MARIANA KOLOS GALUPPO

**Análise da atividade de CD100 na modulação da
ativação de macrófagos e sua infectividade por
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Dissertação 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
Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO
2012**

MARIANA KOLOS GALUPPO

**Análise da atividade de CD100 na modulação da
ativação de macrófagos e sua infectividade por
Leishmania (Leishmania) amazonensis.**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Versão original.

**SÃO PAULO
2012**

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.

Análise da atividade de CD100 na modulação da ativação de macrófagos e sua infectividade por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Mariana Kolos Galuppo. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Modulação da expressão protéica em amastigotas de *Leishmania amazonensis* pela resposta imune do hospedeiro.

Versão do título para o inglês: Analysis of CD100 modulation of macrophage activation and infectivity by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

1. Macrófago 2. CD100/Sema4D 3. *Leishmania amazonensis*
4. Leishmaniose cutânea 5. Camundongo BALB/c e C57BL/6
6. Imunologia I. Stolf, Profa. Dra. Beatriz Simonsen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB044/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana Kolos Galuppo.

Título da Dissertação: Análise da atividade de CD100 na modulação da ativação de macrófagos e sua infectividade por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

Decl. CEUA.014/10

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 001/09/CEUA, datado de 12.01.09 e por solicitação da Profa. Dra. *Beatriz Simonsen Stolf*, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Mariana Kolos Gallupo** ao projeto de pesquisa "Expressão protéica em amastigotas de *leishmania amazonensis*: modulação pela resposta imune de camundongos experimentalmente infectados", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 01 de abril de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador -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.

AGRADECIMENTO

Agradeço inicialmente aos meus pais Haroldo e Catarina, por sempre me apoiarem e continuarem me apoiando em todas as decisões importantes na minha vida, até mesmo tendo que mudar de cidade e visitá-los apenas a cada dois meses. Sinto muita saudade, 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. Ao João Paulo, meu amigo, companheiro e amor, por dividir tudo comigo, sejam momentos tristes ou alegres, obrigada por tornar essa trajetória mais tranquila ao meu lado, por todo o apoio, carinho, preocupação e amor.

A todos os antigos amigos e aos novos amigos que não saem do meu coração. Obrigada Alípio Benedetti (Alépinho) pela amizade sincera e ao casal Flávio (Japa) e Carol Yamamoto, obrigada pela confiança e ajuda de sempre, sem vocês eu não conseguiria me instalar tão rápido em São Paulo.

Obrigada a todas as pessoas do departamento de parasitologia, Maurício por ter me ajudado a concluir este trabalho, por ser um ótimo amigo e companheiro de laboratório, ao Leonardo que também sempre me ajudou em tudo que eu precisasse, ao Renan que sem ele eu não saberia realizar um experimento de FACs, obrigada por toda a paciência e ajuda, a Eline, Márcio, Mario, Kelly, Suelen, Keitty, Leandro, obrigada por toda ajuda de sempre e pela companhia nos almoços divertidos. A todas as pessoas do biotério que sempre tão prestativas me ajudaram também, Sandra muito obrigada.

Obrigada especialmente a Beatriz Stolf, por ter me aceitado como sua aluna de mestrado. 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 dois anos. Obrigada pela paciência, dedicação, carinho e por ser essa pessoa tão

especial que você se tornou pra mim (sem esquecer a Flavinha que passou esta etapa final conosco no laboratório).

Obrigada Profa. Silvia Boscardin por sempre estar tão disponível em me ajudar, por ter aceitado participar da minha banca de qualificação e por sempre acrescentar muitas ideias ao meu trabalho.

Profa. Silvia Uliana, também por ser tão atenciosa, solícita e por ter feito parte da minha banca de qualificação sempre acrescentando ótimas soluções.

A todos do laboratório do Prof. Cláudio Marinho, 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.

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. 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. Análise da atividade de CD100 na modulação da ativação de macrófagos e sua infectividade por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

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 350 milhões pessoas no mundo estão em área de risco de infecção. 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* e o potencial papel de CD100 na modulação da ativação do macrófago, postulamos que essa molécula pode afetar a infectividade dessa célula por este parasita. CD100 reduz a migração e expressão de citocinas inflamatórias em monócitos humanos e células dendríticas e é induzida em macrófagos por estímulos inflamatórios. A partir dessas informações, nossos objetivos são analisar e comparar a expressão de CD100 em diferentes tipos de macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 e os efeitos dessa molécula em termos de ativação e infecção com *L. amazonensis*. Avaliamos a expressão de CD100 em macrófagos peritoneais residentes das duas linhagens de camundongos e os resultados sugerem que macrófagos de camundongos BALB/c expressam mais CD100 do que macrófagos de camundongos C57BL/6. Mostramos ainda que tanto macrófagos de BALB/c quanto de C57BL/6 diminuem a expressão de CD100 ao longo da infecção com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Realizamos também experimentos para avaliar a modulação do CD100 solúvel (sCD100) sobre a infecção de macrófagos das duas linhagens. Os resultados mostraram que macrófagos de camundongos BALB/c pré-tratados com sCD100 durante 24 horas antes da infecção tem maior índice de infecção no tempo de 4 horas de incubação e macrófagos em contato com o sCD100 antes, durante e após a infecção tem aumento no índice nos períodos de 4 e 24 horas de incubação. Em macrófagos de camundongo C57BL/6 pré-tratados durante 24 horas com sCD100 ou mantidos com sCD100 durante o período de infecção o índice aumenta em 4 horas de incubação. Quando os macrófagos permanecem durante todo o tempo em contato com sCD100 o índice de infecção aumenta nos períodos de 4 e 24 horas de incubação. Pode-se concluir, portanto, que CD100 é expresso por diferentes tipos de macrófagos, que pode estar relacionado com a modulação da infecção por *Leishmania*, e que a infecção reduz a expressão dessa molécula pelo macrófago.

Palavra-chave: *Leishmania amazonensis*. Sema/4D. CD100. Macrófago.

ABSTRACT

GALUPPO, M. K. Analysis of CD100 modulation of macrophage activation and infectivity by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2012. 87 p. Masters thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leishmaniasis is caused by trypanosomatids of the genus *Leishmania*, which infect mainly macrophages. The disease can have cutaneous, mucocutaneous and visceral forms, and over 350 million people worldwide live at risk areas. The main factors that influence form and severity of the disease are the species of *Leishmania* and the host immune response. Studies based on infected animal models susceptible and resistant to *Leishmania* show how the immune system of hosts with different profiles affects the survival of the parasite. Considering the importance of macrophages in *Leishmania*'s infection and the potential role of CD100 in the modulation of macrophage activation, we postulated that this molecule may affect macrophage infectivity. CD100 is known to reduce migration and expression of inflammatory cytokines in human monocytes and dendritic cells, and is induced in macrophages by inflammatory stimuli. Based on these informations, our objectives are to analyze and compare the expression of CD100 on different types of macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice lineages and the effects of this molecule in terms of macrophage activation and infectivity by *L. amazonensis*. We analyzed the expression of CD100 in resident peritoneal macrophages from both strains of mice and the results suggest that macrophages from BALB/c mice express more CD100 than macrophages from C57BL/6 animals. We have also shown that macrophages from both BALB/c and C57BL/6 mice decrease the expression of CD100 along the infection with *Leishmania amazonensis* promastigotes. Experiments were also performed to analyze the modulation of soluble CD100 (sCD100) over infection of macrophages from both strains. The results show that macrophages from BALB/c mice pre-treated for 24 hours with sCD100 have augmented infection rates in of 4 hours of incubation. When macrophages remained in contact with the sCD100 before, during and after infection, rates increase after 4 and 24 hours of infection. In macrophages from C57BL/6 mice pre-treated for 24 hours with sCD100 and incubated with sCD100 during the infection rates augment in 4 hours of incubation. When macrophages remained in contact with sCD100 throughout the infection, rates increase after 4 and 24 hours of infection. We can therefore conclude that CD100 is expressed by different macrophage types, that it may be related to modulation of *Leishmania*'s infection and that the infection itself reduces CD100 expression in macrophages.

Key words: *Leishmania amazonensis*. Sema/4D. CD100. Macrophage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Eletroforese de RNA de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 em gel de agarose 2%	33
Figura 2 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 por Real Time RT-PCR	41
Figura 3 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados ou não com tioglicolato 3% por Real-Time RT-PCR.....	43
Figura 4 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com tioglicolato 3% por Real-Time RT-PCR	44
Figura 5 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. amazonensis</i> durante 4 horas.....	45
Figura 6 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com tioglicolato 3%, infectados com <i>L. amazonensis</i> durante 4 horas.....	45
Figura 7 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados ou não com tioglicolato 3% e infectados com <i>L. amazonensis</i> durante 4 horas	46
Figura 8 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 por Real-Time RT-PCR.....	47

Figura 9 - Índice de infecção de macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. amazonensis</i> por 4 horas.....	48
Figura 10 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com <i>L. amazonensis</i> por 4 horas, por Real-Time RT-PCR.....	49
Figura 11 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c e BALB/c ^{XID} por Real-Time RT-PCR	51
Figura 12 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e BALB/c ^{XID} infectados com <i>L. amazonensis</i> na proporção de 10 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72h	52
Figura 13 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com <i>L. amazonensis</i> na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72h	53
Figura 14 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72h, por Real-Time RT-PCR.....	54
Figura 15 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> na proporção de 5 parasitas por macrófago por 24 horas, por Real-Time RT-PCR.	55

Figura 16 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72 horas..... **56**

Figura 17 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 24 e 48h horas . **57**

Figura 18 - Western blot da proteína CD100-fc utilizando anticorpo anti-mouse Semaphorin 4D/CD100..... **58**

Figura 19 - Expressão relativa de iNOS, TGF β , IL1 β , TNF α em macrófagos de BALB/c estimulados ou não com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 6 e 18 horas, por Real-Time RT-PCR **60**

Figura 20 - Expressão relativa de iNOS, TGF β , IL1 β , TNF α em macrófagos de C57BL/6 estimulados ou não com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 6 e 18 horas, por Real-Time RT-PCR..... **62**

Figura 21 - Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de BALB/c estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 24 e 48 horas **65**

Figura 22 - Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 24 e 48 horas. **66**

Figura 23 - Efeito de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas..... **68**

Figura 24 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas. **70**

Figura 25 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos balb/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas**71**

Figura 26 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o número de amastigotas por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas **72**

Figura 27 - Efeito de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas..... **74**

Figura 28 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas **75**

Figura 29 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas **76**

Figura 30 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o número de amastigotas por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas **77**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real- Time RT-PCR..... **34**

Tabela 2 - Viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes temperaturas e meios com sCD100..... **67**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Epidemiologia da leishmaniose	19
1.2	O sistema imune e a infecção por <i>Leishmania</i>	20
1.3	CD100/Sema4D	22
1.4	CD100, seus receptores e o sistema imune	23
1.5	CD100 – potencial modulador de macrófagos?	26
1.6	JUSTIFICATIVA: CD100 e infecção por <i>L. amazonensis</i>.....	28
2	OBJETIVO	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>.....	30
3.2	Obtenção de macrófagos peritoneais recrutados ou não com tioglicolato	30
3.3	Obtenção de monócitos medulares e diferenciação em macrófagos	30
3.4	Plaqueamento de macrófagos peritoneais e medulares	31
3.5	Infecção de macrófagos com <i>Leishmania amazonensis</i>	31
3.6	Estímulo de macrófagos peritoneais com LPS e/ou CD100 solúvel (sCD100)	32
3.7	Extração e quantificação de RNA de macrófagos	32
3.8	Transcrição reversa.....	33
3.9	Real-Time RT-PCR.....	33
3.10	Preparação de bactérias competentes e transformação com plasmídeo	35
3.11	Preparação de DNA plasmidial em pequena escala	35

3.12	Transfecção de células HEK293T para obtenção da proteína CD100 solúvel.....	35
3.13	Precipitação e purificação da proteína CD100 solúvel	36
3.14	Análise de proteína por SDS-PAGE	36
3.15	Western blot	37
3.16	Dosagem de Nitrito pelo método de Griess	37
3.17	Infecção de macrófagos peritoneais na presença de CD100 solúvel	38
3.18	Avaliação da viabilidade celular de promastigotas medida pela redução do sal tetrazólico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2IL)-2,5-Brometo de Difenil Tetrazolio) na presença ou não de sCD100.....	39
3.19	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1	Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais residentes	40
4.2	Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato.....	41
4.3	Índice de infecção por <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais estimulados ou não com tioglicolato	44
4.4	Expressão de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea	47
4.5	Índice de infecção por <i>L. amazonensis</i> em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea.....	48
4.6	Expressão de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea infectados por <i>L. amazonensis</i>	49
4.7	Expressão de CD100 em macrófagos de camundongos BALB/c e BALB/c ^{XID}	49
4.8	Cinética de tempo e índice de infecção por <i>L. amazonensis</i> em macrófagos peritoneais.....	51
4.9	Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i>	53
4.10	Produção da proteína CD100-Fc recombinante	57

4.11 Expressão de iNOS, TGF β , IL1 β E TNF α em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100	58
4.12 Produção de nitrito por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100	64
4.13 Análise da viabilidade de <i>L. amazonensis</i> na presença de sCD100 por ensaios de MTT.....	66
4.14 Efeito de CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos de animais C57BL/6 e BALB/c por <i>L. amazonensis</i>	67
 5 CONCLUSÃO GERAL	 79
 REFERÊNCIAS	 80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. O parasita tem uma forma flagelada (promastigota) encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra desprovida de flagelo externo (amastigota) nas células dos vertebrados. Dependendo da espécie do parasita e de determinantes de susceptibilidade dos hospedeiros, as infecções apresentam-se sob diferentes formas clínicas: forma tegumentar (cutânea e mucosa) ou visceral (LAINSON e SHAW, 1978, GLEW et al., 1988, GRIMALDI e TESH, 1993).

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 12 milhões de pessoas infectadas e que cerca de 350 milhões estejam sob risco de adquirir a doença. Sua distribuição abrange a África, as Américas, a Ásia e o sul da Europa. A incidência anual mundial de leishmaniose tegumentar é de 1,5 a 2,0 milhões, sendo que 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru e 80% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. A estimativa da incidência anual mundial de leishmaniose visceral é de 500.000 casos, sendo que 90% deles ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (WHO, 2007, DESJEUX, 2004).

No Brasil observa-se um aumento do número de casos de leishmaniose nos últimos anos, acompanhado por sua expansão geográfica. As principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela leishmaniose tegumentar no país são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a mais comum e mais frequentemente associada à forma clínica mucosa, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, dispersa pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do país, responsável por manifestações localizadas e difusas anérgicas da leishmaniose cutânea, e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, responsável por causar predominantemente lesões ulceradas cutâneas, com ocorrência nas regiões norte e nordeste do país. *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie responsável pela leishmaniose visceral, que quando não tratada pode evoluir para a forma grave

da doença, debilitando e incapacitando pacientes até a morte (Atlas de leishmaniose tegumentar americana, Ministério da Saúde, 2006).

1.2 O sistema imune e a infecção por *Leishmania*

Como já mencionado, 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. braziliensis* (formas cutânea e mucocutânea) e *L. amazonensis* (forma cutânea e cutânea difusa). No primeiro caso, a doença mucocutânea pode evoluir a partir da doença cutânea não tratada. Já no caso da doença difusa, a manifestação tem relação com defeitos no sistema imune do indivíduo infectado (IVES et al., 2011).

O principal paradigma sobre a regulação da resposta imune nas infecções por *Leishmania* resultou da 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 *Leishmania major* parece ser 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 e MOSMANN, 1987), pois IFN- γ ativa o macrófago e IL-2 estimula o crescimento 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 (STEVENSON et al., 1988): IL-4 estimula a produção de IgE e tanto IL-4 quanto IL-10 estimulam células B e inibem ativação clássica de macrófagos (SIELING e MODLIN, 1994). O modelo experimental de leishmaniose mais utilizado é o da infecção por *L. major*, espécie do Velho Mundo associada à forma cutânea de leishmaniose humana. Nesse sistema, linhagens isogênicas como C57BL/6 e C3H são resistentes à infecção por montarem uma resposta imune Th1 protetora contra o parasita, diferentemente de BALB/c, que é susceptível e forma uma resposta imune do tipo Th2 (JI et al., 2002).

Para *L. amazonensis*, a segunda espécie de *Leishmania* mais comum no Brasil, a dicotomia da resposta de camundongos suscetíveis e resistentes não é tão evidente quanto para *L. major* (AFONSO e SCOTT, 1993), e os mecanismos que determinam maior 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. 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. No entanto, há ausência de uma resposta Th1 devido à redução do receptor de IL-12 funcional nas células T CD4 (JONES et al., 2000). Do mesmo modo, camundongos BALB/c infectados com *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). Ainda assim, essa linhagem de camundongo é mais suscetível do que C57BL/6.

Os macrófagos desempenham um papel muito importante na resposta inicial às infecções, mesmo antes da ativação dos mecanismos mediados por células T e B. As células T podem responder à infecção liberando citocinas que ativam os macrófagos para destruir parasitos intracelulares e células tumorais. Um exemplo é o aumento da destruição de *L. enriettii* por macrófagos de camundongos C57BL/6 estimulados com citocinas de linfócitos quando comparados com macrófagos cultivados sem estímulo (GORDON, 2001). Além de seu papel como célula do sistema imune, os macrófagos são as principais células infectadas por *Leishmania* (INIELTA et al., 2002, INIELTA et al., 2005) e seu perfil de ativação é decisivo para a resolução ou não da infecção por esse parasita. A heterogeneidade dos macrófagos deriva dos efeitos distintos de citocinas tipo Th1 e Th2 na diferenciação de monócitos/ macrófagos. Os perfis predominantemente Th1 e Th2 dos camundongos C57BL/6 e BALB/c estão associados aos perfis “extremos” de macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1 (C57BL/6) após estímulo com LPS (lipopolissacarídeo) são ativados para produzirem NO a partir de arginina, o que controla a proliferação de parasitas intracelulares como *Leishmania major*. Os macrófagos M2 (BALB/c, DBA/2) após o mesmo estímulo aumentam metabolismo de arginina para ornitina, produzindo poliaminas e promovendo proliferação dos parasitas (MILLS et al., 2000). A diferenciação de macrófagos nos perfis M1 e M2, ou ativados clássicos e alternativos, respectivamente, pode ser feita com estímulos de diferentes citocinas (GORDON, 2003). INF- γ caracteristicamente aumenta as atividades pró-inflamatória e antimicrobiana (ativação clássica), aumentando a produção de TNF α , o “burst” respiratório e a expressão de MHC de classe II. IL10 neutraliza eficientemente essas propriedades (desativação), enquanto que IL4 e IL13 aumentam a expressão de MHC de classe II e do receptor de manose (MR), levando à chamada “ativação alternativa”. De um modo geral, quando “classicamente ativados” os macrófagos medeiam à imunidade celular, e quando

“alternativamente ativados” podem promover a imunidade humoral, incluindo processos de reparação (GORDON, 2001).

Linfócitos e macrófagos estabelecem uma série de interações importantes. Além da interação entre linfócitos T e macrófagos já descrita, os anticorpos liberados pelos linfócitos B permitem que os macrófagos reconheçam com maior eficácia os patógenos (GORDON, 2001).

1.3 CD100/Sema4D

CD100 ou Sema4D é uma molécula que pertence à classe quatro das semaforinas. As semaforinas são proteínas solúveis ou ligadas à membrana sendo 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 e 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 tem importantes papéis em outros processos biológicos como morfogênese cardíaca (TOYOFUKU e KIKUTANI, 2007), crescimento vascular (TOYOFUKU et al., 2007, GERETTI et al., 2008), crescimento invasivo de células epiteliais (GIORDANO et al., 2002), progressão de tumor (BIELENBERG e KLAGSBRUN, 2007) e regulação imune (KIKUTANI e KUMANOGOH, 2003, SUZUKI et al., 2008, MIZUI et al., 2009).

A Sema4D ou CD100 possui uma seqüência de sinal amino-terminal seguida de um domínio Sema, um domínio Ig-like, um trecho rico em lisina, uma região transmembrana hidrofóbica e uma cauda citoplasmática (KUMANOGOH e KIKUTANI, 2001). Ela foi a primeira semaforina caracterizada no sistema imunológico (BOUGERET et al., 1992, MIZUI et al., 2009, CH'NG e KUMANOGOH, 2010), e mais recentemente estudos mostraram que Sema3A (DELAIRE et al., 2001), Sema4A (SMITH et al., 2011), e Sema7A (KUMANOGOH e KIKUTANI, 2001) também são expressas em células imunes.

1.4 CD100, seus receptores e o sistema imune

A proteína CD100 é expressa por diferentes tipos de células. Foi inicialmente identificada em linfócitos T ativados (BOUGERET et al., 1992) e posteriormente em outros tipos celulares, tanto humanos quanto murinos. CD100 pode ser encontrada como uma proteína de 150 kDa ligada à membrana ou como uma molécula solúvel de 120 kDa (sCD100), originada por uma clivagem proteolítica (ELHABAZI et al., 2001, BASILE et al., 2007, ZHU et al., 2007).

Muitos trabalhos têm estudado o papel de CD100 no sistema nervoso (MOREAU-FAUVARQUE et al., 2003, YAMAGUCHI et al., 2011), em crescimento e angiogênese tumorais (BASILE et al., 2006, SIERRA et al., 2008, CH'NG e KUMANOGOH, 2010, GABROVSKA et al., 2011, SOONG et al., 2011, YANG et al., 2011) e em osteogênese. No sistema nervoso central foi demonstrado que CD100, em cérebro embrionário de camundongos, induz um colapso dos cones de crescimento de axônios (FURUYAMA et al., 1996, SWIERCZ et al., 2002), em cérebro pós-natal inibe o desenvolvimento de oligodendrócitos (YAMAGUCHI et al., 2011) e em adultos é expresso por oligodendrócitos e mielina e após uma lesão no SNC inibe a regeneração axonal (MOREAU-FAUVARQUE et al., 2003). Em relação à osteogênese, observou-se que CD100 expresso pelos osteoclastos ao se ligar em seu receptor plexina B1 em osteoblastos inibe a formação óssea pela supressão dos sinais do fator similar a insulina (insulin-like growth factor-1, IGF-1) e pela modulação da motilidade dos osteoblastos. De fato, camundongos CD100 e plexina B1 negativos mostraram um fenótipo de osteosclerose devido ao aumento da formação óssea (NEGISHI-KOGA et al., 2011). Em tumores, CD100 tem efeito de supressão da proliferação de melanoma (SOONG et al., 2011). CD100 expresso em queratinócitos ao se associar a seu receptor Plexina B1 expresso por melanócitos, promove a sobrevivência e proliferação dos melanócitos humanos na pele (SOONG et al., 2011). Em resposta a irradiação UV melanócitos diminuem a expressão de Plexina B1. Isso resulta em uma maior atividade do receptor c-Met, ativado pelo fator de crescimento de hepatócitos (HGF) produzido por queratinócitos e fibroblastos, e perda da expressão de E-caderina, promovendo a migração de melanócitos e, potencialmente, a transformação em melanoma (SOONG et al., 2011). Em câncer de pâncreas foi demonstrado que CD100 expresso por linfócitos infiltrantes no tumor pode potencializar a capacidade de invasão e de metástase das células tumorais através da interação plexina B1 e CD100 (KATO et al., 2011).

Zhu e colaboradores (2007) mostraram que CD100 também é expressa em plaquetas, apresentando dois efeitos na resposta à lesão vascular. Quando a ativação plaquetária começa, CD100 na superfície das plaquetas é capaz de interagir diretamente com o receptor CD72 nas plaquetas vizinhas, promovendo a formação de trombos sobre o colágeno exposto. Em um segundo momento, o sCD100 liberado das plaquetas pode contribuir para a cicatrização de feridas através de seus efeitos nas células endoteliais, favorecendo a recuperação da monocamada endotelial e promovendo o crescimento de novos vasos (ZHU et al., 2007).

No sistema hematopoiético CD100 é expresso pela maioria das células (B, T, células NK 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 diversos trabalhos (HALL et al., 1996, PAN et al., 1999, KUMANOGOH et al., 2000, SHI et al., 2000, DELAIRE et al., 2001, KUMANOGOH et al., 2002, ELHABAZI et al., 2003, CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005). Em camundongos sCD100 melhora a resposta proliferativa e a diferenciação de células B estimuladas com anticorpo monoclonal anti-CD40 e IL-4, e a adição de células CHO transfectadas com CD100 a essas células B estimuladas aumenta significativamente a produção de IgG1. Esses resultados indicam que CD100 tem efeito sinérgico sobre a sinalização de CD40 em células B (KUMANOGOH et al., 2000), 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).

A sinalização célula-célula de semaforinas através da interação com os receptores é importante para a homeostase e morfogênese de muitos tecidos e é amplamente estudada por seu papel na conectividade neural, migração de células de câncer e resposta imune (JANSSEN et al., 2010). Diversos trabalhos estudaram os efeitos de CD100 associado a receptores específicos para essa molécula. Uma análise da expressão de proteínas conhecidas como receptores potenciais de CD100 mostrou que, em camundongos, CD72 é um importante receptor de CD100 expresso em células epiteliais brônquicas, macrófagos alveolares, células B, DCs, fibroblastos e basófilos (MIZUI et al., 2009, SMITH et al., 2011). CD72 contém motivos denominados tyrosine inhibitory motifs (ITIMs) em sua região citoplasmática, e a proteína tyrosine phosphatase 1 (SHP-1) que está associada aos ITIMs regula negativamente a resposta imune (KUMANOGOH e KIKUTANI, 2001) e a homeostase celular (MIZUI et al., 2009). A estimulação desse receptor com o CD100

induz a desfosforilação da ITIM e consequente dissociação de SHP-1 resultando no aumento da resposta imunológica (KUMANOGOH e KIKUTANI, 2001). De fato, células B de camundongos CD72 deficientes sofrem hiper-proliferação após vários estímulos comparadas com as células B de camundongos selvagens, enquanto que camundongos deficientes de CD100 mostraram baixa proliferação de células B, 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 CD22 também exibem uma expansão no número de células B1, indicando que SHP-1 é necessário para regular negativamente o desenvolvimento ou manutenção dessas células. CD100 regula positivamente o desenvolvimento e crescimento das células B1 através da inativação de SHP-1 mediado por CD72 (SCOTT et al., 1996), o que é também observado em modelo de camundongos CD100-transgênicos, nos quais o número de células B-1 CD5+ é aumentado significativamente (PAN et al., 1999, KUMANOGOH e KIKUTANI, 2001).

Em camundongos, CD100 também é expressa em células T, e age sobre células dendríticas através da interação com o receptor CD72, que por sua vez aumentam a ativação (KUMANOGOH et al., 2002) e diferenciação das células T (MIZUI et al., 2009). sCD100 desempenha um papel na ativação e maturação de células dendríticas induzindo CD40 e maturação das DCs, medidos pela expressão de moléculas co-estimulatórias e aumento da expressão de IL-2 (KUMANOGOH et al., 2002).

Em humanos, estudos demonstraram que sCD100 inibe a migração de diversas células: células B (DELAIRE et al., 2001), monócitos (DELAIRE et al., 2001, CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005) e DCs imaturas (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005). Além de afetar a migração de monócitos e DCs, sCD100 modula significativamente a produção de citocinas por essas células: 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). sCD100 tem interação direta com o receptor Plexina B1 expressa por DCs, e os efeitos de inibição da migração pelo sCD100 nessas células foram abolidos quando Plexina B1 foi bloqueada (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005). A plexina B1 é também expressa em células B humanas, DCs imaturas, monócitos (GRANZIERO et al., 2003, CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005) e células endoteliais (SIERRA et al., 2008, SUN et al., 2009).

Sabe-se que o CD100 está ainda envolvido na indução da agregação de células B, melhorando sua viabilidade *in vitro* (HALL et al., 1996), na maturação de células dendríticas

derivadas de medula óssea (KIKUTANI e KUMANOGOH, 2003) e na proliferação de células T na presença de doses submitogênicas de anticorpo monoclonal anti-CD3 ou anti-CD2 (BOUGERET et al., 1992, HEROLD et al., 1995).

Um estudo recente mostrou que o CD100 é capaz de mediar a ativação de NF- κ B e a produção de IL-8 por essas células, promovendo um efeito pró-angiogênico nas células endoteliais humanas (YANG et al., 2011).

1.5 CD100 – potencial modulador de macrófagos?

Nos últimos anos, evidências tem suportado a ideia de que os macrófagos associados a tumores são a maioria das células inflamatórias infiltrantes na massa tumoral, e que eles produzem citocinas que ajudam na proliferação e na sobrevivência das células tumorais, bem como na sua capacidade de invadir tecidos circundantes e metastatizar (LEWIS e POLLARD, 2006, ZALATNAI, 2006, ALBINI and SPORN, 2007).

Um trabalho relativamente recente mostrou que maioria dos leucócitos no estroma tumoral são macrófagos, e que estes expressam CD100 (SIERRA et al., 2008). Foi observada expressão de CD100 em macrófagos peritoneais ativados (por injeção de CFA), mas não nos não ativados (controle). 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-KO (nocaute) foram capazes de responder a LPS aumentando a produção de citocinas como 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 KO (SIERRA et al., 2008).

O papel de CD100 na angiogênese foi proposto quando o sobrenadante de culturas de macrófagos WT foi mais eficaz em promover migração de células endoteliais do que o de macrófagos KO. Essa atividade quimioatraente foi parcialmente perdida na presença de anticorpos bloqueadores de CD100 ou de plexina B1, confirmando que este último é o receptor de CD100 em células endoteliais (BARBERIS et al., 2004, BASILE et al., 2006). O papel de CD100 na angiogênese *in vivo* foi analisado com implantes de macrófagos WT ou KO para CD100 em camundongos KO. Camundongos com implantes WT formaram vasos bem ramificados e organizados, enquanto que implantes KO exibiram vasos pequenos e mal

organizados. O bloqueio de plexina B1 resultou na falta de vasos organizados, reforçando que esse receptor é obrigatório para a resposta angiogênica a CD100 (SIERRA et al., 2008).

Além de tumores, placas ateroscleróticas também possuem macrófagos que expressam CD100. Estudos de nosso grupo utilizando células humanas mostraram que tanto macrófagos quanto as células espumosas, abundantes em placas ateroscleróticas, expressam essa molécula na membrana e de forma solúvel, especialmente quando ativadas por IFN- γ e outros estímulos inflamatórios (LUQUE et al., submetido 2012). A presença de receptores para CD100 nessas células e o papel desta proteína na progressão da aterosclerose foram avaliados. Foi demonstrada a participação de CD100 na adesão de monócitos e células endoteliais humanas, e a plexina B2 foi identificada como seu receptor nos monócitos (LUQUE et al., manuscrito em preparação). Além disso, a interação de sCD100 com o receptor plexina B2 dos macrófagos inibe a expressão de CD36 dos mesmos diminuindo a internalização de LDL modificado nestas células (LUQUE et al., submetido 2012). Além de tumores e placas ateroscleróticas, macrófagos de baço expressam CD100. Curiosamente, nem todos os macrófagos desse órgão são CD100+, sugerindo que essa molécula possa estar relacionada com subtipos específicos de macrófagos (LUQUE et al., submetido 2012).

1.6 JUSTIFICATIVA: CD100 e infecção por *L. amazonensis*

Considerando a importância do perfil do macrófago na infecção por *Leishmania* e o potencial papel de CD100 na modulação da ativação do macrófago, postulamos que essa molécula pode afetar a infectividade pelo parasita. Como mencionado anteriormente, CD100 reduz a expressão de citocinas inflamatórias em monócitos humanos e é induzida em macrófagos por estímulos inflamatórios. Além disso, a expressão de CD100 em macrófagos de baço é heterogênea, sugerindo uma associação com subtipos de macrófagos. Com base nessas informações, buscaremos analisar a expressão de CD100 em diferentes macrófagos (perfis M1 e M2, peritoneais e medulares) e o efeito de CD100 sobre macrófagos em termos de seu perfil de ativação e sua infectividade por *Leishmania amazonensis*.

Um trabalho bastante interessante avaliou o efeito de leucotrienos sobre a infecção por *Leishmania* (SEREZANI et al., 2006). Essas moléculas são produzidas por macrófagos em resposta à infecção pelo parasita, tem efeito leishmanicida dependente de NO e seus níveis correlacionam-se com suscetibilidade de diferentes linhagens de camundongo (SEREZANI et al., 2006).

Outro trabalho publicado recentemente avaliou o efeito da expressão de CD200, uma conhecida molécula inibitória para macrófagos, sobre a infecção por *Leishmania amazonensis*. Os autores mostraram que a infecção induziu o aumento de CD200 nos macrófagos, o que levou à inibição de iNOS e aumento da proliferação dos parasitas (CORTEZ et al., 2011).

De forma semelhante, postulamos que CD100, se capaz de modular a ativação macrofágica, poderá afetar a infectividade dessa célula por *L. amazonensis*. Optamos por estudar a infecção por *L. amazonensis* por três motivos: possuir uma alta frequência no Brasil, dispersa pelas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste; por sua capacidade de causar formas clínicas diferentes de acordo com o sistema imune do hospedeiro (doença cutânea localizada ou difusa); e pelo fato da leishmaniose causada por essa espécie em modelo murino (*in vivo* e *in vitro*) ter semelhanças com a doença humana.

2 OBJETIVO

Os objetivos do projeto são:

- Avaliar se há a expressão de CD100 nos macrófagos M1 e M2 (provenientes de camundongos C57BL/6 e BALB/c, respectivamente), medulares e peritoneais;
- Avaliar se existe diferença na expressão de CD100 entre macrófagos M1 e M2, medulares e peritoneais e escolher um dos dois subtipos (medulares ou peritoneais) para as análises seguintes;
- Analisar o efeito de CD100 solúvel sobre a produção de citocinas e NO em macrófagos ativados com LPS e não ativados;
- Comparar os graus de infecção *in vitro* por *L. amazonensis* em macrófagos das duas linhagens de camundongo, correlacionando com a expressão de CD100 nos mesmos;
- Investigar se a infecção por *L. amazonensis* altera a expressão de CD100 em macrófagos;
- Investigar se há modulação no grau de infecção por *L. amazonensis* em macrófagos cultivados na presença de CD100 solúvel.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* da cepa LV79 (WHO type – MPRO/72/M1841) foram cultivados em estufa de 24 °C em meio Warren completo pH 7,2: 37 g/L de Brain Heart Infusion (Difco laboratories), 0,1 mg/mL de ácido fólico (SIGMA), 0,01 g/L de hemina (SIGMA) dissolvida em NaOH 2N, autoclavado por 15 minutos a 121 °C, acrescido de 20 µg/mL de gentamicina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A cada sete dias os parasitas foram repicados para a densidade de 2×10^6 /mL.

3.2 Obtenção de macrófagos peritoneais recrutados ou não com tioglicolato

Macrófagos residentes na cavidade peritoneal ou recrutados com tioglicolato foram obtidos de animais BALB/c e C57BL/6. Para recrutamento, foram injetados 1,5 mL de Tioglicolato (3%) na cavidade peritoneal dos camundongos quatro dias antes da retirada das células.

Coleta das células peritoneais: camundongos BALB/c e C57BL/6 foram sacrificados em câmara de CO₂ e colocados em recipientes contendo álcool 70% para a descontaminação da pele, que foi aberta para expor a cavidade peritoneal. 5 mL de PBS 1X estéril gelado foram injetados na cavidade peritoneal e após massagem o conteúdo da cavidade foi aspirado com uma seringa e centrifugado a 300 xg durante 7 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) 1640 não suplementado (sem soro e sem antibiótico). A contagem dos macrófagos foi realizada em câmara de Neubauer® com azul de “Tripan” (Sigma) a 10% para avaliação da viabilidade celular.

3.3 Obtenção de monócitos medulares e diferenciação em macrófagos

Camundongos BALB/c e C57BL/6 foram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada dos fêmures. As epífises foram cortadas e os fêmures foram mergulhados em álcool 70% e lavados em PBS 1X estéril. As células foram recolhidas lavando o canal medular com 5 mL de meio R2030 (50 mL de RPMI, 30 mL de sobrenadante de cultura de fibroblasto L929 e 20 mL de Soro Fetal bovino) com uma agulha 21 G conectada a uma seringa de 5 mL. As células retiradas foram transferidas para placas de Petri de poliestireno estéril (OptiluxTM) e mantidas a 37 °C, 5%

de CO₂ por 7 dias. No terceiro/quarto dia foram acrescentados mais 10 mL de meio R2030 e após o sétimo dia o meio foi descartado e foram adicionados 5 mL de meio RPMI 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 300 xg a 4 °C por 10 minutos e ressuspensas em meio R105 (85 mL de RPMI, 5 mL de sobrenadante de cultura de fibroblasto L929 e 10 mL de Soro Fetal bovino) para a contagem em câmara de Neubauer e posterior plaqueamento.

3.4 Plaqueamento de macrófagos peritoneais e medulares

Logo após a retirada dos macrófagos peritoneais ou diferenciação dos monócitos de medula óssea em macrófagos o meio contendo as células foi centrifugado a 300 xg a 4 °C por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 pH 7,2 não suplementado gelado para contagem em câmara de Neubauer com azul de “Tripan” a 10%. A suspensão de células foi ajustada para 6×10^5 /mL para cálculo do índice de infecção ou para 4×10^6 /mL para extração de RNA. Transferiu-se 0,5 mL da primeira suspensão para placas de 24 poços com lamínula de vidro circular de 13 mm (Glass Técnica) para cálculo do índice de infecção (sempre em triplicata, ou seja, com 3 lamínulas por condição) ou 2 mL da segunda suspensão para placa de 6 poços para extração de RNA. Após duas horas de incubação em estufa a 37 °C 5% de CO₂ o meio foi trocado por RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SFB em temperatura ambiente, e as células foram incubadas na estufa de 37 °C, 5% de CO₂ durante a noite.

3.5 Infecção de macrófagos com *Leishmania amazonensis*

Dependendo do experimento a infecção foi realizada na proporção de 2, 2,5, 5 ou 10 parasitas por macrófago. Após o período de incubação para aderência das células (ver item 3.4), foi realizada a infecção dos macrófagos com formas promastigotas de *L. amazonensis* durante 4, 24, 48 e 72 horas. Em todos os casos, o meio foi trocado após 4 horas de infecção para remoção dos parasitas não internalizados. Para análise da infecção, as lamínulas foram fixadas por incubação instantânea em metanol, coradas com corante Giemsa (2 gotas/mL de água destilada) por 15 minutos 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 e a quantidade de amastigotas em 100 macrófagos. O índice de infecção corresponde ao produto da proporção de macrófagos infectados pela média do número de amastigotas por macrófago infectado.

Para a extração de RNA os macrófagos aderidos a placas de seis poços foram infectados nas proporções de 2,5 ou 5 parasitas/macrófago pelos períodos já citados. Ao final do período de infecção o meio de cada poço foi retirado, foi adicionado 1 mL de Trizol (Life Technologies) e procedeu-se a extração como descrito em 3.7.

3.6 Estímulo de macrófagos peritoneais com LPS e/ou CD100 solúvel (sCD100)

Macrófagos peritoneais de BALB/c e C57BL/6 foram plaqueados em placas de 6 poços como descrito em 3.4. Após as 2 horas de adesão, o meio foi trocado por meio completo contendo LPS na concentração de 2,5 ng/mL e/ou sCD100 na concentração de 100 ng/mL. As incubações foram feitas por 6 e 18 horas e o RNA extraído com 1 mL de Trizol, como descrito abaixo (item 3.7).

3.7 Extração e quantificação de RNA de macrófagos

A extração de RNA foi feita seguindo instruções do fabricante (manual Trizol, Life Technologies). Após o período de infecção ou tratamento 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 ressuspenso em 10 µL de água DEPC (Life Technologies), rigorosamente agitado, aquecido por 10 minutos a 65 °C e transferido para gelo. O RNA foi quantificado por espectrofotômetro (Nanodrop - Thermo Scientific) 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 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 (ver figura 1 como exemplo).

Figura 1 – Eletroforese de RNA de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (1) e C57BL/6 (2) em gel de agarose 2%.

Fonte: Galuppo (2012).

3.8 Transcrição reversa

A transcrição reversa de RNA para cDNA foi feita utilizando a enzima SuperScript[™] II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Aos tubos contendo 1,7 µg de RNA foram adicionados 50 ng de random primers, 250 ng de oligo (dT), 500 µM de dNTP (Life Technologies) em H₂O 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 e 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.

3.9 Real-Time RT-PCR

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços (Thermo-Fast[®] 96 PCR Plate Non-Skirted) utilizando *ABsolute QPCR SYBR Green Mix* (Thermo Scientific) e o equipamento Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf). O valor da linha de corte (*threshold*) que define o nível de fluorescência detectável e, portanto, o Ct foi determinado automaticamente.

As reações de PCR em tempo Real foram realizadas em triplicata, utilizando por poço 1,97 µL do cDNA diluído 1:10, oligonucleotídeos nas concentrações padronizadas, 7,6 µL de *SYBR Green Mix* e *H₂O nuclease free* em quantidade suficiente para 15 µL. Para confirmar a ausência de DNA contaminante 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 e SCHMITTGEN, 2001) 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, O'Sullivan et al. 2009 e avaliados usando o programa DNASTAR (T_m de aproximadamente 60° C e sem pareamentos significativos entre os oligonucleotídeos de cada par e internos). Os oligonucleotídeos para amplificação de TNF- α , IL-1 β , TGF β , iNOs e GAPDH murinos foram sintetizados com base nas seqüências disponíveis em Marinho e colaboradores (2009) ou obtidos por colaboração com o Laboratório de Imunologia do Incor.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de Real-Time RT-PCR.

Primer	Forward	Reverse
IL-1β	5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3'	5'-AGGCCACAGGTATTTGTGCG-3'
Nos2	5'-CACCTTGGAGTTCACCCAGT-3'	5'-ACCACTCGTACTTGGGATGC-3'
TGFβ1	5'-GGAGAGCCCTGGATACCAA-3'	5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'
TNF-α	5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3'	5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
GAPDH	5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	5'-GGGTCGTTGATGGCAACAAT-3'
CD100	5'-ACCACCTGAAGTTGACATCCTT-3'	5'-ACCATGACTGATGTGTAGCTGTG-3'

3.10 Preparação de bactérias competentes e transformação com plasmídeo

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5 α foi inoculada em 3 mL de meio de cultura LB (Life Technologies) e incubada por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). O pré-inóculo (3 mL) foi então diluído em 200 mL de meio LB e incubado a 37 °C sob agitação constante até DO₆₀₀ de 0,6 - 0,8, quando foi transferido para gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.400 xg por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e as bactérias ressuspensas em 75 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M e incubadas em gelo por 12 horas. Em seguida uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores foi feita, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano foi ressuspensão em 2 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M e glicerol 15%. As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 50 μ L, congeladas rapidamente em gelo seco e armazenadas a -70 °C.

Para as transformações 0,1 ng de DNA plasmidial foram adicionados aos tubos contendo 20 μ L de bactérias competentes, juntamente com 75 μ L da solução de CaCl₂ 0,1 M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por exatamente 40 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 100 μ L de meio LB e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sob agitação. O volume total da mistura foi aplicado em placas de LB (Life Technologies) 1,5% de Agar (Sigma) contendo 50 μ g/mL de ampicilina, que foram incubadas em estufa a 37 °C durante a noite.

3.11 Preparação de DNA plasmidial em pequena escala

Para obtenção da proteína CD100 solúvel fusionada com Fc (IgG) contamos com o plasmídeo de expressão CD100-Fc (WANG et al., 2001) para células de mamíferos gentilmente cedido pelo Prof. Kumanogoh (Osaka, Japão). O plasmídeo foi utilizado para transformar bactérias DH5 α e a amplificação e a extração do DNA plasmidial em pequena escala foram feitas com o kit plasmidPrep *Mini Spin Kit* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante. O produto de purificação foi quantificado no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific) e visualizado em gel de agarose 1%.

3.12 Transfecção de células HEK293T para obtenção da proteína CD100 solúvel

Placas de 150 mm (TPP®) foram semeadas com 7,5x10⁶ 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 µg do plasmídeo CD100-Fc foram misturados a 1 mL de uma solução de NaCl 150 mM e em seguida a 100 µL 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% CO₂ por sete dias.

3.13 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 (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 calculada pelo método de Bradford e a presença da proteína CD100 foi analisada por SDS-PAGE e Western blot.

3.14 Análise de proteína por SDS-PAGE

Foram preparados géis de separação e empilhamento segundo Sambrook et al., 1989. O gel de separação foi composto de 8% 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 água e 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.

3.15 Western blot

Ensaio de Western blot foram realizados para confirmar a identidade da proteína CD100-Fc recombinante. A transferência da proteína do gel de SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose (Amersham™ Hybond™ - 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 confirmar a transferência. Em seguida a membrana foi bloqueada com leite em pó 5% em PBS 0,1% Tween 20 por 1 hora, e incubada com o anticorpo primário (Anti-mouse Semaphorin 4D/CD100 Antibody – R&D Systems) diluído 1:250 em leite 2,5% em PBS 0,1% Tween 20 por 2 horas. Foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1X, 0,1% Tween 20 e incubou-se a membrana com o anticorpo secundário (Anti-Rat IgG – Peroxidase; Sigma-ALDRICH) diluído 1:2000 em leite 2,5% em PBS 0,1% Tween 20 durante uma hora. Foram realizadas mais 2 lavagens de 10 minutos com PBS 0,1% Tween 20, e uma última lavagem apenas com PBS. Em seguida foi adicionado ECL (Amersham™ ECL™ detection systems, GE) sobre a membrana por 5 minutos e ela foi exposta a filme de raio-X.

3.16 Dosagem de Nitrito pelo método de Griess

A concentração de nitrito no sobrenadante de culturas de macrófagos foi medida usando a reação padrão de Griess (LONARDONI et al., 2000).

2×10^6 macrófagos peritoneais foram plaqueados em placas de 96 poços em 100 μ L de meio RPMI 1640 não suplementado pH 7,2 durante 2 horas em estufa de 37 °C com 5% de CO₂ de acordo com Ding et al., 1988. Em seguida, o meio foi trocado por RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SFB e mantido por 24 horas. As células foram incubadas com diferentes estímulos durante 24 e 48 horas e após este período 50 μ L do sobrenadante de cultura foram misturados com 50 μ L do reagente de Griess (1 % sulfanilamide/ 0,1 % naphthylethylene diamine dihydrochloridel e 2.5% H₃P₀₄) e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 540 nm usando um filtro de referência 620 nm em um leitor de microplacas e a concentração de nitrito foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.17 Infecção de macrófagos peritoneais na presença de CD100 solúvel

Macrófagos peritoneais residentes de animais C57BL/6 e BALB/c foram plaqueados em placas de 24 poços como descrito no item 3.4 e infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de cinco parasitas por macrófago (como descrito no item 3.5), em diferentes condições:

1. Macrófagos foram plaqueados com sCD100 na concentração de 100 ng/mL por 24 horas, lavados e infectados (sem sCD100) durante 4, 24 e 48 horas, para analisarmos se sCD100 modula a ativação dos macrófagos afetando sua capacidade de fagocitose e destruição de formas promastigotas;

2. Macrófagos foram plaqueados sem sCD100 e infectados na presença de sCD100 e após 4 horas de infecção o meio foi trocado por meio RPMI pH 7,2 suplementado sem sCD100 e mantido por 4, 24 e 48 horas, para analisarmos se o sCD100 modula a fagocitose dos parasitas pelo macrófago;

3. Macrófagos foram plaqueados e infectados sem sCD100, após 4 horas de infecção o meio foi trocado por meio RPMI pH 7,2 suplementado com sCD100 e mantido durante 24 e 48 horas, para analisarmos se a proteína recombinante afeta a capacidade do macrófago de conter a multiplicação do parasita;

4. Macrófagos foram plaqueados na presença de sCD100, infectados na presença de sCD100 por 4 horas e mantidos em RPMI pH 7,2 suplementado com sCD100 durante 4, 24 e 48 horas, para analisarmos se a proteína em contato com o macrófago desde o plaqueamento até o final da infecção afeta a quantidade de parasitas sobreviventes;

5. Macrófagos foram plaqueados e infectados sem sCD100 durante 4, 24 e 48 horas. Experimento controle.

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

3.18 Avaliação da viabilidade celular de promastigotas medida pela redução do sal tetrazólico MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2IL)-2,5-Brometo de Difenil Tetrazolio) na presença ou não de sCD100

Promastigotas de *L. amazonensis* no sétimo dia de cultivo foram submetidas a diferentes tratamentos: Em uma placa de 24 poços, foram plaqueados $2,1 \times 10^6$ parasitas por poço em meio RPMI suplementado pH 7,2 ou Warren suplementado pH 7,2 (controles) na presença ou não de sCD100 na concentração de 100 ng/mL. Os parasitas e controle em meio RPMI foram mantidos em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e os parasitas e controle em meio Warren em estufa a 24 °C durante 4 horas, similares às incubações de infecção de macrófagos e crescimento de promastigotas, respectivamente.

Após este período os promastigotas foram centrifugados a 600 xg por 10 minutos a 4 °C, ressuspensos em 100 µL de tampão PBS e transferidos para placa de 96 poços. Acrescentou-se 20 µL de MTT (Sigma, solução 5mg/mL preparada em PBS) e incubou-se a 24 °C durante 50 minutos. Adicionou-se 100 µL de SDS 10 % a cada poço e as placas foram analisadas em espectrofotômetro para microplacas de cultura BioTek ELx800 (Biotek) na absorbância em 595 nm (MOSMANN, 1983).

3.19 Análise estatística

Os resultados de todos os experimentos foram analisados utilizando os testes ANOVA (para três ou mais amostras) ou T de Student (para duas amostras).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais residentes

Estudos mostraram diversas funções de CD100 no sistema imune: sCD100 inibe a migração células B (DELAIRE et al., 2001), monócitos (DELAIRE ET AL., 2001, CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005) e DCs imaturas humanas (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005), regula a produção de citocinas por monócitos (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005) e regula a agregação de células B e a sobrevivência e ativação de células T (HALL et al., 1996, SHI et al., 2000). Em células NK foi mostrado que CD100 estabiliza o contato com a célula alvo, resultando em aumento de toxicidade e maior produção de IFN- γ pelas células NK (MIZRAHI et al., 2007). Mais recentemente foi mostrado que CD100 produzido por macrófagos tumorais aumenta angiogênese (SIERRA et al., 2008). Nesse último trabalho os autores analisaram a expressão de CD100 (por RT-PCR) não só em macrófagos tumorais, mas também em macrófagos peritoneais ativados (por injeção de CFA) e não ativados (controle), e observaram a expressão apenas nos ativados.

Buscando comparar a expressão de CD100 em macrófagos de linhagens murinas com suscetibilidades distintas a *L. amazonensis*, isolamos macrófagos peritoneais residentes (não ativados) de camundongos BALB/c e C57BL/6 e quantificamos os transcritos de CD100 por Real Time RT-PCR. Os dados são mostrados na Figura 2.

Figura 2 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 por Real Time RT-PCR.

Razões de expressão em macrófagos de cada animal em relação à média dos de C57BL/6. Análise estatística utilizada: teste t. Resultados de três experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Como pode ser observado na figura 2, macrófagos peritoneais não ativados de ambas as linhagens expressam CD100, ao contrário do observado por Sierra e colaboradores (2008). A expressão de CD100 nos macrófagos dos animais BALB/c tende a ser maior do que em C57BL/6, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p = 0,12$), provavelmente devido ao pequeno número de amostras e grande dispersão nos valores de BALB/c.

4.2 Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato

De acordo com Ding e colaboradores (1988), macrófagos estimulados com periodato liberam grande quantidade de H_2O_2 . Quando estimulados com caseína, liberam, também, grandes quantidades de espécies Reativas de Oxigênio Intermediário (ROI) (WEINBERG, 1981, TSUNAWAKI e NATHAN, 1984).

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos geneticamente modificados para mínima reatividade inflamatória aguda (AIRmin) sintetizam maior quantidade de citocinas IL-10 e $TGF\beta$ em relação aos de máxima reatividade inflamatória aguda (AIRmáx), que produzem mais citocinas pró-inflamatórias (IBANEZ et al., 1992). Curiosamente, após o estímulo com tioglicolato os macrófagos peritoneais da linhagem AIRmáx produzem mais citocinas anti-

inflamatórias do que os AIRmin. Além disso, macrófagos de ambas as linhagens induzidos por tioglicolato são mais eficientes quanto à fagocitose de partículas de zimosan do que os macrófagos residentes (Andrea Gil e Nancy Starobinas, 2008).

Outro estudo mostrou que na cavidade peritoneal de camundongos não estimulados é possível encontrar um subconjunto de macrófagos denominados LPMs (*large peritoneal macrophages*) que desaparecem da cavidade após estímulo com tioglicolato ou LPS. Após esses estímulos, outro subconjunto de macrófagos predomina na cavidade peritoneal: os SPMs (*small peritoneal macrophages*), que não são derivados dos LPMs, mas sim de monócitos do sangue (GHOSN et al., 2010).

Sabendo-se que macrófagos induzidos/recrutados com tioglicolato podem ter propriedades fisiológicas distintas das dos residentes (HOOVER e NACY, 1984, GHOSN et al., 2010), comparamos a expressão de CD100 em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 inoculados ou não com Tioglicolato 3%. O meio tioglicolato é utilizado para a indução da resposta inflamatória peritoneal fazendo com que sejam liberados mediadores pró-inflamatórios na mucosa, que induzirão o recrutamento e consequentemente o acúmulo de macrófagos no local. Nas primeiras 6 horas do estímulo o tioglicolato induz a migração preferencial de neutrófilos, e após este período torna-se um potente indutor de macrófagos, principalmente após 96 horas (Andrea Gil e Nancy Starobinas, 2008).

A análise por real time RT-PCR apresentada na figura 3 mostra que a expressão relativa de CD100 em macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com tioglicolato é maior quando comparada à dos macrófagos não estimulados ($p = 0,03$), e macrófagos de C57BL/6 estimulados com tioglicolato tendem a ter maior expressão do que os não estimulados com tioglicolato, sendo esta diferença não estatisticamente significativa ($p = 0,4$).

Figura 3 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados ou não com tioglicolato 3% por Real-Time RT-PCR.

Razão estimulados/ média do controle não estimulado de cada linhagem. Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de três experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Nossos resultados indicam que macrófagos estimulados com tioglicolato expressam ou tendem expressar mais CD100 quando comparados ao controle. Sendo assim, optamos por não utilizar nenhum tipo de estímulo para recrutar as células da cavidade peritoneal, mesmo sabendo que animais previamente injetados com tioglicolato apresentam um maior infiltrado celular na cavidade e assim maior rendimento de macrófagos (Andrea Gil e Nancy Starobinas, 2008). Além disso, macrófagos das duas linhagens após estímulo não apresentam o mesmo perfil quando comparados com macrófagos não estimulados com tioglicolato (comparar Figuras 2 e 4). De fato, a Figura 4 mostra que macrófagos de BALB/c e C57BL/6 estimulados tem expressões semelhantes de CD100 ($p = 0,1$), enquanto que macrófagos residentes de BALB/c tendem expressar mais CD100 do que os de C57BL/6 (figura 2).

Figura 4 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com tioglicolato 3% por Real-Time RT-PCR.

Razões de cada animal em relação à média dos C57BL/6. Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de três experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

4.3 Índice de infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais estimulados ou não com tioglicolato

Realizamos também experimentos de infecção para comparação do índice de infecção entre macrófagos induzidos ou não com tioglicolato. Foram plaqueados 3×10^5 macrófagos estimulados ou não por tioglicolato 3% como descrito (itens 3.4 e 3.5) e a infecção foi realizada na proporção de 2, 5 e 10 parasitas por macrófago durante quatro horas. O índice de infecção corresponde ao produto da proporção de macrófagos infectados pelo número de amastigotas por macrófago infectado.

Figura 5 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* durante 4 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Figura 6 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com tioglicolato 3%, infectados com *L. amazonensis* durante 4 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

As figuras 5 e 6 mostram os índices de infecção nos macrófagos residentes e recrutados com tioglicolato, respectivamente. Observa-se que aumentando o número de parasitas por macrófagos aumenta-se também o índice de infecção, como esperado. Quando analisamos os macrófagos não estimulados com tioglicolato (figura 5), observamos que os índices de infecção de macrófagos de animais BALB/c nas proporções 5:1 e 10:1 tendem ser ligeiramente maiores (diferença estatisticamente não significativa) que o dos macrófagos de C57BL/6, diferença não observada entre macrófagos estimulados com tioglicolato.

A figura 7 mostra a comparação das figuras 5 e 6. Observamos que recrutando os macrófagos BALB/c com tioglicolato a tendência é diminuir sutilmente o índice de infecção, enquanto que para animais C57BL/6 observa-se um pequeno aumento no índice, embora nenhuma das alterações seja estatisticamente significativa.

Figura 7 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados ou não com tioglicolato 3% e infectados com *L. amazonensis* durante 4 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

4.4 Expressão de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea

Macrófagos são células bastante heterogêneas (NATHAN, 1986). Para não restringirmos nossas análises apenas a macrófagos peritoneais, incluímos experimentos comparando a expressão de CD100 entre macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea das duas linhagens de camundongos.

Figura 8 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 por Real-Time RT-PCR.

Razão em relação a media de C57BL6. Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de três experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Pode-se observar que não há diferença significativa na expressão relativa de CD100 entre macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 ($p = 0,2$). Quando comparamos esses dados com os obtidos a partir de macrófagos peritoneais (Figura 2) observamos uma diferença na expressão de CD100 em macrófagos de BALB/c e C57BL/6, já que macrófagos da cavidade peritoneal de BALB/c tendem a expressar mais CD100 do que os de C57BL/6. Os dados crus de DCt ($Ct \text{ CD100} - Ct \text{ GAPDH}$ para cada amostra) obtidos para macrófagos medulares das duas linhagens de camundongo mostraram que a expressão de CD100 é muito baixa nesses macrófagos quando comparada com macrófagos peritoneais (dados não mostrados).

4.5 Índice de infecção por *L. amazonensis* em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea

Analizamos também o índice de infecção de macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea nas mesmas condições descritas anteriormente.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que animais BALB/c e C57BL/6 tem índices de infecção semelhantes em todas as proporções parasita:macrófago e que aumentando o número de parasitas por macrófago aumenta-se o índice.

Observamos maior semelhança entre os índices de macrófagos medulares e os de macrófagos recrutados com tioglicolato, nos quais não há diferença de infecção entre as linhagens, do que com os de macrófagos residentes. Isso sugere que macrófagos diferenciados de monócitos possam estar mais ativados do que os macrófagos peritoneais residentes, possivelmente pela metodologia de diferenciação, que inclui incubações com fator de crescimento GM-CSF (presente no sobrenadante das células L929).

Figura 9 - Índice de infecção de macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* por 4 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

4.6 Expressão de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea infectados por *L. amazonensis*

Foram plaqueados 4×10^6 macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea por poço como descrito anteriormente e a infecção foi realizada na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4 horas para análise da expressão relativa de CD100. Os dados apresentados na figura 10 mostram que a expressão de CD100 não muda após a infecção nas condições adotadas ($p = 0,2$ e $p = 0,8$ respectivamente).

Figura 10 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados ou não com *L. amazonensis* por 4 horas, por Real-Time RT-PCR.

Razão infectado/controlo individual de cada linhagem. Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de três experimentos. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

4.7 Expressão de CD100 em macrófagos de camundongos BALB/c e BALB/c^{XID}

Sabe-se que na cavidade peritoneal de camundongos não manipulados existem 5-10 milhões de células sendo 50-60% delas linfócitos B1, por volta de 30% macrófagos e 5-10% células T (RAY e DITTEL, 2010). As células B1 são um subconjunto de células B que, portanto, expressam CD100 (HALL et al., 1996, SHI et al., 2000), estão envolvidas na imunidade inata, auto-imunidade, regulação imune pela produção de IL-10 (O'GARRA et al., 1992) e produção de IgM natural, o qual fornece a primeira linha de defesa contra uma série de vírus e bactérias

(BAUMGARTH et al., 2000; BAUMGARTH et al., 2000). Embora sejam linfócitos, essas células aderem fortemente a macrófagos e permanecem ligadas a eles por vários dias (ALMEIDA et al., 2001), podendo, portanto, estar incluídas entre os comumente chamados “macrófagos peritoneais” que utilizamos nos experimentos mostrados.

A fim de analisarmos se os linfócitos B1 presentes na cavidade peritoneal dos camundongos estariam expressando CD100 juntamente com os macrófagos residentes ou afetando a expressão de CD100 destes, comparamos a expressão de CD100 em células peritoneais de camundongos BALB/c e BALB/c^{XID}. Animais BALB/c^{XID} possuem uma interrupção no gene alvo p85 α que prejudica o desenvolvimento de células B na fase pró-B, reduzindo o número de células B maduras, células B CD5⁺ Ly-1 e suas respostas proliferativas (SUZUKI et al., 1999). Por essa razão, esses animais são usados como modelos para ausência de células B1 no peritônio (POPI et al., 2004).

A figura 11 mostra a análise da expressão relativa de CD100 nas células peritoneais aderentes de BALB/c e BALB/c^{XID}. Pode-se observar que as duas linhagens de camundongos têm expressões estatisticamente semelhantes de CD100 ($p = 0,5$). Sendo assim, concluímos que os linfócitos B1 encontrados na cavidade peritoneal dos camundongos não estão afetando a expressão de CD100 dos chamados “macrófagos peritoneais”.

Figura 11 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais residentes de camundongos BALB/c e BALB/c^{XID} por Real-Time RT-PCR.

Razão em relação à média dos animais BALB/c. Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de sete experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Com base na confirmação da não modulação na expressão de CD100 pelas células B1 em macrófagos residentes da cavidade peritoneal, decidimos usar esse tipo de macrófago nos experimentos seguintes por sua facilidade e rapidez de isolamento, que exige menor manuseio com conseqüente menor chance de ativação/estímulo das células.

4.8 Cinética de tempo e índice de infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais

Depois de realizarmos as infecções de quatro horas para análise do índice de infecção em macrófagos peritoneais residentes, macrófagos peritoneais estimulados com tioglicolato e macrófagos diferenciados de monócitos de medula óssea, optamos pela proporção de 2,5 e 10 parasitas por macrófago peritoneal para comparação da infecção analisando agora uma cinética de tempo de 4, 24, 48 e 72 horas (ver item 3.5). Os valores do índice de infecção para infecções na proporção de 10 parasitas/macrófago são mostrados na figura 12.

Figura 12 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, C57BL/6 e BALB/c^{XID} infectados com *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72h.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *= p ≤ 0.05.

Fonte: Galuppo (2012).

Observamos na figura 12 que aumentando o período de incubação (4, 24, 48 e 72 horas) os macrófagos das duas linhagens conseguem reduzir o número de parasitas intracelulares. Quando comparamos os macrófagos M1 de animais C57BL/6 com os macrófagos M2 de animais BALB/c, observamos que macrófagos C57BL/6 tendem controlar um pouco mais a infecção por *L. amazonensis* a partir de 48 horas de incubação, embora não tenha havido diferenças estatísticas significativas possivelmente devido ao excesso de parasitas utilizado, que pode mascarar diferenças sutis. Macrófagos de camundongos BALB/c^{XID} também não apresentam diferença de índice de infecção durante 4 horas de incubação, sugerindo que a presença de células B1 no peritônio de BALB/c (mas não em BALB/c^{XID}) não afeta a infectividade dos macrófagos pelo parasita.

Quando os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago, como mostrado na figura 13, observamos novamente que macrófagos de animais BALB/c apresentam diminuições dos índices de infecção ao longo do

tempo de incubação, com diferenças estatisticamente significativas entre o tempo de 4 horas e os demais (24, 48 e 72 horas). Os macrófagos de animais C57BL/6 também apresentam redução no índice de infecção ao longo do tempo, com diferenças entre 4 horas e os demais tempos e entre 24 horas e os demais, e sem diferença significativa entre 48 e 72 horas de incubação.

Figura 13 - Índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 ou 72h.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de cinco. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Quando comparamos os índices de infecção obtidos para macrófagos M1 e M2 na proporção de 2,5 parasitas por macrófago, observamos maior infecção em C57BL/6 (M1) com diferença estatística significativa em 4 e 24 horas de infecção. Estes dados não eram esperados considerando que C57BL/6 apresenta menores lesões em infecções *in vivo* do que BALB/c com esta cepa de *L. amazonensis* (dados não mostrados).

4.9 Expressão de CD100 em macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*

Macrófagos peritoneais residentes foram infectados com *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago durante 4, 24, 48, ou 72 horas (ver item 3.5), e o RNA foi coletado e

utilizado para quantificação de CD100 (e GAPDH) por Real Time RT-PCR. Os dados de BALB/c são mostrados na figura 14.

Figura 14 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72h, por Real-Time RT-PCR.

Razão infectado/controle não infectado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA.
*: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

A expressão relativa de CD100 em macrófagos de camundongos BALB/c infectados na proporção de 2,5 parasitas por macrófagos por diferentes tempos é significativamente mais baixa quando comparada ao controle sem infecção. Quando infectamos na proporção de 5 parasitas por macrófago (Figura 15), a expressão relativa de CD100 também diminui significativamente em relação ao controle após 24 horas de infecção ($p = 0,002$). Podemos concluir que a infecção por *L. amazonensis* é capaz de levar à redução na expressão de CD100 pelo macrófago.

Figura 15 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 24 horas, por Real-Time RT-PCR.

Razão infectados/controle não infectado. Análise estatística utilizada: teste t. Resultados de cinco experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

A expressão relativa de CD100 em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados na proporção de 2,5 parasitas por macrófago ao longo de 4, 24, 48 e 72 horas é mostrada na figura 16.

Figura 16 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 2,5 parasitas por macrófago por 4, 24, 48 e 72 horas.

Razão infectado/controle não infectado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA.
*: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Observamos que, como já visto para macrófagos de BALB/c, a expressão de CD100 diminui significativamente ao longo do período de infecção em macrófagos de animais C57BL/6. No período de 48 horas observamos os menores valores de expressão de CD100 (figura 16). Macrófagos de C57BL/6 foram infectados na proporção de 5 parasitas por macrófago por 24 e 48 horas (figura 17) e a expressão de CD100 é estatisticamente menor ($p = 0,002$) após 48 horas de infecção quando comparado ao controle.

Figura 17 - Expressão relativa de CD100 em macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago por 24 e 48h horas.

Razão infectados/controle não infectado. Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado individual de cinco experimentos independentes. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Uma observação importante é que em macrófagos de animais BALB/c observamos uma maior diminuição no índice de infecção em 24 e 72 horas (figura 14), sendo que em 24 horas observamos queda na expressão de CD100 (figura 15). Da mesma forma, em macrófagos de animais C57BL/6 a menor expressão de CD100 foi observada no período de 48 horas de incubação, tempo no qual também se observa menor índice de infecção (figura 16 e 17 respectivamente), sugerindo que a diminuição de CD100 pode estar associada a uma diminuição da infecção.

4.10 Produção da proteína CD100-Fc recombinante

A expressão e purificação da proteína CD100-Fc recombinante foram realizadas como descrito em 3.13. Realizamos um Western blot para confirmar a banda de CD100 pelo reconhecimento pelo anticorpo Anti-mouse Semaphorin 4D/CD100, e a figura 18 comprova a presença da proteína CD100 na fração purificada, com os tamanhos esperados de 130 e 150KDa (clivada e com porção transmembrana, respectivamente).

Figura 18 - Western Blot da proteína CD100-Fc utilizando anticorpo Anti-mouse Semaphorin 4D/CD100.

Fonte: Galuppo (2012).

4.11 Expressão de iNOs, TGF β , IL1 β e TNF α em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100

Macrófagos liberam produtos com capacidade de inibição ou promoção da proliferação celular e atração quimiotática (NATHAN, 1987). Macrófagos do tipo M1 (C57BL/6) após estímulo com LPS (lipopolissacarídeo) são ativados e produzem óxido nítrico (NO) a partir de arginina, enquanto que macrófagos M2 (BALB/c, DBA/2) sob o mesmo estímulo aumentam metabolismo de arginina para ornitina, produzindo poliaminas e promovendo proliferação de parasitas intracelulares como *Leishmania* (MILLS et al., 2000). De fato, M1 e M2 são subtipos extremos de macrófagos que apresentam os padrões de ativação clássica e alternativa, respectivamente (GORDON, 2003, FAIRWEATHER e CIHAKOVA, 2009).

Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos BALB/c estimulados com LPS expressam altos níveis de iNOs, TNF α e IL1 β (CARRERA et al., 1996). A iNOS é uma das enzimas responsáveis pela produção do óxido nítrico (NO). O NO é produzido em células eucarióticas por três isoformas da sintase de NO (NOS), sendo a NOS indutível (iNOS ou NOS2) caracterizada por alta produção da molécula e regulação transcricional e pós-transcricional por diversas citocinas (WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010). O macrófago é a célula protótipo para a síntese de NO por iNOS (NOS2), e o NO é uma importante molécula microbicida para esse fagócito (GAUR, ROBERTS et al., 2007, WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010). Além do NO, a IL-1 β e o TNF- α têm um importante papel leishmanicida. A IL-1 β é secretada por macrófagos,

monócitos, células de Langerhans e células dendríticas (DCs), e induz a expressão de moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas, enzimas proteolíticas e proteínas de matriz em vários tipos de células da pele, incluindo queratinócitos, células endoteliais e fibroblastos, estimulando a inflamação (MURPHY et al., 2000). Além disso, a IL-1 β participa de processos de crescimento de células B e produção de anticorpos (PEREIRA e ALVES 2008). O TNF- α é secretado por macrófagos e queratinócitos (JI et al., 2003, BARTON, 2008), e suas funções são fundamentais na ativação de células T durante o processo de apresentação de antígenos e no aumento da capacidade microbicida de neutrófilos (AFONSO et al., 2008). O TGF- β inibe a síntese de NO pelo macrófago, além de reduzir a produção de IL-1 β e TNF- α (VODOVOTZ et al., 1993, MCDONALD et al., 1999). Quando amastigotas ou promastigotas de *Leishmania* expõem fosfatidilserina (PS) em sua membrana levam à liberação de TGF- β pelos macrófagos, criando um ambiente antiinflamatório (WANDERLEY e BARCINSKI, 2010). Além dos macrófagos, células T reguladoras (Treg) CD4+CD25+ produzem TGF- β e podem contribuir para a proliferação destes parasitas e progressão da doença. De fato, essas células são as principais fontes de TGF- β e IL-10 nas lesões por *Leishmania amazonensis*. Elas suprimem a proliferação celular e a produção de IL-2 e IFN- γ por células T presentes no local, e sua participação no desenvolvimento da leishmaniose é bastante complexa (JI et al., 2005).

Com base nos dados mencionados acima, decidimos quantificar as expressões de iNOs (NOS2), TGF β , IL1 β e TNF α em macrófagos peritoneais do tipo M1 e M2 incubados com LPS e/ou sCD100. Com esses experimentos buscamos avaliar se CD100 murino possui um papel pró-inflamatório sobre o macrófago semelhante ao do LPS, ou um papel antiinflamatório, reduzindo o aumento de iNOs, IL1 β e TNF α resultante do estímulo com LPS. Como mencionado anteriormente, o único trabalho realizado nesse sentido mostrou que CD100 induziu IL-10 em monócitos humanos e reduziu as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- α (CHABBERT-DE PONNAT et al., 2005).

As incubações com CD100 e/ou LPS foram feitas por 6 e 18 horas e a quantificação relativa dos transcritos foi determinada por Real Time RT-PCR. Os dados são apresentados nas figuras 19 e 20.

Figura 19 - Expressão relativa de iNOs, TGF β , IL1 β , TNF α em macrófagos de BALB/c estimulados ou não com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 6 e 18 horas, por Real-Time RT-PCR.

Razão estimulado/controlado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. . *: $p \leq 0,05$.
Fonte: Galuppo (2012).

Figura 20 - Expressão relativa de iNOs, TGF β , IL1 β , TNF α em macrófagos de C57BL/6 estimulados ou não com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 6 e 18 horas, por Real-Time RT-PCR.

Razão estimulado/controlado de três experimentos independentes. Análise estatística utilizada: ANOVA. *: $p \leq 0,05$.
Fonte: Galuppo (2012).

Na figura 19 podemos observar que macrófagos de animais BALB/c incubados com LPS por 6 horas expressam significativamente mais IL1 β , e tendem a expressar mais iNOs, TGF β e TNF α . Após um período de incubação de 18 horas com LPS houve um aumento sem diferença estatística significativa de iNOs, IL1 β e TNF α . Quando macrófagos de animais BALB/c foram incubados com a combinação de LPS+sCD100, notou-se uma diminuição não estatisticamente

significativa da expressão de iNOs (18 horas) e IL1 β (6 horas) em relação a expressão induzida por LPS. Incubações apenas com sCD100 aumentaram de forma não significativa a expressão de TNF α (18 horas).

Na figura 20 apresentamos os resultados das mesmas análises realizadas com macrófagos de camundongos C57BL/6. Quando as células foram incubadas com LPS houve uma tendência de aumento, estatisticamente não significativo, na expressão de iNOs (6 e 18 horas), TGF β (6 horas), IL1 β (6 e 18 horas) e TNF α (6 e 18 horas), quando comparados ao controle. Incubações com LPS+sCD100 tendem a diminuir (embora não significativamente) a expressão relativa de iNOs (18 horas) e TGF β (6 horas) e aumentar a expressão de IL1 β (18 horas) comparadas ao estímulo com LPS. Quando macrófagos foram incubados apenas com sCD100, as expressões relativas de iNOs, TGF β , IL1 β e TNF α (6 e 18 horas) não mudaram em relação ao controle.

4.12 Produção de nitrito por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100

Há trabalhos apontando para falta de correlação entre mudanças na expressão de iNOS (RNA) e produção de nitrito em macrófagos sob diferentes estímulos, inclusive infecção por *Leishmania* (BALESTIERI et al., 2002, WILKINS-RODRIGUEZ et al., 2010, CORTEZ et al., 2011). Por essa razão, analisamos a produção de nitrito nos macrófagos estimulados com LPS e/ou sCD100 nas concentrações usadas para análise da expressão de citocinas e iNOS (itens 3.6, 3.16 e 3.11). Após estímulos de 6 e 18 horas não houve produção mensurável de nitrito (dados não mostrados), provavelmente pela diferença entre o tempo necessário para transcrição e tradução/atividade da enzima e pela pouca sensibilidade do método de Griess em comparação com RealTime RT-PCR.

Na figura 21 mostramos os dados referentes às medidas feitas após 24 e 48 horas de estímulo em macrófagos BALB/c.

Figura 21 - Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de BALB/c estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 24 e 48 horas.

Resultado de 3 experimentos. Análise estatística utilizada: ANOVA. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Observamos que macrófagos de camundongos BALB/c estimulados com LPS e LPS+sCD100 produziram mais nitrito em ambos os tempos de incubação. Quando incubados apenas com sCD100 a expressão não mudou comparada ao controle.

Na figura 22 mostramos os dados referentes aos macrófagos C57BL/6.

Figura 22 - Dosagem de nitrito no sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 estimulados com LPS, LPS+sCD100 e sCD100 por 24 e 48 horas.

Resultados de 3 experimentos. Análise estatística utilizada: ANOVA. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Pode-se observar que a produção de nitrito no sobrenadante de cultura de macrófagos de animais C57BL/6 aumentou significativamente em relação ao controle (não estimulado) para células estimuladas com LPS ou LPS+sCD100 durante 24 horas e quando estimuladas apenas com LPS durante 48 horas. Quando as células foram incubadas apenas com sCD100, a produção de nitrito foi estatisticamente igual ao controle.

Podemos concluir que nas condições analisadas o sCD100 não é capaz de modular a produção de nitrito pelos macrófagos das duas linhagens murinas.

4.13 Análise da viabilidade de *L. amazonensis* na presença de sCD100 por ensaios de MTT

Como mostrado nos experimentos anteriores, sCD100 nas concentrações e condições usadas não modulou a produção de NO ou citocinas pelos macrófagos. Buscamos então avaliar se essa molécula modularia a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis*.

Antes de realizarmos esses experimentos analisamos se sCD100 teria alguma ação direta sobre a viabilidade dos promastigotas que seriam utilizados nas infecções de macrófagos. Para as infecções formas promastigotas de *L. amazonensis* no sétimo dia de cultivo são mantidas em contato com macrófagos em RPMI suplementado pH 7,2 e sCD100 a 37 °C, 5% de CO₂ durante 4

horas. Para verificar se sCD100 afeta a viabilidade dos parasitas realizamos um ensaio de MTT nessas condições de incubação. Em paralelo incubamos os parasitas com sCD100 em meio Warren a 24 °C, condições normais de crescimento das promastigotas. Os resultados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes temperaturas e meios com sCD100 em relação ao controle (mesmo meio, sem sCD100).

Condições	D.O. / % de viabilidade
RPMI + sCD100 (37 °C)	0,032/ 98,99%
RPMI controle (37 °C)	0,033
Warren + sCD100 (24 °C)	0,339/ 109,71%
Warren controle (24 °C)	0,309

Fonte: Galuppo (2012).

Como podemos observar a adição de sCD100 não alterou em mais/menos de 10% a viabilidade dos parasitas na condição de infecção (RPMI a 37 °C) nem na condição de cultivo das promastigotas. Prosseguimos então com os experimentos de infecção na presença de sCD100.

4.14 Efeito de CD100 solúvel sobre a infecção de macrófagos de animais C57BL/6 e BALB/c por *L. amazonensis*

Para analisar se sCD100 modula a infecção de macrófagos peritoneais residentes por *Leishmania amazonensis* foram realizados experimentos de infecção com formas promastigotas na proporção de 5 parasitas por macrófago de camundongos BALB/c e C57BL/6 em diferentes condições de incubação com sCD100, como descrito no item 3.17. Buscamos com esse experimento analisar se a pré-incubação do macrófago com sCD100 alteraria sua capacidade fagocítica e leishmanicida, se a incubação com sCD100 durante a infecção afetaria a fagocitose e se a incubação com sCD100 após 4 horas de infecção mudaria a sobrevida/multiplicação dos parasitas.

Os dados com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c são representados na figura 23.

Figura 23 - Efeito de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Observamos na figura 23 que quando macrófagos de animais BALB/c são pré-tratados com sCD100 durante 24 horas o índice de infecção aumenta quando comparado ao controle em

infecção de 4 horas e tende a aumentar (sem diferença estatisticamente significativa) em infecções de 24 e 48 horas.

As incubações com sCD100 durante as 4 horas de infecção não modularam significativamente a infecção em nenhum dos tempos analisados, mas há uma tendência de aumento no índice em infecções de 4 e 48 horas. Adicionando sCD100 após as 4 horas de infecção, observamos que o índice tende a aumentar apenas no período de 48 horas de infecção.

Realizamos então um experimento no qual os macrófagos foram pré-incubados com sCD100 por 24 horas, mantidos com CD100 durante 4 horas de infecção (contato com parasita) e incubados com sCD100 até o momento de análise da infecção (4, 24 ou 48 horas de infecção). Os dados são mostrados na figura 24.

Figura 24 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.

Fonte: Galuppo (2012).

Podemos observar que quando macrófagos de animais BALB/c são incubados com sCD100 durante todo o período o índice de infecção aumenta em 4 e 24 horas de infecção.

A figura 25 nos mostra a porcentagem de macrófagos de BALB/c infectados após incubação ou não com sCD100 antes, durante e após a infecção. Esta análise é complementar ao experimento da figura 24.

Figura 25 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.

Fonte: Galuppo (2012).

Podemos observar que macrófagos de animais BALB/c incubados com sCD100 são mais infectados quando comparados ao controle (não incubado com sCD100) nos períodos de 4, 24 e 48 horas de infecção.

A figura 26 nos mostra o número de amastigotas por macrófago infectado na presença ou não de sCD100 nos períodos de 4, 24 e 48 horas de infecção.

Figura 26 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o número de amastigotas por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.

Fonte: Galuppo (2012).

Notamos que macrófagos de animais BALB/c em contato com sCD100 possuem um número maior de amastigotas em seu interior nos períodos de 4 e 24 horas de infecção. Concluimos então que o aumento observado nos índices de infecção na presença de sCD100 deve-se aos aumentos na proporção de macrófagos infectados e o número de amastigota por macrófago.

A partir destas análises, podemos postular que sCD100 é capaz de modular a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, além de alterar a sobrevivência/multiplicação dos parasitas em seu interior.

As figuras 27, 28, 29 e 30 mostram experimentos iguais aos das figuras 23, 24, 25 e 26 realizados com macrófagos de camundongos C57BL/6.

Figura 27 - Efeito de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos *C57BL/6* infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de um experimento representativo de três. *: $p \leq 0,05$.

Fonte: Galuppo (2012).

Na figura 27 observamos que para infecções de 4 horas o índice aumenta em relação ao controle quando os macrófagos de *C57BL/6* são pré-tratados com sCD100 durante 24 horas e quando entram em contato com o sCD100 durante as 4 horas de infecção. Nas infecções de 24 e

48 horas os índices de infecção não mudaram significativamente em nenhuma das condições de incubação com sCD100.

Na figura 28 são mostrados os resultados das infecções realizadas na presença constante de sCD100, inclusive antes da infecção (pré-tratamento do macrófago por 24 horas).

Figura 28 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o índice de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos *C57BL/6* infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.

Fonte: Galuppo (2012).

De forma semelhante ao observado para BALB/c o índice de infecção aumenta na presença de sCD100, mas nos tempos de 4, 24 e 48 horas de infecção quando comparado ao controle.

A figura 29, complementar ao experimento da figura 28, mostra a porcentagem de macrófagos de animais C57BL/6 infectados por 4, 24 e 48 horas na presença constante ou não de sCD100.

Figura 29- Efeito da presença contínua de sCD100 sobre a porcentagem de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitas por macrófago durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.
Fonte: Galuppo (2012).

Observamos que macrófagos de animais C57BL/6 incubados com sCD100 são significativamente mais infectados quando comparados ao controle apenas no período de 4 horas de infecção, embora haja uma tendência de aumento em 48 horas.

A figura 30 nos mostra o número de amastigotas por macrófago infectado na presença ou não de sCD100 durante os períodos de 4, 24 e 48 horas de infecção.

Figura 30 - Efeito da presença contínua de sCD100 sobre o número de amastigota por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* durante 4, 24 e 48 horas.

Análise estatística utilizada: teste t. Resultado de um experimento representativo de três.

Fonte: Galuppo (2012).

Observamos que os macrófagos de camundongo C57BL/6 em constante contato com sCD100 apresentam maior número de amastigotas nos tempos de 4 e 48 horas de infecção (diferença estatisticamente significativa). Podemos concluir que o aumento observado nos índices de infecção de macrófagos de C57BL/6 na presença de sCD100 deve-se ao aumento na proporção de macrófagos infectados e especialmente ao crescimento do número de amastigotas por macrófago.

Com estes dados, podemos postular que, como mencionado para macrófagos de camundongos BALB/c, sCD100 é capaz de modular a capacidade fagocítica de macrófagos de camundongos C57BL/6 no início da infecção (4 horas), além de alterar a sobrevivência/multiplicação dos parasitas em seu interior.

5 CONCLUSÃO GERAL

Com o conjunto de dados apresentados podemos concluir que macrófagos peritoneais residentes de animais BALB/c e C57BL/6 expressam CD100, sendo que macrófagos de BALB/c tendem a expressar mais quando comparados aos macrófagos dos animais C57BL/6. Macrófagos recrutados com tioglicolato e macrófagos medulares também expressam CD100, os últimos em menor quantidade.

A maior parte de nossos experimentos sugeriu que macrófagos dos animais C57BL/6 tendem a controlar mais a infecção com *L. amazonensis* quando comparados aos macrófagos de animais BALB/c, corroborando com dados da literatura de que macrófagos M1 (C57BL/6) são mais resistentes à infecção com *L. major* do que macrófagos M2 (BALB/c) (MILLS et al., 2000). Visto que macrófagos de C57BL/6 controlam mais a infecção a partir de 48 horas de incubação com o parasita, tempo onde se tem a menor expressão de CD100, e que o mesmo é observado para macrófagos de camundongos BALB/c no tempo de 24 horas de incubação, podemos especular que a diminuição de expressão de CD100 pode estar relacionada com a diminuição de infecção por *Leishmania*. Interessantemente, macrófagos de C57BL/6 expressam menos CD100 e esses animais sabidamente controlam melhor a infecção por *Leishmania in vivo*.

Avaliamos o efeito de CD100 solúvel na infecção de macrófagos das duas linhagens. Os resultados nos permitiram concluir que a presença dessa molécula antes e depois da adição do parasita é capaz de aumentar significativamente a infecção dos macrófagos por *L. amazonensis*.

REFERÊNCIAS

- GIL, A.; STAROBINAS, N. Estudo comparativo da ativação de macrófagos de linhagens de camundongo geneticamente selecionados para a reatividade inflamatória aguda. 2008; 85 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.
- AFONSO, L. et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, n. 2, p. 389-96, 2008.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2952-9, 1993.
- ALBINI, A.; SPORN M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat. Ver. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 139-47, 2007.
- ALMEIDA, S. R. et al. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. **Int Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 1193-201, 2001.
- BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect.**, v. 4, n. 1, p. 23-9, 2002.
- BARBERIS, D. et al. Plexin signaling hampers integrin-based adhesion, leading to Rho-kinase independent cell rounding, and inhibiting lamellipodia extension and cell motility. **FASEB J.**, v. 18, n. 3, p. 592-4, 2004.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 2, p. 413-20; 2008.
- BASILE, J. R. et al. Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 24, p. 9017-22, 2006.
- BASILE, J. R. et al. MT1-MMP controls tumor-induced angiogenesis through the release of semaphorin 4D. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 9, p. 6899-905, 2007.
- BAUMGARTH, N. et al. The role of B-1 and B-2 cells in immune protection from influenza virus infection. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, n. 252, p. 163-9, 2000.
- BAUMGARTH, N. et al. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 2, p. 271-80; 2000.

- BIELLENBERG, D. R.; KLAGSBRUN, M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 26, n. 3-4, p. 421-31, 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, n. 2, p. 318-23, 1992.
- CARRERA, L. et al. Leishmania promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 2, p. 515-26, 1996.
- 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. et al. Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively. **Int. Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 439-47, 2005.
- CHER, D. J.; MOSMANN, T. R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **J. Immunol.**, v. 138, n. 11, p. 3688-94, 1987.
- CORTEZ, M. et al. Leishmania promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 6, p. 463-71, 2011.
- DELAIRE, S. et al. Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration. **J. Immunol.**, v. 166, n. 7, p. 4348-54, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.
- DING, A. H. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, n. 7, p. 2407-12, 1988.
- ELHABAZI, A. et al. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. **J. Immunol.**, v. 166, n. 7, p. 4341-7, 2001.
- ELHABAZI, A. et al. Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 23, n. 1-2, p. 65-81, 2003.
- FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. **J. Autoimmun.**, v. 33, n. 3-4, p. 222-30, 2009.
- FURUYAMA, T. et al. Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 52, p. 33376-81, 1996.
- GABROVSKA, P. N. et al. Semaphorin-plexin signalling genes associated with human breast tumourigenesis. **Gene**, v. 489, n. 2, p. 63-9, 2011.

- GAUR, U. et al. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 179, n. 12, p. 8446-53, 2007.
- GERETTI, E. et al. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 31-9, 2008.
- GHOSN, E. E. et al. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 6, p. 2568-73, 2010.
- GIORDANO, S. et al. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. **Nat. Cell. Biol.**, v. 4, n. 9, p. 720-4, 2002.
- GIORGIO, S. et al. Leishmania amazonensis infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. **Acta Trop.**, v. 70, n. 1, p. 119-22, 1998.
- GLEW, R. H. et al. Biochemistry of the Leishmania species. **Microbiol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 412-32, 1988.
- GORDON, S. Mononuclear phagocytes in immune defence. Available from: **Immunology (I. Roitt, J. Brostoff, D. Male eds)**, Chapter 9, p. 1-13, Mosby, London, 2001.
- GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, 2003; 3(1):23-35.
- GRANZIERO, L. et al. CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1962-9, 2003.
- GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 6, n. 3, p. 230-50, 1993.
- HALL, K. T. et al. Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, n. 21, p. 11780-5, 1996.
- HEROLD, C. et al. Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb. **Int. Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 1995.
- HOOVER, D. L.; NACY, C. A. Macrophage activation to kill Leishmania tropica: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. **J. Immunol.**, v. 132, n. 3, p. 1487-93, 1984.
- IBANEZ, O. M. et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 2555-63, 1992.
- INIESTA, V. et al. Arginase I induction during Leishmania major infection mediates the development of disease. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6085-90, 2005.

- INIESTA, V. et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites. **Parasite Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 113-8, 2002.
- IVES, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775-8, 2011.
- JANSSEN, B. J. et al. Structural basis of semaphorin-plexin signalling. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1118-22, 2010.
- Ji, J. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during Leishmania amazonensis infection. **J. Immunol.**, v. 174, n. 11, p. 7147-53, 2005.
- Ji, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 66, n. 4, p. 338-45, 2002.
- Ji, J. et al. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 8, p. 4278-88, 2003.
- JONES, D. E. et al. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during Leishmania amazonensis infection. **J. Immunol.**, v. 165, n. 1, p. 364-72, 2000.
- KATO, S. et al. Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer. **Cancer Sci.**, v. 102, n. 11, p. 2029-37, 2011.
- KIKUTANI, H.; KUMANOGOH, A. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 159-67, 2003.
- KUMANOGOH, A.; KIKUTANI, H. The CD100-CD72 interaction: a novel mechanism of immune regulation. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 670-6, 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.**, v. 169, n. 3, p. 1175-81, 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. 621-31, 2000.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.
- LEWIS, C. E.; POLLARD, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. **Cancer Res.**, v. 66, n. 2, p. 605-12, 2006.

- 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.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LONARDONI, M. V. et al. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6355-61, 2000.
- MCDONALD, P. P. et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 163, n. 11, p. 6164-72, 1999.
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6166-73, 2000.
- MIZRAHI, S. et al. CD100 on NK cells enhance IFNgamma secretion and killing of target cells expressing CD72. **PLoS One.**, v. 2, n. 9, p. e818, 2007.
- 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. 9229-39, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-57, 1986.
- MURPHY, J. E. et al. Interleukin-1 and cutaneous inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 114, n. 3, p. 602-8, 2000.
- NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, n. 2, p. 319-26, 1987.
- NEGISHI-KOGA, T. et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. **Nat. Med.**, v. 17, n. 11, p. 1473-80, 2011.
- O'GARRA, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 711-7, 1992.
- PAN, C. et al. CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation. **Immunity**, v. 11, n. 4, p. 495-506, 1999.

PEREIRA, B. A.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Vet. Parasitol.**, v. 158, n. 4, p. 239-55, 2008.

POPI, A. F. et al. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Immunology**, v. 113, n. 3, p. 348-54, 2004.

RAY, A.; DITTEL, B. N. Isolation of mouse peritoneal cavity cells. **J. Vis. Exp.**, n. 35, p. 1488, 2010.

SANTOS, C. X. et al. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, n. 4, p. 989-98, 2009.

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, C. H. et al. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. **J. Immunol.**, v. 177, n. 5, p. 3201-8, 2006.

SHI, W. et al. The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 633-42, 2000.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 378-87, 1994.

SIERRA, J. R. et al. Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 7, p. 1673-85, 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. 1230-8, 2011.

STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-8, 1988.

SUN, Q. et al. Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 46, p. 32066-74, 2009.

SUZUKI, H. et al. Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. **Science**, v. 283, n. 5400, p. 390-2, 1999.

- SUZUKI, K. et al. CD100/Sema4D, a lymphocyte semaphorin involved in the regulation of humoral and cellular immune responses. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 14, n. 1, p. 17-24, 2003.
- SUZUKI, K. et al. Semaphorins and their receptors in immune cell interactions. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 17-23, 2008.
- SWIERCZ, J. M. et al. Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology. **Neuron**, v. 35, n. 1, p. 51-63, 2002.
- TOYOFUKU, T.; KIKUTANI, H. Semaphorin signaling during cardiac development. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n. 600, p. 109-17, 2007.
- 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. 1373-84, 2007.
- TSUNAWAKI, S.; NATHAN, C. F. Enzymatic basis of macrophage activation. Kinetic analysis of superoxide production in lysates of resident and activated mouse peritoneal macrophages and granulocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 259, n. 7, p. 4305-12, 1984.
- VODOVOTZ, Y. et al. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **J. Exp. Med.**, v. 178, n. 2, p. 605-13, 1993.
- WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cell Mol. Life. Sci.**, v. 67, n. 10, p. 1653-9, 2010.
- WANG, X. et al. Functional soluble CD100/Sema4D released from activated lymphocytes: possible role in normal and pathologic immune responses. **Blood**, v. 97, p. 11, n. 3498-504, 2001.
- WEINBERG, J. B. In vivo modulation of macrophage tumoricidal activity: enhanced tumor cell killing by peritoneal macrophages from mice given injections of sodium periodate. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, n. 3, p. 529-33, 1981.
- WHO. World Health Organization. 2007. Available from: [http: www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr). Accessed: Jan 5, 2012.
- WILKINS-RODRIGUEZ, A. A. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase by Leishmania mexicana amastigotes in murine dendritic cells. **Exp. Parasitol.**, v. 126, n. 3, p. 426-34, 2010;
- YAMAGUCHI, W. et al. Sema4D as an inhibitory regulator in oligodendrocyte development. **Mol Cell Neurosci**, v. 49, n. 3, p. 290-9, 2011.
- 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.

ZALATNAI, A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. **Curr. Mol. Med.**, v. 6, n. 6, p. 685-93, 2006.

ZHU, L. et al. Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, n. 5, p. 1621-6, 2007.