

## MIMETISMO APOPTÓTICO COMO POSSÍVEL MECANISMO IMUNOPATOGÊNICO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD)

### APOPTOTIC MIMICRY AS A POSSIBLE IMMUNOPATHOGENIC MECHANISM OF DIFFUSE CUTANEOUS LEISHMANIASIS (DCL)

Jaqueline França Costa<sup>1</sup>, João L.M. Wanderley<sup>2,3</sup>, Jackson M.L. Costa<sup>1</sup>, Marcelo A. Barcinski<sup>2,5</sup>, Aldina Barral<sup>1,4,6</sup>, Valéria de M. Borges<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, BA; <sup>2</sup>Divisão de Medicina Experimental, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ; <sup>3</sup>Programa de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ; <sup>4</sup>Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Salvador, BA; <sup>5</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, SP; <sup>6</sup>Instituto de Investigação em Imunologia, INCT, Salvador, BA

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é uma manifestação clínica rara das leishmanioses, caracterizada pela presença de inúmeros macrófagos intensamente parasitados. Tem sido sugerido que a LCD resulta da ausência de resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*, levando ao crescimento descontrolado do parasita. No Brasil, a LCD é quase que exclusivamente causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Nessa revisão discutiremos o papel da morte celular programada por apoptose como possível mecanismo imunopatogênico na infecção por *L. amazonensis*. Semelhante ao que ocorre durante o reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas, formas amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS em sua superfície, em um mecanismo chamado “Mimetismo Apoptótico” que resulta na desativação do macrófago e possibilita o estabelecimento e manutenção da infecção. Nesse contexto, o estudo da exposição de PS nos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD pode contribuir na elucidação de mecanismos supressores nessa patologia.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, mimetismo apoptótico, fosfatidilserina, Macrófago.

*Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (DCL) is a rare clinical manifestation of Leishmaniasis, characterized by a number of macrophages heavily parasitized. It has been suggested that DCL results from a lack of cell-mediated immunity to leishmanial antigen, leading to uncontrolled parasite growth. In Brazil, Leishmania (Leishmania) amazonensis is the main specie involved in DCL cases. In this review we approached the role of programmed cell death by apoptosis as a possible immunopathogenic mechanism in the L. amazonensis infection. Similarly to the exposure and recognition of apoptotic cells, L. amazonensis amastigotes expose PS on its surface, in a mechanism called “Apoptotic Mimicry” which drives macrophage deactivation and allows the infection establishment and maintenance. In this context, the study of PS exposure in the isolates of L. amazonensis of patients with DCL may contribute in the elucidation of suppressor mechanisms in this pathology.*

Key words: *Leishmania amazonensis*, apoptotic mimicry, phosphatidylserine, macrophage.

#### Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

A leishmaniose é um problema grave de saúde pública, sendo incluída entre as seis mais importantes endemias do mundo. No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta extensa distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que incluem a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea mucosa (LCM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD)<sup>(4)</sup>. Enquanto as lesões na LCL são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização, na LCD as lesões se caracterizam por um denso infiltrado dérmico de macrófagos vacuolizados intensamente parasitados<sup>(13)</sup>. No Brasil, a LCD é causada quase que

exclusivamente pela *L. (L.) amazonensis*, apesar dessa espécie já ter sido associada a todas as formas de leishmaniose tegumentar e eventualmente à forma visceral<sup>(6)</sup>.

A LCD constitui uma forma clínica rara, porém grave, de natureza crônica, com recidivas frequentes e anergia ao teste intradérmico de Montenegro (IDRM), devido à imunossupressão da resposta imune celular específica para antígeno de *Leishmania*<sup>(13,14)</sup>. O intenso parasitismo intramacrofágico nas lesões de LCD reflete o estado funcional desses macrófagos, considerados permissivos<sup>(7)</sup>. A ativação deficiente dos macrófagos na LCD dificulta a eliminação da *Leishmania* resultando em um processo inflamatório desorganizado, incapaz de controlar a infecção<sup>(9)</sup>.

Assim como nas diferentes formas clínicas da leishmaniose, os fatores determinantes da LCD são multifatoriais e podem estar associados tanto a eventos imunológicos e genéticos do paciente quanto a fatores patogênicos relacionados ao parasito e ao vetor<sup>(4, 10, 12, 22)</sup>. A participação de fatores associados ao parasita tem sido evidenciada por alguns autores<sup>(2, 3, 20)</sup>, embora seja um ponto que ainda permanece a

Recebido em 16/05/2009

Aceito em 08/06/2009

Endereço para correspondência: Dra. Valéria de M. Borges, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, 40296-710, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 31762215; Fax: 55 71 31762279. Endereço Eletrônico: vborges@bahia.fiocruz.br.

Gazeta Médica da Bahia

2009;79 (Supl.3):40-44

© 2009 Gazeta Médica da Bahia. Todos os direitos reservados.

ser mais bem explorado. Nesse sentido, a exposição de marcadores de apoptose pelo parasito poderia ser um dos fatores a contribuir durante interação parasita-hospedeiro como possível mecanismo imunossupressor da LCD.

### Conseqüências do reconhecimento de células apoptóticas

Apoptose é um tipo de morte celular programada de fundamental importância para a manutenção da homeostasia e desenvolvimento tecidual e caracteriza-se por diversas modificações morfológicas e bioquímicas<sup>(27)</sup>. O reconhecimento de células apoptóticas ocorre devido à expressão ou exposição de ligantes de superfície que interagem com as células fagocíticas do sistema imune inato, como macrófagos e células dendríticas, sendo a fosfatidilserina (PS) um dos principais ligantes estudados nesse contexto<sup>(25)</sup>. O PS é um fosfolipídio estrutural presente no folheto citoplasmático da membrana da bicamada lipídica que é externalizado em resposta a um estímulo apoptótico, caracterizando um dos eventos iniciais desse tipo de morte celular programada<sup>(25)</sup>. Até este momento não está claro se existe um receptor específico para o PS e qual seria esse receptor, mas existe um consenso atual que o sistema de reconhecimento de ligantes na superfície de células apoptóticas compreende vários receptores na membrana de fagócitos que atuam de modo redundante, otimizando a capacidade do organismo de eliminar rapidamente essas células<sup>(11)</sup>.

O reconhecimento de PS na superfície de células apoptóticas fagocitadas por macrófagos ocasiona uma resposta imune supressora mediada por TGF- $\beta_1$  e PGE $_2$ <sup>(18)</sup>. A pré-sensibilização de camundongos com lipossomas de PS é suficiente para inibir uma resposta imune antígeno-específica *in vivo*<sup>(21)</sup>. Células de linfonodos dos animais pré-sensibilizados com lipossomas de PS aumentam a produção de TGF- $\beta$ , sugerindo um papel direto de PS na regulação da resposta imune, inibindo a inflamação e mantendo a homeostase do tecido<sup>(21)</sup>.

### Apoptose e parasitismo

Na última década tem sido demonstrado que a via de desativação do macrófago induzida pela fagocitose de células apoptóticas é utilizada por diversos patógenos intracelulares como estratégia de replicação por vias dependentes da produção de mediadores antiinflamatórios. Van Zandbergen *et al.*<sup>(30)</sup> demonstraram um mecanismo descrito como “Cavalo de Tróia” em infecções com *L. major*. Neste modelo, formas promastigotas infectam neutrófilos que, por sua vez, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A internalização através do reconhecimento do neutrófilo apoptótico evita o contato direto do parasita com receptores macrófágicos e induz a produção de TGF- $\beta_1$ . Desta forma, a entrada do parasita no macrófago é facilitada e a ativação desta célula inibida, resultando no estabelecimento da infecção<sup>(30)</sup>.

Na infecção experimental por *Trypanosoma (T.) cruzi*, grande número de células T CD4+ apoptóticas são

evidenciadas no baço de camundongos infectados<sup>(23)</sup>. O reconhecimento dessas células T apoptóticas pelos macrófagos favorece a proliferação do *T. cruzi* intracelular através da indução da produção de TGF- $\beta$ , poliaminas e PGE $_2$  pela célula hospedeira<sup>(19)</sup>. Na infecção por *L. major*, as conseqüências da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos apresentam dois comportamentos que dependem do genótipo do hospedeiro<sup>(26)</sup>. Em camundongos BALB/c, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos leva a um aumento de sua carga parasitária em um mecanismo dependente da secreção de TGF- $\beta_1$  e PGE $_2$ . Já em camundongos C57BL/6, a carga parasitária diminui de maneira dependente de TNF- $\alpha$  e elastase neutrofílica<sup>(26)</sup>.

Resultados recentes de nosso grupo sugerem que a fagocitose de neutrófilos humanos apoptóticos favorece a replicação intramacrofágica de *L. amazonensis* via indução de TGF- $\beta_1$  e PGE $_2$ <sup>(1)</sup>. Nestes modelos, os parasitas intracelulares aproveitam o ambiente gerado pela interação entre as células apoptóticas e os macrófagos como mecanismo de escape devido à inibição da resposta inflamatória e evasão da morte no momento da infecção da célula hospedeira.

### “Altruísmo Celular” e “Mimetismo Apoptótico” na *Leishmania*

Além da capacidade que patógenos intracelulares têm de se beneficiarem dos processos antiinflamatórios induzidos pelo reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos, tem sido demonstrado que parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de atuar de maneira ativa no programa de morte celular, seja pelo suicídio de uma sub-população para garantir o sucesso do restante da população, seja por mimetizar o fenótipo apoptótico, ajudando o parasita a evadir os mecanismos microbicidas do sistema imune do hospedeiro.

A exposição de PS na superfície de *L. major* tem sido considerada como um fator de virulência na forma promastigota, influenciando no estabelecimento da infecção. Van Zandbergen *et al.*<sup>(31)</sup> demonstraram que o sucesso da infecção com promastigotas de *L. major*, em modelos *in vitro* e *in vivo*, depende da presença de parasitas apoptóticos no inóculo no momento da infecção. Durante a fase estacionária de culturas de promastigotas, aproximadamente 50% dos parasitas morrem por apoptose com arredondamento do corpo celular, desorganização da estrutura do cinetoplasto, condensação da cromatina nuclear e exposição de PS<sup>(31)</sup>. O reconhecimento dos parasitas apoptóticos induz a produção de TGF- $\beta$  pelos neutrófilos criando um ambiente antiinflamatório que propicia a sobrevivência das formas não apoptóticas. Este tipo de comportamento foi determinado de “Altruísmo Celular”<sup>(31)</sup>.

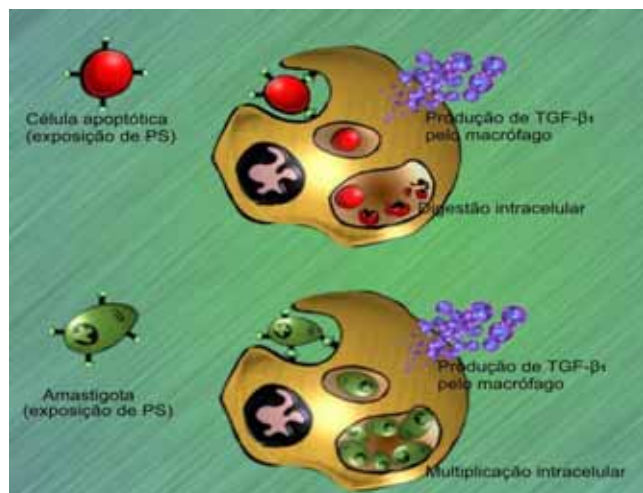
Mecanismos semelhantes de cooperação entre promastigotas apoptóticas e viáveis no momento da infecção também foram observados em promastigotas de *L. amazonensis*. Wanderley *et al.*<sup>(34)</sup> demonstraram que o reconhecimento dos parasitas que expõem PS (PS<sup>pos</sup>) pelos macrófagos estimula os processos de internalização e inibe a

atividade microbicida, facilitando a sobrevivência e a proliferação das formas que não expõem PS (PS<sup>neg</sup>) no interior da célula. A importância deste mecanismo de cooperação entre as duas populações foi confirmada em modelo de infecção *in vivo*. Camundongos infectados com formas metacíclicas PS<sup>pos</sup> ou PS<sup>neg</sup> isoladamente não desenvolvem lesão ou apresentam lesões significativamente menores que aquelas infectadas com as duas formas do parasita<sup>(34)</sup>. Esses dados sugerem que a presença de parasitas apoptóticos é crucial para a sobrevivência do parasita e o desenvolvimento da doença.

Os mecanismos pelos quais a exposição de PS favorece a infecção da *Leishmania* diferem entre as duas formas evolutivas do parasita, refletindo distintas estratégias de interação com a célula hospedeira. Freitas Balanco *et al.*<sup>(16)</sup> mostraram que amastigotas de *L. amazonensis* expõem PS na superfície celular, sem necessariamente concluir o programa de morte, em um processo descrito como “Mimetismo Apoptótico” (Figura 1)<sup>(16)</sup>. Assim como para as formas promastigotas, a exposição de PS nas formas amastigotas também representa um importante fator de virulência e é fundamental para o reconhecimento e fagocitose do parasita pelo macrófago<sup>(16)</sup>.

Nesse sentido, há evidências de que formas amastigotas de *L. amazonensis* são capazes de inibir diretamente a atividade microbicida de fagócitos através da exposição e do reconhecimento de PS na sua membrana<sup>(33)</sup>. Em seguida ocorre a internalização destes parasitas por macrófagos e a exacerbação da infecção, por um mecanismo mediado por aumento na produção de TGF- $\beta$  e IL-10 e redução da síntese de óxido nítrico<sup>(16,32)</sup>. Em modelos murinos de infecção por *L. amazonensis*, a exposição de PS foi dependente do perfil genético de susceptibilidade (BALB/c) ou resistência (C57BL/6), induzindo respectivamente alta ou baixa expressão da molécula, com conseqüências diferenciais para a resposta imune na eliminação do parasita<sup>(33)</sup>.

**Figura 1.** Mimetismo apoptótico em amastigotas de *Leishmania amazonensis* (Desenho de Fernando Real).



Assim, a expressão de PS na superfície das formas amastigotas de *L. amazonensis* é um fator de virulência, pois funciona como um ligante, mediando o reconhecimento destes parasitas por macrófagos<sup>(16)</sup>. O bloqueio da sinalização por PS ou seu receptor específico na membrana macrofágica diminui a internalização e a proliferação intracelular das formas amastigotas, de modo específico<sup>(16)</sup>. Estes resultados mostram que a exposição de PS por formas amastigotas, além de torná-las mais infectivas, induz uma permissividade macrofágica para o crescimento do parasita.

Mecanismo semelhante parece ocorrer em outras infecções parasitárias, como tem sido mostrado na infecção por *Toxoplasma gondii*<sup>(28)</sup> e formas tripomastigotas de *T. cruzi*<sup>(15)</sup>, onde em ambos, a exposição de PS pelo parasita inibe a produção de óxido nítrico durante a infecção de macrófagos. Além disso, alguns vírus utilizam um mecanismo semelhante para serem internalizados por células hospedeiras, como o vírus Vaccinia<sup>(24)</sup> e Citomegalovírus<sup>(29)</sup>. Portanto, a habilidade em induzir uma resposta antiinflamatória utilizando características de células apoptóticas parece ser um mecanismo comum entre patógenos intracelulares que precisam lidar com mecanismos microbicidas das células hospedeiras.

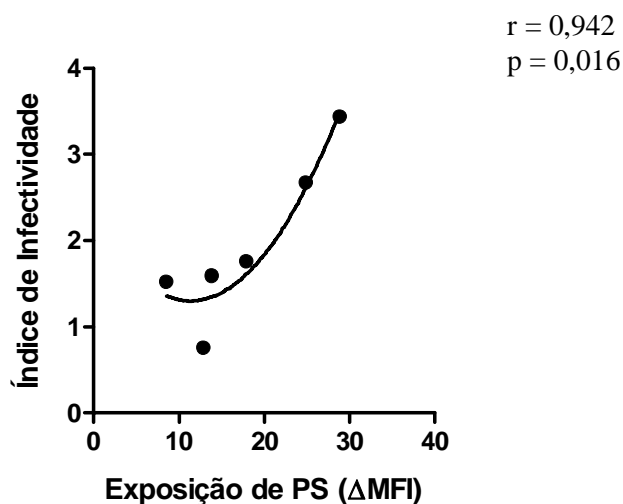
#### Exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD

Atualmente nosso grupo tem se dedicado ao estudo do papel da exposição de PS na superfície de diferentes isolados de *L. amazonensis*. Nossa hipótese é que isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD apresentam maior exposição de PS em comparação com a forma LCL e isto contribui para desativação do macrófago, favorecendo a replicação do parasita. Para isso, comparamos a exposição de PS em isolados de *L. amazonensis* de casos clínicos de LCD relatados no Maranhão na fase ativa da doença e comparamos aos isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCL de casos clínicos da Bahia.

Nossos resultados preliminares indicam que os isolados obtidos de pacientes com LCD apresentam maior exposição de PS do que os isolados de pacientes com LCL após 24 horas de infecção. Além disso, os resultados mostraram que a infecção com as amastigotas de pacientes com LCD apresentaram maior porcentagem de macrófagos infectados e índice de infecção, quando comparados a infecção com amastigotas de pacientes com LCL (França-Costa *et al.*, dados não publicados). Por outro lado, independente da cepa do parasita analisada, os parâmetros de infectividade se correlacionam positivamente com a exposição de PS nos parasitas (Figura 2).

Os resultados demonstraram que os isolados de *L. amazonensis* de pacientes com LCD foram mais infectivos do que as cepas isoladas de pacientes com LCL, sugerindo o aumento na exposição de PS como um mecanismo de adaptação importante para a sobrevivência e estabelecimento da infecção em pacientes com LCD. No entanto, é preciso aprofundar os

**Figura 2.** Relação entre o índice de infectividade e exposição de PS. Cada ponto representa uma cepa de *L. amazonensis* isolada de pacientes com LCD ou LCL. Os dados mostrados no eixo X são referentes a quantificação da exposição de PS em amastigotas purificados de macrófagos após 24 horas de infecção (valores representados em  $\Delta$  MFI que corresponde a diferença da média de intensidade de fluorescência entre os parasitas marcados e não marcados com Anexina V). No eixo Y estão mostrados os valores referentes ao índice de infectividade (porcentagem de macrófagos infectados x número de amastigotas por macrófago/100) em 72 horas pós-infecção. Para análise de associação entre os parâmetros de exposição de PS e índice de infectividade foram utilizados o coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ). Utilizamos uma curva quadrática polinomial para evidenciar a tendência da correlação. Valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.



mecanismos pelos quais o reconhecimento de PS na superfície do isolado de *L. amazonensis* desativa a resposta macrofágica. Um possível candidato é o TGF- $\beta_1$  que além de ser uma das principais citocinas envolvidas na resposta macrofágica deflagrada em reconhecimento ao PS, é capaz de potencializar a via da arginase levando a produção de poliaminas, importantes moléculas envolvidas em eventos de proliferação celular e apoptose<sup>(32)</sup>. A capacidade indutora da produção de TGF- $\beta_1$  tem sido considerada como um mecanismo de virulência potencial responsável pela infecção de humanos com *L. amazonensis*, bem como um mecanismo de escape para esse parasita<sup>(5,8)</sup>. Altos níveis de TGF- $\beta_1$  foram observados em lesões de pacientes com LCD quando comparado a lesões de cutânea localizada<sup>(17)</sup>. Por outro lado, Giudice *et al.*<sup>(20)</sup> demonstraram que a resistência ao óxido nítrico de isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas se correlaciona com a severidade da doença. Entretanto, a modulação negativa da produção de óxido nítrico na célula hospedeira induzida pela exposição de PS na superfície de *L. amazonensis* ainda não foi demonstrada.

O conhecimento sobre a dinâmica de expressão de PS, juntamente com a identificação dos mecanismos envolvidos na supressão de respostas efetoras observada nos pacientes com LCD, pode resultar em alvos terapêuticos para intervir na imunopatogênese dessa doença estigmatizante.

#### Agradecimentos

Este trabalho é financiado pelo PAPES V/CNPq. JFC é bolsista Capes. JLMW é bolsista CNPq. JC, MAB, AB, VMB são pesquisadores do CNPq.

#### Referências

1. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarencio J, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. J Leukoc Biol 84:389-396, 2008.
2. Akuffo H, Schurr E, Andersson G, Yamaneberhan T, Britton S. Responsiveness in diffuse versus local cutaneous leishmaniasis is due to parasite differences. Scand J Immunol 26:717-721, 1987.
3. Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AM, De Freitas LA, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/C mice. Am J Trop Med Hyg 54:178-184, 1996.
4. Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Carvalho EM. Immunology of cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop 19:173-191, 1986.
5. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science 257:545-548, 1992.
6. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Junior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 44:536-546, 1991.
7. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. Int J Dermatol 34:474-479, 1995.
8. Barral A, Teixeira M, Reis P, Vinhas V, Costa J, Lessa H, Bittencourt AL, Reed S, Carvalho EM, Barral-Netto M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. Am J Pathol 147:947-954, 1995.
9. Bittencourt AL, de Freitas LA, Pompeu ML, Vieira ML, Barral A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 85:53-59, 1990.
10. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol 84:188-194, 1996.
11. Bratton DL, Henson PM. Apoptotic cell recognition: will the real phosphatidylserine receptor(s) please stand up? Curr Biol 18:R76-79, 2008.
12. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop 56:315-325, 1994.
13. Convit J, Pinaroli ME, Rondon AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. Trans R Soc Trop Med Hyg 66:603-610, 1972.
14. Costa JM, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvao CE, Pedroso e Silva Cde M, da Silva AR. The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. Rev Soc Bras Med Trop 25:115-123, 1992.

15. Damatta RA, Seabra SH, Deolindo P, Arnholdt AC, Manhaes L, Goldenberg S, de Souza W. *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. *FEMS Microbiol Lett* 266:29-33, 2007.
16. de Freitas Balanco JM, Moreira ME, Bonomo A, Bozza PT, Amarante-Mendes G, Pirmez C, Barcinski MA. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol* 11:1870-1873, 2001.
17. Diaz NL, Arvelaez FA, Zerpa O, Tapia FJ. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 31:114-117, 2006.
18. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101:890-898, 1998.
19. Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, DosReis GA, Lopes MF. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199-203, 2000.
20. Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7:7, 2007.
21. Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, Marrack P, Henson PM, Fadok VA. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses *in vivo*. *J Immunol* 174:1393-1404, 2005.
22. Liew FY. Induction, regulation and function of T-cell subsets in leishmaniasis. *Chem Immunol* 54:117-135, 1992.
23. Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, DosReis GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* 154:744-752, 1995.
24. Mercer J, Helenius A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320:531-535, 2008.
25. Moreira M, Barcinski M. Apoptotic cell and phagocyte interplay: recognition and consequences in different cell systems. *An Acad Bras Cienc*. 12:93-115, 2004.
26. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172:4454-4462, 2004.
27. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784-788, 2000.
28. Seabra SH, de Souza W, Damatta RA. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. *Biochem Biophys Res Commun* 324:744-752, 2004.
29. Soares MM, King SW, Thorpe PE. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. *Nat Med* 14:1357-1362, 2008.
30. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173:6521-6525, 2004.
31. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, Muller A, Holscher C, Herrmann M, Sacks D, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13837-13842, 2006.
32. Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz J Med Biol Res* 38:807-812, 2005.
33. Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176:1834-1839, 2006.
34. Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, de Freitas Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. Cooperation between Apoptotic and Viable Metacyclics Enhances the Pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS ONE* 4:e5733, 2009.