

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

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.

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.

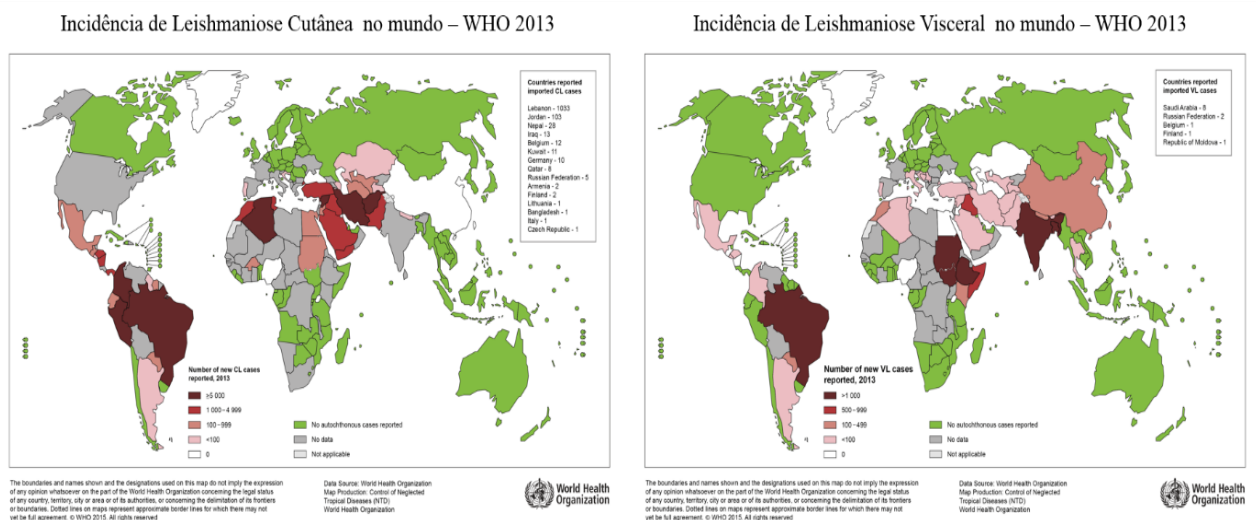


Figura 1. Mapa de incidência de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral no mundo - OMS 2013

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).

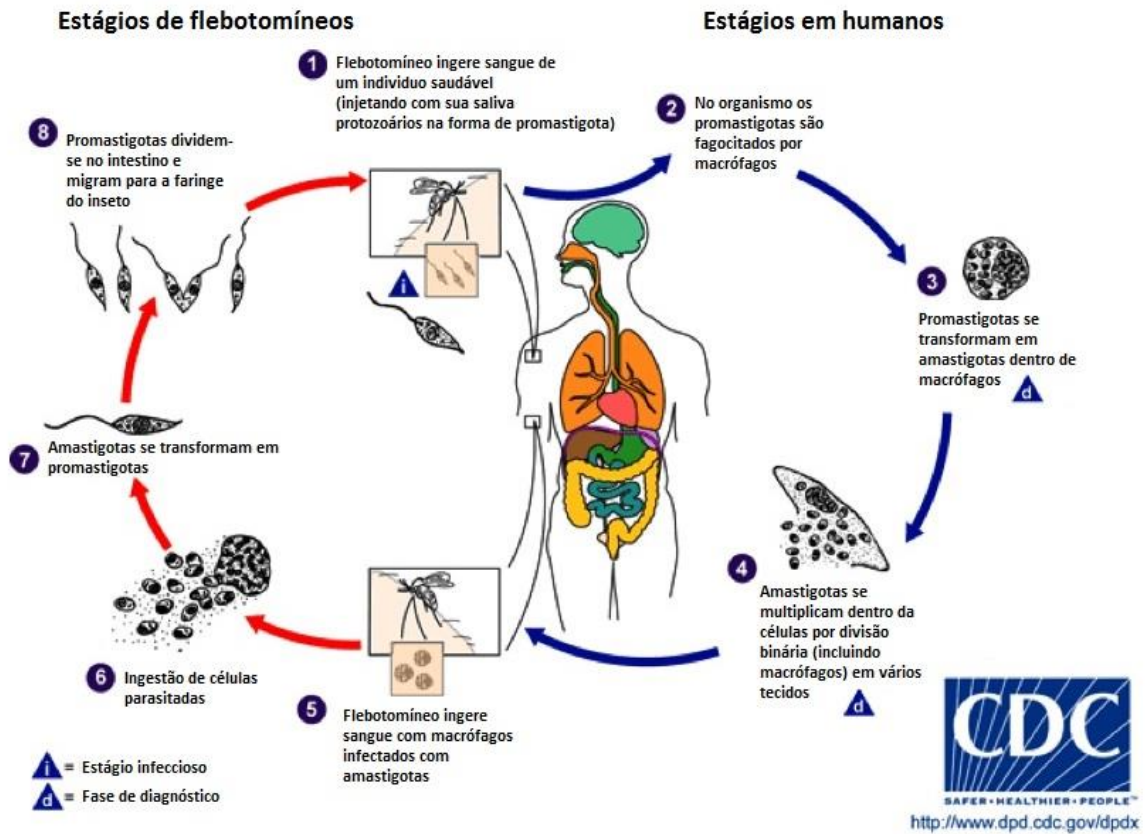


Figura 2. Ciclo de vida heteroxênico da *Leishmania*.

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"> { <i>L. (L.) mexicana</i> { <i>L. (L.) amazonensis</i> { <i>L. (L.) pifanoi</i> { <i>L. (L.) venezuelensis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (L.) major</i> { <i>L. (L.) tropica</i> { <i>L. (L.) aethiopica</i>
	<i>L. (Viannia)</i> subgenus	<ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (V.) braziliensis</i> { <i>L. (V.) peruviana</i> { <i>L. (V.) lansoni</i> { <i>L. (V.) naiff</i> { <i>L. (V.) lansoni</i> { <i>L. (V.) panamensis</i> { <i>L. (V.) guyanensis</i> 	
Diffuse cutaneous	<ul style="list-style-type: none"> <i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) pifanoi</i> 		<i>L. (L.) aethiopica</i>
Mucocutaneous	<i>L. (V.) braziliensis</i>		
Visceral	<i>L. (L.) donovani</i> complex	<ul style="list-style-type: none"> { <i>L. (L.) chagasi</i>* 	<ul style="list-style-type: none"> <i>L. (L.) infantum</i>* <i>L. (L.) donovani</i>

*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 Flebotomíneo 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 - 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 γ (IFN- γ) e aumentam a imunidade mediada por células (CHER; MOSMANN, 1987), pois IFN- γ 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- γ , 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- γ (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- γ 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 α e IL-6, além de quimiocinas que atraem eosinófilos e células T reguladoras. M2c são induzidos por IL-10, TGF- β e glicocorticoides, e também secretam IL-10 e TGF- β , 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 (Fc γ Rs, nomeado Fc γ RII-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 (FcγR), a IgA, receptores Fc-alfa (FcαR), e a IgE, receptores Fc-épsilon (FcεR) (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 FcγRs 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 FcγRs 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 de 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 fosfolípídeos 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; KUMANOGOH, 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 (BIELENBERG; KLAGSBRUN, 2007) e regulação imune (KIKUTANI; KUMANOGOH, 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 (KUMANOGOH; 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; KUMANOGOHO et al., 2000; KUMANOGOHO 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 (KUMANOGOHO 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 (KUMANOGOHO 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 (KUMANOGOHO 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 (CHABBERTDEPONNAT 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- α (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 (KUMANOGOH; 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- β), mas sim por ativação com LPS (SIERRA et al., 2008). Macrófagos de camundongos CD100 nocaute responderam a LPS aumentando a produção de TNF- α (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- α 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 (KUMANOGOH et al., 2000; KUMANOGOH 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.

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*, consequentemente 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*.

REFERÊNCIAS¹

¹ 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**. 8th 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 γ 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.; CARCELÉN, 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.; RNET, 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-PRATT 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 lymphokine 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.

SIELING, 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 inhuman *leishmaniasis*: possible role of fibronectin in parasiteattachment. **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.