



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ADESÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES AO
TECIDO CONJUNTIVO NA LEISHMANIOSE: PAPEL
DE INTEGRINAS β_1 E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS**

NATHANAEL DE FREITAS PINHEIRO JUNIOR

Salvador - Bahia - Brasil

2006

3:593.1



001645

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

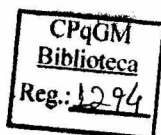
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ADESÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES AO
TECIDO CONJUNTIVO NA LEISHMANIOSE: PAPEL
DE INTEGRINAS β_1 E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS**

NATHANAEL DE FREITAS PINHEIRO JUNIOR

Orientador: Dr. Washington Luís Conrado dos Santos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação
em Patologia, área de concentração Patologia
Experimental, da Universidade Federal da Bahia,
como requisito para a obtenção do grau de Mestre
em Patologia.



Salvador - Bahia
2006

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P654a Pinheiro Junior, Nathanael de Freitas
Adesão de fagócitos mononucleares ao tecido conjuntivo na leishmaniose: Papel de Integrinas Beta-1 e receptores de quimiocinas – [manuscrito]. / Nathanael de Freitas Pinheiro Junior. - 2005.
89 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Dr. Washington Luis Conrado dos Santos. Laboratório de Patologia e Biointervenção.

1. Fagócitos. 2. Macrófagos. 3. Moléculas de adesão. 4. Leishmania. I. Título.

CDU 611.018.53:593.1

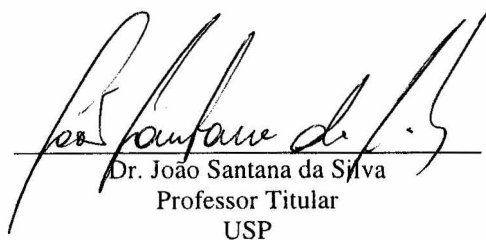
PHIL
M.F.U. 1334
00 1645

ADESÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES AO TECIDO CONJUNTIVO NA LEISHMANIOSE: PAPEL DE INTEGRINAS β_1 E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS


NATHANAEL DE FREITAS PINHEIRO JUNIOR

FOLHA DE APROVAÇÃO

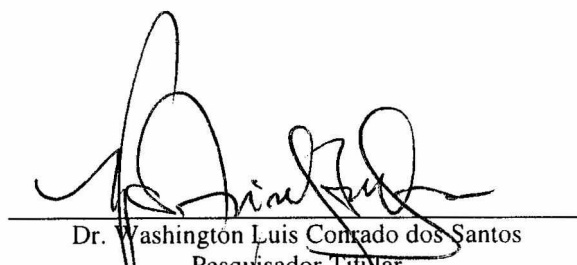
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. João Santana da Silva
Professor Titular
USP



Dra. Camila Indiani de Oliveira
Pesquisadora Titular
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Ao meu mestre, Dr. Washington Luís Conrado dos Santos

Pela atenção, dedicação, entusiasmo e pelos ensinamentos e discussões de conteúdo pessoal, filosófico e até mesmo científico: um exemplo de postura e conduta frente às questões da ciência e de suas fronteiras.

À Nana

Minha grande companheira que, com tanto amor, me dá suporte, estímulo, carinho e equilíbrio: Fundamental em todas as minhas conquistas.

Aos meus pais e irmãos

Que têm sido cruciais para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho

Pelo apoio, revisão crítica deste e de outros textos e pelo incentivo durante o período de iniciação científica no antigo LIMC.

Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Pela liderança do LPBI e pela minha primeira oportunidade de realizar IC.

À Micely d'El-Rei Hermida

Grande amiga e colega mais que dedicada. Sem a sua participação, esse trabalho seria inviável.

À Cláudia Santana e Mariana Macedo

Amigas do laboratório que tornam o trabalho mais fácil e divertido. Em especial à Mariana pela oportunidade de co-orientá-la em sua IC.

A Ricardo Lima

Um amigo inestimável desde tempos de IC, pelos momentos de apoio mútuo.

À Lenita dos Santos

Que pacientemente me iniciou nas práticas do laboratório durante a IC.

À Elivani dos Santos (Lívia)

Técnica competente e dedicada, que possibilita, anonimamente e com satisfação visível, todos os trabalhos em andamento no laboratório.

Ao CNPq e à FAPESB

Pelas bolsas de mestrado, concedida entre março de 2004 e junho de 2005, e de DTR, concedida desde julho de 2004, e pelo financiamento do projeto que deu origem a esta dissertação.

À Fiocruz e ao CPqGM

Pela infra-estrutura física e pessoal que possibilitaram a execução dos experimentos desta dissertação, e pelo ambiente de trabalho ameno e positivo que encontramos neste centro.

Eis que a Ciência, esse sistema exato de conhecimentos, ultrapassa os campos da imaginação... Cuidado, artistas, escritores, poetas, homens que viveis de criar mundos imaginários! Os cientistas, dentro do seu minucioso mundo matemático, invadem também o vosso, e com que grau de beleza! [...] Realmente penetram o Infinito, na mais prodigiosa viagem de que já houve notícia.

Vinícius de Moraes

RESUMO

ADESÃO DE FAGÓCITOS MONONUCLEARES AO TECIDO CONJUNTIVO NA LEISHMANIOSE: PAPEL DE INTEGRINAS β_1 E RECEPTORES DE QUIMIOCINAS. **Nathanael de Freitas Pinheiro Junior**. Parasitos do gênero *Leishmania* podem causar lesões na pele, mucosas ou vísceras. Os mecanismos que regulam o tropismo do parasito não estão bem esclarecidos, mas moléculas na superfície de fagócitos infectados podem ter um papel importante. Nosso grupo demonstrou anteriormente que a infecção por *Leishmania* reduz a adesão de fagócitos mononucleares ao tecido conjuntivo inflamado. Uma vez que a perda de adesão ao tecido conjuntivo é o primeiro passo para a migração celular, este fenômeno pode estar relacionado com a habilidade destas células em deixar o tecido inflamado em direção ao linfonodo drenante. Nesta dissertação, nós examinamos o papel de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas na perda de adesão de fagócitos mononucleares ao tecido conjuntivo inflamado. Para isso nós empregamos análises de citometria de fluxo de moléculas de adesão em fagócitos infectados com *Leishmania* marcada com fluorocromo. Além disso, realizamos ensaios de adesão celular e análise de expressão de RNAm para receptores de quimiocinas através de RT-PCR em tempo real. Nós observamos que a porcentagem de células infectadas ($r=-0,826$; $P=0,003$) e o número de parasitos por célula infectada ($r=-0,917$; $P=0,028$) se correlacionaram negativamente com a adesão ao tecido conjuntivo. A redução na adesão celular induzida pela infecção por *Leishmania* (58,7 à 75,0%; $P=0,005$) ocorreu tão cedo quanto duas horas após a infecção e foi mantida por pelo menos 24 horas. A infecção com apenas 0,6 parasito por célula reduziu a adesão em 27,9 a 44,6% ($P<0,001$). O bloqueio na adesão celular foi mantido pela infecção por *Leishmania*, mas pela fagocitose de parasitos mortos (adesão celular variou de 15,2% abaixo a 24,0% acima do controle; $P>0,05$). A infecção por *Leishmania* também reduziu a adesão celular a fibronectina (54,1 a 96,2%, $P<0,01$), colágeno (15,7 à 83,7%, $P<0,05$) ou laminina (59,1 à 82,2%, $P<0,05$). Não houve modulação da expressão de VLA4, VLA5, LFA-1, Mac-1, L-Selectina, ICAM-2 OU VCAM-1 na superfície de células infectadas. Entretanto, a população CD11b^{hi} apresentava alta taxa de infecção (49,6 a 97,3%). A substituição de Ca^{+2} e Mg^{+2} por Mn^{+2} reverteu a inibição causada pela *Leishmania* ($P<0,05$) e este fenômeno foi bloqueado por anticorpos anti-VLA4 ($P<0,0001$). A expressão dos receptores de quimiocinas CCR4 e CCR5 estava diminuída 16 horas após a infecção (2,8 a 4,1 vezes e 1,9 a 2,8 vezes, respectivamente). Estes dados sugerem fortemente que mecanismos que regulam a função de integrinas estão implicados na redução de adesão celular na leishmaniose. Este efeito pode ser devido à redução dos receptores de quimiocinas observada aqui ou pode ainda ser parte de um efeito inibitório mais geral da infecção dos fagócitos por *Leishmania*.

Palavras-chave: Fagócitos; Macrófagos; Moléculas de adesão; *Leishmania*

ABSTRACT

MONONUCLEAR PHAGOCYTE-CONNECTIVE TISSUE ADHESION IN LEISHMANIASIS: ROLE OF β_1 -INTEGRIN AND CHEMOKINE RECEPTORS.

Nathanael de Freitas Pinheiro Junior. *Leishmania* sp. are intracellular parasites that may cause lesions in the skin, mucosa and viscera. The mechanisms regulating the tropism of the parasite are not well understood, but molecules on the surface of the parasite-infected phagocytes may play a role. We have previously shown that *Leishmania* infection reduces mononuclear phagocyte adhesion to inflamed connective tissue. As de-adhesion is the first step to cell migration, this phenomenon may be related to the ability of these cells to leave tissue and migrate to the draining lymph node. In this work, we examined the role of adhesion molecules and chemokines in the loss of adhesion of mononuclear phagocytes to the inflamed connective tissue. To do so, we employed flow cytometry analysis of adhesion molecules in fluorescently-stained *Leishmania*-infected phagocytes, together with cell adhesion assays and real-time RT-PCR for chemokine receptors known to be present on mononuclear phagocytes. We found that infection rate ($r=-0.826$, $P=0.003$) and parasite burden ($r=-0.917$, $P=0.028$) negatively correlated to mouse phagocyte adhesion. The decrease in phagocyte adhesion to connective tissue, induced by *Leishmania* (58.7 to 75.0% inhibition, $P=0.005$), occurred as early as 2h after infection and was maintained in a plateau for at least 24h. The infection with 0.6 *Leishmania* per cell reduced phagocyte adhesion in 27.9 to 44.6% ($P<0.001$). Impairment in cell adhesion was sustained by phagocyte infection but not after phagocytosis of killed parasites (cell adhesion varied from 15.2% below to 24.0% above the control levels, $P>0.05$). *Leishmania* infection also diminished cell adhesion to fibronectin (54.1 to 96.2%, $P<0.01$), collagen (15.7 to 83.7%, $P<0.05$) and laminin (59.1 to 82.2%, $P<0.05$). There was no modulation of VLA4, VLA5, LFA-1, Mac-1, L-selectin, ICAM-2 or VCAM-1 surface expression on the infected cells. However, the CD11b^{hi} sub-population was highly infected (49.6 to 97.3%). Replacement of Ca⁺² and Mg⁺² by Mn⁺² reverted the inhibition caused by *Leishmania* ($P>0.05$) and this reversion was blocked by anti-VLA4 antibodies ($P<0.0001$). Expression of CCR4 and CCR5 mRNA was downregulated 16h after infection (2.8 to 4.1 times and 1.9 to 2.8 times, respectively). These data suggest that mechanisms regulating integrin function are implicated in the change of macrophage adhesion in leishmaniasis. This may be due to the downregulation of chemokine receptors observed or may be part of a major inhibitory effect of *Leishmania* infection on the phagocytes.

Keywords: Phagocytes; Macrophages; Adhesion molecules; *Leishmania*

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
1 INTRODUÇÃO	10
1.1 A LEISHMANIOSE	10
1.1.1 Quadro clínico, epidemiologia e tratamento	10
1.1.2 Determinantes das formas clínicas	11
1.2 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	15
1.2.1 Circulação linfocitária	15
1.2.2 Migração de células mielóides	16
1.2.3 Migração através da barreira do endotélio venular	19
1.2.4 Regulação de integrinas	21
1.2.5 Migração do tecido inflamado ao linfonodo	23
1.2.6 Determinantes da diferenciação de monócitos	25
1.3 INTEGRINAS NA APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA	26
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 GERAL	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4 ARTIGO	30
4.1 MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO	31
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS	71
7 PERSPECTIVAS	72
8 REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origem e destino de monócitos do sangue periférico	18
Figura 2. Moléculas envolvidas nos diferentes estágios da migração celular do sangue para o tecido	20
Figura 3. Mecanismos de regulação da adesão mediada por integrinas	21
Figura 4. Vias intracelulares de regulação da função de integrinas	22
Figura 5. Migração de células dendríticas do tecido ao vaso linfático	24
Figure 1. Correlation between adhesion of peritoneal exudate cells to inflamed connective tissue and the intensity of infection, as measured by the percentage of infected phagocytes (A) and the number of parasites per infected cell (B)	60
Figure 2. Effect of infection time on the adhesion of mouse mononuclear phagocytes to the connective tissue	60
Figure 3. Effect of the infection with different <i>Leishmania</i>-to-phagocyte ratios in cell adhesion to connective tissue, two (A) or 24 hours (B) after infection	61
Figure 4. Effect of <i>Leishmania</i> infection in the adhesion of mouse mononuclear phagocytes to purified extra-cellular matrix components	61
Figure 5. Cell surface expression of adhesion molecules on mouse peritoneal exudate cells, two (A) or 24 hours (B) after infection with <i>Leishmania</i>.	62
Figure 6. Cell surface expression of adhesion molecules and infection rate in sub-populations of mouse peritoneal exudate cells 24 hours after culture	62
Figure 7. Effect of manganese ions on the <i>Leishmania</i>-infected phagocyte adhesion to fibronectin	63
Figure 8. Chemokine receptor mRNA expression by PEC, two (A) or sixteen hours (B) after incubation with <i>L. amazonensis</i>	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígeno (do inglês <i>antigen presenting cells</i>)
AMP	Adenosina m onofosfato
CCLs	Quimiocinas do tipo beta
CCRs	Receptores de quimiocinas do tipo beta
CD	Nomenclatura sistematizada de moléculas (do inglês <i>cluster differentiation</i>)
CX₃CLs	Quimiocina contendo 3 aminoácidos entre dois resíduos-chave de cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTH	Hipersensibilidade tardia (do inglês <i>delayed type hypersensitivity</i>)
EPAC	Proteína de troca diretamente ativada por AMP cíclico (do inglês <i>exchange protein directly activated by cyclic AMP</i>)
GTP	Guanosina t rifosfato
ICAM	Moléculas da superfamília das imunoglobulinas (do inglês <i>intercellular adhesion molecules</i>)
IL	Interleucina
JAMs	Moléculas presentes nas junções endoteliais (do inglês <i>junctional adhesion molecules</i>)
LCD	Leishmaniose c utânea d ifusa
LCL	Leishmaniose c utânea l ocalizada
LCM	Leishmaniose c utâneo- m ucosa
LFA-1	Antígeno associado a função de leucócitos (do inglês <i>leukocyte function associated antigen</i>)
LV	Leishmaniose v isceral
MDR	Transportador de membrana (do inglês <i>multi-drug resistance</i>)
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (do inglês <i>major histocompatibility complex</i>)
PECAM	P latelet e ndothelial c ell a dhesion m olecule
PI3K	Fosfatidil- i nositol- 3 -OH c inase
PKC	Proteína c inase C
Rap-1	Pequena GTPase (do inglês <i>regulator for cell adhesion and polarization type-1</i>)
RAPL	GTPase ligadora de Rap-1
RAS	Receptor de fatores de crescimento (do inglês <i>rat sarcoma</i>)
RHOA	Membro "A" da família de genes homólogos à RAS (do inglês <i>RAS homologue gene family, member A</i>)
RT-PCR	R everse- t ranscription- P olymerase c hain r eaction
TCR	Receptor de células T (do inglês <i>T-cell receptor</i>)
TGF-β	Fator de crescimento tumoral tipo beta (do inglês <i>tumor growth factor</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>tumor necrosis factor</i>)
VCAM	Moléculas da superfamília das imunoglobulinas (do inglês <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VLAs	Integrinas leucocitárias (do inglês <i>very late activation antigen</i>)

1 INTRODUÇÃO

1.1 A LEISHMANIOSE

1.1.1 Quadro clínico, epidemiologia e tratamento

A leishmaniose é um complexo de doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Estima-se que existam cerca de vinte espécies diferentes de *Leishmania* patogênicas para o homem e mais de trinta espécies de flebotomíneos vetores (GRIMALDI *et al.*, 1989). O ciclo da doença é iniciado quando fêmeas de flebotomíneos ingerem formas amastigotas de *Leishmania* durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. Estes parasitas diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas no trato digestivo do vetor, e são regurgitadas intradermicamente no local da picada durante novo repasto (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Os parasitos entram em fagócitos do hospedeiro e se multiplicam no interior de células permissivas. Em todas as formas da doença, fagócitos mononucleares são encontrados em linfonodos que drenam o sítio de inoculação parasitária e a gênese das lesões está intimamente associada à presença de macrófagos, em maior ou menor quantidade, albergando formas amastigotas do parasito (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Pode ser dividida clinicamente em quatro grandes formas: a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose visceral (LV) (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). A LCL apresenta-se mais comumente como uma úlcera solitária, de bordos elevados e fundo granuloso e úmido em áreas expostas (face e membros). Geralmente são autolimitadas e respondem bem ao tratamento. As lesões ulcerosas nas mucosas da boca, nariz e faringe da forma cutâneo-mucosa (LCM) causam extensa lesão tecidual, freqüentemente desfigurante. A LCD cursa com

lesões nodulares e usualmente não ulceradas. A LV acomete órgãos como fígado, baço e medula óssea, levando a um quadro febril com hepatoesplenomegalia maciça e anemia profunda, por vezes associada a leucopenia. É uma patologia grave e usualmente fatal se não tratada. Outras formas menos comuns de leishmaniose incluem a leishmaniose dérmica pós-calazar, a leishmaniose viscerotrópica, a leishmaniose recidivante, e a disseminada (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Estima-se que estas doenças acometam, anualmente, entre 1,5 e 2 milhões de pessoas em 88 países (WHO, 2002). Destes, 72 são países em desenvolvimento, incluindo os 13 mais pobres do mundo (WHO, 2002), o que torna os custos dessa doença especialmente problemáticos. O Brasil é o único que integra as listas dos países que concentram mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea e visceral, com cerca de 40 mil casos novos de leishmaniose cutânea e pelo menos seis mil casos novos de LV anualmente (mais de 80% no Nordeste) (WHO, 2002; DESJEUX, 2004).

Apesar do surgimento de resistência em algumas áreas (JACKSON *et al.*, 1990; GROGL *et al.*, 1992), atualmente a maior parte dos casos de leishmaniose é tratado com Glucantime e terapia de suporte (HERWALDT, 1999; BERMAN, 2005). Drogas alternativas, tais como a anfotericina B e, mais recentemente, a miltefosina (primeira alternativa para uso via oral) (SUNDAR *et al.*, 2002; SCHRANER *et al.*, 2005) também têm sido utilizadas, especialmente na falência do regime com antimonial (BERMAN, 2005). Estas drogas são tóxicas, caras e exigem acompanhamento estrito dos pacientes, o que aumenta consideravelmente os gastos com essa doença (HERWALDT, 1999; DESJEUX, 2004; BERMAN, 2005).

1.1.2 Determinantes das formas clínicas

As diferentes formas de leishmaniose estão intimamente associadas a grupos de espécies de *Leishmania* (GRIMALDI *et al.*, 1989; COLMENARES *et al.*, 2002). Apesar disso, espécies causadoras de formas tegumentares têm sido

isoladas de pacientes com acometimento visceral (BARRAL *et al.*, 1991), assim como espécies mais comumente causadoras de LV podem ser isoladas de pacientes com acometimento tegumentar (NOYES *et al.*, 1997; BELLI *et al.*, 1999; CAMPOS-PONCE *et al.*, 2005). Os determinantes de padrões tão diferentes de doença são apenas parcialmente conhecidos e parecem envolver fatores do patógeno (GRADONI & GRAMICCIA, 1994; LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000) e do hospedeiro. Diferentes características do hospedeiro podem influenciar tanto a sua susceptibilidade quanto a forma de apresentação clínica da leishmaniose. Dentre estes, o *status* imunológico (CERF *et al.*, 1987; GRADONI & GRAMICCIA, 1994), a idade (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995) e alelos de genes ligados ao sistema imune (BARBIER *et al.*, 1987; CABRERA *et al.*, 1995) têm sido estudados .

Estudos da infecção experimental de camundongos com *L. major* (SADICK *et al.*, 1986) ou *L. amazonensis* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987a) levaram a muitos avanços na compreensão da imunopatogênese da leishmaniose. Nestes modelos, a infecção de diferentes linhagens isogênicas de camundongos reproduz parcialmente algumas formas clínicas da leishmaniose humana (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987b).

Camundongos da linhagem BALB/c desenvolvem uma lesão progressiva que evolui inexoravelmente com disseminação do parasito para vísceras e morte do animal com anemia, hepato-esplenomegalia e linfopenia. A infecção com *Leishmania* neste modelo mimetiza alguns aspectos da forma difusa da leishmaniose humana (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987a; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987b) e também da forma visceral. Como demonstrado também em humanos (CASTES *et al.*, 1983; CARVALHO *et al.*, 1985a), estes animais apresentam resposta imune celular específica anti-*Leishmania* suprimida (pólo hipoérgico) (MULLER *et al.*, 1989).

Quando animais da linhagem C57BL/6 são infectados, desenvolvem uma lesão localizada que atinge seu ápice em torno da terceira semana após a infecção e resolve-se em torno da oitava semana (SADICK *et al.*, 1986;

BARRAL-NETTO *et al.*, 1987a). A resolução da lesão leva à resistência contra re-infecções por *Leishmania* (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987b). Estes animais desenvolvem uma resposta celular específica intensa com alta produção de IFN- γ (SADICK *et al.*, 1986). Estas lesões mimetizam a LCL ou LCM (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987a; BARRAL-NETTO *et al.*, 1987b).

A definição de populações de células T CD4+ que secretam um conjunto diferente de citocinas após estímulo foi estabelecida em 1986 (MOSMANN *et al.*, 1986). Em 1989, Heinzel e colaboradores associaram o perfil de susceptibilidade de camundongos BALB/c a *L. major* a uma resposta tipo Th2, associada a altos níveis de IL-4 e IL-1 e baixos níveis de IFN- γ , enquanto camundongos C57BL/6 desenvolviam uma resposta predominantemente Th1, com aumento na expressão de IFN- γ , IL-2 e baixa expressão de IL-4, durante a infecção (HEINZEL *et al.*, 1989).

Em concordância com estes achados, pacientes com LV ativa apresentavam níveis de IFN- γ e IL-2 muito baixos (CARVALHO *et al.*, 1985a), enquanto na fase de recuperação da doença apresentam DTH+ contra antígenos do parasito (REED *et al.*, 1986). Nas formas de LCM e LCL, há usualmente resposta linfoproliferativa (especialmente na LCM) e abundante produção de IFN- γ em resposta a estímulo antigênico (CARVALHO *et al.*, 1985b). Além disso, a DTH é negativa nos momentos iniciais da infecção em casos de LCL, tornando-se positiva dentro de dois a três meses após a infecção (BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995).

Além disso, achados histopatológicos em lesões precoces de LCL (FREITAS, comunicação pessoal) ou lesões mais tardias de LCL e LCM (VERESS & EL HASSAN, 1986) sugerem que a vasculite secundária ao fenômeno de hipersensibilidade não só está presente, como pode ser responsável pela ulceração das lesões tegumentares nestas formas.

O destino da infecção e o direcionamento da resposta imune adaptativa pode, em grande parte, depender da maneira que a resposta imune inata do

hospedeiro lida com o patógeno durante momentos precoces da interação parasito/hospedeiro (KAYE *et al.*, 1994; SAHA *et al.*, 1995; SHANKAR & TITUS, 1997; MOLL, 2000). O tipo de célula que carrega e apresenta antígenos podem ser determinantes da forma e intensidade da resposta imune adaptativa (MOLL, 2000; MALDONADO-LOPEZ & MOSER, 2001).

Durante os primeiros momentos da infecção por *Leishmania*, células fagocíticas mononucleares são infectadas (BARRAL-NETTO *et al.*, 1987b; MOLL *et al.*, 1995; DE ALMEIDA *et al.*, 2003b). Embora não tenha sido formalmente demonstrado, as formas amastigotas intracelulares devem ser carregadas por fagócitos mononucleares e, portanto, dependem das moléculas de adesão e receptores de quimio-atraentes na superfície dessas células para o seu endereçamento (GALVAO *et al.*, 1993; BITTENCOURT & BARRAL-NETTO, 1995). O destino e a identidade das células que albergam o microorganismo no sítio de inoculação não estão completamente estabelecidos (MOLL *et al.*, 1993; RANDOLPH *et al.*, 1999; MURAILLE *et al.*, 2003). Além disso, o tipo celular responsável pela estimulação eficaz da resposta imune do hospedeiro na leishmaniose também tem sido motivo de controvérsia na literatura (MOLL *et al.*, 1995; SAHA *et al.*, 1995; SHANKAR & TITUS, 1997; RITTER *et al.*, 2004).

A vacinação com células dendríticas pulsadas com antígeno de *Leishmania major*, mas não com macrófagos, confere resistência em um modelo de susceptibilidade à leishmaniose (VON STEBUT *et al.*, 2000). Outros estudos têm ainda mostrado que a apresentação de antígeno por subtipos de células dendríticas (CD11b⁺ CD8a⁺) é suficiente para o controle da infecção. A resposta imune adaptativa pode ser ainda mais eficaz no controle parasitário em animais onde somente estas células expressam MHC-II do que em seus pares selvagens (LEMOS *et al.*, 2004).

1.2 MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

A migração leucocitária representa um papel crucial para o funcionamento adequado do sistema imunológico ao possibilitar que células T e células apresentadoras de antígeno (APCs) encontrem-se, além de permitir que os diversos tecidos sejam constantemente “vigiados” por essas células (PAUL, 1999).

1.2.1 Circulação linfocitária

Neste processo, linfócitos T virgens entram em linfonodos através das vênulas de endotélio alto. No linfonodo, estes linfócitos entrarão em contato com diversas APCs carreando múltiplas combinações MHC:peptídeo. Caso não ocorra reconhecimento específico entre o receptor de células T (TCR) e o complexo MHC:peptídeo correspondente, esta célula sairá do linfonodo através do linfático eferente, chegando à corrente sanguínea pelo ducto torácico e continuará a circular entre os compartimentos linfático e sanguíneo.

Em um cenário diferente, este linfócito reconhece na superfície de uma célula apresentadora de antígeno, um complexo MHC:peptídeo com afinidade pelo seu TCR e sofre mudanças no perfil de expressão de moléculas de adesão e receptores de quimiocinas. Essas mudanças alteram o padrão de migração desta célula, que agora ganha capacidade de migrar com maior eficiência para tecidos periféricos não linfóides (CAHILL *et al.*, 1977; JUNG *et al.*, 1988).

Além disso, sítios onde processos inflamatórios estão em andamento são sinalizados através do aumento da expressão de moléculas da superfamília das imunoglobulinas na superfície endotelial do leito vascular e quimio-atraentes (recrutamento celular). Estas alterações aumentam a migração linfocitária para estes locais através da parede vascular por um processo

chamado de diapedese, também dependente de moléculas de adesão (JUNG *et al.*, 1988; PAUL, 1999).

1.2.2 Migração de células mielóides

Apesar do processo de migração linfocitária ser bem conhecido, muito pouco se conhece sobre o padrão de migração de células mielóides. Se o encontro entre os linfócitos e as APCs (em sua maioria de origem mielóide) ocorre nos órgãos linfóides secundários, é necessário que estas células também tenham capacidade de migrar para estes tecidos, especialmente após a aquisição de antígenos na periferia. O primeiro tipo celular identificado capaz de realizar essa tarefa eficientemente é a célula de Langerhans, o protótipo de célula dendrítica presente na epiderme (MACATONIA *et al.*, 1987). Mais tarde, células dendríticas residentes foram identificadas e caracterizadas na derme e em outros tecidos (ANJUERE *et al.*, 1999). Até o presente momento, a ontogenia dessas células não está completamente esclarecida e há controvérsias acerca da existência de um precursor comum entre monócitos circulantes, células dendríticas e macrófagos residentes e inflamatórios (D'AMICO *et al.*, 1998; RANDOLPH *et al.*, 1999; TRAVER *et al.*, 2000; MAKALA *et al.*, 2002; IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004).

Durante muito tempo acreditou-se que as células de Langerhans eram as responsáveis pelo transporte e apresentação de antígenos periféricos a linfócitos T, enquanto monócitos provenientes da medula óssea, que infiltram tecidos durante o processo inflamatório, terminavam a sua jornada em tecidos periféricos (COTRAN *et al.*, 1999). Por outro lado, a quantidade de células apoptóticas observada nos tecidos infiltrados não parecia corresponder ao número de células que invadiam os tecidos e, ao final do processo inflamatório, o número de células monocíticas teciduais residentes não aumenta (MULLER & RANDOLPH, 1999). Diversos estudos sugeriam que estas células migram para o linfonodo drenante durante a fase de resolução da inflamação (HARMSSEN *et al.*, 1985; ROSEN & GORDON, 1990; BELLINGAN *et al.*, 1996)

Todas essas questões culminaram com estudos que demonstraram que as populações monocíticas mielóides são heterogêneas tanto em respeito a sua origem quanto a seu destino final (CAVANAGH & VON ANDRIAN, 2002; SUNDERKOTTER *et al.*, 2004).

A maior parte das células mielóides circulantes é constituída por neutrófilos maduros, que começam a migrar para sítios inflamatórios dentro de minutos a horas. Estas células não são capazes de migrar além do tecido inflamado e encontram o seu fim durante o exercício de suas funções primordiais como protagonistas da imunidade inata, ainda no local de inflamação. Por outro lado, monócitos circulantes iniciam a migração para sítios de inflamação horas após o início do processo inflamatório e continuam a infiltrar estes tecidos por um período mais longo, sendo o tipo celular predominante após quarenta e oito horas do início do processo (COTRAN *et al.*, 1999).

O que ocorre com essas células após a diapedese tem sido motivo de diversos estudos recentes (RANDOLPH *et al.*, 1999; BARRATT-BOYES *et al.*, 2000; PAILLOT *et al.*, 2001). Existem, pelo menos, dois subtipos de monócitos circulantes: os chamados monócitos inflamatórios (CD14⁺ CCR2^{Hi} CCR5^{Lo}) e os monócitos CD16⁺ CCR5^{Hi} (WEBER *et al.*, 2000; IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004). Os monócitos inflamatórios são recrutados para os tecidos durante um processo de agressão de uma maneira dependente de CCL2 (GERSZTEN *et al.*, 1999), enquanto os monócitos CD16⁺ parecem constituir a subpopulação celular que mantém o pool de monócitos residentes nos tecidos não linfóides periféricos e migram para estes sob influência de CX₃CL1 e CCL3 (ANCUTA *et al.*, 2003; ANCUTA *et al.*, 2004).

O paradigma da migração unidirecional de células mielóides (da medula óssea para o sangue e deste para o tecido periférico) foi formalmente quebrado pela observação de que células originadas de monócitos circulantes (que diferiam das células de Langerhans) podem ser encontradas em linfonodos que drenam sítios inflamatórios (RANDOLPH *et al.*, 1999).

Essas e outras observações (a maioria delas *in vitro*) (D'AMICO *et al.*, 1998; RANDOLPH *et al.*, 1998a; BARRATT-BOYES *et al.*, 2000; MAKALA *et al.*, 2001a; MAKALA *et al.*, 2001b; PAILLOT *et al.*, 2001; CAVANAGH & VON ANDRIAN, 2002; MAKALA *et al.*, 2002; KOYA *et al.*, 2003) levaram a um novo modelo em que monócitos inflamatórios circulantes são atraídos para um tecido inflamado e podem seguir por duas vias: diferenciar-se em macrófago ou em célula dendrítica (figura 1).

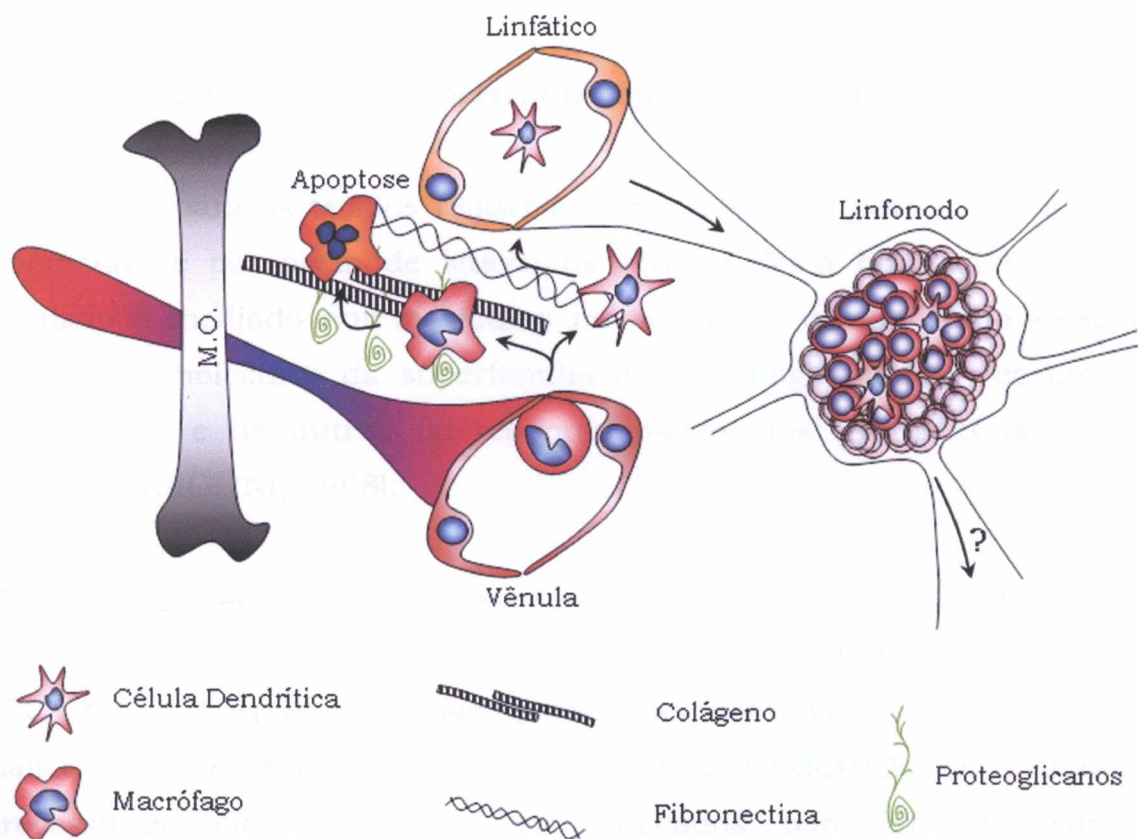


Figura 1. Origem e destino de monócitos do sangue periférico. Provenientes de precursores mielóides na medula óssea, os monócitos circulam por um a dois dias antes de migrarem para um tecido periférico através da parede de vênulas. No interstício, estas células encontram componentes da matriz conjuntiva (especialmente proteoglicanos, colágenos e fibronectina), para os quais apresentam receptores em sua superfície. Neste momento os monócitos podem diferenciar-se em macrófagos ou células dendríticas. Os macrófagos podem tornar-se células residentes (destino predominante no estado de equilíbrio) ou morrer por apoptose (especialmente em situações inflamatórias). As células dendríticas adquirem antígeno através de fagocitose ou macropinocitose e migram para os linfonodos através dos vasos linfáticos que drenam a região.

As células dendríticas adquirem capacidade migratória e chegam ao seio sub-capsular do linfonodo drenante através dos vasos linfáticos aferentes (figura 1) (CAVANAGH & VON ANDRIAN, 2002; IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004). Desta maneira, este tipo celular representa a principal ponte entre a imunidade inata e a adaptativa (MOLL, 2003). Em alguns modelos, esta última via pode representar até 50% dos monócitos que extravasam para o tecido durante o processo inflamatório (BELLINGAN *et al.*, 1996; BELLINGAN *et al.*, 2002).

1.2.3 Migração através da barreira do endotélio venular

A migração para os tecidos requer a transposição da barreira endotelial. O fenômeno de passagem de leucócitos através desta barreira é finamente regulado e mediado por moléculas na superfície celular como selectinas, integrinas, moléculas da superfamília das imunoglobulinas, receptores de quimiocinas e de outros fatores quimio-atraentes (CARLOS & HARLAN, 1994; BAGGIOLINI, 1998).

Monócitos inflamatórios expressam L-selectina (CD62L), LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) e VLA4 (CD49d/CD29), além de PECAM-1 (CD31) e moléculas glicosiladas contendo derivados do ácido siálico (CARLOS & HARLAN, 1994; IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004). No processo de migração podem ser destacados, para fins didáticos, três estágios: (1) a rolagem leucocitária; (2) a adesão forte e (3) a diapedese (figura 2) (COTRAN *et al.*, 1999).

O processo de rolagem é mediado principalmente pela interação entre selectinas e moléculas altamente glicosiladas semelhantes ao ácido siálico que estão tanto na superfície endotelial quanto leucocitária. Essas moléculas são grandes e estendem-se para o luz do vaso, facilitando o contato com a célula transeunte (CARLOS & HARLAN, 1994; HOGG *et al.*, 2003). Neste momento, o leucócito entra em contato com quimiotáticos presos à superfície endotelial por moléculas da família das sindecanas, que imobilizam as

quimiocinas e mantêm disponível o sítio de ligação destas ao seu receptor (TANAKA *et al.*, 1993).

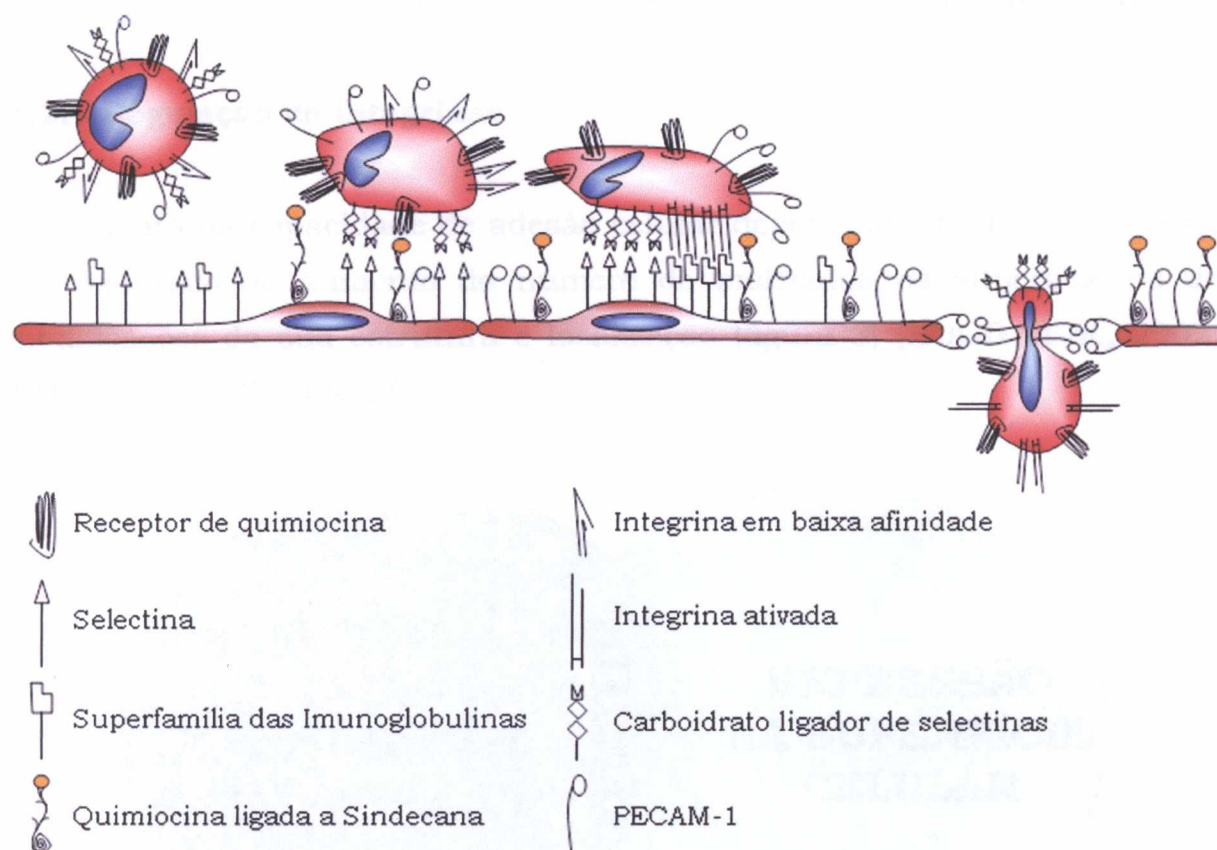


Figura 2. Moléculas envolvidas nos diferentes estágios da migração celular do sangue para o tecido. O monócito circulante reconhece na parede endotelial moléculas da família das selectinas (especialmente P- e E-Selectina). O contato de glicoconjugados complexos na membrana leucocitária com as longas selectinas endoteliais acarreta uma diminuição da velocidade do leucócito e sua aproximação ao endotélio (estágio 1; rolagem). Neste momento quimiocinas presas a glicoproteínas da família das sindecanas interagem com receptores na superfície do leucócito e desencadeiam a ativação de integrinas. Estas últimas respondem pela adesão forte entre o monócito e a célula endotelial (estágio 2), além de estar implicada na sinalização para formação do complexo de polaridade. A célula agora está pronta para mergulhar nas junções entre células endoteliais (estágio 3; diapedese), ricas em PECAM-1 (CD31), CD99 e moléculas da família das JAMs. Essas moléculas têm diferentes papéis na migração através do endotélio e da membrana basal dos vasos.

A interação entre quimiotático e seu receptor na superfície leucocitária desencadeia cascatas intracelulares que incluem vias dependentes de pequenas GTPases da família de Rap1 e vias de fosfatidil-inositol-3-OH cinase (PI3K). Essas vias culminarão com modificações da função das

integrinas já presentes na membrana (HOGG *et al.*, 2002; LAUDANNA *et al.*, 2002). Por sua vez, as integrinas são moléculas que se estendem pouco além da membrana celular e, portanto precisam de maior proximidade entre as células para engajar seus contra-receptores (CARLOS & HARLAN, 1994).

1.2.4 Regulação de integrinas

O aumento na capacidade de adesão celular dependente de integrinas pode ser resultado do aumento do número de moléculas na superfície ou de modificações da sua estrutura e localização (figura 3) (HOGG *et al.*, 2002; TAKAGI & SPRINGER, 2002).



Figura 3. Mecanismos de regulação da adesão mediada por integrinas. O aumento da adesão mediada por integrinas pode ser consequência direta do aumento do número de moléculas na superfície celular, resultado do aumento da sua afinidade pelo ligante (através de modificação da sua conformação tridimensional) ou do recrutamento de integrinas para focos de acúmulo molecular homônimo. Estas moléculas sofrem alterações conformacionais induzidas pela ligação a diferentes cátions divalentes: A maior parte das integrinas encontra-se em estado de baixa afinidade quando ligadas ao Ca^{+2} em comparação àquelas ligadas a Mg^{+2} ou a Mn^{+2} .

Em diversos sistemas, estímulos que aumentam a adesão de células o fazem através da mudança da função de moléculas já presentes na superfície celular sem um aumento apreciável na expressão dessas moléculas (KAKAZU *et al.*, 1995; CARR *et al.*, 1996; LLOYD *et al.*, 1996; WEBER *et al.*, 1996a). O protótipo deste tipo de estímulo é a sinalização através de receptores de quimiocinas (figura 4; *inside-out signaling*) (LAUDANNA *et al.*,

2002). A ligação com outros fatores quimiotáticos (WEBER *et al.*, 1996b), citocinas (BAUVOIS *et al.*, 1996), moléculas co-estimulatórias (SHIMIZU *et al.*, 1992) e a ligação do TCR ao complexo MHC:peptídeo correspondente (CHAN *et al.*, 1991) são outros eventos capazes de desencadear cascatas intra-celulares que culminam com aumento na afinidade das integrinas na superfície celular. Além disso, a ligação de integrinas a seus contra-receptores (CAMPANERO *et al.*, 1994; MAY *et al.*, 2000) e a diferentes cátions (DRANSFIELD & HOGG, 1989) pode desencadear alterações na afinidade e na mobilidade lateral de integrinas através de modificação direta da estrutura molecular (*outside-in signaling*) (TAKAGI & SPRINGER, 2002; WEBER, 2003).

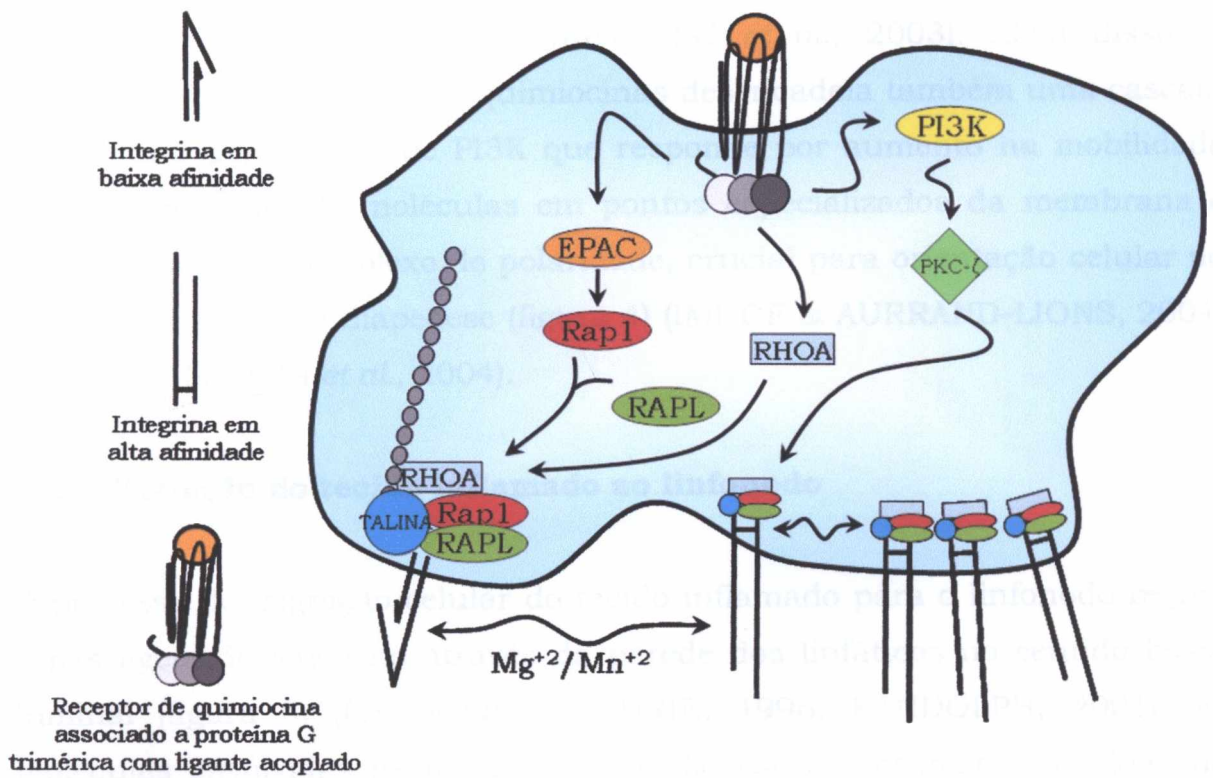


Figura 4. Vias intracelulares de regulação da função de integrinas. Após a ligação a uma quimiocina, as proteínas G associadas aos receptores de quimiocinas desencadeiam diversas vias de sinalização intracelulares. A ativação de adenilato ciclases leva a ativação de EPAC. Esta por sua vez ativa Rap1 que agora se liga a RAPL e se acopla à porção intracelular da cadeia alfa. A talina também sofre ativação e se liga à cauda intracelular da cadeia beta. Por último ocorre a ativação de RHOA que se associa a talina e ao complexo Rap1/RAPL e completa o cenário para a mudança da conformação dobrada de baixa afinidade da integrina para uma conformação esticada de alta afinidade. Paralelamente ocorre a ativação de cinases de fosfatidil-inositol-3-OH. Essas cinases ativam cisteíno-proteína cinases atípicas (zeta) que são responsáveis pelo aumento na mobilidade lateral dessas moléculas e sua reunião em micro ou macro-aglomerados na membrana.

Tem sido demonstrado que a sinalização para regulação da afinidade de LFA-1 na superfície celular por quimiocinas é dependente da pequena GTPase Rap1 (KATAGIRI *et al.*, 2000; SHIMONAKA *et al.*, 2003), em associação com RAPL e talina (KATAGIRI *et al.*, 2003). Além disso, a sinalização por receptores de quimiocinas desencadeia também uma cascata intracelular dependente de PI3K que responde por aumento na mobilidade lateral, agregação de moléculas em pontos especializados da membrana e pela formação do complexo de polaridade, crucial para orientação celular no sentido de realizar a diapedese (figura 4) (IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004; SANCHEZ-MARTIN *et al.*, 2004).

1.2.5 Migração do tecido inflamado ao linfonodo

O processo de migração celular do tecido inflamado para o linfonodo requer a passagem do leucócito através da parede dos linfáticos no sentido baso-luminal (figura 5) (RANDOLPH & FURIE, 1996; RANDOLPH, 2001). As moléculas envolvidas neste movimento não são as mesmas envolvidas na migração do sangue para o tecido (RANDOLPH & FURIE, 1996; MULLER & RANDOLPH, 1999). Tem sido demonstrado que o fator tecidual (RANDOLPH *et al.*, 1998c) e a glicoproteína-p (RANDOLPH *et al.*, 1998b) participam deste processo.

Apesar de não dependerem de integrinas para atravessar o endotélio linfático, é possível que seja necessária uma perda de adesão a componentes da matriz celular mediada por integrinas para que ocorra a migração de um

sítio inflamatório para o linfonodo drenante (IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004; RANDOLPH *et al.*, 2005).

Entretanto, em um modelo de indução de exsudação peritoneal induzida por tioglicolato, a migração de células para o linfonodo é dependente da adesão destas ao epitélio peritoneal através de integrinas contendo cadeias beta-1 (CD29) (BELLINGAN *et al.*, 1996; BELLINGAN *et al.*, 2002). Em um outro sistema, onde folhetos epidérmicos são colocados em cultura, demonstrou-se que integrinas contendo cadeias α_6 são essenciais para que células de Langerhans atravessem a membrana basal da epiderme e migrem através dos linfáticos (PRICE *et al.*, 1997).

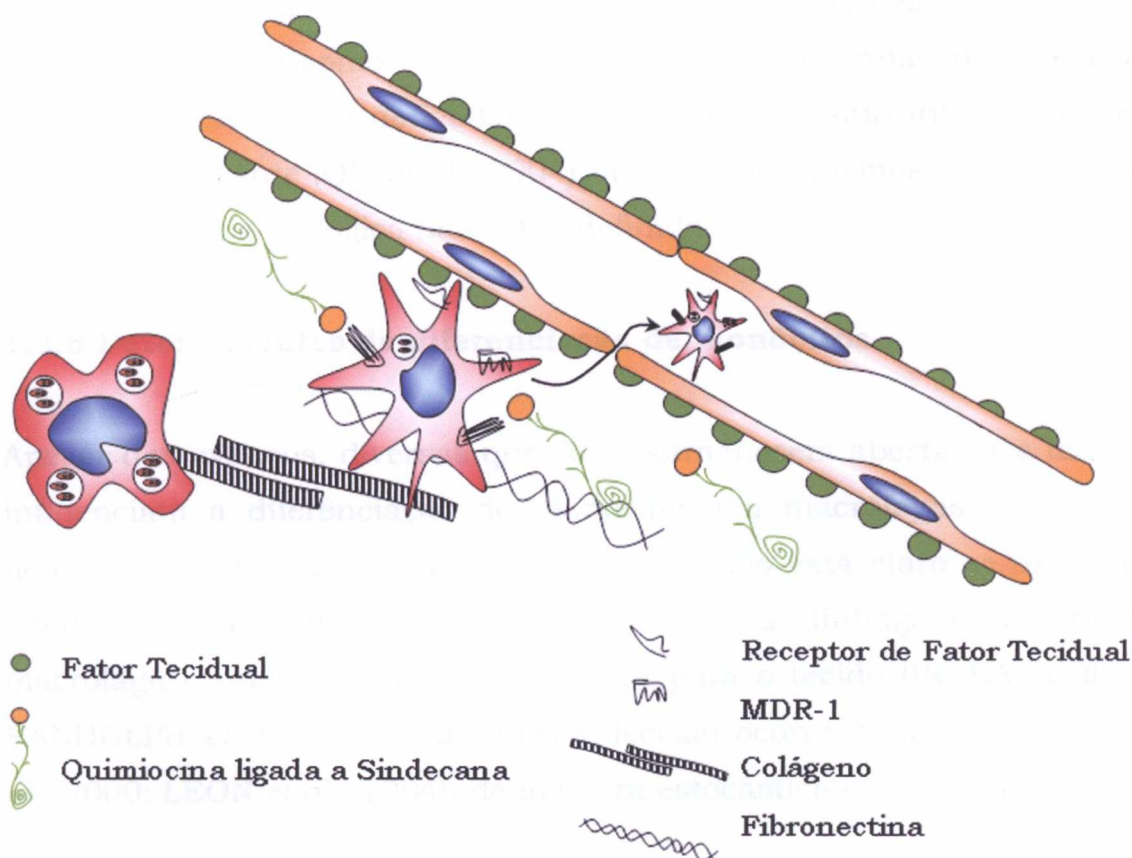


Figura 5. Migração de células dendríticas do tecido ao vaso linfático. Após a diferenciação a partir de monócitos, células dendríticas sofrem modificações que incluem: (1) expressão de receptor de fator tecidual (FT; expreso na superfície basal do endotélio linfático); (2) expressão de glicoproteína-p (MDR-1); (3) moderada capacidade fagocítica e (4) expressão de CCR7. A produção de CCL19 e CCL21 (ligantes de CCR7) pelo endotélio linfático atrai as células dendríticas para a sua proximidade. Estas alterações são cruciais para permitir a migração deste tipo celular do tecido para o linfonodo drenante através dos vasos linfáticos. Nestes vasos estas células são encontradas como “células veladas” (do inglês *veiled cells*).

Além disso, a expressão de receptores de quimiocinas associados a células linfóides como o CCR7 por precursores de células dendríticas (SOZZANI *et al.*, 1998; SAEKI *et al.*, 1999), bem como a expressão de seu ligante CCL21 (PRICE *et al.*, 1997) e CCL19 por células dos vasos linfáticos, também desempenham papel fundamental (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 2000). Outros receptores como o CCR8 também têm sido implicados na migração de células dendríticas derivadas de monócitos do sítio inflamatório para o linfonodo drenante (QU *et al.*, 2004), mas os mecanismos desse fenômeno a sua importância biológica não estão definidos.

1.2.6 Determinantes da diferenciação de monócitos

Apesar dos avanços, diversas questões permanecem abertas. Os fatores que influenciam a diferenciação de monócitos em macrófagos ou em células dendríticas são pouco conhecidos. De fato, não está claro se os monócitos circulantes já estão comprometidos com a linhagem dendrítica ou macrófaga antes mesmo de extravasar para o tecido (INABA *et al.*, 1992; RANDOLPH *et al.*, 2002) ou se essa decisão ocorre mais tarde (TRAVER *et al.*, 2000; LEON *et al.*, 2004), de maneira estocástica ou direcionada.

Randolph e colaboradores (1998) demonstraram que monócitos podem diferenciar-se em células dendríticas em um modelo de transmigração reversa *in vitro* (passagem do leucócito através de uma monocamada endotelial no sentido baso-luminal). Nesse modelo, o contato com estímulos inflamatórios sub-endoteliais não muda a frequência da diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas. Neste mesmo modelo,

entretanto, o estágio de maturação das CDs em contato com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou IL-1 é compatível com células plenamente maduras (CD14⁻ CD86^{Hi} MHC-II^{Hi} CD83⁺), enquanto as que entram em contato apenas com o endotélio e a matriz extra-celular sub-endotelial apresentam características de CDs imaturas (CD14^{Lo} CD86^{Lo} MHC-II^{Lo} CD83⁺).

Outros grupos, entretanto, demonstraram que LPS (ROTTA *et al.*, 2003) e lipofosfoglicanos (PONTE-SUCRE *et al.*, 2001) da parede de *Leishmania major* (LPG) bloqueiam a diferenciação de monócitos em células dendríticas na presença de antígenos particulados, mas não na presença de antígenos solúveis. Esses achados sugerem que estas células podem ser cruciais para a determinação da iniciação de uma resposta adquirida ou contenção do agente invasor pela resposta imune inata sem despertar a imunidade adaptativa (IMHOF & AURRAND-LIONS, 2004).

1.3 INTEGRINAS NA APRESENTAÇÃO ANTIGÊNICA

Além de suas funções nos processos de adesão e migração celular, integrinas (especialmente LFA-1) há muito vêm sendo implicadas na apresentação de antígeno para linfócitos T (GRAKOUÏ *et al.*, 1999; KATAGIRI *et al.*, 2002; HOGG *et al.*, 2003). A injeção concomitante de anticorpo anti-LFA-1 ou anti-ICAM-1 (CD54; ligante de LFA-1) e um antígeno leva a um estado ativo de não responsividade ao antígeno co-injetado (DAVIGNON *et al.*, 1981). Mais recentemente, tem sido demonstrado que LFA-1 participa da formação e manutenção dos pontos de contato entre linfócitos T e APCs (sinapses imunológicas) (MONKS *et al.*, 1998).

Desta maneira, alterações na função de integrinas poderiam influenciar não só a capacidade migratória e o endereçamento de células monocíticas, mas também interferir com a capacidade apresentadora de antígeno destas células.

2 JUSTIFICATIVA

Em algumas formas de leishmaniose, é comum a disseminação do parasito para sítios distantes do local de inoculação (BITTENCOURT & BARRALNETTO, 1995). Os determinantes das formas clínicas são pouco conhecidos e podem incluir fatores genéticos do hospedeiro (BARBIER *et al.*, 1987; CERF *et al.*, 1987; GRADONI & GRAMICCIA, 1994; CABRERA *et al.*, 1995) e do parasito (LEMOS DE SOUZA *et al.*, 2000).

Em estudo anterior, nosso grupo desenvolveu um ensaio *in vitro* que permite o estudo de função de integrinas na superfície de células fagocíticas mononucleares. Neste modelo, a adesão ao tecido conjuntivo inflamado ocorre principalmente através de integrinas, uma vez que é dependente de cátions divalentes e é inibida pela adição de anticorpos anti-cadeia α_4 (CD49d) e β_2 (CD18) de integrinas, assim como por misturas de peptídeos que ligam-se a integrinas e impedem a ligação destas com componentes da matriz extra-celular (CARVALHAL *et al.*, 2004).

Usando este tipo de ensaio, demonstramos que a infecção por parasitos do gênero *Leishmania* torna estes fagócitos menos capazes de aderir ao tecido conjuntivo inflamado. Essa redução não foi observada após fagocitose de partículas de látex com o tamanho aproximado de uma amastigota de *Leishmania* (3 μm) ou de *Mycobacterium fortuitum* (CARVALHAL *et al.*, 2004).

Os principais tipos celulares infectados pelo agente etiológico da leishmaniose são fagócitos mononucleares (BITTENCOURT & BARRALNETTO, 1995). Estas células têm um papel decisivo no desenvolvimento desta patologia ao ser tanto o alvo da infecção (BITTENCOURT & BARRALNETTO, 1995) como o tipo celular responsável pela ativação da resposta imunológica (MALDONADO-LOPEZ & MOSER, 2001).

Assim, o conhecimento das alterações relacionadas ao potencial migratório e de apresentação antigênica de células monocíticas no contexto de infecção

por *Leishmania* é de importância fundamental para o entendimento desta desordem (TAPIA *et al.*, 1994) e mesmo de outras desordens também caracterizadas pelo acúmulo de macrófagos (PANAYI, 1993; YOON *et al.*, 1998; DANDONA & ALJADA, 2002; RENIER *et al.*, 2003; HENDRIKS *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Identificar os mecanismos moleculares envolvidos na disseminação de macrófagos infectados por *Leishmania* em diferentes tecidos.

3.2 ESPECÍFICOS:

1. Estudar a cinética da redução de adesão dos fagócitos mononucleares infectadas com *Leishmania amazonensis*;
2. Avaliar a influência da intensidade da infecção na adesão celular;
3. Examinar o efeito da fagocitose de parasitos mortos e seus produtos na adesão celular;
4. Examinar o perfil de expressão de moléculas de adesão por fagócitos mononucleares infectados *in vitro* com *Leishmania* ou não infectados;
5. Examinar a modificação no estado de afinidade de integrinas e o papel de VLA4 na perda de adesão após infecção por *L. amazonensis* e
6. Avaliar a expressão de receptores de quimiocinas em células infectadas *in vitro* com *Leishmania* ou não infectados.

4 ARTIGO

Pinheiro, N.F., M.D.R. Hermida, *et al.* Leishmania infection impairs beta-1-integrin function and chemokine receptor expression in murine macrophages: insights into parasite dissemination. Infection and Immunity. Submetido para publicação. 2006.

4.1 MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

TITLE:

Leishmania infection impairs beta-1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes: Insights into parasite dissemination

AUTHORS:

Nathanael F. Pinheiro Jr.^{*}, Micely D. R. Hermida^{*}, Mariana P. Macedo^{*†}, José Mengel^{*}, Andre Bafica^{*‡}, and Washington L. C. dos-Santos^{*†}

INSTITUTIONAL AFFILIATIONS:

^{*} Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

[†] Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil.

[‡] Immunobiology Section, Laboratory of Parasitic Diseases, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

*** CORRESPONDING AUTHOR: Washington LC dos-Santos.** LPBI - Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Waldemar Falcão nº 121, Candeal, Salvador, BA, Brazil - 40296-710. Telephone: +55 71 3176-2257 ext 262, fax: +55 71 3176-2255, e-mail: wluis@cpqgm.fiocruz.br

RUNNING TITLE:

Beta-1-integrin and chemokines in leishmaniasis

ABSTRACT:

Leishmania are intracellular parasites that cause lesions in the skin, mucosa and viscera. We have previously shown that *Leishmania* infection reduces mononuclear phagocyte adhesion to inflamed connective tissue. In this paper we examined the role of adhesion molecules and chemokines in this phenomenon. Infection rate ($r=-0.826$, $P=0.003$) and parasite burden ($r=-0.917$, $P=0.028$) negatively correlated to mouse phagocyte adhesion. The decrease (58.7 to 75.0% inhibition, $P=0.005$) in phagocyte adhesion to connective tissue, induced by *Leishmania*, occurred as early as 2h after infection and was maintained in a plateau for at least 24h. The infection with 0.6 *Leishmania* per cell reduced phagocyte adhesion in 27.9 to 44.6% ($P<0.001$). Impairment in cell adhesion was sustained by phagocyte infection since it was not observed after phagocytosis of killed parasites (cell adhesion varied from 15.2% below to 24.0% above the control levels, $P>0.05$). *Leishmania* infection also diminished cell adhesion to fibronectin (54.1 to 96.2%, $P<0.01$), collagen (15.7 to 83.7%, $P<0.05$) and laminin (59.1 to 82.2%, $P<0.05$). The CD11b^{hi} sub-population was highly infected (49.6 to 97.3%). There was no modulation of VLA4, VLA5, LFA-1, Mac-1, L-selectin, ICAM-2 or VCAM-1 surface expression on the infected cells. Accordingly, Ca⁺² and Mg⁺² replacement by Mn⁺² reverted the inhibition caused by *Leishmania* and this reversion was blocked by anti-VLA4 antibodies. Expression of CCR4 and CCR5 mRNA was downregulated 16h after infection (2.8 to 4.1 times and 1.9 to 2.8 times, respectively). These data suggest that mechanisms regulating integrin function are implicated in the change of macrophage adhesion in leishmaniasis.

INTRODUCTION

The protozoan parasites of the genus *Leishmania* are the causative agents of tegumentary and visceral leishmaniasis. Distinct species of *Leishmania* cause different forms of the disease, although some overlap has been reported (1, 8, 34). For example, *Leishmania amazonensis*, a pathogen mostly detected in cutaneous lesions, has been described to cause visceral disease (1). The mechanisms by which the parasite induces such different diseases are largely unknown and may involve both pathogen and host factors (8, 13, 21, 34). In all cases, *Leishmania* infection initiates when an infected phlebotominae sand fly inoculates the parasites into the dermis during feeding. Thereafter, the infective promastigotes enter and multiply inside the host phagocytic cells, eventually reaching the draining lymph node. The identity and fate of the cells that carry the organism away from the injection site are controversial (31, 32, 36, 37). However, the genesis of the lesions is closely linked to the presence of macrophages harboring *Leishmania* amastigotes (3). In the different forms of the disease, one may find parasitized macrophages in the lymph nodes that drain the inoculation site (32) or in the blood (27). Since the amastigote forms are obligated intracellular parasites, their migration has to rely on the addressing information displayed on the surface of their phagocytic hosts, such as the type of adhesion molecules or chemokine receptors.

In fact, it has been reported that upon phagocytosis of *Leishmania major* (31, 32, 37), mononuclear phagocytes harboring live parasites migrate from the skin to the draining lymph node. This evidence suggests that *Leishmania* infection induces cellular changes that lead to de-adhesion (a first step in cellular traffic) and migration of mononuclear phagocytes from the skin to draining lymph node. The capacity of these cells to home back to the skin, to mucosae or internal organs, may also be modified by the parasite (2). We have recently reported the

development of an *in vitro* adhesion assay to study the interactions of mononuclear phagocytes with the connective tissue (11). Using this tool, we have shown that different *Leishmania* species reduce the adherence of phagocytes to the inflamed connective tissue and suggested that mechanisms regulating integrin affinity would be involved in such modulation of cell adhesion by *Leishmania* (11). Thus, the observed decrease of cell adherence early upon *Leishmania* infection may account for the first stage of this migratory process.

In the present work we examine the variables influencing the changes in phagocyte adherence induced by *Leishmania* such as parasite burden, infection versus parasite products and time course of infection. We also examine pathways potentially involved in the reduction of *Leishmania*-infected phagocyte adhesion. Hence, in a first set of experiments we studied the influence of infection rate and intensity on monocytic phagocyte adhesion, the kinetics of this phenomenon and if infection is needed or phagocytosis of dead parasites would cause the same effect. In a second set of experiments, we compare the profile of adhesion molecules and chemokine receptors expression in non-infected and *Leishmania*-infected cells. The understanding of the mechanisms of *Leishmania* dissemination may aid the identification of novel targets for therapies against aggressive forms of leishmaniasis, as well as against other disorders mediated by inadequate addressing of monocytes (46).

MATERIAL AND METHODS

Animals

Eight to twelve-week-old BALB/c mice were obtained from the colony of the Gonçalo Moniz Research Center - FIOCRUZ (Salvador, Brazil). The animals were maintained under controlled environmental conditions of humidity, temperature, light-dark cycle, with commercial balanced mouse chow and water *ad libitum*. The experiments involving animals were conducted in accordance to the Oswaldo Cruz Foundation guidelines for research with animals (<http://www.fiocruz.br/presidencia/vppdt/comceua.htm>).

Mouse peritoneal exudate cells

Peritoneal exudate cells (PEC) were obtained by the intraperitoneal injection of 3 ml of a sterile thioglycollate (Sigma, USA) solution at 3% (w/v). Four days after the injection, peritoneal cells were collected by washing the peritoneal cavity two times with cold $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -free HBSS (Sigma) containing 20 IU/ml heparin. The cells were washed two times in HBSS, suspended in RPMI (Sigma) with 10% FBS (Cultilab, Brazil), 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin and 2mM glutamine (complete RPMI) and cultured in non-adherent polypropylene tubes at 37°C and 5% CO_2 . More than 80% of the cells obtained using this process had macrophage features, as evaluated by morphological analysis of Giemsa-stained slides and by flow cytometry using forward and side scatters or staining with anti-CD11b (clone 2D7; BD-Pharmingen, USA) and F4/80 (clone CI:A3-1; Caltag, USA) antibodies. Viability was assessed by trypan blue exclusion. At least 85% of the cells used for the experiments were viable.

Sections of inflamed tissue

Dorsal subcutaneous inflammatory air pouches were produced in BALB/c mice by the injection of 2 ml of air and 200 µl of soy oil containing 0.1% croton oil. Animals were sacrificed three days after the injection. Transversal full-thickness slices of tissue from the inflammatory air pouch were collected, immersed in Histoprep (Fisher Scientific, USA), frozen in liquid nitrogen and preserved at -70° C until use. Serial 5 µm cryostat sections (perpendicular to the skin and to the wall of the inflammatory air pouch) were collected onto glass slides previously coated with a gelatin film (0.5% solution in HBSS, Sigma). Sections were air dried for ten minutes, fixed with cold (-20° C) acetone for three minutes and then washed with PBS. Ten millimeter diameter circles were drawn around each section using a non-toxic marker pen (Pap Pen; Daido Sangyo, Japan) to prevent the free flow of the cell suspension over the slides. The purpose of using gelatin-coated glass slides was to minimize the adherence of macrophages to the glass (11).

Phagocyte infections and phagocytosis of killed *Leishmania*

Leishmania braziliensis (MHOM/BR/3456) and *L. amazonensis* (Leila strain, MHOM/BR88/BA-125) were grown in Schneider's insect medium (Sigma) containing 10% (*L. amazonensis*) or 20% (*L. braziliensis*) FBS at 24° C (47). Parasites were washed three times in HBSS, suspended in complete RPMI and incubated with the phagocytes. Control phagocytes were either cultured with medium alone or in medium containing 3 µm-diameter latex beads (Sigma). For some experiments, the parasites were killed by incubation with absolute ethanol for twenty minutes on ice, washed three times in HBSS and incubated with

the phagocytes. For the flow cytometry analyses, *Leishmania* were stained with a red fluorescent dye (PKH26; Sigma) according to the manufacturer's instructions, before incubating them with the phagocytes. Briefly, 10^8 parasites were suspended in 2 ml of PBS, mixed to a 4 μ M PKH26 solution in 2 ml of PBS and incubated for five minutes at room temperature in the dark under periodic agitation. Staining was stopped by the addition of 4 ml of FBS and incubation at 37° C for thirty minutes and washed three times in HBSS. Preliminary experiments showed that the dye does not escape from stained parasites or alters its viability and infectivity in vitro (data not shown). Promastigotes or amastigote forms of *Leishmania*, obtained according to a protocol described elsewhere (47) were used in these experiments with similar results. Ten parasites or latex particles *per* cell were used where not otherwise stated. Samples of the cells from each group were centrifuged onto glass slides, fixed with methanol, Giemsa-stained and examined by light microscopy to check the percentage of infected phagocytes and the number of parasites *per* infected cell. At least 1,000 mononuclear cells were counted.

Leukocyte-connective tissue adhesion assay

These assays were performed according to a previously described method (11). Briefly, inflamed connective tissue sections were incubated with HBSS containing 1% (w/v) BSA (Sigma) for thirty minutes at room temperature to block non-specific reactions. Cells were washed twice in HBSS and suspended at 2×10^6 cells/ml in HBSS containing 1% BSA. In the experiments of replacement of divalent cations, cells were washed with $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -free HBSS, incubated with 1 mM EDTA for five minutes on ice, washed three times in $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -free HBSS, suspended in $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ -free HBSS containing 1% BSA and supplemented with 250 μ M Ca^{+2} and 250 μ M Mg^{+2} or 500 μ M Mn^{+2} . In some experiments, VLA4 was blocked by

incubation of the cells and tissue sections with antibodies (clone R1-2; BD-Pharmingen, USA) at 10 μ g/ml for twenty minutes on ice, before they were left to adhere to the tissue. Aliquots of 4x10⁵ cells were placed over the tissue sections. They were incubated under agitation (eighty cycles per minute on a circular shaker), washed three times in PBS with Ca⁺² and Mg⁺² (500 μ M) to remove non-adherent cells and fixed for thirty minutes in 1% glutaraldehyde. Slides were then stained with H&E and examined under light microscopy. Measurements were performed using a CX41 microscope (Olympus, USA) coupled to a digital imaging system. Non-overlapping areas of inflamed connective tissue represented in all sections were selected for the measurements. Five microphotographs were taken from equivalent areas in each section and the adhered cells were counted using the Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, USA). Results are expressed as the mean + SEM of the counts obtained in each treatment replicate or as the percentage of cells adhered as compared to the untreated controls. Four to six sections were used per group of cells subjected to different treatments.

Leukocyte-extra-cellular matrix components adhesion assay

Sterile 96-well ELISA plates were sensitized with collagen, fibronectin and laminin. For sensitization with collagen, the wells were incubated overnight with a type I collagen solution at 300 μ g/ml (Sigma) in ammonia atmosphere at room temperature. In order to increase fibronectin binding to the wells, sensitization was done in wells previously coated with collagen with a 10 μ g/ml fibronectin (Sigma) solution. Laminin sensitization was done using a laminin solution (Sigma) at 20 μ g/ml. The plates were incubated for 1 hour at 37^o C and washed three times in HBSS. Samples of the cells (200 μ l containing 8x10⁴ cells) were seeded in each well and incubated for 1 hour at 37^o C and 5% CO₂. After the incubation, plates were

carefully washed four times in warm HBSS and the adhered cells were fixed with 1% glutaraldehyde for thirty minutes. Six replicates were used for each treatment. Three different non-overlapping random areas *per* well were taken for quantification in an inverted microscope, similarly to what was described above. Results are expressed as the mean of the counts obtained in each treatment replicate.

Flow cytometry analysis

Murine PEC were analyzed for surface expression of CD11a (clone 2D7), CD11b (M1/70), CD18 (GAME-46), CD49d (9C10), CD62L (MEL-14), CD102 (3E2) and CD106 (429/MVCAM.A). All antibodies were fluorescein conjugates obtained from BD-Pharmingen. Non-infected or *Leishmania*-infected cells were suspended in PBS containing 1% BSA and 0.05% sodium azide and blocked with 5% mouse serum plus 5% FBS for thirty minutes on ice. The cells were then incubated with labeled antibodies or isotype controls (A95-1 and R35-95 from BD-Pharmingen) in a dilution of 1:200 for thirty minutes. The data shown is representative of four independent experiments. Cells were washed and analyzed on a FACScan flow cytometer using the CellQuest software (Becton–Dickinson, USA). The histograms and bitmaps of distribution of cell populations were constructed using the FlowJo Software (Tree Star Inc, USA). Fifty thousand events were analyzed per sample.

Chemokine receptor expression analysis by Real-Time PCR

We analyzed six different chemokine receptors known to be present on monocytic cells (CCR1, 3, 4, 5, 7 and CXCR4) (35, 42, 43, 54, 55). Total RNA was extracted using the RNeasy RNA extraction kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's protocol. Real-

time RT-PCR was performed on an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, USA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) after reverse transcription of 1 μ g RNA using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, USA). The relative level of gene expression was determined by the comparative Ct method as described by the manufacturer, whereby each sample was normalized to 18S and expressed as a fold change compared with untreated controls. Primer3 software (Whitehead Institute for Biomedical Research, USA) (40) was used to design the specific primers (Table 1).

Analysis of results

The statistical significance of the difference between groups was assessed using the two-tailed student's *t* test or one-way ANOVA, followed by Newman–Keuls post test, with critical level of significance at $P < 0.05$. Trends were measured using Pearson's correlation coefficient (*r*).

RESULTS

The intensity of the infection determines the adhesion rate to connective tissue of mouse monocytic phagocytes

We first evaluated the effect of the infection intensity on phagocyte adhesion using different doses of parasites per cell (figure 1). Twenty-four hours after the infection, the percentage of infected cells inversely correlated with the number of adhered cells ($r = -0.734$, $P < 0.0001$). The number of parasites per infected phagocyte also negatively correlated with the connective tissue adhesion ($r = -0.780$, $P < 0.0001$). These correlations followed a polynomial distribution, reaching a plateau at about 50% of infected phagocytes or at three parasites *per* infected cell.

***Leishmania* infection modulates phagocyte adhesion as early as two hours after infection**

We next tested whether the observed effect on *Leishmania*-infected macrophage adhesion was dependent on the time of exposure to the parasite. Observing different time points after *in vitro* infection (figure 2), we noticed a significant reduction in adhesion at two hours (25.1 to 41.8% of the control levels; ANOVA $P < 0.01$). The effect of *Leishmania* infection on cell adhesion was partially reverted between two to six hours ($P < 0.05$) and was kept in a plateau thereafter, until the last time point tested (24h).

A critical rate of infection has to be achieved in order to change the adherence of mononuclear phagocytes to the connective tissue two hours after infection

As shown in figure 3A, two hours after PEC infection with 0.6 parasite per cell, the cell adhesion was not significantly decreased. It remained at 92.8 to 93.4% of the control levels (ANOVA $P>0.05$), while infection with 2.5 parasites per cell significantly reduced the adhesion of the cells to inflamed connective tissue (53.0 to 69.5% of the control levels, ANOVA $P<0.05$). After twenty-four hours of infection with 0.6 live parasite per cell, however, we observed a significant reduction in the adhesion of PEC to connective tissue (55.4 to 74.2% of the control levels, ANOVA $P<0.001$; figure 3B).

Modulation of mononuclear phagocyte adherence to inflamed connective tissue is sustained by infection and not by phagocytosis of killed parasites

In order to examine if the effect on leukocyte adhesion could be reproduced by products of dead parasites, phagocytes were incubated with killed *Leishmania*. Incubation with 10 parasites *per* cell for the short period of two hours reduced the adhesion of PEC to the connective tissue (26.2 to 50.5%, ANOVA $P<0.001$; figure 3A). The same phenomenon was not observed when the incubation period was extended to 24 hours: the adhesion varied from 78.8 to 124.0% of the control levels (ANOVA $P>0.05$; figure 3B). At this later time point, the number of parasite-containing phagocytes in the group incubated with ten killed parasites per cell was equivalent to that observed in the group infected with two live parasites per cell (22.7 vs 28.5%; *t* test $P=0.7$), where significant reduction in adhesion was observed. Identical results were obtained using killed promastigotes or amastigotes.

Since we observed some differences between results of the experiments performed at early (2 to 4 hours) or after longer periods (8 to 24 hours) of *Leishmania* infection, we considered the possibility that distinct mechanisms influencing phagocyte adhesion would be taking place at

these two stages of infection. Hence, we performed some of the subsequent experiments taking in account those two times of infection.

***Leishmania* infection decreases mononuclear phagocyte adhesion to purified extra-cellular matrix components**

In order to identify the cell-connective tissue adhesion pathways altered in the *Leishmania* infection we have performed a series of experiments using fibronectin, collagen and laminin as substrate for cell adhesion (39). The adhesion of PEC to all the tested extra-cellular matrix components was reduced upon infection of the cells with *Leishmania* (figure 4). Adhesion to fibronectin was reduced to 26.3% (45.9 to 3.8; ANOVA $P<0.01$) of the control levels. Moreover, the number of cells adhered to collagen or laminin was small, and further reduced upon *Leishmania* infection: 22.3% (84.3 to 16.3%; ANOVA $P<0.05$) and 17.8% (40.9 to 17.8%; ANOVA $P<0.05$) of the control levels respectively.

The expression of adhesion molecules is not modulated by *Leishmania* either two or twenty-four hours after infection

Since the experiments described above indicated impairment of a wide range of integrins involved in phagocyte-connective matrix interactions, we decided to compare the surface expression of adhesion molecules between infected and non infected phagocytes. The PEC infected with *Leishmania* displayed only a slight shift towards a decrease of CD49d (VLA4 α_4 chain, a fibronectin receptor) in two out of four experiments (figure 5). No significant changes in the intensity of expression of other adhesion molecules involved in cell-cell or cell-matrix interactions such as CD11a (LFA-1 α_L chain), CD11b (Mac-1 α_M chain), CD18 (β_2 integrin

chain), CD62L (L-Selectin), CD102 (LFA-1 ligand ICAM-2) or CD106 (VLA4 ligand VCAM-1) were observed in four independent experiments (figure 5).

Differences in the profile of adhesion molecule expression were, however, associated to the intensity of phagocyte infection (figure 6): compared to the CD11b^{neg} and CD11b^{lo} populations, the CD11b^{hi} population showed a higher percentage of infection (13.5-20.7% and 15.8-26.1% vs 49.6-97.3%, respectively). Almost all highly infected cells were in the CD11b^{hi} population. The CD11a^{neg} population had a higher percentage of infected cells as compared to the CD11a^{pos} population (59.0-91.1% vs 24.1-30.9%). Almost all the CD11a^{neg} population was highly infected. CD49d showed a pattern of infection similar to the one observed with the CD11a staining (66.6-83.5% infected cells in the CD49d^{neg} and 23.5-37.0% in the CD49d^{pos} population). Also, most CD49d^{neg} cells were highly infected.

Analyses of cells gated at the *Leishmania*^{pos} and *Leishmania*^{neg} sub-populations (figure 6, center histograms) revealed that CD11b expression was bimodal in the infected population showing discrete CD11b^{lo} and CD11b^{hi} peaks. Although the CD11b^{hi} peak was blunt in the uninfected sub-population, the proportion of the cell populations in gates CD11b-negative, -low and -high (figure 6, CD11b, first and second columns) was unchanged comparing the *Leishmania* to the control group (negative, 3.7-16.7% vs 4.1-17.6%; low, 67.0-88.9% vs 56.9-71.0%; high, 8.3-21.7% vs 10.8-39.8).

Very late activation antigen (VLA) 4 function is modulated by *Leishmania* infection

Manganese regulates integrin function and activate most integrins to its highest affinity form without modifying membrane clustering formation or surface expression levels (9, 45). To

confirm that the impairment in the infected-cell adhesion to fibronectin resulted from changes in VLA4 function instead of in the expression of this integrin, we conducted experiments replacing Ca^{+2} and Mg^{+2} by Mn^{+2} on infected cells during the adhesion assays (figure 7). Calcium and Mg^{+2} replacement by Mn^{+2} increased the adhesion of both infected (447.9 to 3961.0 cells/ mm^2) and uninfected cells (2193.0 to 3945.0 cells/ mm^2) to fibronectin (ANOVA $P < 0.001$), reverting the inhibitory effect of *Leishmania* infection on the adhesive capabilities of these cells (ANOVA $P > 0.05$). Anti-VLA4 antibodies abrogated the effect produced by Mn^{+2} on the adhesion of these cells (ANOVA $P < 0.001$).

***Leishmania* down-regulates CCR4 and CCR5 gene expression by mononuclear phagocytes**

Since our data suggested that changes in integrin function instead of adhesion molecule expression was altered in *Leishmania*-infected cells, we investigated possible changes in the expression of chemokine receptors by infected cells. We found that two hours after infection (figure 8A), CCR1, CCR5 and CCR7 were up-regulated about two times comparing to the control group (1.59 to 2.89, 1.68 to 3.74 and 1.92 to 2.36 times respectively). By 16 hours after infection (figure 8B), however, live *Leishmania* caused a down-regulation in the expression of CCR4 (-2.82 to -4.05 times) and CCR5 (-1.88 to -2.84 times). Killed *Leishmania* increased the expression of CCR4 at this same time point (1.66 to 5.43 times). The LPS-treated controls showed a marked reduction in the expression of CXCR4 both at two hours (-6.88 to -13.48 times) or sixteen hours (-1.81 to -3.74 times), in accordance with previous works (48, 51).

DISCUSSION

In the present study we investigated the mechanisms underlying the modulation of the adhesion of mononuclear phagocytes to connective tissue by *Leishmania*. This modulation, which has been previously described by de Almeida and collaborators (19) and by our group (11), may be important in the process of parasite dissemination to different tissues (30). Herein, we demonstrate that phagocyte adherence to the inflamed connective tissue is modulated by the parasite burden in the cell and the changes are sustained by infection, and not by phagocytosis of killed *Leishmania*. Our data suggest that mechanisms that regulate cell surface β 1-integrin activity, rather than the differential expression of these adhesion molecules, are implicated in the change of macrophage adhesion in leishmaniasis and that changes in the expression of chemokine receptors may be involved in this process.

In our previous report, we noticed that the reduction of adhesion observed after phagocyte infection by *Leishmania* was variable (11). Herein we show that differences in the intensity of infection cause such variation: a negative correlation was observed between the percentage of infected cells, the number of parasites per infected cell and their adherence to the connective tissue. It has been estimated that, in the early stages of *Leishmania* infection in vivo, the rate of parasites per phagocytic cell is low, varying in the range of 0.03 to 0.1 (17). As the disease progresses, however, the number of parasites steadily increases and may reach a rate of 30 to 100 parasites per phagocytic cell (17, 28). The partial clearance of the parasite from the inoculation site after a period of intense proliferation correlates to the appearance of infected cells at distant sites (50). Our data show that infection with small numbers of *Leishmania* was not able to reduce phagocyte adhesion at two hours post-infection. Nevertheless, significant reduction on phagocyte adhesion occurred by twenty-four hours, when intracellular

proliferation had taken place (33, 53). Indeed, increasing the amount of *Leishmania* parasites per cell significantly reduced phagocyte adhesion until reaching a plateau at ten parasites per cell even after two hours of co-incubation. Under conditions of such high parasite burden, connective-tissue adhesion by infected phagocytic cells reach levels of about 20-30% of that observed with non-infected cells. We are now studying the migratory capabilities and pathways used by these cells in vivo.

To evaluate whether the changes in phagocyte adhesion were dependent on the infection of the cells by the parasite or could be maintained by products of phagocytosed *Leishmania*, mononuclear phagocytes were incubated with either live or ethanol-killed *Leishmania*. We chose to use ethanol to kill *Leishmania* as this method would better preserve the carbohydrate structure as well as the morphology of the parasite (14). In experiments employing dead parasites, we only observed reduction in cell adhesion in the early stages of co-incubation (2h). Such inhibition in cell adhesion was reverted to control levels by twenty-four hours of culture, even when the number of parasites inside the cells was maintained at rates that inhibited adhesion if live *Leishmania* were used. In fact, when live parasites were used, an intense decrease in cell adhesion was observed two to four hours after infection, with slight reversion at later time points (8-24 hours). A possible explanation for this process is a transient blocking of adhesion molecules on the surface of phagocytic cells by molecules present on the surface of the *Leishmania* (non-internalized parasites are still seen at two hours after infection, some of them attached to the surface of phagocytes). *Leishmania* binds to Mac-1 (38) and other integrins (4) and these molecules are intimately linked to connective tissue-phagocyte and intercellular adhesion (9, 20, 52). Flow cytometry analyses of the cells used in this study shows that the CD11b^{hi} sub-population is highly phagocytic or permissive to *Leishmania* infection. Such findings may be related to the use of this pathway in parasite

binding and internalization by the phagocyte, producing a transient blocking of the interactions between this (and potentially of other integrins) and the connective tissue.

Integrins constitute the main molecules used by monocytic phagocytes to interact with connective tissue cells and extra-cellular matrix components like collagen, laminin and fibronectin (9). Integrins α_4/β_1 (VLA-4) and α_5/β_1 (VLA-5) are important in the interaction of monocytes with fibronectin (5, 10, 49). We have previously shown that monocytic phagocytes rely mainly on β_2 and α_4 -integrins to adhere to the inflamed connective tissue (11). Here we observed that the infection by *Leishmania* reduces macrophage adhesion to fibronectin, laminin and collagen. By using flow cytometry analyses, however, we did not observe decrease in the cell surface expression of any of the examined adhesion molecules. This is true for the whole group of cells co-incubated with *Leishmania* (11) and for the subset of amastigote containing cells (this work). It is now long recognized, however, that signaling via hepta-helical G-protein coupled chemokine receptors may modify the binding activity of integrins without altering their cell surface expression levels (20, 26, 29). Integrin function may be modulated by altering their lateral mobility/clustering and three-dimensional molecular conformation (22, 45). Consistent with these findings, we have shown herein that the adhesion of infected cells was almost completely restored by manganese, a phenomenon that was blocked by antibodies to the α_4 -integrin. As manganese is known to change the integrin from a low affinity to a high affinity state (45), these results indicate that the control of integrin affinity may be impaired in infected phagocytes.

We also showed that CCR1, CCR5 and CCR7 expression were increased during the early stages of in vitro infection with *Leishmania*, and CCR4 and CCR5 were decreased at later time points (16h). The beta chemokine receptor 4 (CCR4) has been described as an important

homing molecule directing lymphocytes specifically to the inflamed skin, in response to its ligands CCL17 (TARC) and CCL22 (MDC) (7). Immunohistochemistry of the inflammatory air pouches that we used in our adhesion assays revealed a strong expression of CCL17 (data not shown). Knockout mice lacking CCR4 show normal macrophage recruitment to the peritoneal cavity early after LPS injection but, by twenty-four hours, the number of these cells is much lower than that found on wild type mice. Reduction of peritoneal macrophage numbers was accompanied by resistance to LPS-induced shock and decreased macrophage-derived serum cytokine levels (12). These results indicate the importance of the impairment of the CCR4-dependent pathway in the kinetics of macrophage mobilization in an inflammatory setting. In our experiments, live but not killed *Leishmania* induced down-regulation of CCR4 and loss of phagocyte adherence to the connective tissue twenty-four hours after infection. This may indicate the involvement of this pathway in the migration of monocytic phagocytes from the *Leishmania* inoculation site and in the development of a systemic/adaptive response.

The main ligand for the CCR5 (RANTES or CCL5) has been shown to modulate the adhesion of eosinophils to ICAM-1, without altering the expression of β_2 -integrins (23). It has also been shown that the CCR5 ligands CCL3 (MIP-1 α) and CCL5 stimulate firm adhesion of monocytes to VCAM-1 and fibronectin-coated plates in a β_1 -integrin-dependent way, as a result of affinity regulation (49). Our results show that live *Leishmania* up-regulated the expression of CCR5 at the early stages of infection, as observed by Dasgupta and collaborators (15). Such effect, however, is rapidly reversed to downregulation as the infection progresses, in accordance with the findings of Steigerwald and Moll, whom showed that the *L. major*-induced downregulation of CCR2 and CCR5 decreased the capacity of bone marrow-derived dendritic cells to migrate toward its respective ligands CCL2 and CCL3 (44).

The possible participation of such down-regulation of CCR5 in lowering the capacity of infected cells to adhere to connective tissue is now being studied in our laboratory.

Previous work has shown that immunological hypo-responsiveness in leishmaniasis may be due to an active inhibition of the antigen-presenting functions of monocytic phagocytes, and that these effects are related to parasite burden in these cells (18, 25, 41). In this work we showed that integrin functions are impaired in these cells in a manner that is also dependent on parasite burden. Besides their functions in leukocyte trafficking, integrins have been shown to be necessary for the formation of immunological synapses and for antigen-presenting cell (APC) functions, stabilizing the APC-T-cell interaction and allowing the relatively low affinity TCR ligands to stimulate T cells (16, 24). Hence, we propose that, in addition to changes in B7 expression (25, 41), the impairment in integrin function in mononuclear phagocytes with high *Leishmania* burden may also contribute to the inefficient stimulation of CD4⁺ T-helper cells during antigen presentation. Thus, the impairment in integrin function observed in the work reported herein is in accordance with evidence suggesting that *Leishmania* produce a wide spectrum of suppressive changes in the infected phagocyte (6). The intracellular mechanisms altered by *Leishmania* infection that could mediate the bulk of these effects deserve further study. The identification of these intracellular pathways may disclose potential targets to be aimed at in new therapeutic strategies for aggressive forms of leishmaniasis and other diseases associated with inadequate addressing of phagocytes (46).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Bahia State Research Support Foundation (FAPESB) and Brazilian National Research Council (CNPq) grant # 473048/2003-5.

We are in debt with Dr. Lain C Pontes-de-Carvalho and Dr. Claudia Ida Brodskyn, both from Fiocruz-Gonçalo Moniz Research Center, for the careful review and suggestions to this manuscript.

REFERENCES

1. **Barral, A., D. Pedral-Sampaio, G. Grimaldi Junior, H. Momen, D. McMahon-Pratt, A. Ribeiro de Jesus, R. Almeida, R. Badaro, M. Barral-Netto, E. M. Carvalho, and et al.** 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* **44**:536-546.
2. **Belhadj, S., F. Pratlong, N. H. Toumi, K. Kallel, H. Mahjoub, H. Babba, R. Azaiez, J. P. Dedet, and E. Chaker.** 2002. Visceral leishmaniasis in Tunisia: result of the isoenzymatic characterization of 65 *Leishmania infantum* strains. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**:627-630.
3. **Bittencourt, A. L., and M. Barral-Netto.** 1995. Leishmaniasis, p. 597-651. *In* W. Doerr and G. Seifert (ed.), *Tropical Pathology*, 2 ed, vol. 8, Cap. 14. Springer, Berlin.
4. **Brittingham, A., G. Chen, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser.** 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* **67**:4477-4484.
5. **Brown, D. L., D. R. Phillips, C. H. Damsky, and I. F. Charo.** 1989. Synthesis and expression of the fibroblast fibronectin receptor in human monocytes. *J Clin Invest* **84**:366-370.
6. **Buates, S., and G. Matlashewski.** 2001. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. *J Immunol* **166**:3416-3422.
7. **Campbell, J. J., G. Haraldsen, J. Pan, J. Rottman, S. Qin, P. Ponath, D. P. Andrew, R. Warnke, N. Ruffing, N. Kassam, L. Wu, and E. C. Butcher.** 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* **400**:776-780.

8. **Campos-Ponce, M., C. Ponce, E. Ponce, and R. D. Maingon.** 2005. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol* **109**:209-219.
9. **Carlos, T. M., and J. M. Harlan.** 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**:2068-2101.
10. **Carr, M. W., R. Alon, and T. A. Springer.** 1996. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity* **4**:179-187.
11. **Carvalho, D. G., A. Barbosa, Jr., M. D'El-Rei Hermida, J. Clarencio, N. F. Pinheiro, Jr., P. S. Veras, and W. L. Dos-Santos.** 2004. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. *Exp Parasitol* **107**:189-199.
12. **Chvatchko, Y., A. J. Hoogewerf, A. Meyer, S. Alouani, P. Juillard, R. Buser, F. Conquet, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, and C. A. Power.** 2000. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* **191**:1755-1764.
13. **Colmenares, M., S. Kar, K. Goldsmith-Pestana, and D. McMahon-Pratt.** 2002. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96 Suppl 1**:S3-7.
14. **Culling, C. F. A., R. T. Allison, and W. T. Barr.** 1985. Cellular pathology technique, 4th ed. Butterworths, London ; Boston.
15. **Dasgupta, B., K. Roychoudhury, S. Ganguly, M. A. Akbar, P. Das, and S. Roy.** 2003. Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scand J Immunol* **57**:366-374.

16. **Davignon, D., E. Martz, T. Reynolds, K. Kurzinger, and T. A. Springer.** 1981. Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* **127**:590-595.
17. **de Almeida, M. C.** 2002. Infective inoculum for *Leishmania*. *Trends Parasitol* **18**:154-155.
18. **de Almeida, M. C., S. A. Cardoso, and M. Barral-Netto.** 2003. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* **33**:153-162.
19. **de Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto.** 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**:861-870.
20. **Detmers, P. A., S. K. Lo, E. Olsen-Egbert, A. Walz, M. Baggiolini, and Z. A. Cohn.** 1990. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med* **171**:1155-1162.
21. **Gradoni, L., and M. Gramiccia.** 1994. *Leishmania infantum* Tropism: Strain genotype or host immune status? *Parasitol Today* **10**:264-267.
22. **Hogg, N., R. Henderson, B. Leitinger, A. McDowall, J. Porter, and P. Stanley.** 2002. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev* **186**:164-171.
23. **Kakazu, T., J. Chihara, A. Saito, and S. Nakajima.** 1995. Effect of RANTES on eosinophil adhesion to plates coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1 and expression of beta 2-integrin adhesion molecules on eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* **108 Suppl 1**:9-11.

24. **Katagiri, K., M. Hattori, N. Minato, and T. Kinashi.** 2002. Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol Cell Biol* **22**:1001-1015.
25. **Kaye, P. M., N. J. Rogers, A. J. Curry, and J. C. Scott.** 1994. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. *Eur J Immunol* **24**:2850-2854.
26. **Laudanna, C., J. Y. Kim, G. Constantin, and E. Butcher.** 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol Rev* **186**:37-46.
27. **Liarte, D. B., I. L. Mendonca, F. C. Luz, E. A. Abreu, G. W. Mello, T. J. Farias, A. F. Ferreira, M. A. Millington, and C. H. Costa.** 2001. QBC for the diagnosis of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop* **34**:577-581.
28. **Lira, R., M. Doherty, G. Modi, and D. Sacks.** 2000. Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. *Infect Immun* **68**:5176-5182.
29. **Lloyd, A. R., J. J. Oppenheim, D. J. Kelvin, and D. D. Taub.** 1996. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol* **156**:932-938.
30. **Martinez, J. E., Alba, L. Arias, M. A. Escobar, and N. G. Saravia.** 1992. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **86**:392-394.
31. **Moll, H., H. Fuchs, C. Blank, and M. Rollinghoff.** 1993. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**:1595-1601.

32. **Muraille, E., C. De Trez, B. Pajak, F. A. Torrentera, P. De Baetselier, O. Leo, and Y. Carlier.** 2003. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* **71**:2704-2715.
33. **Nacy, C. A., and C. L. Diggs.** 1981. Intracellular replication of *Leishmania tropica* in mouse peritoneal macrophages: comparison of amastigote replication in adherent and nonadherent macrophages. *Infect Immun* **34**:310-313.
34. **Noyes, H., M. Chance, C. Ponce, E. Ponce, and R. Maingon.** 1997. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol* **85**:264-273.
35. **Power, C. A., A. Meyer, K. Nemeth, K. B. Bacon, A. J. Hoogewerf, A. E. Proudfoot, and T. N. Wells.** 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J Biol Chem* **270**:19495-19500.
36. **Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller.** 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**:753-761.
37. **Ritter, U., A. Meissner, C. Scheidig, and H. Korner.** 2004. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* **34**:1542-1550.
38. **Rosenthal, L. A., F. S. Sutterwala, M. E. Kehrli, and D. M. Mosser.** 1996. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun* **64**:2206-2215.

39. **Rosso, F., A. Giordano, M. Barbarisi, and A. Barbarisi.** 2004. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* **199**:174-180.
40. **Rozen, S., and H. Skaletsky.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**:365-386.
41. **Saha, B., G. Das, H. Vohra, N. K. Ganguly, and G. C. Mishra.** 1995. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* **25**:2492-2498.
42. **Sato, K., H. Kawasaki, H. Nagayama, R. Serizawa, J. Ikeda, C. Morimoto, K. Yasunaga, N. Yamaji, K. Tadokoro, T. Juji, and T. A. Takahashi.** 1999. CC chemokine receptors, CCR-1 and CCR-3, are potentially involved in antigen-presenting cell function of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **93**:34-42.
43. **Sozzani, S., W. Luini, A. Borsatti, N. Polentarutti, D. Zhou, L. Piemonti, G. D'Amico, C. A. Power, T. N. Wells, M. Gobbi, P. Allavena, and A. Mantovani.** 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* **159**:1993-2000.
44. **Steigerwald, M., and H. Moll.** 2005. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* **73**:2564-2567.
45. **Takagi, J., and T. A. Springer.** 2002. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev* **186**:141-163.
46. **Tapia, F. J., G. Caceres-Dittmar, M. A. Sanchez, C. T. Fernandez, A. J. Rondon, and J. Convit.** 1994. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol* **3**:17-22.

47. **Teixeira, M. C., R. de Jesus Santos, R. B. Sampaio, L. Pontes-de-Carvalho, and W. L. dos-Santos.** 2002. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol Res* **88**:963-968.
48. **Verani, A., F. Sironi, A. G. Siccardi, P. Lusso, and D. Vercelli.** 2002. Inhibition of CXCR4-tropic HIV-1 infection by lipopolysaccharide: evidence of different mechanisms in macrophages and T lymphocytes. *J Immunol* **168**:6388-6395.
49. **Weber, C., R. Alon, B. Moser, and T. A. Springer.** 1996. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. *J Cell Biol* **134**:1063-1073.
50. **Wilson, M. E., D. J. Innes, A. D. Sousa, and R. D. Pearson.** 1987. Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *J Parasitol* **73**:55-63.
51. **Worgall, S., R. Connor, R. J. Kaner, E. Fenamore, K. Sheridan, R. Singh, and R. G. Crystal.** 1999. Expression and use of human immunodeficiency virus type 1 coreceptors by human alveolar macrophages. *J Virol* **73**:5865-5874.
52. **Wright, S. D., P. A. Reddy, M. T. Jong, and B. W. Erickson.** 1987. C3bi receptor (complement receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:1965-1968.
53. **Wyler, D. J.** 1982. In vitro parasite-macrophage interactions in human leishmaniasis. Evidence for an active role of the parasite in attachment. *J Clin Invest* **70**:82-88.
54. **Yanagihara, S., E. Komura, J. Nagafune, H. Watarai, and Y. Yamaguchi.** 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* **161**:3096-3102.
55. **Zhou, Y., T. Kurihara, R. P. Ryseck, Y. Yang, C. Ryan, J. Loy, G. Warr, and R. Bravo.** 1998. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune

response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor.

J Immunol **160**:4018-4025.

FIGURE LEGENDS

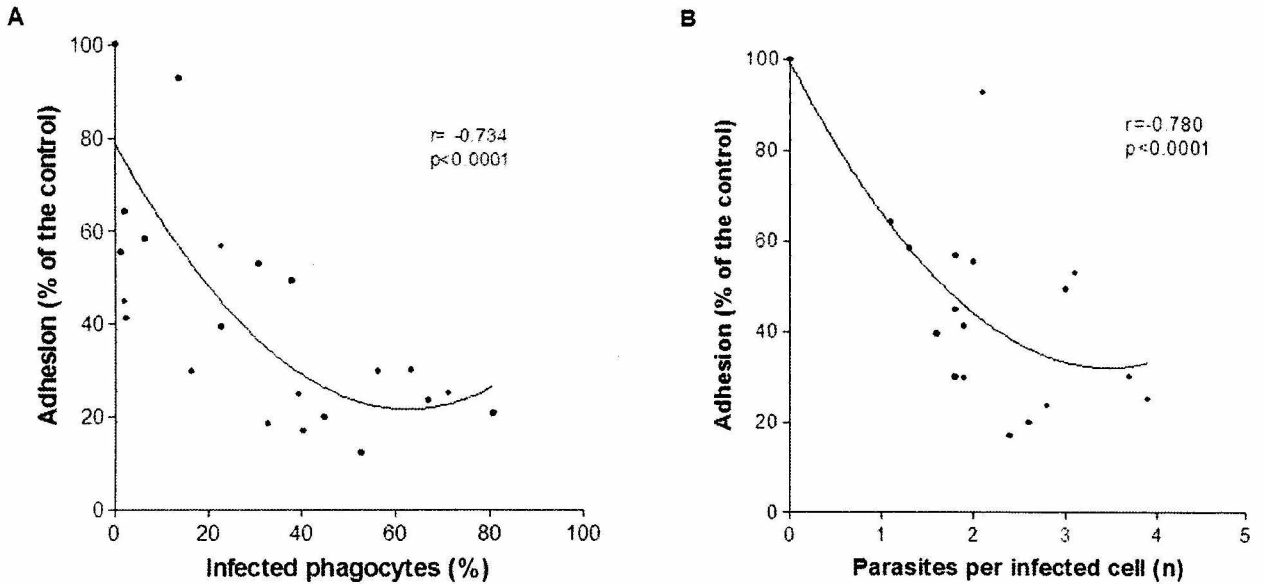


Figure 1. Correlation between adhesion of peritoneal exudate cells to inflamed connective tissue and the intensity of infection, as measured by the percentage of infected phagocytes (A) and the number of parasites per infected cell (B). Twenty-four hours after infection, the adherence to the connective tissue inversely correlated to both the percentage of infected phagocytes ($r = -0.734$, $P < 0.0001$) and number of parasites per infected cell ($r = -0.780$, $P < 0.0001$). The dots represent data from five independent experiments.

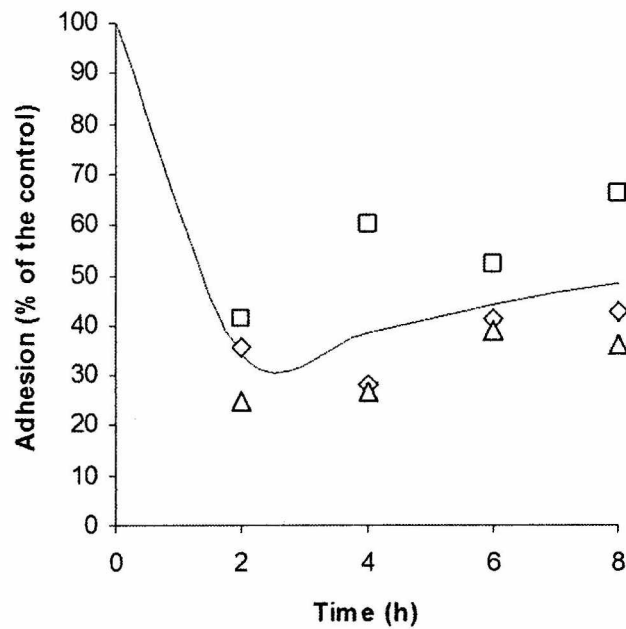


Figure 2. Effect of infection time on the adhesion of mouse mononuclear phagocytes to the connective tissue. PEC were cultivated with medium alone (0h), or medium containing live *Leishmania* for 2, 4, 6 or 8 hours and left to adhered for thirty minutes to a section of inflamed skin as described in *Material and Methods*. The loss of adhesion of infected phagocytes was evident by 2h after infection. This effect is partially reverted between 2 and 6 hours (student's *t* test $P < 0.05$) after infection. Geometric forms represent three independent experiments and the line represents the mean. Note that the tendency is maintained in all experiments in spite of the variation among different assays.

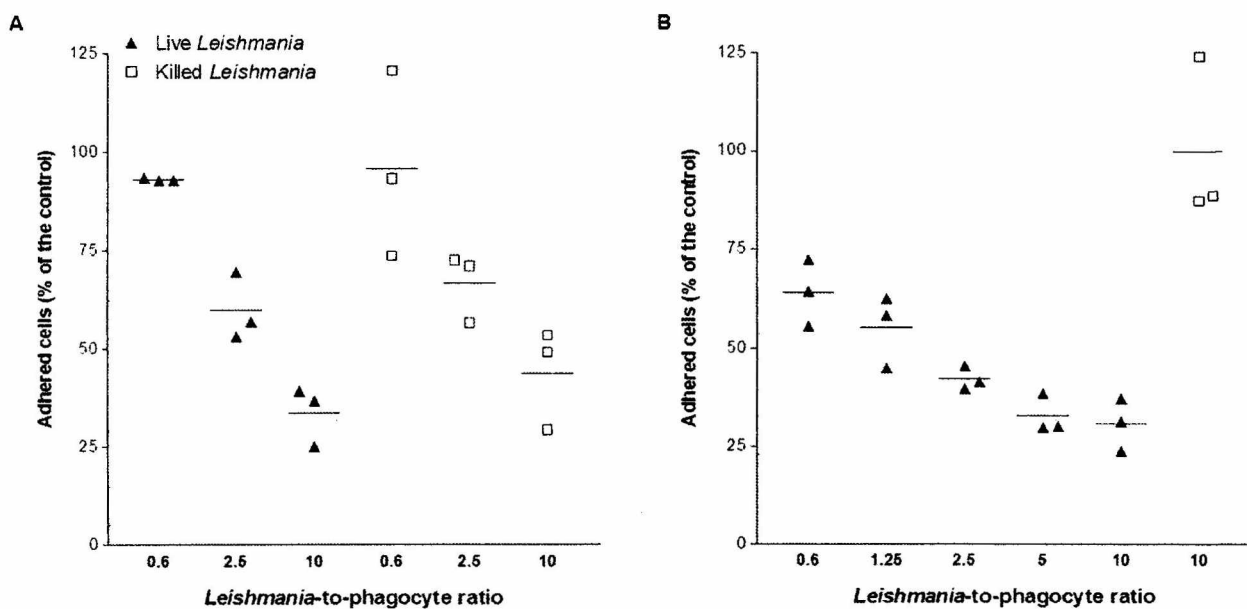


Figure 3. Effect of the infection with different *Leishmania*-to-phagocyte ratios in cell adhesion to connective tissue, two (A) or 24 hours (B) after infection. Monocytes were cultivated with medium alone (controls), or with medium containing either live (filled triangles) or ethanol-killed (empty squares) *Leishmania* and were left to adhere for thirty minutes to sections of inflamed skin as described in *Material and Methods*. Incubation of the phagocytes with small amounts of *Leishmania* (0.6 per phagocyte) led to a decrease in the adhesion twenty-four hours ($P < 0.001$) but not two hours after infection ($P > 0.05$). Data extracted from three independent assays.

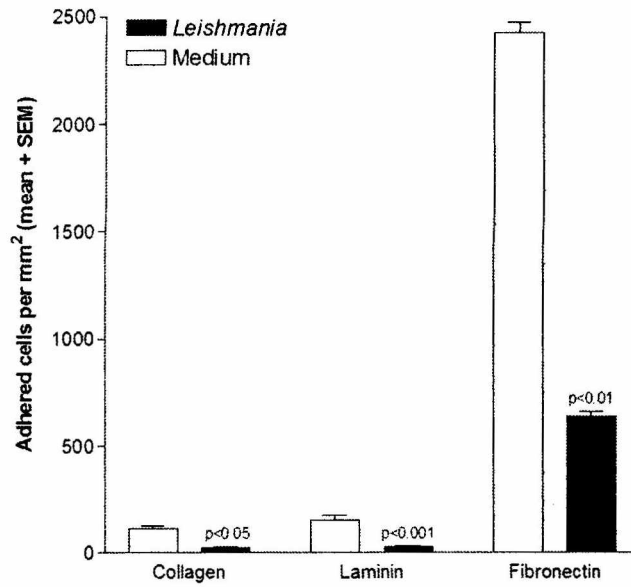


Figure 4. Effect of *Leishmania* infection in the adhesion of mouse mononuclear phagocytes to purified extra-cellular matrix components. Cells cultivated with medium alone (empty bars), or medium containing live *Leishmania* (filled bars) were washed and adhered for thirty minutes to pre-coated ELISA plate wells, as described in *Material and Methods*. *Leishmania* infection reduced adhesion to collagen (112.5 vs 25.0 cells/mm²; ANOVA, $P < 0.05$), laminin (153.1 vs 28.1 cells/mm², ANOVA, $P < 0.001$) and fibronectin (2421.9 vs 637.5 cells/mm², 73; ANOVA, $P < 0.01$). The data shown is representative of five different experiments. The P values of the differences between results obtained from infected and non-infected control cells are supplied.

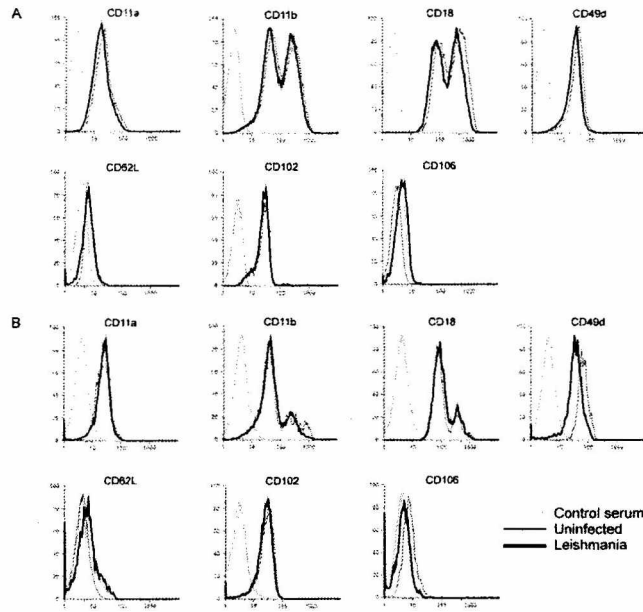


Figure 5. Cell surface expression of adhesion molecules on mouse peritoneal exudate cells, two (A) or 24 hours (B) after infection with *Leishmania*. Cells cultivated with medium alone (thin lines) or with live *Leishmania* (bold lines) were washed and stained with the appropriate fluorochrome-linked antibody, as described in *Material and Methods*. Gray lines represent the isotype controls. The data depicted is representative of four independent analyses.

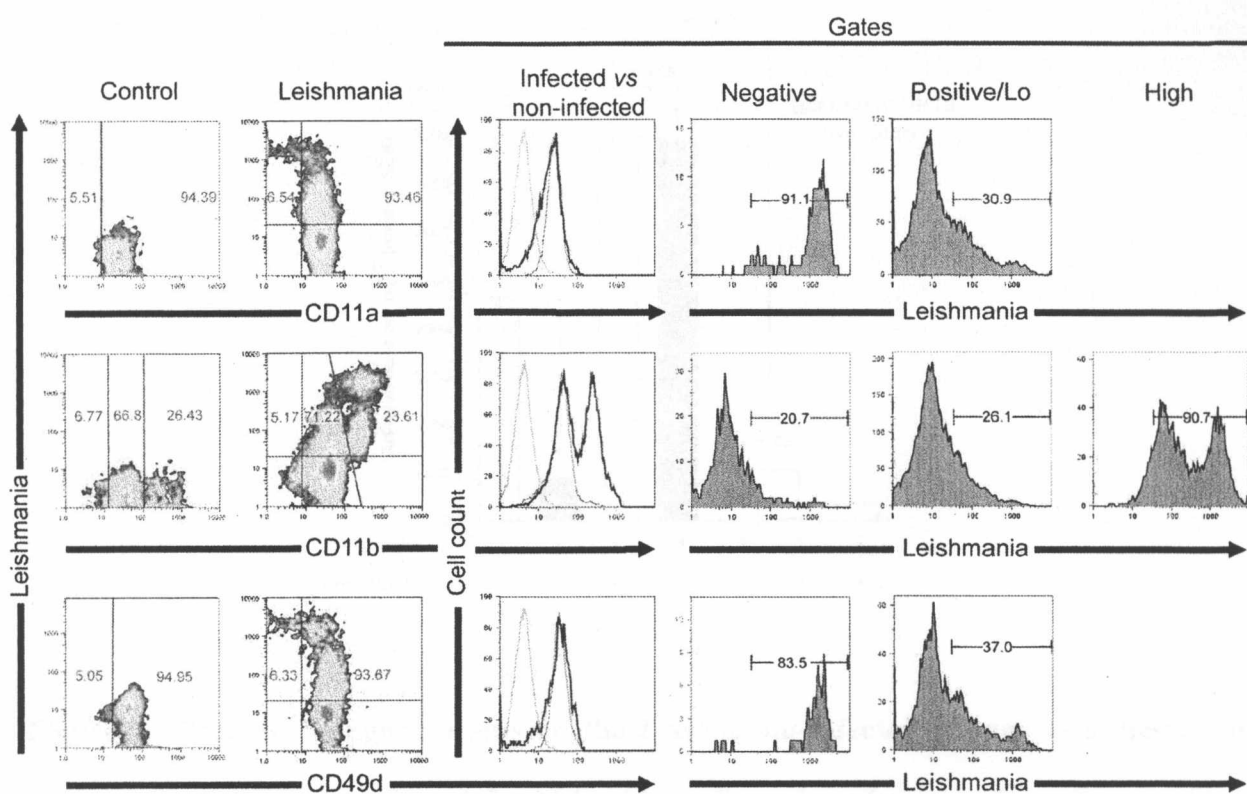


Figure 6. Cell surface expression of adhesion molecules and infection rate in subpopulations of mouse peritoneal exudate cells 24 hours after culture. Cells cultivated with medium alone (control), or medium containing live fluorescently stained *Leishmania* (*Leishmania*) were washed and stained with FITC-conjugated antibodies as described in *Material and Methods*. Numbers in the contour plots (1st and 2nd columns) represent the proportion of the populations defined by the fluorescence intensity in the X axis. In the center histograms (3rd column), gray lines represent the isotype control, black thin lines represent the staining of cells negative for *Leishmania* (Y axis) in the 2nd column and bold black lines the positive cells. The filled histograms on the right (4th, 5th and 6th columns) express the percentage of the infected population in the gates negative, positive/lo and high defined in the plots on the 2nd column. The data presented is representative of four independent experiments.

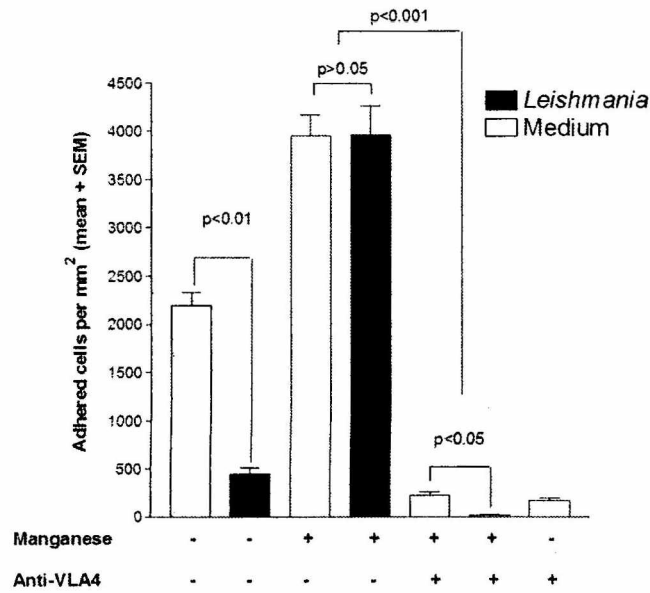


Figure 7. Effect of manganese ions on the *Leishmania*-infected phagocyte adhesion to fibronectin. Cells were cultivated for 24 h with medium alone (empty columns), or medium containing *Leishmania* (solid columns), washed, treated with 250 μM Ca^{+2} and 250 μM Mg^{+2} or with 500 μM Mn^{+2} in the presence of anti- α_4 -integrin antibody (anti-VLA4) or isotype controls. Cells were allowed to adhere for thirty minutes to fibronectin-coated ELISA plate wells, as described in *Material and Methods*. The addition of Mn^{+2} reverted the loss of phagocyte adhesion induced by *Leishmania* infection (ANOVA, $P>0.05$). The increase in adhesion induced by Mn^{+2} addition was abrogated by the addition of an anti- α_4 -integrin antibody (ANOVA, $P<0.001$).

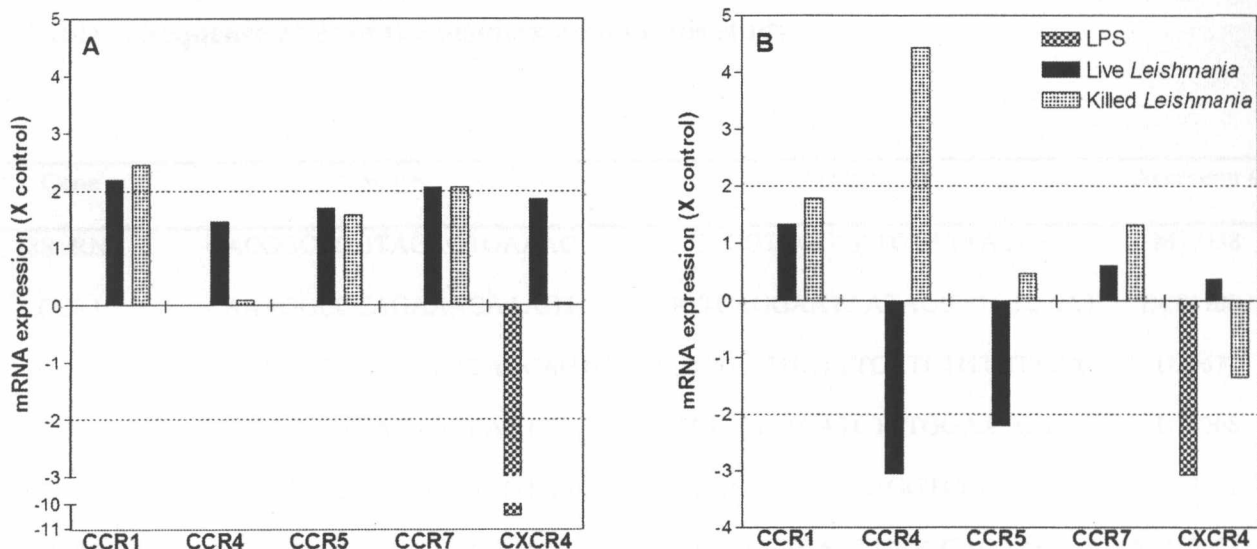


Figure 8. Chemokine receptor mRNA expression by PEC, two (A) or sixteen hours (B) after incubation with *L. amazonensis*. Cells were cultivated in medium alone (base line), in the presence of 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS (checkered columns) or medium containing either live (solid bars) or killed (dotted bars) *Leishmania*. After incubation, total RNA was extracted and subjected to reverse transcription-real-time PCR, as described in the *Material and Methods*. Two hours after incubation (A), either live or ethanol-killed *Leishmania* caused an increase in the expression of CCR1, CCR5 and CCR7, while LPS decreased CXCR4 expression by 10.4 times. Twenty four hours after incubation (B), killed parasites induced a four-fold increase in the expression of CCR4 while live parasites inhibited CCR4 (three times) and CCR5 (two times) expression. LPS decreased CXCR4 expression three times. This data is representative of three independent experiments.

Table 1. Sequence 5'-3' of the primers used in this study.

Gene	Sense	Anti-Sense	Accession #
18S rRNA	CACGGCCGGTACAGTGAAAC	CCCGTCGGCATGTATTAGCT	M27358
CCR1	CAAAGGCCCCAGAAACAAAGT	TGGTCAGGAATAATAGCTTCTGAAT	BC011092
CCR3	TGTTATCTCTGTTTCATTAGCAGTG	CAGTCTTGATTTTCATCTGTGTTGA	U29677
CCR4	GACTGTCCTCAGGATCACTTTC	GGCATTTCATCTTTGGAATCG	U15208
CCR5	CTCCTAGCCAGAGGAGGTGA	TGTCATAGCTATAGGTCGGAACTG	U83327
CCR7	CTACAGCCCCCAGAGCAC	TGACCTCATCTTGGCAGAAG	NM_007719
CXCR4	GGTAACCACCACGGCTGTA	AGTCTCCAGACCCCACTTCTT	NM_009911

5 DISCUSSÃO

Nesta discussão, abordaremos alguns pontos que não foram aprofundados na discussão do artigo apresentado, por questões de restrição de espaço e forma do periódico escolhido.

Diversos trabalhos têm tentado pontuar o tipo celular responsável pelo transporte e apresentação de antígeno durante a infecção por *Leishmania* (vide abaixo). Uma vez que a perda de adesão ao tecido conjuntivo pode representar um passo inicial neste processo, a identificação precisa das células que sofrem este tipo de alteração é crucial para o entendimento da patogênese da leishmaniose (CARVALHAL *et al.*, 2004).

O primeiro trabalho a acessar esta questão foi publicado por Moll e colaboradores (1993). Neste trabalho a célula implicada no transporte e apresentação de antígeno de *Leishmania major* é a célula de Langerhans. Mais tarde outros autores demonstraram que as células de Langerhans, apesar de migrarem para o linfonodo drenante, não são capazes de apresentar antígenos eficazmente em uma variedade de sistemas (ALLAN *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2003), incluindo durante a infecção por *Leishmania* (LE MOS *et al.*, 2004; MISSLITZ *et al.*, 2004; RITTER *et al.*, 2004). Além disso, outros trabalhos também suportam a hipótese de que as células que carregam antígenos de *Leishmania* (MURAILLE *et al.*, 2003) ou partículas de látex (RANDOLPH *et al.*, 1999) são células derivadas de monócitos inflamatórios circulantes.

Makala e colaboradores (2001b) demonstraram que, no *pool* de células de exsudato peritoneal induzido por tioglicolato (tipo celular utilizado neste trabalho), existem células com capacidade de diferenciação em células dendríticas com fenótipo mielóide e grande capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T *in vitro*. Este fenótipo é compatível com o sub-tipo de célula dendrítica que é responsável por apresentar antígenos a linfócitos T *in vivo* em outros sistemas (ALLAN *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2003; LEMOS *et*

al., 2004; RITTER *et al.*, 2004). Estamos agora conduzindo experimentos em nosso laboratório para elucidar o fenótipo das células que sofrem redução na adesão ao tecido conjuntivo inflamado.

Como visto na *Introdução*, integrinas são moléculas que podem ter suas funções reguladas de diversas maneiras. Os mecanismos fisiológicos de controle dessas moléculas provavelmente dependem de eventos intracelulares que culminam com alterações na função das integrinas na superfície externa da célula (*inside-out signaling*) (KINASHI, 2005).

Duas vias principais de sinalização intra-celular estão implicadas nas alterações de função das integrinas: (1) vias associadas a pequenas GTPases da família Rap1 (KATAGIRI *et al.*, 2000) e (2) as vias associadas a fosfatidilinositol-3-OH cinase (PI3K), ambas associadas a receptores de quimiocinas acoplados a proteínas G (GIAGULLI *et al.*, 2004).

Dois dos pontos em questão são: (1) qual o mecanismo desencadeado pela infecção por *Leishmania* que responde pela perda de adesão dos fagócitos ao tecido conjuntivo inflamado ou a componentes imobilizados da matriz extracelular e (2) qual o meio utilizado pelo parasito para levar a este fenômeno.

Tanto a via de Rap1 quanto a via de PI3K são reguladas por mensageiros intermediários que podem ser comuns a diversas outras vias de sinalização (BOS *et al.*, 2003; GIAGULLI *et al.*, 2004; KATAGIRI *et al.*, 2004). Dessa maneira, a inibição funcional de integrinas, observada neste estudo, pode fazer parte de um programa comum, desencadeado pela infecção por *Leishmania*, no qual algumas funções celulares estão fortemente suprimidas (ALEXANDER & RUSSELL, 1992).

Até o momento, pouco se conhece sobre a interferência da infecção por *Leishmania* na modulação da função de integrinas através dessas vias. Apesar disso, parece improvável que este parasito aja através da inibição de

vias dependentes de PI3K, uma vez que animais nocautes para uma subunidade crucial para a ativação desta cinase são mais resistentes à infecção por *L. major* que seus pares selvagens como consequência do aumento não controlado na expressão de IL-12 naqueles animais (FUKAO *et al.*, 2002).

Tem sido amplamente demonstrado que diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de causar diversos efeitos inibitórios em células mononucleares infectadas. Entre estes estão alterações na homeostase de cálcio (OLIVIER *et al.*, 1992a; OLIVIER *et al.*, 1992b), a inibição da modulação de expressão de moléculas co-estimulatórias em macrófagos (KAYE *et al.*, 1994; SAHA *et al.*, 1995), monócitos (DE ALMEIDA *et al.*, 2003a) e células dendríticas (PRINA *et al.*, 2004), hipo-responsividade ao estímulo com interferon-gama (IFN- γ) (REINER, 1994; NANDAN & REINER, 1995) ou mesmo a supressão da expressão de diversas outras moléculas, como demonstrado através de técnicas de micro-arranjo de DNA (BUATES & MATLASHEWSKI, 2001).

O achado de que macrófagos infectados com espécies de *Leishmania* estavam em estado de hipo-responsividade ao IFN- γ , além de outros achados, acima mencionados, trouxeram consigo a visão geral de que este parasita leva o fagócito a um estado de desativação (REINER, 1994). Entretanto, tem sido cada vez mais aceita a idéia de que macrófagos podem ser ativados da maneira clássica, com expressão de citocinas pró-inflamatórias e ativação de vias de aniquilação de germes intracelulares, ou de uma maneira chamada alternativa ou tipo II. Nessa última situação, os macrófagos expressam citocinas anti-inflamatórias ou moduladoras como TGF- β , IL-10 e TNF- α e são menos capazes de destruir microorganismos intra-celulares (MA *et al.*, 2003; MOSSER, 2003).

Recentemente, alguns autores têm demonstrado que as modificações na expressão gênica de macrófagos nos momentos mais iniciais da infecção por *Leishmania chagasi* não são tão abrangentes como foi demonstrado em pontos mais tardios da infecção (BUATES & MATLASHEWSKI, 2001). De

fato, os dados encontrados por Rodriguez e colaboradores (2004) sugerem que, durante o contato inicial com o patógeno, os macrófagos podem ser induzidos a expressar e suprimir genes em um padrão compatível com ativação tipo II.

Como observamos antes, há uma clara discrepância entre o percentual de células infectadas e o percentual de redução da adesão ao tecido conjuntivo (vide figura 1A do manuscrito apresentado). Este dado nos chamou a atenção para a possibilidade de que um fator solúvel agindo em células infectadas, e também em células vizinhas não infectadas, leve à redução da aderência dos fagócitos mononucleares observado neste estudo. Entretanto, em experimentos realizados com sobrenadantes de culturas infectadas, não conseguimos detectar qualquer efeito atribuível a um fator solúvel (MACEDO, 2004).

Estes experimentos, entretanto, não afastam a possibilidade de um fator extremamente lábil ou sensível ao congelamento (esses experimentos foram realizados com meios condicionados mantidos congelados antes do uso)(MACEDO, 2004). Para avaliar essas questões, estamos realizando experimentos com câmaras de co-cultura separadas por uma membrana semipermeável. Neste sistema, poderemos avaliar não só o papel de um fator solúvel, mas também a possível necessidade de contato intercelular para a expressão do fenômeno observado.

Formica e colaboradores (1994) demonstraram que a adesão de macrófagos a uma matriz conjuntiva, composta principalmente por fibronectina, aumentava sensivelmente a produção de substâncias microbicidas. Além disso, como apresentado na *Introdução*, LFA-1 é uma integrina intimamente ligada ao processo de apresentação antigênica a linfócitos T e a inibição de sua função pode levar a um estado de anergia a um antígeno co-administrado (DAVIGNON *et al.*, 1981).

Tomados estes aspectos em conjunto, a inibição da função de integrinas (especialmente VLA4 e talvez Mac-1 e LFA-1), demonstrada no manuscrito aqui apresentado, poderia tanto ser parte de um processo maior de reprogramação celular induzida pela *Leishmania* como um fenômeno isolado. Nesta última hipótese, consideramos ainda a possibilidade da inibição da função de integrinas ser precursora e potencialmente causadora de outros efeitos inibitórios observados nas células infectadas por este parasito. A perda de adesão e um possível aumento na capacidade migratória poderiam também ser parte do mecanismo de direcionamento da diferenciação de monócitos em macrófagos ou células dendríticas, um processo ainda pouco conhecido.

6 CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS

- I) **A inibição da adesão de fagócitos mononucleares depende da intensidade da infecção** *[em experimentos com diferentes taxas de parasito por célula (vide páginas 37 e 49), encontramos uma correlação inversa entre infecção e capacidade de adesão celular, como também foi observado por Almeida e colaboradores (2002)];*
- II) **A inibição da função de integrinas é mantida pela infecção, mas não pela fagocitose de parasitos mortos** *[em experimentos de incubação por 24 horas, apenas células infectadas com parasitos vivos apresentavam redução na capacidade adesiva (vide páginas 37 e 50)];*
- III) **A infecção com *Leishmania* modifica a função, mas não a expressão de integrinas na superfície dos fagócitos** *[a expressão de integrinas estava inalterada em células infectadas com *Leishmania* (vide páginas 38, 51 e 52), a redução de adesão foi revertida com a adição de Mn^{+2} e essa reversão foi bloqueada com anticorpos contra VLA4 (páginas 38, 39 e 52)];*
- a. **Isso pode decorrer de redução na sinalização via receptores de quimiocinas** *[em experimentos de RT-PCR em tempo real, mostramos redução na expressão de CCR4 e CCR5 após a infecção por *Leishmania* (vide páginas 39 e 53). Além disso, Steigerwald & Moll (2005) demonstraram que a infecção por *Leishmania* reduz a expressão de CCR2 e CCR5 em células dendríticas e diminui a migração in vitro dessas células na presença de CCL2 e CCL3];*
- b. **Ou pode ainda ser parte de uma inibição geral de funções celulares que é desencadeada pela infecção por *Leishmania* (BUATES & MATLASHEWSKI, 2001), contribuindo para a hipo-responsividade imunológica observada nos momentos iniciais das diversas formas de leishmaniose (ALEXANDER & RUSSELL, 1992).**

7 PERSPECTIVAS

- 1) Qual o fenótipo das células com potencial migratório induzido pela infecção por *Leishmania*?

Para investigar essa questão, estamos realizando experimentos preliminares utilizando células marcadas com corantes fluorescentes, citometria de fluxo e imunistoquímica. Esses dados serão cruciais para a construção de um modelo de disseminação parasitária na leishmaniose.

- 2) Quais as vias de sinalização intracelular que estão envolvidas na perda de adesão celular induzida pela infecção por *Leishmania*?

Para avaliar esta questão, realizaremos experimentos utilizando inibidores específicos de diversas vias de sinalização intracelulares e animais nocaute para CCR5. O entendimento dos mecanismos que regulam este fenômeno pode ser de importância na definição de alvos terapêuticos para formas onde há disseminação do parasito no hospedeiro ou mesmo em outras patologias associadas a endereçamento inadequado de células fagocíticas mononucleares, tais como a esclerose múltipla (HENDRIKS *et al.*, 2005) e a artrite reumatóide (PANAYI, 1993).

8 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J. e RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Adv Parasitol**, v.31, p.175-254, 1992.

ALLAN, R. S.; SMITH, C. M.; BELZ, G. T.; VAN LINT, A. L.; WAKIM, L. M.; HEATH, W. R. e CARBONE, F. R. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. **Science**, v.301, n.5641, p.1925-1928, 2003.

ALMEIDA, M. C. D. **Estudos de aspectos iniciais da infecção por *Leishmania* spp.** (PhD). 2002. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 93 f.

ANCUTA, P.; MOSES, A. e GABUZDA, D. Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. **Immunobiology**, v.209, n.1-2, p.11-20, 2004.

ANCUTA, P.; RAO, R.; MOSES, A.; MEHLE, A.; SHAW, S. K.; LUSCINSKAS, F. W. e GABUZDA, D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. **J Exp Med**, v.197, n.12, p.1701-1707, 2003.

ANJUERE, F.; MARTIN, P.; FERRERO, I.; FRAGA, M. L.; DEL HOYO, G. M.; WRIGHT, N. e ARDAVIN, C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. **Blood**, v.93, n.2, p.590-598, 1999.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v.392, n.6676, p.565-568, 1998.

BARBIER, D.; DEMENAI, F.; LEFAIT, J. F.; DAVID, B.; BLANC, M.; HORS, J. e FEINGOLD, N. Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. **Tissue Antigens**, v.30, n.2, p.63-67, 1987.

BARRAL-NETTO, M.; CARDOSO, S. A. e BARRAL, A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Acta Trop**, v.44, n.1, p.5-11, 1987a.

BARRAL-NETTO, M.; DE FREITAS, L. A. e ANDRADE, Z. A. Histopathologic changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishmaniasis of BALB/c mice. **Am J Pathol**, v.127, n.2, p.271-278, 1987b.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. e ET AL. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, v.44, n.5, p.536-546, 1991.

BARRATT-BOYES, S. M.; ZIMMER, M. I.; HARSHYNE, L. A.; MEYER, E. M.; WATKINS, S. C.; CAPUANO, S., 3RD; MURPHEY-CORB, M.; FALO, L. D., JR. e DONNENBERG, A. D. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. **J Immunol**, v.164, n.5, p.2487-2495, 2000.

BAUVOIS, B.; VAN WEYENBERGH, J.; ROUILLARD, D. e WIETZERBIN, J. TGF-beta 1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN-gamma: dependence on alpha 5 beta 1 and beta 2 integrins. **Exp Cell Res**, v.222, n.1, p.209-217, 1996.

BELLI, A.; GARCIA, D.; PALACIOS, X.; RODRIGUEZ, B.; VALLE, S.; VIDEA, E.; TINOCO, E.; MARIN, F. e HARRIS, E. Widespread atypical cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania* (L.) Chagasi in Nicaragua. **Am J Trop Med Hyg**, v.61, n.3, p.380-385, 1999.

BELLINGAN, G. J.; CALDWELL, H.; HOWIE, S. E.; DRANSFIELD, I. e HASLETT, C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. **J Immunol**, v.157, n.6, p.2577-2585, 1996.

BELLINGAN, G. J.; XU, P.; COOKSLEY, H.; CAULDWELL, H.; SHOCK, A.; BOTTOMS, S.; HASLETT, C.; MUTSAERS, S. E. e LAURENT, G. J. Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation. **J Exp Med**, v.196, n.11, p.1515-1521, 2002.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Curr Infect Dis Rep**, v.7, n.1, p.33-38, 2005.

BITTENCOURT, A. L. e BARRAL-NETTO, M. Leishmaniasis. In: DOERR, W. e SEIFERT, G. (Ed.). **Tropical Pathology**. 2 ed. Berlin: Springer, 1995. Vol. 8, Cap. 14, p.597-651.

BOS, J. L.; DE BRUYN, K.; ENSERINK, J.; KUIPERIJ, B.; RANGARAJAN, S.; REHMANN, H.; RIEDL, J.; DE ROOIJ, J.; VAN MANSFELD, F. e ZWARTKRUIS, F. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. **Biochem Soc Trans**, v.31, n.Pt 1, p.83-86, 2003.

BUATES, S. e MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **J Immunol**, v.166, n.5, p.3416-3422, 2001.

CABRERA, M.; SHAW, M. A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H.; CASTES, M.; CONVIT, J. e BLACKWELL, J. M. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v.182, n.5, p.1259-1264, 1995.

CAHILL, R. N.; POSKITT, D. C.; FROST, D. C. e TRNKA, Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. **J Exp Med**, v.145, n.2, p.420-428, 1977.

CAMPANERO, M. R.; SANCHEZ-MATEOS, P.; DEL POZO, M. A. e SANCHEZ-MADRID, F. ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. **J Cell Biol**, v.127, n.3, p.867-878, 1994.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E. e MAINGON, R. D. Leishmania chagasi/infantum: further investigations on Leishmania tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Exp Parasitol**, v.109, n.4, p.209-219, 2005.

CARLOS, T. M. e HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. **Blood**, v.84, n.7, p.2068-2101, 1994.

CARR, M. W.; ALON, R. e SPRINGER, T. A. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. **Immunity**, v.4, n.2, p.179-187, 1996.

CARVALHAL, D. G.; BARBOSA, A., JR.; D'EL-REI HERMIDA, M.; CLARENCIO, J.; PINHEIRO, N. F., JR.; VERAS, P. S. e DOS-SANTOS, W. L. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. **Exp Parasitol**, v.107, n.3-4, p.189-199, 2004.

CARVALHO, E. M.; BADARO, R.; REED, S. G.; JONES, T. C. e JOHNSON, W. D., JR. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. **J Clin Invest**, v.76, n.6, p.2066-2069, 1985a.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L.; REED, S. e ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, v.135, n.6, p.4144-4148, 1985b.

CASTES, M.; AGNELLI, A.; VERDE, O. e RONDON, A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immunol Immunopathol**, v.27, n.2, p.176-186, 1983.

CAVANAGH, L. L. e VON ANDRIAN, U. H. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. **Immunol Cell Biol**, v.80, n.5, p.448-462, 2002.

CERF, B. J.; JONES, T. C.; BADARO, R.; SAMPAIO, D.; TEIXEIRA, R. e JOHNSON, W. D., JR. Malnutrition as a risk factor for severe visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v.156, n.6, p.1030-1033, 1987.

- CHAN, B. M.; WONG, J. G.; RAO, A. e HEMLER, M. E. T cell receptor-dependent, antigen-specific stimulation of a murine T cell clone induces a transient, VLA protein-mediated binding to extracellular matrix. **J Immunol**, v.147, n.2, p.398-404, 1991.
- COLMENARES, M.; KAR, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K. e MCMAHON-PRATT, D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.96 Suppl 1, p.S3-7, 2002.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. e ROBBINS, S. L. Robbins pathologic basis of disease. In: (Ed.). 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. Vol. p.644-696.
- D'AMICO, G.; BIANCHI, G.; BERNASCONI, S.; BERSANI, L.; PIEMONTI, L.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. e ALLAVENA, P. Adhesion, transendothelial migration, and reverse transmigration of in vitro cultured dendritic cells. **Blood**, v.92, n.1, p.207-214, 1998.
- DANDONA, P. e ALJADA, A. A rational approach to pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. **Am J Cardiol**, v.90, n.5A, p.27G-33G, 2002.
- DAVIGNON, D.; MARTZ, E.; REYNOLDS, T.; KURZINGER, K. e SPRINGER, T. A. Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. **J Immunol**, v.127, n.2, p.590-595, 1981.
- DE ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A. e BARRAL-NETTO, M. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **Int J Parasitol**, v.33, n.2, p.153-162, 2003a.
- DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A. e BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.861-870, 2003b.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v.27, n.5, p.305-318, 2004.
- DRANSFIELD, I. e HOGG, N. Regulated expression of Mg²⁺ binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits. **Embo J**, v.8, n.12, p.3759-3765, 1989.
- FORMICA, S.; ROACH, T. I. e BLACKWELL, J. M. Interaction with extracellular matrix proteins influences *Lsh/Ity/Bcg* (candidate *Nramp*) gene regulation of macrophage priming/activation for tumour necrosis factor- α and nitrite release. **Immunology**, v.82, n.1, p.42-50, 1994.

- FUKAO, T.; TANABE, M.; TERAUCHI, Y.; OTA, T.; MATSUDA, S.; ASANO, T.; KADOWAKI, T.; TAKEUCHI, T. e KOYASU, S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. **Nat Immunol**, v.3, n.9, p.875-881, 2002.
- GALVAO, C. E.; SILVA, A. C.; SALDANHA, A. C.; SILVA, C. M.; COSTA MDO, R. e COSTA, J. M. [Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia braziliensis* in the state of Maranhao, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.26, n.2, p.121-123, 1993.
- GERSZTEN, R. E.; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; LIM, Y. C.; YOSHIDA, M.; DING, H. A.; GIMBRONE, M. A., JR.; LUSTER, A. D.; LUSCINSKAS, F. W. e ROSENZWEIG, A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. **Nature**, v.398, n.6729, p.718-723, 1999.
- GIAGULLI, C.; SCARPINI, E.; OTTOBONI, L.; NARUMIYA, S.; BUTCHER, E. C.; CONSTANTIN, G. e LAUDANNA, C. RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. **Immunity**, v.20, n.1, p.25-35, 2004.
- GRADONI, L. e GRAMICCIA, M. *Leishmania infantum* Tropism: Strain genotype or host immune status? **Parasitol Today**, v.10, n.7, p.264-267, 1994.
- GRAKOU, A.; BROMLEY, S. K.; SUMEN, C.; DAVIS, M. M.; SHAW, A. S.; ALLEN, P. M. e DUSTIN, M. L. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science**, v.285, n.5425, p.221-227, 1999.
- GRIMALDI, G., JR.; TESH, R. B. e MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **Am J Trop Med Hyg**, v.41, n.6, p.687-725, 1989.
- GROGL, M.; THOMASON, T. N. e FRANKE, E. D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **Am J Trop Med Hyg**, v.47, n.1, p.117-126, 1992.
- HARMSSEN, A. G.; MUGGENBURG, B. A.; SNIPES, M. B. e BICE, D. E. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. **Science**, v.230, n.4731, p.1277-1280, 1985.
- HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L. e LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J Exp Med**, v.169, n.1, p.59-72, 1989.

- HENDRIKS, J. J.; TEUNISSEN, C. E.; DE VRIES, H. E. e DIJKSTRA, C. D. Macrophages and neurodegeneration. **Brain Res Brain Res Rev**, v.48, n.2, p.185-195, 2005.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v.354, n.9185, p.1191-1199, 1999.
- HOGG, N.; HENDERSON, R.; LEITINGER, B.; MCDOWALL, A.; PORTER, J. e STANLEY, P. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. **Immunol Rev**, v.186, p.164-171, 2002.
- HOGG, N.; LASCHINGER, M.; GILES, K. e MCDOWALL, A. T-cell integrins: more than just sticking points. **J Cell Sci**, v.116, n.Pt 23, p.4695-4705, 2003.
- IMHOF, B. A. e AURRAND-LIONS, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. **Nat Rev Immunol**, v.4, n.6, p.432-444, 2004.
- INABA, K.; STEINMAN, R. M.; PACK, M. W.; AYA, H.; INABA, M.; SUDO, T.; WOLPE, S. e SCHULER, G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. **J Exp Med**, v.175, n.5, p.1157-1167, 1992.
- JACKSON, J. E.; TALLY, J. D.; ELLIS, W. Y.; MEBRAHTU, Y. B.; LAWYER, P. G.; WERE, J. B.; REED, S. G.; PANISKO, D. M. e LIMMER, B. L. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. **Am J Trop Med Hyg**, v.43, n.5, p.464-480, 1990.
- JUNG, T. M.; GALLATIN, W. M.; WEISSMAN, I. L. e DAILEY, M. O. Down-regulation of homing receptors after T cell activation. **J Immunol**, v.141, n.12, p.4110-4117, 1988.
- KAKAZU, T.; CHIHARA, J.; SAITO, A. e NAKAJIMA, S. Effect of RANTES on eosinophil adhesion to plates coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1 and expression of beta 2-integrin adhesion molecules on eosinophils. **Int Arch Allergy Immunol**, v.108 Suppl 1, p.9-11, 1995.
- KATAGIRI, K.; HATTORI, M.; MINATO, N.; IRIE, S.; TAKATSU, K. e KINASHI, T. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. **Mol Cell Biol**, v.20, n.6, p.1956-1969, 2000.
- KATAGIRI, K.; HATTORI, M.; MINATO, N. e KINASHI, T. Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. **Mol Cell Biol**, v.22, n.4, p.1001-1015, 2002.
- KATAGIRI, K.; MAEDA, A.; SHIMONAKA, M. e KINASHI, T. RAP1, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. **Nat Immunol**, v.4, n.8, p.741-748, 2003.

- KATAGIRI, K.; SHIMONAKA, M. e KINASHI, T. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. **J Biol Chem**, v.279, n.12, p.11875-11881, 2004.
- KAYE, P. M.; ROGERS, N. J.; CURRY, A. J. e SCOTT, J. C. Deficient expression of co-stimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages. **Eur J Immunol**, v.24, n.11, p.2850-2854, 1994.
- KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.7, p.546-559, 2005.
- KOYA, R. C.; KASAHARA, N.; FAVARO, P. M.; LAU, R.; TA, H. Q.; WEBER, J. S. e STRIPECKE, R. Potent maturation of monocyte-derived dendritic cells after CD40L lentiviral gene delivery. **J Immunother**, v.26, n.5, p.451-460, 2003.
- LAUDANNA, C.; KIM, J. Y.; CONSTANTIN, G. e BUTCHER, E. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. **Immunol Rev**, v.186, p.37-46, 2002.
- LEMOS DE SOUZA, V.; ASCENCAO SOUZA, J.; CORREIA SILVA, T. M.; SAMPAIO TAVARES VERAS, P. e RODRIGUES DE-FREITAS, L. A. Different Leishmania species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes Infect**, v.2, n.15, p.1807-1815, 2000.
- LEMOS, M. P.; ESQUIVEL, F.; SCOTT, P. e LAUFER, T. M. MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of Leishmania major. **J Exp Med**, v.199, n.5, p.725-730, 2004.
- LEON, B.; MARTINEZ DEL HOYO, G.; PARRILLAS, V.; VARGAS, H. H.; SANCHEZ-MATEOS, P.; LONGO, N.; LOPEZ-BRAVO, M. e ARDAVIN, C. Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. **Blood**, v.103, n.7, p.2668-2676, 2004.
- LLOYD, A. R.; OPPENHEIM, J. J.; KELVIN, D. J. e TAUB, D. D. Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. **J Immunol**, v.156, n.3, p.932-938, 1996.
- MA, J.; CHEN, T.; MANDELIN, J.; CEPONIS, A.; MILLER, N. E.; HUKKANEN, M.; MA, G. F. e KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.11, p.2334-2346, 2003.
- MACATONIA, S. E.; KNIGHT, S. C.; EDWARDS, A. J.; GRIFFITHS, S. e FRYER, P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after

exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. **J Exp Med**, v.166, n.6, p.1654-1667, 1987.

MACEDO, M. P. D. **Interações entre fagócitos mononucleares e o tecido conjuntivo na leishmaniose: Papel de fatores solúveis na modulação da adesão celular.** (Monografia). 2004. Medicina, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador. 33 f.

MAKALA, L. H.; NISHIKAWA, Y.; KAMADA, T.; SUZUKI, H.; XUAN, X.; IGARASHI, I. e NAGASAWA, H. Comparison of the accessory activity of murine peritoneal cavity macrophage derived dendritic cells and peritoneal cavity macrophages in a mixed lymphocyte reaction. **J Vet Med Sci**, v.63, n.12, p.1271-1277, 2001a.

MAKALA, L. H.; NISHIKAWA, Y.; KAMADA, T.; XUAN, X. e NAGASAWA, H. Antigen presentation by murine peritoneal cavity macrophage-derived dendritic cells. **Pathobiology**, v.69, n.2, p.104-112, 2001b.

MAKALA, L. H.; NISHIKAWA, Y.; MISHIMA, M.; INOUE, N.; XUAN, X.; SUZUKI, H.; FUJISAKI, K.; MIKAMI, T. e NAGASAWA, H. Phenotype and function of murine peritoneal cavity macrophage derived-dendritic cells. **J Vet Med Sci**, v.64, n.9, p.813-820, 2002.

MALDONADO-LOPEZ, R. e MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Semin Immunol**, v.13, n.5, p.275-282, 2001.

MAY, A. E.; NEUMANN, F. J.; SCHOMIG, A. e PREISSNER, K. T. VLA-4 (alpha(4)beta(1)) engagement defines a novel activation pathway for beta(2) integrin-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor. **Blood**, v.96, n.2, p.506-513, 2000.

MISSLITZ, A. C.; BONHAGEN, K.; HARBECKE, D.; LIPPUNER, C.; KAMRADT, T. e AEBISCHER, T. Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. **Eur J Immunol**, v.34, n.3, p.715-725, 2004.

MOLL, H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. **Adv Exp Med Biol**, v.479, p.163-173, 2000.

_____. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cell Microbiol**, v.5, n.8, p.493-500, 2003.

MOLL, H.; FLOHE, S. e ROLLINGHOFF, M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. **Eur J Immunol**, v.25, n.3, p.693-699, 1995.

- MOLL, H.; FUCHS, H.; BLANK, C. e ROLLINGHOFF, M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. **Eur J Immunol**, v.23, n.7, p.1595-1601, 1993.
- MONKS, C. R.; FREIBERG, B. A.; KUPFER, H.; SCIAKY, N. e KUPFER, A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. **Nature**, v.395, n.6697, p.82-86, 1998.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A. e COFFMAN, R. L. 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.2348-2357, 1986.
- MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**, v.73, n.2, p.209-212, 2003.
- MULLER, I.; GARCIA-SANZ, J. A.; TITUS, R.; BEHIN, R. e LOUIS, J. Analysis of the cellular parameters of the immune responses contributing to resistance and susceptibility of mice to infection with the intracellular parasite, *Leishmania major*. **Immunol Rev**, v.112, p.95-113, 1989.
- MULLER, W. A. e RANDOLPH, G. J. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. **J Leukoc Biol**, v.66, n.5, p.698-704, 1999.
- MURAILLE, E.; DE TREZ, C.; PAJAK, B.; TORRENTERA, F. A.; DE BAETSELIER, P.; LEO, O. e CARLIER, Y. Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. **Infect Immun**, v.71, n.5, p.2704-2715, 2003.
- NANDAN, D. e REINER, N. E. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. **Infect Immun**, v.63, n.11, p.4495-4500, 1995.
- NOYES, H.; CHANCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E. e MAINGON, R. *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. **Exp Parasitol**, v.85, n.3, p.264-273, 1997.
- OLIVIER, M.; BAIMBRIDGE, K. G. e REINER, N. E. Stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*. Attenuation of calcium transients is related to defective agonist-induced accumulation of inositol phosphates. **J Immunol**, v.148, n.4, p.1188-1196, 1992a.
- OLIVIER, M.; BROWNSEY, R. W. e REINER, N. E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani*

is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.16, p.7481-7485, 1992b.

PAILLOT, R.; LAVAL, F.; AUDONNET, J. C.; ANDREONI, C. e JUILLARD, V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. **Immunology**, v.102, n.4, p.396-404, 2001.

PANAYI, G. S. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: from molecules to the whole patient. **Br J Rheumatol**, v.32, n.7, p.533-536, 1993.

PAUL, W. **Fundamental Immunology**. New York. 1999. 1589 p.

PONTE-SUCRE, A.; HEISE, D. e MOLL, H. Leishmania major lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. **Immunology**, v.104, n.4, p.462-467, 2001.

PRICE, A. A.; CUMBERBATCH, M.; KIMBER, I. e AGER, A. Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. **J Exp Med**, v.186, n.10, p.1725-1735, 1997.

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N. e ANTOINE, J. C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **J Cell Sci**, v.117, n.Pt 2, p.315-325, 2004.

QU, C.; EDWARDS, E. W.; TACKE, F.; ANGELI, V.; LLODRA, J.; SANCHEZ-SCHMITZ, G.; GARIN, A.; HAQUE, N. S.; PETERS, W.; VAN ROOIJEN, N.; SANCHEZ-TORRES, C.; BROMBERG, J.; CHARO, I. F.; JUNG, S.; LIRA, S. A. e RANDOLPH, G. J. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. **J Exp Med**, v.200, n.10, p.1231-1241, 2004.

RANDOLPH, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. **Semin Immunol**, v.13, n.5, p.267-274, 2001.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V. e SWARTZ, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nat Rev Immunol**, v.5, n.8, p.617-628, 2005.

RANDOLPH, G. J.; BEAULIEU, S.; LEBECQUE, S.; STEINMAN, R. M. e MULLER, W. A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. **Science**, v.282, n.5388, p.480-483, 1998a.

RANDOLPH, G. J.; BEAULIEU, S.; POPE, M.; SUGAWARA, I.; HOFFMAN, L.; STEINMAN, R. M. e MULLER, W. A. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent

lymphatic vessels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95, n.12, p.6924-6929, 1998b.

RANDOLPH, G. J. e FURIE, M. B. Mononuclear phagocytes egress from an in vitro model of the vascular wall by migrating across endothelium in the basal to apical direction: role of intercellular adhesion molecule 1 and the CD11/CD18 integrins. **J Exp Med**, v.183, n.2, p.451-462, 1996.

RANDOLPH, G. J.; INABA, K.; ROBBIANI, D. F.; STEINMAN, R. M. e MULLER, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. **Immunity**, v.11, n.6, p.753-761, 1999.

RANDOLPH, G. J.; LUTHER, T.; ALBRECHT, S.; MAGDOLEN, V. e MULLER, W. A. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. **Blood**, v.92, n.11, p.4167-4177, 1998c.

RANDOLPH, G. J.; SANCHEZ-SCHMITZ, G.; LIEBMAN, R. M. e SCHAKEL, K. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. **J Exp Med**, v.196, n.4, p.517-527, 2002.

REED, S. G.; BADARO, R.; MASUR, H.; CARVALHO, E. M.; LORENCO, R.; LISBOA, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D., JR. e JONES, T. C. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.35, n.1, p.79-85, 1986.

REINER, N. E. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. **Immunol Today**, v.15, n.8, p.374-381, 1994.

RENIER, G.; MAMPUTU, J. C. e SERRI, O. Benefits of gliclazide in the atherosclerotic process: decrease in monocyte adhesion to endothelial cells. **Metabolism**, v.52, n.8 Suppl 1, p.13-18, 2003.

RITTER, U.; MEISSNER, A.; SCHEIDIG, C. e KORNER, H. CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.34, n.6, p.1542-1550, 2004.

ROSEN, H. e GORDON, S. Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. **Eur J Immunol**, v.20, n.6, p.1251-1258, 1990.

ROTTA, G.; EDWARDS, E. W.; SANGALETTI, S.; BENNETT, C.; RONZONI, S.; COLOMBO, M. P.; STEINMAN, R. M.; RANDOLPH, G. J. e RESCIGNO, M. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory

monocytes into dendritic cells in vivo. **J Exp Med**, v.198, n.8, p.1253-1263, 2003.

SADICK, M. D.; LOCKSLEY, R. M.; TUBBS, C. e RAFF, H. V. Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to Leishmania antigens in vitro. **J Immunol**, v.136, n.2, p.655-661, 1986.

SAEKI, H.; MOORE, A. M.; BROWN, M. J. e HWANG, S. T. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J Immunol**, v.162, n.5, p.2472-2475, 1999.

SAHA, B.; DAS, G.; VOHRA, H.; GANGULY, N. K. e MISHRA, G. C. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. **Eur J Immunol**, v.25, n.9, p.2492-2498, 1995.

SALLUSTO, F. e LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunol Rev**, v.177, p.134-140, 2000.

SANCHEZ-MARTIN, L.; SANCHEZ-SANCHEZ, N.; GUTIERREZ-LOPEZ, M. D.; ROJO, A. I.; VICENTE-MANZANARES, M.; PEREZ-ALVAREZ, M. J.; SANCHEZ-MATEOS, P.; BUSTELO, X. R.; CUADRADO, A.; SANCHEZ-MADRID, F.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L. e CABANAS, C. Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. **J Biol Chem**, v.279, n.16, p.16194-16205, 2004.

SCHRANER, C.; HASSE, B.; HASSE, U.; BAUMANN, D.; FAEH, A.; BURG, G.; GRIMM, F.; MATHIS, A.; WEBER, R. e GUNTARD, H. F. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. **Clin Infect Dis**, v.40, n.12, p.e120-124, 2005.

SHANKAR, A. H. e TITUS, R. G. The influence of antigen-presenting cell type and interferon-gamma on priming and cytokine secretion of Leishmania major-specific T cells. **J Infect Dis**, v.175, n.1, p.151-157, 1997.

SHIMIZU, Y.; VAN SEVENTER, G. A.; ENNIS, E.; NEWMAN, W.; HORGAN, K. J. e SHAW, S. Crosslinking of the T cell-specific accessory molecules CD7 and CD28 modulates T cell adhesion. **J Exp Med**, v.175, n.2, p.577-582, 1992.

SHIMONAKA, M.; KATAGIRI, K.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, N.; TSURUO, T.; YOSHIE, O. e KINASHI, T. Rap1 translates chemokine signals to integrin

activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. **J Cell Biol**, v.161, n.2, p.417-427, 2003.

SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; D'AMICO, G.; LUINI, W.; BIANCHI, G.; KATAURA, M.; IMAI, T.; YOSHIE, O.; BONECCHI, R. e MANTOVANI, A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. **J Immunol**, v.161, n.3, p.1083-1086, 1998.

STEIGERWALD, M. e MOLL, H. Leishmania major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. **Infect Immun**, v.73, n.4, p.2564-2567, 2005.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A. e BERMAN, J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v.347, n.22, p.1739-1746, 2002.

SUNDERKOTTER, C.; NIKOLIC, T.; DILLON, M. J.; VAN ROOIJEN, N.; STEHLING, M.; DREVETS, D. A. e LEENEN, P. J. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J Immunol**, v.172, n.7, p.4410-4417, 2004.

TAKAGI, J. e SPRINGER, T. A. Integrin activation and structural rearrangement. **Immunol Rev**, v.186, p.141-163, 2002.

TANAKA, Y.; ADAMS, D. H.; HUBSCHER, S.; HIRANO, H.; SIEBENLIST, U. e SHAW, S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. **Nature**, v.361, n.6407, p.79-82, 1993.

TAPIA, F. J.; CACERES-DITTMAR, G.; SANCHEZ, M. A.; FERNANDEZ, C. T.; RONDON, A. J. e CONVIT, J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. **Exp Dermatol**, v.3, n.1, p.17-22, 1994.

TRAVER, D.; AKASHI, K.; MANZ, M.; MERAD, M.; MIYAMOTO, T.; ENGLEMAN, E. G. e WEISSMAN, I. L. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. **Science**, v.290, n.5499, p.2152-2154, 2000.

VERESS, B. e EL HASSAN, A. M. Vascular changes in human leishmaniasis: a light microscope and immunohistological study. **Ann Trop Med Parasitol**, v.80, n.2, p.183-188, 1986.

VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; NGUYEN, B. V.; CUSHING, M.; SACKS, D. L. e UDEY, M. C. Leishmania major-infected murine langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. **Eur J Immunol**, v.30, n.12, p.3498-3506, 2000.

WEBER, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **J Mol Med**, v.81, n.1, p.4-19, 2003.

WEBER, C.; ALON, R.; MOSER, B. e SPRINGER, T. A. Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis. **J Cell Biol**, v.134, n.4, p.1063-1073, 1996a.

WEBER, C.; BELGE, K. U.; VON HUNDELSHAUSEN, P.; DRAUDE, G.; STEPPICH, B.; MACK, M.; FRANKENBERGER, M.; WEBER, K. S. e ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. **J Leukoc Biol**, v.67, n.5, p.699-704, 2000.

WEBER, C.; KITAYAMA, J. e SPRINGER, T. A. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.20, p.10939-10944, 1996b.

WHO. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. **Weekly Epidemiological Record**, v.44, n.77, p.365-372, 2002.

YOON, J. W.; JUN, H. S. e SANTAMARIA, P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. **Autoimmunity**, v.27, n.2, p.109-122, 1998.

ZHAO, X.; DEAK, E.; SODERBERG, K.; LINEHAN, M.; SPEZZANO, D.; ZHU, J.; KNIPE, D. M. e IWASAKI, A. Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2. **J Exp Med**, v.197, n.2, p.153-162, 2003.