhos e por proporcionar-me a oportunidade de realizá-los. Minha gratidão, admiração e respeito imensuráveis.

Ao Prof. Dr. José Angelo Laullêta Lindoso, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, com quem todos os dias aprendo uma nova lição, por sua incansável busca da verdade, fazendo ciência priorizada no amor e dignidade, minha gratidão, respeito e admiração. Obrigada pela troca permanente de idéias, minha fonte mais rica de inspiração e por estimulantes discussões com questões fundamentais da apoptose, por todo carinho e alegria.

Deixo te hoje o poema do poeta alemão Meister Eckhart:

“A alma na sua forma mais pura, assemelha-se a Deus, mas é o anjo que nos dá uma melhor idéia Dele.

Isso é tudo que um anjo é: uma idéia de Deus.” Obrigada por ser uma idéia de Deus na minha vida e ajudar a tornar realidade as possibilidades impossíveis de meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira, diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da USP, pela oportunidade oferecida para realizarmos nosso trabalho e pela disponibilidade e apoio em atividades desenvolvidas no seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulo Cotrim, por toda atenção dispensada, por sua constante preocupação na elaboração de oportunidades dentro do laboratório que propiciem melhores condições para a realização de nossas atividades, e por disponibilizar, sempre com alegria, o seu laboratório de Biologia Molecular, para que pudéssemos dar continuidade as nossas investigações e por viver ciência. Meus agradecimentos, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Magnus Gidlund, por disponibilizar com muita alegria e incentivo, seu laboratório de Imunofisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP para realizarmos alguns de nossos experimentos e pela amizade e por estimular discussões científicas junto a todo grupo do laboratório, meu respeito e admiração.

A grande amiga,-irmã Mestre Beatriz, a Bea, (extensivo ao José) por todo incentivo, amor, alegria e partilha de vida. Por acreditar que tudo isso seria possível, por todo apoio e pelas valiosas orientações nas diversas atividades do laboratório e estimulantes discussões..Minha admiração, respeito e alegria.

As grandes mestres Edite Kanashiro e Sueli Bastos, por aguçarem em mim a vontade de fazer ciência, extrapolando as limitações.Por todo incentivo e calorosa amizade. Pelos importantes passos em cultura de células e biologia molecular.O tempo não poderá apagar.Obrigada por tudo.

A querida amiga Dra. Maria das Graças Prianti que me fez crer que há também aqueles irmãos do caminho (estensivo ao Carlos) que nos escolhem pura e simplesmente por acreditarem em nós, Você é uma grande incentivadora e recolhe em si mesma uma valiosa generosidade que contribuiu enormemente para o meu crescimento. Meu carinho, respeito e admiração. Obrigada por ajudar na confecção desta tese e por toda alegria partilhada.

A grande amiga Dra Márcia Carvalho Dias, que possui uma enorme capacidade em minimizar as intemperes daqueles que a rodeiam. Obrigada pela valiosa contribuição científica, nas discussões com análise de resultados de citometria. Por sua visão crítica e apurada. Teu brilho no olhar denuncia a sua gana e seriedade em fazer ciência. Obrigada por ser uma amiga presente.

A querida amiga Célia Vendrame por todo apoio e ajuda na obtenção de reagentes importantes para realização desta tese. Por toda amizade e carinho.

As queridas amigas Juliana Iokj, Erika Manuli (estensivo ao Erick) pela importante ajuda na confecção desta tese e por todo estímulo nas atividades do laboratório e pelas discussões científicas e da nossa preciosa amizade.

A querida Mussya Rocha, grande incentivadora, por toda ajuda e pela doação de cell scrapper, apoio sempre presente. Obrigada pela tua alegria e amizade.

A querida amiga Mariço, por compartilhar alegrias e dificuldades e pelo incentivo sempre presente e importante dicas na dinâmica das atividades do laboratório. Meu carinho, amizade e gratidão.

A querida Regiane estímulo e amizade sempre presente. Por todo apoio e ajuda com atividades envolvendo programas de computador.

Aos queridos amigos Fabrício Pettito e Fábio Freitas com quem aprendi as primeiras atividades envolvendo animais de laboratório com coleta de macrófagos em camundongos e isolamento de amastigotas em Hamsteres. E acima de tudo pela preciosa amizade. Obrigada Pettito por ajudar na formatação desta tese e pelas discussões envolvendo cálculos que foram de grande ajuda.

Ao querido Arnaldo Rodrigues, por estimular a minha curiosidade científica, por sua alegria sempre constante, pela amizade e apoio, por participar com muito afinco dos experimentos e dar um novo e importante sentido nesta etapa do meu crescimento científico. Obrigada ainda pelas horas dispensadas para ajudar na confecção da tese e por me ensinar um outro jeito de ver a vida. A você meu carinho, respeito e amizade sincera.

Ao querido amigo Francisco José de Oliveira Rios, pelo auxílio no uso de leitor FIENA, incentivo e alegria na obtenção de resultados.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular pela agradável convivência, apoio sempre presente e ajuda na elaboração de protocolos que envolveram BioMol. Em especial Adriano Cappellazzo Coelho, Norival Kesper.

Aos queridos professores que efetivamente participaram da minha formação neste período: Dra. Irma Duarte, Dra. Maria Aparecida Basile, Dra. Glória, Dra. Isis Abranhansen e Dra. Sílvia Alfieri. Obrigada pelos valiosos ensinamentos e por toda amizade e incentivo.

Agradeço ainda aos professores Dr. Paulo Cotrim e Dr. Jorge Casseb pela avaliação que me permitiu ingressar nos estudos desta tese.

Ao Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarantes, pela doação da célula J774, modelo de nosso estudo, e pela receptividade em seu laboratório nas pessoas de Axel e Gabrielli..

Ao Prof. Dr. Dewton, pela doação de Iodeto de Propideo para nossas primeiras investigações com Anexina V e a Camila pelo uso do citometro naquela etapa.

A Profa Dra. Maria Aparecida Dalboni, da Escola Paulista de Medicina, por doação da Ciclohexamida, para estudos iniciais de apoptose desta tese. Por todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Claudio Panutti pela gentileza em disponibilizar o citômetro e toda sua equipe (Carol, Anderson, Carla, Dani, Nadily, Cicero, Ju, Sonia, Luciano) que nos auxiliaram no uso do citômetro, importante ferramenta para nossas investigações. Por todo apoio e agradável convívio.

A Profa. Dra. Sandra Ávila por todo incentivo, amizade e auxílio com recente doação de anticorpo recombinante de TNF e por agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Scott Kauffman pelo envio de artigos (caspase 6) e pelas palavras de incentivo.

Ao Dr. Célio X. Castro Santos, Laboratório de Biologia Vascular, InCor, Victor Debbas, Angelika e Paulo Sushi, pela valiosa colaboração na execução de alguns de nossos experimentos, envolvendo PARP, pela doação do anticorpo anti-PARP, e pelas discussões científicas além do agradável convívio.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior pelo software WinCycle e valiosas discussões científicas.

Aos Professores da Qualificação- Prof. Dr. Roger Chammas, Profa.Dra. Shigueko Sanohara, Profa. Dra. Nancy Starobinas pelas valiosas sugestões da tese e palavras de incentivo.

A querida Sandra Regina que nos últimos tempos tem se preocupado e ajudado com valiosas dicas que puderam ser usadas para o preparo da confecção da tese. Pela amizade, carinho e constante apoio. Obrigada.

A Dra Elisângela Ribeiro pelo envio de material importante sobre uso do citômetro. Por todo apoio e incentivo.

A querida amiga Elisabete Ourique de Mello pelo agradável convívio e pelo apoio sempre presente. Por nossa valiosa amizade.

As Dras Guita R. Elefant e Dra Carmem Arroyo pela valiosa atenção e apoio sempre que solicitado e agradável convívio. Minha admiração e amizade.

A toda equipe do Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo: Alexandre Taneno, Gabrielli Tanon, Fernanda Signore, Erika Hoffman, Kelly Kanufre, Kelly Dias, Amanda, Janaina, Fabiana Leoratti, Sarita, Melissa, Cristina, Patrick, Debora, Rogério, Kleber, Piero, Renata, Juliana, Monica, Flávia Freitas, Tiago, Fernando Henrique das Mercedes, Naiúra Vieira Pereira, Marcel, Luciana, Maria Paulina, William, Livia e Rodrigo N. Barbosa e Priscila por todo apoio, incentivo e agradável convivência.

As queridas irmãs Scalabrinianas pela calorosa acolhida em Roma, em importante momento do congresso World Leish III, principalmente a irmã

Gregória e a Suor Neuza Mariano. Obrigada por me proporcionarem um aprendizado de vida em um momento inesquecível.

Aos queridos amigos, funcionários deste laboratório que participaram ativamente durante estes anos de tese. Obrigada pela enorme ajuda e pela manutenção, cuidado dispensado aos animais utilizados neste estudo, reorganizando os materiais do laboratório. Compartilhando valiosas sugestões para melhoria das atividades do laboratório. Por todo carinho e incentivo nesta importante etapa da minha jornada científica e de vida. A todos vocês: Paulo Oliveira, Renato Racickas, Ione Sales, Arthur de Jesus, Amanda, Sandra, Nilda, Nilzete e Cornélio.

A querida amiga Eunice Pinto, secretaria deste laboratório, por auxiliar com muito carinho e estar sempre atenta aos nossos pedidos, por se importar e fazer a diferença em importantes momentos. Muito obrigada.

À comissão de Pós-Graduação do Departamento de Fisiologia Experimental da universidade de São Paulo pela acolhida.

As funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Fisiopatologia Experimental da Universidade de São Paulo: Thânia, Sônia, Fátima e Diva, que foram muito além do que com a presteza e paciência, preocuparam-se e orientaram minha conduta científica quando as atividades estavam ligadas aquele departamento. Obrigada pelo agradável convívio por todo incentivo e amizade.

Agradeço em especial minha querida irmanzinha Elisângela que não mede esforços para ajudar em meu crescimento com valiosas discussões e ensinamentos e com

todo apoio que me possibilitou viabilizar a estadia em São Paulo. Acima de tudo pela amizade e incentivo e pela calorosa acolhida.

A todos os amigos do caminho : Adriana Carniato, Marilu Mazzaro, Ellen Syntia, Leuridan, João Paulo, Lillian Barros, Erika Morita, Alda ,Graça., Raquel, Dinho, Zilah. Acima de tudo pela amizade e incentivo e pela calorosa acolhida e por aqueles que não foram citados mas permanecem na memória do coração.

Ao meu querido sobrinho José Antonio de Souza Neto e esposa Wanessa, por toda compreensão por minha ausência no casamento devido o momento crítico da concretização final desta tese.

Agradecimento especial a todos os animais de laboratório utilizados nas investigações desta tese por compartilhar da mesma busca e por Honrar a ciência com a sua contribuição. Meu muito obrigada.

*“Se há em mim uma verdade,
Deve explodir.
Não posso refutá-la ou
Refutarei a mim mesmo.”
Karol Wojtila*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

OBJETIVOS

MATERIAIS E MÉTODOS

- 1 Animais
- 2 Parasito
- 3 Purificação de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*
- 4 Obtenção de promastigota em cultura
- 5 Cultura de macrófagos J774
- 6 Infecção de macrófagos por leishmânia
- 7 Indução de apoptose em macrófagos J774 e avaliação do efeito da infecção por leishmânia
 - Indutores de apoptose
 - 7.1 Detecção de apoptose, exposição de fosfatidil serina, por ligação a Anexina V conjugada a fluoresceína (Anexina V-FITC)
 - 7.2 Detecção do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) em macrófagos J774
- 8 Expressão da proteína do choque térmico rHSP83 pela bactéria M15
- 9 Infecção em macrófagos J774, por bactéria E. Coli M15 contendo o gene de proteína de choque térmico de 83 kDa (HSP 83) de *Leishmania (L.) infantum*

- 10 Detecção de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) 113 kDa em macrófagos J 774
- 11 Detecção da atividade de caspase 3 em macrófagos J 774
- 12 Detecção de caspase 3 clivada (ASP 175) em macrófagos J 774

RESULTADOS

- 1 Infecção de Macrófago J774 com *Leishmania (L.) chagasi*.
- 2 Indução de apoptose em célula J 774
- 3 Proteção de apoptose em célula J 774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*
- 4 Detecção da alteração do potencial de membrana da mitocôndria
- 5 Proteção de apoptose por HSP 83
- 6 Detecção de PARP em células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* e induzidas a apoptose por CPT
- 7 Detecção da atividade de caspase 3 e caspase 3 clivada em células infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* e induzidas a apoptose por CPT ou H₂O₂

DISCUSSÃO

CONCLUSÕES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana da mitocôndria
Ac-DEVD-AFC	<i>Acetyl-asp-glu-Val-Asp-7- amido- 4- trifluoromethyl-coumarin</i>
AFC 7	<i>Amido –4- trifluoromethyl-coumarin</i>
APAF-1	Fator 1 de ativação de protease de apoptose
APO LOGIX – JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolycarbocyanine iodide
CDKs	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
c-FLIP	<i>cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP)</i>
CPT	Camptotecina
CR	Receptor de complemento
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DBD	DNA <i>binding</i>
D.O	Densidade óptica
DD	Domínio de morte
DISC	Complexo de sinal indutor de morte
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DR	Receptor de morte
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDAR	Receptor de <i>ectodysplasin–A</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide 4- trifluoro-methoxyphenylhydrazone</i>
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FLIPS	<i>FLICE inhibitory proteins</i>

Fas (CD95)	Receptor de morte celular da superfamília do TNF
FLICE	<i>FADD-like interleukin-1beta-converting enzyme-like inhibitory protein (c-FLIP)</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
IAP	Proteínas inibidoras de apoptose
IgG	Imunoglobulina G
IKK	<i>IkappaB kinase</i>
IL-10	Interleucina-10
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomannan
LB	Meio Lauri Bretani
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
MemTNF	TNF integrado a membrana
MTP	Placa <i>microtiterplate</i>
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NF-kappaB	<i>Nuclear factor kappaB</i>
NGFR	Fator de crescimento do nervo
NK	Natural Killer
NLS	Sequência de localização nuclear
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PM	Peso molecular
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gel eletrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	soro fetal bovino
sTNF	TNF solúvel
TBS-T	Tampão tris fosfato com tween 0,05%
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFrh	Fator de Necrose Tumoral recombinante humano
TNF- α	Fator de necrose de tumor alfa
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	Receptores de interação denominada de família de fator associado ao receptor
TRAIL-R	Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF receptor
Tween 20	Polioxietileno sorbitol monolaurato

Souza, E. B

Vias de inibição de apoptose em macrófagos J774 infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*. São

Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;

2005

RESUMO

Macrófagos infectados com *Leishmania* são protegidos de apoptose, entretanto não se conhece o mecanismo de transdução de sinal intracelular que interfere neste processo de morte. Neste trabalho, células J 774 em cultura, com privação de nutrientes, sofrem apoptose, a qual aumenta na presença dos indutores camptotecina (CPT) ou fator de necrose tumoral recombinante (rTNF). Estas células quando infectadas com amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (5 parasitos/uma célula) são protegidas de apoptose. Avaliando as possíveis vias intracelulares envolvidas nesse processo, observamos que a privação de nutrientes altera o potencial de membrana da mitocôndria, havendo reversão com a infecção tanto com promastigotas e amastigotas, entretanto a reversão da alteração do potencial de membrana induzida por rTNF só foi observada com infecção com promastigotas. Tanto a atividade de caspase 3, como a detecção de caspase 3 clivada induzidas por H₂O₂ são revertidas com a infecção com promastigotas ou amastigotas. Quando analisamos a expressão de poli (ADP ribose) polimerase (PARP), em relação às células sem indução, a

indução por CPT não levou ao aumento da PARP de 116 kDa, mas, aumento da banda de 24 kDa. Por outro lado, a infecção por amastigota de *Leishmania (L.) chagasi* em células J774 levou à diminuição da expressão de PARP de 116 kDa, mas aumento da de 24 kDa. Nas células infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, observamos uma diminuição da banda de 116 kDa, aparecimento de uma molécula de 89kDa e diminuição da expressão da de 24 kDa. Nas células sob indução por CPT, a infecção levou a resultados similares, exceto a diminuição da molécula de 24 kDa quando infectado por amastigota. Avaliando-se a influência da proteína do choque térmico de 83 kDa de *Leishmania infantum*, como possível fator que interferiria no processo de apoptose, observamos que a fagocitose de bactérias *Escherichia coli* (M15) contendo plasmídeo com gene de HSP83 expressando essa proteína, leva a diminuição da apoptose nessas células, mesmo quando induzidas por CPT ou rTNF.

Nossos dados mostram que a infecção de macrófagos J774 in vitro por *Leishmania (L.) chagasi*, interfere no processo de apoptose afetando diversas vias de sinalização intracelular de apoptose, tanto extrínsecas quanto intrínsecas, sendo que promastigota é mais efetiva em inibir apoptose nesta linhagem macrofágica.

Palavras Chave : Apoptose; *Leishmania*; Macrófagos; Proteínas do choque térmico; Fator de necrose tumoral; Camptotecina; Mitocôndria; Poli (ADP-ribose) polimerases

Souza, E. B

Apoptosis inhibition pathways in J774 macrophages infected by *Leishmania (L.) chagasi*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006

ABSTRACT

Macrophages infected by *Leishmania* are protected from apoptosis, however the mechanism of intracellular signal transduction that interferes in this death process remains unknown. In this work, J774 cells in culture, under nutrient deprivation undergo apoptosis, which is increased in the presence of inducers: camptothecin (CPT) or recombinant tumoral necrosis factor (rTNF). These cells infected by amastigotes or promastigotes of *Leishmania (L.) chagasi* (5 parasites per cell) are protected from apoptosis. Evaluating the possible intracellular pathways involved in this process, we observed nutrient deprivation alters the mitochondrial membrane potential, reversed by both amastigote and promastigote infection, in contrast, mitochondrial membrane potential was altered by rTNF and it was reversed only by promastigotes. Both caspase 3 activity and caspase 3 cleavage detection induced by H₂O₂ are reversed with amastigote or promastigote infection. When we analysed the expression of poly (ADP-ribose) polymerase, related to no induced cells. CPT induction didn't increase 116 kDa PARP, but increased a 24 kDa fragment. Otherwise, *Leishmania (L.) chagasi* amastigote infection in J774 cells decreased 116 kDa PARP, but increased a 24 kDa fragment. In cells infected by *Leishmania (L.) chagasi*, we observed a decrease of 116 kDa

fragment, appearance of a 89 kDa fragment and a decreasing of a 24 kDa fragment. In the cells under CPT induction similar results were found, except a decreasing of a 24 kDa when infected by amastigote. Evaluating the *Leishmania (L.) infantum* Heat Shock Protein of 83 kDa, as a possible factor that interferes in the apoptosis process, we observed that a phagocytosis of *Escherichia coli* (M15) bacteria with a HSP83 gene within a plasmid expressing this protein induced by isopropyl β - D- tiogalactopiranosideo (IPTG), considerably diminished apoptosis in these cells even when induced by CPT or rTNF.

Our data show that *Leishmania (L.) chagasi* infection in J774 macrophages in vitro notoriously interferes in the apoptosis process affecting several intracellular pathways involved in both extrinsic and intrinsic pathways, more prominently with promastigote in this macrophage cell lineage.

Key Words: Apoptosis; Leishmania; Macrophages; Heat shock protein; Tumoral necrosis factor; Camptothecin; Mitochondria; Poly (ADP-ribose) polymerases

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários obrigatórios do gênero leishmânia (família Trypanosomatidae, ordem kinetoplastida) e que afeta mais de 12 milhões de pessoas, a maioria crianças e adultos jovens em 88 países e em todos os continentes, exceto Austrália. Considerada pela Organização Mundial de Saúde entre as seis doenças tropicais mais importantes, com uma incidência anual de 2 milhões de novos casos, com cerca de 400 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção, sendo que 90% de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2001) .

No Brasil, a leishmaniose visceral ocorre em 17 estados, distribuída em quatro regiões, sendo que a maioria dos casos ocorre na região Nordeste (Monteiro SP, 1994) . A ocorrência em novas áreas geográficas e a urbanização da doença, ocorrendo em algumas capitais da região Nordeste como Fortaleza, Natal, São Luís e Teresina, são motivo de grande preocupação para as autoridades sanitárias devido ao risco de aumento em grande escala de novos casos (BRANDÃO-FILHO, 1994). No estado de São Paulo, até recentemente só havia relatos de casos importados da doença, porém de 1999 a junho de 2000 foram registrados 23 casos no homem no município de Araçatuba e dois casos no município de Birigui (CVE, 2001). Infecção por *Leishmania (L.) chagasi* pode resultar em infecções viscerais potencialmente fatais em seres humanos, e a eliminação dos parasitos pelo macrófago é dependente da montagem de uma resposta imune efetiva mediada por célula do hospedeiro, com implicações no controle ou progressão da infecção (Goto and Lindoso, 2004; Locksley and Louis, 1992) .

Fatores específicos e inespecíficos da resposta imune do hospedeiro estão envolvidos no controle ou progressão da doença, sendo a sobrevivência do parasito dependente da capacidade de promastigotas e amastigotas evadirem-se de mecanismos adaptativos do hospedeiro vertebrado (Cunningham, 2002). Os macrófagos são as principais células hospedeiras para leishmânia. Todavia, estas células infectadas contrapõem-se a invasão deste patógeno por sua própria morte, em um processo evolucionariamente conservado e regulado geneticamente, denominado de apoptose. Por outro lado, este potente mecanismo de defesa das células hospedeiras colocam grande pressão seletiva sobre o parasito, o qual por sua vez, desenvolve estratégias para modular este processo apoptótico da célula hospedeira a seu favor (Heussler et al., 2001). Tais mecanismos que propiciam interação e evasão do parasito não estão bem claros. Estudos recentes de apoptose ou morte celular programada na evolução das leishmanioses têm contribuído para elucidação destes mecanismos acima citados.

Os macrófagos podem desempenhar diferentes papéis, atuando como célula hospedeira onde parasitos multiplicam-se e estabelecem a infecção, como célula apresentadora de antígeno ou ainda como célula efetora da resposta imune (Mosser and Rosenthal, 1993; SACKS, 1993). Uma vez dentro do macrófago, a leishmânia está protegida da degradação do fagolisossomo por uma variedade de adaptações que inibem os mecanismos de defesa celular, como por exemplo, a inibição da fusão endosoma-fagosoma e vias de sinalização celular (Cunningham, 2002). Entretanto os mecanismos que propiciam interação e evasão do parasito não estão bem claros.

Apoptose exerce papel importante na remoção de células indesejáveis ou danificadas durante o desenvolvimento, homeostase tecidual, envelhecimento de organismos multicelulares e seleção da população linfocítica (Luder et al., 2001). Diferentemente da necrose, que é uma forma patológica de morte celular resultante de injúria celular aguda, morfologicamente caracterizada por lise e aumento do volume celular, a apoptose é caracterizada por autodigestão celular controlada através da ativação de proteases endógenas, que resulta em destruição do citoesqueleto, diminuição do volume celular e protusão de membrana citoplasmática. Durante apoptose ocorrem mudanças características no núcleo, o qual sofre condensação quando as endonucleases são ativadas e iniciam a fragmentação do DNA nuclear em oligonucleossomos (Gross et al., 1999; Heussler et al., 2001).

Há relatos de que a apoptose possa ser iniciada ou regulada pelo parasito, deste modo contribuindo para a disseminação do mesmo dentro do hospedeiro, inibindo ou modulando as respostas imunes ou facilitando a sobrevivência intracelular do patógeno (Luder et al., 2001) .

Lindoso (2001), observou que a apoptose participa da imunopatogenia da leishmaniose visceral experimental em hamsteres. Neste modelo ocorre apoptose em células inflamatórias de baço e fígado, havendo maior grau nas fases iniciais de infecção, com desaparecimento nas fases mais tardias. As células aderentes esplênicas apresentam menor grau de apoptose do que as células não aderentes, e o estímulo com concanavalina A ou antígeno de leishmânia não promoveu aumento de apoptose dessas células em cultura.

Os achados de menor grau de apoptose em células aderentes in vivo

corroboram os achados de (Moore and Matlashewski, 1994) onde observaram que macrófagos infectados com *L. donovani* ou tratados com lipofosfoglicano são protegidos de apoptose quando induzidos por LPS.

A proteção de células hospedeiras de apoptose foi observada também com outros microrganismos e nesses estudos alguns fatores foram identificados. Macrófagos infectados com *Mycobacterium bovis* (BCG) são protegidos da morte por apoptose, pela indução de secreção de maior quantidade de TNF- α (Kremer et al., 1997). IL-10 protege os linfócitos T de apoptose, na morte celular induzida pelo vírus *Epstein-Barr* (Taga et al., 1994). No experimento in vitro de proteção do macrófago de apoptose por *L. donovani*, os autores observaram aumento na expressão gênica de TNF- α e GM-CSF e mostram que TNF- α e GM-CSF recombinante inibem apoptose de macrófagos em cultura, concluindo que estes seriam os prováveis fatores protetores de apoptose (Moore and Matlashewski, 1994). Particularmente, na interação leishmânia-macrófago não se conhece até o momento as vias implicadas nessa proteção.

O início de apoptose pode ocorrer de várias formas. A via mais conhecida é pela ligação dos ligantes de morte a seus receptores específicos, tais como Fas/APO-1 (CD95) ou receptor I do fator de necrose tumoral (TNFRI) pertencentes à superfamília TNFR, os quais possuem um domínio intracelular que é crucial para transdução do sinal de apoptose (Luder et al., 2001).

A despeito da diversidade de sinais que podem induzir morte celular, várias características são compartilhadas em sua execução. A liberação de perforinas e granzimas pelas células Natural Killer (NK) ou por linfócitos T

citotóxicos (CTLs) pode induzir apoptose de células alvo (Shi et al., 1992). A transdução destes estímulos pró-apoptóticos por diferentes vias de sinalização resulta na ativação de caspases, uma família de cisteínas proteases que são sintetizadas como pró-enzimas inativas presentes em toda célula nucleada. No início da indução de apoptose, essas enzimas são ativadas e formam uma cascata proteolítica, que resulta na clivagem e ativação de numerosos alvos nucleares e citoplasmáticos (Thornberry and Lazebnik, 1998). Quatorze caspases de mamíferos foram identificadas, as quais podem ser divididas em três famílias baseadas em sua seqüência de homologia e especificidade de substrato (Sartorius et al., 2001).

Três vias levam, portanto, apoptose envolvendo a atuação destas caspases. Quando granzimas são secretadas por células T citotóxicas ou células (NK), elas entram na célula alvo com auxílio de perforinas e ativam diretamente as caspases efetoras. Uma segunda via, sob a ligação de um ligante (TNF/Fas ligante), receptores de morte (TNF-R1, Fas) associam-se às proteínas adaptadoras (FADD, ou TRADD), aos quais se ligam a moléculas de pró-caspase 8. A formação deste complexo molecular (DISC) resulta na clivagem e ativação da caspase 8 e subsequente ativação das caspases efetoras. A terceira via denominada via mitocondrial é iniciada por sinais internos, a ocorrência de dano do DNA ou stress por exemplo, resultam na ativação da proteína de supressão tumoral p53 que recruta os membros pró-apoptóticos (Bax, Bad, Bid) da família de proteínas Bcl-2, para a membrana mitocondrial, seguida pela liberação do citocromo c para o citoplasma, onde juntamente com APAF-1 e pró-caspase 9 formam o apoptosoma, que uma vez ativado, inicia a ativação das caspases efetoras. Independentemente da

via iniciadora, uma vez que estas caspases efetoras são ativadas, resultam em ativação de endonucleases, alterações da superfície celular e reorganização do citoesqueleto (Heussler et al., 2001).

Em adição a essa classificação das vias de apoptose, está uma outra via definida a partir de sua caspase iniciadora, a via de stress do retículo endoplasmático atribuída a ativação da caspase 12 (Rodriguez-Hernandez et al., 2006).

Assim como há mecanismos desencadeadores de apoptose, há também aqueles que a inibem. Em mamíferos, uma família de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl0), modulam a participação da mitocôndria neste processo, ainda que o mecanismo bioquímico e suas funções não estejam bem definidos (Schmitz et al., 2000).

A transdução de sinais de apoptose por TNFRI pode resultar na ativação da cascata “downstream” de kinases de um fator de transcrição eucariótico induzível NF-kB. A ativação deste fator de transcrição nuclear (NF-kB) tem papel importante na indução de moléculas efetoras do macrófago e está envolvido na regulação e expressão de genes que participam nas respostas de fase aguda, imune e inflamatória do hospedeiro e de modo importante inibe a apoptose e promove a sobrevivência da célula (Yuan, 1997). O NF-kB é induzido por uma ampla variedade de citocinas inflamatórias extracelulares e por estímulos de patógenos intracelulares (Pahl, 1999). Além de estímulos extracelulares, como do receptor de TNF 1 (TNFR-1) e de patógenos intracelulares, uma multisubunidade I κ B complexa Kinase (IKK) é ativada, a qual induz a liberação do NF-kB e translocação para o núcleo onde regula a transcrição do gene (Heussler et al., 2001;

Karin and Ben-Neriah, 2000). Em células não estimuladas, NF- κ B é recrutado para o citoplasma por ligação ao seu inibidor I κ B, o qual mascara a localização de sinal celular do NF- κ B. A ativação de NF- κ B em células infectadas por *Theileria parva*, depende da permanente degradação de ambos os inibidores de NF- κ B; I κ B- α e I κ B- β , de uma maneira parasito-dependente (Palmer et al., 1997). Outros estudos demonstraram que ativação constitutiva de NF- κ B é necessária para evitar destruição de células infectadas por apoptose (Dobbelaere et al., 2000; Fernandez et al., 1999; Heussler et al., 2001; Heussler et al., 1999). A inibição mediada por droga de ativação de NF- κ B constitutivo ou transfecção com mutantes negativos que bloqueiam a via de NF- κ B resulta em uma imediata apoptose. Isto indica que as vias apoptóticas são constitutivamente ativadas em células infectadas, mas são inibidas por transcrição de genes dependentes de NF- κ B. A cascata “downstream” a essas kinases é a de um fator de transcrição eucariótico induzível NF- κ B. A ativação deste fator tem papel importante na indução de moléculas efetoras do macrófago e está envolvido na regulação e expressão de genes que participam nas respostas de fase aguda, imune e inflamatória do hospedeiro. As formas de NF- κ B que se ligam ao DNA ativo, são complexos diméricos compostos de várias combinações de membros que constituem os complexos de proteínas da família rel. Os complexos de NF- κ B que está localizado no citossol, é constituído de duas subunidades prototípicas, p50 e p65 associados com a subunidade inibidora I κ B, o qual é composto de uma família de proteínas. Os dímeros de NF- κ B podem ser ativados por uma série de estímulos tais como citocinas, forbol esterres, vírus, inibidores de síntese de proteínas, ativadores celulares e ionóforos de cálcio.

Portanto, a ativação de NF- κ B requer fosforilação sequencial, multiubiquitinização e degradação de I κ B.

Há também uma família de proteínas, chamada de FLIPS (“FLICE inhibitory proteins”) que age inibindo a transdução do sinal de apoptose, pela ligação a proteínas adaptadoras e que pode promover a sobrevivência pela interferência com o processamento da caspase 8. Uma outra família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) pode bloquear apoptose, interferindo com a via de morte pela associação com iniciador de caspases tão bem quanto com caspases efetoras. Por exemplo, X-IAP, c-IAP1 e c-IAP2 retêm as caspases efetoras 3 e 7 tão bem quanto o iniciador de caspase 9 (Deveraux et al., 1998; Roy et al., 1997). Assim como essas proteínas, as chaperonas ou “Heat Shock Proteins” pertencem a uma potente família de inibidores de apoptose. A HSP70 pode afetar a via apoptótica em níveis tanto de citocromo c quanto de ativação de caspases (Mosser et al., 2000; Pandey et al., 2000) demonstraram que os efeitos anti-apoptóticos de HSP70 e HSP90 são mediados através da associação com Apaf-1. As proteínas do choque térmico (“Heat Shock Proteins” - HSPs) são uma família altamente conservada evolucionariamente, sintetizadas pelas células em resposta a uma variedade de estímulos resultante da elevação da temperatura, intoxicação química e infecção. Estas HSPs foram estudadas por uma perspectiva imunológica. Em várias infecções, HSPs estão expressas em ambos; microrganismos e célula hospedeira, embora permaneça obscuro como as HSPs participam na interação parasito-hospedeiro. As HSPs podem estar envolvidas com a adaptação de patógenos ao ambiente do hospedeiro e na transformação de microrganismos em formas proliferativas. E o mais

importante, parece que as HSPs nas células hospedeiras, protegem estas células das consequências do stress associado com a infecção (Hisaeda et al., 1997). As chaperonas exibem várias outras propriedades importantes, incluindo a prevenção da agregação de proteínas e promoção de desagregação por catalizar o reenovelamento de proteínas denaturadas ou danificadas (Heussler et al., 2001). Muitos estímulos apoptóticos causam a liberação de citocromo c junto com Apaf-1, e o complexo citocromo c-Apaf-1 cataliza o processamento de pro caspase 9, ativando caspase 3. O prodomínio de caspase 9 contém um domínio de recrutamento de caspase (CARD), o qual se liga ao domínio CARD N-Terminal correspondente de Apaf-1. A interação de Apaf-1 com pro caspase 9 formam um complexo apoptosoma, sugerido como crucial para ativação de caspase 3 (Ikeyama et al., 2001). Em soma no contexto de inibição da via mitocondrial, Bcl-2 bloqueia a liberação do citocromo c pela interação com membro pró-apoptótico Bax.

Portanto, há um ténue balanço entre as proteínas indutoras e inibidoras de apoptose que pode ser afetado e, dependendo do estímulo, da via de ativação, da ligação do receptor de morte e da proteína envolvida, pode haver indução ou inibição de apoptose.

O entendimento da atuação da proteína nuclear alvo PARP, tida como fator determinante de morte celular por apoptose é fundamental nestes processos apoptóticos que envolvem a interação parasito-hospedeiro. A poli (ADP-ribose) polimerase PARP, é uma proteína nuclear de 116 kDa, ativada por quebras de DNA e que usa a molécula de NAD⁺ para catalizar a síntese de polímeros de ADP-ribose nas proteínas nucleares. Essa proteína

nuclear, possui três domínios funcionais: o domínio de ligação de DNA (DBD, 46 kDa), localizado na porção N-terminal, o qual contém a sequência de localização nuclear (NLS) e dois Zn fingers; o domínio de automodificação (22 kDa) que media a autoribosilação; o domínio catalítico C-terminal (54kDa), o qual é essencial para conversão de NAD⁺ em ADP-ribose (Ivana Scovassi and Diederich, 2004; Scovassi and Poirier, 1999).

PARP é uma abundante proteína nuclear que está envolvida no sistema de reparo-excisão de base de DNA. Pertence a uma grande família de proteínas que inclui PARP-2, PARP-3, vault PARP e tankyrases b (Hong et al., 2004).

PARP parece estar envolvido com uma grande variedade de funções celulares por catalizar a transferência de ADP-ribose de NAD⁺ para receptor de proteínas, por sua atividade como co-ativador transcripcional (Shall and de Murcia, 2000). Embora o papel de PARP durante a apoptose, não esteja bem esclarecido, estudos recentes sugerem que sob condições de dano excessivo do DNA, PARP promove morte celular (Jacobson and Jacobson, 1999; Shall and de Murcia, 2000).

Em contrapartida, a depleção ou inibição de PARP, protege diferentes células de apoptose, células HL-60 e U937 induzidas por uma variedade de estímulos e células das ilhotas de pâncreas de camundongos, prevenindo a diabetes nestes modelos (Nosseri et al., 1994; Pacini et al., 1999; Shall and de Murcia, 2000; Shiokawa et al., 1997; Simbulan-Rosenthal et al., 1998; Tanaka et al., 1995). Além destes aspectos, um outro de grande importância na inibição de PARP é sua atuação como co-fator de NF- κ B, com papel essencial na expressão de genes dependentes de NF- κ B (Hassa et al.,

2003; Koh et al., 2005; Nakajima et al., 2004). A importância maior de tudo isso para o parasito leishmânia é que isto sugeriria a expressão de genes responsivos de NF- κ B, como c-FLIP e IAPs, envolvidos com a inibição das vias de apoptose, por interferência do processamento de caspase 8 (c-FLIP) e das caspases iniciadoras tanto quanto das caspases efetoras 3 e 7 (IAPs) (Heussler et al., 2001). Somados a isso, está o fato de que a inibição de PARP pode também promover o retardo no ciclo celular (Shall and de Murcia, 2000), o que favoreceria o parasito leishmânia.

Na compreensão da proteção do macrófago de apoptose quando infectado pela leishmânia, os receptores, as vias e as moléculas participantes terão de ser analisados na presença de diferentes tratamentos que possibilitem a investigação tanto por via intrínscica quanto por via extrínscica.

Vários indutores de apoptose são utilizados em diversos tipos celulares para o desencadeamento da morte celular, utilizando diferentes vias de transdução de sinal intracelular.

A camptotecina (CPT) é uma potente droga antitumor, inibidora de topoisomerase I de DNA e derivada da *Camptotheca acuminata* (Hentze et al., 2004; Sordet et al., 2003), a qual utiliza diferentes vias de transdução de sinal intracelular de morte por apoptose. CPT ativa p53 e induz mecanismos “downstream” pró-apoptóticos (Kohn et al., 2000), porém pode induzir a morte por apoptose independente de p53 (Shimizu and Pommier, 1997; Vasey et al., 1996). De outra forma, provoca diretamente “up-regulate” de CD95/Fas e receptor 2-Trail em células de carcinoma de próstata humano (Chatterjee et al., 2001), bem como a morte induzida por CPT pode requerer de novo síntese de moléculas pró-apoptóticas desconhecidas em certos

sistemas experimentais (Suzuki et al., 1997). Também CPT pode induzir apoptose dependente ou independente de ciclo celular em linhagem celular de câncer de colon humano (Goldwasser et al., 1996; Park et al., 1997) ou ainda dependente ou independente de ativação de caspases (Shimizu and Pommier, 1996, 1997; Suzuki et al., 1997). Outras vias intracelulares de apoptose, tais como redução da expressão de RNAm de TraF2, X-IAP e FLIP e podem inibir a ativação de NF-kB induzida por TNF (Wajant et al., 2003). Também a morte celular induzida por drogas inibidoras de topoisomerasas, envolve a ativação de caspases no citoplasma por moléculas pró-apoptóticas liberadas da mitocôndria (Sordet et al., 2003). Desta forma, a indução de apoptose por CPT pode ocorrer por diversas vias de transdução de sinal apoptótico intracelular, que diferem de célula para célula.

Outros sinais extrínsecos de apoptose são mediados por um grupo de receptores de morte dentro da superfamília de receptores de TNF. Estes receptores são caracterizados por domínios extracelulares similares ricos em cisteína, bem como por seqüências citoplásmicas conservadas, domínio de morte (DD). Os oito membros da superfamília de TNF conhecidos contêm um domínio de morte citoplasmático funcional que incluem: receptor de TNF 1 (TNFR1 ou receptor de morte 1 (DR1)), Fas (CD95 ou DR2), DR3, Ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL) receptor 1 (TRAIL-R1 ou DR4), Trail receptor 2 (TRAIL-R2 ou DR5), DR6, receptor de ectodysplasin-A (EDAR), e fator de crescimento do nervo (NGFR) (Rowinsky, 2005).

Na ativação mediada pelo ligante do receptor de morte, o domínio de morte intracelular conservado atrai a molécula adaptadora intracelular

(TRADD/FADD). A molécula adaptadora recruta caspase 8 ou 10 para o receptor de morte, formando o complexo de sinal indutor de morte (DISC), onde eles são clivados e ativados. (Sprick et al., 2002; Wang et al., 2001). Em algumas células, estas caspases iniciadoras são suficientes para clivar e ativar as moléculas executoras terminais, caspases 3, 6 e 7 (Chen and Wang, 2002).

Os membros da família ligante de TNF exercem seus papéis biológicos via interação com seus receptores de membrana (TNF-R). Os membros da família TNF-R contêm de um a seis seqüências repetidas ricas em cisteína em seus domínios extracelulares, tipicamente cada um com três pontes de cisteína. Dois receptores, TNF-R1 (receptor de TNF tipo 1; CD120a; p55/60) e TNF-R2 (receptor de TNF tipo 2; CD120b; p75/80) se ligam tanto ao TNF integrado a membrana (MemTNF) quanto ao TNF solúvel (sTNF). TNF-R1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos onde a expressão de TNF-R2 é altamente regulada e é tipicamente encontrado em células do sistema imune. Na grande maioria das células, TNF-R1 parece ser o mediador chave da sinalização por TNF, onde no sistema linfóide TNF-R2 parece ter um papel maior. TNF-R1 contém um domínio de morte (DD) e receptores de interação denominada de família de fator associado ao receptor (TRAF) (Wajant et al., 2003).

Os caminhos para o desencadeamento do sinal de apoptose podem ser iniciados pela ligação de receptores de morte celular, pertencentes a superfamília de TNF, expressos na superfície da célula, a seus respectivos ligantes. Contudo, essa via extrínica de apoptose induzida por TNF-R1 para o processamento downstream de caspase 8 ocorre em uma via principal de

mesmas rotas já descritas para outros receptores de morte como Fas e TRAIL- R1/2 e é dependente do tipo celular. No tipo celular 1: a apoptose é induzida pela ativação de grande quantidade de caspase 8 no complexo sinalizador de morte (“death-inducing signaling complex”-DISC), acompanhada por rápida clivagem de caspase 3 com ativação direta da cascata efetora. No tipo celular 2: a formação do DISC é bastante reduzida e a ativação da cascata de caspase ocorre após diminuição de potencial transmembrana da mitocôndria e neste tipo de célula a mitocôndria é usada como amplificador para iniciar a cascata de caspases executoras de apoptose, envolvendo a ativação da caspase 8 em menor intensidade, da caspase 9 e desembocando na ativação da caspase 3. Nesta via a participação da molécula bcl-2 tem papel importante como fator anti-apoptótico com sua atuação modulando a participação da mitocôndria neste processo (Scaffidi et al., 1998).

Algumas células também requerem ativação do sistema de apoptose baseado na mitocôndria, para amplificar o sinal de receptor de morte. Caspase 8 e 10 clivam e ativam domínio interagindo com fator pro-apoptótico citoplasmático Bcl-2 (BID), o qual transloca para mitocôndria e induz a liberação de citocromo c, fator iniciador de apoptose (Rowinsky, 2005).

Os membros da família ligante de TNF exercem seus papéis biológicos via interação com seus receptores de membrana (TNF-R). Os membros da família TNF-R contém de um a seis *repeats* ricos em cisteína em seus domínios extracelulares, tipicamente cada um com três pontes de cisteína. Dois receptores, TNF-R1 (receptor de TNF tipo 1; CD120a; p55/60)

e TNF-R2 (receptor de TNF tipo 2; CD120b; p75/80) se ligam tanto ao TNF integrado a membrana (MemTNF) quanto ao TNF solúvel (sTNF).

Todas essas características acima descritas sobre os indutores escolhidos, nos levaram a investigar alguns pontos cruciais dentro dos possíveis mecanismos de apoptose envolvidos na interação de amastigotas ou promastigotas de *Leishmânia (L.) chagasi* com macrófago J774.

Embora estudos prévios demonstraram que a leishmânia sobrevive, reside e multiplica, dentro do fagolisossomo de macrófagos, não é surpresa que estes parasitos, subvertam a seu favor a resposta imune inata do hospedeiro por evitar, alterar ou desarranjar o efeito microbicida destes macrófagos, protegendo estes macrófagos da apoptose (Akarid et al., 2004; Lindoso, 2001.; Moore and Matlashewski, 1994; Navarre and Zychlinsky, 2000).

Contudo pouco se sabe a respeito de como o parasito da leishmânia sobrevive dentro do macrófago e mais importante, qual o mecanismo ou mecanismos envolvidos, neste processo anti-apoptótico preciso, usado por este protozoário que permanece para ser elucidado.

Todos estes aspectos tomados juntos, nos insitaram a realizar nossos estudos em macrófago J774 infectado por *Leishmania (L.) chagasi*, sob atuação de diferentes indutores onde as duas principais vias apoptóticas: via intrínscica (mitocondrial) e via extrínscica (mediada por receptores de morte) foram avaliadas como uma grande possibilidade em aberto para compreender melhor a inter-relação parasito-hospedeiro.

OBJETIVOS

GERAL

- Avaliar as vias intracelulares de inibição de apoptose em macrófagos J774 quando infectados com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro

ESPECÍFICOS

- Estabelecer a infecção com *Leishmania (L.) chagasi* em macrófagos J774 in vitro e indução da apoptose por privação de nutrientes, fator de necrose tumoral recombinante (rTNF) e camptotecina (CPT) e sua inibição nestes macrófagos.
- Detectar a inibição da apoptose (expressão de fosfatidil serina) em macrófagos J774 infectados com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro sob indução de fator de necrose tumoral recombinante (rTNF), ou camptotecina (CPT), ou por privação de nutrientes
- Avaliar o potencial de membrana da mitocôndria em macrófagos J774 infectados com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro e sob indução por rTNF, CPT e por privação de nutrientes
- Avaliar o efeito da proteína do choque térmico (HSP83) de *Leishmania (L.) infantum* na apoptose de células J774 in vitro sob indução de rTNF, CPT e por privação de nutrientes

- Detectar a expressão da proteína nuclear alvo, poli (ADP-ribose) polimerase PARP, em células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro sob indução de CPT
- Avaliar a atividade de caspase 3 em macrófagos J774 infectados com amastigota ou promastigota de *Leishmania (L.) chagasi* in vitro sob indução por CPT, H₂O₂ ou por privação de nutrientes
- Detectar caspase 3 clivada em células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro sob indução de CPT, H₂O₂ e por privação de nutrientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) não isogênicos de 45 a 60 dias de idade, de ambos os sexos, foram utilizados para manutenção e obtenção de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Estes animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo, em ambiente de ventilação natural, com ração (Purina-Brasil) e água à vontade.

2. Parasito

Cepa de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46) foi mantida em hamsteres (*Mesocricetus auratus*) com inoculações intraperitoniais de homogeneizado de baço de animais infectados a cada três meses.

3. Purificação de amastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) com aproximadamente 2 a 3 meses de infecção foram sacrificados em câmara de CO₂ e o baço retirado assepticamente e macerado para obtenção dos parasitos, sendo as amastigotas purificadas segundo (Dwyer, 1976) modificado. Resumidamente, os baços macerados foram homogeneizados em meio RPMI 1640 (SIGMA, EUA) frio, a suspensão celular deixada por 10 minutos em gelo para sedimentação de fragmentos tissulares, a seguir filtrada em

gaze, passada 4 vezes por agulha fina (24G) e centrifugada a 250 g por 10 minutos. O sobrenadante foi centrifugado novamente a 250 x g por 10 minutos e o sobrenadante resultante centrifugado a 2.465 g por 25 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio RPMI 1640 incompleto e os parasitos contados em câmara de Neubauer, sendo a concentração ajustada para 4 e 10 x 10⁶ parasitos/mL.

4. Obtenção de promastigota em cultura .

Amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* purificadas foram cultivadas em meio M199 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil) inativado pelo calor e com 2% de urina humana filtrada. As formas promastigotas foram cultivadas a 26°C em meio M199 acrescido de 10% de SFB e posteriormente utilizados nos experimentos de infecção de macrófagos J774. A partir de um inóculo inicial de 10⁶ parasitos no frasco, contados a cada 24 horas e mantidos com repiques a cada 4 ou 5 dias. Utilizou-se, nos experimentos, as gerações P₁ até P₃ e as formas promastigotas na fase estacionária, de crescimento.

5. Cultura de macrófagos J774

Macrófago J774 (HORST IBELGAUFTS' COPE), gentilmente cedidos pelo Professor Dr. João Gustavo Amarantes Mendes, foram mantidos no nosso laboratório, posteriormente descongelados e cultivados em meio RPMI 1640 inicialmente com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e incubados a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca dos meios para estes macrófagos foi realizada a cada dois dias e as condições de soro

fetal bovino modificadas para 5% e posteriormente mantida a 1%, até se processarem os experimentos.

6. Infecção de macrófagos por leishmânia

Células J 774 cultivadas em frascos de cultura (Corning Costar-Cambridge, MA, EUA) foram desprendidas com “cell scrapper”, (Corning Incorporated, NY, made in México) e as células lavadas duas vezes com meio RPMI 1640 a 250 g por 10 minutos. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de RPMI 1640 com 1% de SFB e acertada a concentração para 10^6 células/mL. Macrófagos J774 foram colocados em poços ou sobre lamínulas em placa de cultura (Corning Costar, EUA) de 24 poços e incubadas por 2 horas a 37^oC em atmosfera úmida com 5% CO₂. Posteriormente os macrófagos foram lavados com RPMI 1640 incompleto e infectados com amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* por 6 horas com meio RPMI acrescido de 5% de Soro Fetal Bovino, na proporção de 2 ou 5 parasitos por macrófago. As lâminas foram coradas com Giemsa por 30 minutos e o grau de infecção foi avaliado sob microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), contando-se o número de parasitos em cem células. Os macrófagos obtidos a partir dos poços da placa de cultura foram utilizados para os experimentos que foram analisados por citometria de fluxo.

7. Indução de apoptose em macrófagos J774 e avaliação do efeito da infecção por leishmânia.

Indutores de apoptose: Fator de Necrose Tumoral recombinante humano (TNFrh) 50ng (BD-Pharmingen,EUA), camptotecina (CPT) 5 μ M (SIGMA,EUA) e H₂O₂ 150 μ M (Merck-Alemanha).

10⁶ células J774 aderidas a placa de 24 poços nas condições já descritas, foram incubadas com diferentes concentrações de CPT (3 μ M, 6 μ M, 9 μ M) e TNFrh (10ng, 50ng) por 6 horas a 37^oC em atmosfera úmida com 5% CO₂. Após esse período de incubação, as células foram submetidas à avaliação da apoptose.

Em outros experimentos, as células J774 foram infectadas com amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* na proporção de cinco parasitos por célula e a seguir incubadas com TNFrh 10ng ou 50ng/mL ou CPT 5 μ M ou ainda H₂O₂ 150 μ M e incubadas por 6 horas a 37^oC em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram retiradas por raspagem e submetidas a diferentes análises.

7.1. Detecção de apoptose, exposição de fosfatidil serina, por ligação a Anexina V conjugada a fluoresceína (Anexina V-FITC).

Células J774 submetidas a diferentes protocolos experimentais foram analisadas para detecção de apoptose pelo método de Anexina V, segundo protocolo do fabricante (BD Pharmingen, EUA). Resumidamente, 10⁶ células foram incubadas com anexina V conjugada com isoticianato de fluoresceína (FITC) e acrescidas de iodeto de propídeo (%). Após duas lavagens com

solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (“phosphate-buffered saline” = PBS), as células foram ressuspensas em 500 μ L de PBS com 1% de albumina bovina e analisadas por citometria de fluxo (FacsComp-BD Biosciences, EUA).

7.2 Detecção do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) em macrófagos J774.

Macrófagos J774 submetidos a diferentes protocolos experimentais foram avaliados para detecção da perda do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$). Utilizamos para essa detecção o corante catiônico “APO LOGIX – JC-1(5,5’,6,6’ - tetrachloro - 1,1’3,3’ - tetraethyl-benzimidazolyl-carbocyanine iodide) (Cell Technology, EUA). De acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, 10^6 células J774, após lavadas com solução salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2 (“phosphate-buffered saline = PBS) fria, foram ressuspensas em 0,5 mL do reagente (1X JC-1-Kit). Em seguida, as células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ por 15 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 250 g e o sobrenadante removido. O sedimento foi ressuspenso em 2 mL do tampão de ensaio (1X – JC-1-Kit) seguido de outra centrifugação com posterior remoção do sobrenadante. Esta etapa foi repetida uma vez. O sedimento foi ressuspenso em 0,5 mL do tampão de ensaio (1x JC-1-Kit). Para certificarmos a eficiência do JC-1 Kit, utilizamos um desacoplador de membrana da mitocôndria, *carbonyl cyanide 4- trifluoromethoxyphenylhydrazone*, (FCCP) (SIGMA, EUA) em diferentes concentrações (1,56 μ M, 3,12 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M). A

detecção do potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$) destes macrófagos J774 foi em seguida analisada por citometria de fluxo. Os resultados que exibem JC-1 agregados a membrana da mitocôndria que não perdeu seu potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), estão expressos no quadrante superior direito de cada painel e são, portanto detectados no canal FL2 enquanto que no quadrante inferior direito de cada painel foi detectada em canal FL1, a membrana da mitocôndria que sofreu alteração no seu potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) e possibilitou quebra monomérica de JC-1.

8. Expressão da proteína do choque térmico rHSP83 pela bactéria M15

Plasmídeo pQE-Li contendo gene da proteína do choque térmico (“Heat Shock Protein”-HSP) de 83 kDa de *Leishmania (L.) infantum* foi gentilmente cedida pelo Dr. Sérgio O. Angel (Angel et al., 1996). Para a expressão do HSP83, o plasmídeo foi inserido na bactéria *Escherichia coli* M15 resistente a kanamicina. A bactéria M15, foi cultivada em 3 mL de meio Lauri Bretani com 30 μ g/mL de kanamicina (LB) + 50 μ g/mL de ampicilina, e deixada por 18 horas sob agitação a 37°C. Após este período 20 μ L da cultura bacteriana foram transferidos para outros 2 tubos contendo 2 ml de LB Kanamicina + ampicilina, e deixados a 37°C sob agitação constante por duas horas, para ser obtida em fase logarítmica, com 0,6 de densidade óptica (D.O) a 550nm. Um dos tubos foi guardado a 4°C (controle sem indução) e no outro a indução da expressão da proteína foi feita adicionando-se 1mM de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1M, incubando-se sob agitação a 37°C por duas horas. As culturas bacterianas

com e sem IPTG, foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Em seguida foi adicionado Tampão de lise (PBS + 1% de Triton X-100 + 4mg/mL de lisozima) + inibidor de protease PMSF(1mM) (SIGMA, EUA) e a lise das bactérias foi completada pelo processo de congelamento (-80°C) e descongelamento (37°C) por 3X. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 15.000 g por 15 minutos. As amostras foram submetidas a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12 %, sendo utilizado 8 µL do sobrenadante e 8µL do sedimento dissolvido com uréia 8M, com e sem indução com IPTG e paralelamente com 5µL de padrão de PM (High-Sigma).

9. Infecção em macrófagos J774, por bactéria *E. Coli* M15 contendo o gene de proteína de choque térmico de 83 kDa (HSP 83) de *Leishmania (L.) infantum*.

10⁶ macrófagos J774 foram aderidos por uma hora em placas de 24 poços, e incubados com 5 µL da cultura de bactéria M15 sem indução por IPTG (controle negativo) ou com 5µL da cultura de bactéria M15 com indução por 1mM de IPTG por 30 minutos. Esses macrófagos foram induzidos por CPT 5 µM e TNF 50 ng , por 6 horas conforme descrito anteriormente e, após lavagem por PBS, submetida a análise da apoptose em citometria de fluxo.

10- Detecção de poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) 113 kDa em macrófagos J 774 .

10⁶ células J774 submetidas a diferentes protocolos experimentais cultivados em placas de 6 poços (Corning, Costar, EUA) foram posteriormente coletados com tampão de lise (NaCl 150 mM; Glicerol 10%; Triton 1%, EGTA 1 mM e MgCl₂, HEPES 20mM; aprotinina (SIGMA, EUA) 1 µg/mL; Leupeptina (SIGMA, EUA) 1 µg/mL e PMSF (SIGMA, EUA) 1 mM) e submetidos a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990), utilizando-se como padrão a albumina bovina (BSA). Cinquenta µg de cada amostra de macrófagos J774 foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE 12%. A transferência do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada com um sistema semiseco por 2 horas. Em seguida a membrana foi bloqueada em tampão tris fosfato com tween 0,05% (TBS-T), acrescido de 5% de leite desnatado durante 1 hora. Após o bloqueio com 5% de leite, a membrana foi incubada com anticorpo de coelho anti-PARP 1:1000 (Rabbit anti-PARP automodification Domain (509-524) – CALBIOCHEM, EUA) por 18 horas a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então lavada 3 vezes em TBS-T. Na etapa seguinte um anticorpo bovino anti- IgG de coelho conjugado com peroxidase 1:2000 (CALBIOCHEM, EUA) foi colocado e incubado por 1 hora. Depois a membrana foi revelada pelo sistema de “enhanced chemiluminescence” ECL.(Amersham Pharmacia Biotech). A densitometria foi realizada utilizando-se o programa: *Scion image beta 4.03* (www.scioncorp.com).

11- Detecção da atividade de caspase 3 em macrófagos J 774

Para detecção específica e quantitativa *in vitro* da atividade de caspase 3, utilizamos o ensaio enzimático e de imunoabsorbância fluorométrica (FIENA- Roche Diagnostics Corporation, EUA), segundo protocolo do fabricante. 2×10^6 células foram lavadas com PBS fria e centrifugadas a 300 g. O sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de solução 5, tampão de lise *dithiothreitol* (1x DTT), incubado por um minuto no gelo. Em seguida as células foram centrifugadas por 15 minutos a 1800 g. 100 μ L do sobrenadante foram utilizados para análise. Na etapa seguinte, 100 μ L de anti-caspase 3 (concentração ou diluição) foram colocados em placa “microtiterplate” (MTP) e incubada a 4°C por 18 horas. A solução de sensibilização foi removida e a placa foi bloqueada com 200 μ L de tampão bloqueador (solução 3-Kit FIENA) por 30 minutos. A solução bloqueadora foi removida e a placa lavada três vezes com 200 μ L de solução tampão de incubação (solução 4-Kit FIENA) por um minuto cada lavagem. A seguir, 100 μ L do lisado celular, foram colocados na MTP e esta foi coberta com plástico adesivo e incubada por uma hora a 37°C. Em seguida, o lisado foi removido por aspiração e lavado com 200 μ L de tampão de incubação por um minuto cada lavagem. Finalmente, foram adicionados 100 μ L da solução de substrato: *Acetyl-asp-glu-Val-Asp-7- amido- 4- trifluoromethyl-coumarin* 1x (Ac-DEVD-AFC) e a placa coberta com plástico adesivo e incubada a 37°C por duas horas. As soluções de calibração: *7- amido -4- trifluoromethyl-coumarin* (AFC) foram diluídas de acordo com recomendações do fabricante (50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M) (FIENA-Kit)

e as amostras foram então mensuradas fluorometricamente. Utilizamos para leitura filtro de excitação de 450 nm e de emissão 535 nm. Unidades de caspase 3 foram determinadas utilizando-se a seguinte formula:

Unidades de Caspase 3 = $(\Delta\text{FU}/\text{min}) \times \text{slope}^{-1} \times (1 \text{ unidade}/10^{-6} \Delta\text{M AFC}/\text{min})$, obtidas a partir da curva padrão de AFC, onde as absorbâncias foram tratadas pelos métodos de transformação e regressão linear pelo programa GraphPad Prism3.

12- Detecção de caspase 3 clivada (ASP 175) em macrófagos J 774

10^6 macrófagos J 774 submetidos a diferentes protocolos foram utilizados para detecção de caspase 3 clivada (ASP 175) (Cell Signaling, USA) por citometria de fluxo. H_2O_2 foi utilizado como indutor direto da clivagem de caspase 3. As células foram fixadas com 0,5% de formaldeído em PBS por 10 minutos a 37°C , centrifugadas e lavadas uma vez com PBS para remoção do fixador. Posteriormente, as células foram permeabilizadas (5 mL 0,25% Triton X -100), no gelo por 30 minutos e lavadas uma vez em tampão de incubação (0,5g de BSA em 100mL de PBS) por 10 minutos a 250 g e ressuspensas em tampão de incubação. Foi então adicionado anticorpo de coelho anti- caspase – 3 clivada humana (ASP 175) na diluição 1:25 (Cell Signaling, USA) e feita incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas duas vezes com 500 μL de tampão de incubação, 10 minutos cada, a 250 g, e em seguida incubadas com o anticorpo de cabra anti-IgG de coelho marcado com biotina (DAKO, EUA) na diluição 1:300 por 30 minutos a temperatura ambiente e posteriormente lavadas com tampão de incubação por 10 minutos a 250 g. Em seguida foi

acrescentada a estreptavidina conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição 1:50 (DAKOCYTOMATION, EUA) e feita incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com tampão de incubação, 10 minutos cada, a 250 g, ressuspensas em tampão de incubação e analisadas por citometria de fluxo (BD, EUA). Os resultados são expressos em % de fluorescência.

RESULTADOS

1-Infecção de Macrófago J774 com *Leishmania (L.) chagasi*.

Para avaliarmos a proteção de células J 774 da apoptose quando infectadas in vitro com *Leishmania (L.) chagasi* e as vias de sinalização envolvidas neste processo, padronizamos, inicialmente, a melhor concentração de soro fetal bovino (SFB) para crescimento de células J 774 em cultura, como sendo de 1% de SFB. Posteriormente, buscamos a melhor relação de número de parasitos/macrófago, assim como a melhor concentração de SFB a ser utilizada na infecção de macrófagos com promastigotas ou amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, além do tempo de infecção. Obtivemos como melhor resultado a relação de 5 parasitos/macrófago (5:1), com 5% de SFB e no tempo de 6 horas de infecção (Figura1). O mesmo foi feito com amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, obtendo-se resultados similares (dados não mostrados). A partir destes dados, os experimentos posteriores foram realizados nessas condições de cultura e infecção.

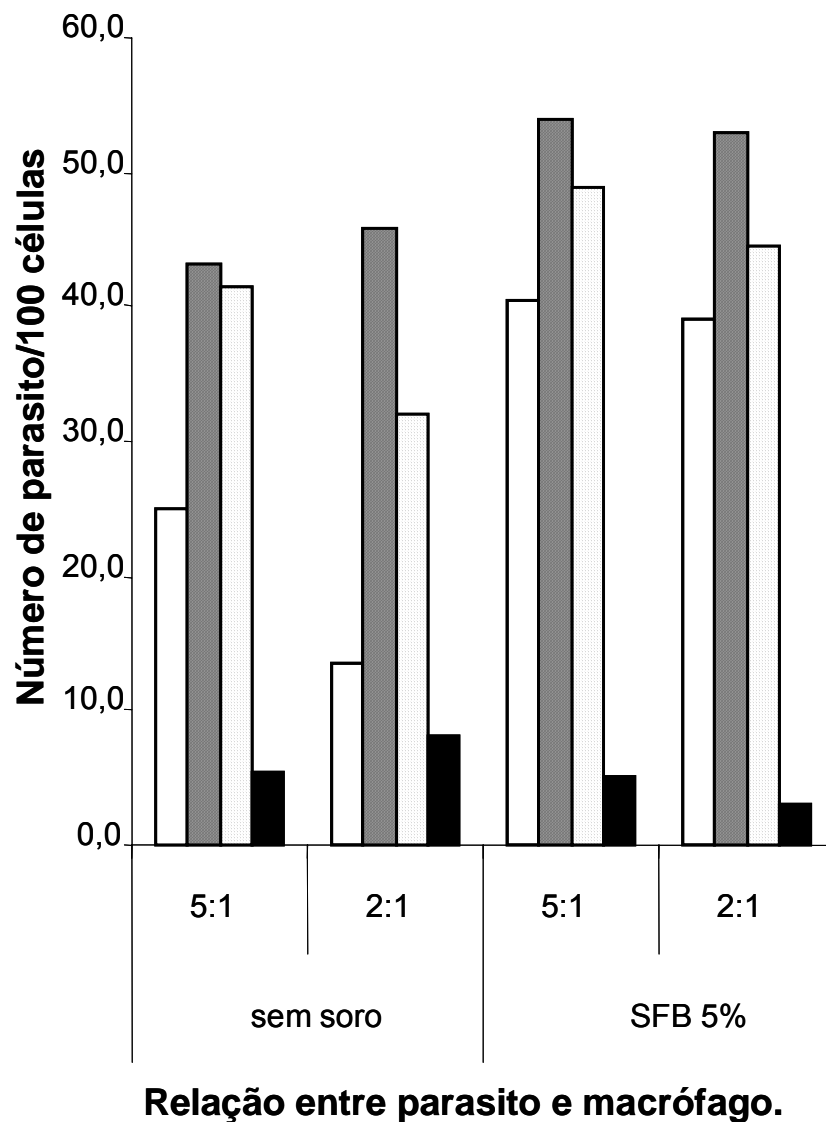


Figura 1- Grau de infecção em células J774 por promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, em tempos diferentes de cultura e relação parasito/célula de 2:1 e 5:1, na presença ou não de soro fetal bovino (SFB). 2×10^6 células foram incubadas por 2 horas para a sua adesão à placa e mantidas após infecção por diferentes tempos.

□ = 3 horas; ■ = 6 horas; ▨ = 24 horas; ■ = 48 horas

2. Indução de apoptose em célula J 774.

Inicialmente observamos que as células em cultura, sem nenhum estímulo adicional, já expressam um percentual de células que expõem fosfatidil serina, quando avaliada por ligação a anexina V, que interpretamos como morte por apoptose. Utilizando diferentes indutores de apoptose, fator de necrose tumoral humano recombinante (rTNF) e camptotecina (CPT) , em diferentes concentrações, observamos que CPT nas concentrações de 3 e 6 μ M e rTNF nas concentrações de 10ng/mL e 50ng/mL (Figura 2) foram os melhores estímulos para induzir apoptose em células J774.

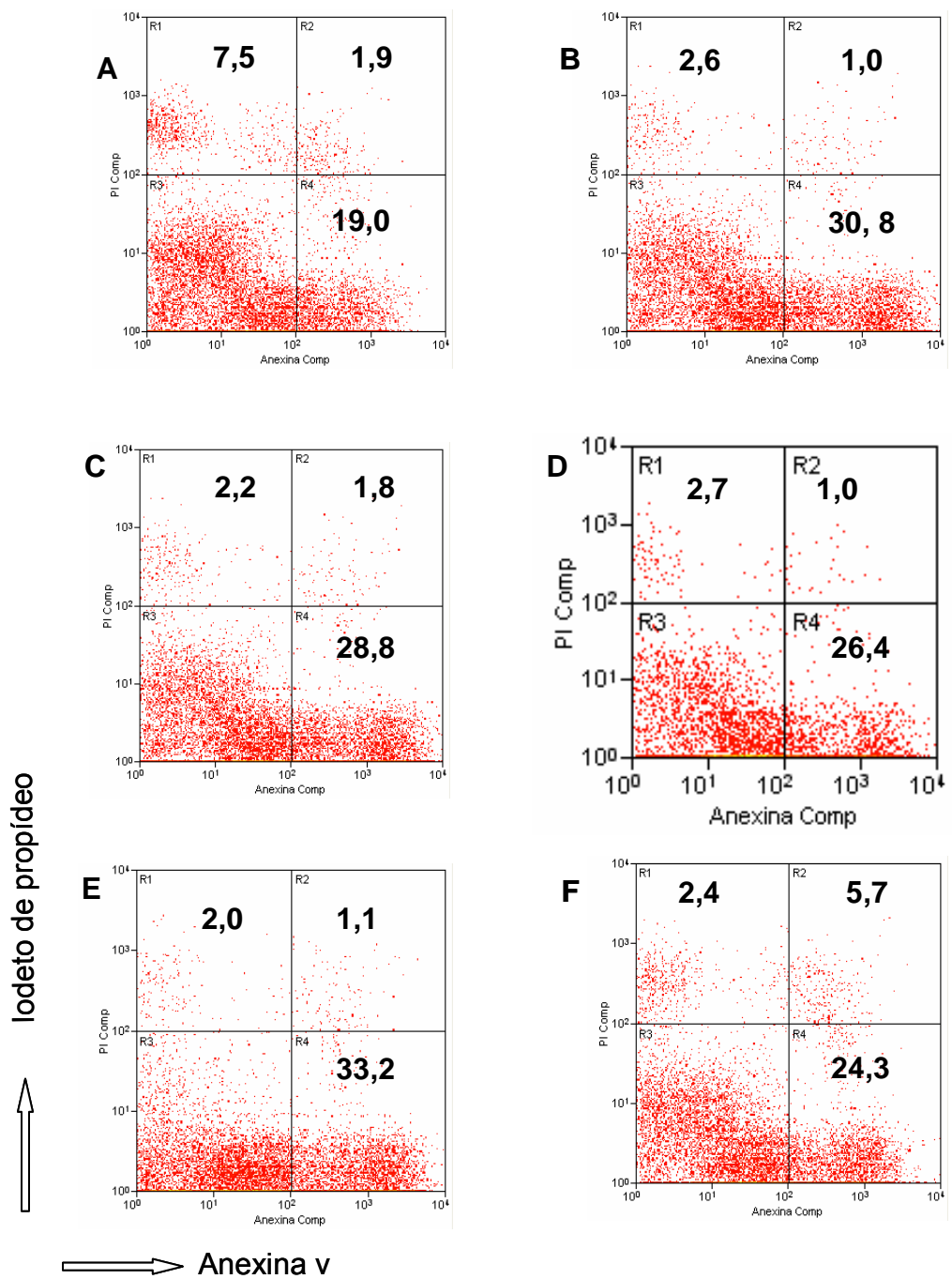


Figura 2. Detecção de apoptose (exposição de fosfatidil serina) em célula J774 induzida por diferentes concentrações de camptotecina (CPT) ou de TNF recombinante (rTNF) por 6 horas, pelo método de Anexina V por citometria de fluxo. Controle (A); CPT 3 μ M (B); CPT 6 μ M (C); CPT 9 μ M (D); rTNF 10ng/mL (E); rTNF 50ng/mL (F).

3. Proteção de apoptose em célula J 774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*

Estabelecidos os parâmetros para infecção de células J774 com promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e as condições que levam a apoptose, isto é, por tempo de cultura, indução com CPT ou rTNF, partimos para avaliar a proteção da célula de apoptose com a infecção.

Células J774 foram infectadas com amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e induzidas a apoptose por manutenção em cultura, uso de CPT 5 μ M ou rTNF 50 ng/ml nas condições previamente estabelecidas. Em cultura, as células não infectadas, mesmo sem a presença de agente indutor de apoptose, apresentam exposição de fosfatidil serina e ligação a anexina V em 19% no final do período do experimento (Figura 3 A). Esta porcentagem cai quando as células são infectadas com amastigotas ou promastigotas (Figura 3 B, C), no entanto, a queda é maior com as infectadas por promastigotas (Figura 3C). Quando utilizamos CPT (Figura 3D) ou rTNF (Figura 3G) ocorre aumento da porcentagem de células anexina V positivas em relação a células controle (Figura 3A). Porém, quando essas células induzidas, foram infectadas com amastigotas (Figura 3E) ou promastigotas a porcentagem de células anexina V positivas diminuíram consideravelmente (Figura 3F, H).

Com esses resultados mostrando proteção de apoptose quando as células eram infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*, passamos à avaliação de possíveis vias intracelulares envolvidas nesse processo de proteção. Avaliamos o envolvimento de mitocôndria analisando a alteração do potencial de membrana mitocondrial, a participação da HSP 83 de

Leishmania infantum como possível fator inibidor da apoptose, a clivagem da proteína nuclear alvo *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP) resultante da ativação de caspase 3, bem como a atividade de caspase 3 e ainda a presença da caspase 3 clivada.

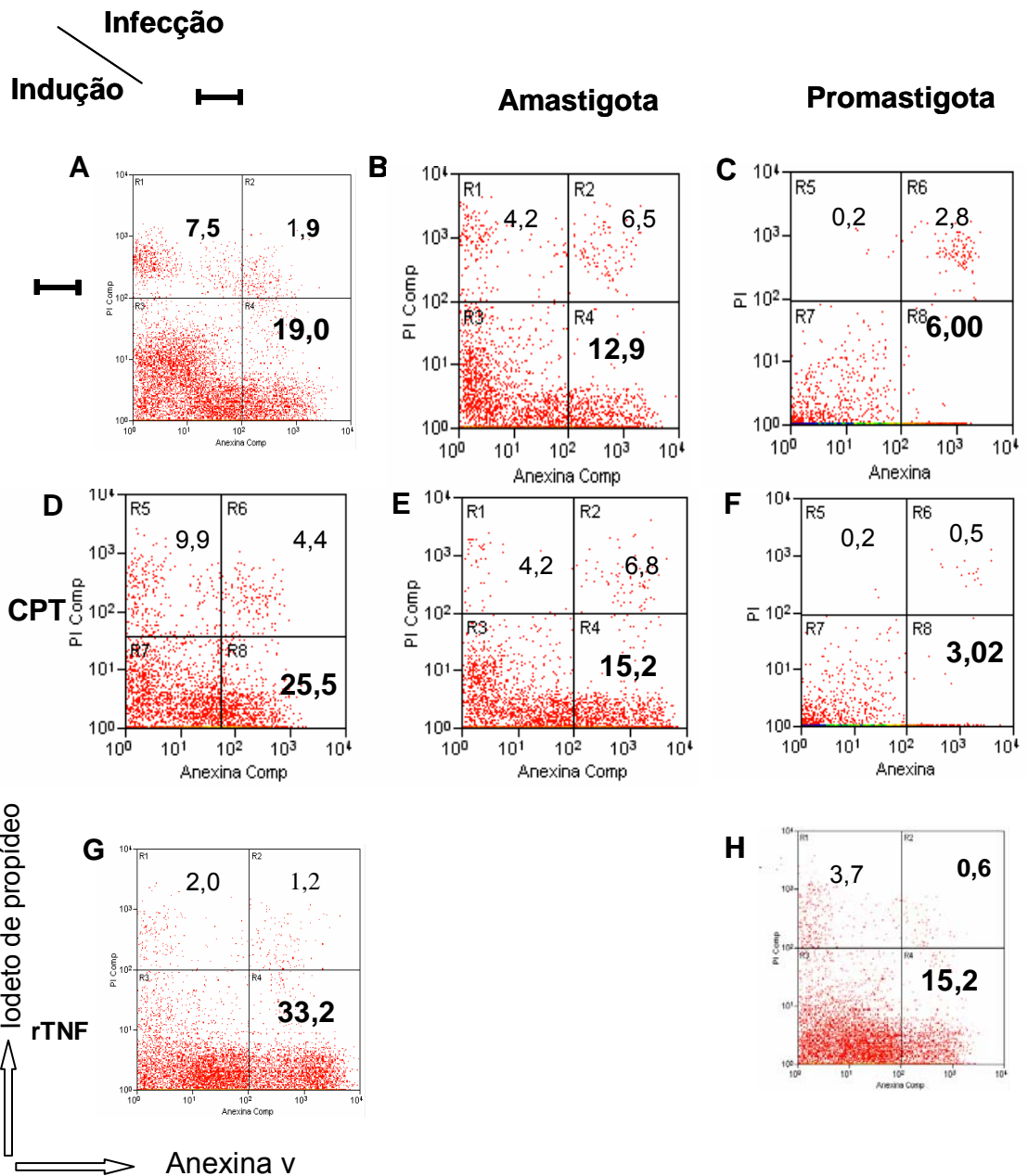


Figura 3. Apoptose em células J774, infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*, na presença de 5% de SFB e induzidas por 5 μ M de camptotecina (CPT) ou 10 ng de rTNF, detectada pelo método de Anexina V, analisadas por citometria de fluxo. Controle (A); amastigotas (B,E); promastigotas (C,F,H); CPT (D,E,F); rTNF (G,H).

4. Detecção da alteração do potencial de membrana da mitocôndria.

Em primeiro plano, para avaliar o funcionamento do Kit JC-1 que detecta alteração do potencial de membrana da mitocôndria por ser um corante catiônico por citometria de fluxo, utilizamos como controle positivo da reação um desacoplador de membrana mitocondrial “carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone” (FCCP) em diferentes concentrações (1,56 μM , 3,12 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM e 50 μM) (Figura 4). Observamos que o kit eficientemente mostra a alteração do potencial de membrana, atingindo 70 % de alteração do potencial de membrana da mitocôndria quando utilizamos a concentração de 50 μM de FCCP (Figura 4 G).

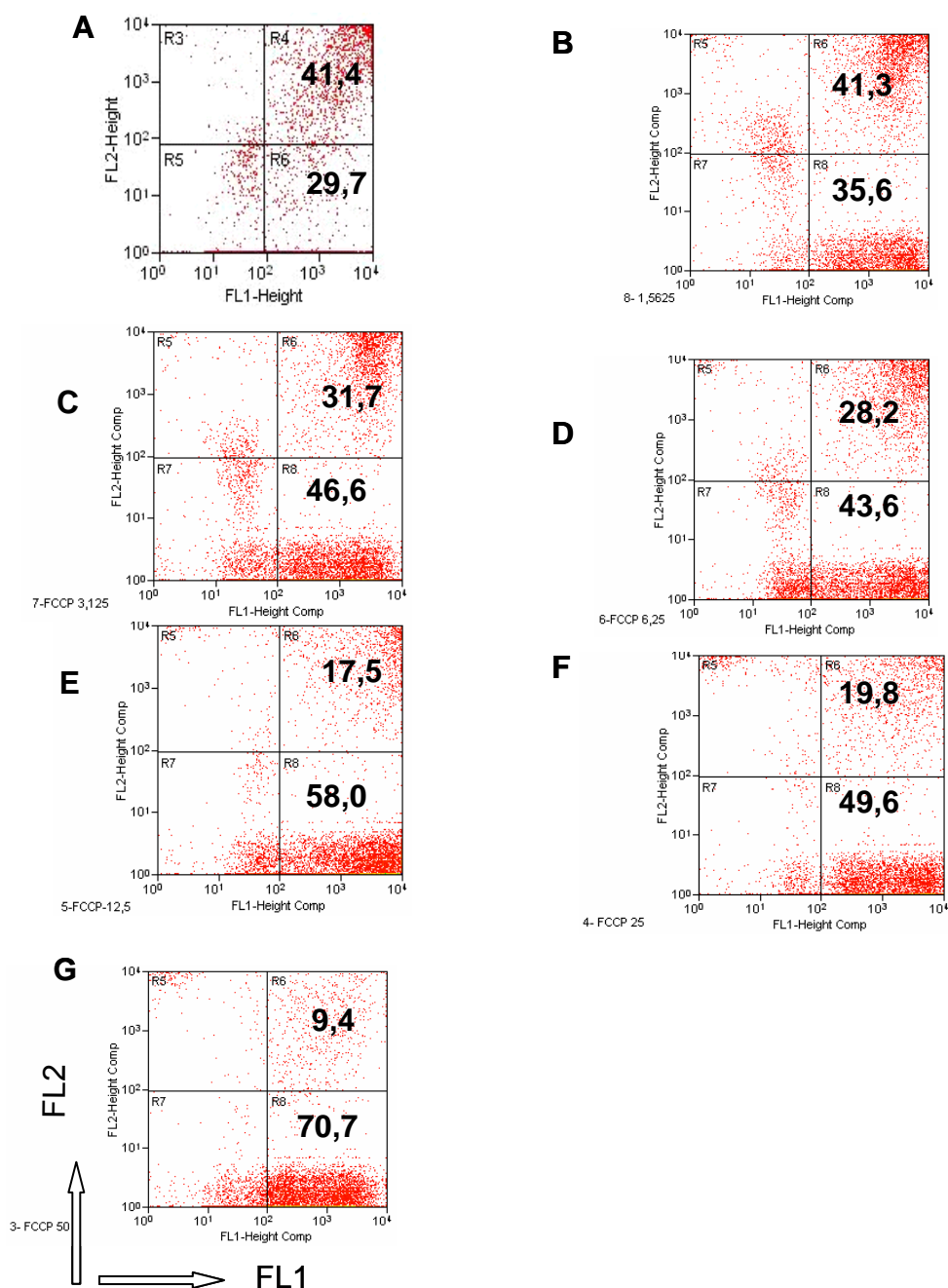


Figura 4 – Detecção do potencial de membrana da mitocôndria com diferentes concentrações do desacoplador de membrana da mitocôndria (FCCP). 10^6 células J774 foram incubadas para sua adesão à placa por 2 horas, induzidas por 6 horas com FCCP em diferentes concentrações, e incubadas com o corante catiônico JC-1, para detecção do potencial de membrana da mitocôndria. Análise por citometria de fluxo. Controle (A); FCCP $1,56 \mu\text{M}$ (B); FCCP $3,12 \mu\text{M}$ (C); FCCP $6,25 \mu\text{M}$ (D); FCCP $12,5 \mu\text{M}$ (E); FCCP $25 \mu\text{M}$ (F); FCCP $50 \mu\text{M}$ (G).

Na avaliação da alteração do potencial de membrana da mitocôndria em células controle e infectadas com amastigotas ou promastigotas e induzidas a apoptose por CPT e rTNF, as células em cultura, na ausência de estímulo indutor, apresentam alteração do potencial de membrana de mitocôndria em 30%. Essa porcentagem diminuiu com a infecção com amastigota para 23,2% (Figura 5B) o que não ocorre com promastigotas (Figura 5C). A indução de apoptose com CPT ou rTNF não aumentou o potencial de membrana da mitocôndria em relação às células controle, sem indução (Figura 5D e 5G), porém, a infecção com promastigotas em células induzidas por rTNF inibiu a alteração do potencial de membrana da mitocôndria (Figura 5 I).

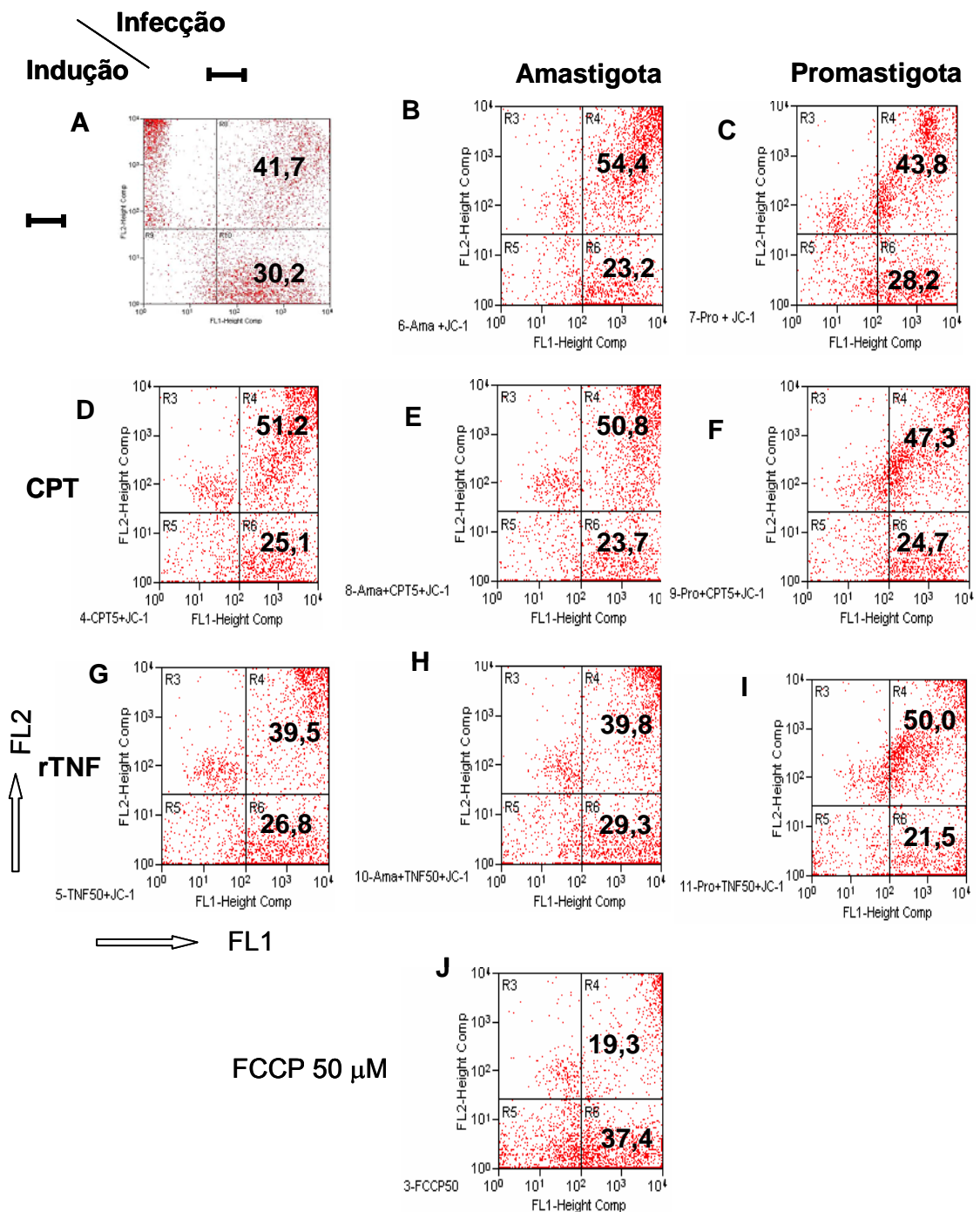


Figura 5 - Detecção do potencial de membrana de mitocôndria ($\Delta\Psi_m$) de células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*. 10^6 células J774 foram infectadas com amastigota ou promastigota (parasito: célula = 5:1), e induzidas por TNF recombinante (rTNF 50 ng/mL) ou camptotecina (CPT 5 μ M). Controle (A); infectadas com amastigota (B,E,H); infectadas com promastigota (C,F,I); induzidas por CPT 5 μ M (D,E,F); induzidas por rTNF 50ng/mL (G,H,I); desacoplador de membrana da mitocôndria (FCCP, 50 μ M) (J). Análise por citometria de fluxo utilizando corante catiônico JC-1.

5. Proteção de apoptose por HSP 83.

O potencial de membrana de mitocôndria apresentou alterações em algumas situações que reverteram com a infecção. Portanto, passamos ao estudo do possível envolvimento do APAF-1 que resulta da alteração em mitocôndria no processo de apoptose e contribui na formação do apoptossoma. Para tanto, recorreremos a chaperona HSP 83 da *Leishmania infantum*, pois proteínas do choque térmico foram descritas como inibidoras do APAF-1 (Heussler et al., 2001). A bactéria *E.coli* M15 contendo plasmídeo pQE-Li com gene de HSP83, incubada com IPTG que induz a expressão da proteína, foi lisada e o sobrenadante e o sedimento analisados em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. No sobrenadante não detectamos a HSP83, mas, sim no sedimento (Figura 6), confirmando a sua localização celular. Isto nos direcionou para o protocolo utilizando a própria bactéria contendo o inserto do Hsp83 no experimento de proteção da apoptose. Esta abordagem trazia a vantagem de mimetizar a infecção de macrófago por leishmânia, pois as bactérias são também fagocitadas por essas células e além de expressar Hsp83, quando induzida por IPTG, à semelhança do que possivelmente ocorre com leishmânia que expressa Hsp83 durante a infecção.

Nas diferentes condições que levam à apoptose, isto é, manutenção em cultura ou indução por CPT ou rTNF, a presença de bactéria que expressa Hsp83, na presença de IPTG, levou à diminuição da porcentagem de células em apoptose. (Figura 7 C, E, G) em relação às células com a bactéria sem IPTG (Figura 7 B) e em relação a células com os indutores CPT (Figura 7 D) ou rTNF (Figura 7F).

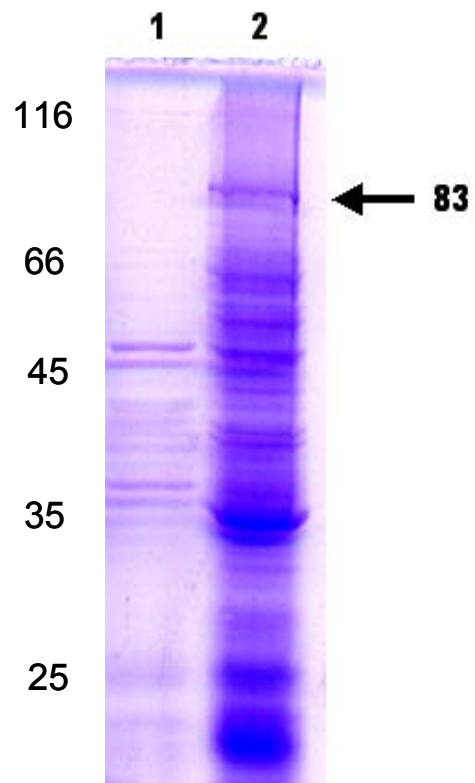


Figura 6. Detecção da expressão de HSP 83 de *Leishmania infantum* por Western blotting. Linha 1. Sobrenadante de cultura de bactéria com IPTG. Linha 2. Sedimento de cultura de bactéria com IPTG. IPTG= Isopropil-1 tio-beta-D galactosideo

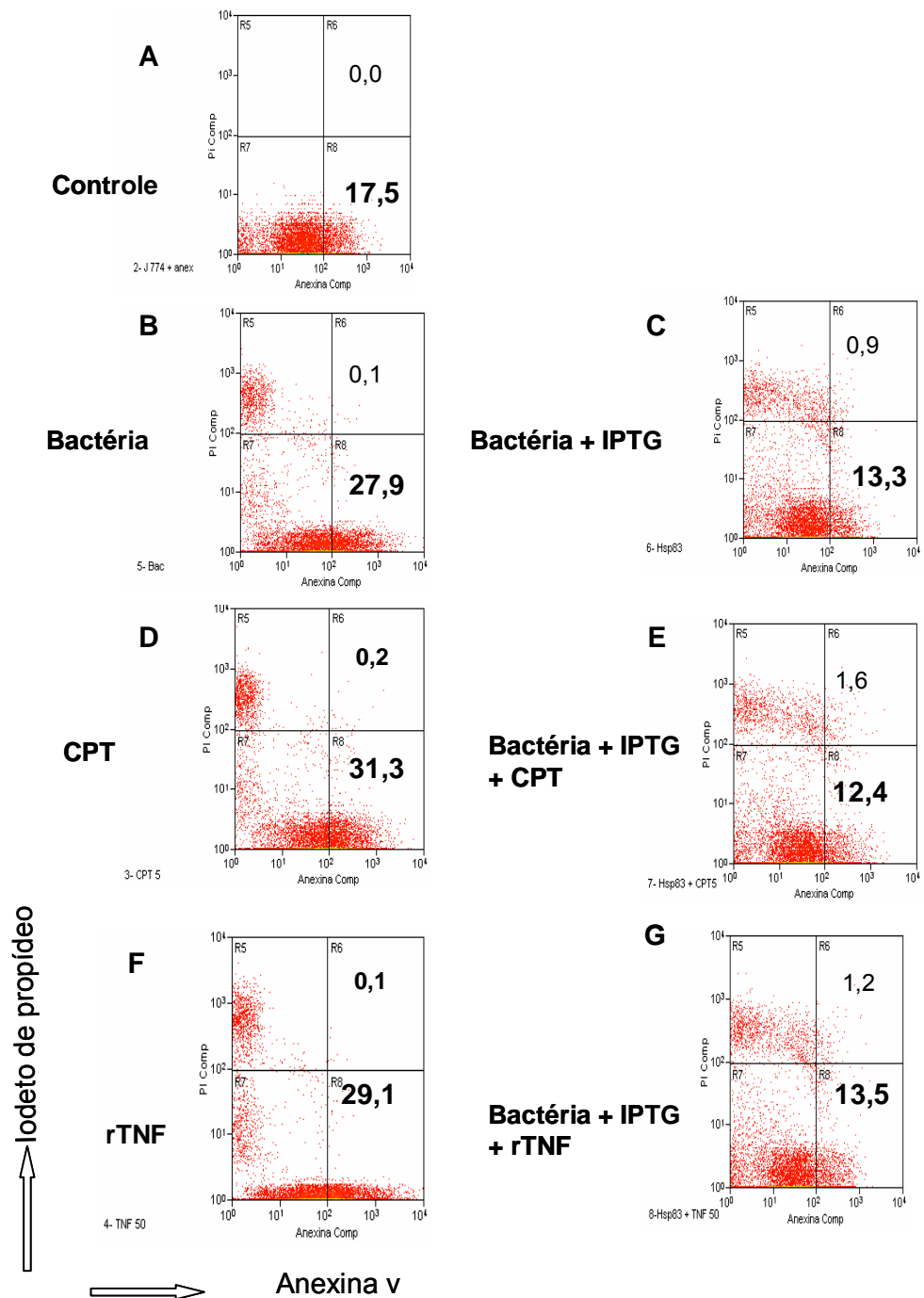


Figura 7- Efeito da proteína do choque térmico de 83 kDa (HSP83) de *Leishmania (L.) infantum* na apoptose de células J 774. 10^6 células J774 foram infectadas com bactéria M15 contendo plasmídeo com o inserto de gene de HSP 83 de *Leishmania (L.) infantum* na presença ou não de IPTG por 30 minutos e induzidas por rTNF 50 ng/mL ou camptotecina (CPT) 5 μ M por 6 horas. Controle (A); Bactéria (B); Bactéria + IPTG (C); CPT 5 μ M (D); Bactéria + IPTG induzida por CPT (E); rTNF 50 ng/mL (F); Bactéria + IPTG induzida por rTNF (G). Análise por citometria de fluxo, utilizando o método de Anexina V.

IPTG= Isopropil-1 tio-beta-D galactosídeo

6. Detecção de PARP em células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* e induzidas a apoptose por CPT

Um dos elementos que se destaca no processo de apoptose é a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) que é ativada em consequência à fragmentação do DNA. Subseqüentemente, PARP sofre fragmentação nesse processo (Hong et al., 2004; Ivana Scovassi and Diederich, 2004; Koh et al., 2005). Nas células J774 analisamos a expressão de PARP por Western-blot e avaliamos por densitometria (Figuras. 8 A, B e C). Em relação às células sem indução, a indução por CPT não levou ao aumento da PARP de 116 kDa, não mostrou aparecimento de bandas de massa molecular de 89 kDa, porém, houve aumento da banda de 24 kDa. Por outro lado, a infecção por amastigota de *Leishmania (L.) chagasi* em células J774, sem a presença de qualquer indutor, levou à diminuição da expressão de PARP de 116 kDa, não aparecimento de fragmento de 89 kDa, mas aumento da de 24 kDa. Nas células infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, observamos uma diminuição da banda de 116 kDa, aparecimento de uma molécula de 89kDa e diminuição da expressão da de 24 kDa.

Em relação às células sob indução por CPT, a infecção por amastigota na presença de CPT mostrou diminuição da expressão da molécula de 116 kDa, não aparecimento da molécula de 89 kDa, mas, diminuição da de 24 kDa. Por outro lado, a infecção por promastigota na presença de CPT, não alterou a expressão da molécula de 116 kDa, levou ao aparecimento da molécula de 89 kDa , mas, diminuição da de 24 kDa.

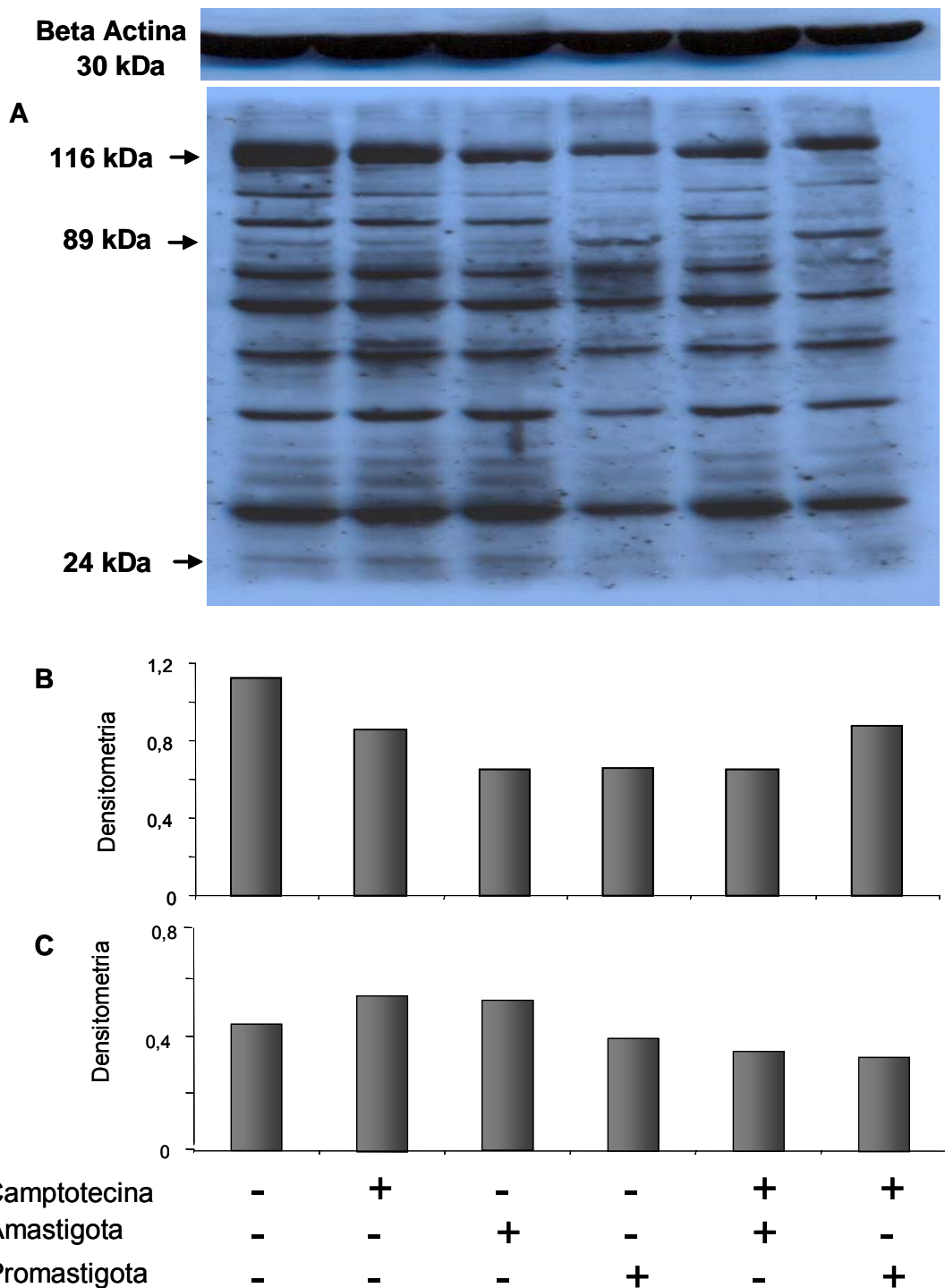


Figura 8 - Detecção de PARP [Poli (ADP-ribose) polimerase] 116 kDa em células J774 infectadas por *Leishmania (L.) chagasi*. 10^6 células J774 foram infectadas com amastigota ou promastigota (parasito:célula = 5:1) por 6 horas e induzidas por camptotecina (CPT $5\mu\text{M}$) por 6 horas. Amostras foram submetidas a SDS-PAGE 12% e analisadas por western blot utilizando-se anticorpo policlonal de coelho anti-PARP bovino. A- Western blot, B- Densitometria de molécula de 116 kDa. C- Densitometria de molécula de 24 kDa

7. Detecção da atividade de caspase 3 e caspase 3 clivada em células infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* e induzidas a apoptose por CPT ou H₂O₂:

Um dos processos chaves para que ocorra a apoptose é a ativação de caspase 3. A cultura de células sem indução com CPT apresenta uma certa atividade de caspase 3 que na presença de infecção por promastigotas diminuiu quando comparada ao controle. A indução com CPT não levou ao aumento da atividade de caspase 3 em relação à célula sem indução.

Para avaliarmos o efeito da infecção na atividade da caspase 3, utilizamos H₂O₂ na concentração de 150 µM que sabidamente induz a atividade de caspase 3 (Jiao et al., 2006). Os resultados mostram que H₂O₂ aumenta a atividade de caspase 3 e quando as células foram infectadas com amastigotas ou promastigotas houve uma redução da atividade de caspase 3, sendo mais eficiente com promastigotas. (Figura 9).

Como havíamos demonstrado uma diminuição na atividade de caspase 3, partimos para avaliar a presença da caspase 3 clivada. Para isto avaliamos esse produto por citometria de fluxo, utilizando anticorpo anti-caspase 3 clivada e utilizando ainda H₂O₂ como ativador da caspase 3. Nas células sem tratamento detectamos caspase 3 clivada em 11,1% que não se alterou visivelmente quando infectadas por amastigotas ou promastigotas (Figura 10 A, B e C) . Camptotecina não induziu o aumento caspase 3 clivada, nem apresentou alteração na presença de infecção. Entretanto, com H₂O₂ observamos aumento da porcentagem de caspase 3 clivada (Figura 10 D) e essa porcentagem foi reduzida com a infecção tanto com amastigotas (Figura 10 E) como promastigotas (Figura 10 F).

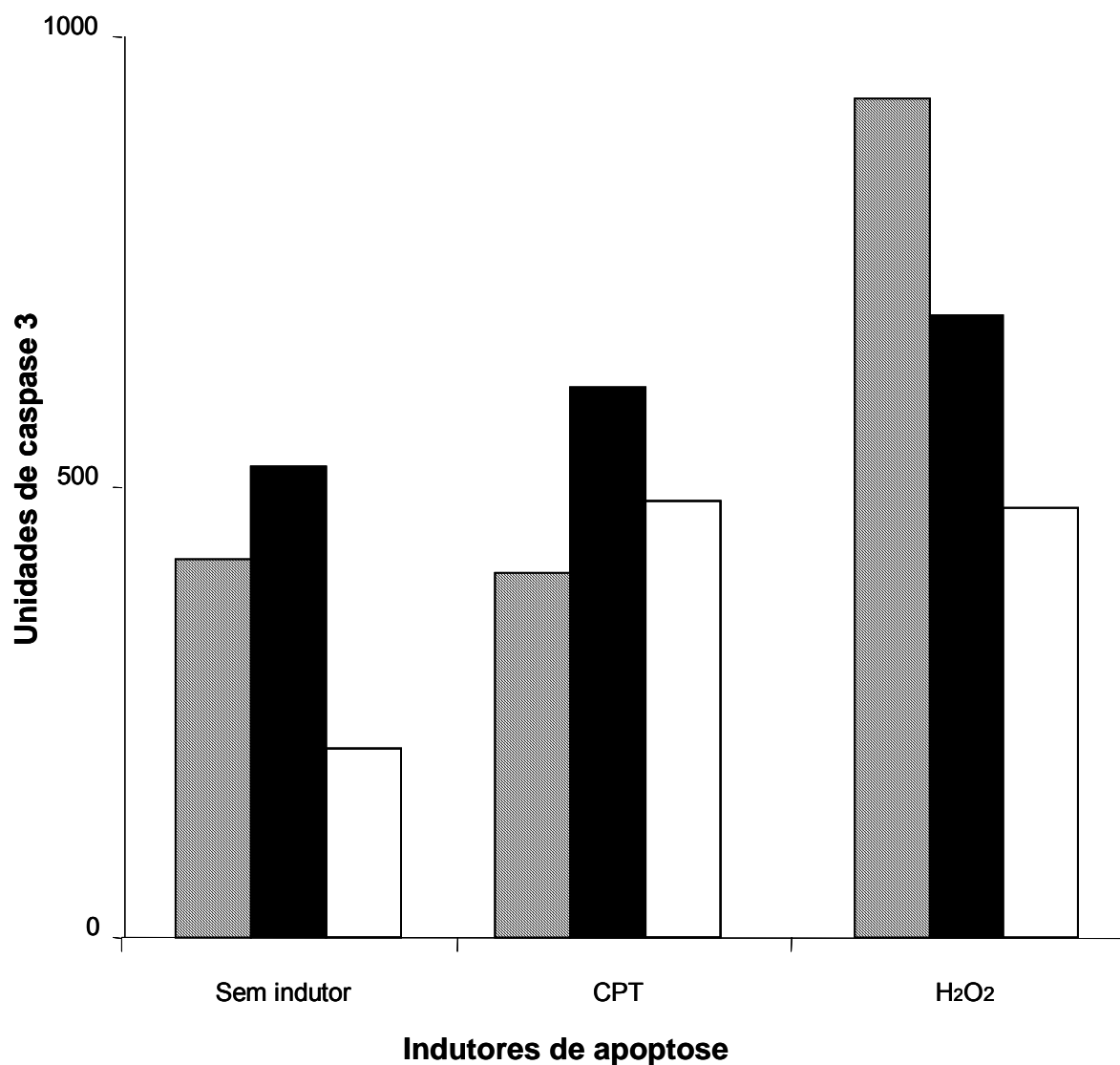


Figura 9 – Efeito da infecção com amastigota ou promastigota de *Leishmania (L.) chagasi* na atividade de caspase 3. 2×10^6 células J774 foram infectadas com amastigota ou promastigota de *Leishmania (L.) chagasi* (parasito:célula = 5:1) por 6 horas e induzidas por H₂O₂ (150 μM) ou Camptotecina (CPT) 5 μM por 6 horas. A detecção foi realizada por “Fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay” (FIENA).

▨ Sem Infecção ■ Amastigota □ Promastigota

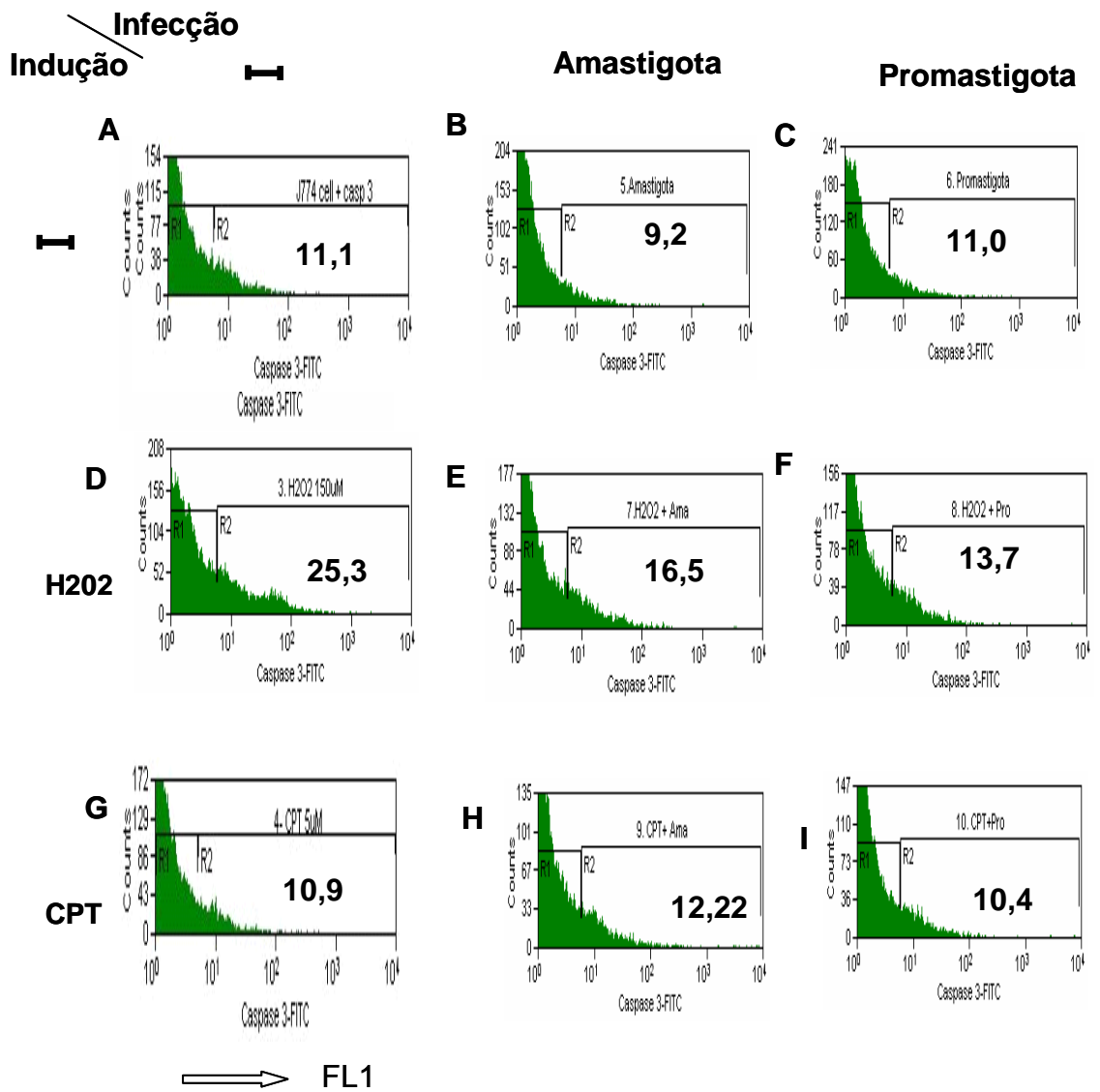


Figura 10 - Detecção de caspase 3 clivada em células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi*. Células J774 foram infectadas com amastigota ou promastigota (parasito:célula =5:1) por 6 horas e induzidas por H2O2 (150µM) ou Campototecina (CPT) 5 µM por 6 horas. Controle (A); amastigota (B,E,H); promastigota (C,F,I); H2O2 (D,E,F); CPT (G,H,I). Analisada por citometria de fluxo.

DISCUSSÃO

No estabelecimento e no desenvolvimento da infecção por leishmânia, o parasito recorre a diversos mecanismos para evadir-se da resposta imune protetora, incluindo a inibição de apoptose da célula hospedeira, observada tanto em experimentos *in vitro* (Moore and Matlashewski, 1994) como *in vivo* em leishmaniose visceral em hamsteres (Lindoso, 2001.). Esta inibição da apoptose de células do hospedeiro por parasito protozoário intracelular é importante por viabilizar a vida deste protozoário dentro de uma célula que, na vigência do processo inflamatório, pode ser eliminado por apoptose, com conseqüente eliminação de parasitos no seu interior. As diversas estratégias utilizadas por este parasito, provavelmente subvertem a seu favor a transdução de sinais apoptóticos e propicia condições para estender o tempo de vida da célula hospedeira. Contudo, pouco se sabe a respeito dos mecanismos biológicos celulares de tais interferências e suas implicações no processo de inibição da apoptose.

Para realizarmos este estudo das vias envolvidas na proteção do macrófago da apoptose na infecção por leishmânia, utilizamos a linhagem celular macrófagica J774 considerando suas características bastante peculiares que favorecem a abordagem de mecanismos de inibição de apoptose. A linhagem celular macrófagica J774 foi estabelecida a partir de um tumor crescido em um camundongo BALB/c fêmea e corresponde a uma fase definida de desenvolvimento do macrófago (<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?5463>) e já foi utilizada em vários estudos que avaliaram os mecanismos de transcrição de sinal em diferentes sistemas (Abarca-Rojano et al., 2003; Balaraman et al., 2005; D'Agostino et

al., 2003; Hisaeda et al., 1997; Iбата-Ombetta et al., 2003; Lai and Sjostedt, 2003; Zhang and Wang, 2003). Além disso, essas células expressam receptores para imunoglobulinas e complemento, os quais facilitam a entrada da leishmânia no macrófago sem ativar os mecanismos efetores desta célula (<http://www.cellsciences.com>). De acordo com (Cunningham, 2002), promastigotas metacíclicos opsonizam-se com as partículas C_{3b} e C_{3bi} do complemento os quais se ligam aos receptores CR1 e CR3 do macrófago, respectivamente, sendo esta a via predominante de entrada no macrófago por estes parasitos e que promovem a fagocitose sem desencadear o *burst* oxidativo, facilitando a sobrevivência do mesmo (Mosser and Edelson, 1987). Também está descrito que amastigotas de *L. major* e *L. donovani* usam o receptor CR3 para internalização na célula hospedeira (Alexander et al., 1999). Além disso, amastigotas de *L. major* e de *L. mexicana* usam opsonização por imunoglobulinas para entrarem no macrófago utilizando-se do receptor Fc (Guy and Belosevic, 1993; Peters et al., 1995).

No presente trabalho, estabelecemos no macrófago J774 a infecção por amastigotas ou promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* e partimos para avaliação da proteção de apoptose e da possível via de transdução de sinal de apoptose envolvida, utilizando três estímulos: a indução de morte por rTNF que o faz por receptores da grande família de receptores de TNF (TNFR1), portanto, por via considerada extrínseca; a indução de morte por camptotecina (CPT), inibidora da topoisomerase I no DNA, que atua diretamente no núcleo e ainda a privação de nutrientes que provavelmente agiria na via intrínseca da mitocôndria.

Os dados de nosso estudo in vitro mostraram que a apoptose de macrófagos J774 foi inibida pela infecção com amastigotas e mais proeminentemente com promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, quando induzidas por fator de necrose tumoral recombinante humano (rTNF) ou por camptotecina (CPT) ou por privação de nutrientes. O fato da proteção de apoptose ser em diferentes graus por estes parasitos, de forma mais marcante quando estes macrófagos estavam infectados com promastigotas, sugere que a proteção de apoptose envolve vias diferentes.

Nossos resultados sobre proteção de apoptose em células J774 suscitaram outros experimentos que pudessem esclarecer quais as possíveis vias de sinalização envolvidas neste processo.

Iniciamos esse estudo por um ponto da via intrínseca, detectando o potencial de membrana da mitocôndria, devido ao fato de que certos sinais como dano no DNA e stress, estimularem o recrutamento de Bax (membro pró-apoptótico da família Bcl-2) que se liga à membrana externa da mitocôndria e faz poros que propiciam o colapso do potencial de membrana da mitocôndria. (Heussler et al., 2001; Kluck et al., 1997). A perda do potencial de membrana favorece a liberação do citocromo c para o citossol onde se associa ao fator 1 de ativação de protease de apoptose (APAF-1) e com posterior associação a caspase 9 formando o apoptosoma que age com sinal direto para a caspase executora 3 (Heussler et al., 2001). Utilizamos para detecção do potencial de membrana, um corante catiônico JC-1 que se liga a membrana da mitocôndria sadia carregada negativamente e emite coloração em vermelho enquanto que em membranas que estão entrando em apoptose, o corante catiônico JC-1 começa a entrar para a parte interna

da mitocôndria, quebrando-se em monômeros e emitindo nestas condições a coloração em verde, emissões essas analisadas por citometria de fluxo.

Nossos resultados mostram que há envolvimento da via da mitocôndria na situação de privação de nutriente e de indução por rTNF, pois a infecção por amastigota e por promastigota reverteram, respectivamente, a alteração do potencial de membrana. Alguns autores já mostraram atuação de TNF passando por mitocôndria (Wajant et al., 2003). No nosso estudo, não se observou reversão do potencial de membrana por CPT embora envolvimento da mitocôndria com o uso de CPT tenha sido relatado anteriormente em outra linhagem celular (Sordet et al., 2003). Nossos resultados corroboram ainda os resultados (Akarid et al., 2004) que mostram que a infecção de macrófagos derivados de medula óssea com *Leishmania major* previne a liberação de citocromo c da mitocôndria. Há relatos de que a perda do potencial de membrana da mitocôndria está correlacionada com a indução de apoptose e que bcl-2 protege a mitocôndria deste efeito. Além deste aspecto, a despolarização da mitocôndria na apoptose parece estar associada com a transição de permeabilidade, um evento que envolve a formação de um canal inespecífico nas membranas mitocondriais, as quais são também bloqueadas por bcl-2 (Kluck et al., 1997). A participação de bcl-2 na infecção por leishmânia necessita de estudos posteriores. O próximo passo dentro dos nossos estudos, dentro ainda da via intrínseca, foi analisar a inibição da via de apoptose, utilizando uma proteína do choque térmico ("heat shock protein" = HSP) de 83 kDa de *Leishmania (L.) infantum*. O evento que se segue à alteração do potencial de membrana da mitocôndria é a liberação de citocromo c e Apaf-1 que resultam na formação do

apoptossoma onde interferência de HSP fora relatado (Heussler et al., 2001).

Sabidamente, as HSPs, são uma família altamente conservada evolucionariamente, e podem estar envolvidas com a adaptação de patógenos ao ambiente do hospedeiro e na transformação de microrganismos em formas proliferativas. E o mais importante, parece que as HSPs nas células hospedeiras protegem estas células das consequências do stress associado com a infecção (Hisaeda et al., 1997).

Dentro dos estudos de proteção de apoptose, foram descritos os efeitos anti-apoptóticos de HSP70 e HSP90 através de sua associação direta ao Apaf-1, inibindo deste modo a formação do apoptossoma (Mosser et al., 2000; Pandey et al., 2000; Saleh et al., 2000), fator determinante para ativação de caspase 3 (Ikeyama et al., 2001).

Em nossos estudos utilizamos uma bactéria *E.coli* M15, contendo o gene de HSP 83 de *Leishmania (L.) infantum*, ligado ao plasmídeo pQE-Li. Analisando a expressão da HSP83 pela bactéria, observamos que a proteína expressa permanece ligada a célula e não é secretada. Isto nos direcionou para utilizar a própria bactéria com gene de HSP83 nos experimentos e foi um protocolo que mais se aproximou do que ocorre no processo de infecção de macrófago por leishmânia. No nosso experimento, ao invés da leishmânia que é fagocitada por macrófago, utilizamos a bactéria para ser fagocitada e utilizamos IPTG que leva a indução da expressão da proteína na bactéria. Observamos no nosso estudo, a proteção de apoptose em macrófagos J774 quando infectados com bactéria M15 na presença do indutor IPTG em todas as condições avaliadas: privação de nutriente, e com rTNF ou CPT.

Estes resultados de proteção de apoptose por HSP83 em célula J774 corroboram os trabalhos descritos na literatura que mostram proteção, por exemplo, de hepatócitos de rato por HSP70 quando sob indução da apoptose por H₂O₂ e etanol, além dessa inibição ser também descrita com HSP65 e HSP90 em outros tipos celulares (Heussler et al., 2001; Hisaeda et al., 1997; Ikeyama et al., 2001).

Os nossos resultados sugerem que HSP83 pode atuar na via intrínseca quando alteração do potencial de membrana de mitocôndria ocorrer na infecção por leishmânia, inibindo a formação de apoptossomo. Entretanto, nossos achados sugerem que a proteção de HSP 83 de *Leishmania infantum* em macrófago J774 pode atingir outras vias, uma vez que foi eficiente também na apoptose induzida por CPT que aparentemente não alterou o potencial de membrana de mitocôndria.

Um outro fator importante para modular a morte por apoptose é a atividade da enzima nuclear poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) de 116 kDa que é expressa quando há quebra do DNA. O acúmulo da proteína poli (ADP-ribosilada), o polímero PAR, no entanto, resulta no consumo de NAD⁺ e ATP, levando ao dano celular, o que é controlado pela degradação da PARP pela caspase 3. Portanto, no processo de apoptose, pode ocorrer aumento da expressão da PARP e/ou fragmentação em moléculas de 89 e 24 kDa (Hong et al., 2004; Rodriguez-Hernandez et al., 2006).

Em nossos estudos investigamos se a presença do parasito da *Leishmania (L.) chagasi* poderia interferir na clivagem de PARP. Nós observamos que a indução por CPT não levou ao aumento da PARP de 116

kDa ou do fragmento de 24 kDa nas células J774, nem induziu a fragmentação desta em molécula de 89 kDa.

Por outro lado, a infecção por amastigotas e promastigotas de *Leishmania (L) chagasi*, sem a presença de qualquer indutor, apresentou uma diminuição da expressão de PARP de 116 kDa. Devido provavelmente a inibição de apoptose gerada por estes parasitos quando estes estão sob condições de cultura, momento em que a célula sem o parasito apresenta apoptose em decorrência da perda de nutrientes e fatores de crescimento, com a presença dos parasitos, a esperada quebra de DNA não ocorre e conseqüentemente esse aumento de PARP não é observado.

De modo intrigante, nas células infectadas por promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* observamos fragmento de 89 kDa, independente da indução ou não por CPT. Esse resultado é contraditório em relação à inibição da apoptose na presença de infecção, encontrada neste estudo e em outros (Lindoso, 2001.; Moore and Matlashewski, 1994), uma vez que o encontro dos fragmentos de 89 kDa e de 24 kDa é tido como sinal de apoptose (Koh et al., 2005). Por outro lado, o trabalho de (Goebel et al., 2001) mostra resultados similares aos nossos onde a inibição de apoptose por *Toxoplasma gondii*, em células HL-60 e U937 foi acompanhada de alterações na expressão de PARP e com clivagem de PARP com aparecimento de fragmento de 83 kDa.

Devemos ressaltar, no entanto, que encontramos diferença na expressão de 24 kDa nas diferentes condições, com aumento da sua expressão sob indução por CPT e sua diminuição nas células infectadas. Este encontro talvez explique essa aparente contradição do encontro de

fragmentação do PARP na vigência de inibição de apoptose, pois, recentemente o papel dos diferentes fragmentos vem sendo elucidado. Sabe-se que o fragmento de 24 kDa contém um domínio de ligação de DNA que possivelmente facilitaria o processo de apoptose por bloquear o acesso de enzimas reparadoras de DNA fragmentado, enquanto que o fragmento de 89 kDa teria alguma ação na prevenção da depleção de energia ou na sinalização de dano ao DNA (Koh et al., 2005). Desta forma, o fragmento de 24 kDa propiciaria e o de 89 kDa preveniria da apoptose, o que é condizente com os nossos achados.

Nossos resultados trazem a tona algo que não fora observado com este protozoário em relação à inibição dos processos apoptóticos envolvendo uma proteína nuclear alvo, que parece guardar outras possibilidades que não as descritas, redefinindo talvez, o papel de PARP em apoptose, ora propiciando a morte celular, ora inibindo-a.

Entre as diferentes classes de moléculas implicadas no processo apoptótico, talvez a mais proeminente seja uma família de cisteína proteínas que clivam especificamente após resíduos aspárticos. Três grandes vias foram identificadas de acordo com a atuação destas cisteínas: via por receptor de morte envolvendo a caspase iniciadora 8; a via do stress do retículo endoplasmático atribuída a ativação da caspase 12 e a via mitocondrial, levando a ativação da caspase 9 (Rodriguez-Hernandez et al., 2006). Contudo é a caspase 3 que exerce um papel central no direcionamento das vias de apoptose e na clivagem proteolítica de substratos que determinam a morte celular por apoptose.

Realizamos a detecção da atividade de caspase 3 e também a presença da caspase 3 clivada em macrófagos J774.

Nos macrófagos J774, a CPT não induziu aumento da atividade da caspase 3 além do que foi observado com célula em cultura, em provável situação de privação de nutriente. No entanto, somente na primeira condição, a infecção com promastigotas reduziu a atividade da caspase 3, sugerindo que nessa condição, talvez a via intrínseca esteja ativando a caspase 3 que não estaria sendo ativada pela CPT. A capacidade da leishmânia de inibir a atividade da caspase 3 foi diretamente estudada utilizando H_2O_2 que sabidamente é tido como indutor de caspase 3 (Ishisaka et al., 2002; Kim et al., 2006). A atividade da caspase 3 induzida por H_2O_2 foi claramente inibida tanto por amastigotas quanto por promastigotas. Nossos resultados corroboram o trabalho de (Akarid et al., 2004), onde a atividade de caspase 3 foi observada em macrófagos de medula quando induzidos por estaurosporina, mas não quando infectados por *Leishmania major*.

Os resultados obtidos com a detecção de caspase 3 clivada, quando utilizamos H_2O_2 também mostram capacidade tanto de amastigotas quanto de promastigotas de inibir a geração de caspase 3 clivada, embora não tenha sido possível observar efeito semelhante com outros estímulos.

Tomados à luz de nossos esclarecimentos, nossos resultados apontam para uma interferência da *Leishmania (L.) chagasi* na cascata sinalizadora de apoptose, promovendo a inibição deste processo em células J774 infectadas por este parasito mesmo quando induzidas por rTNF ou CPT e pela via de privação de nutrientes. A proteção de apoptose por amastigotas e promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*, frente aos

estimulos utilizados, foi evidente e de modo mais marcante com promastigotas.

Estamos longe de esgotar a análise das diversas vias de apoptose e sua inibição durante a infecção por leishmânia, mas, com o uso de diferentes indutores, avaliamos vários pontos das diferentes vias e podemos concluir que leishmânia tem capacidade de interferir em vários pontos das diferentes vias. Tem capacidade de reverter a alteração do potencial de membrana na mitocôndria, provavelmente atua na via extrínseca, pois, nas diversas abordagens, a infecção inibe a apoptose ou os sinais que levam a apoptose induzida por rTNF, além da capacidade de inibir a atividade da caspase 3 ou geração da caspase 3 clivada e modular a fragmentação da enzima PARP.

Uma indagação que sempre acompanha nesses estudos é em relação ao componente da *L. (L.) chagasi* que estaria envolvido nesses processos de inibição das vias de apoptose. Neste trabalho apontamos um candidato, HSP83, embora acreditemos que outras moléculas do parasito possam contribuir. O fato de ser mais evidente com a infecção por promastigotas, reforça o papel de HSP83, pois sua expressão se espera mais marcante nessa forma do parasito. Outras moléculas são apontadas, no entanto, em estudos de outros autores. Estudos realizados por (McNeely and Turco, 1990) demonstram a importância do lipofosfoglicano (LPG) presente na parede celular de promastigotas metacíclicos, para sobrevivência intracelular de *Leishmania donovani* dentro de monócitos humanos. Também foi descrito em outro patógeno intracelular, *Mycobacterium tuberculosis*, a presença de um complexo molecular de fosfatidilinositol que ancora grandes quantidades de manose,

lipoarabinomannan (LAM) à parede celular deste patógeno, promovendo a sobrevivência do macrófago (Maiti et al., 2001). Além deste aspecto é possível que algum fator de promastigota de *Leishmania (L.) chagasi* (HSP 83, IGF-I, lipofosfoglicano) esteja envolvido com algumas proteínas inibitórias CDKs (p²⁷ e p²¹) do ciclo celular, devido ao fato de serem afetadas por indutores de morte celular como camptotecina, usada em nossas investigações ou outras inibidoras de topoisomerasas, como relatados por (Chen et al., 2004; Liu et al., 2003; Xaus et al., 2001).

Os nossos estudos, se por um lado, apontam a interferência da infecção por leishmânia em várias etapas e vias de apoptose, mostra também a complexidade do problema, uma vez que a reversão desta interferência da infecção na apoptose que favoreceria o hospedeiro envolve moléculas do parasito e diferentes proteínas intracelulares de vias intrínsecas da célula hospedeira envolvidas nessa interação.

CONCLUSÕES

- Detectamos a inibição de apoptose (fosfatidil serina) em macrófagos J774 tanto por amastigotas quanto por promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* in vitro, induzidos ou não por CPT ou rTNF, ou por privação de nutrientes, com maior eficiência com promastigotas.
- O potencial de membrana da mitocôndria de células J774 infectadas com *Leishmania (L.) chagasi* in vitro apresentou-se diminuído em células sob privação de nutrientes, o que foi revertido pela infecção da amastigota. Em células sob indução por rTNF, observamos a reversão deste potencial por promastigotas.
- A HSP83 de *Leishmania (L.) infantum* exibiu um efeito de inibição da apoptose em células J774 in vitro, nas três condições avaliadas: por privação de nutrientes, por indução com rTNF ou por CPT.
- Houve diminuição de expressão da molécula de 116 kDa PARP em células J774 infectadas com amastigota e promastigota de *Leishmania (L.) chagasi*, quando comparadas a células induzidas a apoptose por camptotecina.
- Infecção com promastigota gerou um fragmento de 89 kDa. Houve ainda diminuição da expressão de 24 kDa em células privadas por nutrientes quando comparada as células induzidas por camptotecina.

- A infecção com amastigotas diminuiu a expressão de molécula de 24 kDa em células sob privação de nutrientes quando comparadas a célula induzida com camptotecina.

- O aumento da atividade de caspase 3 em células J 774 induzidas por H₂O₂ foi revertida pela infecção tanto com amastigotas quanto com promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

- A caspase 3 clivada foi detectada em células J 774 induzidas por H₂O₂ sendo essa clivagem revertida tanto por amastigota quanto por promastigota.

Tomados juntos, nossos dados mostram inibição da apoptose em macrófagos J774 quando infectados in vitro com amastigotas e mais proeminentemente com promastigotas tanto por via intrínscica quanto por via extrínscica.

Sugere o papel de HSP83 como possível fator de interferência deste parasito nestas vias propiciando a inibição em diferentes pontos.

E traz à tona, novas abordagens sobre atuação de PARP talvez, redefinindo seu papel no processo apoptótico de células infectadas por estes protozoários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca-Rojano, E., Rosas-Medina, P., Zamudio-Cortez, P., Mondragon-Flores, R., Sanchez-Garcia, F.J., 2003, Mycobacterium tuberculosis virulence correlates with mitochondrial cytochrome c release in infected macrophages. Scand J Immunol 58, 419-427.
- Akarid, K., Arnoult, D., Micic-Polianski, J., Sif, J., Estaquier, J., Ameisen, J.C., 2004, Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. J Leukoc Biol 76, 95-103.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999, Leishmania species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci 112 Pt 18, 2993-3002.
- Angel, S.O., Requena, J.M., Soto, M., Criado, D., Alonso, C., 1996, During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. Acta Trop 62, 45-56.
- Balaraman, S., Singh, V.K., Tewary, P., Madhubala, R., 2005, Leishmania lipophosphoglycan activates the transcription factor activating protein 1 in J774A.1 macrophages through the extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein kinase. Mol Biochem Parasitol 139, 117-127.

Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

BRANDÃO-FILHO, S.S., J., 1994, Leishmaniasis in Brasil. *Parasitol. Today* 10, 329-330.

Chatterjee, D., Schmitz, I., Krueger, A., Yeung, K., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., Peter, M.E., Wyche, J.H., Pantazis, P., 2001, Induction of apoptosis in 9-nitrocamptothecin-treated DU145 human prostate carcinoma cells correlates with de novo synthesis of CD95 and CD95 ligand and down-regulation of c-FLIP(short). *Cancer Res* 61, 7148-7154.

Chen, G.G., Liu, Z.M., Viantis, A.C., Tse, G.M., Leung, B.C., van Hasselt, C.A., 2004, Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J Cell Biochem* 92, 1246-1256.

Chen, M., Wang, J., 2002, Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7, 313-319.

Cunningham, A.C., 2002, Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol* 72, 132-141.

CVE, 2001, <http://www.cve.sp.gov.br>.

D'Agostino, P., Ferlazzo, V., Milano, S., La Rosa, M., Di Bella, G., Caruso, R., Barbera, C., Grimaudo, S., Tolomeo, M., Feo, S., Cillari, E., 2003, Chemically modified tetracyclines induce cytotoxic effects against J774 tumour cell line by activating the apoptotic pathway. *Int Immunopharmacol* 3, 63-73.

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1998, IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.

Dobbelaere, D.A., Fernandez, P.C., Heussler, V.T., 2000, *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cell Microbiol* 2, 91-99.

Dwyer, D.M., 1976, Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J Immunol* 117, 2081-2091.

Fernandez, P.C., Machado, J., Jr., Heussler, V.T., Botteron, C., Palmer, G.H., Dobbelaere, D.A., 1999, The inhibition of NF-kappaB activation pathways and the induction of apoptosis by dithiocarbamates in T cells are blocked by the glutathione precursor N-acetyl-L-cysteine. *Biol Chem* 380, 1383-1394.

- Goebel, S., Gross, U., Luder, C.G., 2001, Inhibition of host cell apoptosis by *Toxoplasma gondii* is accompanied by reduced activation of the caspase cascade and alterations of poly(ADP-ribose) polymerase expression. *J Cell Sci* 114, 3495-3505.
- Goldwasser, F., Shimizu, T., Jackman, J., Hoki, Y., O'Connor, P.M., Kohn, K.W., Pommier, Y., 1996, Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 56, 4430-4437.
- Goto, H., Lindoso, J.A., 2004, Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 37, 615-623.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999, BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Guy, R.A., Belosevic, M., 1993, Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun* 61, 1553-1558.
- Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., Hottiger, M.O., 2003, Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* 278, 45145-45153.

Hentze, H., Latta, M., Kunstle, G., Dhakshinamoorthy, S., Ng, P.Y., Porter, A.G., Wendel, A., 2004, Topoisomerase inhibitor camptothecin sensitizes mouse hepatocytes in vitro and in vivo to TNF-mediated apoptosis. *Hepatology* 39, 1311-1320.

Heussler, V.T., Kuenzi, P., Rottenberg, S., 2001, Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol* 31, 1166-1176.

Heussler, V.T., Machado, J., Jr., Fernandez, P.C., Botteron, C., Chen, C.G., Pearce, M.J., Dobbelaere, D.A.a., 1999, The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7312-7317.

Hisaeda, H., Sakai, T., Ishikawa, H., Maekawa, Y., Yasutomo, K., Good, R.A., Himeno, K., 1997, Heat shock protein 65 induced by gammadelta T cells prevents apoptosis of macrophages and contributes to host defense in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 159, 2375-2381.

Hong, S.J., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2004, Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25, 259-264.

- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D., Jouault, T., 2003, *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 278, 13086-13093.
- Ikeyama, S., Kusumoto, K., Miyake, H., Rokutan, K., Tashiro, S., 2001, A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol. *J Hepatol* 35, 53-61.
- Ishisaka, R., Utsumi, K., Utsumi, T., 2002, Involvement of lysosomal cysteine proteases in hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1865-1872.
- Ivana Scovassi, A., Diederich, M., 2004, Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* 68, 1041-1047.
- Jacobson, M.K., Jacobson, E.L., 1999, Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem Sci* 24, 415-417.
- Jiao, J.D., Xu, C.Q., Yue, P., Dong, D.L., Li, Z., Du, Z.M., Yang, B.F., 2006, Volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels are involved in oxidative stress-induced apoptosis of mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 277-285.

- Karin, M., Ben-Neriah, Y., 2000, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18, 621-663.
- Kim, D.S., Jeon, S.E., Jeong, Y.M., Kim, S.Y., Kwon, S.B., Park, K.C., 2006, Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. *FEBS Lett* 580, 1439-1446.
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzell, E., Green, D.R., Newmeyer, D.D., 1997, The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Koh, S.H., Chang, D.I., Kim, H.T., Kim, J., Kim, M.H., Kim, K.S., Bae, I., Kim, H., Kim, D.W., Kim, S.H., 2005, Effect of 3-aminobenzamide, PARP inhibitor, on matrix metalloproteinase-9 level in plasma and brain of ischemic stroke model. *Toxicology* 214, 131-139.
- Kohn, K.W., Shao, R.G., Pommier, Y., 2000, How do drug-induced topoisomerase I-DNA lesions signal to the molecular interaction network that regulates cell cycle checkpoints, DNA replication, and DNA repair? *Cell Biochem Biophys* 33, 175-180.
- Kremer, L., Estaquier, J., Brandt, E., Ameisen, J.C., Locht, C., 1997, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur J Immunol* 27, 2450-2456.

- Lai, X.H., Sjostedt, A., 2003, Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun* 71, 4642-4646.
- Lindoso, J.A.L., TESE . 2001. Apoptose na evolução da leishmaniose visceral experimental em hamster. Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Liu, S., Bishop, W.R., Liu, M., 2003, Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* 6, 183-195.
- Locksley, R.M., Louis, J.A., 1992, Immunology of leishmaniasis. *Curr Opin Immunol* 4, 413-418.
- Luder, C.G., Gross, U., Lopes, M.F., 2001, Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol* 17, 480-486.
- Maiti, D., Bhattacharyya, A., Basu, J., 2001, Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Biol Chem* 276, 329-333.

- McNeely, T.B., Turco, S.J., 1990, Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J Immunol* 144, 2745-2750.
- Monteiro SP, L.M., Arias JR . 1994, Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 27, 67-72.
- Moore, K.J., Matlashewski, G., 1994, Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 152, 2930-2937.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I., Massie, B., 2000, The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20, 7146-7159.
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1987, The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 327, 329-331.
- Mosser, D.M., Rosenthal, L.A., 1993, *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 4, 315-322.
- Nakajima, H., Nagaso, H., Kakui, N., Ishikawa, M., Hiranuma, T., Hoshiko, S., 2004, Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose)

polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J Biol Chem* 279, 42774-42786.

Navarre, W.W., Zychlinsky, A., 2000, Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cell Microbiol* 2, 265-273.

Nosseri, C., Coppola, S., Ghibelli, L., 1994, Possible involvement of poly(ADP-ribosyl) polymerase in triggering stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 212, 367-373.

Pacini, A., Quattrone, A., Denegri, M., Fiorillo, C., Nediani, C., Ramon y Cajal, S., Nassi, P., 1999, Transcriptional down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase gene expression by E1A binding to pRb proteins protects murine keratinocytes from radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274, 35107-35112.

Pahl, H.L., 1999, Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Palmer, G.H., Machado, J., Jr., Fernandez, P., Heussler, V., Perinat, T., Dobbelaere, D.A., 1997, Parasite-mediated nuclear factor kappaB regulation in lymphoproliferation caused by *Theileria parva* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12527-12532.

- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., 2000, Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *Embo J* 19, 4310-4322.
- Park, D.S., Morris, E.J., Greene, L.A., Geller, H.M., 1997, G1/S cell cycle blockers and inhibitors of cyclin-dependent kinases suppress camptothecin-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci* 17, 1256-1270.
- Peters, C., Aebischer, T., Stierhof, Y.D., Fuchs, M., Overath, P., 1995, The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* 108 (Pt 12), 3715-3724.
- Rodriguez-Hernandez, A., Brea-Calvo, G., Fernandez-Ayala, D.J., Cordero, M., Navas, P., Sanchez-Alcazar, J.A., 2006, Nuclear caspase-3 and capase-7 activation, and Poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 131-139.
- Rowinsky, E.K., 2005, Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* 23, 9394-9407.

- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1997, The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-6925.
- SACKS, D.L., JA; WIRTH, DF., 1993, Leishmaniasis., In: WARREN., K.S. (Ed.) *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. Blackwell Scientific Publications., Boston, pp. 237-268.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Balkir, L., Robbins, P.D., Alnemri, E.S., 2000, Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483.
- Sartorius, U., Schmitz, I., Krammer, P.H., 2001, Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2, 20-29.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., Krammer, P.H., 2000, Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 1123-1136.
- Scovassi, A.I., Poirier, G.G., 1999, Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 199, 125-137.

Shall, S., de Murcia, G., 2000, Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460, 1-15.

Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebersold, R., Greenberg, A.H., 1992a, Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med* 176, 1521-1529.

Shi, L., Kraut, R.P., Aebersold, R., Greenberg, A.H., 1992b, A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 175, 553-566.

Shimizu, T., Pommier, Y., 1996, DNA fragmentation induced by protease activation in p53-null human leukemia HL60 cells undergoing apoptosis following treatment with the topoisomerase I inhibitor camptothecin: cell-free system studies. *Exp Cell Res* 226, 292-301.

Shimizu, T., Pommier, Y., 1997, Camptothecin-induced apoptosis in p53-null human leukemia HL60 cells and their isolated nuclei: effects of the protease inhibitors Z-VAD-fmk and dichloroisocoumarin suggest an involvement of both caspases and serine proteases. *Leukemia* 11, 1238-1244.

- Shiokawa, D., Maruta, H., Tanuma, S., 1997, Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett* 413, 99-103.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Iyer, S., Boulares, A.H., Smulson, M.E., 1998, Transient poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis. *J Biol Chem* 273, 13703-13712.
- Sordet, O., Khan, Q.A., Kohn, K.W., Pommier, Y., 2003, Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3, 271-290.
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A., Walczak, H., 2002, Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 21, 4520-4530.
- Stoscheck, C.M., 1990, Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 182, 50-68.
- Suzuki, A., Iwasaki, M., Kato, M., Wagai, N., 1997, Sequential operation of ceramide synthesis and ICE cascade in CPT-11-initiated apoptotic death signaling. *Exp Cell Res* 233, 41-47.

- Taga, K., Chretien, J., Cherney, B., Diaz, L., Brown, M., Tosato, G., 1994, Interleukin-10 inhibits apoptotic cell death in infectious mononucleosis T cells. *J Clin Invest* 94, 251-260.
- Tanaka, Y., Yoshihara, K., Tohno, Y., Kojima, K., Kameoka, M., Kamiya, T., 1995, Inhibition and down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase results in a marked resistance of HL-60 cells to various apoptosis-inducers. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 41, 771-781.
- Thornberry, N.A., Lazebnik, Y., 1998, Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Vasey, P.A., Jones, N.A., Jenkins, S., Dive, C., Brown, R., 1996, Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol Pharmacol* 50, 1536-1540.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003, Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10, 45-65.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J., 2001, Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13884-13888.

WHO, 2001, Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. Report of a WHO. Expert. Committee,. <http://www.int/emc/diseases/leish/index.html>.

Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., Celada, A., 2001, Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. Immunobiology 204, 543-550.

Yuan, J., 1997, Transducing signals of life and death. Curr Opin Cell Biol 9, 247-251.

Zhang, G.S., Wang, Z.Y., 2003, [Indomethacin-induced HL-60 cell apoptosis is associated with inhibition of beta-catenin/c-myc signal transduction pathway]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi 24, 629-631.