

# Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida

Apoptosis and apoptotic mimicry in *leishmania*: strategies for a successful infection

Michelle Marini Horikawa<sup>1,2</sup>, Maurício Scavassini Peña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

**Resumo.** A apoptose é um processo essencial nos organismos multicelulares, importante na remoção de células indesejadas e na regulação do número de células do organismo. As células em apoptose não induzem atividade inflamatória e são removidas de forma silenciosa pelos fagócitos. A apoptose também ocorre em organismos unicelulares e parece apresentar as mesmas características encontradas em metazoários. Estudos em *Leishmania* mostraram que este parasita é capaz de mimetizar e utilizar um dos fenômenos observados na apoptose, a exposição de fosfatidilserina (PS), como um dos mecanismos adaptativos para estabelecer a infecção em mamíferos. Apresentamos nesta revisão as estratégias associadas à apoptose utilizadas pela *Leishmania* que a tornam capaz de burlar a resposta imune do hospedeiro, resultando na sobrevivência e proliferação dos mesmos.

**Palavras-chave.** *Morte celular programada, apoptose, mimetismo apoptótico, Leishmania, fosfatidilserina.*

**Abstract.** Apoptosis is an essential process for multicellular organisms, important for removing unwanted cells and regulating the number of cells in the organism. The cells in apoptosis do not induce an inflammatory reaction and are silently removed by phagocytes. This type of cell death also occurs in unicellular organisms and appears to have the same features found in metazoans. Studies in *Leishmania* have shown that this parasite is able to mimic and use one of the phenomena observed in apoptosis, phosphatidylserine (PS) exposure, as an adaptive mechanism to establish infection in mammals. We show in this review the strategies associated with apoptosis used by *Leishmania* that enable them to evade the host immune response resulting in their survival and proliferation.

**Keywords.** *Programmed cell death, apoptosis, apoptotic mimicry, Leishmania, phosphatidylserine.*

## Apoptose

O termo “morte celular programada” (MCP) foi proposto em 1965 para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental (Lockshin e Williams, 1965). Em 1972, Kerr e colaboradores descreveram os diferentes aspectos das células na morte programada e na patológica e, para diferenciá-las, batizaram a morte programada de “apoptose”, em oposição à necrose. Em grego arcaico, a palavra apoptose significa “o ato de cair”, como caem as pétalas das flores e as folhas das árvores no outono. O termo foi expandido para o contexto celular porque sugere que a morte celular é benéfica e necessária ao bom funcionamento do organismo. Trata-se de um mecanismo fisiológico, geneticamente programado, essencial à sobrevivência por remover células indesejadas e, portanto, regular o número de células de um organismo multicelular (Kerr *et al.*, 1972). A apoptose ocorre nas mais diversas situações: na organogênese, na hematopoiese normal e patológica, na atrofia dos órgãos, na reposição fisiológica

de certos tecidos maduros, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (Ranganath e Nagashree, 2001). Este tipo de MCP também já foi descrito para organismos unicelulares (Barcinski e DosReis, 1999).

Os eventos apoptóticos iniciam-se na mitocôndria, com perda de potencial de membrana e liberação de citocromo e a consequente ativação de cisteíno-proteínases conhecidas como caspases (Cysteiny ASPartate-specific proteinASE). Estas enzimas tem um resíduo de cisteína e são capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico (Donnelly *et al.*, 2000).

Uma vez desencadeada, a apoptose evolui com exposição de fosfatidilserina (PS), redução no volume celular, condensação da cromatina, formação de prolongamentos (*blebs*) na membrana celular, desintegração do núcleo e clivagem do DNA por endonucleases, resultando em fragmentos de 180-200pb ou múltiplos deles (Koopman, 1994; Shaha, 2006). Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número, de tamanho e se rompem,

<sup>2</sup>Contato do autor:

mimarini19@yahoo.com.br

Recebido 07out10

Aceito 14mar11

Publicado 22jul11

originando estruturas contendo o conteúdo celular, denominadas de corpos apoptóticos (Figura 1). Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (Fadok *et al.*, 2000; De Freitas Balanco *et al.*, 2001; Moreira e Barcinski, 2004; Ziegler e Groscurth, 2004; Wanderley *et al.*, 2005).

A necrose também é um tipo de morte celular, mas difere da apoptose por resultar em aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana e ruptura celular (Figura 1). Durante a necrose o conteúdo celular é liberado, causando danos às células vizinhas e reação inflamatória local (Ziegler e Groscurth; 2004).

A exposição de PS, um outro evento caracter-

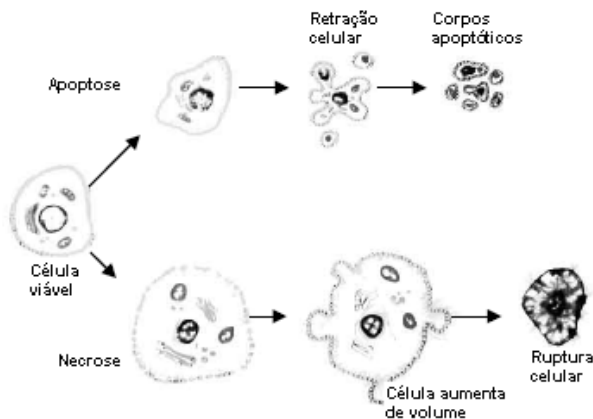


Figura 1. Características morfológicas da apoptose e da necrose (Grivicich *et al.*, 2007).

ístico de apoptose, depende da presença de cálcio no meio extracelular (Hampton *et al.*, 1996; Uthaisang *et al.*, 2003). O reconhecimento da PS induz nos macrófagos (fagócitos) a síntese das citocinas anti-inflamatórias TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador-beta) e IL-10 (interleucina-10), e inibe a síntese da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (fator-alfa de necrose tumoral). A interação da PS com um receptor (PSR) tem por consequência a internalização e a eliminação das células apoptóticas (McDonald *et al.*, 1999).

Estudos sobre apoptose revelaram que endoproteases intracelulares são as principais efetoras neste processo (Li e Yuan, 2008). Os primeiros estudos apontam para a importância das caspases como mediadores da fase de execução do processo apoptótico (Miura *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2006). Caspases podem ser classificadas com base nas suas funções principais em duas subfamílias: caspases pró-apoptóticas e caspases pró-inflamatórias. Caspases pró-apoptóticas (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) são conhecidas por serem principalmente envolvidas na mediação da morte celular e pela produção de sinalizadores, enquanto que as pró-inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11, -12) regulam a maturação das citocinas durante a inflamação. A ativação das caspases pró-inflamatórias pode também induzir a apoptose (Li e Yuan, 2008).

Metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases de metazoários e parecem estar restritas às plantas, fungos e protozoários. São cisteína peptidases com uma cisteína catalítica conservada e uma díade de histidinas considerada essencial para a atividade da enzima (Ambit *et al.*, 2008). Em termos de seqüência, MCAs tem pouca similaridade com as caspases, mas predições de estrutura secundária indicam que as MCAs possuem dobramentos similares a caspase-3 e caspase-1 (Uren *et al.*, 2000). Em termos de função e atividade observam-se grandes diferenças entre MCA e caspases. Enquanto caspases apresentam especificidade por substratos com um ácido aspártico na posição P1, MCAs de algumas plantas possuem especificidade por substratos com arginina/lisina (Vercammen *et al.*, 2004; Vercammen *et al.*, 2006). Recentemente foi mostrado também para MCA de *L. major* especificidade por arginina (Gonzalez *et al.*, 2007).

Comparações entre genomas revelaram que a maior parte das proteínas envolvidas na apoptose de mamíferos aparentemente não é codificada no genoma de *Leishmania* ou de outros protozoários relacionados (Ivens *et al.*, 2005). Além disso, pouco se sabe sobre as vias de apoptose nesses organismos.

#### Ciclo Biológico da *Leishmania*

As *Leishmania* ssp. são protozoários parasitas transmitidos a vertebrados pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. Apresentam duas formas principais: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas do parasita) são inoculadas no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do inseto. Essas formas ligam-se a diversos receptores dos macrófagos, sendo fagocitadas e encapsuladas no vacúolo parasitóforo que se funde com os lisossomos formando o fagolisossoma (Brodskyn *et al.*, 2003). No fagolisossoma as formas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, formas intracelulares obrigatórias que se multiplicam por fissão binária (Alexander e Russell, 1992; McConville e Handman, 2007) e que são adaptadas à temperatura corporal dos mamíferos e ao meio ácido dos fagolisossomos (Brodskyn *et al.*, 2003). Os amastigotas são liberados dos macrófagos por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado (Ritting e Bogdan, 2000; Handman e Bullen, 2002; McConville e Handman, 2007) e podem invadir células dendríticas, fibroblastos e novos macrófagos. Durante um novo repasto sanguíneo o flebotomíneo ingere os macrófagos infectados com a forma amastigota. No período de quatro a cinco dias no intestino do inseto vetor as formas amastigotas de *Leishmania* diferenciam-se na forma promastigota procíclica, não infectante, que se multiplica por fissão binária. Posteriormente ocorre a diferenciação em promastigotas metacíclicas, que migram para a região anterior do tubo digestivo do vetor atingindo o aparelho picador sugador, a partir do qual podem ser transmitidos (Sacks e Perkins, 1985; Bates e Rogers, 2004).

#### Internalização da *Leishmania* nas células fagocitárias

A fagocitose é uma importante estratégia de de-

fesa do hospedeiro, componente do sistema imune inato. É realizada por “fagócitos profissionais” que fagocitam microrganismos, eliminando-os no seu interior (Fadok *et al.*, 2001). Entretanto, *Leishmania* spp. desenvolveram mecanismos para burlar a atividade microbicida dos macrófagos, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar no seu interior.

A internalização dos promastigotas ocorre por um processo clássico de fagocitose tipo zíper, mediado pelo reconhecimento receptor/ligante. Nesse processo geralmente participam os receptores para complemento CR1 e CR3 dos macrófagos, além de outros. As moléculas do complemento C3b e C3bi fixadas nas formas promastigotas de *Leishmania* ligam-se aos receptores de macrófagos CR1 e CR3, respectivamente, mostrando o importante papel do receptor de complemento na internalização do parasita na célula hospedeira (Robledo *et al.*, 1994). A protease gp63, presente na superfície dos promastigotas, pode converter C3b em C3bi, que é então reconhecida pelo CR3 (Brittingham e Mosser, 1996).

Os promastigotas exploraram a opsonização pelo complemento para auxiliar na entrada e na sobrevivência do parasita no macrófago. Este método confere vantagem de sobrevivência do parasita, uma vez que o CR1 e CR3 promovem a fagocitose sem acionar o “burst” respiratório (Mosser e Edelson, 1987; Mosser *et al.*, 1987). Além disso, o receptor CR3 é capaz de inibir a resposta imune celular mediada por IL-12, citocina pró-inflamatória que ativa as células fagocitárias (Marth e Kelsall, 1997; Descoteaux e Turco, 1999).

O “burst” respiratório, caracterizado pelo aumento acentuado no consumo de oxigênio, ocorre em células fagocíticas como macrófagos e neutrófilos. Esse aumento resulta na ativação da NADPH oxidase que catalisa a redução do oxigênio a ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) tendo como doador de elétrons o NADPH. O  $O_2^{\cdot-}$  é convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), e tanto o  $O_2^{\cdot-}$  quanto o  $H_2O_2$  destroem os patógenos fagocitados (Curnutte, 2004).

Além de CR1 e CR3, existem outros receptores no macrófago que facilitam a entrada das formas promastigotas: CR4 (Alexander *et al.*, 1999), receptor para moléculas glicosiladas (Mosser *et al.*, 1987), receptor para proteína C-reativa (Culley *et al.*, 1996), receptor para fibronectina (Rizvi *et al.*, 1988), receptor para fucose-manose (Russel e Wilhelm, 1986; Channon *et al.*, 1984) e receptor para Fc (Chang, 1981).

O lipofosfoglicano (LPG) é o glicoconjugado mais abundante presente na superfície dos promastigotas procíclicos e metacíclicos. Nas formas metacíclicas a estrutura da LPG impede o acesso e a inserção do complexo C5b-9 na membrana, protegendo-as da lise pelo complemento (Puentes *et al.*, 1990; McConville *et al.*, 1992).

Formas amastigotas também utilizam receptor CR3 e receptor de fucose-manose para entrada no macrófago (Alexander *et al.*, 1999). Amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* utilizam a opsonização por imunoglobulinas como um meio de entrar no macrófago através do receptor Fc (Guy e Belosevic, 1993; Peters *et al.*, 1995). LPG

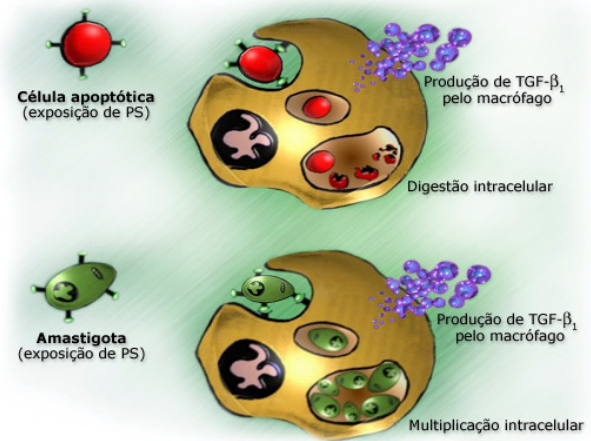


Figura 2. Reconhecimento de PS nos amastigotas e nas células apoptóticas. Células apoptóticas e formas promastigotas de *Leishmania* que expõem PS são sempre destinadas à morte, enquanto que formas amastigotas que expõem PS sobrevivem no interior dos macrófagos (Mimetismo Apoptótico). A síntese de TGF- $\beta$  inibe os mecanismos microbicidas do macrófago, favorecendo a proliferação de amastigotas (Costa *et al.*, 2009).

está envolvido na invasão em ambas as formas promastigotas e amastigotas, porém, na forma amastigota, por ser menos abundante e até ausente em *L. (L.) donovani*, é um ligante menos importante (Handman e Bullen, 2002). As moléculas que predominam na superfície dos amastigotas são os glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) (Alexander *et al.*, 1999), que podem também estar envolvidos na invasão nos macrófagos e na modulação da síntese de óxido nítrico (NO) e do “burst” respiratório (Suzuki *et al.*, 2008).

Além das estratégias acima descritas, amastigota e promastigota desenvolveram outro mecanismo capaz de modular a internalização e a ativação macrofágica por meio da exposição e consequente reconhecimento da PS (Balanco *et al.*, 2001; Tripathi e Gupta, 2003).

#### Exposição de PS e a sobrevivência da *Leishmania* no macrófago

Parasitas do gênero *Leishmania* exploraram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferarem no hospedeiro (Shaha, 2006). As formas apoptóticas de promastigotas são sempre destinadas à morte (van Zandbergen *et al.*, 2006; Wanderley *et al.*, 2009), e provocam a síntese de TGF- $\beta$  pelo macrófago, inibindo sua atividade inflamatória e colaborando para a sobrevivência dos parasitas não apoptóticos (Figura 2) (van Zandbergen *et al.*, 2006). De fato, um inóculo de promastigotas viáveis sem exposição de PS não minimiza a síntese de NO pelo macrófago e com isto os parasitas são destruídos, não havendo geração e multiplicação de amastigotas e progressão da doença (Wanderley *et al.*, 2005). A exposição de PS contribui assim para a infectividade dos promastigotas, e é mais elevada na fase estacionária, onde há maior quantidade de promastigotas metacíclicos (forma infectiva) (Tripathi e Gupta, 2003).

Além dos promastigotas, as formas amastigotas também são capazes de suprimir a resposta inflamatória,



induzindo secreção de TGF- $\beta$  e reduzindo a síntese de NO (Wanderley *et al.*, 2005). Diferentemente do que ocorre nos promastigotas, as formas amastigotas ao expor PS na superfície não necessariamente sofrem morte por apoptose, e por isso esse processo foi denominado de Mimetismo Apoptótico (Figura 2) (Balanco *et al.*, 2001; Moreira e Barcinski, 2004; Wanderley *et al.*, 2005). Nesta situação, duas hipóteses foram aventadas: ou a exposição de PS não corresponde a uma etapa da apoptose, ou pode ocorrer nos amastigotas um resgate da morte celular por apoptose por um mecanismo ainda desconhecido, permitindo a internalização e a sobrevivência intracelular desses parasitas (Wanderley e Barcinski, 2010).

### Exposição de PS em outros patógenos

Mecanismo semelhante parece ocorrer em outras infecções causadas por parasitas, como em *Toxoplasma gondii* (Seabra *et al.*, 2004) e formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (DaMatta *et al.*, 2007). Em ambos os casos a exposição de PS pelo parasita inibe a síntese de NO pelos macrófagos durante a infecção parasitária. Além disso, alguns vírus utilizam um mecanismo semelhante para serem internalizados por células hospedeiras, como o vírus da Hepatite B (Vanlandschoot e Leroux-Roels, 2003) e o Citomegalovírus (Soares *et al.*, 2008). Células tumorais também expõem PS sem evoluir para a apoptose, o que contribui para a progressão da doença, já que essa exposição inibe a resposta inflamatória, levando a um estado de imunossupressão com a liberação de TGF- $\beta$ , um importante mediador na progressão de tumores malignos (Lima *et al.*, 2009).

Podemos concluir, portanto, que alguns patógenos intracelulares, dentre eles os parasitas do gênero *Leishmania*, foram capazes de induzir uma resposta anti-inflamatória, utilizando-se das características de células apoptóticas, conseguindo burlar e inativar os mecanismos microbicidas das células hospedeiras. Com isso, esses parasitas são capazes de proliferar, podendo desencadear, nesse caso, a leishmaniose nas suas mais variadas formas clínicas.

### Bibliografia

- Alexander J. e Russell, D.G. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advances in Parasitology*. 31, 175-254.
- Alexander J., Satoskar A.R. e Russell D.G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*. 18, 2993-3002.
- Ambit A., Fasel N., Coombs G.H. e Mottram J.C. (2008). An essential role for the *Leishmania* major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death and Differentiation*. 15, 113-122.
- Barcinski M.A. e DosReis G.A. (1999). Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 4, 395-401.
- Bates P.A. e Rogers M.E. (2004). New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine*. 6, 601-609.
- Brittingham A. e Mosser D.M. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology Today*. 11, 444-447.
- Brodskyn C., de Oliveira C.L., Barral A. e Barral-Netto M. (2003). Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Review of Vaccines*. 5, 705-717.
- Chang K.P. (1981). Antibody-mediated inhibition of phagocytosis in *Leishmania donovani*-human phagocyte interactions in vitro. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2, 334-339.
- Channon J.Y., Roberts M.B. e Blackwell J.M. (1984). A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology*. 2, 345-355.
- Costa J.F., Wanderley J.L.M., Costa J.M.L., Barcinski M.A., Barral A. e Borges V.M.B. (2009). Apoptotic mimicry as a possible immunopathogenic mechanism of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Gazeta Médica da Bahia*. 79, 40-44.
- Culley F.J., Harris R.A., Kaye P.M., McAdam K.P. e Raynes J.G. (1996). C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *Journal of Immunology*. 12, 132-141.
- Curnutte J.T. (2004). Superoxide production by phagocytic leukocytes: the scientific legacy of Bernard Babior. *The Journal of Clinical Investigation*. 8, 1054-1057.
- DaMatta R.A., Seabra S.H., Deolindo P., Arnholdt A.C.V., Manhães L., Goldenberg S. e Souza W. (2007). *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiology Letters*. 266, 29-33.
- De Freitas Balanco J.M., Moreira M.E., Bonomo A., Bozza P.T., Amarante-Mendes G., Pirmez C. e Barcinski M.A. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Current Biology*. 23, 1870-1873.
- Descoteaux A. e Turco, S.J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2-3, 341-352.
- Donnelly E.T., O'Connell M., McClure N. e Lewis S.E. (2000). Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Human Reproduction*. 7, 1552-1561.
- Fadok V.A., de Cathelineau A., Daleke D.L., Henson P.M. e Bratton D.L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 1071-1077.
- Fadok V.A., Bratton D.L., Rose D.M., Person A., Ezekewitz R.A. e Henson P.M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 6782, 85-90.
- Fritz J.H., Ferrero R.L., Philpott D.J. e Girardin S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature Immunology*. 7, 1250-1257.
- Gonzalez I.J., Desponds C., Schaff C., Mottram J.C. e Fasel N. (2007). *Leishmania* major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *International Journal for Parasitology*. 37, 161-172.
- Grivicich I., Regner A. e Rocha A.B. (2007). Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53, 335-343.
- Gross A., McDonnell J.M. e Korsmeyer S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*. 13, 1899-1911.
- Guy R.A. e Belosevic, M. (1993). Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into

- macrophages. *Infection and Immunity*. 4, 1553-1558.
- Hampton M.B., Vanags D.M., Pörn-Ares M.I. e Orrenius S. (1996). Involvement of extracellular calcium in phosphatidylserine exposure during apoptosis. *FEBS Letters*. 3, 277-282.
- Handman E. e Bullen D.V.R. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 8, 332-334.
- Ivens A.C., Peacock C.S., Worthey E.A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M.A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S.M., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C.V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R.M., Cronin A., Cruz A.K., Davies R.M., De Gaudenzi J., Dobson D.E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A.C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J.C., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'neil S., Pentony M., Pohl T.M., Price C., Purnelle B., Quail M.A., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J.C., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D.C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D.F., Blackwell J.M., Stuart K.D., Barrell B. e Myler P.J. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 309, 436-442.
- Kerr J.F., Wyllie A.H. e Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 6, 239-257.
- Koopman G. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 5, 1415-1420.
- Li J. e Yuan J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 27, 6194-6206.
- Lima L.G., Chammas R., Monteiro R.Q., Moreira M.E. e Barcinski M.A. (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Letters*. 283, 166-175.
- Lockshin R.A. e Williams C.M. (1965). Programmed cell death-I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *Journal of Insect Physiology*. 10, 643-649.
- Marth T. e Kelsall B.L. (1997). Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *Journal of Experimental Medicine*. 11, 1987-1995.
- McConville M.J., Turco S.J., Ferguson M.A. e Sacks D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infective stage. *EMBO Journal*. 10, 3593-3600.
- McConville M.J. e Handman E. (2007). The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*. 10, 1047-1051.
- McDonald P.P., Fadok V.A., Bratton D. e Henson P.M. (1999). Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *Journal of Immunology*. 11, 6164-6172.
- Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwig E.A. e Yuan J. (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. 75, 653-660.
- Moreira M.E.C. e Barcinski M.A. (2004). Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 1, 93-115.
- Mosser D.M., Vlassara H., Edelson P.J. e Cerami A. (1987). *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *The Journal of Experimental Medicine*. 1, 140-145.
- Mosser D.M. e Edelson P.J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*. 6120, 329-331.
- Peters C., Aebischer T., Stierhof Y.D., Fuchs M. e Overath P. (1995). The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science*. 108, 3715-3724.
- Puentes S.M., Da Silva R.P., Sacks D.L., Hammer C.H. e Joiner K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology*. 12, 4311-4316.
- Ranganath R.M. e Nagashree N.R. (2001). Role of programmed cell death in development. *International Review of Cytology*. 202, 159-242.
- Ritting M.H. e Bogdan C. (2000). *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology*. 7, 292-297.
- Rizvi F.S., Ouaisi M.A., Marty B., Santoro F. e Capron A. (1988). The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *European Journal of Immunology*. 3, 473-476.
- Robledo S., Wozencraft A., Valencia A.Z. e Saravia N. (1994). Human monocyte infection by *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. *Journal of Immunology*. 152, 1265-1276.
- Russel D.G. e Wilhelm H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology*. 7, 2613-2620.
- Sacks D.L. e Perkins P.V. (1985). Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 3, 456-459.
- Seabra S.H., Souza W. e DaMatta R.A. (2004). *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochemical and biophysical research communications*. 324, 744-752.
- Shaha C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *The Indian Journal of Medical Research*. 3, 233-244.
- Soares M.M., King S.W., Thorpe P.E. (2008). Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nature Medicine*. 14, 1357-1362.
- Suzuki E., Tanaka A.K., Toledo M.S., Levery S.B., Straus A.H. e Takahashi H.K. (2008). Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*. 3, 362-369.
- Tripathi A. e Gupta C.M. (2003). Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1, 1-9.
- Uren A.G., O'Rourke K., Aravind L.A., Pisabarro M.T., Seshagiri S., Koonin E.V. e Dixit V.M. (2000). Identification of

- paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*. 6, 961–967.
- Uthaisang W., Nutt L.K., Orrenius S. e Fadeel B. (2003). Phosphatidylserine exposure in Fas type I cells is mitochondria-dependent. *FEBS Letters*. 2-3, 110-114.
- Vanlandschoot P. e Leroux-Roels G. (2003). Viral apoptotic mimicry: immune evasion strategy developed by the hepatitis B virus. *Trends in Immunology*. 24, 144-147.
- Van Zandbergen G., Bollinger A., Wenzel A., Kamhawi S., Voll R., Klinger M., Müller A., Hölscher C., Herrmann M., Sacks D., Solbach W. e Laskay T. (2006). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 37, 13837-13842.
- Vercammen D., Belenghi B., van de Cotte B., Beunens T., Gavigan J.A., De Rycke R. Brackenier A. Inzé D. Harris J.L. e Van Breusegem F. (2006). Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *Journal of Molecular Biology*. 364, 625–636.
- Vercammen D., van de Cotte B., De Jaeger G., Eeckhout D., Casteels P., Vandepoele K. Vandenbergue I., Van Beeumen J., Inzé D. e Van Breusegem F. (2004). Type-II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of Biological Chemistry*. 279, 45329–45336.
- Wanderley J.L. e Barcinski M.A. (2010). Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67, 1653-1659.
- Wanderley J.L., Benjamin A., Real F., Bonomo A., Moreira M.E. e Barcinski M.A. (2005). Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 6, 807-812.
- Ziegler U. e Groscurth P. (2004). Morphological features of cell death. *News in Physiological Sciences*. 19, 124-128.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A. e Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*. 90, 405–413.