

**MARIANA KOLOS GALUPPO**

**Caracterização funcional de CD100/Sema4D na  
infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências

São Paulo  
2015

**MARIANA KOLOS GALUPPO**

**Caracterização funcional de CD100/Sema4D na  
infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania)*  
*amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia da Relação  
Patógeno Hospedeiro do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade de  
São Paulo, para obtenção do Título de  
Doutora em Ciências

Área de concentração: Biologia da Relação  
Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen  
Stolf

Versão original

São Paulo  
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do  
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Galuppo, Mariana Kolos.

Caracterização funcional de CD100/Sema4D na infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Mariana Kolos Galuppo. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Estudo de proteína envolvida na interação entre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e o seu hospedeiro.

Versão do título para o inglês: Functional characterization of CD100/Sema4D in macrophage infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

1. Sema 4D 2. CD100 3. Macrófago 4. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 5. Leishmaniose I. Stolf, Profa. Dra. Beatriz Simonsen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0163/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Mariana Kolos Galuppo.

Título da Tese: Caracterização funcional de CD100/Sema4D na infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Orientador(a): Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a)

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil  
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@ich.usp.br

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **023** nas fls.**029** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof(a) Dr(a) **Beatriz Simonsen Stolf**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo de fatores de virulência de Leishmania e proteínas do macrófago envolvidas na infecção*" do qual participam o(s) aluno(s) **Mariana K Galuppo, Karoline M. Leite, Eloiza de Rezende, Maurício Scavassini Pena** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.03.2015**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 26 de março de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico a toda minha família que mesmo longe esteve tão perto e a todas as pessoas e camundongos que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais Haroldo e Catarina, por sempre me apoiarem e continuarem me apoiando em todas as decisões importantes na minha vida, igualmente ao mestrado, mesmo eu tendo que morar em outra cidade e visitá-los apenas a cada dois meses. Agora estou voltando! Obrigada por todo amor, incentivo, carinho, dedicação, preocupação, e por serem meus exemplos de vida. Às minhas irmãs, Júlia e Fernanda, que completam a minha vida, com alegria, muito amor e carinho. Amo muito vocês. Às minhas avós queridas Lourdes e Clara por serem tão cuidadosas, especiais, carinhosas e me receberem de volta a Belo Horizonte sempre de braços abertos. Às minhas tias, tios, primas e primos por estarem sempre juntos ao meu lado e felizes comigo por mais esta conquista.

A todos os antigos amigos e aos novos amigos que não saem do meu coração. Obrigada especialmente aos novos, aqui em São Paulo, por terem me acolhido e terem feito eu me sentir em casa e amar essa cidade. Flávio (Japa) e Carol Yamamoto, obrigada pela confiança e ajuda de sempre, sem vocês eu não conseguiria me instalar tão rápido em São Paulo. Carolzinha, Zé, Alípio e João Paulo por ter participado de uma importante parte dessa minha trajetória. Ao Daniel Moreira, que se tornou uma pessoa querida e especial em minha vida, esteve ao meu lado no final dessa fase tornando a muito mais tranquila, feliz e divertida.

Obrigada a todas as pessoas do departamento de parasitologia. Maurício, que se tornou um amigo para toda vida, que esteve ao meu lado desde o início, obrigada por ter me ajudado a concluir este trabalho de uma maneira mais divertida, tranquila e saudável, ao Leonardo que também sempre me ajudou em tudo que eu precisasse. Eloiza, Patrizia e Karoline, foi um prazer trabalhar com vocês. Wesley e Renan, meus outros dois amigos pra vida toda, obrigada por também estar ao meu lado deixando todos os meus dias mais felizes. A Kelly, um obrigado especial por além de ser uma amiga querida me ensinou e ajudou nos experimentos finais de FACs, ao Luiz e ao Márcio, obrigada por toda ajuda de sempre. A todas as pessoas do biotério que sempre tão prestativas me ajudaram também, Juliana e Danielle muito obrigada. Silvia, Dalva e Sabrina, obrigada por toda a ajuda e paciência com documentos e prazos. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Obrigada especialmente a Beatriz Stolf, por ter me aceitado como sua aluna de mestrado e doutorado. Obrigada por ter confiado em meu trabalho e dedicado seu tempo me ajudando em experimentos que eu nunca havia feito, em cálculos, em como apresentar um trabalho, enfim, por todo o ensino durante estes seis anos. Obrigada pela paciência, dedicação, carinho e por ser essa pessoa tão especial que você se tornou pra mim.

Obrigada Profa. Silvia Boscardin por sempre estar tão disponível em me ajudar e por sempre acrescentar muitas ideias ao meu trabalho.

Profa. Silvia Uliana, também por ser tão atenciosa, solícita e por sempre estar acrescentando ótimas soluções ao meu projeto.

Ao Prof. Mauro Cortez, por ter aceito ser meu colaborador e colaborar não apenas em ideias, soluções e discussões mas também por me disponibilizar material, como anticorpos, marcadores e o espaço em seu laboratório para análises de resultados. Sem esquecer de seus alunos sempre muito acessíveis e solícitos, Ismael, Lina e Natália.

Ao Prof. Dr. Fábio Forti e Dr. Thompson Eusébio do Instituto de Química, por terem permitido que eu desenvolvesse parte do projeto em seu laboratório e por toda calma, ensinamento e discussão.

Ao Prof. Cláudio Marinho, obrigada por toda ajuda.

A todos do laboratório do Prof. Gerd Wunderlich, obrigada por toda ajuda.

Ao Dr. Kumanogoh que foi tão gentil em me fornecer diretamente do Japão um plasmídeo para que eu conseguisse produzir a proteína recombinante em nosso laboratório, obrigada por toda atenção.

A Dra. Laurence Brass da Universidade da Pennsylvania, por ter me cedido os camundongos C57BL/6 nocaute para CD100.

Obrigada Profa. Fernanda Ortis, Profa. Ana Paula Lepique, Dr. Renato Mortara e Profa. Deborah Schechtman por empréstimo de anticorpos, bloqueadores de receptores, pela ajuda em toda a parte de imunofluorescência e utilização de equipamentos em seu laboratório, respectivamente.

A todos os funcionários do CEFAP, Mario obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e pelas lindas fotos realizadas no microscópio CONFOCAL.

Ao CNPq que inicialmente me financiou e a FAPESP que em seguida me aceitou como bolsista.

Obrigada a todas as pessoas que me ajudaram de alguma forma a concluir este trabalho, me ajudando indiretamente ou participando diretamente dos meus experimentos. Sem vocês eu não conseguiria realizar mais essa etapa da minha vida. Estou muito feliz, OBRIGADA!

Certeza.

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que sempre estamos começando;

A certeza que precisamos continuar;

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

(Fernando Pessoa)

## RESUMO

GALUPPO, M. K. **Caracterização funcional de CD100/Sema4D na infecção de macrófagos por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2015. 99 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A leishmaniose é causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* que infectam preferencialmente macrófagos. A doença pode se apresentar nas formas cutânea, mucocutânea e visceral, e 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas. Diversos fatores influenciam a forma e a severidade da doença, sendo a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro os principais deles. Estudos baseados em modelos de animais infectados suscetíveis e resistentes a *Leishmania* mostram como o sistema imune de hospedeiros com diferentes perfis afeta a sobrevivência do parasita. Considerando a importância do perfil do macrófago na infecção por *Leishmania*, o potencial papel de CD100 (que mostramos ser expressa por macrófagos de BALB/c e C57BL/6) na modulação da ativação do macrófago, e nossos dados de que CD100 recombinante solúvel (sCD100) aumenta a infectividade dessa célula pelo parasita, tivemos como objetivo a caracterização funcional de CD100 na infecção do macrófago por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, analisamos a expressão, localização, e o papel da proteína em macrófagos infectados ou não por *L. (L.) amazonensis*, assim como em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 nocautes para essa molécula. Observamos que sCD100 aumenta o índice de infecção e a fagocitose de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e partículas de Zymosan por macrófagos peritoneais murinos. Demonstramos que essa modulação ocorre quando sCD100 entra em contato com o macrófago através de seu receptor CD72. Mostramos que a infectividade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro* é semelhante em macrófagos nocautes para CD100 e em macrófagos selvagens, mas que *in vivo* as lesões são menores em camundongos nocautes para a proteína quando comparados aos camundongos selvagens.

**Palavras-chave:** *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Sema/4D. CD100. Macrófago.

## ABSTRACT

GALUPPO, M. K. **Functional characterization of CD100 / SEMA4D in macrophage infection by *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2015. 99 p. Ph. D. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Leishmaniasis is caused by trypanosomatid protozoa of the genus *Leishmania* that infect preferentially macrophages. The disease may present in cutaneous, mucocutaneous and visceral forms, and 12 million people worldwide are infected. Several factors influence the form and severity of the disease, and the species of *Leishmania* and the host immune response are the main ones. Studies based on models of infected animals susceptible and resistant to *Leishmania* show how the host immune system with different profiles affects the survival of the parasite. Considering the importance of the macrophage profile in *Leishmania* infection, the potential role of CD100 (shown to be expressed by macrophages from BALB/c and C57BL/6) in the modulation of macrophage activation and our data that recombinant soluble CD100 (sCD100) enhances the infectivity of that cell by the parasite, our objective was the functional characterization of CD100 on the infection of macrophages by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. For this, we analyzed the expression, location and role of the protein in macrophages infected or not by *L. (L.) amazonensis*, as well as in peritoneal macrophages from C57BL/6 knockout for this molecule. We observed that sCD100 increases the infection and phagocytosis of promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and Zymosan particles by murine peritoneal macrophages. We demonstrated that this modulation occurs when sCD100 interacts with the macrophage through its CD72 receptor. We showed that the infectivity of *L. (L.) amazonensis* promastigotes *in vitro* is similar in wildtype and CD100-knockout macrophages, but that knockout animals develop smaller lesions *in vivo* when compared to wildtype animals.

**Keyword:** *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Sema/4D. CD100. Macrophage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de incidência de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral no mundo .....	19
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida heteroxênico da <i>Leishmania</i> . .....	20
<b>Figura 3.</b> Inseto Flebotomíneo fêmea, vetor de leishmaniose .....	21
<b>Figura 4.</b> Principais formas clínicas da leishmaniose.....	22
<b>Figura 5.</b> Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> , cepa LV79, cultivadas em meio 199, pH 7,2. ....	55
<b>Figura 6.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	56
<b>Figura 7.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	57
<b>Figura 8.</b> Expressão relativa de CD100 normalizada por GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	57
<b>Figura 9.</b> Expressão relativa de CD100 normalizada com GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na proporção de 10 parasitas por macrófago.....	58
<b>Figura 10.</b> Expressão relativa de CD100 normalizada com GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	59
<b>Figura 11.</b> Imunofluorescência para CD100 em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c.....	60
<b>Figura 12.</b> Western Blot para a proteína CD100-Fc.....	61
<b>Figura 13.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença contínua de sCD100 .....	62
<b>Figura 14.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença contínua de sCD100 .....	62
<b>Figura 15.</b> Índice de fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c incubados com Zymosan na presença contínua ou não de sCD100 .....	63
<b>Figura 16.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em diferentes condições.....	65
<b>Figura 17.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença contínua ou não de sCD100, sCD100+bloqueador de Fc e bloqueador de Fc .....	66

<b>Figura 18.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na ausência de estímulo (controle) ou na presença de de sCD100, IgG1 humano e sCD100 + IgG1.....	67
<b>Figura 19.</b> Western blot para CD72 e GAPDH.....	68
<b>Figura 20.</b> Imunofluorescência para CD72 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	69
<b>Figura 21.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c na presença ou não de sCD100, precedida ou não de pré-incubação com anti-CD72.....	70
<b>Figura 22.</b> Imunofluorescência de macrófagos peritoneais incubados ou não com sCD100 ou BSA.....	71
<b>Figura 23.</b> Imunofluorescência para análise da fagocitose de formas promastigotas por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	72
<b>Figura 24.</b> Análise quantitativa de fagocitose por imunofluorescência.....	72
<b>Figura 25.</b> Imunofluorescência para análise da polimerização de actina em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	74
<b>Figura 26.</b> A-Western blot para marcação de actina em extrato solúvel e insolúvel de macrófago de medula óssea estimulado ou não com sCD100, não infectado ou infectado com <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	75
<b>Figura 27.</b> Western blot para pERK em macrófagos de camundongos BALB/c estimulados e/ou infectados.....	77
<b>Figura 28.</b> Western blot para pERK em macrófagos de camundongos BALB/c estimulados e/ou infectados, e em promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	78
<b>Figura 29.</b> Atividade tirosina fosfatase em extratos de macrófagos e de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	79
<b>Figura 30.</b> Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo.....	80
<b>Figura 31.</b> Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 selvagem (WT) ou CD100 nocaute (KO) com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	82
<b>Figura 32.</b> Medida das lesões dos camundongos C57BL/6 wild type (WT) e nocaute para CD100 (CD100 KO) infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> durante 13 semanas.....	82
<b>Figura 33.</b> Marcação das células do baço de animais C57BL/6.....	84
<b>Figura 34.</b> Marcação das células do linfonodo de animais C57BL/6.....	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais espécies de <i>Leishmania</i> de novo e velho mundo que causam doenças no homem e associação com as formas clínicas.....	21
<b>Tabela 2</b> - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real-Time RT-PCR.....	50
<b>Tabela 3</b> - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR para triagem dos animais nocautes para CD100.....	52

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	20
1.1	Leishmaniose.....	19
1.2	O sistema imune a e a infecção por <i>Leishmania</i> .....	22
1.3	Fagocitose de <i>Leishmania</i> pelo macrófago.....	24
1.4	CD100/Sema4D .....	28
1.5	CD100 e o sistema imune .....	29
1.6	CD100 expresso por macrófagos.....	31
1.7	CD100 e infecção de macrófagos por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	32
2	OBJETIVO .....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
3.1	Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e determinação da curva de crescimento.....	37
3.2	Obtenção de macrófagos peritoneais residentes e plaqueamento.....	37
3.3	Obtenção de monócitos de medula óssea e diferenciação em macrófagos .....	38
3.4	Obtenção de formas amastigotas de lesão murina .....	38
3.5	Infecção dos macrófagos com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	39
3.6	Preparação do DNA plasmidial em grande escala .....	39
3.7	Transfecção de células HEK293T para obtenção da proteína CD100 solúvel.....	39
3.8	Precipitação e purificação da proteína CD100 solúvel .....	40
3.9	Incubação das formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com CD100 solúvel.....	40
3.10	Infecção de macrófagos peritoneais na presença de CD100 solúvel .....	41
3.11	Fagocitose de Zymosan .....	41
3.12	Análise da fagocitose por Imunofluorescência.....	41
3.13	Análise da conformação do citoesqueleto de macrófagos por Imunofluorescência.....	42
3.14	Análise da polimerização de actina e marcação de CD100 em macrófagos por Imunofluorescência .....	43
3.15	Análise da marcação de CD100 em macrófagos por imunofluorescência.....	43
3.16	Análise da marcação de CD72 em macrófagos por Imunofluorescência .....	44

3.17	SDS-PAGE .....	44
3.18	Western Blot.....	45
3.19	Análise da polimerização de Actina por Western Blot .....	46
3.20	Análise da expressão de CD72 em macrófagos peritoneais e esplenócitos por Western Blot.....	46
3.21	Análise da fosforilação de ERK em macrófagos por Western Blot .....	47
3.22	Infecção de macrófagos peritoneais na presença de sCD100 e bloqueadores de receptor Fc, IgG1 humano ou anti-CD72.....	47
3.23	Extração e quantificação de RNA de macrófagos .....	49
3.24	Transcrição reversa .....	49
3.25	Real-Time RT-PCR .....	50
3.26	Atividade de tirosina fosfatase .....	51
3.27	Triagem dos camundongos C57BL/6 nocautes para CD100 .....	51
3.28	Análise in vivo dos camundongos C57BL/6 infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	52
3.29	Análise de populações celulares por citometria de fluxo .....	53
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1	Índice de infecção por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em macrófagos peritoneais residentes .....	55
4.2	Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....	57
4.3	Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	59
4.4	Produção da proteína CD100-Fc recombinante .....	61
4.5	Efeito de CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	61
4.6	Análise da fagocitose de Zymosan em macrófagos estimulados ou não com CD100 solúvel.....	63
4.7	Efeito da pré-incubação de promastigotas com CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos .....	64
4.8	Efeito de Bloqueadores de receptor Fc e IgG1 sobre o estímulo da infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> promovido por CD100 solúvel.....	65
4.9	Expressão de CD72 em macrófagos e seu papel nos efeitos de CD100 solúvel na infecção.....	67

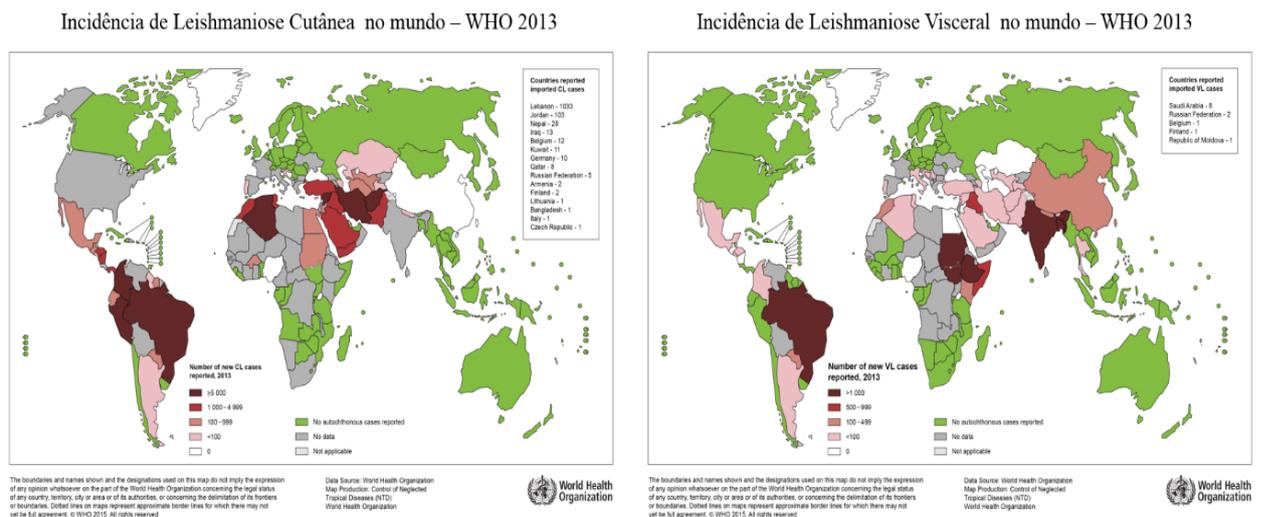
4.10	Efeito de CD100 solúvel sobre o citoesqueleto de macrófagos .....	70
4.11	Participação de CD100 solúvel na fagocitose de <i>L.(L.) amazonensis</i> e na polimerização de actina.....	71
4.12	Fosforilação de ERK em macrófagos estimulados com CD100 solúvel e infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	76
4.13	Atividade tirosina fosfatase em macrófagos estimulados com CD100 solúvel e infectados por <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	78
4.14	Infecções de macrófagos e camundongos C57BL/6 nocautes para CD100 .....	79
4.15	Expressão de CD100 em populações celulares específicas do baço e linfonodo de camundongos C57BL/6 .....	83
5	CONCLUSÕES.....	87
	REFERÊNCIAS .....	89

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um complexo de doenças, agrupadas em tegumentares ou viscerais, causadas por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*.

Por seu considerável impacto sobre a saúde mundial, as leishmanioses estão entre as dez endemias prioritárias da Organização Mundial da Saúde - OMS. Estima-se que a prevalência no mundo seja de 14 milhões de pessoas infectadas, 2 milhões de novos casos todo ano, sendo cerca de 300.000 da doença visceral e 1 milhão casos da doença cutânea (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015). Estima-se que ocorram em torno de 20 mil óbitos por ano e que cerca de 310 milhões estejam sob risco de adquirir a doença (WHO, 2015). Atualmente a doença afeta 98 países e no Brasil observa-se um aumento do número de casos nos últimos anos, acompanhado por sua expansão geográfica (WHO, 2015). A distribuição das leishmanioses cutânea e visceral é mostrada na figura 1.



**Figura 1.** Mapa de incidência de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral no mundo - OMS 2013

A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear de vertebrados, entre eles o homem. O parasita encontra-se na forma promastigota flagelada no tubo digestivo do inseto vetor e na forma amastigota desprovida de flagelo externo nos fagócitos, especialmente macrófagos, dos hospedeiros vertebrados, Figura 2 (MC CONVILLE, 2007). A fêmea do inseto vetor, conhecido como flebotomíneo (Figura 3), transmite a forma promastigota do parasita durante o repasto sanguíneo ao ingerir o sangue de indivíduos saudáveis, infectando-os e assim concluindo o ciclo, Figura 2 (BATES, 2007).

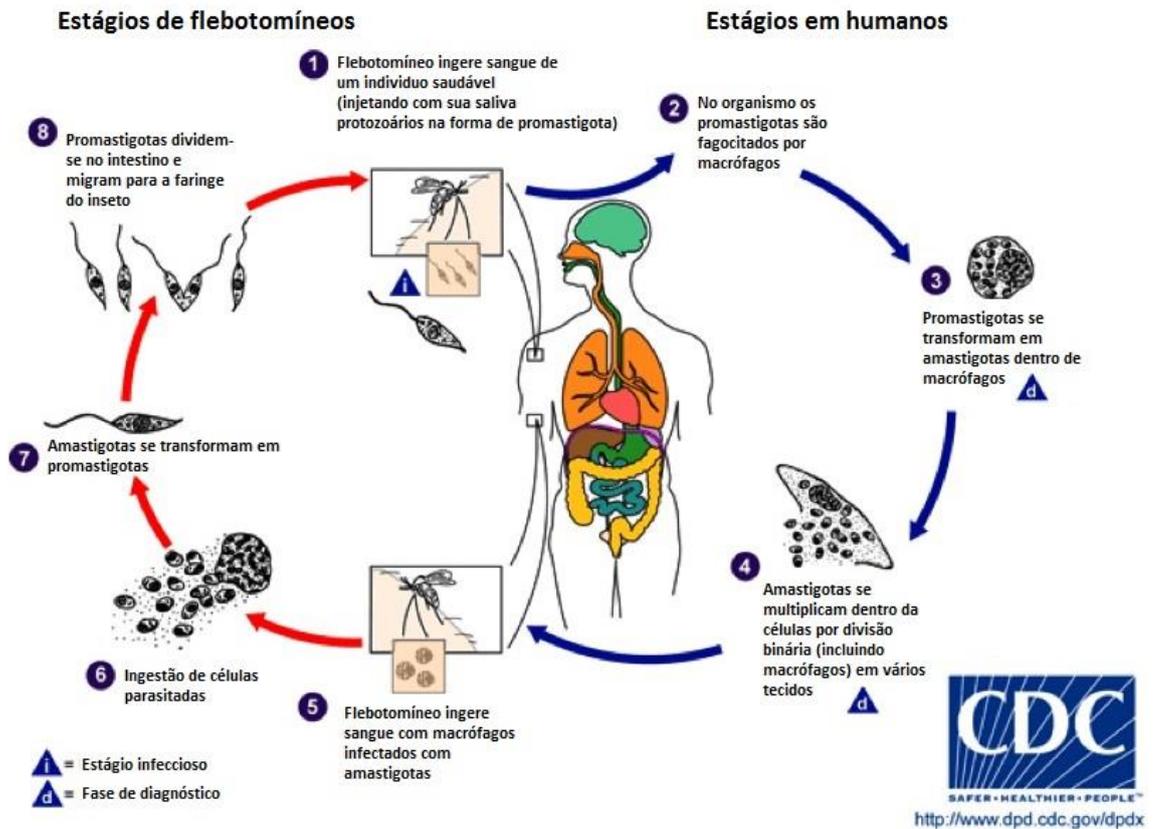


Figura 2. Ciclo de vida heteroxênico da *Leishmania*.

Inúmeras espécies de *Leishmania* causam doença ao homem (tabela I), sendo subdivididas nos subgêneros *Leishmania* (a partir de agora abreviado como *L.*) e *Viannia* (como *V.*) de acordo com seu desenvolvimento no inseto vetor (BATES, 2007; LAINSON, 1978). As espécies mais comuns no Brasil são *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (L.) chagasi*. Existe certa especificidade entre a espécie de parasita e a espécie preferencial de vetor envolvido na transmissão (BRASIL, 2006). As espécies de flebotomíneos mais comumente encontradas no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmecanociva*, que podem transmitir a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* dispersa pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país; *Lutzomyia umbratilis* para a espécie *Leishmania (V.) guyanensis*, com ocorrência nas regiões norte e nordeste do país; *Lutzomyia longipalpis* para a espécie *Leishmania (L.) chagasi*, e *Psychodopigus wellcomei* que transmite a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, a mais comum no país (BRASIL, 2006).

Disease form	New World species		Old World species	
Cutaneous	<i>L. (L.) mexicana</i> complex	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. (L.) mexicana</i></li> <li><i>L. (L.) amazonensis</i></li> <li><i>L. (L.) pifanoi</i></li> <li><i>L. (L.) venezuelensis</i></li> </ul>	<i>L. (L.) major</i> complex	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. (L.) major</i></li> <li><i>L. (L.) tropica</i></li> <li><i>L. (L.) aethiopica</i></li> </ul>
	<i>L. (Viannia)</i> subgenus			
Diffuse cutaneous	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. (L.) amazonensis</i></li> <li><i>L. (L.) pifanoi</i></li> </ul>			<i>L. (L.) aethiopica</i>
Mucocutaneous	<i>L. (V.) braziliensis</i>			
Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> complex	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. (L.) chagasi</i>*</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li><i>L. (L.) infantum</i>*</li> <li><i>L. (L.) donovani</i></li> </ul>

\*Generally, *L. infantum* and *L. chagasi* are the causative agents of visceral leishmaniasis; however, cases of cutaneous leishmaniasis have been reported (214, 215).

**Tabela 1.** Principais espécies de *Leishmania* de novo e velho mundo que causam doenças no homem e associação com as formas clínicas. Fonte: McMahon-Pratt; et al., 2004.



**Figura 3.** Inseto Flebotômico fêmea, vetor de leishmaniose. Brasil, 2006.

Dependendo da espécie do parasita (Tabela 1) e de determinantes de suscetibilidade dos hospedeiros vertebrados, as infecções apresentam-se sob diferentes formas clínicas: forma tegumentar (cutânea localizada ou difusa e mucosa) ou visceral, Figura 4 (GRIMALDI; TESH, 1993; LAINSON; SHAW, 1978).



**Figura 4.** Principais formas clínicas da leishmaniose. (A) Forma cutânea localizada; (B) Forma cutânea difusa; (C) Forma mucosa; (D) Forma visceral. Fonte: Goto et al., 2012 e [www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en](http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en) - OMS (2010)

## 1.2 O sistema imune a e a infecção por *Leishmania*

A resposta imune do hospedeiro é um fator extremamente importante no curso da leishmaniose. De fato, uma mesma espécie do parasita pode causar formas diferentes da doença, como pode ser observado para *L. (V.) braziliensis* (formas cutânea e mucocutânea) e *L. (L.) amazonensis* (forma cutânea localizada e cutânea difusa) tabela 1. No primeiro caso, a doença mucocutânea pode evoluir a partir da doença cutânea não totalmente curada. Já no caso da doença difusa, a manifestação está relacionada a uma anergia aos antígenos de *Leishmania* (GOTO et al., 2012).

O principal paradigma sobre a regulação da resposta imune nas infecções por *Leishmania* foi baseado na análise do padrão de citocinas produzido por clones de células T CD4 murinas. Em modelos murinos a resposta imune de animais resistentes versus suscetíveis a *L. (L.) major* é regulada pelas subpopulações de células T Th1 e Th2, respectivamente (MOSMANN et al., 1986). Células Th1 produzem principalmente interleucina 2 (IL-2) e interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e aumentam a imunidade mediada por células (CHER; MOSMANN, 1987), pois IFN- $\gamma$  ativa o macrófago e IL-2 estimula a proliferação de células T antígeno-específicas, resultando em

doença mais branda ou cura. Células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e aumentam a resposta humoral (STEVENS et al., 1998). Interleucinas do tipo IL-4 estimulam a produção de IgE e, tanto IL-4 quanto IL-10 estimulam células B e inibem ativação clássica de macrófagos (SIELING; MODLIN, 1994). Na infecção por *L. (L.) major*, espécie do Velho Mundo associada à forma cutânea de leishmaniose humana, linhagens isogênicas de camundongos como C57BL/6 e C3H são resistentes à infecção por desenvolverem uma resposta imune Th1 protetora contra o parasita, enquanto que BALB/c, é suscetível, apresentando uma resposta imune do tipo Th2 (HEINZEL et al., 1989).

Para *L. (L.) amazonensis*, a segunda espécie de *Leishmania* mais comum no Brasil, a dicotomia da resposta de camundongos suscetíveis e resistentes não é evidente como para *L. (L.) major* (AFONSO; SCOTT, 1993), e os mecanismos que determinam o sucesso no combate à infecção não estão completamente esclarecidos (SEREZANI et al., 2006). De fato, a maioria das linhagens de camundongo é suscetível a esse parasita, desenvolvendo lesões. A infecção normalmente não evolui para cura nas linhagens resistentes a *L. (L.) major* como C57BL/6 e C3H (JONES et al., 2000). Esses animais quando infectados não apresentam uma resposta típica Th2, pois produzem IL-4 e IFN- $\gamma$ , e a neutralização de IL-4 não resolve a doença. A ausência de uma resposta Th1 se deve à redução do receptor de IL-12 funcional nas células T CD4 (JONES et al., 2000). Do mesmo modo, camundongos BALB/c infectados com a *L. (L.) amazonensis* não apresentam uma resposta imune polarizada mas sim mista, com células Th1 e Th2 e citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  (JI et al., 2002), sendo muito mais suscetíveis em relação a linhagem C57BL/6.

Os macrófagos desempenham um papel muito importante na resposta inicial às infecções por *Leishmania*, mesmo antes da ativação dos mecanismos mediados por células T e B. Além disso, as células T podem responder à infecção liberando citocinas que ativam os macrófagos para destruir parasitas intracelulares, e os anticorpos liberados pelos linfócitos B permitem também que os macrófagos reconheçam com maior eficácia os patógenos (GORDON, 2003). Além de seu importante papel no sistema imune, os macrófagos são as principais células infectadas por *Leishmania* e seu perfil de ativação é decisivo para a resolução ou não da infecção por esse parasita (INIESTA et al., 2002; INIESTA et al., 2005). A heterogeneidade dos macrófagos deriva dos efeitos distintos de citocinas tipo Th1 e Th2 na diferenciação de monócitos para macrófagos. Os perfis de resposta predominantemente Th1 e Th2 dos camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *L. (L.) major*, respectivamente, estão associados aos perfis “extremos” de macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 (C57BL/6) após estímulo com LPS (lipopolissacarídeo) são ativados para produzirem óxido nítrico (NO)

a partir de arginina, o que controla a proliferação de parasitas intracelulares como *L. (L.) major*. Os macrófagos M2 (BALB/c, DBA/2), após o mesmo estímulo, aumentam o metabolismo de arginina para ornitina, produzindo poliaminas e promovendo proliferação dos parasitas (MILLS et al., 2000). A diferenciação de macrófagos nos perfis M1 (ativados clássicos) e M2 (ativados alternativos, posteriormente cunhados M2a – DUQUE; DECOTEAUX, 2014) pode ser feita com estímulos de Interferon- $\gamma$  e de IL4 e IL13, respectivamente (GORDON, 2003). Hoje sabe-se que a diversidade de macrófagos é muito maior do que a simples classificação M1-M2 (DUQUE; DECOTEAUX, 2014; MURRAY et al., 2014). Macrófagos alternativamente ativados podem ser M2a, M2b, ou M2c (DUQUE; DECOTEAUX, 2014). Os M2a, diferenciados na presença de IL4 e IL13, expressam quimiocinas que recrutam células Th2, eosinófilos e basófilos. M2b são induzidos por LPS, imunocomplexos, células apoptóticas e IL-1Ra, expressam iNOS e secretam IL-10, TNF $\alpha$  e IL-6, além de quimiocinas que atraem eosinófilos e células T reguladoras. M2c são induzidos por IL-10, TGF- $\beta$  e glicocorticoides, e também secretam IL-10 e TGF- $\beta$ , as quais induzem resposta Th2 e células T reguladoras. Macrófagos M2c expressam arginase e promovem regeneração tecidual e angiogênese. Além de ser complexa, a diferenciação de macrófagos é um processo reversível (DUQUE; DECOTEAUX, 2014).

Além de M1 e M2 a,b,c, outros subtipos de macrófagos foram descritos por diferentes grupos dependendo dos estímulos de diferenciação usados (MURRAY, 2014), o que torna a nomenclatura dessas células bastante variável. De qualquer forma, a análise de citocinas e moléculas produzidas/expressas por subtipos extremos de macrófagos auxilia na compreensão do perfil de resposta a patógenos como *Leishmania*.

### 1.3 Fagocitose de *Leishmania* pelo macrófago

Promastigotas e amastigotas de *Leishmania* são internalizados pelo macrófago, sua principal célula hospedeira, por fagocitose. De forma geral, o processo de fagocitose se inicia a partir da interação entre receptores específicos da superfície da célula fagocítica e ligantes complementares na superfície da partícula ou célula fagocitada (RITTIG; BOGDAN, 2000). Além desses receptores, a fagocitose envolve uma cascata de ativação de moléculas sinalizadoras que incluem quinases, GTPases e fosfatases que atuam em sistema de feed-back envolvidos na transdução de sinal de receptores fagocíticos (MAY; MACHESKY, 2000). Essas

cascatas culminam na ingestão do patógeno de modo independente ou dependente da reorganização do citoesqueleto de actina nas células fagocíticas.

Muitos estudos documentam que o sucesso da infecção de *Leishmania* em macrófagos depende da capacidade das formas promastigotas ou amastigotas do parasito em aderir a essas células por receptores de membrana e, dessa forma, serem fagocitados (ALEXANDER; RUSSEL, 1992). As ativações desses receptores podem ser cruciais para o destino intracelular do parasita (UENO; WILSON, 2012).

Os receptores mais conhecidos que participam da internalização de *Leishmania* são o receptor do tipo 3 do complemento (CR3), o receptor do tipo 1 do complemento (CR1), o receptor de manose (MR), receptores Fc gama (FcγRs, nomeado FcγRII-B2), e os receptores de fibronectina (FnRs) (BLACKWELL et al., 1985; DA SILVA et al., 1989; GUY; BELOSEVIC, 1993; MOSSER; EDELSON, 1985; WYLER et al., 1985). Os receptores usados, assim como as vias de internalização, parecem variar de acordo com a fase do parasita, como mostrado para promastigotas logarítmicos e metacíclicos de *L. (L.) chagasi* (UENO et al., 2009).

Receptores do tipo 1 e 3 do complemento: CR3 (CD18/CD11b) é uma integrina expressa na superfície de polimorfonucleares (PMNs), especialmente neutrófilos, e de fagócitos mononucleares que desempenha um papel importante na defesa imunológica. Este receptor ligado ao iC3b (forma inativada de C3b) ou a ligantes dos agentes patogênicos promove o rearranjo do citoesqueleto de actina e a sinalização da cascatas das quinases (EHLERS, 2000). O CR1 é expresso na superfície de monócitos, macrófagos e PMNs, e reconhece principalmente o C3b e C4b (ADEREM; UNDERHILL, 1999). A glicoproteína GP63, que é altamente expressa em promastigotas, converte C3 (terceira proteína do complemento) em C3b, um ligante natural para o CR1. CR1, com fator I, decompõe o C3b em iC3b (forma inativada de C3b), facilitando a ligação ao CR3 (UENO; WILSON, 2012).

Receptor de manose: MR é uma lectina que funciona como receptor fagocitário em macrófagos primários e células dendríticas mielóides. Devido a sua ligação preferencial a manoses e ao fato de formas promastigotas de *Leishmania* apresentarem em sua superfície lipofosfoglicano (LPG), também ligante de MR, esse receptor é considerado um dos receptores para formas promastigotas de *Leishmania* (UENO; WILSON, 2012).

Receptor de fibronectina: A fibronectina é abundante no tecido conjuntivo e é necessária aos fagócitos para deixarem o sistema vascular e migrarem através do endotélio e sub-endotélio em resposta a um estímulo inflamatório (BROWN; et al., 1989). Os receptores para a fibronectina (FnRs) são integrinas expressas em fibroblastos, monócitos e PMNs. Há evidências de que FnR coopera com receptores de complemento CR3 e CR1 facilitando a fagocitose de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (UENO; WILSON, 2012).

Receptor Fc: São proteínas expressas na superfície de células natural killer, macrófagos, mastócitos e neutrófilos. São de vários subtipos, classificados com base no tipo de anticorpo que reconhecem: aqueles que se ligam a IgG são os receptores Fc-gamma (Fc $\gamma$ R), a IgA, receptores Fc-alfa (Fc $\alpha$ R), e a IgE, receptores Fc-épsilon (Fc $\epsilon$ R) (PIERRE, 2013).

Pela falta de LPG ou GP63 na superfície de formas amastigotas em algumas espécies de *Leishmania*, acredita-se que elas empreguem diferentes moléculas para a entrada/fagocitose pelos macrófagos. Formas amastigotas de *L. (L.) major* estão opsonizadas por IgG1 após o isolamento de lesões de camundongos BALB/c, sugerindo que Fc $\gamma$ Rs poderiam constituir um portal de entrada nos macrófagos (GUY; BELOSEVIC, 1993). De fato, diversos grupos têm confirmado que amastigotas de *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* ou *L. (L.) amazonensis* opsonizadas com anticorpos específicos aderem aos Fc $\gamma$ Rs na superfície dos macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos (MDDCs) (BOSETTO; GIORGIO, 2007; GUY; BELOSEVIC, 1993; PETERS et al., 1995).

Além da ligação aos receptores, a entrada de formas promastigotas de *Leishmania* envolve outras interações com a célula hospedeira. Estudos demonstraram que quando formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* interagem com os macrófagos são formados longos pseudopodes que circundam o corpo do parasita ou seu flagelo para que ocorra a fagocitose (COURRET et al., 2002). De fato, o citoesqueleto de actina está envolvido no processo de ligação e internalização da *Leishmania*, processo que foi mais estudado em *L. (L.) donovani* (MAY, 2000; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A actina é uma proteína de 43KDa bastante conservada e presente em todos os eucariotos. Nas células ela é encontrada nas formas monomérica globular (actina G) e polimérica filamentosa (actina F), que forma uma rede de microfilamentos de 7-10 nm de espessura (MILLIGAN, 1990). O citoesqueleto de actina é uma estrutura bastante dinâmica, cuja regulação é importante para diversas funções celulares, entre elas a fagocitose (DOS REMEDIOS, 2003). Sua estrutura é normalmente avaliada pela marcação de F-actina por faloidina ou pela razão F-actina/actina G, separadas por centrifugação diferencial (COOK,

2014; KIM, 2008). A extensão da polimerização e despolimerização de actina é orquestrada por uma série de proteínas de ligação em resposta a diversos estímulos (NOSWORTHY et al., 2003). A desestabilização do citoesqueleto de actina de macrófagos resulta em uma redução na fixação de promastigotas de *L. (L.) donovani*, juntamente com uma redução na carga de amastigotas intracelulares, mostrando que a infecção de macrófagos por *L. (L.) donovani* está fortemente correlacionada com a capacidade polimerização de actina da célula hospedeira (ROY et al., 2014). De forma semelhante, a redução de F-actina e a desorganização de microtúbulos levaram a uma diminuição da associação de *L. (V.) braziliensis* com macrófagos (AZEVEDO et al., 2012). Essa desorganização afetou também a produção de NO e a secreção de IL10 na presença de *L. (V.) braziliensis* (AZEVEDO et al., 2012).

Para infecções por *L. (L.) amazonensis* foi mostrado que a fagocitose de promastigotas metacíclicos e de amastigotas é um processo dependente de actina, no qual F-actina se acumula em torno dos parasitas durante e após a fagocitose (COURRET et al., 2002). A fagocitose de formas metacíclicas leva de 3 a 9 minutos, e os parasitas começam a se dividir a partir de 24-48 horas após a infecção (COURRET et al., 2002). Foi observado que 40 a 55% dos metacíclicos são circundados por F-actina após 10 minutos, 10 a 20% após 30 minutos e apenas 5 a 10% após 1-2 horas. Os autores sugeriram que a F-actina polimeriza e despolimeriza durante a internalização do parasita, eventualmente formando ondulações nas regiões de entrada. Para *L. (L.) major* observou-se um número maior de metacíclicos circundados por actina em todos os tempos, apontando para possíveis peculiaridades na fagocitose de acordo com a espécie de *Leishmania* (COURRET et al., 2002).

Outros trabalhos demonstram a importância do colesterol da membrana na internalização de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (CHATTOPADHYAY, 2012; PUCADYIL et al., 2004; RODRIGUEZ, 2011; RODRIGUEZ, 2006). De fato, após o reconhecimento por receptores de superfície, promastigotas são normalmente internalizados por cavéolas ricas em colesterol (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

A partir da interação de moléculas expressas na superfície (LPG e GP63) da *Leishmania* com receptores dos macrófagos, o metabolismo e a ativação do macrófago podem ser modulados, especificamente nas cascatas de sinalização intracelular, reduzindo a produção de óxido nítrico, o burst respiratório e a produção de citocinas (PIEDRAFITA et al., 1999). As alterações de transdução de sinal ocorrem a partir do bloqueio da cascata de fosforilação por modulação de quinases e fosfatases celulares, ou pela expressão de fosfatases do parasita, que agem sobre as proteínas dos macrófagos. Como exemplo, sabe-se que a *Leishmania* diminui a atividade da proteína quinase C (PKC) dos macrófagos pela ação do LPG presente na superfície

dos promastigotas, ou por meio dos fosfolipídeos de glicosilinositol (GIPL) encontrados na superfície dos amastigotas (DESCOTEAUX et al., 1999). Enquanto os amastigotas são capazes de inibir a produção de óxido nítrico por macrófagos através dos GIPLs presentes em sua superfície, as unidades repetitivas de LPG presentes nos promastigotas podem protegê-los durante o burst respiratório através da reação com radicais hidroxila e ânions superóxido, burlando os mecanismos de defesa da célula hospedeira e mantendo o parasita vivo em seu interior (DESCOTEAUX et al., 1999).

#### 1.4 CD100/Sema4D

Além dos receptores dos macrófagos e das moléculas de *Leishmania* citados acima, outras moléculas podem afetar o processo de fagocitose desse parasita. Neste projeto avaliamos o papel de CD100 na fagocitose e em outros processos relacionados com a infecção por *L. (L.) amazonensis*.

CD100 ou Sema4D é uma molécula que pertence à classe quatro das semaforinas. As semaforinas são proteínas ligadas à membrana ou solúveis, originadas por clivagem proteolítica, tendo sido inicialmente identificadas como moléculas de quimiorrepulsão no desenvolvimento neuronal, desempenhando um papel crucial na orientação dos axônios (SUZUKI et al., 2003; MIZUI et al., 2009; CH'NG; KUMANOGOHO, 2010). Existem oito classes de semaforinas. As classes I e II foram encontradas em invertebrados, as classes III a VII em vertebrados e a classe VIII compreende proteínas virais. Até o momento mais de vinte tipos de semaforinas já foram identificadas e sabe-se que elas exercem efeitos repulsivos, atrativos ou bifuncionais, dependendo do contexto biológico em que se encontram (MIZUI et al., 2009).

Além de estarem envolvidas no sistema nervoso, as semaforinas têm importantes papéis em outros processos biológicos como morfogênese cardíaca (TOYOFUKU et al., 2007), crescimento vascular (GERETTI et al., 2008; TOYOFUKU et al., 2007), crescimento invasivo de células epiteliais (GIORDANO et al., 2002), progressão de tumor (BIELLENBERG; KLAGSBRUN, 2007) e regulação imune (KIKUTANI; KUMANOGOHO, 2003; MIZUI et al., 2009; SUZUKI et al., 2003).

A Sema4D ou CD100 possui uma seqüência sinal amino-terminal seguida de um domínio Sema, um domínio Ig-like, um trecho rico em lisinas, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática (KUMANOGOHO; KIKUTANI, 2001). Essa proteína é encontrada como um dímero ligado à membrana no tamanho de 150 kDa (por subunidade) ou

na forma solúvel no tamanho de 120 kDa (sCD100), obtida por clivagem (BASILE et al., 2007; ELHABAZI et al., 2003; ZHU et al., 2007). Essa clivagem é feita em plaquetas por uma metaloprotease ADAM17 (ZHU, 2007). Ela foi a primeira semaforina caracterizada no sistema imunológico (BOUGERET et al., 1992; CH'NG; KUMANOGOH, 2010; MIZUI et al., 2009), e posteriormente estudos mostraram que Sema3A (DELAIRE et al., 2001), Sema4A (SMITH et al., 2011) e Sema7A (KUMANOGOH; KIKUTANI, 2001) também são expressas em células do sistema imune. Diversos trabalhos têm estudado o papel de CD100 no sistema nervoso (MOREAUFAUVARQUE et al., 2003), em crescimento e angiogênese tumorais (BASILE et al., 2006; CH'NG; KUMANOGOH, 2010; GABROVSKA et al., 2011; KATO et al., 2011; SIERRA et al., 2008; SOONG et al., 2011; YANG et al., 2011), em osteogênese (NEGISHI-KOGA et al., 2011) e em aterosclerose (LUQUE et al., 2013; LUQUE et al., 2015), e ainda foi mostrado que CD100 também é expressa em plaquetas, participando ora da formação de trombos, ora da recuperação da monocamada endotelial (ZHU et al., 2007).

## 1.5 CD100 e o sistema imune

No sistema hematopoiético CD100 é expressa pela maioria das células (B, T, células Natural Killer e células mielóides) com exceção das células-tronco precoces e eritrócitos, e geralmente aumenta após a ativação (ELHABAZI et al., 2003). O papel de CD100 no sistema imune tem sido mostrado em um número crescente de trabalhos (CHABBERT-DEPONNAT et al., 2005; DELAIRE et al., 2001; ELHABAZI et al., 2003; HALL et al., 1996; KUMANOGOH et al., 2000; KUMANOGOH et al., 2002; PAN et al., 1999; SHI et al., 2000, entre outros), que avaliaram o papel da molécula de membrana ou da solúvel (sCD100) especialmente em células T, B e dendríticas de humanos ou de camundongos.

Em camundongos, sCD100 melhora a resposta proliferativa e a diferenciação de células B estimuladas com anticorpo monoclonal anti-CD40 e IL-4, e a produção de IgG1 (KUMANOGOH et al., 2000). Esses resultados indicam que sCD100 tem efeito sinérgico sobre a sinalização de CD40 em células B e por isso respostas de células B a estímulos de CD40 ou LPS e resposta de anticorpos T dependentes foram prejudicadas em camundongos CD100 negativos (SHI et al., 2000). CD100 medeia a interação de células T com células dendríticas, aumentando a ativação, proliferação (KUMANOGOH et al., 2002; SHI et al., 2000) e diferenciação (MIZUI et al., 2009) das células T. sCD100 induz CD40 e maturação das células dendríticas, aumentando a expressão de moléculas co-estimulatórias e de IL-2 (KUMANOGOH et al., 2002).

Em humanos sCD100 inibe a migração de células B (DELAIRE et al., 2001), monócitos (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005; DELAIRE et al., 2001) e células dendríticas imaturas (CHABBERT-DEPONNAT et al., 2005). Em monócitos e células dendríticas sCD100 aumenta a secreção de IL-10 e reduz a das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005).

Os efeitos de CD100 são desencadeados pela ligação a receptores específicos, especialmente a plexina B1 e o CD72. A plexina B1 é uma glicoproteína que funciona como um receptor de alta afinidade para CD100. Foi identificada no sistema nervoso e seu RNA foi encontrado em diversos tecidos. Foi originalmente considerada receptora apenas em tecidos não linfoides, mas posteriormente foi observada em células dendríticas foliculares e células T ativadas (revisado em NKYIMBERG, 2010).

O CD72, é um importante receptor de CD100 que em camundongos é expresso em células epiteliais brônquicas, macrófagos alveolares, células B, células dendríticas, fibroblastos e basófilos (KIKUTANI; KUMANOGOHO, 2003; MIZUI et al., 2009; SMITH et al., 2011). CD72 é uma proteína da superfamília das lectinas do tipo C cálcio dependentes que contém uma porção transmembrana hidrofóbica e um domínio citoplasmático com dois motivos denominados tyrosine inhibitory motifs (ITIMs), que quando fosforilados se ligam à proteína tirosina fosfatase 1 (SHP-1) e à proteína adaptadora Grb2 (NKYIMBERG, 2010; WU, 2009).

As respostas desencadeadas pela ligação de CD72 foram estudadas principalmente em células B, com resultados conflitantes. A maioria dos estudos mostrou que a ligação de CD100 a CD72 regula positivamente respostas de células B, revertendo o potencial inibitório de CD72 por causar a desfosforilação do ITIM e liberação de SHP-1 (revisado em WU, 2009). De fato, células B de camundongos deficientes em CD72 sofrem hiper-proliferação após vários estímulos quando comparadas com as células B de camundongos selvagens, enquanto que camundongos deficientes de CD100 apresentam baixa proliferação de células B e de células B1 da cavidade peritoneal (PAN et al., 1999) e deficiências na imunidade humoral (SHI et al., 2000). Camundongos deficientes de SHP-1 e CD72 também exibem uma expansão no número de células B1, indicando que SHP-1 é necessário para regular negativamente o desenvolvimento ou manutenção dessas células (SCOTT et al., 1996). Coerentemente, em modelo de camundongos CD100-transgênicos o número de células B-1CD5+ é aumentado significativamente (KUMANOGOHO; KIKUTANI, 2001; PAN et al., 1999). Outros estudos, porém, mostraram que a ligação de CD72 pode acentuar o potencial inibitório desse receptor, dependendo do estado de diferenciação das células B, intensidade dos sinais do receptor de célula B (BCR) e concentração de CD100 (WU, 2009). Em mastócitos também foi observada

uma ação inibitória da ligação de CD72 (TATSUKI, 2010). Tanto CD100 quanto um anticorpo anti-CD72 levaram à fosforilação de CD72 e recrutamento de SHP-1, que desfosforilou moléculas sinalizadoras resultando em redução da ativação de mastócitos KIT dependente (TATSUI, 2010). Os resultados citados mostram que dependendo do tipo celular CD100 pode ter ações distintas mediadas pelo mesmo receptor CD72.

## 1.6 CD100 expresso por macrófagos

Embora diversas revisões citem que CD100 é expresso em macrófagos (KIKUTANI, 2003; NKYIMBENG, 2010) poucos trabalhos avaliaram a expressão ou o efeito de CD100 nessas células. Um deles mostrou que a maioria dos leucócitos no estroma tumoral eram macrófagos, e que estes expressam CD100. Os autores observaram expressão de CD100 apenas em macrófagos murinos peritoneais ativados (por injeção de CFA), mas não nos não ativados (controle) (SIERRA et al., 2008). A expressão de CD100 *in vitro* não foi induzida por estímulos de diferenciação (M-CSF, PMA, IL-10 ou TGF- $\beta$ ), mas sim por ativação com LPS (SIERRA et al., 2008). Macrófagos de camundongos CD100 nocaute responderam a LPS aumentando a produção de TNF- $\alpha$  (SIERRA et al., 2008), e não apresentaram diferenças na produção de citocinas ou na capacidade de diferenciação em macrófago M2. No entanto, observou-se menor recrutamento de células endoteliais para o tumor nos animais nocautes (SIERRA et al., 2008). CD100 também é importante na nefrite, aumentando a ativação de células T e B e o recrutamento de macrófagos nesse modelo de doença (LI et al., 2009).

Estudos de nosso grupo mostraram que placas ateroscleróticas humanas possuem macrófagos que expressam CD100, sendo essa proteína responsável pela diminuição da internalização de LDL oxidado por inibir seu receptor CD36 (LUQUE et al., 2013). Mostramos que tanto macrófagos “convencionais” quanto células espumosas expressam essa molécula na membrana e de forma solúvel, especialmente quando ativadas por IFN- $\alpha$  e outros estímulos inflamatórios. Interessantemente, vimos que apenas parte dos macrófagos de baço expressam CD100, sugerindo que essa molécula possa estar relacionada com subtipos específicos de macrófagos (LUQUE et al., 2013). Em um segundo trabalho, mostramos que CD100 e as plexinas, especialmente plexina B2, contribuem para a ligação de monócitos humanos a células endoteliais *in vitro*, e que essas duas células expressam CD100 na membrana, apontando para a proteína como um dos participantes na interação célula endotelial-monócito, um passo importante na aterogênese e formação de trombos (LUQUE et al., 2015).

Como já mencionado, macrófagos são extremamente importantes na infecção por *Leishmania*. No projeto de mestrado (GALUPPO, 2012) estudamos a expressão de CD100 em macrófagos e suas possíveis interferências na infecção por *Leishmania*. Nosso interesse em estudar CD100 no contexto dos macrófagos e infecção deve-se ao importante papel dessa molécula no sistema imune e de macrófagos na leishmaniose, como descrito a seguir.

### **1.7 CD100 e infecção de macrófagos por *Leishmania (L.) amazonensis***

No projeto de mestrado (GALUPPO, 2012) avaliamos a participação de CD100 na infecção de macrófagos murinos por *L. (L.) amazonensis*. Mostramos que macrófagos peritoneais residentes, estimulados com tioglicolato, ou diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 expressam CD100, análise realizada por Real Time RT-PCR. Sabe-se que células que expressam CD100 exibem essa molécula na membrana celular e podem também liberá-la como uma forma solúvel após clivagem proteolítica (BASILE et al., 2007; ELHABAZI et al., 2001; ZHU et al., 2007). Muitas células que expressam CD100 como linfócitos, macrófagos e células dendríticas são também capazes de responder a essa molécula (KUMANOGOHO et al., 2000; KUMANOGOHO et al., 2002; MIZUI et al., 2009). Durante o projeto de mestrado não dispúnhamos de ferramentas para modular a expressão de CD100 em macrófagos e avaliar seu efeito na infecção por *L. (L.) amazonensis*. Por isso produzimos a proteína recombinante solúvel (sCD100) e avaliamos seu efeito sobre a infecção de macrófagos murinos, células que expressam CD72 e são capazes de responder a CD100 (MIZUI et al., 2009; SMITH et al., 2011). Mostramos que sCD100 aumenta o índice de infecção nas duas linhagens murinas por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (dados não publicados).

A fagocitose de *Leishmania* pelo macrófago é um processo complexo do qual participam diversos receptores e moléculas do parasita, como já citado (item 1.3), mas nenhuma dessas moléculas foi descrita como ligante de CD100. O aumento da infectividade do macrófago na presença de sCD100 poderia ser resultado da redução de mecanismos leishmanicidas dessa célula (por exemplo da ativação clássica do macrófago) ou da ação direta de sCD100 sobre alguma molécula envolvida na fagocitose do parasita. Medimos a produção de Nitrito e a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na presença de sCD100 com ou sem LPS, mas não observamos alterações (dados não publicados). É possível que haja alterações em termos de proteínas e não RNA, alterações em mediadores não testados em nossos experimentos ou ainda a ligação de sCD100 em alguma proteína de

membrana que favoreça a fagocitose. Parte dessas questões foram trabalhadas ao longo deste projeto de doutorado.



O objetivo central do projeto foi avaliar o papel de CD100 na infecção do macrófago por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, analisamos o papel da molécula solúvel e da expressa pelo macrófago na fagocitose e infecção, e analisamos a expressão e localização da proteína em macrófagos.

Objetivos específicos e abordagem técnica utilizada:

- Determinação da localização e expressão de CD100 em macrófagos peritoneais antes e após a infecção com *L. (L.) amazonensis* por imunofluorescência e Real Time RT-PCR, respectivamente;
- Avaliação da fagocitose de partículas de Zymosan por macrófagos peritoneais na presença ou não de sCD100;
- Análise dos possíveis receptores responsáveis pelo efeito de sCD100 em macrófagos (CD72 e FcR);
- Análise do citoesqueleto de actina e tubulina em macrófagos estimulados ou não com sCD100, infectados ou não com *L. (L.) amazonensis* por Imunofluorescência e Western Blot;
- Análise da fagocitose de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por macrófagos estimulados ou não com sCD100 e BSA por imunofluorescência;
- Comparação da infectividade de macrófagos nocauteados ou não para CD100 por *L. (L.) amazonensis in vitro*;
- Comparação do desenvolvimento de lesões em camundongos nocauteados ou não para CD100 infectados por *L. (L.) amazonensis*;
- Análise da expressão de CD100 em populações celulares específicas de baço e linfonodo de camundongos C57BL/6 por FACs.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Cultivo de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e determinação da curva de crescimento

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa LV79 (MPRO/72/M1841) foram cultivados em estufa de 24 °C em meio 199 completo pH 7,2 (9,90g/L de meio 199 (EARLE) (CULTILAB), 0,33 g/L de bicarbonato de sódio, 40 mL/L de HEPES 1 M, 20 mL/L de adenina (Sigma) a 5 mM, 2 mL/L de Hemina 0,25%, acrescido de 20 µg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB, Life Technologies). A cada sete dias os parasitas foram repicados para a densidade de  $2 \times 10^6$ /mL. Para determinação da curva de crescimento uma alíquota da cultura foi diluída em Formalina 1,5% e os parasitas contados em câmara de Neubauer® (Ribeirão Preto, SP, Brasil).

### 3.2 Obtenção de macrófagos peritoneais residentes e plaqueamento

Macrófagos residentes na cavidade peritoneal foram obtidos de animais da linhagem BALB/c ou C57BL/6. Para isso, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e colocados em recipientes contendo álcool 70% para a descontaminação da pele, que foi aberta para expor a cavidade peritoneal. Cerca de 6 mL de PBS 1X estéril gelado foram injetados na cavidade peritoneal e após massagem o conteúdo foi aspirado com seringa e centrifugado a 3000 xg durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Life Technologies) não suplementado. A contagem dos macrófagos foi realizada em câmara de Neubauer®.

A suspensão de macrófagos peritoneais foi ajustada para  $8 \times 10^5$  célula por poço (placa de 24 poços) para cálculo do índice de infecção,  $5 \times 10^5$  células por poço (placa de 24 poços) para imunofluorescência ou  $2 \times 10^6$  célula por poço (placa de 6 poços) para extração de RNA ou obtenção de lisado proteico. Transferiu-se 0,5 mL da respectiva suspensão para placas de 24 poços com lamínula de vidro circular de 13 mm (Glass Técnica) para cálculo do índice de infecção ou imunofluorescência (sempre em triplicata, ou seja, com três lamínulas por condição) ou 2 mL da respectiva suspensão para placa de 6 poços para extração de RNA ou lise das células para obtenção de proteína. Após duas horas de incubação em estufa a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> o meio foi trocado por RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SFB e antibiótico gentamicina em temperatura ambiente, em seguida as células foram incubadas novamente em estufa de 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite.

### 3.3 Obtenção de monócitos de medula óssea e diferenciação em macrófagos

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para a retirada dos fêmures e tíbias. Os ossos foram mergulhados em álcool 70% e lavados em PBS 1X estéril para a retirada das epífises. As células foram recolhidas lavando o canal medular com 10 mL de meio R2030 (RPMI 1640 pH 7,2 com 30% de sobrenadante de cultura de fibroblasto L929 e 20% de Soro Fetal bovino) com uma agulha 21 G conectada a uma seringa de 10 mL. As células retiradas foram transferidas para placas de Petri de poliestireno estéril (Optilux™) (São Paulo, SP, Brasil) e mantidas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. No terceiro/quarto dia foram acrescentados mais 10 mL de meio R2030. Após o sétimo dia o meio foi descartado e foram adicionados 5 mL de meio RPMI pH 7,2 gelado sem SFB. Em seguida as placas contendo os macrófagos aderidos foram incubadas em gelo por 15 minutos e as células foram descoladas com a ajuda de rodinhos. As células soltas foram centrifugadas a 3000 xg a 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI pH 7,2 completo com 10% de SFB e gentamicina para a contagem em câmara de Neubauer e posterior plaqueamento para preparação de lisado proteico (item 3.2).

### 3.4 Obtenção de formas amastigotas de lesão murina

Camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com  $2 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no coxim plantar da pata esquerda. Na décima terceira semana os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e as patas removidas e maceradas em potter com PBS 1X estéril. Em seguida o macerado foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL, mantido em gelo por 30 minutos e centrifugado a 50 xg durante 10 minutos a 4 °C para retirada dos sedimentos. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 1450 xg por 17 minutos, o pellet foi lavado três vezes com 30 mL de PBS 1X estéril, seguido de centrifugação a 1450 xg por 17 minutos. Após as lavagens o pellet foi ressuspensão em 30 mL de meio RPMI pH 7,2 suplementado com 4% de SFB e antibiótico gentamicina e incubado em temperatura ambiente, sob agitação constante, durante 3 horas. Outra centrifugação nas mesmas condições citadas foi realizada. O pellet contendo os parasitas foi ressuspensão em 2 mL de tampão de lise de hemácias (15 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,4) e mantido em gelo durante 1 minuto, em seguida foram adicionados 10 mL de PBS 1X estéril e centrifugou-se nas condições acima. O pellet foi novamente lavado por duas vezes com 25 mL de PBS 1X estéril,

centrifugado e ressuspensão em 1,5 mL de meio RPMI pH 7,2 suplementado com 10% de SFB e antibiótico gentamicina para contagem dos parasitas em câmara de Neubauer®.

### **3.5 Infecção dos macrófagos com *Leishmania (L.) amazonensis***

A infecção dos macrófagos aderidos a lamínulas de vidro ou a placas de 6 poços foi realizada na proporção de 5 ou 10 parasitos por macrófago com formas promastigotas no quarto dia de crescimento ou amastigotas de lesão murina de *L. (L.) amazonensis* durante 4, 24, 48 ou 72 horas. As células aderidas em lamínulas circulares foram fixadas por incubação instantânea das lamínulas em metanol, coradas com kit de corante Instant Prov - NewProv e a infecção foi contada em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100x). Foram analisados 100 macrófagos por lamínula e determinada a proporção de macrófagos infectados (MI), o número de amastigotas por macrófago infectado (AMA) e o índice de infecção (II=MI x número de amastigotas contados).

### **3.6 Preparação do DNA plasmidial em grande escala**

Para obtenção da proteína CD100 solúvel fusionada com Fc (IgG) contamos com o plasmídeo de expressão CD100-Fc (KUMANOGOHI; et al., 2000) para células de mamíferos gentilmente cedido pelo Prof. Kumanogoh (Osaka, Japão). O plasmídeo foi utilizado para transformar bactérias DH5 $\alpha$ , e a amplificação e extração do DNA plasmidial em grande escala foram feitas com o kit NucleoBond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) (São Paulo, SP, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. O plasmídeo purificado foi quantificado no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific).

### **3.7 Transfecção de células HEK293T para obtenção da proteína CD100 solúvel**

Placas de 150 mm (Corning Incorporated - NY) foram semeadas com  $7,5 \times 10^6$  células HEK293T em meio DMEM + 5% soro “low-IgG” (Life Technologies) suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM e 1X solução de antibióticos-antimicóticos (Life Technologies). Quando a confluência celular atingiu 70-80% (cerca de dois dias depois) o meio de cultura foi substituído por meio contendo 1% de nutridoma (Roche). A transfecção das células de cada placa foi feita da seguinte maneira: 10  $\mu$ g do plasmídeo CD100-Fc foram misturados a 1 mL de uma solução de NaCl 150 mM e em seguida a 100  $\mu$ L de uma solução de

polietilenimina (PEI, Sigma) a 0,45 mg/mL. A mistura foi agitada em vortex por 10 segundos e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. O volume total (1,1 mL) foi adicionado lentamente (gota a gota) a cada placa, que foi então incubada em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por sete dias.

### **3.8 Precipitação e purificação da proteína CD100 solúvel**

Sete dias após a transfecção, os sobrenadantes das culturas de células foram coletados, filtrados em membrana de 0,22 µm e centrifugados a 7.500 xg por 10 minutos para precipitação e remoção de debris. Ao sobrenadante recuperado adicionou-se o inibidor de protease PMSF para 100 µM. As proteínas foram então precipitadas adicionando-se lentamente 60% p/v de sulfato de amônio e incubando-se sob agitação lenta a 4 °C por 24 horas. Seguiram-se duas centrifugações consecutivas a 10.000 xg por 45 minutos para coletar uma maior quantidade de proteína precipitada. Os precipitados foram ressuspensos em PBS 1X (50 mL para cada 1 L de cultura inicial) e centrifugados novamente nas mesmas condições para remoção de qualquer partícula não dissolvida. O sobrenadante desta segunda centrifugação foi incubado com “beads” de proteína G (Proteína G Sepharose 4FF GE, lavadas conforme instruções do fabricante) na proporção de 1 mL de “beads” para 50 mL de sobrenadante, sob rotação a 4 °C por 24 horas. A suspensão foi então centrifugada a 800 xg por 5 minutos e as “beads” contendo a proteína CD100-Fc foram transferidas para colunas de cromatografia (Bio-Rad). Seguiram-se duas lavagens da coluna com 5 mL de PBS gelado e eluição em alíquotas de 500 µL utilizando tampão glicina 0,1 M, pH 3,0. Acrescentou-se a cada alíquota 50 µl de tampão Tris 1M pH 8,0 para neutralização do pH. A concentração de proteína em cada alíquota foi determinada pelo método de Bradford (BioRad) e a presença da proteína CD100 foi analisada por SDS-PAGE e Western blot (item 3.17 e 3.18).

### **3.9 Incubação das formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com CD100 solúvel**

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em meio 199 completo pH 7,2, foram incubadas durante 2 horas com sCD100 na concentração de 200 ng/mL em temperatura de 24 °C. Após o estímulo as formas promastigotas foram centrifugadas a 2.500 xg durante 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, antibiótico

gentamicina, pH 7,2, para posterior infecção nos macrófagos peritoneais já plaqueados (item 3.2).

### **3.10 Infecção de macrófagos peritoneais na presença de CD100 solúvel**

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos da linhagem BALB/c ou C57BL/6 foram plaqueados em placas de 24 poços como descrito no item 3.2 e infectados com formas promastigotas no quarto dia de crescimento na proporção de cinco parasitas por macrófago (como descrito no item 3.5). Os macrófagos foram plaqueados na presença de sCD100 na concentração de 100 ng/mL ou 200 ng/mL durante a noite, infectados na presença de sCD100 por 4 horas e mantidos em RPMI pH 7,2 com sCD100 durante 24, 48 e 72 horas. O experimento controle foi feito na ausência de sCD100 em todas as etapas. As análises e comparações foram baseadas nos índices de infecção como descrito no item 3.5.

### **3.11 Fagocitose de Zymosan**

Partículas de Zymosan (Molecular Probes) foram ressuspensas a 1 mg/mL ( $2 \times 10^7$  partículas/mL) em meio RPMI pH7,2 suplementado com 10% de SFB, antibiótico Gentamicina e azida sódica 2 mM. O preparado foi sonificado e vortexado durante 20 minutos e armazenado em geladeira. Os experimentos de fagocitose de zymosan foram feitos de forma similar aos de infecção (item 3.5), na presença ou ausência de sCD100 nas concentrações de 100 ou 200 ng/mL. As células foram incubadas na proporção de 1 zymosan por célula por 1 hora, fixadas, coradas e analisadas. O índice de fagocitose foi calculado de forma análoga ao índice de infecção.

### **3.12 Análise da fagocitose por Imunofluorescência**

As análises por microscopia confocal das imunofluorescências foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Mauro Javier Cortez do Departamento de Parasitologia do ICB (USP), Prof. Dr. Renato Mortara na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e com apoio do Centro de Facilidade de Apoio a Pesquisa (CEFAP-USP).

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c foram plaqueados em placas de 24 poços como descrito no item 3.2, estimulados ou não com 200 ng/mL de sCD100 ou 200 ng/mL de BSA durante a noite. Em seguida, a placa foi mantida em gelo e em cada poço

foram adicionadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por célula. A placa foi conservada em gelo durante 2 horas para que os parasitas se depositassem sobre os macrófagos sem a inicialização da fagocitose. Após este período a placa foi incubada durante 5 minutos em estufa de 33 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse fagocitose.

Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos, lavadas 3 vezes em tampão Brinkley (0,5 M MgCl<sub>2</sub>, 0,5 M EGTA e 0,5 M KCL) com 5% de SFB, incubadas por 30 minutos em cloreto de amônia 50 mM e mantidas por mais 30 minutos em tampão Brinkley com 5% de SFB. Em seguida, as células foram incubadas durante a noite com soro anti-*Leishmania* (soro de camundongo BALB/c infectado, obtido no laboratório) na diluição 1:75. Após este período, foram lavadas cinco vezes com tampão Brinkley 5% de SFB em temperatura ambiente, permeabilizadas com 0,5% Triton x100, TBS+1%BSA durante 10 minutos, novamente lavadas em tampão Brinkley 5% de SFB e incubadas durante uma hora com um mix contendo Anti-mouse IgG (H+L) 488 alexa flúor (Thermo Scientific) na diluição 1:1000, Faloidina Texas Red (Molecular Probes) na diluição 1:500 e DAPI na diluição 1:600. As lamínulas foram lavadas novamente cinco vezes com tampão Brinkley 5% de SFB em temperatura ambiente, montadas com bloqueador (ProLong – Molecular Probes) e esmaltadas para análise em microscopia confocal. Para os dados quantitativos em microscopia de fluorescência foram contados 500 macrófagos infectados ou não, a partir da marcação com Faloidina (actina) e DAPI (núcleo). Foram quantificadas as formas promastigotas aderidas mas não internalizadas marcadas em verde e as formas promastigotas internalizadas marcadas apenas com DAPI (núcleo e cinetoplasto).

### **3.13 Análise da conformação do citoesqueleto de macrófagos por Imunofluorescência**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados como descrito no item 3.2, estimulados com 100 ng/mL e 200 ng/mL de sCD100 ou 100 ng/mL e 200 ng/mL de BSA. Para a análise da marcação de tubulina e actina os macrófagos foram fixados com paraformaldeído 4% durante 10 minutos, lavados três vezes em tampão Brinkley com 5% de SFB, incubados por 30 minutos em cloreto de amônia 50 mM, mantidos por mais 30 minutos em tampão Brinkley com 5% de SFB, em seguida permeabilizados com 1% de BSA/TBS, 0,1% Triton durante 10 minutos e lavados três vezes em tampão Brinkley com 5% de SFB.

Durante uma hora os macrófagos foram incubados com anticorpo anti-Tubulina na diluição 1:100 (Thermo Scientific), e em seguida foram incubados durante duas horas com Faloidina Texas Red (Molecular Probes) na diluição 1:500, DAPI na diluição 1: 600 e anti –

Rabbit Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) na diluição 1:100. As lamínulas foram lavadas três vezes em tampão Brinkley com 5% de SFB e as células foram montadas em bloqueador (ProLong – Molecular Probes) e esmaltadas para análise em microscopia confocal.

### **3.14 Análise da polimerização de actina e marcação de CD100 em macrófagos por Imunofluorescência**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados como descrito no item 3.2, estimulados ou não com 200 ng/mL de sCD100 durante a noite. Em seguida, a placa foi mantida em gelo e em cada poço foram adicionadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por célula na presença ou ausência de 200 ng/mL de sCD100. A placa foi conservada em gelo durante 2 horas, e após este período foi incubada durante 5 minutos ou 4 horas em estufa de 33 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse fagocitose.

Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos, lavadas 3 vezes em tampão Brinkley com 5% de SFB, incubadas por 30 minutos em cloreto de amônia 50 mM, mantidas por mais 30 minutos em tampão Brinkley com 5% de SFB e permeabilizadas com 0,5% Triton x100, TBS + 1% BSA durante 10 minutos. Novamente foram lavadas em tampão Brinkley 5% de SFB. Em seguida, as células foram incubadas durante a noite com soro anti-*Leishmania* (soro obtido no laboratório) na diluição 1:75. Após este período, foram lavadas três vezes com tampão Brinkley 5% de SFB em temperatura ambiente, e incubadas durante uma hora com um mix contendo anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluóor 488 (Thermo Scientific) na diluição 1:1000, Faloidina Texas Red (Molecular Probes) na diluição 1:500 e DAPI na diluição 1:600. As lamínulas foram lavadas novamente cinco vezes com tampão Brinkley 5% de SFB em temperatura ambiente, montadas com bloqueador (ProLong – Molecular Probes) e esmaltadas para análise em microscopia confocal.

### **3.15 Análise da marcação de CD100 em macrófagos por imunofluorescência**

Macrófagos peritoneais de animais BALB/c foram plaqueados como descrito no item 3.2. Em seguida, a placa foi mantida em gelo e em cada poço foram adicionadas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ou não na proporção de 10 parasitas por célula. A placa foi conservada em gelo durante 2 horas. Após este período a placa foi incubada durante 5, 10, 30 minutos ou 4 horas em estufa de 33 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para que ocorresse fagocitose.

Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos, lavadas três vezes em tampão PBS1x + 2% SFB, 30 minutos em cloreto de amônia 50 mM, mantidas por mais 30 minutos em PBS1x + 2% SFB e em seguida permeabilizadas com 0,5% Triton x100, TBS+1% BSA durante 10 minutos. Após este período as células foram incubadas durante a noite com soro anti-Triparedoxina (anticorpo feito em coelho cedido pelo professor Carlos Robelo do Instituto Pasteur, Montevideu) na diluição 1:100 e/ou anti-CD100 (feito em rato, da eBioscience) na diluição 1:50. No dia seguinte as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão PBS1x + 2% SFB e incubadas durante uma hora com anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Flúor488 (Thermo Sientific) na diluição 1:1000, anti-Rat IgG Alexa Fluor 568 (Thermo Sientific) na diluição 1:1000 e DAPI na diluição 1:600. As lamínulas foram lavadas novamente três vezes com tampão PBS1x + 2% SFB, montadas com bloqueador (ProLong – Molecular Probes) e esmaltadas para análise em microscopia confocal.

### **3.16 Análise da marcação de CD72 em macrófagos por Imunofluorescência**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados e fixados (sem infecção com *Leishmania*) como descrito em 3.15. Os macrófagos foram incubados com anticorpo anti-CD72 H-96 (Santa Cruz Biotechnologies) na diluição 1:75 durante a noite, e após lavagens com tampão Brinkley com 5% de SFB foram incubados durante duas horas com DAPI na diluição 1: 600 e anti– Rabbit Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific) na diluição 1:100. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes em tampão Brinkley com 5% de SFB e as células foram fixadas em bloqueador (ProLong – Molecular Probes) e esmaltadas para análise em microscopia confocal.

### **3.17 SDS-PAGE**

Foram preparados géis de separação e empilhamento segundo Sambrook et al., 1989. O gel de separação foi composto de 10% acrilamida:bisacrilamida 37, 5:1, 0,375 M Tris pH 8,8, 0,1%SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,04% v/v de TEMED (N,N,N',N' –tetrametil-etilenodiamina) e sua polimerização foi feita a temperatura ambiente por 1 hora. O gel de empilhamento aplicado acima do gel de separação foi composto de 5% acrilamida, 0,13 M Tris pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio e 0,1% v/v de TEMED e sua polimerização foi feita por 1 hora.

As amostras de proteína foram preparadas em tampão de amostra para 1x (2% SDS, 0,085 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1% azul de bromofenol 1,2% 2β-mercaptoetanol, 10% glicerol), fervidas a 95 °C por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi realizada a 60 V para o gel de empilhamento e a 120 V para o gel de separação, em tampão de corrida 25 mM de Tris-HCl, 250 mM de glicina e 0,1% de SDS.

### 3.18 Western Blot

A transferência das proteínas do gel de SDS-PAGE (item 3.17) para a membrana de nitrocelulose (Amersham TM Hybond TM - ECL, GE Healthcare) foi feita em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS e pH 8,2) por 1 hora a 100 V utilizando o equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A membrana foi corada com o corante Ponceau S (5% Ác. Acético e 0,2% Ponceau S) para análise das bandas e descorada em água. De forma geral, as membranas foram bloqueadas com PBS 1X com 5% leite e 0,1% Tween 20 por 1 hora, e incubadas com o anticorpo primário (ver detalhes abaixo) diluído em PBS com 2,5% leite e 0,1% Tween 20 por 2 horas ou durante a noite, dependendo do anticorpo. Foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20 e as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (ver abaixo) diluído em PBS 1X com 2,5% leite e 0,1% Tween 20 durante uma hora. Foram realizadas duas lavagens de 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20, e uma última lavagem apenas com PBS 1X. Em seguida foi adicionado ECL (Amersham™ ECL™ detection systems, GE) sobre as membranas por 5 minutos e elas foram expostas a filme de raio-X.

Para utilização de uma mesma membrana para identificação de outra proteína (por exemplo GAPDH, para normalização), os anticorpos foram retirados da membrana através do procedimento de “stripping”. A membrana foi lavada três vezes com PBS 0,1% Tween 20, mantida durante 5 minutos em solução de Azida Sódica 0,05% e durante 15 minutos em ácido cítrico 50 mM. Em seguida a membrana foi lavada 3 vezes novamente com PBS 0,1% Tween 20 e bloqueada durante 1 horas com PBS com 5% de leite e 0,1% Tween 20.

Anticorpos primários e secundários utilizados:

- Para confirmação da identidade da proteína CD100 solúvel recombinante utilizamos como primário o anti-mouseSemaphorin 4D/CD100 (R&D Systems) diluído 1:250 por 2 horas e como secundário anti-Rat IgG – Peroxidase (Sigma-ALDRICH) diluído 1:2000.

- Para quantificação de actina polimerizada (F- actina) e globular solúvel (G-actina) utilizamos anti- $\beta$  actina (Imuny Anticorpos Nacionais) na diluição 1:1000 durante a noite e anti-Rabbit IgG (H+L) (Imuny Anticorpos Nacionais) na diluição 1: 2000.
- A análise da expressão de CD72 foi feita usando o anti-CD72 H-96 (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:200 durante a noite e anti-Rabbit HRP (Imuny Anticorpos Nacionais) diluído 1:1000.
- Normalizações com GAPDH foram feitas quando necessário utilizando anti-GAPDH (Sigma Aldrich) diluído 1:10000 durante a noite e anti-Rabbit HRP (Imuny Anticorpos Nacionais) diluído 1:1000.
- A fosforilação de ERK foi avaliada empregando o anticorpo primário Anti-pERK (Erk1/2) (Cell Signaling, gentilmente cedido pela Profa Fernanda Ortis) diluído 1:1000 durante a noite e anti-Rabbit HRP (Cell Signaling) diluído 1:1000.

### **3.19 Análise da polimerização de Actina por Western Blot**

Para a obtenção do lisado proteico para a análise da polimerização de actina por western blot, macrófagos derivados de monócitos da medula óssea de camundongos BALB/c foram plaqueados na presença ou não de 200 ng/mL de sCD100 como descrito no item 3.3. A infecção foi realizada com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção 10:1, na presença ou não de 200 ng/mL de sCD100 por 5, 10, 30 minutos e 4 horas, como descrito no item 3.12. Em seguida as células foram lisadas em 50  $\mu$ L de tampão de lise (1 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris pH7,4, 1% de Triton x-100, 200 mM de PMSF, Proteoblock 100x e 5  $\mu$ L de DNase I 1U/  $\mu$ L). Após a lise, a proteína foi quantificada por Bradford e tubos contendo de 30  $\mu$ g de proteína para os macrófagos não infectados (controle) e 60  $\mu$ g de proteína para os infectados foram centrifugados a 50.000 xg por uma hora a 37 °C. O sobrenadante foi separado do pellet e ao pellet foram adicionados 1  $\mu$ L de DNase I 1U/  $\mu$ L (Invitrogen), 1  $\mu$ L de EDTA 25 mM (Invitrogen) e 8  $\mu$ L de buffer DNase I 10x (Invitrogen) e incubados por 15 minutos a 37 °C. As amostras para Western blot foram preparadas com tampão de amostra.

### **3.20 Análise da expressão de CD72 em macrófagos peritoneais e esplenócitos por Western Blot**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados como descrito no item 3.2 e estimulados ou não com 200 ng/mL de sCD100. Células L929 (linhagem de

fibroblasto) foram cultivadas em meio RPMI pH 7,2 completo com 10% de SFB. Em seguida as células foram lisadas em 50  $\mu$ L de tampão de lise (item 3.19)

Para obtenção do lisado de células de baço, um camundongo BALB/c foi eutanasiado e o baço foi removido assepticamente. Esplenócitos foram obtidos por maceração do órgão em meio RPMI 1640 (Sigma), em seguida foi realizada uma lavagem através de centrifugação a 3000 xg. Os glóbulos vermelhos foram lisados em uma solução de lise de hemácias (150 mM de NH<sub>3</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM de EDTA) por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida duas outras lavagens foram realizadas em meio RPMI 1640 e após centrifugação a 3000 xg o pellet foi ressuspenso em 1 mL de tampão de lise (item 3.19).

A concentração de proteínas nos lisados de macrófago e de baço foi determinada pelo método de Bradford e amostras contendo 30  $\mu$ g de proteína foram preparadas em tampão de amostra (item 3.19).

### **3.21 Análise da fosforilação de ERK em macrófagos por Western Blot**

Para a análise da fosforilação de ERK por western blot, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados na presença ou não com 200 ng/mL de sCD100 como descrito no item 3.2. A infecção foi realizada com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção 20:1, na presença ou não com 200 ng/mL de sCD100 e INF $\gamma$  na concentração 100 U/mL. Como controle foram usados também macrófagos estimulados com INF $\gamma$  durante 3 horas. Em seguida as células foram lisadas em tampão de lise (20 mM de PIPES, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,1% de CHAPS, 10% de Sacarose, 0,1% de triton X-100, 50  $\mu$ M de digitonina e Proteoblock 100 X), as proteínas quantificadas por Bradford e amostras de 20  $\mu$ g foram preparadas em tampão de amostra.

### **3.22 Infecção de macrófagos peritoneais na presença de sCD100 e bloqueadores de receptor Fc, IgG1 humano ou anti-CD72**

A metodologia para os três experimentos (com bloqueadores de receptor Fc, IgG1 humano ou anti-CD72) é semelhante à descrita no item 3.10, mas com as seguintes peculiaridades:

1) Bloqueadores de Fc: (gentilmente cedidos pela Profa. Ana Paula Lepique do Departamento de Imunologia, ICB- USP)

- Macrófagos plaqueados na presença de sCD100 na concentração de 200 ng/ml durante a noite, infectados na presença de sCD100 por 4 horas e mantidos em RPMI pH 7,2 suplementado com sCD100 durante 4 e 24 horas;
- Macrófagos plaqueados e incubados inicialmente com bloqueadores de receptor Fc (CD16 e CD32) na concentração de 0,1 µg/mL por 10 minutos, em seguida com sCD100 na concentração de 200 ng/mL durante a noite. Posteriormente infectados na presença de sCD100 e bloqueadores durante 4 e 24 horas;
- Macrófagos plaqueados, incubados por 10 minutos com bloqueador de receptor Fc (CD16 e CD32) na concentração de 0,1 µg/mL e infectados na presença de bloqueadores por 4 e 24 horas;
- Macrófagos plaqueados e infectados durante 4 e 24 horas. Experimento controle.

## 2) IgG1 humano recombinante:

- Macrófagos plaqueados na presença de sCD100 na concentração de 200 ng/ml durante a noite e infectados na presença de sCD100 por 4, 24, 48 e 72 horas;
- Macrófagos plaqueados com sCD100 na concentração de 200 ng/mL e 70 ng/mL de IgG1 Fc recombinante humano (R&D systems) durante a noite, em seguida infectados na presença de sCD100 e IgG1 durante 4, 24, 48 e 72 horas;
- Macrófagos plaqueados na presença de 70 ng/mL de IgG1 recombinante humano durante a noite, em seguida infectados por 4, 24, 48 e 72 horas contendo IgG1;
- Macrófagos plaqueados e infectados durante 4, 24, 48 e 72 horas. Experimento controle.

## 3) Anti-CD72:

- Macrófagos plaqueados na presença de sCD100 na concentração de 200 ng/ml durante a noite e infectados na presença de sCD100 por 48 horas;
- Macrófagos plaqueados e incubados por 1 hora com anti-CD72 H-96 (Santa Cruz Biotechnology) na concentração de 10 µg/mL, em seguida adicionou-se sCD100 para 200 ng/mL durante a noite. Infecção na presença de anti-CD72 e sCD100 por 48 horas;
- Macrófagos plaqueados, incubados com 10 µg/mL de anti-CD72 durante a noite e infectados por 48 horas na presença de anti-CD72;
- Macrófagos plaqueados e infectados durante 48 horas. Experimento controle.

As análises e comparações foram baseadas nos índices de infecção como descrito no item 3.5.

### 3.23 Extração e quantificação de RNA de macrófagos

A extração de RNA foi feita seguindo instruções do fabricante (manual Trizol, LifeTechnologies). As células foram lisadas diretamente na placa com 1 mL de Trizol por 5 minutos a temperatura ambiente e o material foi transferido para tubos eppendorf. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e a mistura foi rigorosamente agitada por 15 segundos e mantida em repouso por 3 minutos. Após centrifugação a 16.000 xg por 15 minutos a 4 °C a fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para outro tubo e misturada por inversões com 0,5 mL de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e o RNA foi recolhido por centrifugação a 16.000 xg por 15 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% nas mesmas condições da centrifugação anterior e seco a temperatura ambiente. O RNA foi ressuspensão em 10 µL de água DEPC (LifeTechnologies), rigorosamente agitado, aquecido por 10 minutos a 65 °C e transferido para gelo.

O RNA foi quantificado por espectrofotômetro (Nanodrop–ThermoScientific) no comprimento de onda de 260 nm e o grau de pureza da amostra foi avaliado pela relação entre as leituras a 260 e 280 nm (idealmente entre 1,8 e 2,0). Uma alíquota de 0,5 µg em tampão contendo concentrações finais de 3,5 mM Uréia, TAE 1X, glicerol a 15% e azul de bromofenol foi aplicada em gel de agarose 2% para visualizar a integridade por meio da razão entre a intensidade das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S (que deve ser próxima de 2) e para verificar possíveis contaminações com DNA genômico.

### 3.24 Transcrição reversa

A transcrição reversa do RNA para cDNA foi feita utilizando a enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Life Technologies). A 1,7 µg de RNA foram adicionados 50 ng de random primers, 250 ng de oligo (dT), 500 µM de dNTP (Life Technologies) em H<sub>2</sub>O DEPC para 20 µL. Esta mistura foi aquecida por 5 minutos a 65 °C e por 2 minutos a 42 °C em termociclador e em seguida foram adicionados 7 mM DTT, 40 U de inibidor de RNase (RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor – Life Technologies), 200 U da transcriptase reversa, tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C.

### 3.25 Real-Time RT-PCR

As reações de PCR em tempo real foram feitas em placas de 96 poços (Thermo-Fast® 96 PCR Plate Non-Skirted) (São Paulo, SP, Brasil) utilizando *ABsolute QPCR SYBR Green Mix* (ThermoScientific) no equipamento *Mastercycler®eprealplex* (Eppendorf) (São Paulo, SP, Brasil). O valor da linha de corte (*threshold*) que define o nível de fluorescência detectável e, portanto, o Ct, foi determinado automaticamente.

As reações foram feitas em triplicata, utilizando por poço 1,97 µL do cDNA diluído 1:10, oligonucleotídeos nas concentrações padronizadas, 7,6 µL de *SYBR GreenMix* e H<sub>2</sub>O *nucleassefree* em quantidade suficiente para 15 µL. Como controles foram feitas reações na ausência de cDNA. As condições de amplificação utilizadas foram: 15 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 68 °C por 30 segundos. A especificidade da amplificação foi confirmada pela da curva de “Melting” ou dissociação, usando o programa: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, 15 segundos a 95 °C.

Após a determinação das concentrações ideais de oligonucleotídeos e das eficiências de amplificação de cada par de oligonucleotídeos, utilizamos o método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001) (pois os genes tiveram eficiências próximas a 2) para cálculo da quantificação relativa (QR) com o gene normalizador GAPDH.

**QR =  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ referência}$ , e  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$**

- *Oligonucleotídeos usados no Real-Time RT-PCR*

Os oligonucleotídeos para amplificação de CD100 murino foram obtidos a partir de Li et al. (2009) e avaliados usando o programa DNASTAR (Tms de aproximadamente 60 °C e ausência de pareamentos significativos entre si e internos). Os primers para amplificação de GAPDH murino foi sintetizado com base nas sequências obtidas por colaboração com o Laboratório de Imunologia do Incor.

Primer	Forward	Reverse
GAPDH	5'-GGTCGGTGTGAACGGATTG-3'	5'-GGGTCGTTGATGGCAACAAT-3'
CD100	5'-ACCACCTGAACTTGACATCCTT-3'	5'-ACCATGACTGATGTGTAGCTGTG-3'

**Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real-Time RT-PCR

### 3.26 Atividade de tirosina fosfatase

Os experimentos de análise da atividade de fosfatase foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Forti e Dr. Thompson Eusébio do Instituto de Química – USP, seguindo protocolo padronizado por seu grupo.

Macrófagos foram plaqueados na presença de sCD100 durante a noite, estimulados com INF $\gamma$  durante 3 horas ou infectados com *L. (L.) amazonensis* durante 4 horas. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram estimuladas com sCD100 por 4 horas e macrófagos e formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não estimuladas foram utilizados como controle para análise da atividade de fosfatase.

As células foram lisadas com tampão de lise (20 mM de PIPES, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0,1% de CHAPS, 10% de Sacarose, 0,1% de Triton x-100, 50  $\mu$ M de digitonina 20 mM e Proteoblock 1:100), quantificadas por Bradford e 5  $\mu$ g foram utilizados para a reação. As amostras foram incubadas em tampão 1 X, pH 7 (300 mM de Tris, 750 mM de NaCl e 10 mM de EDTA) com DTT 200 mM, BSA 5 mg/mL, DMSO 1%, na presença do substrato 3- O-methylfluorescein phosphate (OMFP) 2 mM, que é hidrolisado por fosfatases produzindo O-methylfluorescein (OMF), detectável no comprimento de onda de 485/525 nm. O controle negativo foi feito acrescentando-se Ortovanadato de Sódio (Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub>) 2 mM que é um inibidor de proteína tirosina fosfatase. A leitura da atividade foi realizada no aparelho TECAN.

### 3.27 Triagem dos camundongos C57BL/6 nocautes para CD100

Camundongos C57BL/6 heterozigotos para CD100 foram cedidos gentilmente pela Dra. Laurence Brass da Universidade da Pennsylvania. Em nosso biotério os animais foram acasalados para a geração de animais homozigotos. A partir da primeira geração, as pontas das caudas dos filhotes foram cortadas para a lise e extração do DNA para triagem por PCR. As caudas foram mantidas em 0,5 mL de Tail Buffer (1 M Tris pH7,5, 5 M NaCl, 0,5 mM EDTA pH 8, 20% SDS) com 20 mg/mL de proteinase K durante a noite a temperatura de 55 °C. Em seguida foram adicionados 0,5 mL de fenol clorofórmio (Invitrogen), misturou-se e manteve-se por 15 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada uma centrifugação a 13.000 xg durante 15 minutos, ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol 100% e manteve-se por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi realizada outra centrifugação de 10 minutos, e ao pellet foram adicionados 1 mL de etanol 70%, seguido de outra centrifugação nas mesmas condições.

O pellet livre de etanol foi ressuspensão 100 µL de TE (Tris-EDTA pH8) e incubado a 55 °C durante 30 minutos.

Para amplificação utilizamos 1 µL de DNA extraído da cauda dos animais, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo mostrado na tabela 2,50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de dNTPs, 1U da *Taq Platinum* polimerase (Lifetecnologies), tampão para 1x e H<sub>2</sub>O nuclease free para um volume final de 25 µL. A ciclagem foi realizada no termociclador *Applied Biosystems* com uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 94 °C, *annealing* por 45 segundos na temperatura de 62 °C e extensão a 72 °C de um minuto.

Primer	Forward	Reverse
CD100 KO	5'-GTCCTTGCTGCTACCCACAGCAG-3'	5'-CGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC -3'
CD100 WT	5'-GTCCTTGCTGCTACCCACAGCAG-3'	5'-ACATTCTCAGTGCACCTTTGCTTC -3'

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de PCR para triagem dos animais nocautes para CD100

Após a triagem, os animais homozigotos nocautes para CD100 foram acasalados e mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas II – USP.

### 3.28 Análise *in vivo* das lesões dos camundongos C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*

Camundongos C57BL/6 nocautes para CD100 (quatro animais) e camundongos C57BL/6 selvagens (quatro animais) foram infectados com 2x10<sup>6</sup> formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no quarto dia de cultivo (início da fase estacionária) no coxim plantar da pata esquerda. Uma vez por semana, durante 13 semanas, as patas infectadas e não infectadas dos animais foram medidas em termos de largura e espessura para acompanhamento do desenvolvimento da lesão.

Foi calculada a área de cada pata (largura x espessura) e em seguida subtraímos do valor da área da pata infectada (esquerda) o valor da área da pata não infectada (direita). Gráficos XY foram construídos para cada animal e calculamos a área sob a curva de cada um. A comparação e análise estatística das áreas sob as curvas de animais selvagens e nocautes foi feita por teste t.

### **3.29 Análise de populações celulares por citometria de fluxo**

As células foram isoladas de baço e linfonodo (poplíteo e inguinal) de camundongo C57BL/6 saudável. Para marcação de superfície,  $6 \times 10^6$  células foram lavadas, os glóbulos vermelhos foram lisados em solução de lise (150 mM de  $\text{NH}_3\text{Cl}$ , 10 mM de  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 mM de EDTA) por 1 minuto em temperatura ambiente, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em FACs buffer (PBS 1X com 2% de Soro Fetal Bovino) para a realização das marcações. Os anticorpos utilizados para as marcações foram: Anti- F4/80 FITC (eBioscience – clone: BM8) na diluição 1:50, Anti- CD3 APC Cy7 (BD – clone: 145-2C11) na diluição 1:50, Anti- CD19 PE Cy7 (BD – clone: ID3) na diluição 1:100, Anti- CD11c APC (BD – clone: HL3) na diluição 1:100 e Anti – Sema4D PE Rat IgG2B (R&D Systems) na diluição 1:5. A incubação foi realizada durante 45 minutos a 4 °C, após este período as células foram lavadas duas vezes com FACs Buffer com centrifugações a 450 xg durante 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de FACs Buffer para análise no citômetro de fluxo (FACS Canto - BD Biosciences).

### **3.30 Análise estatística**

Todos os gráficos e análises estatísticas foram feitos no programa GraphPad Prism. Foram empregados teste t ou ANOVA com Tukey pós teste, dependendo do número de amostras comparadas. Valores de p inferiores a 0.05 foram considerados significativos.

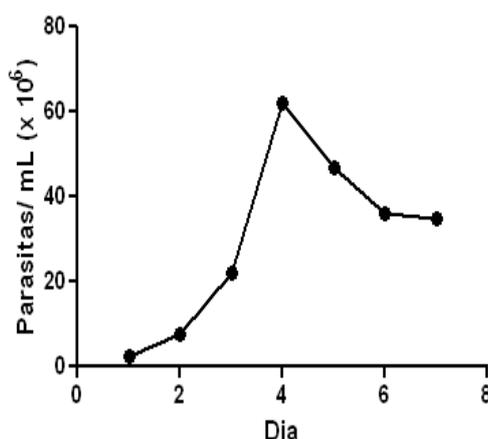
## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 4.1 Índice de infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais residentes

Experimentos realizados durante o mestrado (GALUPPO, 2012) mostraram que macrófagos peritoneais residentes, recrutados com tioglicolato e derivados da medula óssea, de camundongos BALB/c e C57BL/6 expressavam CD100. Mostramos também que quando infectados por promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa LV79 cultivados em meio Warren pH7,2 em diferentes proporções de parasita/macrófago, esses macrófagos apresentaram diminuições dos índices de infecção ao longo de 4, 24, 48 e 72 horas. Esses dados não eram esperados considerando que os parasitas são capazes de se multiplicar no macrófago, o que levaria ao aumento dos índices com o tempo.

Uma hipótese para isso seria uma baixa metaciclogênese em meio Warren, que era utilizado no laboratório para o cultivo das formas promastigotas. Para verificar essa hipótese cultivamos parasitas recém-isolados de lesão murina em meio 199 pH 7,2 completo (item 3.1).

A figura 5 mostra a curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em meio 199 completo pH7,2. Nota-se no quarto dia de crescimento a maior densidade de parasitas viáveis, dado diferente da cinética de crescimento das formas promastigotas cultivadas em meio Warren completo pH 7,2 (dados não mostrados), na qual o maior número de parasitas viáveis era observado no sétimo dia de cultura.

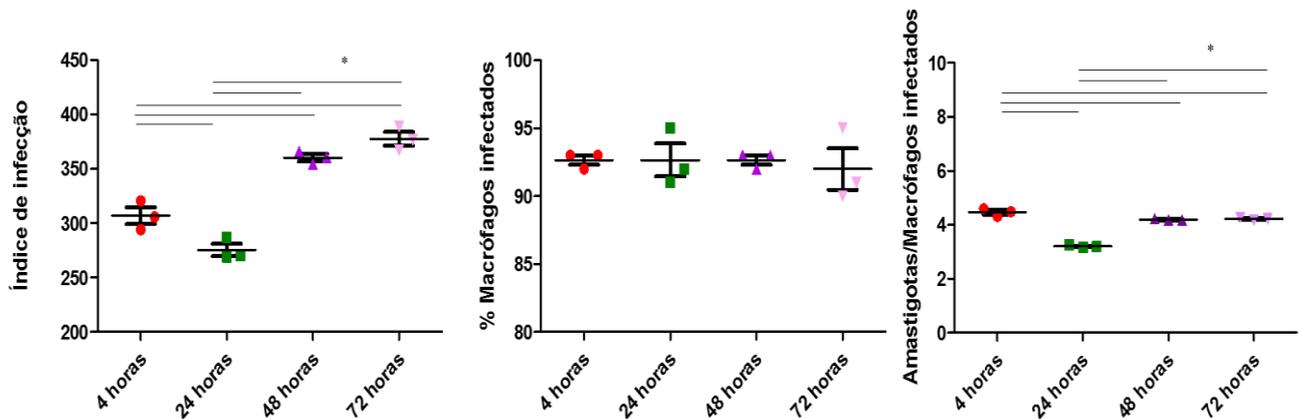


**Figura 5.** Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cepa LV79, cultivadas em meio 199, pH 7,2 durante sete dias. Resultado de um experimento representativo de quatro.

A partir desses dados consideramos que no quarto dia de crescimento as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estão no início da fase estacionária, com parte dos parasitas na fase metacíclica, já que no quinto-sexto dia a densidade de parasitas de cultura começa a diminuir. Realizamos então novas infecções em macrófagos peritoneais utilizando

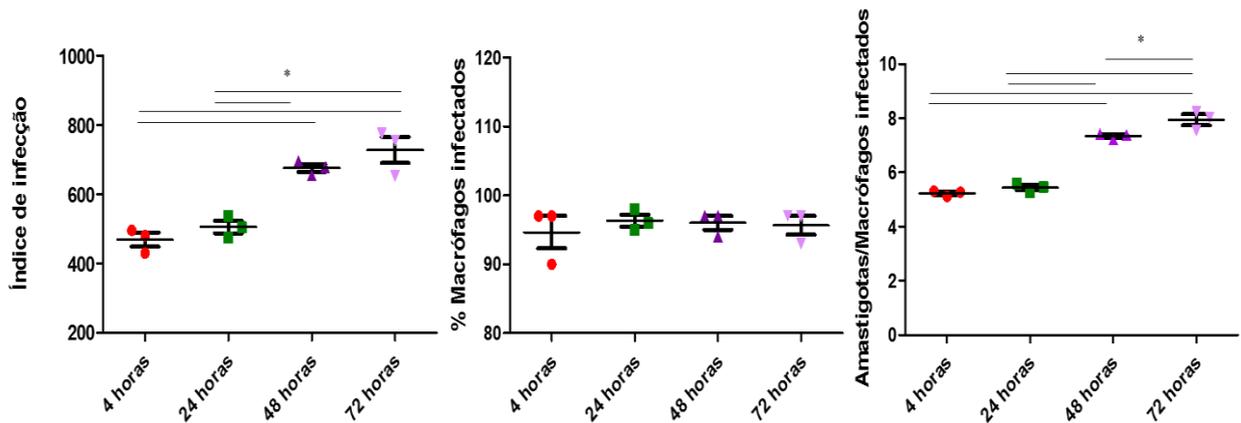
parasitas no 4º dia de cultivo em meio 199 pH7,2 completo para a análise da evolução da infecção.

Nos experimentos de infecção utilizamos inicialmente macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, já que não observamos diferenças importantes entre os subtipos de macrófagos e linhagens murinas na infecção e expressão de CD100 (GALUPPO, 2012; dados não publicados). A figura 6 mostra os índices de infecção de macrófagos peritoneais infectados por 4, 24, 48 e 72 horas. O aumento dos índices com o tempo (diferença estatística significativa) sustenta nossa hipótese de problemas na diferenciação em metacíclicos no meio Warren e nos levou a optar pelo cultivo de *L. (L.) amazonensis* em meio 199 pH7,2 completo para os experimentos seguintes.



**Figura 6.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cepa LV79, cultivadas em meio 199, pH 7,2 na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72 h. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .

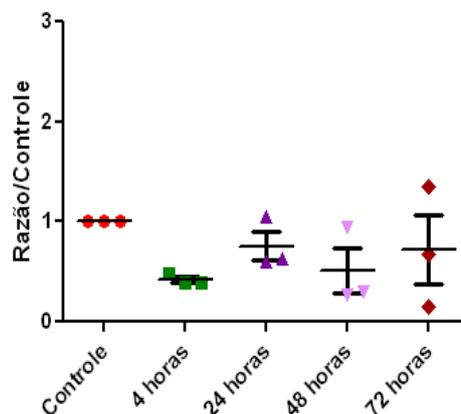
Realizamos infecções com amastigotas de lesão murina para comparar com o padrão obtido com promastigotas cultivados em meio 199 pH7,2 completo. O resultado apresentado na figura 7 mostra também um aumento estatisticamente significativo de infecção ao longo do tempo, mas índices de infecção maiores do que os obtidos com promastigotas. A partir desse momento todos os experimentos foram feitos com promastigotas cultivados em meio 199 pH 7,2 completo.



**Figura 7.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa LV79 de lesão murina, na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72h. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento em triplicata. \*:  $p \leq 0,05$ .

#### 4.2 Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*

Dados de nosso grupo mostraram que CD100 é mais expresso em macrófagos humanos sob estímulo inflamatório (LUQUE et al., 2013), mas sua expressão nunca foi estudada no contexto de uma infecção. Sabendo que os diversos macrófagos murinos estudados expressam CD100 (dados do mestrado), buscamos analisar se a infecção com promastigotas nas novas condições de cultivo alteravam os níveis de transcritos de CD100 no macrófago. Para isso, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24, 48 e 72 horas, e o RNA foi coletado e utilizado para quantificação de CD100 (e GAPDH) por Real Time RT-PCR. Os dados são mostrados na figura 8.

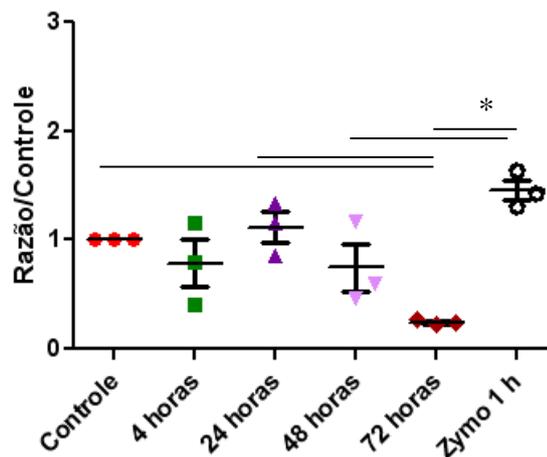


**Figura 8.** Expressão relativa de CD100 normalizada por GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72 horas. Razão em relação ao controle não infectado; média e desvio padrão de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

A figura nos mostra que a expressão relativa de CD100 em macrófagos infectados na MOI (multiplicidade de infecção) de 5:1 por diferentes tempos não muda em relação às células não infectadas. Para verificar se uma infecção com maior proporção de parasitas teria um efeito distinto utilizamos a MOI de 10:1. Nessas condições (figura 9) observamos que a expressão de CD100 diminuiu significativamente após 72 horas de infecção em relação ao controle não infectado, dado interessante por ser um momento tardio da infecção.

Para analisar a expressão relativa de CD100 na fagocitose em termos gerais e não apenas na infecção com *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos foram incubados com partículas de Zymosan. Essas são partículas isoladas da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que consistem em complexos proteína-carboidrato, usadas como um modelo para o reconhecimento de microrganismos pelo sistema imunológico inato há mais de 50 anos (UNDERHILL, 2003). O Zymosan induz sinais inflamatórios em macrófagos através de receptores Toll-like TLR2 e TLR6, e os receptores fagocíticos dos macrófagos reconhecem o Zymosan e estimulam o englobamento dessa partícula (UNDERHILL, 2003).

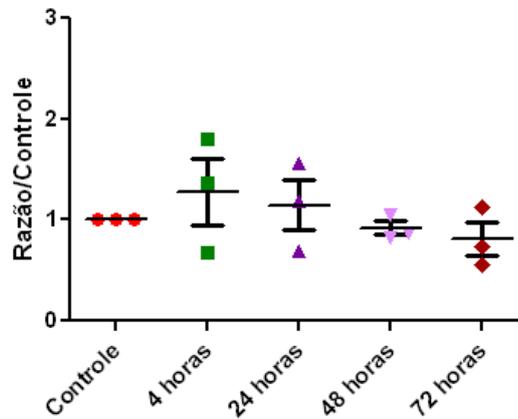
Como pode ser visto também na figura 9, da mesma forma que em macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, a expressão de CD100 não foi modulada pela fagocitose de Zymosan comparado ao controle.



**Figura 9.** Expressão relativa de CD100 normalizada com GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72 horas, ou incubados com Zymosan na proporção de 1 partícula por macrófago por 1 hora. Razão infectado/controle não infectado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

Quando a infecção foi realizada com formas amastigotas recuperadas de lesão murina na proporção de 10 parasitas por macrófago por diferentes tempos não observamos

diferença na expressão de CD100 em nenhum tempo de infecção quando comparados ao controle não infectado (figura 10).



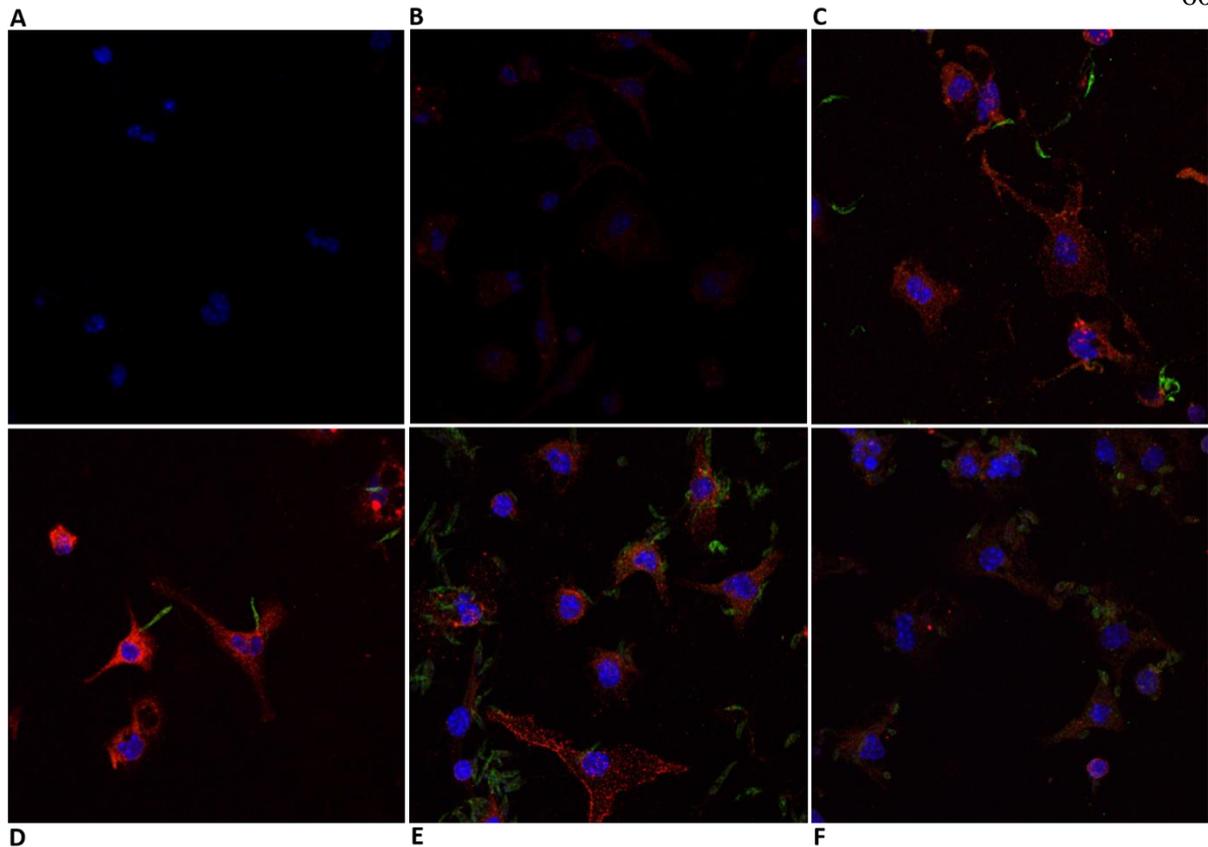
**Figura 10.** Expressão relativa de CD100 normalizada com GAPDH em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72 horas. Razão infectado/controle não infectado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

Concluimos a partir desses experimentos que a infecção por *L. (L.) amazonensis*, independente da forma e proporção do parasita, ou a fagocitose de partículas de Zymosan, não modulam a abundância de transcritos de CD100 em macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c nos tempos testados.

#### 4.3 Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados ou não por *L. (L.) amazonensis*

Como não observamos diferenças nos níveis de CD100 durante a infecção, nos perguntamos se a infecção modularia a distribuição da proteína no macrófago. Para isso, optamos pela análise de CD100 nos macrófagos por imunofluorescência.

Na figura 11 podemos observar a marcação de CD100, em vermelho, nos macrófagos infectados ou não com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, marcadas em verde.



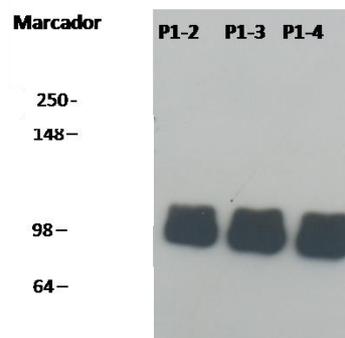
**Figura 11.** Imunofluorescência para CD100 em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c não infectados (B), infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 10 parasitas por macrófago por 5 minutos (C), 10 minutos (D), 30 minutos (E) e 4 horas (F). Marcação com anticorpo anti-CD100 e secundário anti-Rat alexa flúor 568 (vermelho), anti-Triparedoxina com secundário anti-Rabbit alexa flúor 488 marcando *Leishmania* (verde) e DAPI (núcleo em azul). Controle, secundário anti-Rat alexa flúor 568 e DAPI (A). Microscópio confocal, aumento de 63x, 1.0 de zoom.

Embora algumas células pareçam ter intensidade e/ou distribuição distinta de CD100, a análise de um grande número de células em experimentos distintos mostrou que não há diferença na abundância nem distribuição de CD100 entre macrófagos infectados e não infectados. Esse dado está de acordo com os resultados já mostrados de Real Time RT-PCR (figuras 9 e 10), que mostraram abundâncias semelhantes de transcritos de CD100 em macrófagos não infectados ou infectados com promastigotas ou amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Mostramos anteriormente que CD100 solúvel (sCD100) afeta a fagocitose de LDL oxidado por macrófagos humanos (LUQUE et al., 2013). Buscando avaliar se sCD100 afeta também a fagocitose de *Leishmania* por macrófagos murinos, produzimos a proteína recombinante em sistema eucariótico.

#### 4.4 Produção da proteína CD100-Fc recombinante

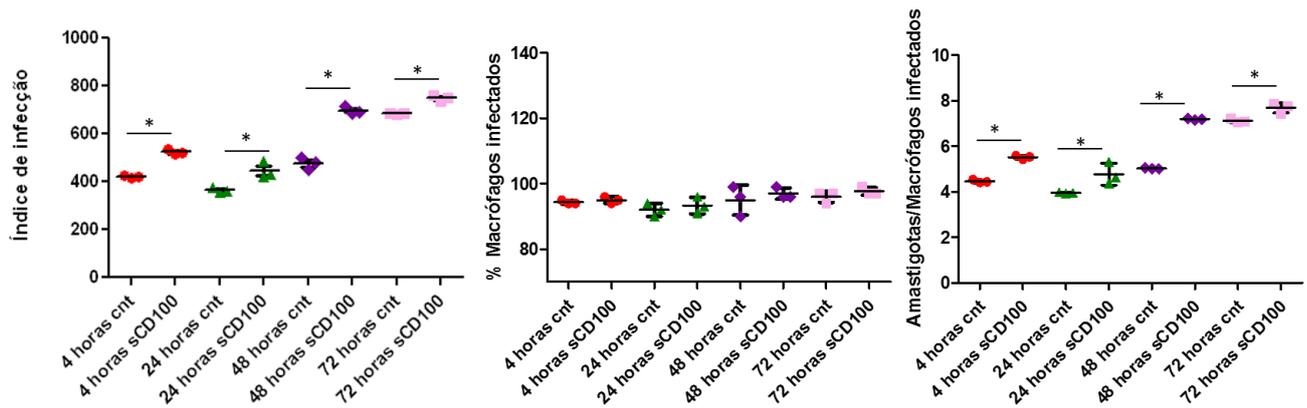
A expressão e purificação da proteína CD100-Fc recombinante foram realizadas como descrito no item 3.8. Foi feito um Western blot para confirmar a proteína produzida pelo reconhecimento do anticorpo Anti-mouse Semaphorin 4D/CD100 (R&D Systems). A figura 12 comprova a presença de CD100 nas três frações analisadas da coluna de cromatografia, P1-2, P1-3, P1-4, que foram as de maior rendimento (por Bradford). A produção da proteína solúvel foi realizada em grande escala para a utilização ao longo do projeto de doutorado.



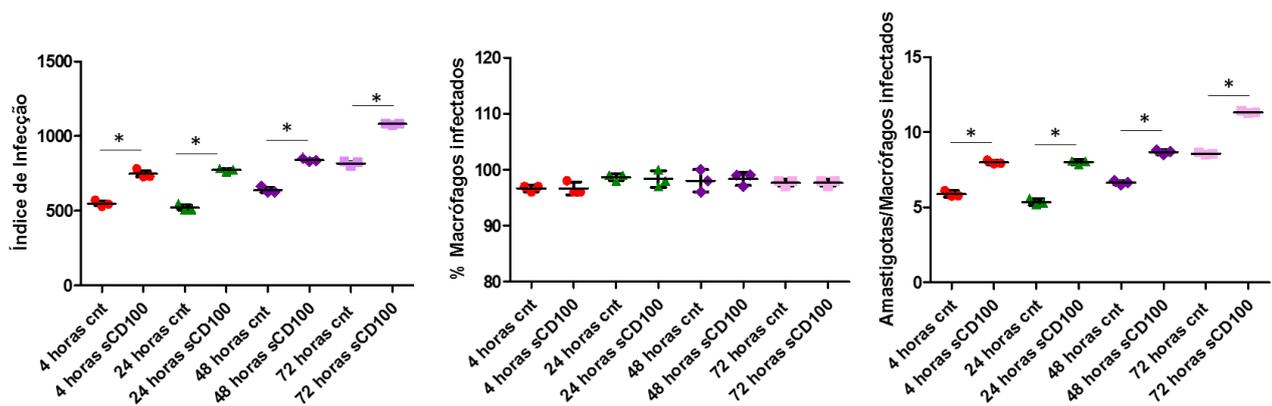
**Figura 12.** Western Blot para a proteína CD100-Fc em três frações de purificação (P1-2, P1-3, P1-4) utilizando anticorpo Anti-mouse Semaphorin 4D/CD100.

#### 4.5 Efeito de CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos por *L. (L.) amazonensis*

Nossos resultados mostraram uma curva de crescimento diferente para formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em meio 199 pH7,2 completo e um índice de infecção crescente ao longo do tempo de infecção. Realizamos então três experimentos nas novas condições de cultivo para avaliar o efeito de sCD100 na concentração de 100 ng/mL sobre a infecção dos macrófagos. As figuras 13 e 14 mostram os resultados em termos de índice de infecção para macrófagos de BALB/c e C57BL/6.



**Figura 13.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72 horas na presença contínua de sCD100 na concentração de 100 ng/mL. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .



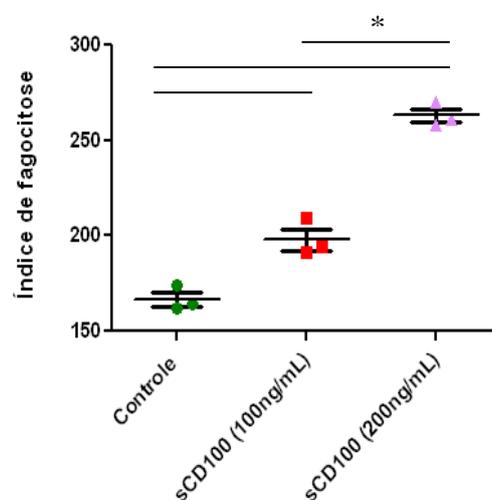
**Figura 14.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72 horas na presença contínua de sCD100 na concentração de 100 ng/mL. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .

De acordo com os dados das figuras 13 e 14, observamos que em 4, 24, 48 e 72 horas o índice de infecção aumenta significativamente na presença de sCD100 quando comparado ao controle não infectado. Estes resultados confirmam que sCD100 modula a infecção por *L. (L.) amazonensis* aumentando o índice de infecção quando comparado ao controle não estimulado. A porcentagem de macrófagos infectados ao longo dos tempos não é alterada na presença de sCD100. Acreditamos que sCD100 não interfere na replicação dos parasitas no interior dos macrófagos porque as razões de parasita por célula entre os tempos (72/48 horas, 48/24 horas, 72/24 horas) são semelhantes na presença ou não de sCD100 (cálculos não mostrados).

Observamos que tanto em macrófagos de camundongos BALB/c quanto em C57BL/6 o índice de infecção aumenta ao longo do tempo e na presença de sCD100, indicando que a infecção tem padrão semelhante nessas duas linhagens murinas. Foram realizadas infecções nas duas linhagens de camundongos porque serão feitos experimentos *in vitro* e *in vivo* com animais nocautes para CD100, que são da linhagem C57BL/6.

#### 4.6 Análise da fagocitose de Zymosan em macrófagos estimulados ou não com CD100 solúvel

Visto que sCD100 é capaz de aumentar o índice de infecção com *L. (L.) amazonensis*, analisamos o efeito de sCD100 na fagocitose em geral. Pré-incubamos macrófagos com sCD100 nas concentrações de 100 ng/mL e 200 ng/mL durante a noite, e então incubamos com uma partícula de Zymosan por célula, também na presença de sCD100 durante uma hora. Os índices de fagocitose nas três condições são mostrados na figura 15



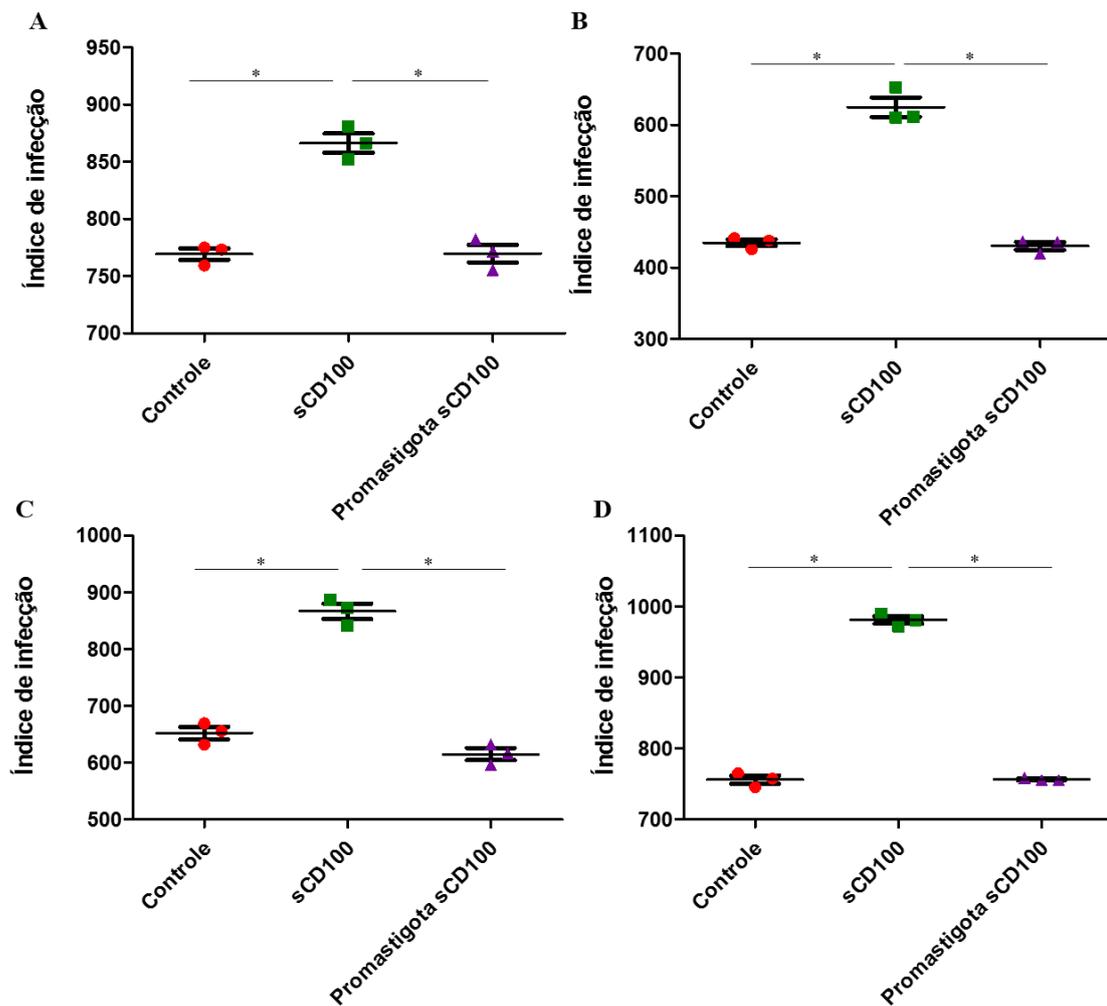
**Figura 15.** Índice de fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c incubados com Zymosan na proporção de 1 partícula por macrófago por 1 hora na presença contínua ou não de sCD100 na concentração de 100 e 200 ng/mL. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .

Os dados apresentados na figura 15 mostram que sCD100 aumenta o índice de fagocitose de partículas de zymosan de forma dose-dependente, indicando que essa proteína atua sobre a fagocitose de forma geral e não apenas de *Leishmania*.

#### **4.7 Efeito da pré-incubação de promastigotas com CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos**

Uma possível explicação para o aumento do índice de infecção por *L. (L.) amazonensis* na presença de sCD100 seria a ligação dessa molécula ao parasita (formas promastigotas e amastigotas) e a facilitação da adesão e entrada deste pelo receptor de CD100, CD72 presente em macrófagos, ou pelo receptor de Fc do macrófago, já que a proteína sCD100 é fusionada com a região Fc do anticorpo IgG1 humano (KUMANOGOH et al., 2000). Para verificar se uma eventual ligação de sCD100 ao parasita aumentaria a fagocitose, foram feitas infecções de macrófagos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pré-incubados ou não com sCD100 durante duas horas em estufa de 24 °C, como descrito no item 3.9.

Analisando a figura 16 podemos observar que quando as formas promastigotas foram pré-incubadas com sCD100 o índice de infecção foi igual ao do controle, ou seja, sCD100 não aumenta a infecção por um contato/interação direto com o parasita nas condições testadas. Por outro lado, como mostrado nas figuras anteriores, quando macrófagos são pré-incubados com sCD100 e sCD100 é mantido durante a infecção, o índice de infecção aumenta de forma estatisticamente significativa.

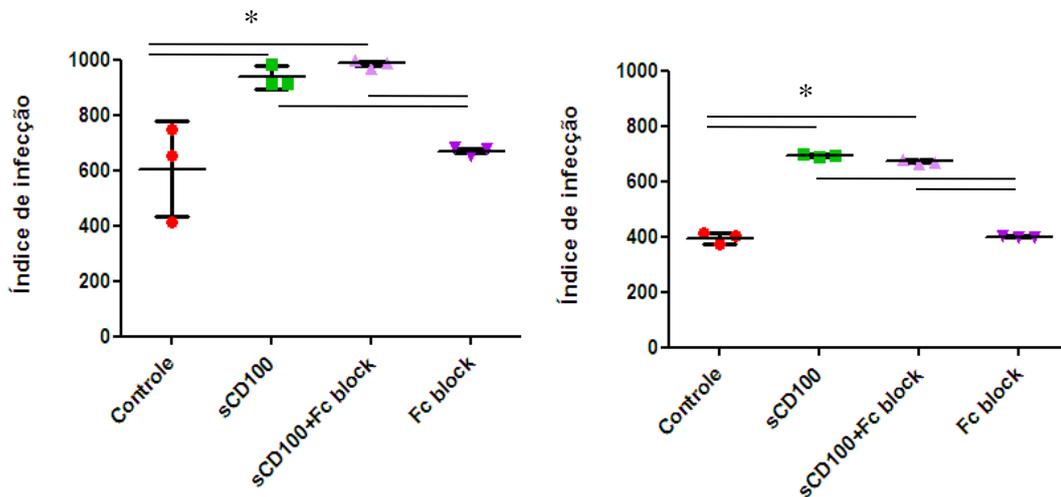


**Figura 16.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados na proporção de 5 parasitas por macrófago com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 4 (A), 24 (B), 48 (C) ou 72 (D) horas em diferentes condições: macrófagos e parasitas sem sCD100 (controle), promastigotas pré-incubadas com sCD100 na concentração de 200 ng/mL (promastigota sCD100), macrófagos e promastigotas na presença contínua de sCD100 na concentração de 200 ng/mL (sCD100). Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .

#### 4.8 Efeito de Bloqueadores de receptor Fc e IgG1 sobre o estímulo da infecção por *L. (L.) amazonensis* promovido por CD100 solúvel

Nossos dados mostraram que o aumento da infecção na presença de sCD100 não se deve a uma interação direta CD100-*Leishmania*, e que essa modulação requer o contato entre sCD100 e o macrófago. O próximo questionamento foi se sCD100 estimularia a infecção do macrófago a partir da ligação a seu receptor CD72 ou se o aumento da fagocitose se devia à interação do IgG1 fusionado à proteína recombinante solúvel (KUMANOGOH et al., 2000) com o receptor FcR do macrófago.

Para responder essa questão realizamos um experimento no qual foram bloqueados os receptores Fc CD16 (Fc $\gamma$ RIII) e CD32 (Fc $\gamma$ RII), que possuem baixa e média afinidade por IgG1 e IgG3 respectivamente (GESSNER et al., 1998; RAVETCH et al., 1986).

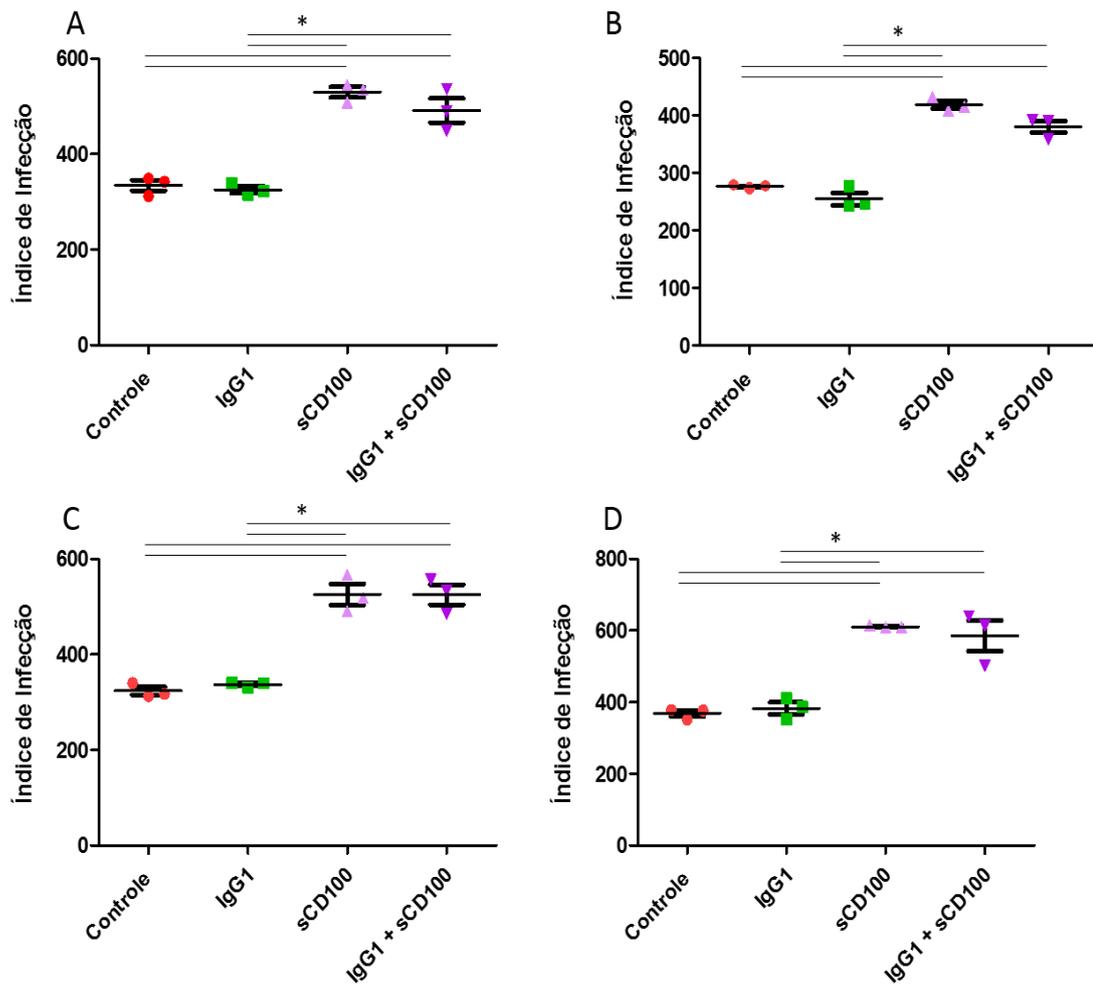


**Figura 17.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4 (A) e 24 (B) horas na presença contínua ou não de sCD100 (200 ng/mL), sCD100+bloqueador de Fc (0,01  $\mu$ g/mL) e bloqueador de Fc. Média e desvio de um experimento com triplicata. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

Os resultados da figura 17 mostram que quando bloqueamos os receptores Fc (CD16 e CD32) dos macrófagos o índice de infecção permanece igual ao controle (macrófagos sem estímulo). Isso era esperado, já que as formas promastigotas não estão opsonizadas por IgG e portanto não entrariam via FcRs. De forma semelhante, macrófagos com os receptores Fc bloqueados e estimulados com sCD100 apresentam índice de infecção maior do que o controle e igual ao da condição com sCD100 e sem bloqueio, mostrando que *in vitro* os receptores Fc (CD16 e CD32) dos macrófagos não estão envolvidos no aumento da infecção de promastigotas promovido por sCD100. Esses resultados indicam que ou este aumento deve-se à ligação de sCD100 a seu receptor CD72 presente nos macrófagos ou a outro receptor Fc que não CD16 e CD32.

Para excluir a participação de IgG1 nos efeitos de sCD100 pela ligação a outros receptores Fc que reconhecem IgG1 como o CD64 (Fc $\gamma$ RI), realizamos experimentos de infecção com formas promastigotas na presença de IgG1 humano recombinante e sCD100, como descrito no item 3.23.

Na figura 18 mostramos a infecção de macrófagos por formas promastigotas na presença de sCD100 concomitante ou não com IgG1 humano, na mesma proporção molar que sCD100, por diferentes tempos.



**Figura 18.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago, por 4 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas (D), na ausência de estímulo (controle) ou na presença de 200 ng/mL de sCD100, 70 ng/mL de IgG1 humano e sCD100 + IgG1. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ . Resultado de um experimento representativo de três.

Como podemos observar, IgG1 humano recombinante não afeta o aumento do índice de infecção promovido por sCD100, ou seja, a ligação de IgG1 a receptores Fc do macrófago não interfere no estímulo da infecção por sCD100. Esse experimento demonstra que o aumento da infecção foi causado diretamente pela proteína sCD100, que deve se ligar a um receptor do macrófago distinto dos Fc $\gamma$ Rs e FcRn, provavelmente o CD72.

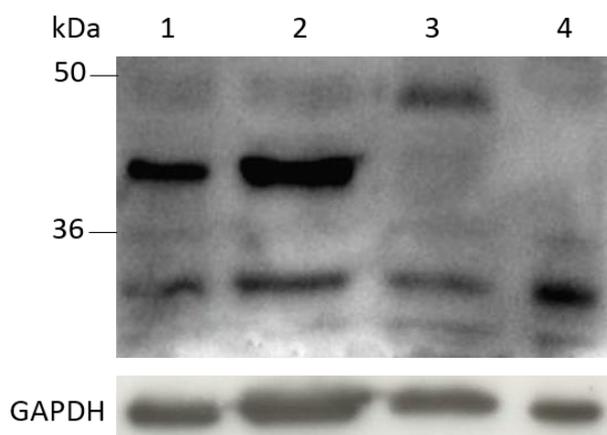
#### 4.9 Expressão de CD72 em macrófagos e seu papel nos efeitos de CD100 solúvel na infecção

CD72 é considerado o principal receptor de CD100 em macrófagos murinos (ISHIDA et al., 2003; KUMANOGOH et al., 2000; SMITH et al., 2011), embora sua expressão não tenha

sido mostrada em macrófagos murinos peritoneais residentes. Para verificar sua expressão em macrófagos peritoneais realizamos Western blot e Imunofluorescência para CD72 em macrófagos de camundongos BALB/c como descrito no item 3.20 e 3.16 respectivamente.

A figura 19 mostra o reconhecimento da banda de aproximadamente 45 kDa correspondente ao CD72 murino, e da banda de aproximadamente 36 kDa do GAPDH.

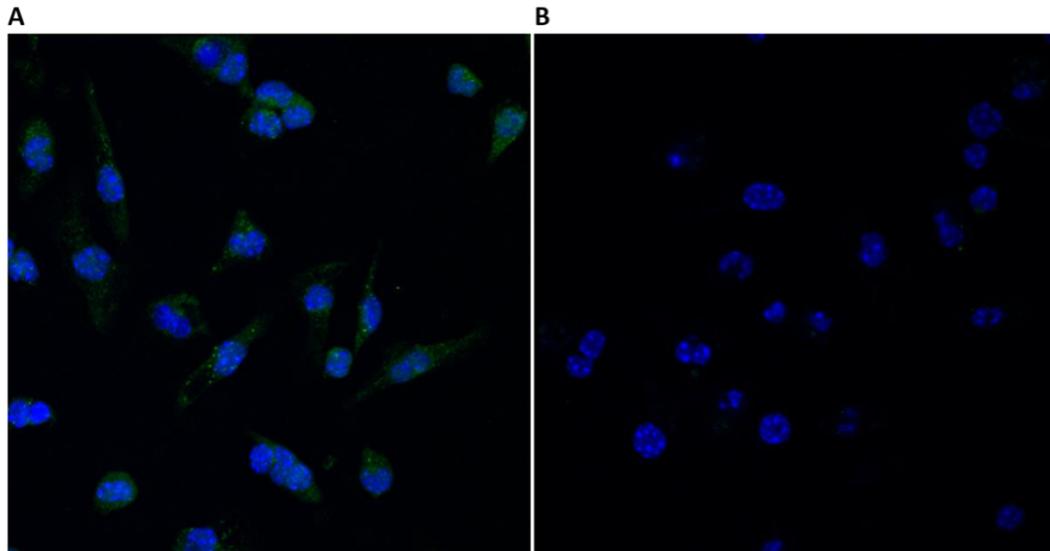
De acordo com a descrição do anticorpo comercial (CD72 H-96: sc – 1707, Santa Cruz Biotechnology) células 293T HEK transfetadas com CD72 de camundongo expressam duas bandas correspondentes ao CD72, o que pode explicar a banda maior, vista na canaleta do lisado de baço murino (3). O controle negativo não apresenta marcação de nenhuma das duas bandas consideradas CD72, apenas bandas abaixo de 36 KDa, consideradas por nós como inespecíficas.



**Figura 19.** Western blot para CD72 e GAPDH em extrato proteico solúvel de macrófago peritoneal de BALB/c (1), de macrófago peritoneal estimulado com 200 ng/mL de sCD100 por 5 minutos (2), de células de baço de BALB/c (3) e de célula L929 (controle negativo – 4). Foram utilizados 30 ug de cada extrato em SDS-PAGE 10%.

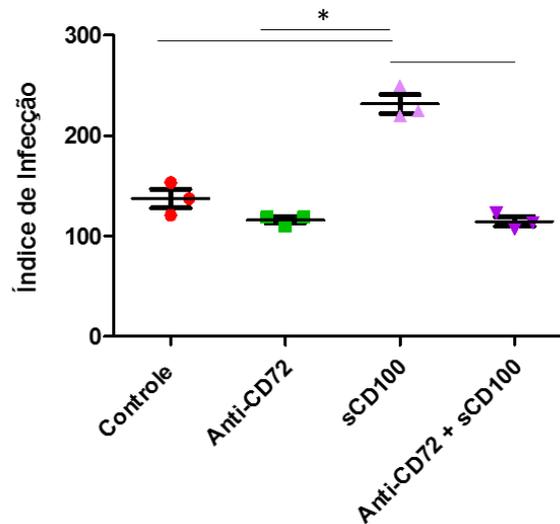
Após densitometria e normalização com GAPDH obtivemos razões CD72/GAPDH semelhantes entre macrófagos peritoneais estimulados e não estimulados com sCD100. A razão foi menor para esplenócitos, o que é de se esperar considerando a heterogeneidade de células nesse órgão, parte das quais não expressa CD72.

Analizamos também a marcação de CD72 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c por Imunofluorescência, e nossos dados confirmam a presença do receptor também por essa técnica, como mostrado na figura 20.



**Figura 20.** Imunofluorescência para CD72 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. (A) Incubação com anticorpo primário anti-CD72, secundário anti-Rabbit Alexa flúor 488 e DAPI, (B) controle contendo anticorpo secundário anti-Rabbit Alexa flúor 488 e DAPI. Microscópio confocal, aumento de 63x, 1.0 de zoom.

Como as técnicas de Western blot e Imunofluorescência confirmaram a expressão de CD72 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, analisamos se o bloqueio desse receptor pela pré-incubação com anti-CD72 anularia o aumento da infecção promovido por sCD100 (procedimento descrito no item 3.24). Os dados são mostrados a seguir na figura 21.



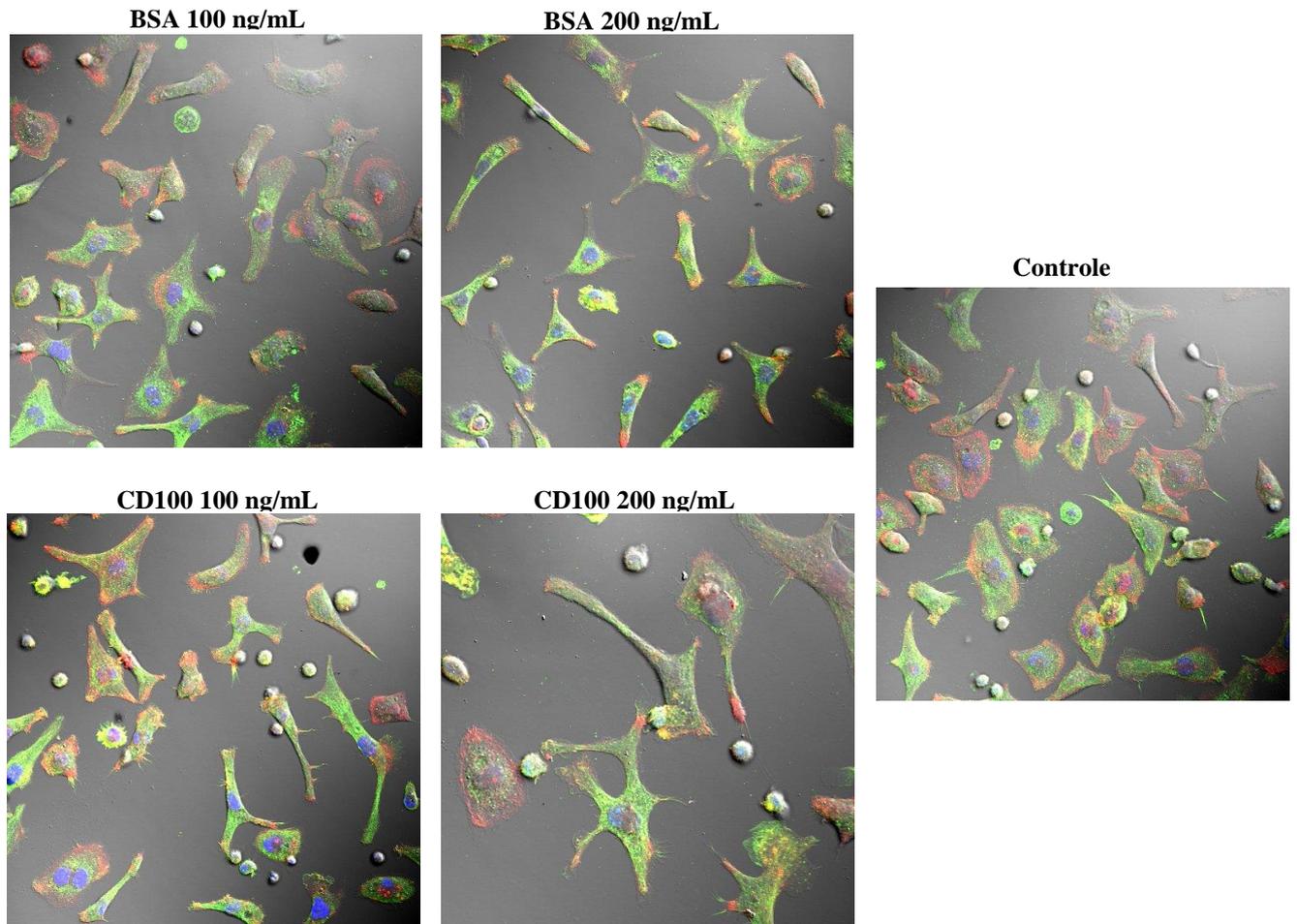
**Figura 21.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c na presença ou não de sCD100, precedida ou não de pré-incubação com anti-CD72. Macrófagos infectados sem estímulo (controle), na presença de anti-CD72 (Anti-CD72), na presença de sCD100 (sCD100) ou pré-incubados com anti-CD72 e posteriormente com sCD100 (Anti-CD72+sCD100) no período de 48 horas. Média e desvio de um experimento com triplicatas. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

Nossos resultados mostram que o bloqueio de CD72 anulou o aumento de infecção promovido por sCD100 (sCD100 x Anti-CD72+sCD100), indicando que sCD100 aumenta a infecção de *L. (L.) amazonensis* por interagir com seu receptor CD72 presente nos macrófagos peritoneais.

#### 4.10 Efeito de CD100 solúvel sobre o citoesqueleto de macrófagos

Sabendo que sCD100 aumenta a infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais pela ligação a CD72, buscamos analisar os efeitos dessa ligação na célula. Analisamos inicialmente se a proteína modula a conformação do citoesqueleto do macrófago analisando a marcação de actina e tubulina. Nossa hipótese baseou-se no fato de a fagocitose de *Leishmania* envolver alterações no citoesqueleto de actina e na descrição de que CD100 afeta o citoesqueleto de neurônios.

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram plaqueados e estimulados com sCD100 ou BSA durante a noite, e a análise em microscopia confocal é mostrada na figura 22.



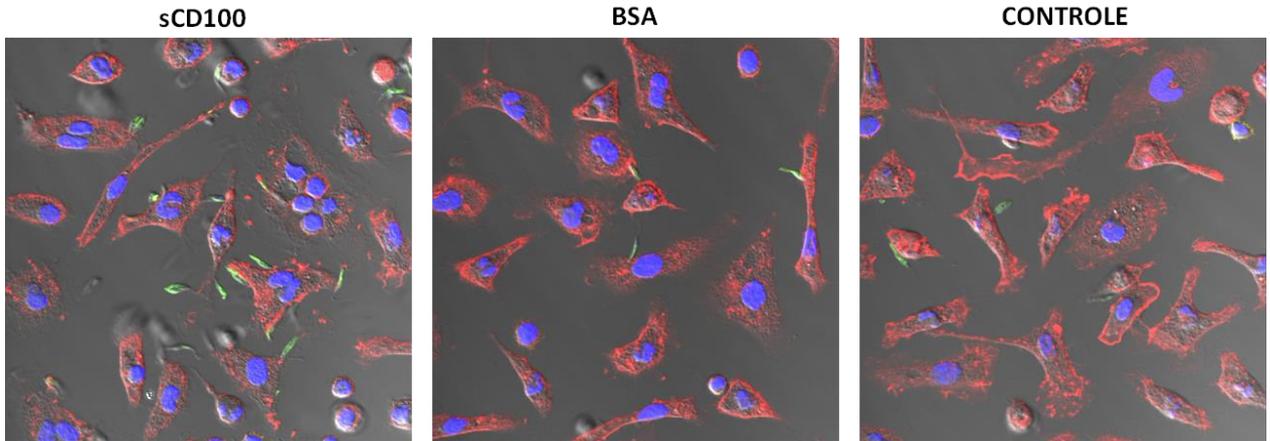
**Figura 22.** Imunofluorescência de macrófagos peritoneais incubados ou não com sCD100 ou BSA durante a noite e corados com Faloidina (marcação vermelha para actina), anticorpo anti-tubulina (marcação tubulina em verde) e DAPI (marcação nuclear em azul). Microscópio confocal, aumento de 63x, 1.0 de zoom.

Análises de vários campos mostraram que o macrófago sob estímulo de sCD100 tem a distribuição de tubulina e actina semelhante à do incubado com BSA e à do controle não estimulado. Como essa análise foi feita em macrófagos não infectados, não podemos descartar que sCD100 afete o citoesqueleto de macrófagos durante o processo de fagocitose ou infecção.

#### **4.11 Participação de CD100 solúvel na fagocitose de *L. (L.) amazonensis* e na polimerização de actina**

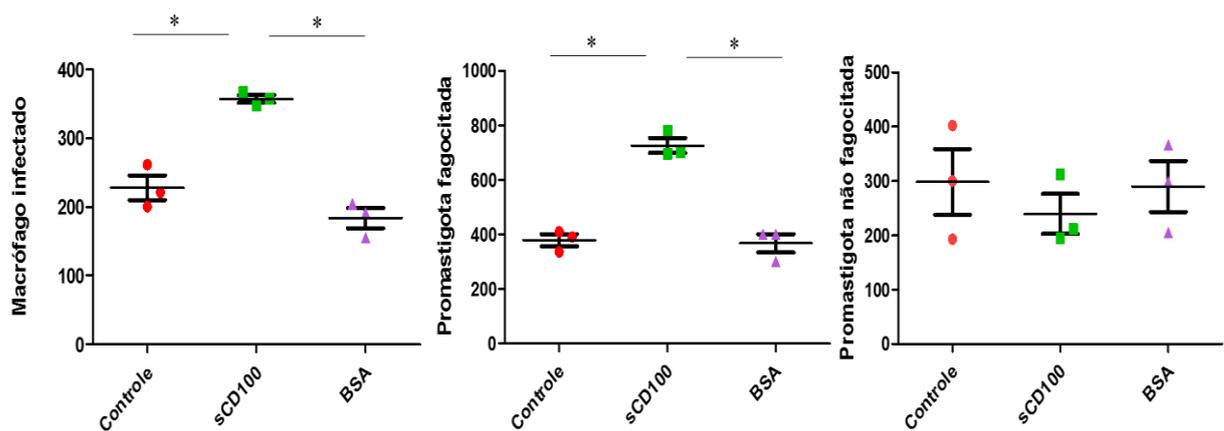
Para avaliar se sCD100 promove alterações de citoesqueleto durante a infecção, analisamos ao mesmo tempo se essa molécula afeta o processo inicial de fagocitose, ou seja, os primeiros minutos de contato entre macrófago e o parasita, e a conformação da actina da célula hospedeira. Para isso, mantivemos as formas promastigotas em contato com o macrófago durante apenas 5 minutos, após este período elas foram lavadas, fixadas e marcadas. Os parasitas aderidos mas não internalizados foram visualizados pelas marcações fluorescentes em

verde e azul (anti-*Leishmania* e DAPI), e os internalizados pela marcação apenas em azul (DAPI). A actina polimerizada (F-actina) é mostrada em vermelho. Uma imagem representativa desse ensaio é mostrada na figura 23.



**Figura 23.** Imunofluorescência para análise da fagocitose de formas promastigotas por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Verde: *Leishmania* (primário anti-*Leishmania*; secundário anti mouse alexa flúor 488), Vermelho: actina (marcação com Faloidina), azul: DNA nuclear e do cnetoplasto (DAPI). Microscópio confocal, aumento de 63x, 1.0 de zoom.

Após análise de vários campos, em três experimentos independentes com triplicatas, não observamos nenhuma mudança na polimerização de actina em macrófagos estimulados com sCD100 e infectados. A fagocitose foi avaliada de forma quantitativa, e os dados de três experimentos são apresentados na figura 24.



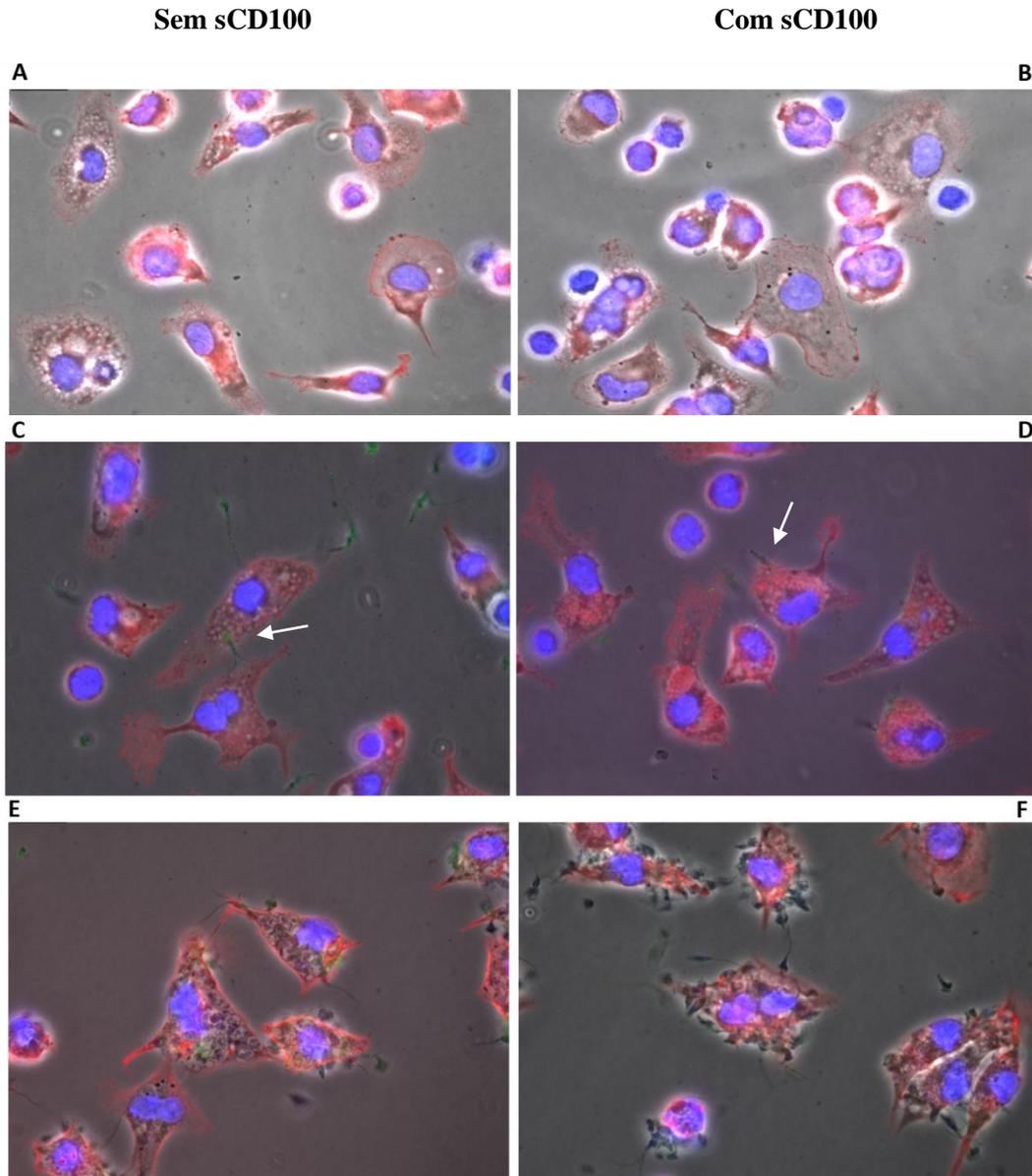
**Figura 24.** Análise quantitativa de fagocitose por imunofluorescência. Número de macrófagos de camundongos BALB/c infectados (em 500 contados), promastigotas fora (não fagocitadas) e dentro (fagocitadas) desses macrófagos. Média de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. \*:  $p \leq 0,05$ .

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que sCD100 aumenta não apenas o número de macrófagos infectados, mas também o número de promastigotas internalizados, indicando que a modulação da infecção por sCD100 acontece nos períodos iniciais a fagocitose.

A ausência de alteração de F-actina na presença de sCD100, estímulo que aumenta a fagocitose de *L. (L.) amazonensis*, é contrária a dados da literatura que mostram que a infecção de macrófagos por *L. (L.) donovani* está associada à polimerização de actina nessa célula (ROY et al., 2014), e que a redução de F-actina diminui a infecção por *L. (L.) donovani* (ROY et al., 2014) e *L. (V.) braziliensis* (AZEVEDO et al., 2012).

Para infecções por *L. (L.) amazonensis* foi mostrado que a fagocitose de formas metacíclicas leva de 3 a 9 minutos, e que 40 a 55% dos metacíclicos são circundados por F-actina após 10 minutos (COURRET et al., 2002). Não estamos analisando fagocitose de metacíclicos mas sim de uma população mista de fase estacionária, mas é possível que 5 minutos seja um tempo muito curto de contato com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* para induzir alterações de F-actina.

Realizamos então experimentos para analisar se a polimerização de actina é modulada quando o macrófago é cultivado com sCD100 em 5 minutos e 4 horas de contato parasita-macrófago. Na figura 25 mostramos imagens representativas por microscopia confocal da imunofluorescência realizada com macrófagos estimulados ou não com sCD100, infectados ou não por *L. (L.) amazonensis* e marcados com Faloidina Texas Red evidenciando a distribuição de F-actina (polimerizada). A análise de vários campos nos mostrou que a distribuição de F-actina é semelhante quando macrófagos são estimulados ou não com sCD100, infectados ou não. Uma observação importante é que após 4 horas de infecção existem muitas formas promastigotas ainda aderidas aos macrófagos estimulados com sCD100 (figura 25 F), sugerindo que esses macrófagos ainda estão fagocitando parasitas.



**Figura 25.** Imunofluorescência para análise da polimerização de actina em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. (A, C, E) macrófagos não estimulados; (B, D, F) macrófago estimulados com 200 ng/ml de sCD100; (A, B) macrófagos não infectados ou (C, D) infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por 5 minutos ou (E, F) 4 horas. Verde: *Leishmania* (primário anti-*Leishmania*; secundário anti mouse alexa flúor 488), Vermelho: actina (marcação com Faloidina), azul: DNA nuclear e do cnetoplasto (DAPI). Microscópio confocal, aumento de 63x, 1.0 de zoom.

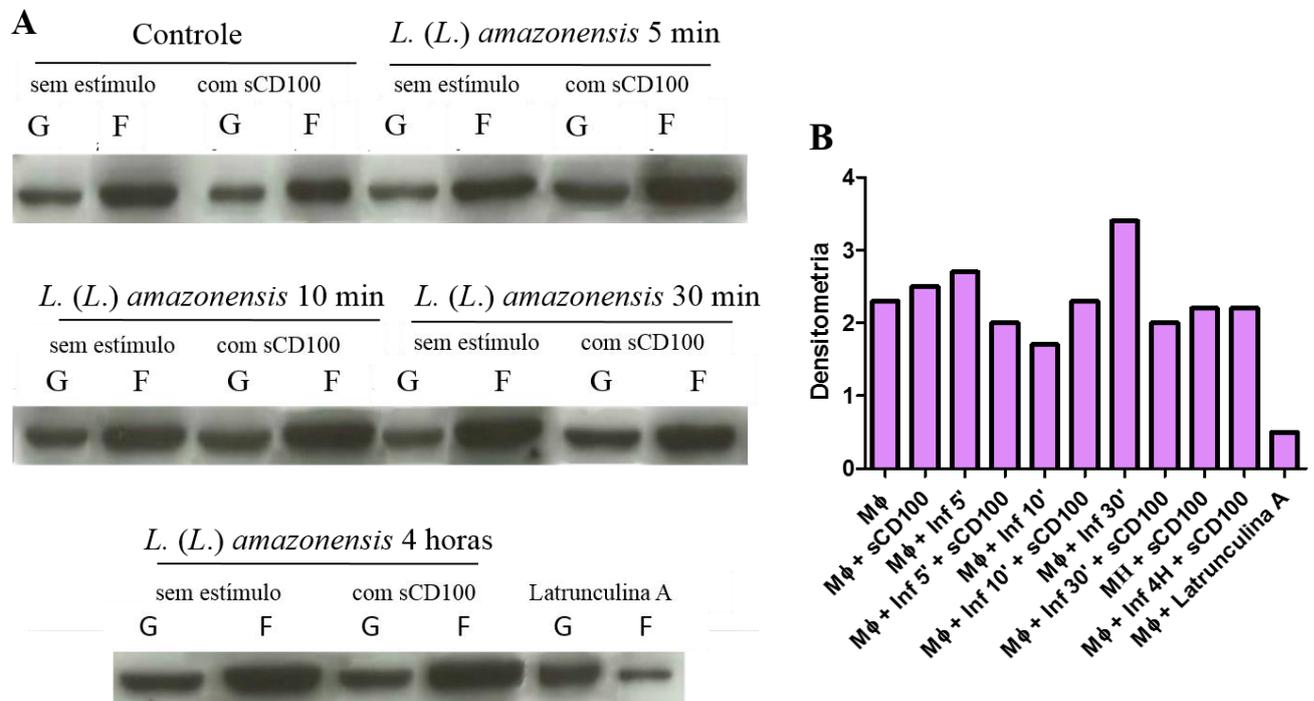
Considerando que pequenas diferenças de F-actina podem não ser visíveis por imunofluorescência, realizamos experimentos de *Western blot* para avaliar quantitativamente a polimerização de actina em macrófagos estimulados ou não com sCD100 e infectados. Esse experimento baseia-se na separação entre F-actina (insolúvel) e G-actina (solúvel) por centrifugação, seguida de *Western blot* para actina nas duas frações. Como controle negativo de polimerização de actina os macrófagos foram tratados com Latrunculina A, uma toxina

extraída da esponja do mar vermelho *Latrunculia magnifica* que é capaz de bloquear a polimerização de actina (OLIVEIRA et al., 1996).

Para esses experimentos utilizamos macrófagos derivados de células da medula óssea porque foi utilizada uma metodologia (item 3.19) já padronizada com esses macrófagos em colaboração com o Prof. Dr. Mauro Cortez.

A figura 26 mostra um de três experimentos com mesmo padrão. Observa-se que na maioria das condições a razão entre F e G actina está em torno de 2, e que não existe diferença nessa razão quando os macrófagos são estimulados ou não com sCD100, ou seja, sCD100 não altera a polimerização de actina na presença ou ausência de *L. (L.) amazonensis* (figura 26B). O controle com Latrunculina A apresentou razão F/G actina de 0,5 ao invés de 2, mostrando que a separação de actina solúvel e insolúvel foi feita com eficiência por esse protocolo.

Sendo assim, podemos concluir que a proteína sCD100 não modula a conformação do citoesqueleto do macrófago ou polimerização de actina, nas condições testadas, para facilitar a entrada das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e consequentemente aumentar o índice de infecção e fagocitose dos macrófagos. Outro mecanismo deve ser induzido após a ligação de sCD100 a CD72 associado ao aumento da fagocitose.



**Figura 26.** A-Western blot para marcação de actina em extrato solúvel e insolúvel de macrófago de medula óssea estimulado ou não com sCD100, não infectado ou infectado com *L. (L.) amazonensis* na proporção 10:1, durante 5, 10, 30 minutos ou 4 horas. Actina solúvel/sobrenadante (G), actina polimerizada/pellet (F) B- Razão F/G actina com base na densitometria das bandas analisadas em A. Experimento representativo de três.

#### 4.12 Fosforilação de ERK em macrófagos estimulados com CD100 solúvel e infectados por *L. (L.) amazonensis*

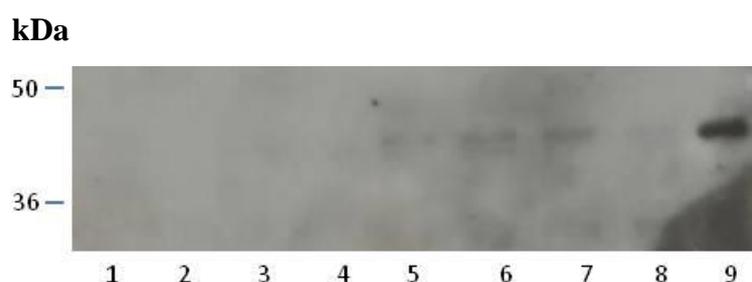
A participação de quinases e fosfatases na fagocitose de *Leishmania* foi estudada em diversos trabalhos, a maioria deles com *L. (L.) donovani*. As três famílias de MAP quinases (ERK1/2, p38, e JNK) não são fosforiladas (induzidas) quando *L. (L.) donovani* é fagocitada por macrófagos (OLIVIER et al., 2005). JAK2 e ERKs 1 e 2 são fosforiladas em resposta a  $\text{INF}\gamma$ , e essa ativação é inibida por infecção prévia por *L. (L.) donovani* (FORGET et al., 2006). A desfosforilação e conseqüente inativação de JAK2 e ERK1/2 é feita pela tirosina fosfatase SHP1, induzida pelo parasita, e leva à inibição da síntese de NO (FORGET et al., 2005; FORGET et al., 2006; OLIVIER et al., 2005).

Macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* parecem sofrer o mesmo tipo de inativação descrito para *L. (L.) donovani*. Macrófagos estimulados com LPS e infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* desfosforilam ERK (MARTINY et al., 1999). Macrófagos infectados com promastigotas de fase estacionária e amastigotas axênicos dessa espécie de *Leishmania* também não apresentaram fosforilação e ativação de ERK (YANG et al., 2007). Coerentemente, foi visto que a infecção com promastigotas e amastigotas de *L. (L.) mexicana* aumenta a atividade da fosfatase SHP1 (ABU-DAYYEH et al., 2010).

Interessantemente, fosfatases também participam da sinalização por CD100. As vias desencadeadas pela ligação de CD100 a CD72 foram estudadas em linfócitos B, nos quais foi mostrado que a ligação de CD100 leva ao bloqueio da fosforilação de CD72 e do recrutamento de SHP1 (KIKUTANI; KUMANOGOH, 2003). A SHP-1 induz desfosforilação em tirosinas e inativação de várias proteínas sinalizadoras (revisado em KUMANOGOH, 2001). Já foi sugerido que a SHP1 liberada do CD72 sofre um dobramento em uma conformação inativa (ZHU, 2007), embora isso não tenha sido claramente mostrado. Não sabemos se o mesmo processo ocorre em macrófagos, mas caso isso ocorra é possível que a ligação de CD100 a CD72 interfira na infecção por *Leishmania* por liberar uma fosfatase SHP1 ativa ou inativa, que tem maior ou menor capacidade de desfosforilar proteínas como ERK 1 e 2, sabidamente importantes para controlar a infecção por *Leishmania*, como já discutido.

Para testar se CD100 afetava a fosforilação de ERK, analisamos pERK em macrófagos peritoneais sob diferentes estímulos/condições: estimulado com sCD100, com  $\text{INF}\gamma$  ou com ambos, infectado com *L. (L.) amazonensis* na presença ou não de sCD100,  $\text{INF}\gamma$  ou ambos (item 3.21). Já foi mostrado que ERK está parcialmente fosforilado em macrófagos peritoneais (ARAUJO-SANTOS et al., 2010), e que estímulos como LPS e  $\text{INF}\gamma$  aumentam essa

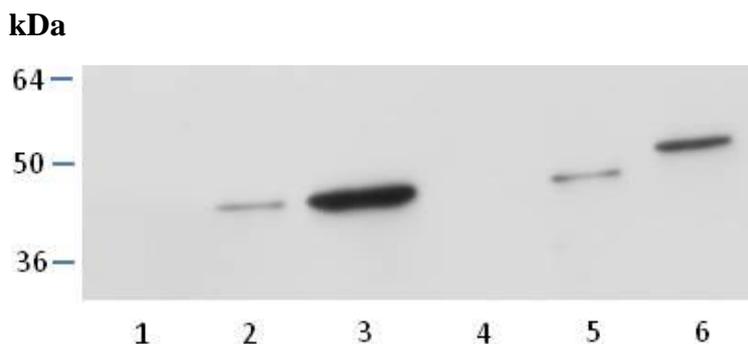
fosforilação. Nesse experimento usamos  $\text{INF}\gamma$  como estímulo ativador da fosforilação de ERK, e como controle positivo foi usada uma linhagem de carcinoma de tireóide que tem ERK constantemente fosforilado, gentilmente cedida pela Profa. Edna Kimura. Os resultados são mostrados na figura 27.



**Figura 27.** Western blot para pERK em macrófagos de camundongos BALB/c estimulados e/ou infectados. Anticorpo primário anti-pERK, secundário anti-mouse HRP. 1. Macrófago, 2. Macrófago + sCD100, 3. Macrófago +  $\text{INF}\gamma$ , 4. Macrófago + sCD100 +  $\text{INF}\gamma$ , 5. Macrófago infectado, 6. Macrófago infectado + sCD100, 7. Macrófago infectado +  $\text{INF}\gamma$ , 8. Macrófago infectado + sCD100 +  $\text{INF}\gamma$ , 9. Célula BCPAP.

O Western blot da figura 27 mostrou fosforilação de ERK apenas nos macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e no controle positivo. Ao contrário do esperado, não observamos fosforilação dessa quinase nos macrófagos estimulados com  $\text{INF}\gamma$ , o que nos levou a questionar a eficiência da ativação por essa citocina ou detecção de pERK em nossas condições experimentais. O controle positivo mostrou uma intensa banda no tamanho esperado de aproximadamente 44 kDa.

Visto que apenas as células infectadas por *L. (L.) amazonensis* mostraram fosforilação de ERK, e sabendo que *Trypanosoma cruzi* fosforila ERK, que é reconhecida pelo mesmo anticorpo anti-ERK murina (MATTOS et al., 2012), analisamos a fosforilação de ERK em extratos de promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em paralelo com extratos de macrófagos. Os resultados são mostrados na figura 28.



**Figura 28.** Western blot para pERK em macrófagos de camundongos BALB/c estimulados e/ou infectados, e em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Anticorpo primário anti-pERK, secundário anti-rabbit HRP. 1. amastigota isolada de lesão de camundongo, 2. amastigota isolada de Macrófago, 3. Promastigota, 4. Macrófago +  $\text{INF}\gamma$ , 5. Macrófago infectado, 6. célula BCPAP.

Embora haja defeitos de migração das amostras no gel usado para o Western blot, os resultados nos permitem constatar que apenas os macrófagos infectados por *L. (L.) amazonensis* e as formas promastigota e amastigota isolada de macrófagos fosforilam ERK. Curiosamente observamos a fosforilação em amastigotas de macrófagos infectados *in vitro*, mas não em amastigotas isolados de lesão. Isso sugere que provavelmente as marcações de pERK observadas em macrófagos infectados são da fosforilação de ERK de *Leishmania* ou da soma da pERK do macrófago e do parasita.

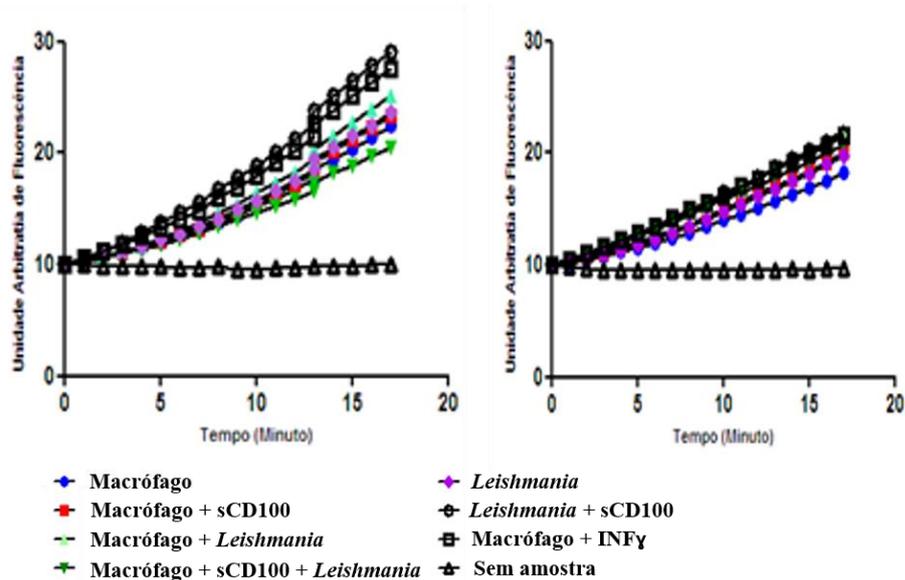
A dificuldade de se distinguir a fosforilação de ERK do macrófago e do parasita e o fato de não observarmos fosforilação (possivelmente por um baixo nível de detecção) na ausência de infecção nos levaram a abandonar a análise do efeito de sCD100 sobre esse processo.

#### **4.13 Atividade tirosina fosfatase em macrófagos estimulados com CD100 solúvel e infectados por *L. (L.) amazonensis***

Como a infecção por *L. (L.) donovani* causa um aumento da atividade tirosina fosfatase associada à desfosforilação de diversas proteínas (FORGET, 2006; OLIVIER, 2005), decidimos avaliar essa atividade após a infecção por *L. (L.) amazonensis* e averiguar se sCD100 acentuaria esse processo.

Para avaliar se sCD100 e a infecção por *L. (L.) amazonensis* modulariam a atividade de tirosina fosfatases do macrófago, realizamos três experimentos partindo de extratos de três infecções independentes, como descrito no item 3.28. Os controles incluídos foram: reações com amostra mas sem substrato (OMFP), reações apenas com substrato, com amostra, substrato e com inibidor de tirosina fosfatase ( $\text{Na}_2\text{VO}_4$ ) e sem amostra. Todos esses controles não

apresentaram atividade mensurável. Analisamos a atividade ao longo de 20 minutos, e os resultados são apresentados na figura 29.



**Figura 29.** Atividade tirosina fosfatase em extratos de macrófagos e de *L. (L.) amazonensis*.

Como mostrado na figura, a infecção por *L. (L.) amazonensis* não mudou a atividade tirosina fosfatase dos macrófagos. Parasitas e macrófagos, estimulados ou não, apresentaram atividade semelhante. Esses dados não corroboram nossa hipótese de que a infecção e a ligação de sCD100 ao macrófago aumentariam a atividade de fosfatase. É possível que a liberação de SHP1 (ativa ou não) promovida pela ligação de CD100 a CD72 seja muito pequena frente a outras fosfatases do macrófago, não alterando a atividade total da célula. De fato, várias tirosina fosfatases do macrófago são moduladas pelo parasita além da SHP1, entre elas PTP1B e TCPTP (GOMEZ et al., 2010). Além disso, a própria *Leishmania* tem atividade fosfatase, como já mostrado na literatura (revisado em SZOOR, 2010) e em nossos resultados (figura 28). Como os extratos de macrófagos infectados contêm tirosina fosfatases da célula hospedeira e do parasita, mudanças sutis induzidas por sCD100 provavelmente não seriam notadas.

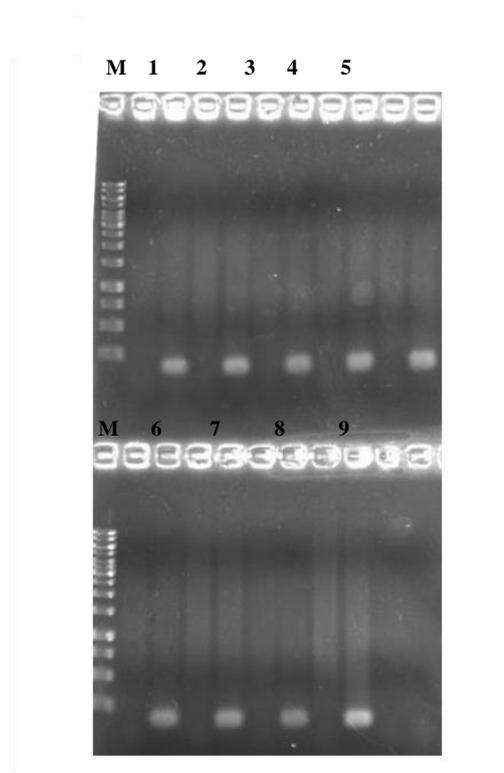
#### 4.14 Infecções de macrófagos e camundongos C57BL/6 nocautes para CD100

Até o momento analisamos os efeitos de CD100 exógeno solúvel sobre a fagocitose, infecção e fosforilação de ERK e atividade fosfatase. A fim de sabermos o efeito de CD100 endógeno do macrófago sobre a infecção *in vitro* e o efeito de CD100 sistêmico sobre o

desenvolvimento de lesões em camundongos, realizamos experimentos com camundongos nocaute para CD100.

Camundongos C57BL/6 nocautes para CD100 foram gerados a partir de uma mutação nula no locus CD100 (SHI, 2000). Fêmeas e machos nocautes desenvolvem-se normalmente, mas possuem deficiências no sistema imune que resultam em falhas no desenvolvimento de linfócitos B1 (diminuição do número na cavidade peritoneal e no baço), *in vitro* a resposta proliferativa e a produção de imunoglobulina em linfócitos B diminui, as respostas humorais a antígenos T dependentes e priming de linfócitos T *in vivo* também são falhos, demonstrando que a interação CD100-CD72 é essencial nesse sistema. Análises macroscópicas e histológicas não mostraram defeitos no cérebro, rim e coração, nem movimentos e posturas anormais (SHI, 2000).

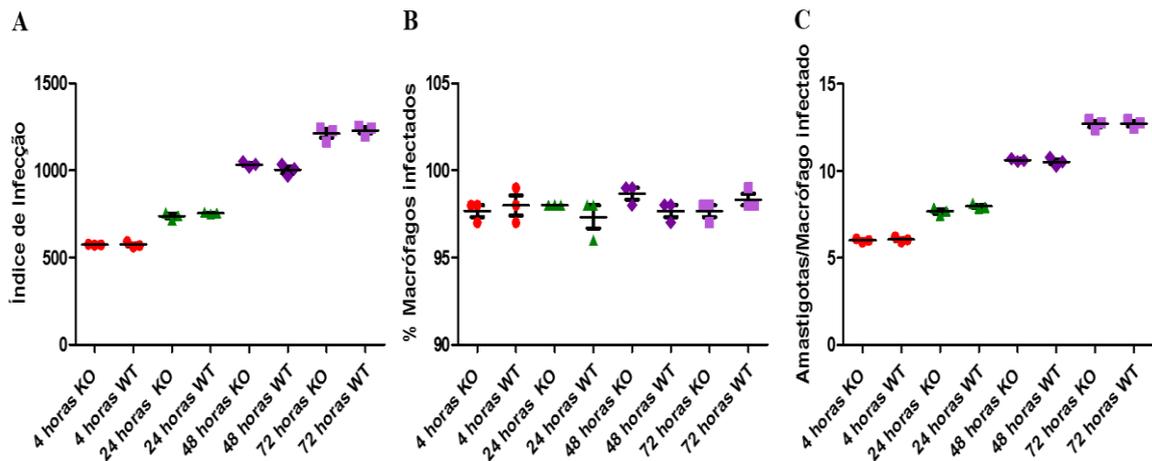
Casais de camundongos C57BL/6 heterozigotos (+/-) para CD100 foram gentilmente cedidos pela Dra. Laurence Brass da Universidade da Pennsylvania. Esses animais foram mantidos em nosso biotério onde foram realizados cruzamentos para produção de gerações homozigotas nocaute. A triagem dos filhotes foi feita por PCR de DNA da cauda. A figura 30 mostra o padrão de PCR correspondente a nove animais homozigotos nocaute, que apresentaram amplificação da região correspondente ao gene alterado (segunda canaleta de cada amostra) mas não correspondente ao gene selvagem (primeira canaleta de cada amostra).



**Figura 30.** Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. M: Marcador; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9: animais analisados, 1ª canaleta de cada amostra: amplificação do gene CD100 selvagem, 2ª canaleta: amplificação do gene CD100 mutado.

A partir da triagem, foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia apenas animais C57BL/6 homocigotos nocautes para CD100. Dispondo de animais nocaute para o gene de CD100, avaliamos o efeito de CD100 endógeno no índice de infecção *in vitro* comparando a infecção de macrófagos de animais C57BL/6 nocautes para CD100 e animais selvagens.

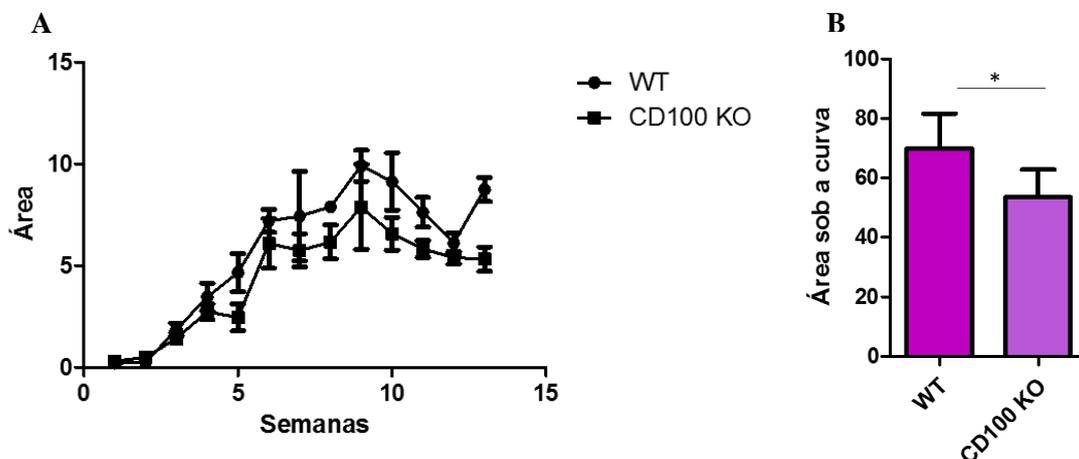
Ao avaliar CD100 endógeno do macrófago, temos que considerar tanto sua forma de membrana quanto solúvel. Inicialmente acreditou-se que CD100 na membrana poderia funcionar como receptor e sinalizar por seu domínio citoplasmático, pois seu *crosslinking* usando anticorpos resultou em proliferação de células T e porque sua região citoplasmática está associada com serina/ treonina quinases (KUMANOGO, 2001). Ainda assim, quase todos os trabalhos até hoje mostraram o efeito de CD100 (solúvel ou de membrana) sobre uma célula que expressa um de seus receptores. Além disso, foi mostrado que a fosforilação da porção citoplasmática de CD100 está relacionada com sua clivagem e liberação como sCD100 (ELHABAZI et al., 2001), sugerindo que o papel de CD100 como ligante seja mais importante do que como receptor. Na figura 31 mostramos que o índice de infecção, bem como a porcentagem de células infectadas e de amastigotas por macrófago, são semelhantes entre macrófagos nocautes (KO) e selvagens (WT) infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em diferentes tempos. A semelhança na infecção entre os macrófagos das duas linhagens de camundongo indica que CD100 de membrana não afeta a infecção por *Leishmania* e sugere que a quantidade de CD100 liberada (como sCD100) seja insuficiente para aumentar a infecção dos macrófagos selvagens.



**Figura 31.** Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongo C57BL/6 selvagem (WT) ou CD100 nocaute (KO) com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72 horas. Índice de infecção (A); Porcentagem de macrófagos infectados (B) e Amastigotas por macrófago infectado (C). Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. \*:  $p \leq 0,05$ .

Visto que a infecção *in vitro* de macrófagos nocautes para CD100 por *L. (L.) amazonensis* é semelhante à de macrófagos selvagens, e considerando que CD100 é expresso por diversos tipos celulares, em especial por linfócitos T, o próximo passo foi analisar a infecção *in vivo*.

Camundongos nocautes e selvagens foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* no início da fase estacionária e durante 13 semanas as lesões foram medidas em espessura e largura. O gráfico da figura 32A mostra a progressão da área (espessura x largura) das lesões nas duas linhagens murinas ao longo de 13 semanas, enquanto que o histograma da figura 32B mostra a comparação das áreas sob as curvas para as duas linhagens.



**Figura 32.** Medida das lesões dos camundongos C57BL/6 wild type (WT) e nocaute para CD100 (CD100 KO) infectados com *L. (L.) amazonensis* durante 13 semanas. Área da lesão (A); Área sob a curva do gráfico A (B). Análise estatística utilizada: Test T. Resultado de um experimento com quatro animais. \*:  $p \leq 0,05$

Observamos que camundongos nocaute para CD100 desenvolvem lesões significativamente menores quando infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* comparados aos camundongos selvagens.

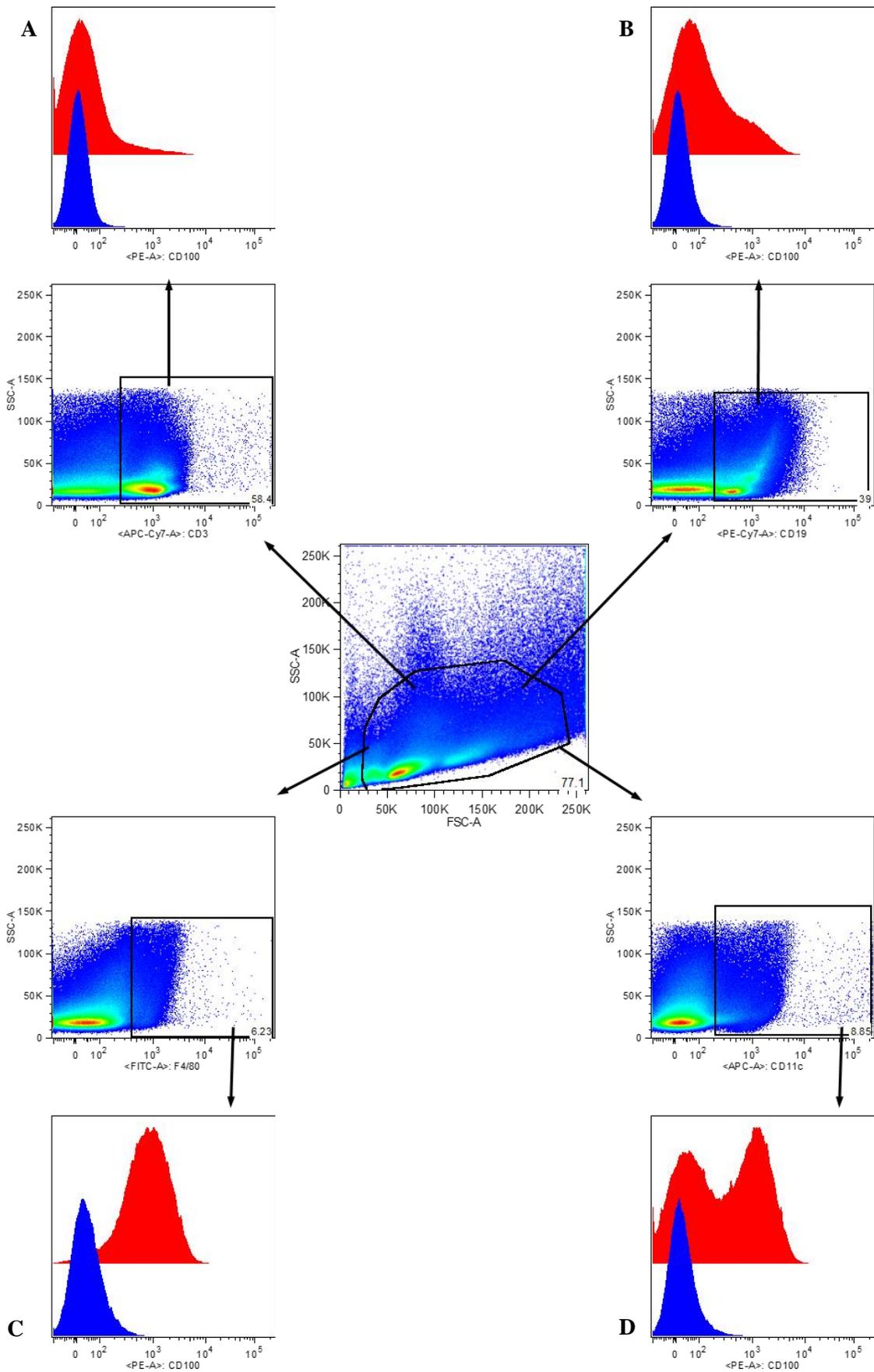
Esses dados mostram que CD100 produzido *in vivo* promove o desenvolvimento de lesões por *L. (L.) amazonensis*, e corroboram os resultados *in vitro* que mostraram aumento da infecção e fagocitose na presença da proteína CD100 solúvel exógena. Resultados mostrados nas figuras 9 e 10 indicaram que de forma geral nem a infecção por *Leishmania* (amastigotas ou promastigotas) nem a fagocitose de zymosan alteraram significativamente os transcritos de CD100. Isso nos leva a pensar que, se CD100 for abundante nas lesões de *L. (L.) amazonensis*, aumentando a infecção, deve ser produzida por outras células ou induzido em macrófagos por outros estímulos que não a entrada do parasita.

#### **4.15 Expressão de CD100 em populações celulares específicas do baço e linfonodo de camundongos C57BL/6**

Considerando que infecções *in vivo* mostraram diferenças entre o desenvolvimento de lesões em animais selvagem e nocaute para CD100, enquanto que a infecção de macrófagos *in vitro* foi semelhante para essas duas linhagens murinas, concluímos que outras células que não macrófagos devem ser as principais responsáveis pela produção de CD100 *in vivo*, afetando a lesão, ou que a produção e liberação de sCD100 é baixa em macrófagos peritoneais mantidos *in vitro*.

Embora diversos trabalhos cite baixa expressão de CD100 em macrófagos, poucos de fato avaliaram isso em termos protéicos (LI, 2009; LUQUE et al, 2013; SIERRA et al., 2008), sendo dois deles em camundongos. Um deles mostrou que macrófagos de tumores murinos produziam CD100 que levava a angiogênese tumoral (SIERRA et al., 2008). O outro avaliou a expressão de CD100 em macrófagos e neutrófilos infiltrantes do rim em lesões glomerulares, ou seja, em condições não fisiológicas. Como nenhum desses trabalhos analisou a expressão de CD100 em macrófagos e outras células que normalmente infiltram as lesões de *Leishmania*, optamos por comparar a abundância de CD100 em macrófagos, linfócitos T, B e células dendríticas.

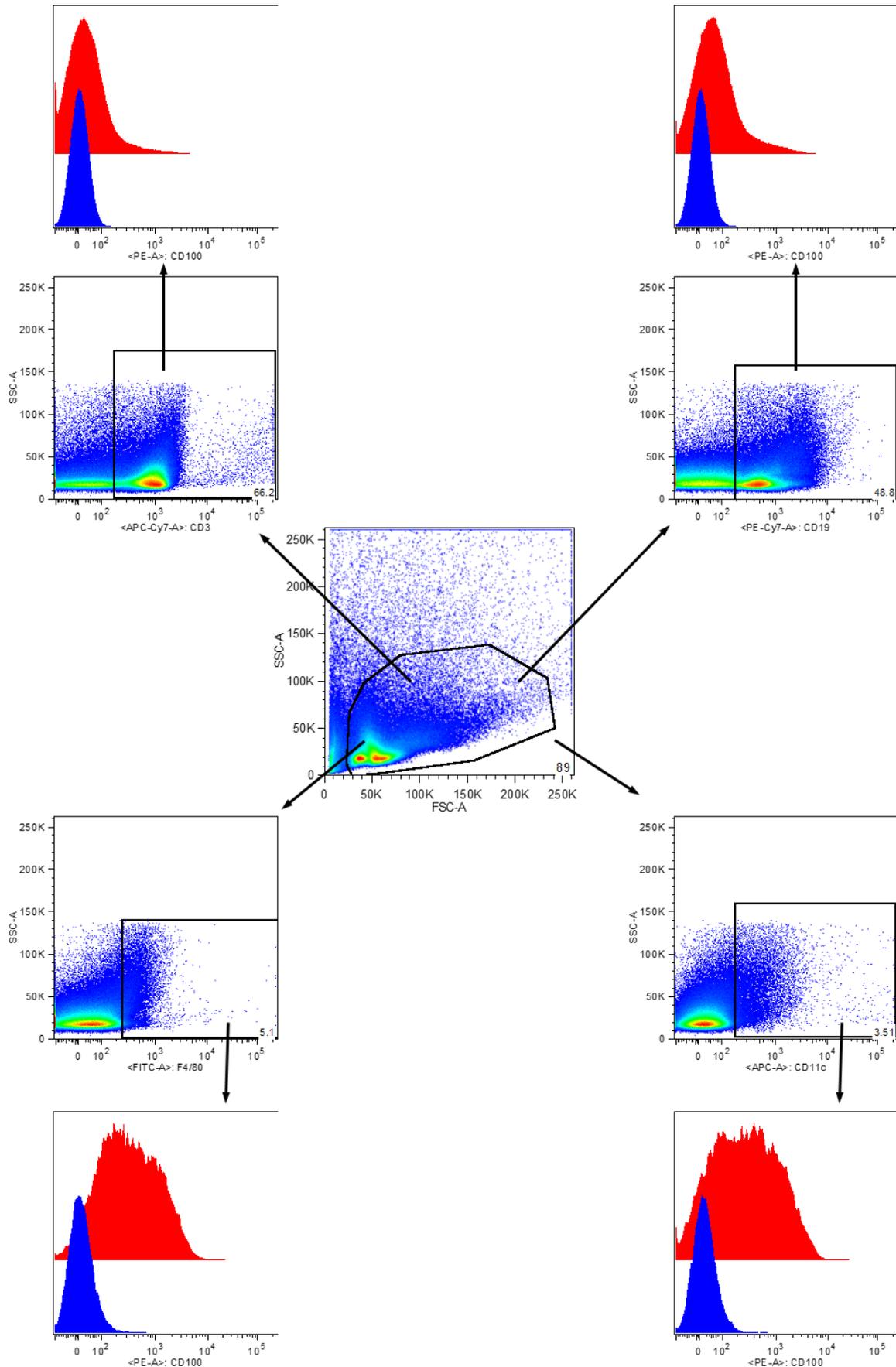
Para isso analisamos células de baço e linfonodo de camundongos C57BL/6 (linhagem dos nocautes de CD100) por citometria de fluxo, uma vez que o anticorpo recomendado para Western blot apresenta marcação tecnicamente insatisfatória (dados do mestrado não mostrados). As análises são mostradas nas figuras seguintes, representativo de 4 animais.



**Figura 33.** Marcação das células do baço de animais C57BL/6. (A) Marcação de células positivas para CD3; (B) células positivas para CD19; (C) células positivas para F4/80; (D) células positivas para CD11c.

De acordo com os dados do FACs, podemos observar que células do baço marcadas positivamente, dentro dos gates selecionados, para F4/80 (macrófagos) figura 33, expressam mais CD100, mediana de 795, quando comparada com as demais células marcadas, CD19 (linfócitos B), mediana 91,6, CD11c (células dendríticas), mediana 32,3, que por sua vez expressam mais CD100 que as células marcadas com CD3 (linfócitos T), com mediana 24,1.

O mesmo foi feito e analisado para células do linfonodo, mostradas na figura 34. Observamos que o perfil de expressão de CD100 nos macrófagos continuam as mesmas quando compradas com as células do baço, onde macrófagos, possuem mediana de 313, expressando mais CD100, do que os linfócitos B, mediana 57,5, as células dendríticas possuindo mediana 274 e os linfócitos T com mediana de 26,7.



**Figura 34.** Marcação das células do linfonodo de animais C57BL/6. (A) Marcação de células positivas para CD3; (B) células positivas para CD19; (C) células positivas para F4/80; (D) células positivas para CD11c.

## **5 CONCLUSÕES**

Nesta tese mostramos pela primeira vez a participação de CD100 na infecção por *Leishmania*. Considerando os resultados apresentados podemos concluir que a proteína CD100 solúvel recombinante aumenta índice de infecção e a fagocitose de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de partículas de Zymosan, mostrando uma modulação na fagocitose não específica apenas para *Leishmania*.

Confirmamos que o efeito de sCD100 sobre a infecção de *Leishmania* depende da interação com seu receptor CD72. Mostramos também que os receptores FcR não participam do aumento da fagocitose das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Embora saibamos que CD100 aumenta a fagocitose, não tivemos ainda sucesso em identificar o processo do macrófago murino que CD100 afeta. Observamos que sCD100 não altera a polimerização de actina, nem a conformação de tubulina da célula, e provavelmente não está relacionado com a fosforilação de ERK1/2 e nem com a ativação da atividade de tirosina fosfatase.

Concluimos que infecções *in vitro* de macrófagos nocautes para CD100 com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* são semelhantes às de macrófagos selvagens, sugerindo que CD100 de membrana não afeta a fagocitose e que a liberação dessa molécula solúvel seja baixa mesmo nos animais selvagens, não levando ao aumento de infecção que observamos anteriormente pelo sCD100 recombinante.

E que o mesmo não é observado *in vivo*, já que as infecções são mais brandas em animais nocautes para a proteína quando comparados aos animais selvagens, o que nos leva a pensar que, se CD100 for abundante nas lesões de *L. (L.) amazonensis*, conseqüentemente aumentando a infecção, a produção de CD100 deve-se resultar por outras células, como os linfócitos B e T, induzido os macrófagos através de seu receptor aumentando a entrada do parasita.

Mesmo não conseguindo desvendar em qual via o CD100 atua para inicializar toda a modulação do macrófago e fazer com que, de alguma forma, o mesmo fique susceptível a infecções ou á aumento na fagocitose, mostramos um interessante papel dessa Semaforina no Sistema Imune em resposta a infecção por *Leishmania*.

## **REFERÊNCIAS\***

---

\* De acordo com:  
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação de documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABU-DAYYEH, I.; HASSANI, K.; EDZE, R.; WESTRA, E. R.; MOTTRAM, J. C.; OLIVIER, M. Comparative study of the ability of *Leishmania Mexicana* promastigotes and Amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2438–2445, 2010.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593–623, 1999.

AFONSO, C. C. L.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, p. 2952-2959, 1993.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.003567.

ALMEIDA, R. S.; AROEIRA, S. T.; FRYMULLER, E.; DIAS, A. A. M.; BOGSAN, B. S. C.; LOPES, D. J.; MARIANO, M. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **The Japanese Society for Immunology**, v. 13, n. 9, p. 1193-1201, 2001.

ARAUJO-SANTOS, T.; PRATES, D. B.; ANDRADE, B. B.; NASCIMENTO, D. O.; CLARENCO, J. et al. *Lutzomyia longipalpis* Saliva Triggers Lipid Body Formation and Prostaglandin E2 Production in Murine Macrophages. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 11, p. 873, 2010. doi:10.1371/journal.pntd.0000873.

AZEVEDO, E.; TEIXEIRA O. L.; KARINA, C. L. A.; TERRA, A.; LOURENÇO D. P. M.; SALERNO, V. P. Interactions between *Leishmania braziliensis* and Macrophages Are Dependent on the Cytoskeleton and Myosin. **Va. J. Parasitol. Res.**, p. 275-436, 2012.

BASILE, J. R.; CASTILHO, R. M.; WILLIAMS, V. P.; GUTKIND, J. S. Semaphorin4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 9017–9022, 2006.

BASILE, J. R.; HOLMBECK, K.; BUGGE, T. H.; GUTKIND, J. S. MT1- MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 6899–6905, 2007.

BATES, P. A. et al. Transmission of *Leishmania metacyclic* promastigotes by phlebotomine and sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

BLACKWELL, J. M. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. **J. Exp. Med.**, v. 1, n. 162, p. 324-331, 1985.

BOSETTO, M. C.; GIORGIO, S. *Leishmania amazonensis*: multiple receptor-ligand interactions are involved in amastigote infection of human dendritic cells. **Exp. Parasitol.**, v. 116, p. 306–310, 2007.

BOUGERET, C. et al. Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. **J. Immunol.**, v. 148, p. 318, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial.** Brasília DF, 2006.

BRITTINGHAM, A. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4477-4484, 1999.

BROWN, D. L. et al. Synthesis and expression of the fibroblast fibronectin receptor in human monocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 366-370, 1989.

CH'NG, E. S.; KUMANOGOH, A. Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression. **Mol. Cancer**, n. 9, p. 251, 2010.

CHABBERT-DE PONNAT, I.; CARDINE, M. A.; PASTERKAMP, J. R.; SCHIAVON, V.; TAMAGNONE, L.; THOMASSET, N.; BENSUSSAN, A.; BOUMSELL, L. Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and Plexin B1, respectively. **International Immunology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2005.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. Role of membrane cholesterol in *Leishmanial* infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 749, p. 201-213, 2012.

CHER, D. J.; MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clone II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **Journal of Immunology**, v. 138, p. 688-694, 1987.

COOK, M., BOLKAN, B. J., KRETZSCHMAR, D. Increased Actin Polymerization and Stabilization Interferes with Neuronal Function and Survival in the AMPKc Mutant Loechrig. **PLoS ONE**, v. 2, p. e89847, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0089847.

COURRET N., et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 2303-2316, 2002.

CULLEY, F. J. et al. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **J. Immunol.**, v. 15, n. 156, p. 4691-4696, 1996.

DA SILVA, R. P. et al. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. **J. Immunol.**, n. 143, p. 617-622, 1989.

DELAIRE, S.; BILLARD, C.; TORDJMAN, R.; et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. **J. Immunol.**, p. 4348, 2001.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives.* Comp. **Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DESCONTEAUX, A. et al. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim. Biophys. Acta.**, p. 1455, 1999.

DOS REMEDIOS, C. G.; CHHABRA, D.; KEKIC, M.; DEDOVA, I. V.; TSUBAKIHARA M.; BERRY, D. A.; NOSWORTHY, N. J. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. **Physiol.**, v. 83, p. 433–473, 2003.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Molecular Innate Immunity**, v. 5, p. 491, 2014.

EHLERS, M. R. CR3: A general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. **Microbes. Infect.**, v. 2, p. 289–294, 2000.

ELHABAZI, A.; DELAIRE, S.; BENSUSSAN, A.; BOUMSELL, L.; BISMUTH, G. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. **J. Immunol.**, p. 4341, 2001.

ELHABAZI, A.; CARDINE, M. A.; CHABBERT, DE PONNAT, I.; BENSUSSAN, A.; BOUMSELL, L. Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 65-81, 2003.

FORGET, G.; MATTE, C.; SIMINOVITCH, K. A.; RIVEST, S.; POULIOT, P.; OLIVIER, M. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. **Eur. J. Immunol.**, v. 6, p.1906-1917, 2005.

FORGET, G.; GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. **Infect. Immun.**, v. 11, p. 6272-6279, 2006.

GABROVSKA, P. N. et al. Semaphorin-plexinsignalling genes associated with human breast tumourigenesis. **Gene**, v. 489, n. 2, p. 63-69, 2011.

GALLO, P. et al. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. **Immunol. Lett.**, n. 133, p. 70–77, 2010.

GALUPPO, M. K. **Análise da atividade de CD100 na modulação da atividade de macrófagos e sua infectividade por *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2012. XX f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-21092012-085336/>> Acesso em: 24 mar. 2015.

GERETTI, E. et al. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 31-9, 2008.

GESSNER, J. E.; HEIKEN, H.; TAMM, A.; SCHMIDT, R. E. The IgG Fc receptor family. **Ann. Hematol.**, v. 76, p. 231-248, 1998.

GIORDANO, S. et al. The Semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. **Nature Cell Biology**, v. 4, 2002. doi:10.1038/ncb843.

GÓMEZ, M. A.; OLIVIER, M. Proteases and phosphatases during *Leishmania*-macrophage interaction Paving the road for pathogenesis. **Virulence**, v. 4, p. 314-318, 2010.

GORDON, S. Mononuclear phagocytes in immune defence. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE. **Immunology**. 8<sup>th</sup> ed. Mosby-Harcourt Publishers, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A.; LAULETTA. Cutaneous and Mucocutaneous *Leishmaniasis*. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, p. 293–307, 2012. doi:10.1016/j.idc.03.001.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. *Leishmaniasis* of the new world: current conceptions and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infect. Immun.**, n. 61, p. 1553–1558, 1993.

HALL, K. T.; BOUMSELL, L.; SCHULTZE, J. L.; BOUSSIOTIS, V. A.; DORFMAN, D. M.; CARDOSO, A. A.; BENSUSSAN, A.; NADLER, L. M.; FREEMAN, G. J. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B cell aggregation and differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, p. 11780 – 11785, 1996.

HEINZEL, P. F. et al. Reciprocal expression of interferon  $\gamma$  or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis evidence for expansion of distinct helper t cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 169, p. 59-72, 1989.

INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, M. V. P.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, L. M.; GOMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. **Infection and Immunity**, p. 6085–6090, 2005.

INIESTA, V.; GOMEZ-NIETO, L. C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELÉN, J.; MIRÓN, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunology**, n. 24, p. 113–118, 2002.

ISHIDA, I.; KUMANOGOH, A.; SUZUKI, K.; AKAHANI, S.; NODA, K. et al. Involvement of CD100, a lymphocyte semaphorin, in the activation of the human immune system via CD72: implications for the regulation of immune and inflammatory responses. **Int. Immunol.**, v. 15, p. 1027-1034, 2003.

IVES, A.; RONET, C.; SCHUTZ, F.; PREVEL, F.; ZANGGER, H.; HICKERSON, S. M.; FASEL, N.; RUZZANTE, G.; REVAZ-BRETON, M.; BEVERLEY, S. M.; MASINA, S.; FUERTES-MARRACO, S.; LON-FYE, L.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, P. *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous *Leishmaniasis*. **Science**, v. 331, 2011.

JI, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, p. 338–345, 2002.

JONES, E. D.; BUXBAUM, U. L.; SCOTT, P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During *Leishmania amazonensis* Infection. **The Journal of Immunology**, p. 364–372, 2000.

KATO, S. et al. Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer. **Cancer Scid.**, v. 102, n. 11, p. 2029-2037, 2011.

KIM, H. R.; CYNTHIA, GALLANT; PAUL, C.; LEAVIS, SUSAN, J.; GUNST; KATHLEEN, G.; MORGAN. Cytoskeletal remodeling in differentiated vascular smooth muscle is actin isoform dependent and stimulus dependent. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 295. p. 768–778, 2008.

KIKUTANI, H.; KUMANOGOH, A. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 159-167, 2003.

KUMANOGOH, A.; KIKUTANI, H. The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation. **Trends Immunology**, v. 22, n. 12, p. 670-676, 2001.

KUMANOGOH, A. et al. Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. **J. Immunol.**, p. 1175, 2002.

KUMANOGOH, A. et al. Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 621-631, 2000.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of *Leishmaniasis* in Latin-America. **Nature**, v. 273, p. 595-600, 1978.

LI, M. et al. Endogenous CD100 promotes glomerular injury and macrophage recruitment in experimental crescentic glomerulonephritis. **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 114-22, 2009.

LUQUE, M. C. A.; GUTIERREZ, P. S.; DEBBAS, V.; PUECH-LEAO, P.; PORTO, G.; COELHO, V.; BOUMSELL, L.; KALIL, J.; STOLF, B. S. Phage display identification of CD100 in atherosclerotic plaque macrophages and foam cell. **Plos One**, v. 8, p. 1-9, 2013.

LUQUE, M. C. A.; GUTIERREZ, P. S.; DEBBAS, V.; KALIL, J.; STOLF, B. S. CD100 and plexins B2 and B1 mediate monocyte-endothelial cell adhesion and might take part in atherogenesis. **Molecular Immunology**, 2015.

MARTINY, A. et al. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania* amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, p. 1–12, 1999.

MATTOS, E. C.; SCHUMACHER, R. I.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 7 p. 46767, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0046767.

MAY, R. C.; CARON, E.; HALL, A.; MACHESKY, L. M. Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3. **Nat. Cell. Biol.**, v. 2, p. 246-248, 2000.

MCCONVILLE et al. The Molecular Basis the molecular pathogens. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 1047–1051, 2007.

MCMAHON-PRATT1 D.; JAMES A. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206–224, 2004.

MILLS, C. D.; KINCAID, K.; ALT J. M.; HEILMAN, M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, p. 6166-6173, 2000.

MILLINGAN, et al. Molecular Structure of F-actin and Location of surface binding sites. **Nature**, v. 348, 1990.

MIZUI, M. et al. Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules. **J. Clin. Immunol.**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2009.

MOREAU-FAUVARQUE, C. et al. The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 27, p. 9229-9239, 2003.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I-Definition according to profiles of lympholine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, p. 2348-2357, 1986.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J. Immunol.**, v. 135, p. 2785–2789, 1985.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature**, v. 3, n. 327, p. 329-331, 1987.

MURRAY, J. P. et al. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and Experimental guidelines. **Immunity**, p. 41, 2014.

NEGISHI-KOGA, T. et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. **Nat. Med.**, v. 17, n. 11, p. 1473-1480, 2011.

NOSWORTHY, N. J. et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. **Physiol. Rev.**, v. 83, p. 433–473, 2003.

NKYIMBENG, T. et al. Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D. **Immunol. Res.**, 2010. Doi: 10.1007/s12026-010-8201-y.

OLIVEIRA, C. A.; KASHMAN, Y.; MANTOVANI, B. Effects of latrunculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associated changes in the F-actin/G-actin content of the cells. **Chem. Biol. Interact.**, p. 141-153, 1996.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 293–305, 2005.

PAN, C. et al. CD72-deficient mice reveal non redundant roles of CD72 in B cell development and activation. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 495-506, 1999.

PETERS, C. et al. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J. Cell. Sci.**, v. 108, p. 3715–3724, 1995.

PIEDRAFITA, D.; PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; XU, D.; SANDS, W.; FENG G. J.; THOMAS, E.; BREWER, J.; FERGUNSON, M. A. J.; ALEXANDER, J.; LIEW, F. Y. Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, 1999.

PIERRE, B. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. **BLOOD**, v. 119, n. 24, 2013.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 1, p. 111–129, 2015.

PUCADYIL, T. J., CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol: a potential therapeutic target in *Leishmania* infection? **Trends. Parasitol.**, v. 23, p. 49–53, 2007.

PUCADYIL, T. J.; TEWARY, P.; MADHUBALA, R.; CHATTOPADHYAY, A. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 133, p. 145–152, 2004.

RAVETCH, J. V.; LUSTER, A. D.; WEINSHANK, R.; KOCHAN, J.; PAVLOVEC, A.; PORTNOY, D. A.; HULMES, J.; PAN, Y. C.; UNKELESS, J. C. Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. **Science**, n. 7, v. 234, p. 718–725, 1986.

RITTIG; BOGDA, C. *Leishmania*–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views M.G. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, 2000.

ROY, S. et al. Integrity of the Actin Cytoskeleton of Host Macrophages is essential for *Leishmania donovani* Infection. *Biochimica et Biophysica. Acta.*, p. 2011-2018, 2014.

RODRIGUEZ, N. E.; GAUR, D. U.; ALLEN, A. H.; WILSON, M. E. Stage-Specific Pathways of *Leishmania infantum chagasi* Entry and Phagosome Maturation in Macrophages. **PLoS ONE**, v. 6, p. e19000, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0019000.

SCOTT, D. W. et al. Role of c-myc and CD45 in spontaneous and anti-receptor-induced apoptosis in adult murine B cells. **Int. Immunol.**, v. 8, n. 9, p. 1375-85, 1996.

SEREZANI, H. C.; PERRELA, H. J.; RUSSO, M.; PETERS-GOLDEN, M.; JANCAR, S. Leukotrienes Are Essential for the Control of *Leishmania amazonensis* Infection and Contribute to Strain Variation in Susceptibility. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3201-3208, 2006.

SHI, W. et al. The class IV semaphorin CD100 plays non redundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. **Immunity**, p. 633, 2000.

SELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, p. 378-387, 1994.

SIERRA, J. R.; CORSO S.; CAIONE, L.; CEPERO, V.; CONROTTO, P.; CIGNETTI, A.; PIACIBELLO, W.; KUMANOGOH, A.; KIKUTANI, H.; COMOGLIO, M. P.; TAMAGNON, L.; GIORDANO, S. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 1673-1685, 2008.

SMITH, E. P. et al. Expression of neuroimmune semaphorins 4A and 4D and their receptors in the lung is enhanced by allergen and vascular endothelial growth factor. **BMC Immunol.**, n. 12, p. 30, 2011.

SOONG, J. et al. Sema4D, the Ligand for Plexin B1, Suppresses c-Met Activation and Migration and Promotes Melanocyte Survival and Growth. **J. Invest. Dermatol.**, v. 132, n. 4, p. 1230-1238, 2011.

STEVENS, T. L.; BOSSIE, A.; SANDERS, V. M.; FERNANDEZ-BOTRAN, R.; COFFMAN, R. L.; MOSMANN, T. R.; VITETTA, E. S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, p. 255-258, 1998.

SZOOR, B. Trypanosomatid protein phosphatases. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.173, p. 53-63, 2010.

SUZUKI, K.; KUMANOGOH, A.; KIKUTAN, H. Mini Review CD100/Sema4D, a lymphocyte semaphorin involved in the regulation of humoral and cellular immune responses. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 17-24, 2003.

TALAMÁS-ROHANA, P. et al. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. **Journal of immunology**, v. 15, n. 144, p. 4817-4824, 1990.

TATSUKI, R. et al. Mast Cells KIT-Mediated Responses in Human CD72 Negatively Regulates. **J. Immunol.**, v. 184, p. 2468-2475, 2010.

TEWARY, P.; VEENA, K.; PUCADYIL, T. J.; CHATTOPADHYAY, A.; MADHUBALA, R. The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized *Leishmania donovani* into macrophages. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 339, p. 661-666, 2006.

TOYOFUKU, T. et al. Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1. **EMBO J.**, v. 26, n. 5, p. 1373-1384, 2007.

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

UNDERHILL; DAVID, M. Macrophage recognition of zymosanparticles. **Journal of Endotoxin Research**, v. 9, p. 176, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis. Fact. sheet.** n. 375. Updated February 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr> 2015>. Acesso: 30 set. 2015.

WU, H. J. et al. CD72, a Coreceptor with Both Positive and Negative Effects on B Lymphocyte Development and Function. **J. Clin. Immunol.**, v. 29, p. 12–21, 2009. doi 10.1007/s10875-008-9264-6.

WYLER, D. J. et al. In vitro parasite-monocyte interactions in human *leishmaniasis*: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infect. Immun.**, v. 49, p. 305–311, 1985.

YANG, Y. H. et al. Plexin-B1 activates NF-kappaB and IL-8 to promote a pro-angiogenic response in endothelial cells. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25826, 2011.

ZHU, L.; BERGMEIER, W.; WU J.; JIANG, H.; STALKER, T. J.; CIESLAK, M.; FAN, R.; BOUMSELL, L.; KUMANOGOH, A.; KIKUTANI, H. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphoring 4D in platelet responses to vascular injury. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, p. 1621 – 1626, 2007.