



FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Faculdade de Medicina

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Instituto Gonçalo Moniz



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* MODULA A ATIVAÇÃO DE
BETA-1 INTEGRINAS E ALTERA A CINÉTICA DO
ESPALHAMENTO CELULAR DE MONÓCITOS SOBRE
FIBRONECTINA**

DJALMA GOMES FERRÃO CARVALHAL

**Salvador – Bahia – Brasil
2016**



FIOCRUZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Faculdade de Medicina

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Instituto Gonçalo Moniz



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* MODULA A ATIVAÇÃO DE
BETA-1 INTEGRINAS E ALTERA A CINÉTICA DO
ESPALHAMENTO CELULAR DE MONÓCITOS SOBRE
FIBRONECTINA**

DJALMA GOMES FERRÃO CARVALHAL

Orientador: Prof. Dr. Washington Luís Conrado dos Santos

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Patologia Experimental.

**Salvador – Bahia – Brasil
2016**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Carvalho, Djalma Gomes Ferrão.

C331i Infecção por *Leishmania* modula a ativação de Beta-1 integrinas e altera a cinética do espalhamento celular de monócitos sobre fibronectina / Djalma Gomes Ferrão Carvalho. - 2016.

95 f.; 30 cm

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

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016

1. Leishmania. 2. Monócitos. 2. Receptores de Antígeno muito Tardio. 3. Integrinas. 4. Adesão Celular. I. Título.

CDU 576:616.993

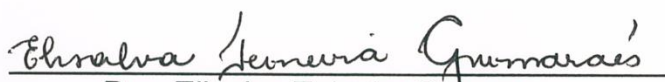
Título da Tese: "INFECÇÃO POR LEISHMANIA MODULA A ATIVAÇÃO DE BETA-1 INTEGRINAS E ALTERA A CINÉTICA DO ESPALHAMENTO CELULAR DE MONÓCITOS SOBRE FIBRONECTINA"

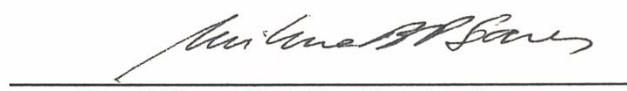
DJALMA GOMES FERRÃO CARVALHAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 24 de outubro de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. Elisalva Teixeira Guimaraes
Professora
UNEB


Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora Titular
IGM/ Fiocruz


Dr. Sérgio Marcos Arruda
Pesquisador Titular
IGM/Fiocruz


Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
IGM/Fiocruz


Dr. Washington Luis Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
IGM/Fiocruz

Fontes de Financiamento:

**IGM/FIOCRUZ
CAPES/COFECUB
UNEB**

A minha família, Grace Favila Figueiredo Carvalhal, Laís Favila Carvalhal e Maria de Lourdes Leite da Silva (*in memoriam*), por todo apoio constante, incentivo e encorajamento. Aos amigos de laboratório, em especial ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Washington Luís Conrado dos Santos por ser uma agente motivacional constante, por sua inestimável amizade, pela sua argumentação simples, lógica e direta, pelo exemplo a ser seguido e pela competente e paciente orientação para realização deste trabalho.

À Dra. Patrícia S. Tavares Veras pelo apoio como coordenadora do convênio Capes Cofecub para realização do estágio sanduiche na França.

Ao Dr. Pierre Bongrand por todo apoio no Laboratoire Adhésion Cellulaire et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

Ao Dr. Philippe Robert pelos ensinamentos nos ensaios com câmara de fluxo laminar realizados em Marseille.

Aos Dr. Eric Ghigo e Prof. Jean Louis Mège, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Transmissibles et Emergentes, CNRS UMR 6236, Institut Fédératif de Recherche 48, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Marseille, France, por todo o suporte para a realização da infecção dos monócitos com *Leishmania* durante a estadia em Marseille.

Aos amigos Pablo Silveira Oliveira e José Geraldo Bonfim Lima pelo apoio e amizade que foram cruciais durante o estágio sanduiche em Marseille.

Aos amigos Claudio Pereira Figueira, Rafaela Andrade Almeida, Micely d'Rei Hermida que participaram de forma inestimável na realização do presente trabalho.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa WLCS do Laboratório de Patologia e Biotecnologia: **Joselli, Valter, Carol, Maria, Jeanne e Carol** pelo companheirismo durante todo o período em que estive no laboratório.

Aos amigos de todo o LPBI pela amizade, críticas e apoio durante todo o doutorado.

Ao Instituto Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz pela disponibilidade de espaço físico, pessoal e equipamentos.

A CAPES/COFECUB pela bolsa e suporte financeiro para a realização do estágio doutoral em Marseille.

A Universidade do Estado da Bahia por todo suporte para o afastamento do País e em especial a Pró-Reitoria de pesquisa pela bolsa PAC.

Às pessoas que, apesar de não citadas nominalmente, contribuíram para o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTAS DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Leishmaniose	20
2.2 Panorama da disseminação do parasito.....	22
2.3 O processo de transmigração celular através dos vasos sanguíneos	27
2.4 Famílias importantes de moléculas envolvidas nas fases de adesão ao leito vascular e a componentes da matriz extracelular.....	29
2.4.1 Selectinas	29
2.4.2 Integrinas.....	31
2.4.3 Moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas	35
2.4.4 Quimiocinas	36
2.5. Procedimentos para avaliação da migração e adesão celular.....	38
3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo geral:	41
4.2 Objetivos específicos	41
5 MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 Declaração de ética	42
5.2 Monócitos humanos	42
5.3 Parasitos e infecções de fagócitos.....	42
5.4 Preparação do substrato de adesão.....	43
5.5 Avaliação da adesão de monócitos em câmara de fluxo laminar	43
5.6 Reação de imunofluorescência para a detecção de células infectadas.....	49
5.7 Ensaios de adesão e experimentos de bloqueio de VLA-4	50
5.8 Microscopia eletrônica de varredura.....	52

5.9 Microscopia de reflexão e interferência (IRM)	52
5.10 Avaliação do efeito de fatores solúveis liberados por <i>L. amazonensis</i>	52
5.11 Citometria de fluxo	53
5.12 Análises estatísticas	53
6 RESULTADOS	54
6.1 Avaliação do rolamento de monócitos não infectados ou infectados com <i>L. amazonensis</i> sobre componentes da matriz extracelular	54
6.2 Análise do espalhamento citoplasmático de monócitos humanos não infectados ou infectados sobre fibronectina	55
6.3 Estudo dos fatores solúveis liberados pelo parasito e por células infectadas na diminuição da adesão a componentes da matriz extracelular	61
6.4 Determinação da cinética de contato dos monócitos infectados com <i>L. amazonensis</i> sobre superfície sensibilizada com fibronectina	61
6.5 Estudo do estado de ativação das integrinas em monócitos humanos infectados por <i>L. amazonensis</i>	62
7 DISCUSSÃO	66
8 CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	70
9 PERSPECTIVAS.....	71
10. REFERÊNCIAS.....	72
11. ANEXO.....	84

CARVALHAL, Djalma Gomes Ferrão. Infecção por *Leishmania* modula a ativação de Beta-1 integrinas e altera a cinética do espalhamento celular de monócitos sobre fibronectina. 95 p. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

A leishmaniose é considerada como um grupo de doenças, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. O gênero inclui mais de 20 espécies de parasitos que são transmitidas ao homem pela picada da fêmea, infectada, dos insetos da família dos flebotomíneos e as diferentes espécies estão associadas a diferentes manifestações clínicas da doença. Uma característica marcante na infecção é a presença de macrófagos infectados no sítio de inoculação do parasito e em órgãos internos do hospedeiro. Estudos prévios, demonstraram que a infecção de fagócitos mononucleares com *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* ou *L. braziliensis* promove uma diminuição na adesão celular ao tecido conjuntivo inflamado da pele. Esta diminuição da adesão é decorrente, principalmente, de mecanismos envolvidos na regulação da molécula VLA-4, uma integrina da família beta 1 que se liga à VCAM-1, trombospondina e à molécula fibronectina presente na matriz extracelular. Neste trabalho, estudamos os estágios iniciais e tardios da formação da ligação entre a molécula VLA-4 e fibronectina em ensaios de adesão celular com monócitos humanos infectados por *L. amazonensis*. O estágio inicial do processo de adesão celular (rolamento) foi avaliado através de ensaios com câmaras de fluxo laminar. Os resultados demonstraram que a função da integrina VLA-4 está preservada nos monócitos infectados quando comparado ao grupo de células não infectadas. A fase tardia do processo de adesão celular foi avaliada mensurando a área de espalhamento citoplasmático, por microscopia eletrônica de varredura, e avaliando a cinética de espalhamento citoplasmático por microscopia de interferência e reflexão (IRM). Nos ensaios avaliados por microscopia de varredura, os monócitos infectados apresentaram uma diminuição da área de espalhamento citoplasmático sobre fibronectina com uma área mediana de 41 (34-51) μm^2 em comparação com grupo de células não infectadas, que apresentaram área mediana de 72 (55-89) μm^2 . O espalhamento citoplasmático foi inibido usando um anticorpo anti-VLA4 para bloquear a ligação desta molécula com o substrato. Nos ensaios de IRM, após o contato inicial com a superfície revestida de fibronectina, os monócitos não infectados espalharam o citoplasma rapidamente na proporção de 15 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$, enquanto os monócitos infectados com *L. amazonensis* mantiveram pequenos contatos na proporção de 5,5 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. Após a avaliação das fases iniciais e tardias do processo de adesão, foi realizada, através de citometria de fluxo, a análise da expressão do epítipo de alta afinidade da molécula VLA-4 de monócitos não infectados e infectados com *L. amazonensis*. As células infectadas tiveram uma diminuição da expressão de VLA-4 de $39 \pm 21\%$ para $14 \pm 3\%$; e LFA1 de $37 \pm 32\%$ para $18 \pm 16\%$. Os nossos dados demonstram que a infecção por *L. amazonensis* não altera as fases iniciais, fase de rolamento, do processo de adesão, mas afeta as fases tardias, adesão firme, uma vez que mantém as moléculas de integrinas em estados de baixa afinidade e impede o espalhamento citoplasmático dos monócitos infectados. Desta forma, os efeitos observados na função das integrinas pode ter um papel relevante na retenção ou migração de leucócitos do sítio de infecção para o linfonodo drenante bem como nas sinapses imunológicas durante a apresentação de antígenos. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar estas hipóteses.

Palavras chave: Leishmania, Monócitos, Receptores de Antígeno muito Tardio, Integrinas Adesão Celular

CARVALHAL, Djalma Gomes Ferrão. *Leishmania* infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. 95 p. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a group of diseases, caused by parasites of the genus *Leishmania*. The genus includes more than 20 species of parasites that are transmitted to humans by the bite of vector female insect, of the phlebotomine family, and the different species are associated with different clinical manifestations of the disease. A striking feature of infection is the presence of infected macrophages at the site of inoculation of the parasite and internal organs of the host. Previous studies have demonstrated that infection of mononuclear phagocytes with *Leishmania amazonensis*, *L. infantum* or *L. braziliensis* promotes a decrease in cellular adhesion to the inflamed connective tissue of the skin. This decrease in adhesion results mainly from mechanisms involved in the regulation of the VLA-4 molecule, a beta 1 integrin that binds to VCAM-1, thrombospondin and the fibronectin molecule present in the extracellular matrix. In this work, we study the early and late stages of the binding formation between VLA-4 and fibronectin molecule in cell adhesion assays with human monocytes infected by *L. amazonensis*. The initial stage of the cell adhesion (rolling) process was evaluated through laminar flow chamber assays, the results demonstrated that VLA-4 integrin function is preserved in infected monocytes when compared to the uninfected cell group. The late phase of the cell adhesion process was evaluated by measuring the cytoplasmic spreading area by scanning electron microscopy and evaluating the kinetics of cytoplasmic spreading by interference and reflection microscopy (IRM). In the assays evaluated by scanning microscopy, infected monocytes showed a decrease in cytoplasmic spread over fibronectin with a median area of 41 (34-51) μm^2 compared to a group of uninfected cells that had a median area of 72 (55- 89) μm^2 . Cytoplasmic spreading was inhibited using an anti-VLA-4 antibody capable of blocking the binding of this molecule to the substrate. In the IRM assays, after initial contact with the fibronectin-coated surface, uninfected monocytes spread the cytoplasm rapidly at the rate of 15 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$, whereas monocytes infected with *L. amazonensis* maintained small contacts in the ratio of 5.5 $\mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. After evaluation of the initial and late stages of the adhesion process, the analysis of the expression of the high affinity epitope of the VLA-4 molecule from uninfected and infected monocytes was performed by flow cytometry. Infected cells suffered a decrease in VLA-4 expression from 39 \pm 21% to 14 \pm 3%; and LFA-1 from 37 \pm 32% to 18 \pm 16%. Our data demonstrate that *L. amazonensis* infection does not alter the initial phases (rolling phase) of the adhesion process, but it affects the late phases (firm adhesion) since it maintains the integrin molecules in states of low affinity and prevents the cytoplasmic spread of infected monocytes. Thus, the observed effects on the function of integrins may play a relevant role in the retention or migration of leukocytes from the site of infection to the draining lymph node as well as in the immune synapses during the presentation of antigens. However, more studies are needed to prove these hypotheses.

Keywords: *Leishmania*, Monocytes, Receptors, Very Late Antigen, Integrins, Cell Adhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> e formas clínicas.	21
Figura 2	Etapas do processo de adesão e migração celular: captura, rolamento, rolamento lento, adesão firme, fortalecimento da adesão e rastejamento intraluminal precede a migração transendotelial de monócitos.	28
Figura 3	Representação dos 24 heterodímeros das famílias de integrinas.	32
Figura 4	Estados conformacionais da molécula VLA-4.	34
Figura 5	Formas de reorganização das integrinas na superfície celular associada com valência e modificações do citoesqueleto e forma celulares durante a adesão.	36
Figura 6	Representação esquemática da câmara de fluxo laminar	44
Figura 7	Sistema de câmara de fluxo laminar.	46
Figura 8	Tela de capturada de um filme obtido do ensaio com câmara de fluxo laminar de monócitos humanos se deslocando da direita para esquerda sobre superfície sensibilizada com fibronectina.	47
Figura 9	Histograma de velocidade representativo de um ensaio em de câmara de fluxo laminar.	50
Figura 10	Trajetórias das células reconstituída pelo software Igor.	51
Figura 11	Avaliação da taxa de infusão da bomba de seringa em relação ao número de células aderidas após 2 minutos de ensaio.	54
Figura 12	Parâmetros físicos do ensaio de adesão em câmara de fluxo.	56
Figura 13	Adesão de monócitos em câmara de fluxo laminar.	57
Figura 14	Espalhamento do citoplasma de monócitos humanos não infectados ou infectados com <i>Leishmania</i> sobre fibronectina.	58
Figura 15	Quantificação da área de espalhamento citoplasmático.	59
Figura 16	Análise correlativa do espalhamento citoplasmático de monócitos humanos cultivados com meio apenas ou com meio contendo <i>Leishmania amazonensis</i> .	60
Figura 17	Avaliação do efeito dos fatores solúveis liberados por <i>Leishmania amazonensis</i> na adesão de monócitos humanos.	62
Figura 18	Cinética do espalhamento citoplasmático de monócito não infectado (A) ou infectado por <i>Leishmania amazonensis</i> (B) sobre lamínulas sensibilizadas com fibronectina, estimado por IRM.	63

Figura 19	Expressão do epítipo de alta afinidade da molécula VLA-4 em monócitos infectados.	64
Figura 20	Expressão do epítipo de alta afinidade da molécula LFA-1 em monócitos infectados.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados da posição dos monócitos em cada quadro do filme registrado nos ensaios de rolamento sobre fibronectina.	49
Tabela 2. Dados de reconstituição da trajetória de um monócito durante o rolamento sobre fibronectina.	50

LISTAS DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
BSA	albumina sérica bovina
C5a	produto derivado da clivagem do componente C5 do complemento
CCR	receptores de quimiocinas da família CC
CL	cutaneous leishmaniasis (leishmaniose cutânea)
CLA	“cutaneous lymphocyte antigen” (antígeno de linfócitos cutâneo)
CR	receptores de quimiocinas da família C
CS-1	fibronectin Type III connecting segment fragment 1-25
CX₃CR	receptores de quimiocinas da família CX ₃ C
CXCR	receptores de quimiocinas da família CXC
DCL	Leishmaniose cutânea difusa
EDTA	“ethylene diamine tetraacetic acid” (ácido etileno diamino-tetracético)
EGTA	“ ethyleneglycol-bis (β-aminoethyl ether)— N,N’-tetraacetic acid” [bi-etilenoglicol (éter β-aminoetil)— N,N’- ácido tetracético.
ELC	“EB/1-ligand chemokine” (quimiocina ligante de EB/1)
GlyCAM	“glycosylation-dependent cell adhesion molecule” (molécula de adesão celular dependente de glicosilação)
GPCR	G protein-coupled receptors
GRO	“growth-related oncogene” (oncogene relacionado ao crescimento)
HBSS	“Hanks’ Balanced Salt Solution” (solução balanceada de sais Hanks)
HEV	High endothelial venules
ICAM	“intercellular adhesion molecule” (molécula de adesão intercelular)
IFN	“interferon”
IL	interleucina
iNOS	sintetase de óxido nítrico induzível
IP-10	“interferon-gama inducible protein“ (proteína induzida por interferon-gama)
IRM	microscopia de reflexão e interferência
LAD	deficiência de adesão leucocitária
LC	“lymphoid tissue chemokine” (quimiocina de tecido linfóide)
LDV	Leu-1 N-2-[4-[(2-methylphenyl)amino]carbonyl]amino]phenyl]acetyl-, Lys-6
LFA	“leukocyte function-associated antigens” (antígeno associado a função

	leucocitária)
LPS	lipopolissacarídeo
LTB4	leucotrieno B4
MAC	“macrophage adhesion molecule” (molécula de adesão de macrófagos)
MAdCAM	“mucosal addressin cell adhesion molecule” (molécula de adesão celular adressina de mucosa)
MCL	mucocutaneous leishmaniasis (leishmaniose mucocutânea)
MCP	“monocyte chemotatic protein” (proteína quimiotática de macrófagos)
MDC	“macrophage-derived chemokine” (quimiocina derivada de macrófagos)
NCAM	“neuronal cell adhesion molecule” (molécula de adesão de células nervosas)
PAF	“platelet-activating factor” (fator de ativação plaquetária)
PBS	“phosphate buffered saline” (salina tamponada com fosfato)
PECAM	“platelet-endothelial adhesion molecule” (molécula de adesão plaqueta-endotélio)
PKDL	leishmaniose tegumentar pós-kala-azar
PLC	Fosfolipase C
PMA	forbol miristato acetato
PPAR-γ	receptor gama ativador da proliferação de peroxissomas
PSGL	“P-selectin-glycoprotein ligand” (glicoproteína ligante de P-selectina)
RANTES	“regulated on activation, normal T cell expressed and secreted” (quimiocina regulada pela ativação de linfócitos T normais)
RGD	Arg-Gly-Asp peptide sequence
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (meio de cultura)
SDF	“stromal-cell-derived factor” (fator derivado de células estromais)
VCAM	“vascular cell adhesion molecule” (molécula de adesão vascular)
VLA	“very late antigen” (antígeno de aparecimento tardio)

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de enfermidades causada por parasitos do gênero *Leishmania*, transmitida pelo inseto vetor *Lutzomia longipalpis*, e se manifesta por um amplo espectro de doenças com acometimento da pele (leishmaniose cutânea), das mucosas oral e nasal (leishmaniose cutâneo-mucosa) e de órgãos internos como a medula óssea, baço, fígado e etc (leishmaniose visceral). A doença é endêmica em quase todos os continentes, exceto na Oceania, sendo estimada em 350 milhões a população sob risco de contrair a enfermidade (DESJEUX, 2004b; ALVAR et al., 2012).

Após a inoculação na pele, o parasito induz um processo inflamatório que promove sinais locais no tecido lesado que induzem o aumento do recrutamento de leucócitos (THALHOFER et al., 2011). Semelhante a outros processos inflamatórios, ocorre liberação de quimiocinas que ativam o endotélio vascular que expressam moléculas como selectinas, moléculas da superfamília das imunoglobulinas e integrinas, que constituem um mecanismo de direcionamento ou endereçamento dos leucócitos (MULLER, 2016; SCHMIDT et al., 2016)

Estudos prévios no nosso laboratório usando um ensaio modificado de STAMPER; WOODRUFF (1977) demonstrou que macrófagos aderem preferencialmente ao tecido conjuntivo inflamado; esta adesão requer a presença de cátions divalentes e depende também do estado de ativação celular, podendo ser inibida por anticorpos contra integrinas contendo cadeias alfa-4 ou beta-2 ou por peptídeos que contenham fragmento de fibronectina (CS-1); o qual apresenta o tripeptídeo LDV, reconhecido pela molécula VLA-4, e peptídeos que contem a sequência RGD. Adicionalmente, macrófagos infectados por *L. amazonensis*, *L. infantum* ou *L. brasiliensis* tem redução na adesão às secções de tecido conjuntivo inflamado nas primeiras 24 horas de infecção quando comparados com macrófagos não infectados, incubados com partículas de látex ou mesmo com *Mycobacterium fortuitum*, sugerindo que não depende apenas do mecanismo de fagocitose para que ocorra redução de aderência mas sim de mecanismos intrínsecos decorrentes da infecção por *Leishmania* (CARVALHAL et al., 2004). Foi demonstrado que VLA-4 é uma das moléculas relevantes para a migração macrofágica nos tecidos (HENDERSON et al., 2003), compõem sinapses imunológicas (ROCHA-PERUGINI et al., 2014; STRAZZA et al., 2014) e tem sua função alterada em decorrência da infecção por *Leishmania*. Entretanto, a função desta integrina pode ser reestabelecida pela substituição de Ca^{++} e Mg^{++} na superfície celular por Mn^{++} (PINHEIRO et al., 2006).

Neste estudo, demonstramos que a interação do parasito com a célula hospedeira não interfere nas fases iniciais do processo de adesão celular, ou seja, fase de rolamento. Contudo,

a infecção afeta o espalhamento citoplasmático (*spreading*) dos monócitos sobre superfícies recobertas por fibronectina e neste processo a principal molécula de adesão é a VLA-4. Por sua vez, somente as células que contém o parasito, após 18h de incubação com promastigotas de *Leishmania* observa-se uma redução do espalhamento citoplasmático. Dessa forma, produtos do parasito ou de outras células não interferem no processo de adesão das células a componentes da matriz extracelular. Foi demonstrado que a cinética de espalhamento celular é afetada em células infectadas e que este fato decorre por redução de afinidade das moléculas de VLA-4. Adicionalmente, a avaliação da afinidade de integrinas beta-2 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os monócitos infectados e os não infectados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que inclui mais de 20 espécies do parasito sendo transmitida pela picada da fêmea dos insetos, infectados, da família dos flebotomíneos. As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, com maior incidência e prevalência em países pobres ou em desenvolvimento. São quatro as principais formas da doença; a leishmaniose visceral (VL, também conhecida como kala-azar); leishmaniose tegumentar pós-kala-azar (PKDL); leishmaniose cutânea (CL); e leishmaniose cutânea mucosa (MCL). Enquanto a leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, a leishmaniose visceral é a mais grave e pode ser fatal, se não for tratada (DESJEUX, 2004a; 2004b; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PACE, 2014) (Figura 1).

Em seres humanos, as várias manifestações incluem (I) a leishmaniose cutânea, caracteriza-se por lesões ulceradas na pele, que podem curar espontaneamente ou progredir para úlceras crônicas com cicatrização grave; (II) leishmaniose mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destrutivas na mucosa e junções mucocutâneas; e (III) a leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por lesões nodulares não ulcerativas. A LV é caracteriza-se por ser uma doença crônica e progressiva, que acomete vários órgãos, incluindo o baço, fígado, medula óssea, linfonodos e, eventualmente, a pele (BARRAL et al., 1991; DINIZ et al., 2008). Além disso, as diferentes formas da doença estão, em geral, associadas a espécies específicas do parasito, por exemplo: *Leishmania infantum* (LV), *Leishmania braziliensis* (LC, LCM) e *Leishmania amazonensis* (LC) (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

As leishmanioses são classificadas como doenças antropozoonóticas ou zoonóticas dependendo se o reservatório natural do parasito é humano ou outros animais. Em uma escala global, aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em áreas onde há transmissão ativa dos parasitos do gênero *Leishmania*, com 14 milhões de pessoas diretamente afetadas pela doença (PACE, 2014; WHO, 2016). As leishmanioses representam a segunda causa mais importante de mortalidade entre as doenças parasitárias, perdendo somente para a malária, quando avaliada em diferentes faixas etárias é a terceira causa comum de morbidade após a malária e esquistossomose em crianças com menos de 15 anos de idade sofrendo a maior parte da carga da doença (SAVOIA, 2015).

As leishmanioses afetam principalmente habitantes de países pobres da África, Ásia e América Latina. Desnutrição, migração de populações, condições precárias de habitação,

sistema imunológico debilitado e a falta de recursos predispõe a doença (WHO, 2016). A doença está presente em cerca de 98 países e alguns destes possuem territórios endêmicos para leishmaniose. Estima-se que cerca de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LC acontecem a cada ano em todo o mundo. Mais de 90% dos casos de LV no mundo ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, enquanto que a LC representa cerca de 75% dos casos no Brasil, na Síria e no Afeganistão (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016).

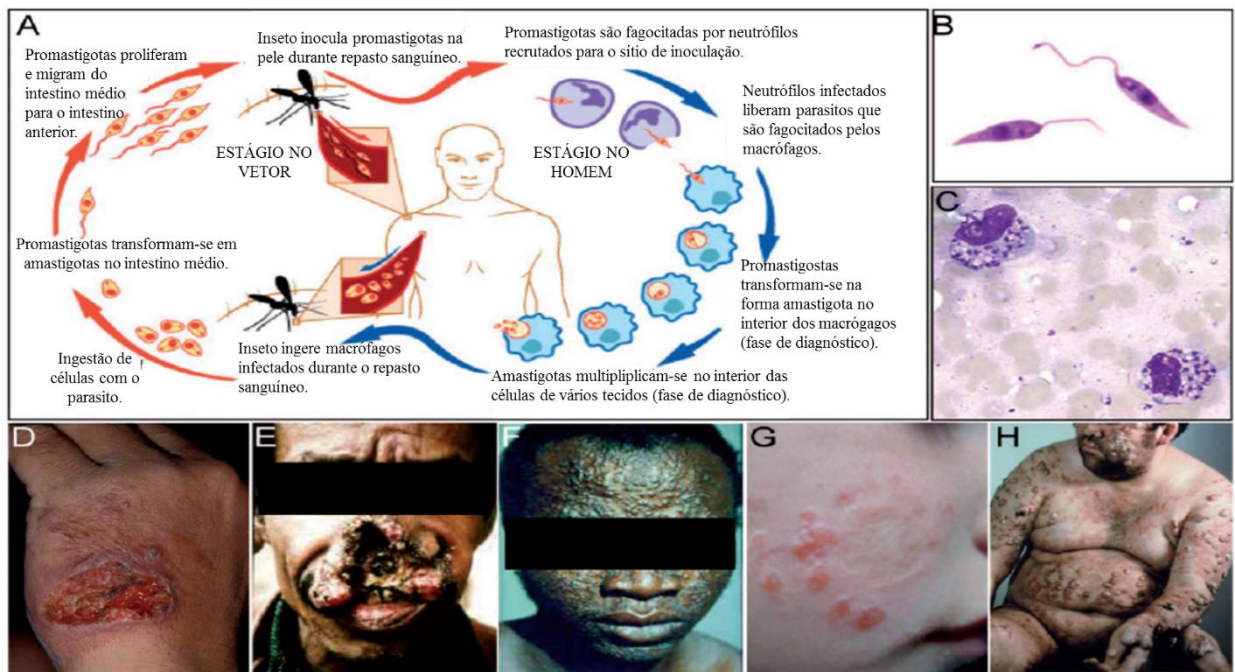


Figura 1. Ciclo de vida da *Leishmania* e formas clínicas. (A) representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania*. (B) *L. donovani* corada com Giemsa, (C) *imprint* de lesão cutânea corado com Giemsa apresentando parasitos intracelulares nos macrófagos, (D) lesão cutânea (CL) na mão, (E) lesão mucocutânea (LCM) da boca e nariz, (F) lesões faciais em um caso de PKDL, (G) lesões emergentes dentro da antiga cicatriz de CL em caso de recidiva cutânea e (H) leishmaniose cutâneo difusa (DCL) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares que têm um complexo ciclo de vida digenético requerendo um hospedeiro vertebrado (canídeos, roedores e seres humanos) e um inseto vetor (Ordem Diptera, família Psychodidae, Sub-família Phlebotominae) pertencente ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e do gênero

Lutzomyia, no Novo Mundo. No Brasil há uma única espécie de vetor: *Lutzomyia longipalpis* (DINIZ et al., 2008; AKHOUNDI et al., 2016).

Durante o seu ciclo de vida, o parasito apresenta formas distintas: a forma promastigota flagelada e móvel, presente no aparelho digestivo do inseto vetor, enquanto que a forma amastigota sem flagelo é encontrada no interior das células fagocíticas. A forma infecciosa, promastigota metacíclica é menor e apresenta um longo flagelo quando comparada com a forma não-infecciosa, procíclica. Após a infecção do hospedeiro vertebrado, as promastigotas fagocitadas se diferenciam em formas amastigotas, que se multiplicam intracelularmente até romperem a célula hospedeira, liberando o parasito, que então infecta outros macrófagos (HANDMAN, 1999; VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

2.2 Panorama da disseminação do parasito

Em todas as formas da leishmaniose a infecção se inicia com a inoculação de formas promastigotas do parasito, na pele do hospedeiro, por diferentes espécies de flebotomíneos e como já mencionado, as diferentes formas da leishmaniose estão associadas primariamente à espécie do parasito e também a condições inerentes ao hospedeiro. Após a inoculação de promastigotas metacíclicas infecciosas na derme, o sistema imune inato da pele detecta a presença das promastigotas e, em questão de minutos, recruta células inflamatórias para os locais de invasão promovendo a indução da imunidade adaptativa (LIU; UZONNA, 2012). Os macrófagos residentes infectados produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas, quimiocinas e promove uma reação inflamatória aguda (MATTE; OLIVIER, 2002). O sistema imunológico da pele do hospedeiro detecta o parasito através de receptores de padrões de reconhecimento e moléculas do sistema complemento presentes em diferentes tipos de células, incluindo neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e células natural killer (NK).

Vários receptores Toll-like (TLRs), tais como TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 e TLR9 contribuem para a detecção e reconhecimento de *Leishmania* por várias células da imunidade inata. Este reconhecimento conduz à ativação de vias de sinalização intracelular que são necessárias para a iniciação da resposta inflamatória e controle da proliferação dos parasitos pela resposta imune inata (DE FREITAS et al., 2016). A ativação de TLRs desempenha um papel vital na produção de citocinas pró-inflamatórias, que são essenciais para a imunidade (SRIVASTAVA et al., 2012). Além disso, em modelos murinos de infecção, a ativação do

inflamassoma e a produção de IL-1 β são importantes para a restrição *in vivo* da infecção com *L. infantum* (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de resposta inflamatória contribuindo para a fagocitose e morte dos patógenos (CHARMOY et al., 2010; DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). Em camundongos depletados de neutrófilos, a infecção por *L. donovani* causa a um aumento da carga parasitária na medula óssea e baço, mas não no fígado devido ao atraso na maturação de granulomas hepáticos que diminuem a expressão da sintetase de óxido nítrico induzível (iNOS) nas células presentes no interior dos granulomas. No baço, a depleção de neutrófilos está associada a um aumento nos níveis de IL-4, IL-10 e na redução da secreção de interferon gama produzido por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (MCFARLANE et al., 2008). O aumento da secreção de IL-4 e IL-10 no soro e nos níveis mais elevados de IgG1 específicos para *Leishmania* ao invés de IgG2a, ou seja, a depleção de neutrófilos induz a uma resposta imune do tipo Th2. Desta forma, os neutrófilos têm um papel fundamental na resposta inicial de proteção contra *L. donovani*, tanto como células efetoras envolvidas na eliminação dos parasitos bem como sendo uma célula essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora do tipo Th1 (MCFARLANE et al., 2008). As interações entre neutrófilos inflamatórios e macrófagos infectados com *L. major* pode aumentar ou diminuir a replicação do parasito no interior desta célula, a depender do genótipo do hospedeiro e de mecanismos envolvendo a secreção de TNF- β ou elastase por neutrófilos (RIBEIRO-GOMES et al., 2004; RIBEIRO-GOMES et al., 2007).

No hospedeiro vertebrado, após a inoculação do parasito, os macrófagos residentes fagocitam o parasito e as formas promastigotas sofrem transformações moleculares e estruturais, dando origem às formas amastigotas. Neste estágio de desenvolvimento, o parasito é obrigatoriamente intracelular, capaz de sobreviver e se multiplicar em macrófagos no interior de compartimentos fagolisossomais denominados de vacúolos parasitoforos (ALEXANDER; RUSSELL, 1992). Monócitos e macrófagos infectados disseminam-se pelos diferentes tecidos do hospedeiro causando lesões (MOLL et al., 1993; FIORINI; MESSINA; BARRACCHIA, 2002; LEON; LOPEZ-BRAVO; ARDAVIN, 2007).

A infecção por *Leishmania* ocorre no contexto de inflamação e reparação dos tecidos. Além dos macrófagos residentes dos tecidos, os macrófagos inflamatórios e neutrófilos são recrutados para o local da infecção e servem quer sejam como células hospedeiras, quer sejam como células efetoras contra a infecção (LOPES; COSTA-DA-SILVA; DOSREIS, 2014). Em resposta à estimulação microbiana, os macrófagos diferenciam-se entre dois

fenótipos distintos: M1 ou M2. Estes dois subtipos são induzidos no decorrer da infecção por *Leishmania*. A infecção microbiana conjuntamente com a citocina IFN- γ , liberada por linfócitos Th1, conduz a macrófagos classicamente ativados, ou seja, macrófagos M1. Os macrófagos M1 produzem óxido nítrico (NO) que tem atividade leishmanicida, portanto, importante para o controle da infecção por *Leishmania*. Já, os macrófagos do tipo M2, induzidos pela citocina IL-4, liberada por linfócitos Th2, expressam arginase e desempenham um papel importante no reparo de tecidual (MOSSER; EDWARDS, 2008; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). A expressão do receptor gama ativador da proliferação de peroxissomas (PPAR- γ) também é necessária para a indução de macrófagos M2. Camundongos geneticamente deficientes de macrófagos M2 ou M1, devido à deficiência genética, quer seja do receptor de IL-4, quer seja do PPAR- γ , são mais resistentes à infecção por *L. major* (HOLSCHER et al., 2006; ODEGAARD et al., 2007).

A picada do inseto vetor infectado com *Leishmania* contribui também para induzir no hospedeiro um cenário de resposta inflamatória e reparação dos tecidos. As moléculas contidas na saliva do inseto desempenham um papel importante no estabelecimento da infecção. Na composição da saliva tem a presença de vasodiladores, anti-coagulantes e moléculas imunomoduladoras (KAMHAWI, 2000; SACKS; KAMHAWI, 2001). O peptídeo encontrado na saliva de insetos, maxadilan, modula a resposta imune do hospedeiro e reprograma a maturação de células dendríticas para facilitar a infecção (MORRIS et al., 2001; WHEAT et al., 2008). Além disso, os elementos celulares e moleculares recrutados pela reação inflamatória modulam interações entre macrófagos e *Leishmania*. A reparação tecidual é uma resposta conservada a uma lesão caracterizada por um influxo inicial de neutrófilos, seguida por monócitos/macrófagos e fibroblastos. O reparo tecidual só será concluído com a resolução da inflamação e, no caso da leishmaniose cutânea, as úlceras crônicas, em modelos murinos de infecção, estão associadas à persistência de infiltrado de neutrófilos (BEIL et al., 1992). Os estudos com microscopia intravital da dinâmica de infecção de *L. major* indica que depois de 1 dia de infecção os parasitos se localizam, principalmente, no interior dos neutrófilos. Posteriormente, a quantidade de neutrófilos infectados diminui e os parasitos estão presentes nos macrófagos. Os parasitos viáveis são libertados a partir de neutrófilos apoptóticos próximos a macrófagos, num mecanismo de “cavalo de Tróia” em que neutrófilos armazenam o parasito até a apoptose, e facilitam a infecção dos macrófagos (PETERS et al., 2008).

O desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th1 protege, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 favorece à progressão da doença

(HEINZEL et al., 1989; HEINZEL et al., 1991; HEINZEL et al., 1993). Outros mecanismos envolvidos na sobrevivência da *Leishmania* no interior das células do hospedeiro vertebrado e o estabelecimento de lesões teciduais são relacionados à disseminação e recirculação de células contendo o parasito e antígenos do parasito para tecidos do hospedeiro. Isso se torna evidente, pois na leishmaniose a relação entre a disseminação do parasito e a gravidade da enfermidade é particularmente estreita. As áreas de lesão estão sempre relacionadas à presença do parasito no interior de células macrofágicas (FERNANDEZ-FLORES; RODRIGUEZ-PERALTO, 2016). Nas formas tegumentares, as lesões permanecem focais na pele, por vezes com evidente linfadenopatia regional, em outros há a disseminação do parasito para múltiplos focos da pele ou para mucosa. O quadro de disseminação da *Leishmania* nos casos de leishmaniose visceral parece ainda mais complexo: provavelmente há um trânsito pele-linfonodo-sangue e, em seguida, um estabelecimento sequencial de células parasitadas em diferentes tecidos, como demonstrado em camundongos e sugerido em estudos com cães naturalmente infectados (DOS-SANTOS et al., 2004; REIS et al., 2006).

Em cães, os dados sugerem forte disseminação tardia de parasitos para a pele (REIS et al., 2006), o que pode ser relevante do ponto de vista epidemiológico por possibilitar a transmissão eficiente de parasitos a flebotomíneos e a propagação da enfermidade (DEANE; DEANE; ALENCAR, 1955). Como observados em outras células, o estabelecimento e a sobrevivência de macrófagos infectados nos tecidos são fenômenos dependentes das interações entre moléculas de adesão na superfície do macrófago e componentes do tecido conjuntivo nos tecidos alvo de lesão. Adicionalmente, pares moleculares envolvidos no processo de adesão e migração leucocitária atuam também na formação de sinapses imunológicas, possibilitando a geração de imunidade (SIMS; DUSTIN, 2002). Recentemente, foi observado no estudo de populações celulares com capacidade de fagocitar *Leishmania* que altas cargas parasitárias afetam a migração de células dendríticas do seu sítio de inoculação para os linfonodos drenantes (HERMIDA et al., 2014).

O desenvolvimento e o padrão de organização dos órgãos linfóides secundários é um processo altamente regulado mediado por citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF). Durante o curso da infecção por *Leishmania donovani*, a zona marginal do baço de camundongos sofre uma extensa remodelação semelhante às anormalidades observadas em camundongos deficientes de algumas citocinas da família TNF. Este processo seletivo, compreende a perda progressiva e rápida dos macrófagos da zona marginal (MZMs). Como consequência funcional, o tráfego de linfócitos para a polpa branca é prejudicada durante a fase crônica da leishmaniose (ENGWERDA et al., 2002).

A interação entre as células dendríticas e células T é essencial para a geração de imunidade mediada por células, assim como as células estromais do baço são essenciais na produção de quimiocinas que atraem as células dendríticas e permitem o encontro destas células com as células T nas áreas correspondentes a sua distribuição nos órgãos linfóides. Células estromais, nas áreas de linfócitos T, expressam constitutivamente CCL19 e CCL21, quimiocinas que se ligam ao receptor CCR7 de linfócitos virgens e células dendríticas maduras (NGO; TANG; CYSTER, 1998; KELLERMANN et al., 1999). Assim, o gradiente de concentração destas quimiocinas permite o encontro de células dendríticas e linfócitos T nas áreas correspondentes destes linfócitos nos órgãos linfóides (DIEU et al., 1998). Apesar de ocorrer um aumento da população de células dendríticas, no curso da infecção por *Leishmania*, a distribuição no baço se apresenta alterada. Em camundongos, durante a fase crônica da infecção por *Leishmania donovani*, as células dendríticas não conseguem migrar a partir da zona marginal para a região periarteriolar do baço (ATO et al., 2002). Em estudos de microscopia confocal e imunohistoquímica, foi demonstrado que as células estromais sofrem uma perda progressiva da expressão das quimiocinas CCL21 e CCL19. Em paralelo, durante a infecção crônica por *Leishmania*, as células dendríticas sofrem diminuição na expressão de CCR7 (ATO et al., 2002). Estudos posteriores demonstraram que a secreção das quimiocinas CCL19 e CCL21 são importantes na fase inicial de recrutamento das células dendríticas do curso pela infecção por *Leishmania donovani* (ATO et al., 2006).

Monócitos circulam na corrente sanguínea e migram da circulação para os tecidos e compõem as populações de macrófagos e células dendríticas presentes nos tecidos, e também são recrutados para os locais de inflamação (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003; SERBINA et al., 2008). Patógenos podem aproveitar este processo para se deslocar na corrente sanguínea e disseminar para outros locais do corpo. Assim como *Leishmania*, *Toxoplasma gondii* é um parasito que infecta fagócitos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004) e existem evidências de que o parasito pode cooptar a função migratória das células do sistema imune do hospedeiro a fim de usá-las como um "cavalo de tróia" para disseminar para outros tecidos (BARRAGAN; SIBLEY, 2002; GREGG et al., 2013).

T. gondii utiliza o fluxo sanguíneo, predominantemente no interior de monócitos infectados, para se disseminar por diferentes tecidos (COURRET et al., 2006; DELLACASA-LINDBERG; HITZIGER; BARRAGAN, 2007; LACHENMAIER et al., 2011; FURTADO et al., 2012). Em condições de fluxo laminar, os monócitos infectados podem aderir, rastejar e efetivar a migração transendotelial (HARKER et al., 2013; UENO et al., 2014). Contudo, macrófagos infectados sofrem regulação negativa da adesão e, possivelmente, este controle

facilita a motilidade através dos tecidos. Nas fases iniciais da infecção ocorre a diminuição da expressão de VLA-4 e VLA-5, entretanto ocorre uma progressiva recuperação desta expressão após 12 horas de infecção. Nos ensaios *in vivo*, há um atraso da migração de macrófagos infectados para o linfonodo drenante (DA GAMA et al., 2004). Em comparação com resultados da adesão de macrófagos infectados por *Leishmania*, não há diminuição significativa da expressão das moléculas de adesão, (PINHEIRO et al., 2006) apesar de ocorrer diminuição da adesão ao tecido inflamado e a componentes da matriz extracelular (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Além disso, não ocorre atraso da migração de macrófagos infectados para o linfonodo drenante (HERMIDA et al., 2014), o que sugere que outros mecanismos de regulação da adesão estejam operando.

2.3 O processo de transmigração celular através dos vasos sanguíneos

Os processos inflamatórios causados por agentes infecciosos ou danos nos tecidos desencadeiam a ativação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), a partir de microrganismos, bem como de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), a partir de células do tecido lesionado (SANZ et al., 2014). Estes sinais de perigo estimulam as células residentes do sistema imune inato, tais como mastócitos, macrófagos e células dendríticas, a desencadear a secreção de citocinas e de outros mediadores pró-inflamatórios que ativam as células endoteliais próximas da microvasculatura. Desta forma, uma cascata de eventos é ativada, permitindo que leucócitos circulantes possam reconhecer o endotélio vascular no tecido inflamado (Figura 2) e interajam com a parede do vaso sanguíneo por meio de uma série de passos conhecidos como: captura, rolamento, aprisionamento de leucócitos, rastejamento para os locais de saída e transmigração através das barreiras de células endoteliais, pericitos e da membrana basal (VESTWEBER, 2015).

O sangue escoar no leito vascular constituindo várias camadas fluidas em diferentes velocidades, à medida que o sangue se afasta da parede do vaso a velocidade aumenta até atingir a velocidade máxima no centro do vaso. A este movimento do fluido dar-se o nome de fluxo laminar. No regime de fluxo laminar, o fluido se move sem que haja mistura ou variação da velocidade das camadas e as células do sangue movem-se de forma ordenada, mantendo a mesma posição relativa. Entretanto, em condições fisiológicas ou patológicas pode ocorrer perturbação deste fluxo, tornando-o um fluxo turbulento (TEES; GOETZ, 2003; LEE; PACKARD; HSIANG, 2015). Assim, as células endoteliais experimentam três forças mecânicas primárias: a pressão, criada pelas forças hidrostáticas do sangue dentro do vaso sanguíneo; estiramento ou tensão circunferencial, criado como resultado de conexões

intercelulares definidas entre as células endoteliais que exercem forças longitudinais sobre a célula durante a vaso motricidade; e tensão de cisalhamento, a força de fricção criada pelo fluxo sanguíneo se arrastando na parede do vaso. Dessas forças, a tensão de cisalhamento é a força hemodinâmica que estimula a liberação de substâncias vasoativas, modifica a expressão gênica, o metabolismo celular, a morfologia celular e está envolvida na interação de moléculas de adesão dos leucócitos/endotélio vascular (DAVIES, 1995; DAVIES et al., 1997; TRAUB; BERK, 1998; DAVIES, 2002; SHYY; CHIEN, 2002; PAN, 2009).

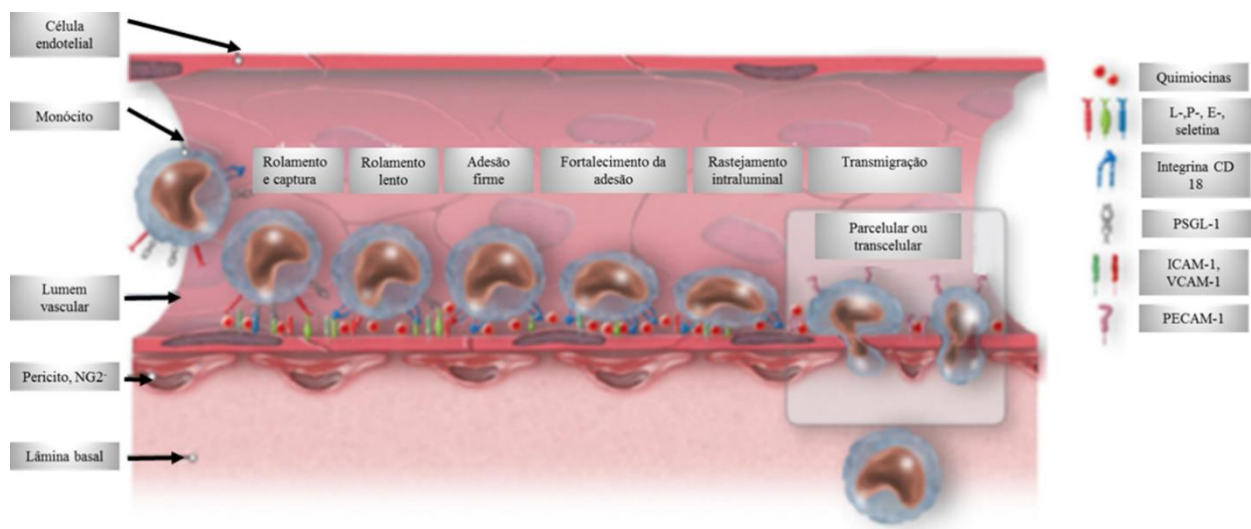


Figura 2. Etapas do processo de adesão e migração celular: captura, rolamento, rolamento lento, adesão firme, fortalecimento da adesão e rastejamento intraluminal precede a migração transendotelial de monócitos. Dois modos de transmigração, um paracelular e outro transcelular, podem ser distinguidos. As células endoteliais ativadas expressam moléculas de adesão e quimiocinas que interagem com ligandos monocíticos (GERHARDT; LEY, 2015).

O processo de adesão e migração celular envolve as moléculas de adesão celular que pertencem a uma das três, principais, classes de moléculas de adesão: selectinas, integrinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas, que medeiam o contato entre as células e destas com a matriz extracelular. O processo de adesão é importante não só no extravasamento de leucócitos do leito vascular para o tecido conjuntivo, mas também em vários eventos biológicos como morfogênese, crescimento, organização e estabilidade dos tecidos (ROZARIO; DESIMONE, 2010; NIESSEN; LECKBAND; YAP, 2011).

As selectinas endoteliais, E-selectina e P-selectina, são induzidas na superfície de células endoteliais em tecidos inflamados enquanto que a L-selectina está na superfície dos leucócitos. As selectinas medeiam a captação de leucócitos a partir do sangue que flui sobre o endotélio; esta interação transitória, em combinação com a diminuição da velocidade do fluxo do sangue, resulta no rolamento de leucócitos sobre a superfície das células endoteliais fazendo com que os leucócitos formem projeções da membrana plasmática na área de contato da célula com o substrato, que funcionam como amarras durante o rolamento. Estas amarras transitórias durante o rolamento ajudam a diminuir a velocidade de rolamento da célula sobre a superfície endotelial (MCEVER, 2015).

As quimiocinas e outras substâncias quimioatraentes tais como C5a, certos leucotrienos e caliceínas geradas pelas células endoteliais ou por células inflamatórias que estão em transcitose são apresentadas na superfície da célula endotelial e desencadeiam a ativação dos leucócitos durante o rolamento. Isto conduz à ativação de integrinas dos leucócitos que se ligam a membros da superfamília das imunoglobulinas, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), cuja expressão é induzida em células endoteliais por citocinas pró-inflamatórias. Tais interações medeiam a adesão firme dos leucócitos e espalhamento citoplasmático do leucócito sobre a superfície de células endoteliais permitindo que os leucócitos rastejem na superfície luminal dos vasos sanguíneos até que transmigrem através da barreira do endotélio em locais de saída adequados (GOLIAS et al., 2011; DIXIT; SIMON, 2012).

2.4 Famílias importantes de moléculas envolvidas nas fases de adesão ao leito vascular e a componentes da matriz extracelular

2.4.1 Selectinas

As interações entre selectinas dos leucócitos e os ligantes glicosilados na superfície das células endoteliais são essenciais para o processo de rolamento e ativação dos leucócitos durante a etapa de rolagem. Durante esta fase, é possível que os leucócitos encontrem quimiocinas que ativam as integrinas, que permitem reter o leucócito e são responsáveis pela modificação da forma da célula e rastejamento sobre o leito vascular. Contudo, as selectinas também estão envolvidas na transdução de sinais que modulam o comportamento dos leucócitos, por exemplo, permitindo reduções nas velocidades de laminagem dependentes de integrinas (Rolamento lento; Figura 2). Apesar do paradigma de múltiplos passos no processo de migração celular enfatizar as interações de leucócitos com células endoteliais, as selectinas

também medeiam a adesão de leucócitos às plaquetas ativadas e a outros leucócitos. Assim, as selectinas iniciam uma cascata adesiva multicelular e sinaliza eventos durante a inflamação fisiológica ou patológica (MCEVER, 2015).

Todas as três selectinas existentes tem um domínio lectina N-terminal (tipo C) dependente de Ca^{2+} (MCEVER; ZHU, 2010), um módulo similar ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e uma série de repetições “em tandem” de consenso, um domínio transmembranar, e uma cauda citoplasmática. L-selectina é expressa nas superfícies de todos os leucócitos. Alguns agonistas induzem a liberação proteolítica do ectodomínio (KAHN et al., 1998). A P-selectina é expressa por megacariócitos e células endoteliais. As moléculas são armazenadas em grânulos nas plaquetas e em corpos Weibel-Palade nas células endoteliais. Mediadores tais como trombina, histamina ou fatores do complemento induzem a rápida redistribuição de P-selectina sobre a membrana plasmática. TNF-alfa, IL-1beta e lipopolissacarídeo (LPS) aumentam a transcrição do mRNA da P-selectina na maioria dos leucócitos. E-selectina é constitutivamente expressa sobre as superfícies das células endoteliais venulares da medula óssea e pele. Na maior parte dos órgãos, no entanto, as células endoteliais precisam ser estimuladas com TNF-alfa, IL-1 β ou com LPS, para sintetizar E-selectina; este mecanismo de expressão induzida é conservada em ratos e seres humanos (VESTWEBER; BLANKS, 1999).

O determinante de reconhecimento mínimo é o sialil Lewis X (sLex), um componente terminal de alguns N- e O-glicanos. Uma modificação pós-tradução, sulfatação, permite que certas glicoproteínas possam servir de ligantes fisiologicamente relevantes para P e L selectinas. Assim, P e L selectinas ligam-se cooperativamente a um sLex recoberto de O-glicano, tirosinas sulfatadas e outros aminoácidos localizados na porção N terminal da P-selectina ligante de glicoproteína 1 (PSGL-1), uma mucina homodimérica em leucócitos. L-selectina se liga a moléculas sializadas, fucosiladas, sulfatadas e N- e O-glicanos de glicoproteínas expressas nas células endoteliais de vênulas endoteliais altas em gânglios linfáticos (VESTWEBER; BLANKS, 1999).

Os leucócitos do sangue rolam, fase inicial de interação, sobre as superfícies endoteliais através de interações reversíveis das selectinas com os seus ligantes. As células rolam através da formação de novas ligações adesivas na borda de ataque, posição anterior da célula, para substituir ligações que se dissociam no bordo de fuga, posição posterior da célula. Estas ligações são de curta duração, geralmente com duração de menos de um segundo. Além disso, as tensões de cisalhamento do fluxo sanguíneo exercem uma força sobre as ligações na borda de fuga; estas ligações são conhecidas como ligações de deslizamento e têm tempo de

vida encurtada pela força do fluxo vascular, por sua vez, ligações de captura tem seu tempo de vida prolongada por esta mesma força (MARSHALL et al., 2003). Assim, a força crescente exerce um efeito trifásico sobre as selectina/ligante, primeiro encurta o tempo de vida das ligações (ligações de deslizamento), em seguida, prolonga (ligação de captura) e depois de novo encurta o tempo de vida (ligações deslizamento) (MARSHALL et al., 2003; SARANGAPANI et al., 2004; WAYMAN et al., 2010). As funções biológicas das ligações de captura não são totalmente compreendidas. A evidência mais forte, a partir de estudos *in vitro* com L-selectina, apoia a ideia de um papel para as ligações de captura na mediação de adesão potencializada pelo fluxo. Em tensões baixas de cisalhamento ($<0,3 \text{ dine/cm}^2$), os leucócitos rolam rapidamente de forma irregular e soltam-se com frequência da superfície de deslizamento. Em tensões de cisalhamento mais elevadas ($0,3 - 1,0 \text{ dine/cm}^2$) permitem que as células rolem mais lentamente e mais regularmente com uma menor frequência de destaque da superfície de rolagem. Em tensões de cisalhamento ainda mais elevadas ($>1,0 \text{ dynes/cm}^2$), as células rolam mais rápido e destacam-se com mais frequência. A baixas tensões de cisalhamento, o tempo de vida das ligações são muito curtos. Assim, como a tensão de cisalhamento aumenta, a força crescente prolonga o tempo de vida das ligações (ligação de captura), fazendo com que o rolamento se torne mais lento e regular até que um ponto ideal de cisalhamento ($1,0 \text{ dine/cm}^2$) seja atingido. Acima do ponto de cisalhamento ideal a força encurta o tempo de vida (ligação de deslizamento), fazendo com que o rolamento se torne mais rápido e menos regular. As ligações de captura podem prevenir a aglutinação de leucócitos circulantes que expressam tanto a L-selectina e o seu ligante (PSGL-1); este fato ocorre porque pouca força é aplicada sobre as ligações entre L-selectina e PSGL-1 que se formam durante o contato aleatório de leucócitos circulantes (MARSHALL et al., 2003; SARANGAPANI et al., 2004; YAGO et al., 2004; MCEVER; ZHU, 2010; WAYMAN et al., 2010; MCEVER, 2015).

2.4.2 Integrinas

As integrinas são proteínas transmembranas, heterodiméricas do tipo I, constituídas por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, são expressas por todos os leucócitos e são importantes na adesão, migração e como moléculas co-estimulatórias de linfócitos T. Elas são uma importante classe de receptores envolvidas nos eventos da adesão que controlam fisiologicamente o desenvolvimento embrionário e também em doenças, a exemplo de neoplasias e trombose. Atualmente, são reconhecidas dezoito subunidades alfa e oito subunidades beta (Figura 3) que se combinam através de ligações não covalentes para formar

24 diferentes integrinas (HYNES, 2002; LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007; GINSBERG, 2014). Cada subunidade contém um único e longo domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática curta que se liga ao citoesqueleto. As cadeias alfa e beta formam, na porção externa, um sítio de ligação nas extremidades N-terminais que caracterizam o domínio I; este sítio de ligação é dependente de íons metálicos para se ligar ao seu ligante e requer a presença de cálcio ou de magnésio como coenzima (HERTER; ZARBOCK, 2013). Nas células em repouso, a molécula se encontra em estado de baixa afinidade tanto em relação aos sítios de ligação bem como em termos de estrutura das duas cadeias que compõem a molécula, as quais se encontram dobradas (Figura 4). Por sua vez, sinais podem partir de dentro da célula (*insight out*) aumentando a afinidade dos domínios extracelulares das integrinas para os seus ligantes, um processo definido como ativação da integrina. A ativação da integrina engloba alterações na afinidade do sítio de ligação em cada integrina devido a mudanças de conformação e também de avidéz, que aumenta devido ao agrupamento e um maior engajamento de moléculas integrinas na superfície da célula, ou seja, aumento da valência (CARMAN; SPRINGER, 2003).

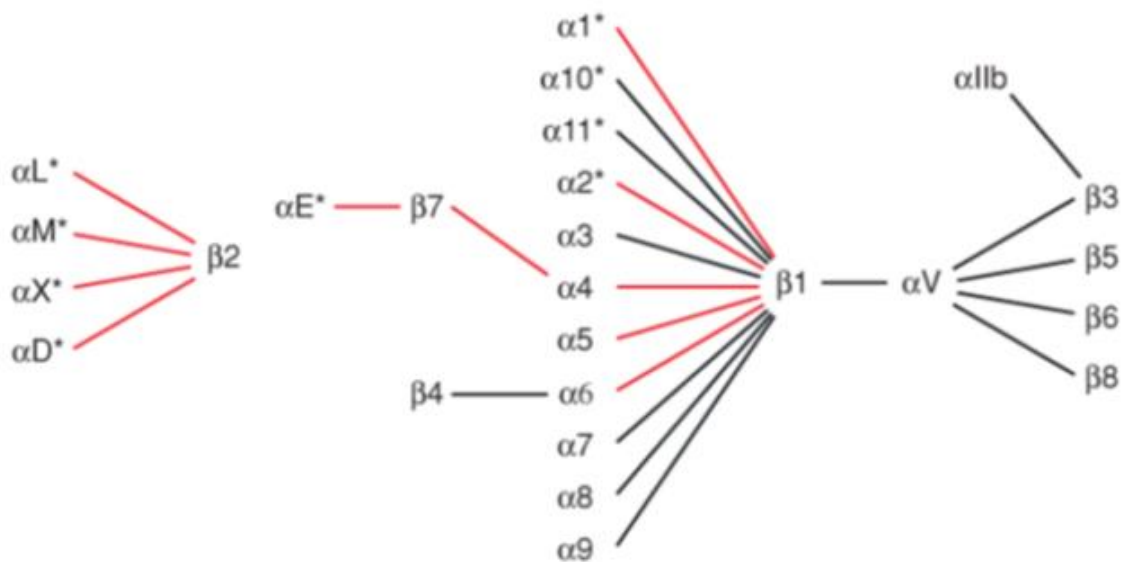


Figura 3. Representação dos 24 heterodímeros das famílias de integrinas. As subunidades alfa com domínios I estão marcadas com asterisco. Integrinas presentes em células do sistema imune marcadas com barras vermelhas (LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007).

A mudança de afinidade ocorre durante a fase de rolamento, pois à medida em que a célula diminui a velocidade de rolamento aumenta a possibilidade de encontro de fatores quimiotáticos aprisionados nas moléculas de heparan sulfato da superfície do endotélio

(MONTRESOR et al., 2012). A imobilização de quimiocinas na superfície endotelial induz um sinal forte para a ativação de VLA-4 em monócitos. Assim, ocorre uma diminuição ainda maior da velocidade de rolagem até que ocorra uma parada da célula sobre a superfície endotelial. A família de quimiocinas CXC (GRO), CXCL1, 2 e 3, IL-8 (CXCL8), CCL5 (RANTES) e CXCL4 (PF4) permitem a parada dos monócitos sobre o endotélio. Os estudos em câmaras de fluxo laminar demonstraram que a rolagem é mais importante para a ativação de LFA-1 que as citocinas solúveis, ao contrário das citocinas/quimiocinas imobilizadas na superfície de rolagem (SHAMRI et al., 2005).

Os receptores das quimiocinas ativam as proteínas G triméricas específicas (LEY, 2003), em particular, RhoA e Rap1 (LAUDANNA et al., 2002). Os receptores conjugados a proteína G (GPCR) transduz um sinal de ativação da fosfolipase C (PLC). A PLC, em seguida, provoca a ativação da Caldag-GEFI, um fator de troca de GTP que ativa Rap1. Por sua vez, Rap1 ativado estimula rapidamente a mudança da afinidade das integrinas e adesão dependente de integrina por proteínas efetoras, tais como RAPL e RIAM (Rap Interacting Adapter molécula) (LAFUENTE et al., 2004). RIAM ativa integrinas recrutando talina perto de integrinas (HAN et al., 2006). A ligação da talina com motivo NPXY da cauda citoplasmática das subunidades beta de integrinas conduz à separação das extremidades citoplasmáticas das subunidades, que conduzem a rearranjos conformacionais dos domínios extracelulares das integrinas induzindo desse modo a conformação intermédia ou elevada da integrina. A E-selectina é capaz de transmitir um sinal de ativação para as integrinas da família beta-2 (SIMON; GREEN, 2005).

Os estímulos externos à célula podem ativar as moléculas de integrinas resultando na ativação da molécula por mudança conformacional, aumento da acessibilidade e afinidade do sítio de ligação bem como *clustering*. As interações a nível de citoesqueleto vão influenciar a velocidade de difusão da integrina e a associação com os ligantes de superfície (Figura 5). A ligação das integrinas com seus ligantes também desencadeiam sinais internos envolvendo cascatas de sinalização celular e uma complexa rede de interações moleculares (CAVALLARO; DEJANA, 2011).

Os sinais mediados por integrinas desempenham um importante papel na regulação de muitas funções dos leucócitos. Nos monócitos e macrófagos, integrinas da sub-família β_2 estão envolvidas em interações célula-célula que são importantes para a migração através do endotélio e também para a fagocitose. Por sua vez, as β_1 integrinas medeiam a adesão a proteínas da matriz extracelular que resulta numa forte indução de genes relacionados com a inflamação (GERHARDT; LEY, 2015).

Durante a inflamação, as integrinas estão ligadas a um conjunto diversificado de processos cruciais que incluem fixação dos leucócitos à matriz extracelular (sinalização de dentro para fora - *inside-out signaling*) e sinais mediadores em resposta ao ambiente circunjacente, quer seja através da ligação de proteínas de matriz extracelular, quer seja ligandos expressos na superfície de outra células (sinalização de fora para dentro - *outside-in signaling*) (ABRAM; LOWELL, 2009).

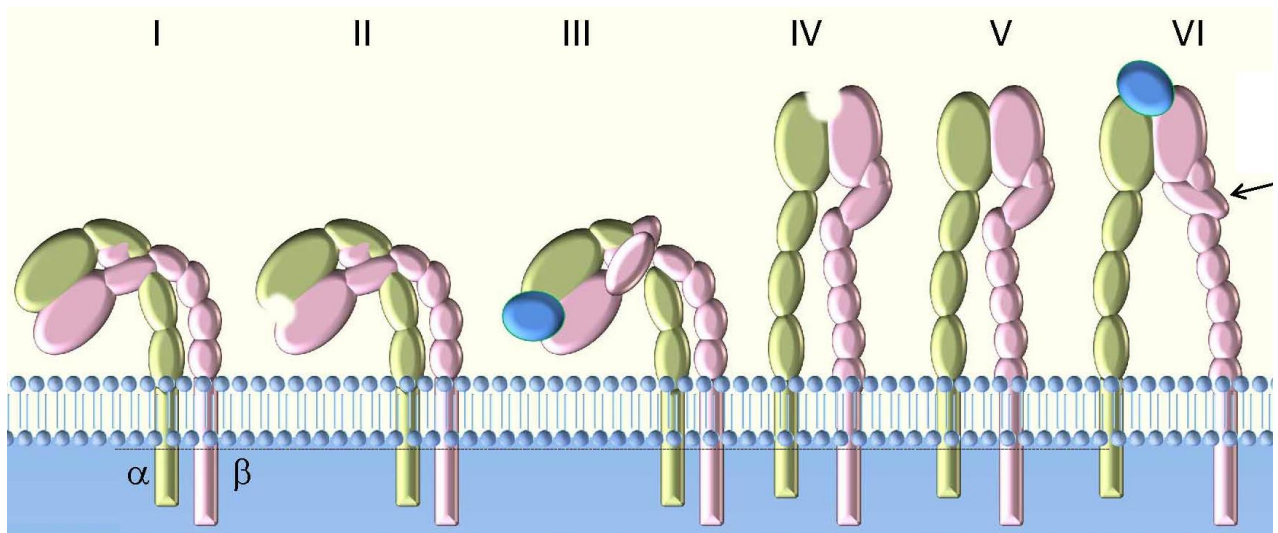


Figura 4. Estados conformacionais da molécula VLA-4. Em I a molécula dobrada em repouso com sítio de ligação em estado de baixa afinidade, II molécula dobrada ativada por phorbol ester e com sítio de ligação em estado de alta afinidade, III molécula em repouso, dobrada com o sítio de ligação ocupado pelo ligante e com o domínio híbrido exposto, IV molécula estendida, ativada por GPCR com o sítio de ligação em estado de alta afinidade e o domínio híbrido escondido, V molécula estendida com sítio de ligação em estado de baixa afinidade e domínio híbrido escondido e VI molécula estendida com sítio de ligação em estado de alta afinidade, ocupado pelo ligante e o domínio híbrido exposto (seta) (CHIGAEV; SKLAR, 2012).

Defeitos específicos na regulação das integrinas permite uma melhor compreensão de sua função nos leucócitos. Assim, pacientes que possuem deficiência da adesão leucocitária (LAD)-uma imunodeficiência rara- apresentam infecções bacterianas recorrentes, má cicatrização, hemorragias, dentre outras alterações. Na LAD tipo I ocorre a deficiência da expressão ou função da cadeia beta 2 (CD18), na LAD tipo II ocorre um defeito nos ligantes das selectinas devido à falta de uma enzima necessária a fucolização de carboidratos ligantes

das selectinas, e na LAD tipo III ocorre uma mutação no gene da proteína KINDLIN3, uma proteína que interage com a porção C-terminal da integrina e é responsável por estabilizar a conformação ativa, que impede a ativação das integrinas (WANG; LIM; RUDD, 2010).

Em leucócitos circulantes, pouco se sabe que tipo de informação a nível celular é gerada pelo contato da célula com a matriz extracelular após os leucócitos se estabelecerem nos sítios de lesão. Além disso, como esta informação é traduzida em cascatas bioquímicas intracelulares e como estas desencadeiam uma resposta celular ainda é pouco compreendida (CRETEL et al., 2008; CRETEL et al., 2010).

2.4.3 Moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas

Algumas moléculas de adesão pertencem à superfamília das imunoglobulinas, uma vez que têm a sua porção extracelular dos domínios semelhantes às imunoglobulinas. A família ICAM inclui cinco membros, possuem uma homologia de 30 a 50%, são contra receptores de diferentes integrinas (ligações heterotípicas) ou podem interagir entre si (ligações homotípicas). ICAM-1 e ICAM-2 são moléculas expressas pelas células endoteliais e leucócitos. ICAM-1 e ICAM-2 são contra receptores de integrinas de LFA-1 e MAC-1 e participam na adesão firme dos leucócitos ao endotélio. LFA-1 liga-se ICAM-1 e ICAM-2 enquanto que MAC-1 liga-se apenas a ICAM-1 (LEHMANN et al., 2003).

ICAM-2 é expressa de forma constitutiva sobre as células endoteliais, contudo, TNF-alfa e IL-1 podem diminuir a expressão (MCLAUGHLIN et al., 1998). ICAM-1 é expressa constitutivamente tanto por células endoteliais quanto por leucócitos e pode ser induzida por TNF-alfa e IL-1. Nos tecidos inflamados a expressão de ICAM-1 está aumentada, principalmente, sobre influência do NFk-B (MEHL et al., 2001). As diferenças observadas na expressão de ICAM-1 e ICAM-2 sugerem que estas moléculas têm funções redundantes na recirculação de linfócitos através de gânglios linfáticos, mas a ICAM-1 é a única no apoio à migração para sítios inflamados (LEHMANN et al., 2003).

VCAM-1 é expressa pelo endotélio ativado, sua cinética é bastante lenta nas primeiras 12 horas após a ativação, e é mantida durante 48 horas na superfície da célula. VCAM-1 se liga à integrina VLA-4 de leucócitos ($\alpha 4\beta 1$) e esta participa na rolagem. Nesta fase, a integrina está numa conformação de baixa afinidade, e na fase de adesão firme integrina apresenta-se em conformação de alta afinidade (ELICES et al., 1990; CHULUYAN; ISSEKUTZ, 1993; ALON et al., 1995)

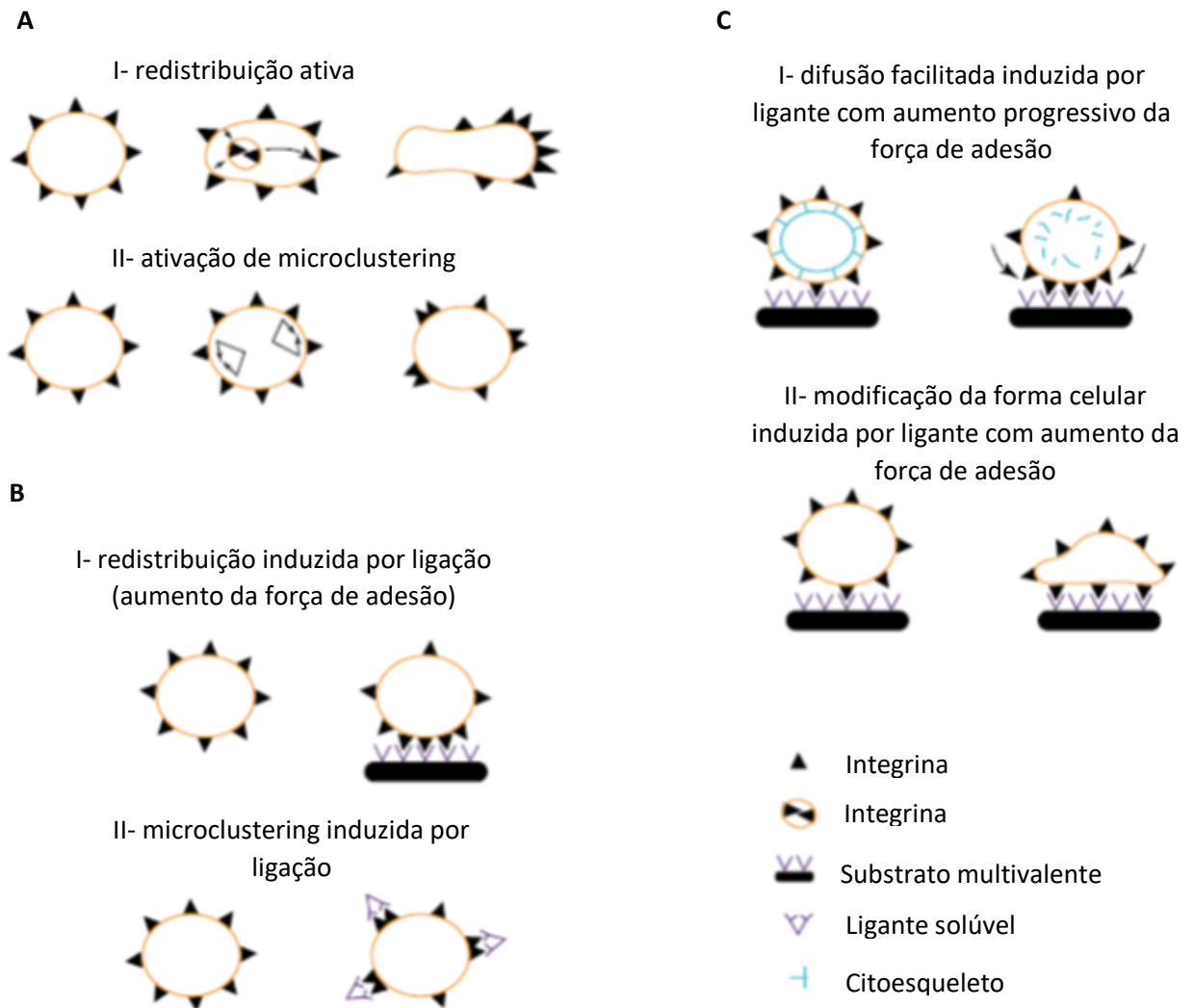


Figura 5. Formas de reorganização das integrinas na superfície celular associada com valência e modificações do citoesqueleto e forma celulares durante a adesão: (A) reorganização independente de ligante, (B) reorganização dependente de ligante e (C) aumento da força de adesão promove efeitos regulatórios no citoesqueleto e forma da célula. (CARMAN; SPRINGER, 2003).

2.4.4 Quimiocinas

As quimiocinas são proteínas altamente básicas de 70-125 aminoácidos com massas moleculares que variam de 6 a 14 kDa (94). A maioria é secretada, embora algumas, como a fractalina, sejam expressas na superfície celular (IMAI et al., 1997). A maioria das quimiocinas contem pelo menos quatro cisteínas que formam duas ligações dissulfeto, uma entre a primeira e a terceira e uma entre a segunda e a quarta cisteína. A estrutura resultante contém três dobras β -pregueadas com curtos loops em uma formação de chave grega (Greek key). As quimiocinas são subdivididas em grupos CC, CXC ou CX3C com base no número de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas. A linfotactina é a única quimiocina

conhecida que contém apenas duas cisteínas (quimiocinas C), correspondentes à segunda e quarta cisteínas de outras classes. As duas regiões de cada quimiocina que interagem com o receptor são um ciclo exposto no esqueleto entre a segunda e a terceira cisteína, que se acredita serem necessárias para ligação de quimiocinas de baixa afinidade aos seus receptores, e a porção NH₂-terminal antes da primeira cisteína, que representa a região de maior variabilidade. O local de ligação NH₂-terminal é necessário para a sinalização do receptor após ligação, o comprimento e a composição de aminoácidos da porção NH₂-terminal determinam se uma quimiocina se ligará com elevada afinidade a um receptor e se a ligação tem efeitos agonísticos ou antagonistas (OLSON; LEY, 2002; CHARO; RANSOHOFF, 2006; PROUDFOOT; UGUCCIONI, 2016).

As quimiocinas CXC são ainda classificadas de acordo com a presença do motivo tripeptídeo ácido glutâmico-leucina-arginina (ELR) na região NH₂-terminal. As quimiocinas ELR⁺ são específicas para as células mielóides enquanto as ELQ-quimiocinas atraem uma variedade de leucócitos (OLSON; LEY, 2002). Receptores de quimiocinas são moléculas com sete voltas pela membrana plasmática e estão ligadas na porção citoplasmática com proteínas G, tipicamente 340-370 aminoácidos de comprimento com 25-80% de identidade de aminoácidos e características comuns incluindo um terminal NH₂ ácido, um 10-amino conservado e na sequência um segundo ciclo intracelular ácido, e uma cisteína em cada um dos quatro domínios extracelulares (MURPHY et al., 2000).

O efeito mais peculiar das quimiocinas envolve a quimiotaxia da célula, que expressa o receptor, em direção a áreas com concentrações mais elevadas da quimiocina. O receptor para quimiocinas com domínios transmembranares como a fractalina pode também induzir adesão e migração de uma maneira análoga às moléculas de adesão (IMAI et al., 1997). Contudo, a maioria das quimiocinas são segregadas e para provocar a quimiotaxia *in vivo*, estas proteínas altamente básicas devem ser imobilizadas em superfícies de células ou de matriz extracelular interagindo com glicosaminoglicanos carregados negativamente. As quimiocinas específicas ligam diferentes tipos de glicosaminoglicanos com afinidades divergentes. O tipo de glicosaminoglicano pode variar de acordo com o tipo celular, local e estado inflamatório. Por conseguinte, a imobilização seletiva num dado local pode ser um passo regulador que determina a função da quimiocina em certos tecidos ou estados inflamatórios. Além disso, a oligomerização da quimiocina ocorre em glicosaminoglicanos e pode proporcionar um mecanismo para a formação de gradiente. As quimiocinas próximas dos seus locais de produção podem formar oligômeros de ordem superior em glicosaminoglicanos endoteliais ou de matriz extracelular criando e preservando

concentrações mais elevadas da quimiocina perto do estímulo inflamatório ou do local de iniciação do tráfego leucocitário, estabelecendo um gradiente de concentração da quimiocina em direção ao sítio de inflamação (OLSON; LEY, 2002).

Outros efeitos são mais específicos para certas quimiocinas e incluem alterações de forma celular, extensão de lamelipódios através da reestruturação do citoesqueleto e liberação de radicais de oxigênio, histamina e proteínas citotóxicas de neutrófilos, basófilos e eosinófilos, respectivamente (BAGGIOLINI, 1998; SALLUSTO; BAGGIOLINI, 2008; GUAZZONE et al., 2012). Certas quimiocinas podem desencadear a adesão firme dependente de integrina de células em rolamento, um passo importante no tráfego de leucócitos para locais de inflamação. A IL-8 e a proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) podem desencadear adesão firme mediada por integrina $\beta 2$ de monócitos (GERHARDT; LEY, 2015) nas células que expressam a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) em câmaras de fluxo. KC, uma quimiocina de camundongos relacionada com IL-8, mas não com JE, MCP-1 de rato, desencadeia a retenção de monócitos via integrina $\alpha 4\beta 1$ em artérias ateroscleróticas (HUO et al., 2001).

2.5. Procedimentos para avaliação da migração e adesão celular

Os estudos iniciais da migração celular utilizavam células marcadas com corantes fluorescentes ou com isótopos radioativos, os quais permitiam discriminar o trajeto e a localização das células (LAPPIN et al., 1999). De forma a auxiliar a compreensão dos mecanismos de migração e adesão celular vários modelos, *in vitro*, foram estabelecidos. A adição de linfócitos sobre secções de linfonodos permitiu estabelecer as HEV como os sítios de recirculação de linfócitos entre a corrente sanguínea e os linfonodos. (STAMPER; WOODRUFF, 1976; 1977). Além disso, a adição de leucócitos sobre componentes purificados da matriz conjuntiva extracelular, como substrato, ou câmaras com monocamadas de células endoteliais permitem a avaliação dos sítios e cinética de adesão das moléculas envolvidas no processo de adesão e migração celular (PRYCE; SANTOS; MALE, 1994).

Atualmente, métodos avançados de microscopia intravital e câmaras de fluxo laminar tem permitido uma avaliação mais precisa das moléculas envolvidas neste processo (MARSHALL et al., 2003; ROBERT et al., 2007; PETERS et al., 2008; PIERRES; BENOLIEL; BONGRAND, 2008). Além disso, técnicas de cultura de células 3D são agora a forma preferida de se utilizar linhagens de células tumorais para preencher a lacuna entre técnicas "absolutamente *in vitro*" e técnicas "verdadeiramente *in vivo*" na compreensão da biologia tumoral (RAVI; RAMESH; PATTABHI, 2016).

No presente estudo, utilizamos técnicas de adesão em câmaras de fluxo, Traswell e em placas recobertas com componentes da matriz extracelular a fim de compreender os estágios iniciais e tórdio da adesão de células infectadas por *Leishmania amazonensis*.

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

As diferentes formas clínicas da Leishmaniose, em geral, estão associadas com gêneros específicos do parasito, que após a inoculação na pele podem disseminar para os órgãos internos do hospedeiro. Os fagócitos são as principais células infectadas pelo parasito e desempenham um importante papel na disseminação da infecção, resposta imune celular e imune adaptativa do hospedeiro ao parasito (BARRAL et al., 1991; PACE, 2014). Neste contexto, as moléculas de adesão celular desempenham um papel fundamental na migração e endereçamento dos leucócitos. Dentre as famílias de moléculas de adesão, as integrinas representam moléculas chave na adesão firme dos leucócitos e estão envolvidas em cascatas de sinalização celular, em eventos como diferenciação celular e sinapses imunológicas (SIMS; DUSTIN, 2002; XIE; TATO; DAVIS, 2013).

Estudos prévios, demonstraram que a infecção de monócitos humanos, macrófagos de linhagem J774 e macrófagos peritoneais por diferentes espécies de *Leishmania* diminui a adesão ao tecido conjuntivo. A diminuição da adesão depende da carga parasitária e do estado de ativação celular, indicando um possível comprometimento do estado funcional das moléculas de integrinas. Nestes estudos, a análise por citometria de fluxo revelou que não houve diminuição significativa da expressão das moléculas de adesão expressas por fagócitos infectados por *Leishmania* de qualquer espécie (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Entretanto, a expressão das integrinas não significa necessariamente que estas moléculas estejam operando na adesão celular, já que para que ocorra a ativação da molécula são necessários sinais externos ou internos que promovam tanto a alteração da afinidade, da avidéz e a mobilização destas moléculas na superfície celular, afim de formar aglomerados moleculares que aumentam a força de adesão aos componentes da matriz extracelular e reorganização do citoesqueleto da célula (HYNES, 2002; HERTER; ZARBOCK, 2013; GINSBERG, 2014; DE MENEZES et al., 2016).

A hipótese do presente estudo é de que a infecção por *Leishmania amazonensis* modula a afinidade das moléculas de $\beta 1$ integrinas em monócitos, mantendo-as em estado de baixa afinidade. Portanto, a compreensão do estado funcional das integrinas expressas por fagócitos infectados por *L. amazonensis* pode contribuir na compreensão dos mecanismos de recrutamento, migração, permanência nos sítios de infecção e formação de sinapses imunológicas entre leucócitos infectados por *L. amazonensis*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar o papel das integrinas $\beta 1$ nas fases iniciais e tardia da adesão de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*, aos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar em câmara de fluxo laminar as fases iniciais da adesão de monócitos infectados por *L. amazonensis*;
- Examinar o espalhamento citoplasmático de monócitos infectados por *L. amazonensis* sobre fibronectina;
- Determinar se a infecção ou o contato com *L. amazonensis* e seus produtos promovem a redução da adesão leucocitária aos componentes da matriz extracelular (após a coincubação dessas células com *Leishmania*);
- Quantificar a cinética de espalhamento celular de monócitos não infectados e infectados;
- Determinar se ocorre alteração da expressão de epítomos de alta afinidade de moléculas de adesão em monócitos infectados;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Declaração de ética

O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O único tipo de amostra humana utilizado no estudo foi buffy-coats descartados de doadores desconhecidos, para obtenção de monócitos purificados. Todos os procedimentos foram desenvolvidos em conformidade com a Declaração de Helsinque de 1964 e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA (Decisão nº 262/2012).

5.2 Monócitos humanos

Os monócitos do sangue periférico foram isolados a partir do sangue coletado de voluntários saudáveis ou de Buffy-coats fornecidos pelo Etablissement Français du Sang (EFS) ou pelo Hemocentro da Bahia (HEMOBA). O sangue foi diluído 1:2 em RPMI, e 35 mL desta solução foi adicionada sob 12 mL Ficcoll-Hypaque (Sigma) em tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugado a 1600 RPM por 30 minutos com o freio da centrífuga desligado e na temperatura de 20°C. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) obtidas neste gradiente foram lavados em HBSS (Sigma) e ressuspensas na concentração de 10^8 células em 2,5 mL de RPMI contendo 70% de Percoll (Sigma), sobre esta solução foram adicionados 2,5 mL de RPMI contendo 50%, 40% e 25% (3 mL) de Percoll e centrifugado a 2000 RPM por 15 minutos à temperatura ambiente, para separação dos monócitos. Ao final da centrifugação, o anel de monócitos foi coletado, lavado duas vezes em HBSS e ressuspenso em RPMI completo (contendo 10% de SBF, 2 mM de glutamina, 2,2 g/L de bicarbonato) em uma concentração de 2×10^6 células/mL. Foram então, incubados em tubos não aderentes a 37° C e 5% CO₂, por 24 h. A pureza da população de monócitos obtida estava tipicamente acima de 87% (medida por citometria de fluxo, utilizando granulocidade como parâmetro). Alternativamente, os monócitos foram separados por seleção negativa utilizando kit de *beads* magnéticas (Miltenyi Biotec, San Diego, CA, EUA), este kit contém uma mistura de anticorpos monoclonais conjugados com biotina contra antígenos que não são expressos em monócitos humanos e permite a obtenção simultânea de monócitos clássicos (CD14⁺⁺ CD16⁻), não clássicos (CD14⁺ CD16⁺⁺) e intermediários (CD14⁺⁺ CD16⁺).

5.3 Parasitos e infecções de fagócitos

Cepas de *Leishmania amazonensis* (cepa de parasitos MHOM / BR88 / BA-125 ou LV79) foram cultivadas em meio Schneider insect (Sigma-Aldrich, EUA), contendo 10% soro

fetal de bovino (Gibco, EUA), 50 mg/mL de gentamicina, a 24° C até atingir a fase estacionária de crescimento. Os parasitos foram lavados 3 vezes em HBSS (Sigma-Aldrich, EUA) e ressuspensos na concentração de 2×10^7 parasitos por mL de RPMI completo para utilização nos ensaios. Os monócitos foram ressuspensos em 2×10^6 / mL em 2 mL de meio RPMI completo somente, meio completo contendo *L. amazonensis* ou com em meio completo contendo partículas de látex de 3 μ m de diâmetro (Sigma-Aldrich, EUA), na proporção de dez parasitos ou partículas por monócitos. As suspensões de células foram cultivadas durante 16-18 h a 37 ° C com 5% de CO₂ em tubos de polipropileno não-aderentes, lavadas com HBSS (Sigma-Aldrich, EUA) e utilizados nos ensaios de adesão e citometria de fluxo. As taxas de infecção foram estimadas usando preparações de Cytospin coradas com Giemsa. Nos resultados apresentados, foram utilizados monócitos infectados que apresentaram taxas de infecção entre 75 e 90% do total de células incubadas com o parasito.

5.4 Preparação do substrato de adesão

A fim de avaliar a adesão a componentes da matriz extracelular foram utilizadas placas estéreis de 96 poços (PINHEIRO et al., 2006), lamínulas de vidro ou lamínulas de Aclar® (EMS, EUA), ambas com 12 mm de diâmetro. Os poços das placas de 96 poços ou de placas de 24 poços contendo as lamínulas foram sensibilizadas com 60 μ l de colágeno (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 300 μ g/mL, incubadas a temperatura ambiente em uma câmara plástica hermeticamente lacrada e úmida, onde foi adicionado 2 mL de hidróxido amônia (Quimis, BRA). Após 8 horas de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com HBSS (Sigma-Aldrich, EUA) e nos poços previamente determinados foi colocado 100 μ l de fibronectina (Sigma-Aldrich, EUA) na concentração de 10 μ g/mL. Após incubar a placa durante a noite a 4 °C, foi realizada a lavagem 4 vezes da placa e então adicionada 200 μ l de HBSS (Sigma-Aldrich, EUA) com 1% de BSA (Sigma-Aldrich, EUA) e após 45 minutos de incubação a temperatura ambiente, a placa foi usada nos ensaios de adesão.

5.5 Avaliação da adesão de monócitos em câmara de fluxo laminar

Uma câmara de fluxo laminar é uma cavidade, geralmente, retangular na qual um fluido escoar em um dado fluxo. A câmara pode ser descrita como um paralelepípedo retangular de altura H, largura l e comprimento L. Neste modelo, quando o fluxo é suficientemente baixo, o fluxo do fluido é laminar e paralelo ao eixo da câmara. A velocidade v é nula no ponto de contato com a parede da câmara. A uma curta distância a partir da parede, isto é, a distâncias relevantes para a câmara de fluxo laminar, podemos considerar que

um gradiente de velocidade linear (denominado G) se estabelece a partir da parede, com $v = Gz$, onde Z é a distância da partícula em relação a parede de fundo (Figura 6).

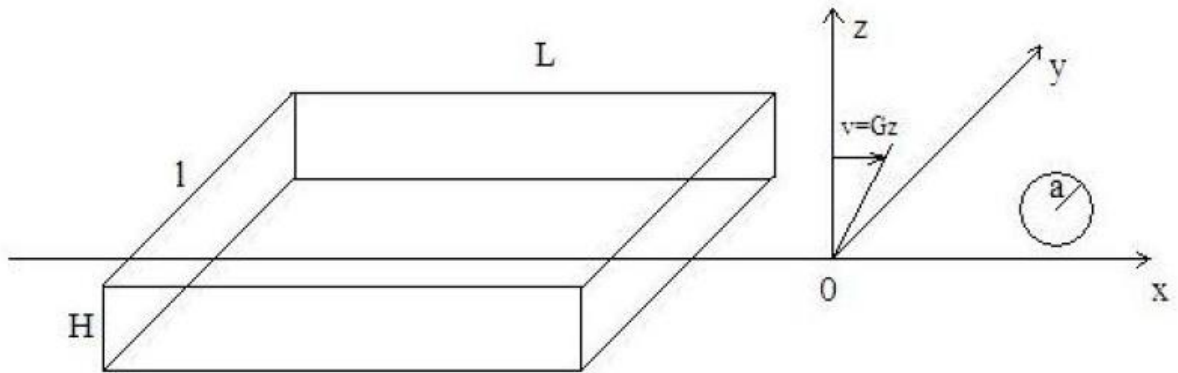


Figura 6. Representação esquemática de uma câmara de fluxo laminar, H altura da câmara, l é a largura e L o comprimento (PIERRES et al., 1994).

O movimento de uma célula submetida a um fluxo laminar pode ser descrito, aproximadamente, por meio de um modelo de microesferas levando-se em conta o seu raio. O movimento de uma microesfera em um fluxo laminar perto de uma parede é complexo, quando a microesfera se afasta da parede (uma distância da ordem de vários raios), a velocidade da esfera é igual à velocidade do fluxo no centro da esfera. Quando a microesfera está perto da parede seu movimento é retardado. Quando o raio da microesfera está ligado à superfície o fluxo exerce uma força de tração hidrodinâmica, que tende a separar a microesfera da parede. Esta força F é dado pela formula: $F = 32 \mu a^2 G$, onde μ é a viscosidade do fluido, a o raio da célula e G a taxa de cisalhamento (PIERRES et al., 1994).

Como uma regra geral, a velocidade de uma esfera que flui livremente perto do substrato da câmara (em micra/s) é comparável à taxa de cisalhamento da parede L (em s^{-1}) vezes o raio da esfera, esta velocidade é chamada de velocidade hidrodinâmica. Assim, uma taxa de cisalhamento da parede de s^{-1} é suficiente para permitir a detecção de uma ligação, de duração de várias dezenas de milissegundos, apesar do movimento browniano poder reduzir o desempenho do sistema (PIERRES; BENOLIEL; BONGRAND, 2008).

Um efeito de alavanca aumenta significativamente a força F exercida pelo fluxo sobre as ligações das microesferas retidas sobre a superfície de rolagem. Assim é possível variar a

força exercida sobre as ligações entre a microesfera e a superfície mudando a força hidrodinâmica por variação da velocidade do fluxo, diâmetro das microesferas usadas ou da viscosidade do fluxo. A variação da velocidade do fluxo é a maneira mais fácil de controlar a força hidrodinâmica exercida sobre as partículas em movimento numa câmara de fluxo laminar e desta forma poder avaliar a frequência com que se formam ligações entre as microesferas e o substrato (ROBERT et al., 2013).

No presente trabalho, os estudos em câmara de fluxo laminar foram utilizados a fim de determinar se os monócitos infectados sofrem alteração da adesão nas fases iniciais deste processo, ou seja, no momento de rolagem.

Monócitos humanos não infectados ou infectados com *L. amazonensis*, ou tratados com 10 mM de $MnCl_2$, na concentração de 2×10^5 células em 1 mL de PBS, foram marcados com calceína (Thermo, EUA), submetidos a um fluxo laminar em uma câmara de fluxo com um canal (largura 2 milímetros e altura de 0,1 mM) inserido em um poço de uma placa para cultura celular de 48 poços (Figuras 7 e 8).

A tensão de cisalhamento neste sistema foi de aproximadamente 10 s^{-1} ; Assim, as células que aderem à superfície foram submetidos a uma força viscosa na ordem de 7 pN (PIERRES et al., 1994). As imagens foram adquiridas com uma câmera de vídeo (HyperHAD; Sony França, Clichy, França) conectada a um microscópio invertido de fluorescência Olympus IX 50, na objetiva de 10x e NA 0,40, todo o sistema foi mantido no interior de uma câmara fechada com temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ eletronicamente monitorada. O tamanho do pixel foi de $1 \times 1 \text{ } \mu\text{m}^2$. Sequências, tipicamente de 2 min de duração, foram digitalizadas por uma placa Win-TV digitalizador (Hauppauge, França) e os arquivos dos filmes foram comprimidos com o software DivX para posterior análise. Foi utilizada uma macro escrita no software ImageJ (1.48v; NIH, EUA) capaz de reproduzir e decompor os arquivos de vídeo em sequências de frames numerados. As células no filme foram detectadas por contraste luminoso e pela área de circularidade, parâmetros ajustados e visualizados previamente nas imagens. O software calculou a posição do centro de cada célula, as coordenadas de cada célula nas imagens juntamente com a respectiva área e agrupou em planilhas no formato Excel (Tabela 1).

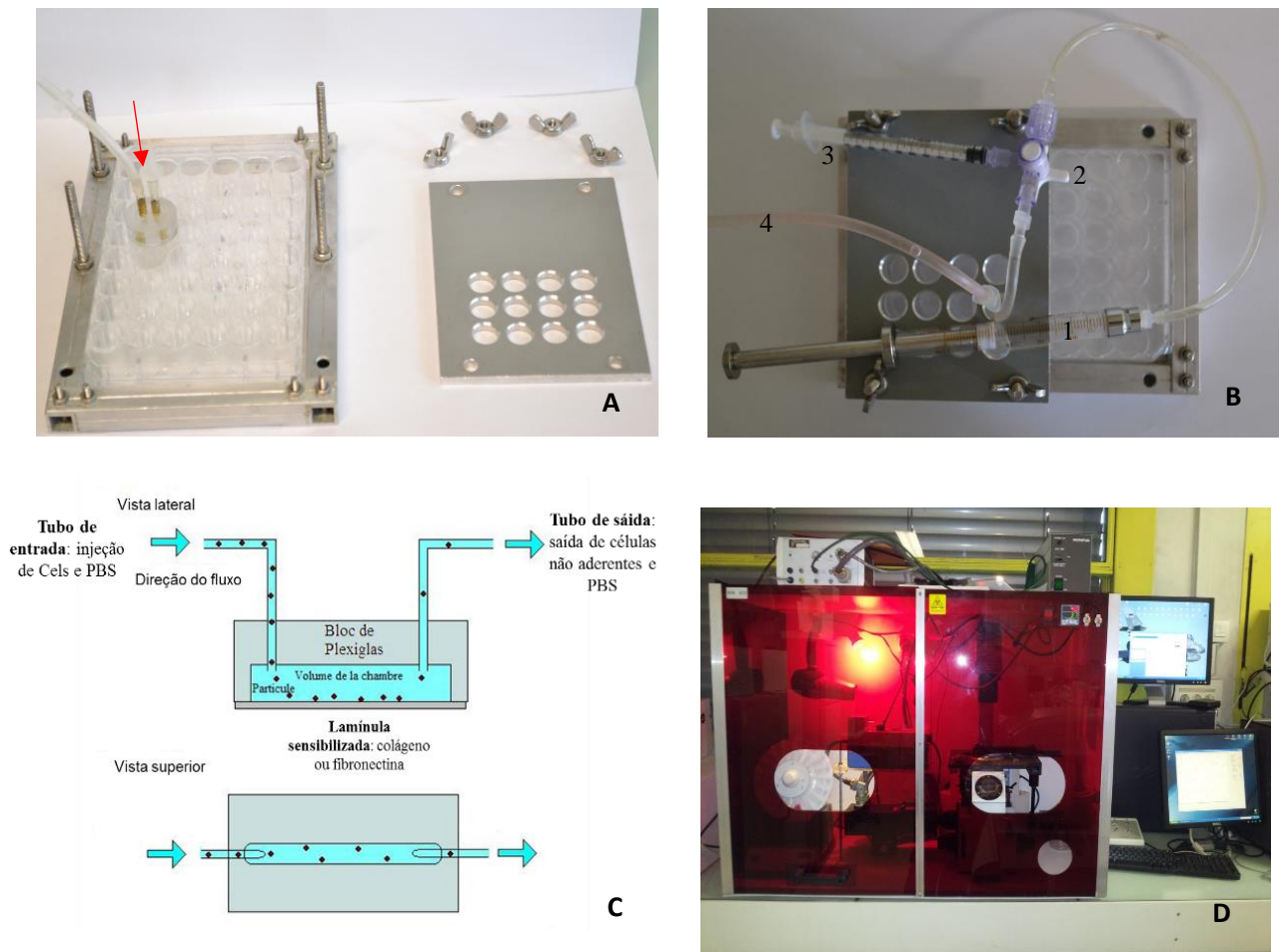


Figura 7. Sistema de câmara de fluxo laminar. (A) placa de 48 poços contendo uma lamínula previamente sensibilizada com colágeno e/ou fibronectina. A placa está posicionada sobre o suporte de alumínio para fixação do bloco de *plexiglass* (seta vermelha), que contém a canaleta da câmara de fluxo. **(B)** câmara de fluxo montada (1- seringa com PBS para manutenção do fluxo, 2- registro de seleção entre a seringa com PBS e a 3-seringa contendo as células a serem inoculadas e 4- tubo de saída do PBS e células não aderentes. **(C)** visão esquemática da câmara de fluxo e **(D)** todo o sistema montado sob um microscópio invertido conectado a bomba de seringa e pronto para captura dos filmes.

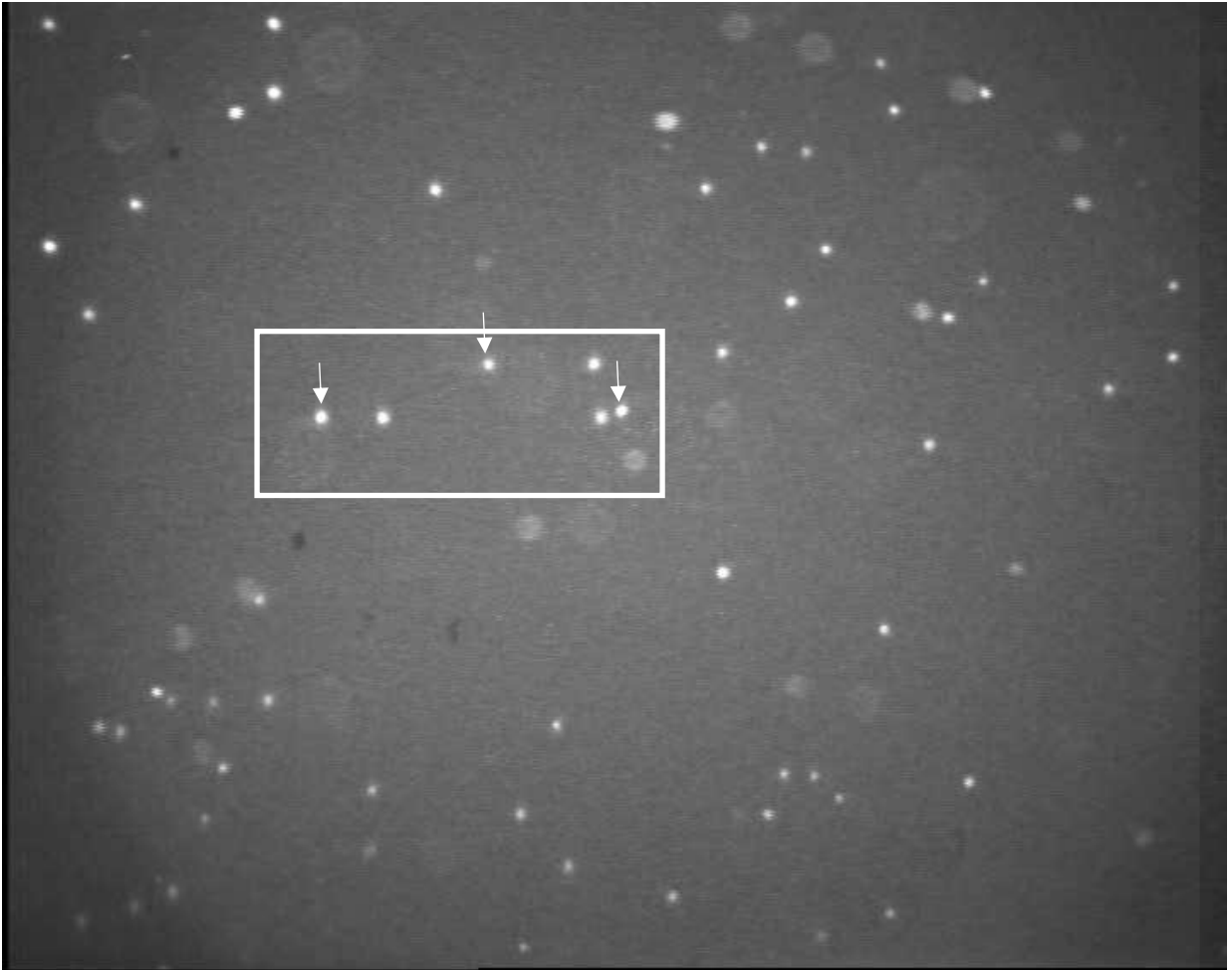


Figura 8. Imagem capturada de um filme obtido do ensaio com câmara de fluxo laminar de monócitos humanos se deslocando da direita para esquerda sobre superfície sensibilizada com fibronectina [as células rolando sobre substrato apresentam uma luminosidade mais intensa (setas)].

Tabela 1. Dados da posição dos monócitos em cada quadro do filme registrado nos ensaios de rolamento sobre fibronectina.

Núm. de detecção	Área	X	Y	Quadro (Slice)
1	17	4.737.630	0.8626	1
2	17	2.851.969	228.035	1
3	50	6.710.217	287.641	1
4	51	2.839.933	344.682	1
5	28	2.510.567	657.987	1
6	32	6.133.459	724.116	1
7	26	1.051.611	839.663	1
8	31	4.414.879	1.010.958	1
9	59	6.535.169	1.250.992	1
10	27	2.890.201	1.245.617	1
11	20	5.849.595	1.290.106	1
12	89	6.064.505	1.458.263	1
13	29	1.890.579	1.607.275	1
14	79	2.814.008	1.804.308	1

A tabela representa parte dos dados obtidos após análise de um filme com o software Image J, onde X e Y representam as coordenadas de posição das células detectadas em cada quadro. O número total de quadros de um filme típico é de cerca de 3000 quadros.

Subsequentemente, foi utilizado um programa denominado TrajFSerie (escrito em Java) capaz de converter os arquivos das planilhas geradas pelo ImageJ em arquivos de planilhas contendo as trajetórias de cada célula durante o tempo de filmagem (Tabela 2).

Os arquivos das trajetórias foram então processados com o software Igor (Wavemetrics, EUA) para criar um histograma de velocidade das células (Figura 9), reconstituir graficamente a trajetória de cada célula (Figura 10), para análise visual, e por fim detectar e medir a duração das paradas de cada célula durante o rolamento sobre a superfície sensibilizada com fibronectina ou colágeno. A quantidade de células aderidas por 200 ms ou mais e a quantidade de células aderidas de forma permanentes, ou seja, células aderidas durante 2 minutos foram determinados.

Tabela 2. Dados de reconstituição da trajetória de um monócito durante o rolamento sobre fibronectina.

Número da imagem	X	Y	Área
1325	349.6443	8.2837	52.0
1326	348.4415	8.3899	50.0
1327	347.2605	8.5047	50.0
1328	345.7506	8.4825	51.0
1329	344.4115	8.5748	52.0
1330	343.3399	8.6456	54.0
1331	341.9821	8.7419	53.0
1332	340.2762	9.0145	55.0
1333	339.0206	9.2255	52.0
1334	337.8895	9.3726	53.0
1335	336.3504	9.46	52.0
1336	334.7155	9.4577	53.0
1337	333.4234	9.4941	51.0

Parte de uma tabela criada pelo software TrajFSerie, representando a trajetória de uma célula, pode-se observar o movimento da célula em função diminuição progressiva dos valores do eixo X enquanto a área (em pixels), é relativamente constante.

5.6 Reação de imunofluorescência para a detecção de células infectadas

As lamínulas de Aclar contendo os monócitos não infectados e infectados foram fixadas com formaldeído, lavadas com HBSS, incubadas com HBSS contendo albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA) (1%) e Tween-20 (Ludwig Biotec, Brasil) (0,05%) (HBSS-BSA-Tween) durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguido pela adição de anticorpo policlonal de coelho anti-*Leishmania* (FROES et al., 2004) na diluição de 1:500 em HBSS-BSA-Tween, durante 2 h à temperatura ambiente. As células foram lavadas e incubadas com anticorpo anti IgG de coelho Alexa 488 (Excitação/Emissão: 495/518 nm), cor verde, (Invitrogen, EUA) faloidina, na cor vermelha (Excitação/Emissão: 591/608 nm) para marcar actina, na diluição de 1:200 em HBSS-BSA-Tween à temperatura ambiente durante 1 h. As lamínulas de Aclar foram montadas numa lâmina de vidro usando meios de montagem Vectashield-DAPI (Vector, EUA), que cora o núcleo das células na cor azul. Imagens de monócitos não infectados ou infectados com *Leishmania* foram registradas utilizando microscópio de fluorescência (Olympus BX51, Japan) para análise correlativa. As lamínulas de Aclar foram cuidadosamente removidas das lâminas, fixadas em glutaraldeído (Sigma-Aldrich, EUA) (2%) e processadas para microscopia eletrônica de varredura (microscopia correlativa).

5.7 Ensaios de adesão e experimentos de bloqueio de VLA-4

Após a preparação das placas de 96 poços ou de 24 poços contendo lamínulas de 12mm de diâmetro de vidro ou de Aclar, previamente marcadas com grades de 1mm, a solução de bloqueio foi descartada e adicionado um total de 8×10^4 monócitos não infectados ou infectados com *L. amazonensis* em 200 μ l de meio em cada poço da placa de 96 poços. Ao final da incubação, os poços foram lavados quatro vezes com HBSS morno e fixadas com 1% de glutaraldeído em HBSS. Em alguns experimentos, Ca^{++} e Mg^{++} no meio foram quelados incubando as células com 1 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, EUA) durante 5 minutos, seguida de lavagem com HBSS sem Ca^{++} e Mg^{++} , e ressuspensão das células em HBSS contendo 1% de BSA e 0,5 mM MnCl_2 (Sigma-Aldrich, EUA). Nos ensaios de bloqueio da molécula VLA4 as células foram incubadas com o anticorpo anti-CD49d (clone 9F10; BD Pharmingen, EUA) na concentração de 20 μ g/ml por 30 minutos em gelo antes de serem adicionados aos poços (PINHEIRO et al., 2006). As células do grupo controle foram incubadas com o isotipo controle (imunoglobulina de rato IgG1, clone R3-34; BD Pharmingen, EUA) na concentração de 20 μ g/ml por 30 minutos em gelo antes de serem adicionados aos poços. A placa foi então incubada por 1 hora em estufa a 37 °C e 5% de atmosfera de CO_2 , lavada 4 vezes com HBSS para a remoção das células não aderentes, fixada com 1% de glutaraldeído diluído em HBSS a 37 °C. No dia seguinte, a placa foi lavada com água, corada com hematoxilina (Merck).

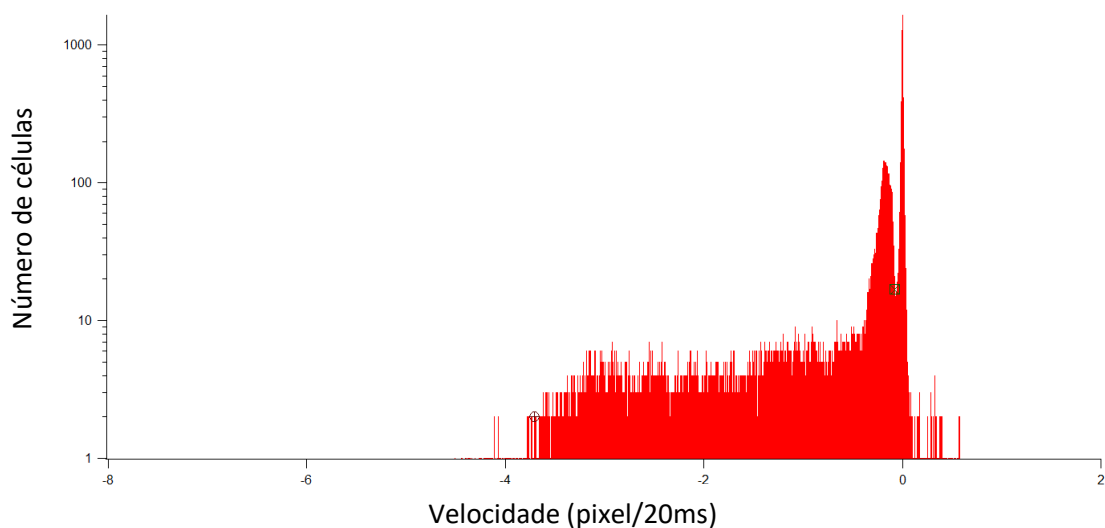


Figura 9. Histograma de velocidade representativo de um ensaio em de câmara de fluxo laminar. As velocidades são negativas porque que as células geralmente se movem da direita para a esquerda no filme, o valor das posições X é decrescente

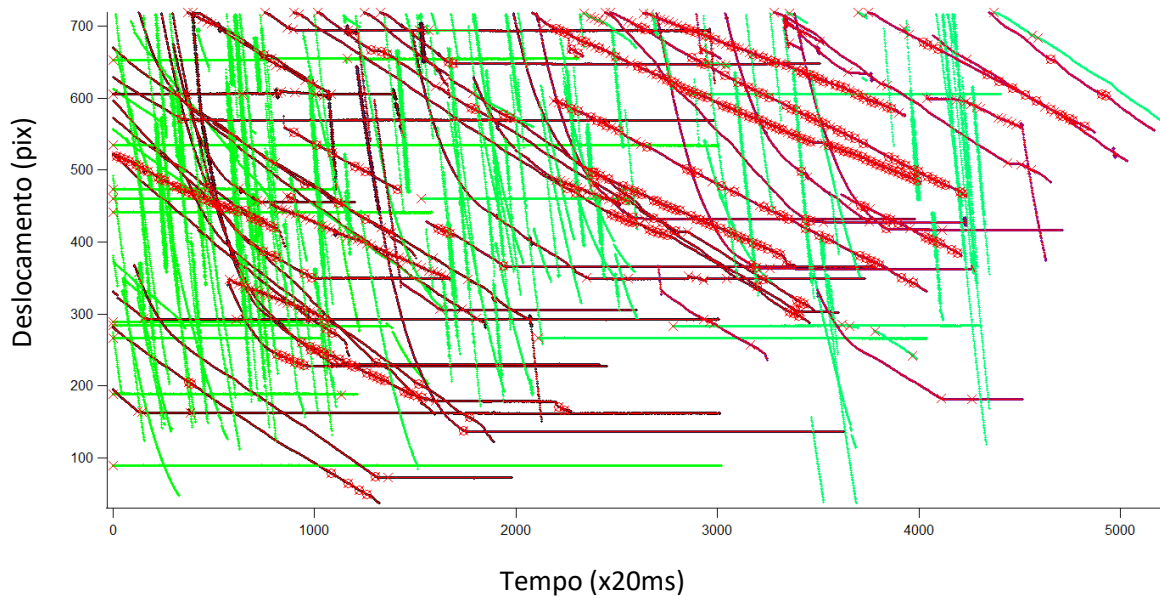


Figura 10. Trajetórias das células reconstituída pelo software Igor. A posição X é mostrado na ordenada, o tempo no eixo das abcissas. As trajetórias representadas em verde são de células que não sofreram paradas (trajetórias perpendiculares ao eixo X) ou de células aderidas antes do início do registro do filme (trajetórias paralelas ao eixo x). As trajetórias em vermelho representam as células que apresentam uma ou mais paradas na fase de rolamento durante o contato com o substrato, após o início do registro do filme.

Para avaliar cada tratamento, foram utilizadas seis réplicas por grupo analisado e cada um dos poços foi fotografado em três diferentes campos aleatórios não sobrepostos na objetiva de 10X/NA 0,4 do microscópio invertido Olympus CX21. As fotos obtidas foram utilizadas para a contagem das células aderidas através do software Image Pro (Media Cybernetics, USA). Os resultados obtidos foram expressos como as médias das contagens obtidas em cada tratamento. Nos experimentos com lamínulas de vidro ou Aclar, foram adicionadas um total de 5×10^5 células em 500 μ l de meio em cada poço. No final da incubação, o meio nos poços contendo as lamínulas de vidro foi cuidadosamente substituído com glutaraldeído a 2,5% e 2% de formaldeído, e foram processadas para microscopia eletrônica de varredura, enquanto que as lamínulas de Aclar foram fixadas com 2% de formaldeído e incubadas durante a noite a 4 °C e processadas para a identificação de *L.*

amazonensis por imunofluorescência e em seguida processada para microscopia eletrônica de varredura.

5.8 Microscopia eletrônica de varredura

As lamínulas de vidro ou de Aclar contendo monócitos ligados e fixos foram lavadas três vezes com 0,1 M de cacodilato de sódio (Aldrich-Sigma, EUA) (pH 7,4) durante 1 h, desidratadas em etanol e secadas no aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD030, Áustria) com CO₂. As lamínulas foram montadas em bases de alumínio, revestida por borrifamento de ouro (desck IV; Denton Vacuum, EUA), e examinadas usando um microscópio eletrônico de varredura (JSM6394LV; JEOL, Japão) operado a 12 kV. Imagens de campos selecionados aleatoriamente foram colhidos, e a área do citoplasma de células foi estimado usando software ImageJ (1.48v; NIH, EUA). As medições foram feitas sem o conhecimento sobre dos grupos de cada amostra.

5.9 Microscopia de reflexão e interferência (IRM)

A fim de estudar a interação de células vivas com o substrato de adesão, alíquotas de 2 mL contendo 2×10^6 monócitos não infectados ou infectados com *Leishmania amazonensis* na proporção de 2 ou 10 promastigotas/monócitos foram incubadas em estufa durante 16-18 h a 37 °C com 5% de CO₂. As células foram então lavadas três vezes com meio completo por centrifugação a 1500 rpm/10 min. A concentração das células foi ajustada para $2,0 \times 10^5$ células/mL, e as células foram transferidas para a câmara de IRM para ser dispensada sobre lamínulas sensibilizadas com fibronectina, que foram previamente posicionadas no microscópio invertido (Zeiss Axiovert 135, Alemanha), equipado com câmara aquecida a 37 °C. As imagens da microscopia de reflexão e interferência foram capturadas com a objetiva antiflex (63x de ampliação, 1,25 NA). Para avaliar a cinética de espalhamento, uma sequência de imagens do mesmo campo foi adquirida a uma taxa de 1 quadro por segundo durante 15 minutos após a adição das células na câmara. Em seguida, a intervalos de 15 minutos, imagens adicionais de campos selecionados aleatoriamente foram adquiridas para análise de área celular utilizando o software Essaiw software (PIERRES et al., 2003).

5.10 Avaliação do efeito de fatores solúveis liberados por *L. amazonensis*

Para a avaliação do efeito dos produtos dos parasitos sobre os monócitos no processo de adesão celular, 2×10^6 monócitos por mL foram cultivados em câmara Transwell com 0,4 µm de tamanho de poro (Corning, EUA). As seguintes preparações estavam presentes na

câmara inferior: (1) meio sozinho; (2) 2×10^7 promastigotas de *Leishmania* por mL em meio RPMI completo; ou (3) 2×10^6 monócitos por mL mais 2×10^7 promastigotas por mL em meio RPMI completo. Foram utilizadas as células colhidas a partir da câmara do topo nos ensaios de adesão.

5.11 Citometria de fluxo

Monócitos não infectados ou infectados por *Leishmania* foram contados e ressuspensos na concentração de 10^6 células por mL em tampão FACS (PBS contendo 1% de albumina de soro bovino e 0,01% de azida de sódio), tratadas com 5% de soro de rato mais 5% de FBS durante 30 min em gelo para bloquear as ligações inespecíficas. As células foram incubadas com os seguintes anticorpos conjugados com fluoresceína: HUTS-4 (anticorpo monoclonal anti-beta 1 integrina, Milli-Mark, Reino Unido), mAb24 (anti-integrina beta 2, Hycult Biotec, EUA) ou com isotipo controle. As incubações das amostras com anticorpos foram realizadas a 4 °C durante 20 min, seguida de três lavagens com tampão FACS. Os anticorpos foram previamente titulados para determinação da concentração ideal de uso, sendo utilizado 10 µg/mL de HUTS-4 e a diluição de 1:100 do mAb24. As células foram analisadas num citômetro de fluxo FACSAria III utilizando o software diva (Becton-Dickinson, EUA) para a aquisição. Para análise dos dados utilizamos FlowJo (Tree Star Inc, Califórnia, EUA). Cinquenta mil eventos foram analisados por amostra.

5.12 Análises estatísticas

Os dados numéricos são apresentados em formato de gráficos e representam os valores absolutos, médias, medianas inferior e quartis superiores (entre parênteses), ou proporções conforme especificadas em cada figura. Para comparações dos valores absolutos entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparações envolvendo mais de dois grupos, o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para pares seleccionados de grupos foi utilizado de acordo com o desenho experimental. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Os dados foram analisados através de programa Prisma 4.0 para Windows, Software GraphPad (San Diego, Califórnia, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do rolamento de monócitos não infectados ou infectados com *L. amazonensis* sobre componentes da matriz extracelular

Inicialmente, foi definida a regulagem no vernier na face superior da bomba de seringa (em unidades arbitrárias), que regulam a velocidade de avanço do carro da bomba e, portanto, a velocidade do fluxo no interior da câmara. Assim, foram testadas 5, 10, 20 e 40 UA (Figura 11), sendo 5 UA a velocidade que obtivemos o maior número de células aderidas nos dois substratos, e as células aderiram 1,5 vezes mais ao colágeno que à fibronectina.

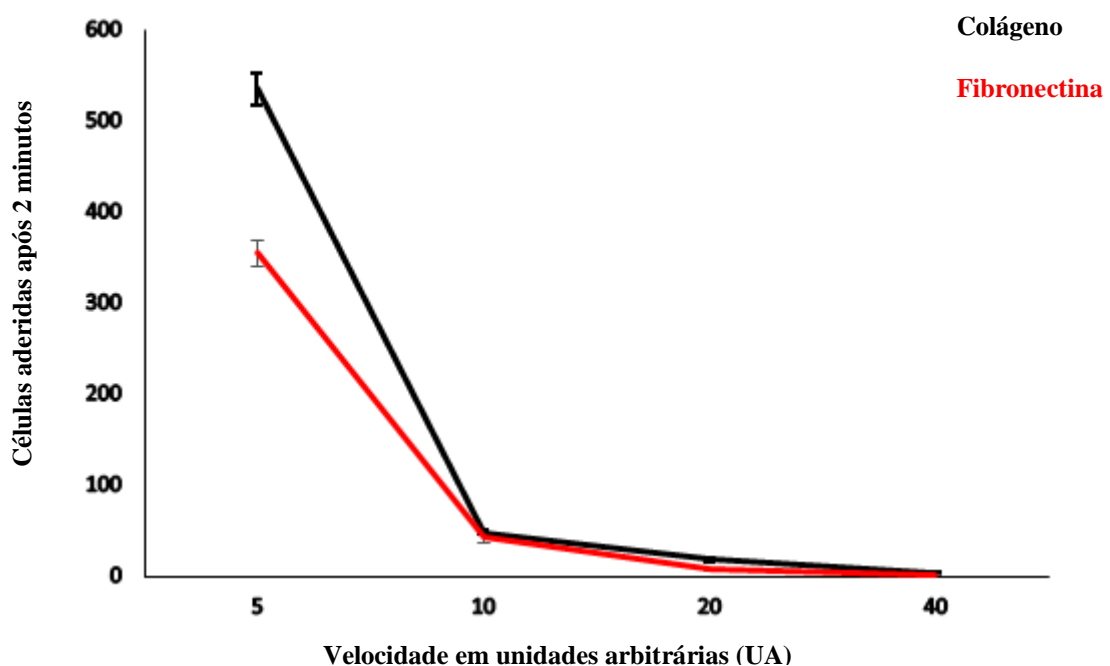


Figura 11. Avaliação da taxa de infusão da bomba de seringa em relação ao número de células aderidas após 2 minutos de ensaio. Monócitos humanos na concentração de 2×10^5 células/ml foram injetados na câmara de fluxo previamente sensibilizada com colágeno (linha preta) ou fibronectina (linha vermelha) e o vernier da bomba de seringa foi ajustado em diferentes velocidades, em unidades arbitrárias (UA), de deslocamento do êmbolo da seringa de 2 mL. Gráfico representativo de 15 experimentos.

A fim de identificar se a infecção de monócitos por *Leishmania* induz mudanças na fase de rolagem de leucócitos, mediada pelas integrinas da família beta 1, sobre superfícies sensibilizadas com colágeno ou fibronectina, foram avaliados os seguintes parâmetros físicos: número de trajetórias, distância total de deslocamento das células, velocidade média das células, número de paradas simples (<200 ms), número de paradas válidas (≥ 200 ms), tempo total de contato (Figura 12) e por fim a frequência da formação de ligações transitórias (Figura 13) entre as células não infectadas ou infectadas com o substrato. A infecção por *L. amazonensis* não alterou nenhum dos parâmetros físicos mencionados, independente do substrato utilizado.

Por sua vez, nem mesmo, a frequência de ligações entre VLA-4/fibronectina exibida pelas várias paradas durante o rolamento de monócitos infectados sofreu alteração quando comparada ao grupo de células não infectadas (Figura 13). Após estimulação com 10 mM de Mn^{++} , a frequência de paradas aumentou em ambos os grupos, não infectados e monócitos infectados por *Leishmania*. Analisados em conjunto, estes resultados demonstram que a infecção por *Leishmania* não interfere com rolamento de monócitos sobre fibronectina com a participação da molécula de VLA-4.

6.2 Análise do espalhamento citoplasmático de monócitos humanos não infectados ou infectados sobre fibronectina

Apesar de não observarmos alterações nas fases iniciais da adesão celular (etapa de rolamento) de monócitos infectados sobre fibronectina, utilizamos microscopia eletrônica de varredura SEM para comparar o espalhamento citoplasmático de monócitos humanos não infectados e infectados por *L. amazonensis* sobre fibronectina na fase tardia. A maioria dos monócitos em cultura com meio sozinho apresentaram um fenótipo celular em que o citoplasma apresentou amplas margens de espalhamento citoplasmático e bordas irregulares (Figura 14A). Monócitos não infectados cultivados apenas com meio de cultura ou com partículas de látex de 3 μm (Figura 14E) apresentaram fenótipos semelhantes, assim como monócitos não infectados tratados com Mn^{++} , que possibilita o aumento da afinidade das integrinas minutos antes do ensaio de adesão, portanto, funcionando como controle positivo de alta afinidade da aderência mediada por integrinas (Figura 14D). Por outro lado, a maioria dos monócitos em cultura com *L. amazonensis* apresentaram uma morfologia arredondada com pouco espalhamento citoplasmático (Figura 14B), que foi semelhante à morfologia observada quando os monócitos foram tratados com EDTA antes do ensaio de adesão,

utilizado como um controle negativo que retêm as integrinas em estado de baixa afinidade devido ao sequestro de cálcio (Figura 14C).

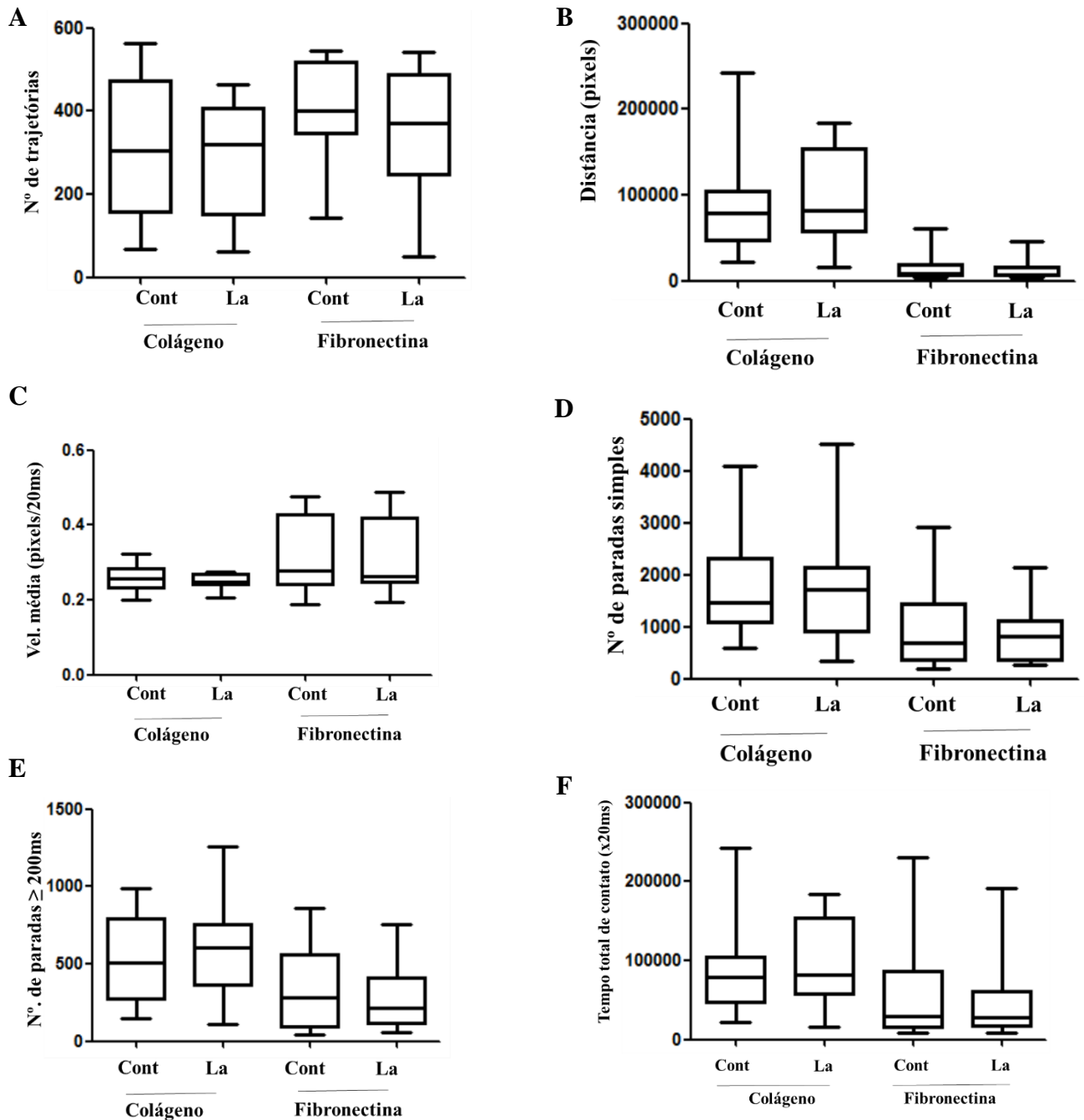


Figura 12. Parâmetros físicos do ensaio de adesão em câmara de fluxo. Em A, o número de trajetórias, B, distância de deslocamento das células, C, a velocidade média das células, D, o número de paradas, E, o número de paradas \geq que 200 ms e F, o tempo total de contato dos monócitos com o substrato (Cont- Controle e La - *L. amazonensis*). Gráfico representativo de 15 experimentos.

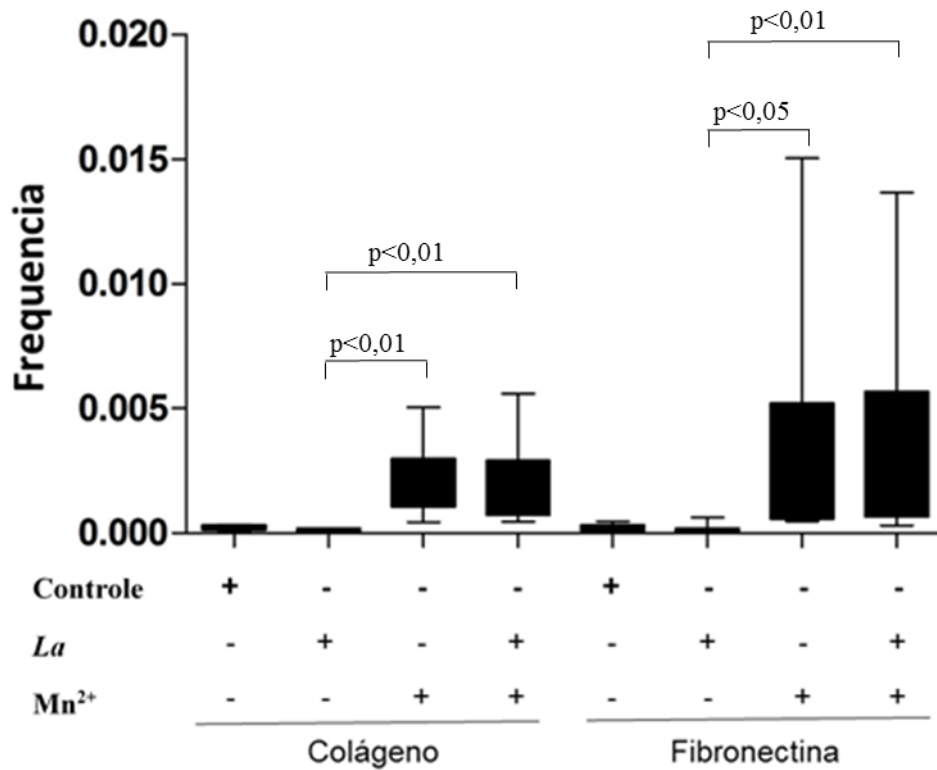


Figura 13. Adesão de monócitos em câmara de fluxo laminar. Monócitos não infectados (controle) ou infectados com *L. amazonensis* (La) na concentração de 2×10^5 células/ml foram conduzidos ao longo de superfícies sensibilizadas com colágeno ou fibronectina numa câmara de fluxo laminar em meio com ou sem a adição de 10 mM $MnCl_2$ (Mn^{2+}). As trajetórias das células individuais foram monitoradas durante 2 min para determinação quantitativa do número total de paradas detectáveis com durações entre 200 ms e 2 min. Gráfico representativo de 6 experimentos.

A área de propagação (μm^2) do citoplasma de monócitos, 72 (55-89) [media (Quartis superior e inferior)], foi maior para os monócitos cultivados com meio apenas do que para os monócitos cultivados com *L. amazonensis* [49 (43-57)], teste de Mann-Whitney, $P < 0,0001$, (Figura 15A). O tratamento com o anticorpo 9F10 contra a cadeia $\alpha 4$ da molécula de VLA4 bloqueou o espalhamento citoplasmático dos monócitos da mesma forma que a exibida por monócitos expostos a infecção por *L. amazonensis* (Figura 14F, Figura 15C). Afim de determinar se a infecção dos monócitos com *L. amazonensis* é um pré-requisito necessário para a inibição do espalhamento citoplasmático foram realizados ensaios de microscopia correlativa, ou seja, fez-se a marcação das células e parasitos por fluorescência, seguida por identificação e quantificação da área de espalhamento citoplasmático (Figura 16) (JIMENEZ et al., 2010). A área de espalhamento citoplasmático dos monócitos infectados [41 (34-51)] é menor do que a

observada de monócitos em cultura com meio sozinho [66 (47-89)], $P < 0,05$) ou que para monócitos que tinham sido cultivadas com os parasitos, mas não continham parasitos [53 (44-73), $p < 0,05$, figura 16D].

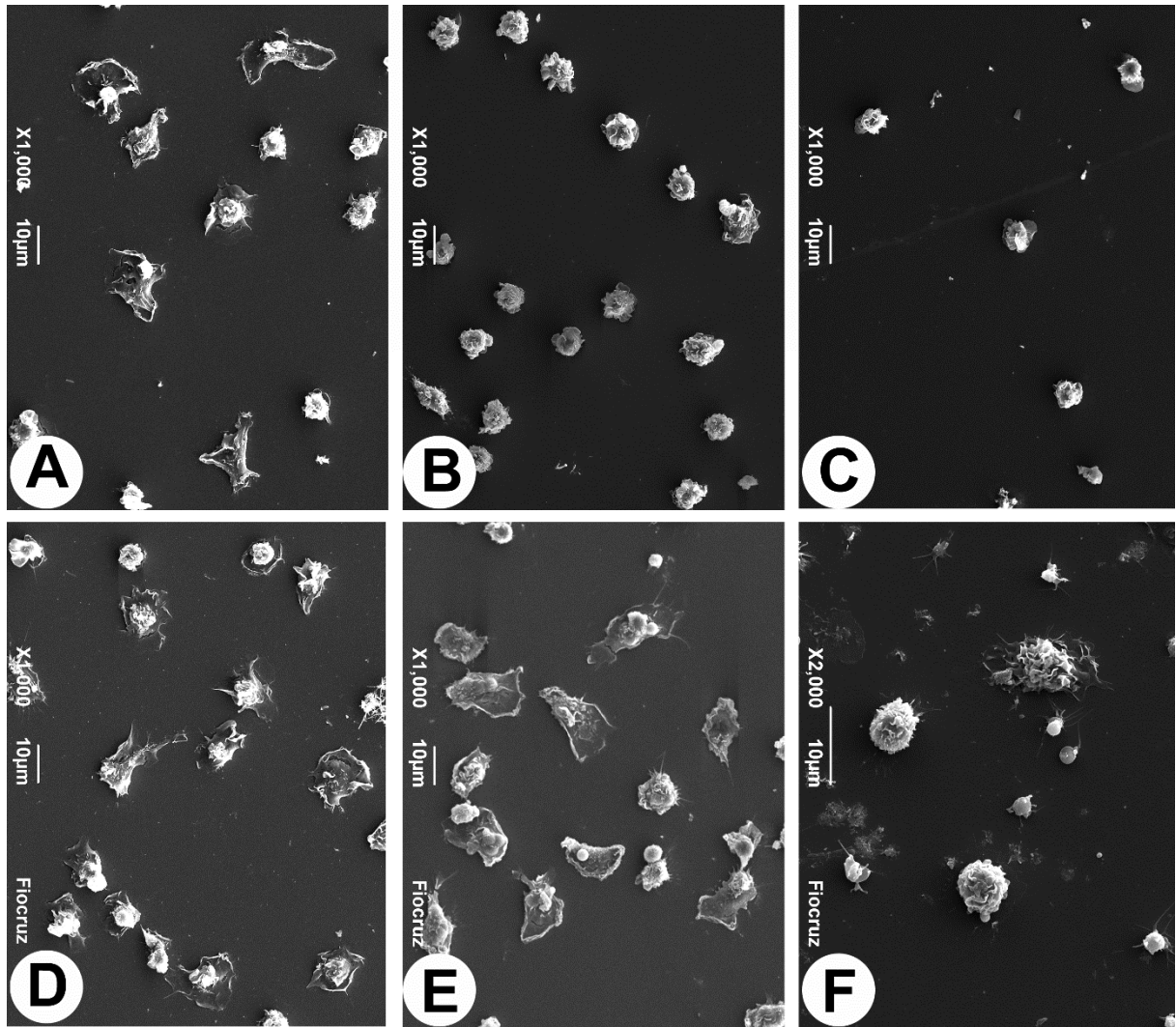


Figura 14. Espalhamento do citoplasma de monócitos humanos não infectados ou infectados com *L. amazonensis* sobre fibronectina. Monócitos de sangue periférico foram cultivados com meio sozinho (A, C, D, F), com meio contendo *L. amazonensis* (B) ou com partículas de látex de 3 µm (E) durante 18 h. As células foram então postas para aderir durante 1h sobre lamínulas sensibilizadas com fibronectina: (A) monócitos não infectados (controle); (B) monócitos incubados com *L. amazonensis*; (C) células não infectadas tratadas com 0,5 mM de EDTA; (D) células não infectadas tratadas com 0,5 mM de $MnCl_2$; (E) células não infectadas cultivadas com partículas de látex; (F) células não infectadas tratadas com o anticorpo anti-VLA4.

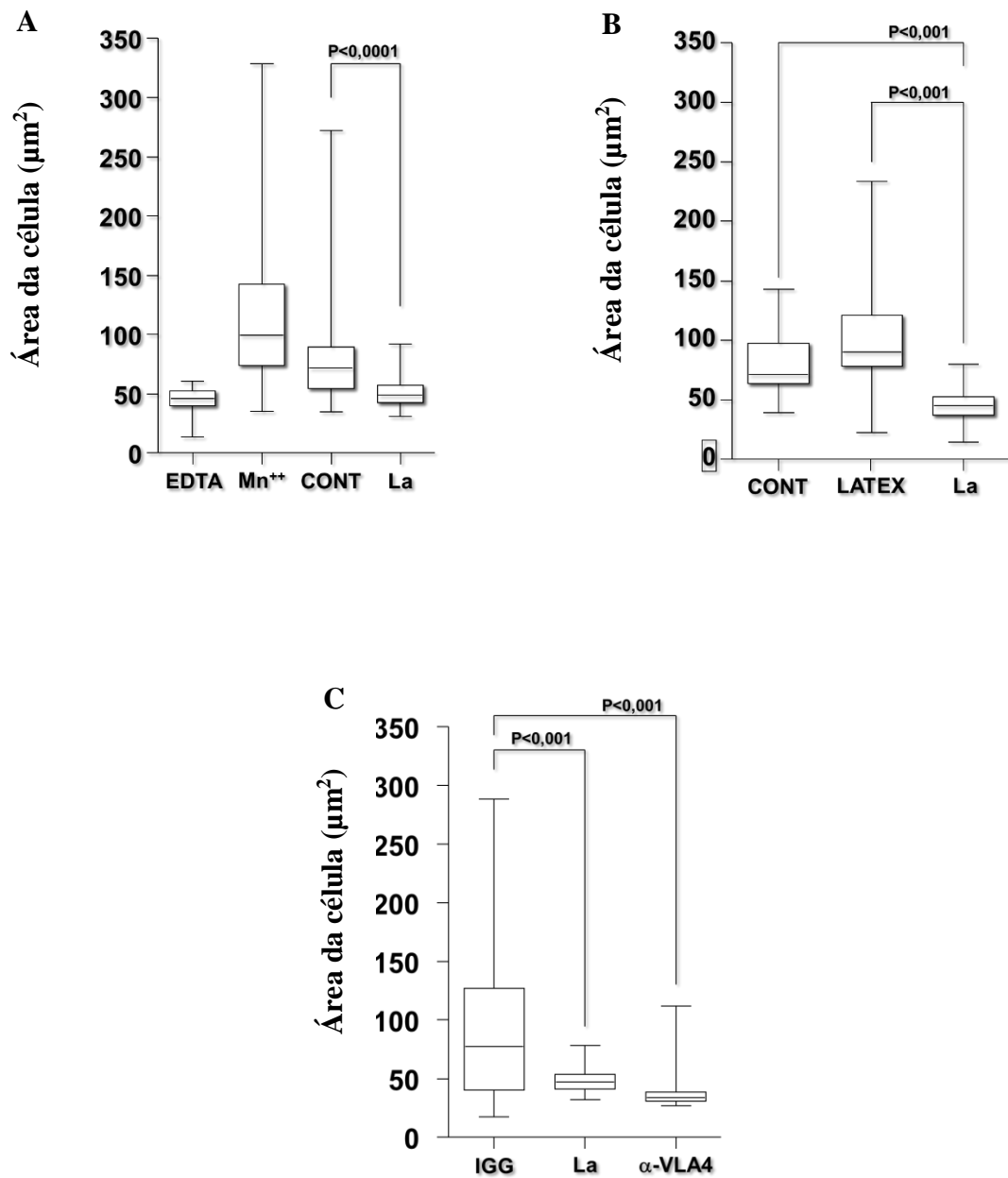


Figura 15. Quantificação da área de espalhamento citoplasmático. Em (A) monócitos humanos foram tratados com: EDTA (controle negativo), MnCl₂ (controle positivo), com meio apenas (Cont) ou com *L. amazonensis* (La); (B) monócitos incubados com partículas de látex, meio apenas ou com *L. amazonensis*; (C) ensaio de bloqueio com anticorpo anti-VLA-4. Os dados são representativos de seis (A) e dois (B, C) ensaios diferentes (teste de Kruskal-Wallis).

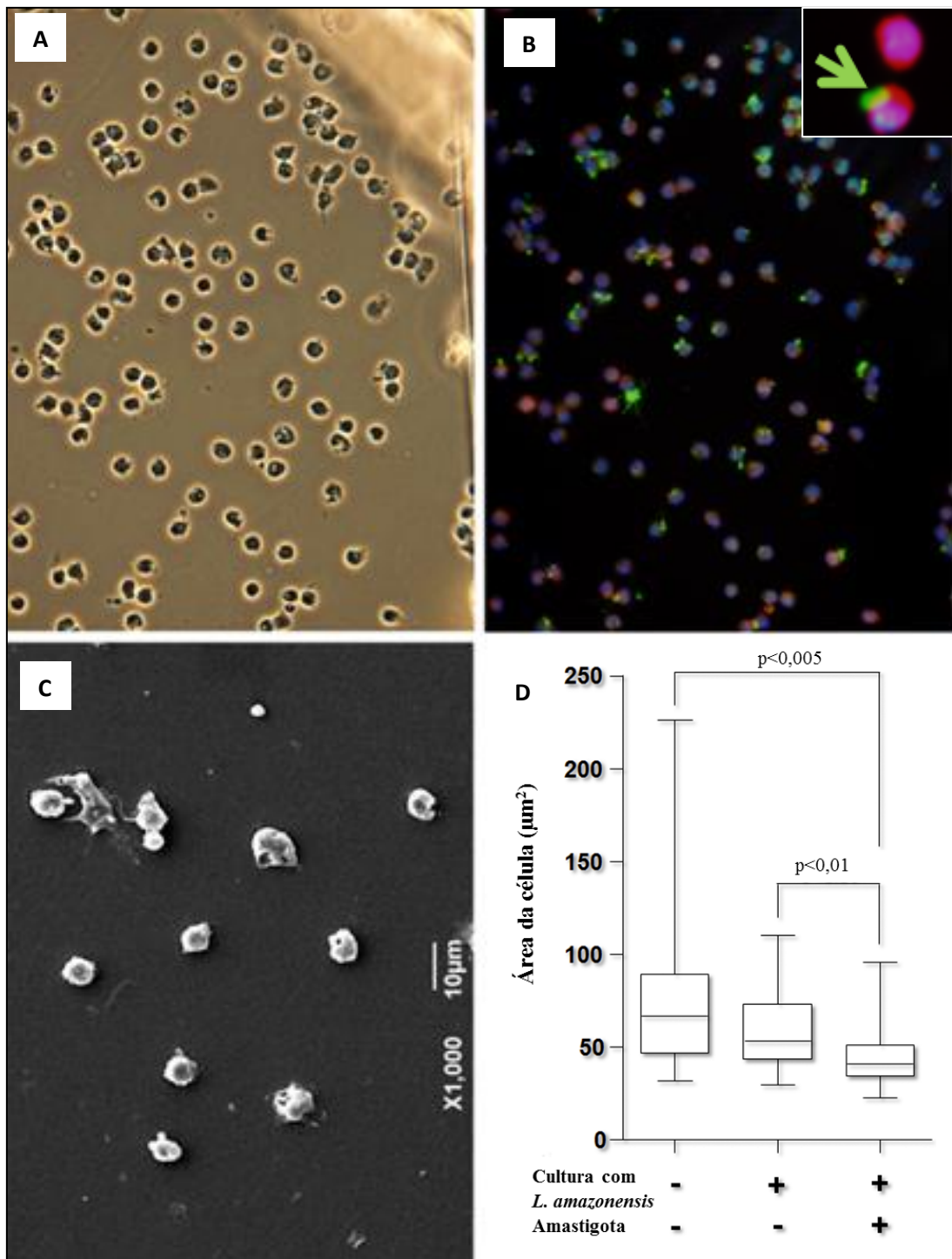


Figura 16. Análise correlativa do espalhamento citoplasmático de monócitos humanos cultivados com meio apenas ou com meio e *L. amazonensis*. As células foram postas para aderir sobre lamínulas de Aclar, contendo uma grelha para permitir a identificação da mesma célula tanto por fluorescência quanto por microscopia eletrônica de varredura. (A) imagem de contraste de fase que mostra as células aderidas à membrana Aclar com parte da grelha utilizada como uma referência. (B) imagem de imunofluorescência

mostrando monócitos não infectados ou monócitos humanos infectados contendo *L. amazonensis* (azul = DAPI, núcleo; faloidina = vermelho, filamentos de actina; verde = *L. amazonensis*). (C) imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando a área correspondente à inserção na parte B. (D) Representação gráfica da área de propagação citoplasmática de monócitos não infectados cultivados com meio sozinho (sem contato com *L. amazonensis*), os monócitos não infectados cultivados com *L. amazonensis* ou monócitos contendo parasito (Teste de Kruskal-Wallis).

6.3 Estudo dos fatores solúveis liberados pelo parasito e por células infectadas na diminuição da adesão a componentes da matriz extracelular

Para determinar se substâncias solúveis, liberadas por células infectadas e/ou parasitos, interferem na aderência de monócitos aos componentes da matriz extracelular, foi realizado um ensaio de adesão utilizando monócitos cultivados em câmaras Transwell separados por uma membrana semipermeável dos parasitos ou de células infectadas. Apenas os monócitos que foram cultivados em contato direto com *L. amazonensis* exibiram diminuição da adesão à fibronectina ou colágeno (Figura 17). Os monócitos em contato com o parasito mostraram uma diminuição de 96,2% na adesão à fibronectina e uma diminuição de 92,5% na adesão ao colágeno em comparação com os monócitos do grupo controle não infectado e cultivado somente com meio de cultura. Os monócitos co-cultivados com parasitos, separados pela membrana semipermeável não mostraram alteração da adesão aos componentes da matriz extracelular (Figura 17).

6.4 Determinação da cinética de contato dos monócitos infectados com *L. amazonensis* sobre superfície sensibilizada com fibronectina

Para avaliar o espalhamento citoplasmático prejudicado devido a infecção, foi feita a IRM para comparar a cinética de contato da membrana de monócitos infectados e não infectados com lamínulas sensibilizadas com fibronectina. Em contato com a superfície, os monócitos não infectados iniciam rapidamente o processo de espalhamento celular até obterem uma adesão estável (Figura 18A), enquanto que os monócitos infectados por *L. amazonensis* em contato com o substrato apresentam pequenas e instáveis áreas de adesão (Figura 18B). A área de contato com o substrato de monócitos aumentou linearmente a uma taxa de aproximadamente $15 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, que foi três vezes maior do que a taxa de monócitos infectados por *L. amazonensis* ($5,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, Figura 18C). A área final de propagação

citoplasmática de monócitos infectados por *L. amazonensis* ($22,8 \mu\text{m}^2$) foi menor do que a das células não infectadas ($67,98 \mu\text{m}^2$, $P < 0,0004$, Figura 18D).

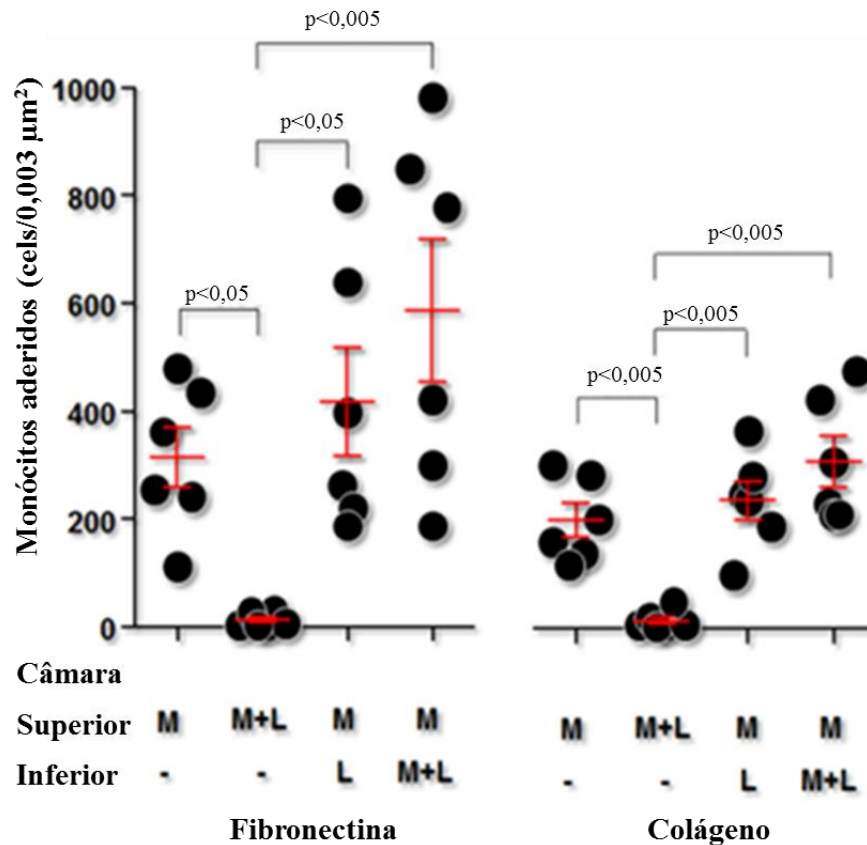


Figura 17. Avaliação do efeito dos fatores solúveis liberados por *L. amazonensis* na adesão de monócitos humanos. Os monócitos humanos foram cultivados na câmara superior dos insertos das câmaras Transwell quer isoladamente (M) quer com *L. amazonensis* (M + L), na proporção de 10 parasitos/célula. A câmara inferior continha meio, *L. amazonensis* (L) ou macrófagos/*L. amazonensis* (M + L). Após 24 h, as células na câmara superior foram recolhidas e submetidas ao ensaio de adesão sobre superfícies revestidas com fibronectina ou colágeno. A taxa de infecção foi acima de 75%. Gráfico representativo de 3 experimentos independentes.

6.5 Estudo do estado de ativação das integrinas em monócitos humanos infectados por *L. amazonensis*

Moléculas de integrinas podem assumir diferentes estados conformacionais, que podem ser correlacionados com a sua afinidade aos seus ligantes (ASKARI et al., 2009; CHIGAIEV; SKLAR, 2012). Assim, estimamos, por citometria de fluxo, a percentagem de

células que expressam o epítipo de elevada afinidade para VLA-4 em monócitos não infectados e infectados por *L. amazonensis*, utilizando o anticorpo monoclonal HUTS-4. A expressão da integrina $\beta 1$ de alta afinidade foi menor entre os monócitos infectados por *L. amazonensis* ($14 \pm 3\%$) do que entre os monócitos não infectados ($36 \pm 21\%$, fig. 19A). Interessantemente, mesmo após estimulação com Mn^{++} , a expressão do epítipo de alta afinidade da molécula VLA-4 foi menor nos monócitos infectados por *L. amazonensis* ($35 \pm 5\%$) que nos monócitos não infectados ($68 \pm 5\%$, fig. 19B).

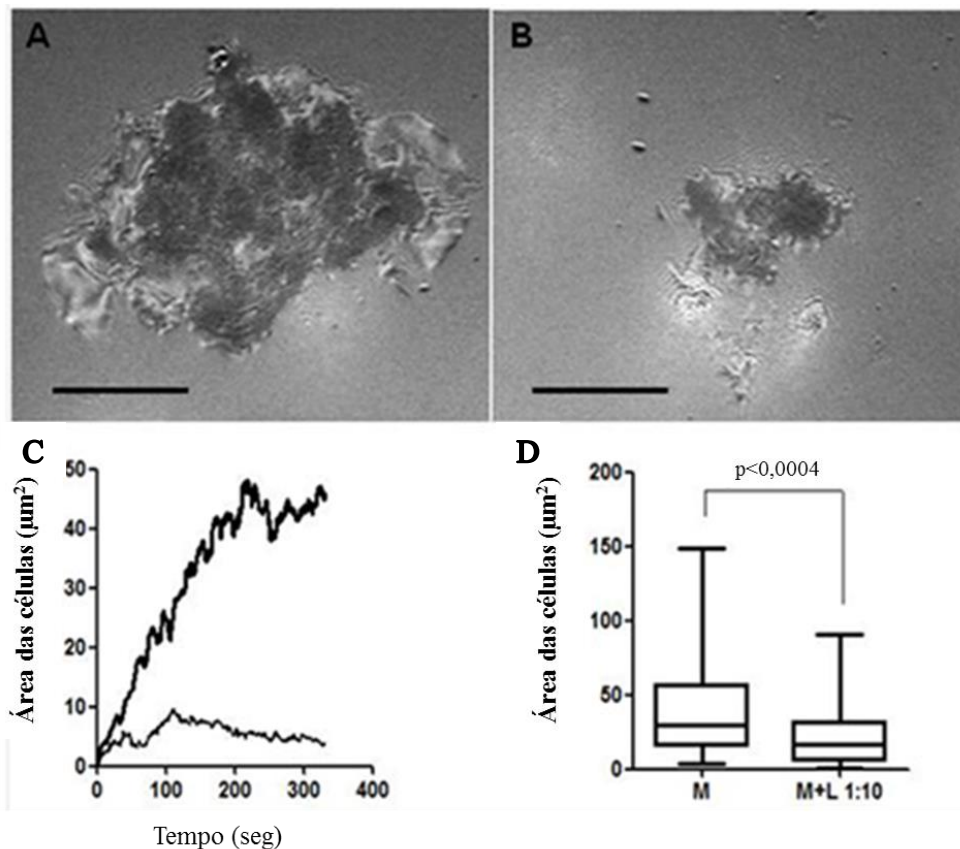


Figura 18. Cinética do espalhamento citoplasmático de monócito não infectado (A) ou infectado por *L. amazonensis* (B) sobre lamínulas sensibilizadas com fibronectina, estimado por IRM. Os dados sobre a cinética do espalhamento citoplasmático são mostrados no gráfico C, monócitos não infectados (linha em negrito) e monócitos infectados (linha clara). (D) Estimativa da área de contato de células analisadas a partir de campos aleatórios. Gráfico representativo de quatro experiências independentes. Barra de escala, 5 μm .

Com o propósito de determinar se esta perturbação na configuração de integrina foi restrita a molécula VLA4 ou se é um efeito mais generalizado da infecção por *L.*

amazonensis, estudou-se a expressão do epítipo de elevada afinidade da molécula de integrina LFA-1, uma integrina beta-2 expressa por leucócitos. A expressão do epítipo de alta afinidade da molécula LFA-1 foi inferior em monócitos infectados por *L. amazonensis* ($18 \pm 16\%$) do que nos monócitos não infectados ($37 \pm 32\%$, a Fig. 20A) e mesmo após a estimulação com Mn^{++} , a expressão do epítipo de alta afinidade da molécula LFA-1 permaneceu inferior nos monócitos infectados por *L. amazonensis* ($52 \pm 13\%$) do que nos monócitos não infectados ($67 \pm 20\%$); todavia, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Fig. 20B).

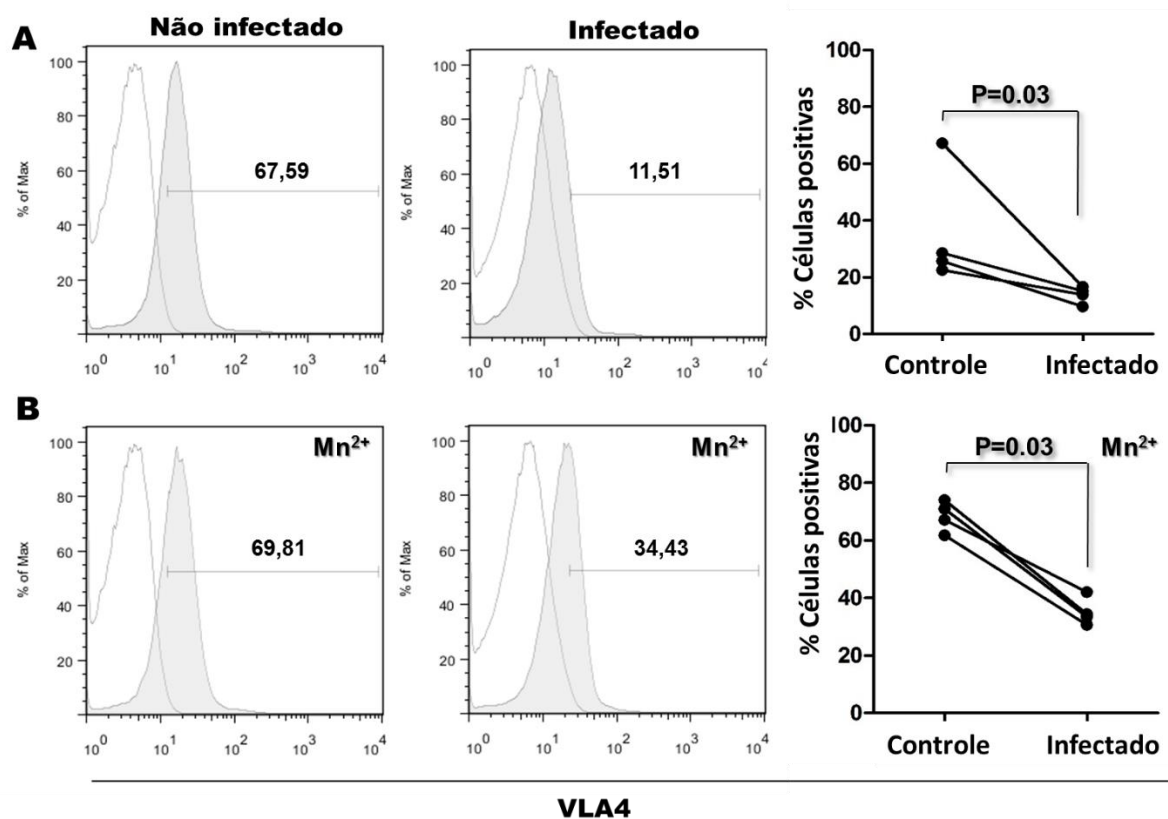


Figura 19. Expressão do epítipo de alta afinidade da molécula VLA-4 em monócitos infectados. Para a marcação de cor única, 1×10^6 monócitos foram cultivados em meio sozinho (controle) ou em meio contendo *L. amazonensis* (infectado). As células foram resuspensas em meio sozinho (A) ou em meio contendo Mn^{++} (B). As células foram marcadas com o anticorpo anti-VLA4, para identificar o epítipo de alta afinidade, e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas vazios representam as células incubadas com isotipo controle e os histogramas cinzentos células incubadas com o anticorpo anti-VLA4. Gráficos: cada par de dados ligados por linha representa uma experiência independente usando o mesmo lote de monócitos, cultivados com meio

sozinho (controle) ou com meio contendo *L. amazonensis* (Infectados) (teste de Mann-Whitney).

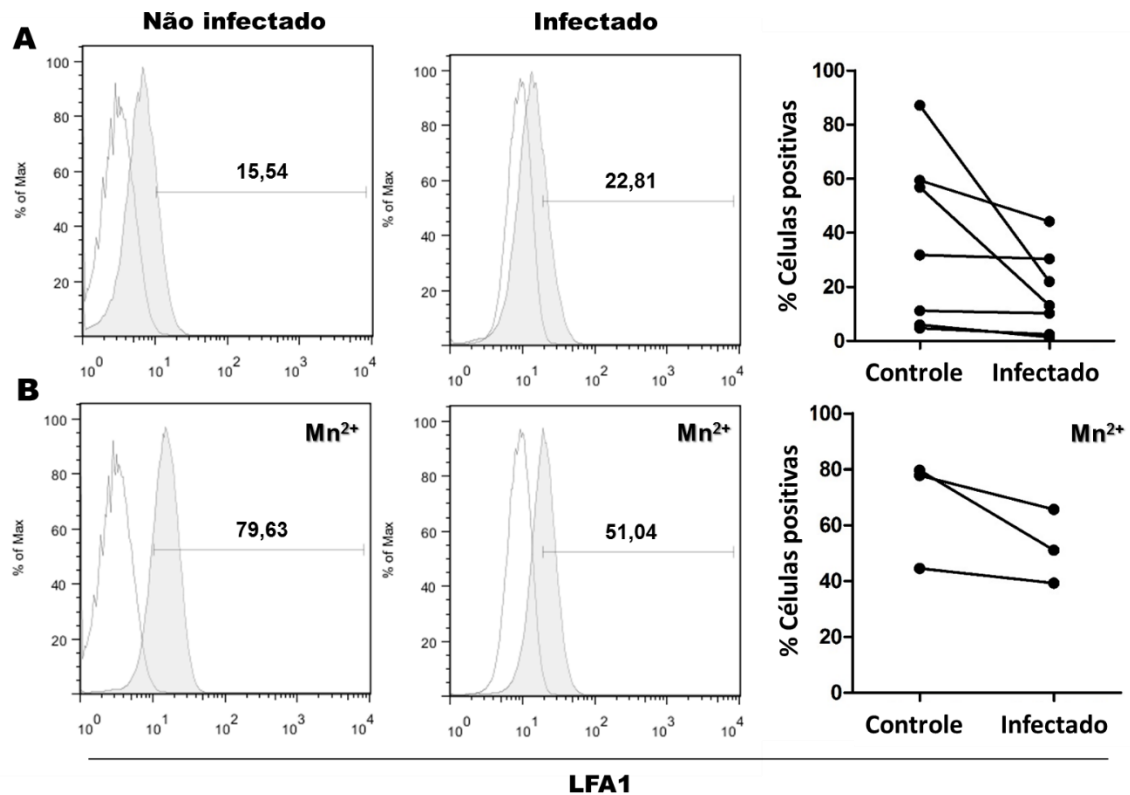


Figura 20. Expressão do epítipo de alta afinidade da molécula LFA-1 em monócitos infectados. Para a marcação de cor única, 1×10^6 monócitos foram cultivados em meio sozinho ou em meio contendo *L. amazonensis*. As células foram ressuspensas em meio sozinho (A) ou em meio contendo Mn⁺⁺ (B). As células foram então coradas com um anticorpo específico para identificar o epítipo de alta afinidade da molécula LFA-1 e analisadas por citometria de fluxo. Os histogramas vazios representam células incubadas com o isotipo controle, enquanto que os histogramas cinzas representam células incubadas com o anticorpo para identificar o epítipo de alta afinidade da molécula LFA1. Gráficos: Cada par de dados ligados por linha representa um ensaio independente, utilizando o mesmo lote de monócitos em cultura, com meio sozinho (controle) ou com meio contendo *L. amazonensis* (infectados), (Teste de Mann-Whitney não significativa).

7 DISCUSSÃO

Estudos anteriores mostraram que a infecção com *L. amazonensis*, *L. infantum* ou *L. braziliensis* inibe a adesão de fagócitos mononucleares ao tecido conjuntivo e a componentes da matriz extracelular (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). A diminuição da adesão de fagócitos mononucleares está correlacionada com a carga parasitária e pode ser revertida pela ativação das moléculas integrinas com Mn^{++} (PINHEIRO et al., 2006). Estudos anteriores demonstraram não existir mudanças consistentes na expressão de moléculas de adesão em monócitos infectados por *Leishmania* (CARVALHAL et al., 2004; PINHEIRO et al., 2006). Estas observações sugerem que a participação das integrinas, em vez da expressão destas moléculas, está alterada em células infectadas.

Neste trabalho, nós expandimos a investigação buscando entender os efeitos da infecção por *L. amazonensis* na adesão de monócitos. Para isso, avaliamos os estágios iniciais da ligação da molécula VLA-4 à molécula de fibronectina presente na matriz extracelular através de ensaios de câmara de fluxo vascular e os estágios tardios da adesão mediada por integrinas nos fagócitos por ensaios de avaliação do espalhamento celular sobre o substrato. Os dados apresentados mostram que a formação das ligações no início da interação entre monócitos e a matriz conjuntiva permanece inalterada. No entanto, a propagação citoplasmática subsequente às fases iniciais de adesão aos componentes da matriz extracelular é inibida pela infecção por *L. amazonensis*. Além disso, houve diminuição da expressão dos epítomos de alta afinidade das integrinas em monócitos infectados e podemos confirmar que a infecção, e não simplesmente o contato com *L. amazonensis*. A infecção intracelular é necessária para induzir alterações na adesão de monócitos.

VLA-4 está presente em diferentes conformações na superfície de leucócitos desde o início das interações, e permite tatear, rolar ou adesão firme sobre as células endoteliais e os componentes da matriz extracelular, tais como a fibronectina, que pode estar distribuído na matriz conjuntiva ou ligado à superfície das células endoteliais (ALON et al., 1995; CHIGAIEV; SKLAR, 2012). Nos experimentos, usamos uma câmara de fluxo para investigar se a infecção por *L. amazoensis* iria alterar os contatos iniciais da adesão mediada pela integrina VLA-4. Assim, câmaras de fluxo foram utilizadas para simular, *in vitro*, as interações leucócito/células endoteliais nos vasos sanguíneos, porém estas câmaras proporcionam também um meio altamente sensível para detectar a formação individual de ligações e rupturas destas quando operadas com uma velocidade correspondente a taxa de cisalhamento da ordem de 10 s^{-1} em associação com um sistema de processamento de imagem

capaz de detectar eventos com duração de apenas algumas dezenas de milissegundos (ROBERT et al., 2008). Neste trabalho mostramos que monócitos humanos foram capazes de formar contatos e ligações com colágeno ou fibronectina. Apesar da baixa frequência, foi possível observar que monócitos rolam sobre as superfícies cobertas com estes componentes da matriz conjuntiva. A cinética deste processo não se alterou após a co-cultura de monócitos com *L. amazonensis*, mesmo quando Mn^{++} foi adicionado para induzir a ativação das integrinas. Tanto as células infectadas e não infectadas apresentaram um aumento semelhante na frequência de adesão e na força desta adesão. Este resultado sugere que a infecção por *L. amazonensis* não afetou a capacidade das moléculas de integrinas na interação com os componentes da matriz conjuntiva nas fases iniciais do processo de adesão.

Em modelos estáticos de adesão de leucócitos a células endoteliais ou a componentes do tecido conjuntivo, a ligação inicial mediada por integrina induz o espalhamento progressivo do citoplasma da célula, como mostrado em trabalhos anteriores do nosso grupo e confirmado no presente estudo (PINHEIRO et al., 2006; ROBERT et al., 2011). Este mecanismo envolve uma grande reorganização dos receptores de adesão dos leucócitos e do citoesqueleto celular para permitir o contato íntimo da membrana com o substrato (VAN KOOYK; VAN VLIET; FIGDOR, 1999). O processo é desencadeado quando em contato com uma pequena região da membrana se expande a uma grande área, deformando a membrana, alterando a conformação/afinidade e reorganizando o alinhamento das moléculas de adesão (PIERRES et al., 2003).

Utilizou-se IRM para monitorar os eventos durante a aderência de monócitos não infectados e infectados por *L. amazonensis* à lamínulas sensibilizadas com fibronectina. Observou-se que monócitos infectados por *L. amazonensis* desenvolvem protrusões da membrana após o primeiro contato com o substrato, mas não foram capazes de espalhar seu citoplasma sobre a superfície sensibilizada com fibronectina, mas, unicamente, pequenas zonas de contato foram mantidas. Esta observação foi posteriormente confirmada por uma avaliação morfométrica da área do substrato coberta por citoplasma usando microscopia eletrônica de varredura. Monócitos não infectados do grupo controle exibiram espalhamento do citoplasma com variados tamanhos de filopódios sobre a fibronectina durante os 60 minutos de incubação. O espalhamento citoplasmático foi inibido na presença de bloqueio com anticorpos anti-VLA-4. A maioria dos monócitos infectados por *L. amazonensis* permaneceram arredondadas ou emitia apenas uma pequena quantidade de projeções citoplasmáticas que aparecem semelhantes aos observados na presença do anticorpo anti-VLA4. Assim, estas observações sugerem que, embora a capacidade de deformação da

membrana dos leucócitos possa ser preservada em células infectadas por *L. amazonensis*, a infecção interfere com os mecanismos que controlam a função das integrinas.

Pelo menos dois processos diferentes estão envolvidos na adesão firme mediada por integrinas presentes nos leucócitos ao tecido conjuntivo: mudanças na afinidade da integrina e agregação de integrinas em pequenos aglomerados em pontos de adesão (CLUZEL et al., 2005). Ambos os processos são potencialmente afetados pela infecção por *Leishmania*: infecção por *Leishmania* pode interromper a formação de balsas lipídicas (*lipid-rafts*) na superfície de leucócitos e esta mudança pode afetar o agrupamento de integrinas em pontos focais de adesão (LEITINGER; HOGG, 2002). Anticorpos específicos para determinação do estado conformacional das integrinas por citometria de fluxo, revelaram uma diminuição na expressão do epítipo de alta afinidade da molécula de VLA-4 presente nas superfícies de monócitos infectados com *L. amazonensis*.

Os mecanismos de regulação da afinidade e a capacidade para mediar rolamento ou adesão firme diferem entre as famílias das integrinas. A falta do domínio I da cadeia alfa da molécula VLA-4 pode ser responsável ao menos por esta diferença funcional (CHIGAEV; SKLAR, 2012). Assim, mostramos que a infecção por *L. amazonensis* induz uma menor expressão dos epítipos de alta afinidade da família de integrinas beta-1 (VLA4); esta observação sugere que uma deficiência mais geral das vias internas para a superfície (*inside-out*) de ativação da integrina está presente durante a infecção por *L. amazonensis*. A infecção por *Leishmania* tem um efeito inibidor sobre uma variedade de vias de transdução de sinais que podem afetar a função das integrinas (SHIO et al., 2012). Adicionalmente, a infecção por *Leishmania* diminui a expressão de vários genes de receptores de quimiocinas dos fagócitos mononucleares de ratos (STEIGERWALD; MOLL, 2005; PINHEIRO et al., 2006). Mais estudos são necessários para investigar as vias que promovem as alterações na afinidade das integrinas relatada neste estudo e se a capacidade para formar agregados de integrinas na interface substrato-célula também é alterada em células infectadas por *Leishmania*. *Toxoplasma gondii*, um outro protozoário intracelular, promove um efeito similar, inibindo a aderência e o espalhamento citoplasmático de monócitos humanos infectados sobre monocamadas de células endoteliais (HARKER et al., 2013). A diminuição do espalhamento citoplasmático de leucócitos após contato com *L. amazonensis* não foi observado quando as células foram incubadas com partículas de látex de 3 μ m, que são do mesmo tamanho que o parasito. Estes dados sugerem que a fagocitose sozinha ou a deformação celular por partículas internalizadas não foi suficiente para afetar a função das integrinas nas células infectadas. Em contraste, foi necessária a infecção dos monócitos para inibir a sua capacidade de adesão.

Apenas uma tendência, não significativa, para uma diminuição na área citoplasmática foi observada em monócitos que não continham amastigotas após a co-cultura com *L. amazonensis*; esta observação é compatível com os experimentos usando câmaras Transwell apresentados neste estudo. Nestes ensaios, monócitos submetidos ao contato com moléculas solúveis liberadas diretamente por promastigotas de *L. amazonensis* ou por outras células infectadas não apresentaram alterações na adesão aos componentes do tecido conjuntivo. Além disso, em estudos prévios do grupo, foi demonstrado que incubação de macrófagos inflamatórios com *Leishmania* viva diminui a aderência de macrófagos sobre fibronectina. Contudo, a incubação dos leucócitos com amastigotas mortos, mesmo em altas taxas de parasitas por macrófagos, não produziu alterações na adesão de leucócitos sobre fibronectina (PINHEIRO et al., 2006).

Finalmente, as integrinas são importantes para a migração celular e recirculação em diferentes tecidos. Elas, também, estão envolvidas na sinalização celular que leva à iniciação e a ativação de linfócitos. O dano às funções leucocitárias das integrinas, demonstrado neste estudo, pode interferir com o curso da infecção por *Leishmania*. Na leishmaniose, promastigotas são inoculados na derme onde eles infectam leucócitos. Estes leucócitos podem permanecer no local de inoculação ou migrarem para os gânglios linfáticos de drenagem onde apresentam os antígenos parasitários para os linfócitos T. Em um estudo recente do grupo, foi demonstrado que as células dendríticas migram de forma menos eficiente do sítio de inflamação para o nódulo linfático de drenagem após co-cultura com *Leishmania* (HERMIDA et al., 2014). A persistência destas células no local da inoculação pode favorecer o desenvolvimento tardio de úlceras na pele. As moléculas de integrinas LFA-1 e VLA-4 participam na montagem e na sinalização através das sinapses imunológicas durante a ativação de linfócitos. Mais estudos são necessários para investigar o efeito modulador potencial da disfunção da integrina durante a doença causada por *L. amazonensis* e outras espécies de *Leishmanias* capazes de mudar a adesão dos fagócitos (CARVALHAL et al., 2004).

8 CONCLUSÕES / SUMÁRIO DE RESULTADOS

- I. **A infecção dos monócitos por *L. amazonensis* não altera as fases iniciais (rolamento) da adesão mediada por VLA-4**, [em experimentos com câmaras de fluxo laminar (vide páginas 52 e 53), não houve diferença nos parâmetros físicos analisados: número de trajetórias, distância de deslocamento das células, velocidade média das células, número de paradas simples, número de paradas \geq que 200 ms, tempo total de contato dos monócitos com o substrato ou mesmo a frequência com que se formam as ligações entre VLA-4/fibronectina];
- II. **A infecção afeta a cinética de espalhamento citoplasmático desde os primeiros momentos de contato da célula infectada com o substrato de adesão** [nos ensaios de SEM e IRM (páginas 55, 57 e 60), os monócitos infectados por *L. amazonensis* apresentaram uma área de espalhamento (*spreading*) menor que monócitos não infectados e apresentam pequenas e instáveis áreas de adesão em contato com o substrato];
- III. **A fagocitose de *L. amazonensis*, isoladamente, não é a responsável pela diminuição da adesão** [nos experimentos de SEM (páginas 55 e 56), monócitos incubados com partículas de látex mantêm a capacidade de aderir e espalhar o citoplasma sobre o substrato];
- IV. **A infecção por *Leishmania* induz menor expressão de epítomos de alta afinidade das integrinas beta 1** [nos experimentos de citometria de fluxo (páginas 61 e 62), os monócitos infectados apresentaram uma diminuição do epítomo de alta afinidade da molécula VLA-4 mas não de LFA-1, quando comparados com os monócitos não infectados. Este resultado, sugere que vias internas de regulação das integrinas sejam moduladas pela infecção. Uma vez que, a ativação por via extracelular com Mn^{++} não foi capaz de restaurar a expressão do epítomo da alta afinidade dos monócitos infectados quando comparado com os monócitos não infectados tratados com Mn^{++} .

9 PERSPECTIVAS

- 1) Moléculas envolvidas no acoplamento de integrinas com o processo de polimerização de actina estão envolvidas na diminuição da afinidade e *clustering* de VLA-4 na superfície de monócitos infectados com *L. amazonensis*?

Para investigar esta questão, ensaios de imunofluorescência com anticorpos contra as moléculas talina e vimetina com monócitos infectados serão realizados.

- 2) Quais as vias de sinalização intracelular, potencialmente, envolvidas na diminuição da afinidade das B1 integrinas em monócitos infectados com *L. amazonensis*?

Desde que um dos principais mecanismos de controle da função de integrinas envolve sinalização intracelular desencadeada e iniciada em receptores de quimiotáticos ou na própria integrina, elegemos duas vias mais consistentemente envolvidas no processo para examinarmos comparativamente em monócitos não infectados ou infectados com *Leishmania*: AMPc/GMPc e PKC/MARCKS. O entendimento de como e se estas vias são responsáveis pela diminuição da afinidade de monócitos infectados, irá ampliar o conhecimento sobre a patogênese da leishmaniose e, possivelmente, possibilitando a concepção de vias terapêuticas para a ativação das integrinas.

10. REFERÊNCIAS

- ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 339-362, 2009.
- AKHOUNDI, M. et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of leishmania species with macrophages. **Adv Parasitol**, v. 31, n., p. 175-254, 1992.
- ALON, R. et al. The integrin α 4 supports tethering and rolling in flow on vcam-1. **J Cell Biol**, v. 128, n. 6, p. 1243-1253, 1995.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: New insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 109-118, 2012.
- ASKARI, J. A. et al. Linking integrin conformation to function. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 2, p. 165-170, 2009.
- ATO, M. et al. Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to leishmania donovani infection in mice deficient in ccl19 and ccl21. **J Immunol**, v. 176, n. 9, p. 5486-5493, 2006.
- ATO, M. et al. Defective ccr7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nat Immunol**, v. 3, n. 12, p. 1185-1191, 2002.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565-568, 1998.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of toxoplasma gondii is linked to parasite motility and virulence. **J Exp Med**, v. 195, n. 12, p. 1625-1633, 2002.
- BARRAL, A. 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.
- BEIL, W. J. et al. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **J Leukoc Biol**, v. 52, n. 2, p. 135-142, 1992.

CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized? **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 547-556, 2003.

CARVALHAL, D. G. et al. 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.

CAVALLARO, U.; DEJANA, E. Adhesion molecule signalling: Not always a sticky business. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 189-197, 2011.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by leishmania parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, n., p. 719361, 2010.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N Engl J Med**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006.

CHIGAEV, A.; SKLAR, L. A. Aspects of vla-4 and lfa-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. **Front Immunol**, v. 3, n., p. 242, 2012.

CHULUYAN, H. E.; ISSEKUTZ, A. C. Vla-4 integrin can mediate cd11/cd18-independent transendothelial migration of human monocytes. **J Clin Invest**, v. 92, n. 6, p. 2768-2777, 1993.

CLUZEL, C. et al. The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. **J Cell Biol**, v. 171, n. 2, p. 383-392, 2005.

COURRET, N. et al. Cd11c- and cd11b-expressing mouse leukocytes transport single toxoplasma gondii tachyzoites to the brain. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 309-316, 2006.

CRETEL, E. et al. How cells feel their environment: A focus on early dynamic events. **Cell Mol Bioeng**, v. 1, n. 1, p. 5-14, 2008.

CRETEL, E. et al. Early contacts between t lymphocytes and activating surfaces. **J Phys Condens Matter**, v. 22, n. 19, p. 194107, 2010.

DA GAMA, L. M. et al. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with toxoplasma gondii. **Microbes Infect**, v. 6, n. 14, p. 1287-1296, 2004.

DAVIES, P. F. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. **Physiol Rev**, v. 75, n. 3, p. 519-560, 1995.

_____. Multiple signaling pathways in flow-mediated endothelial mechanotransduction: Pyk-ing the right location. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 11, p. 1755-1757, 2002.

DAVIES, P. F. et al. Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial mechanotransduction. **Annu Rev Physiol**, v. 59, n., p. 527-549, 1997.

DE FREITAS, E. O. et al. The contribution of immune evasive mechanisms to parasite persistence in visceral leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 153, 2016.

DE MENEZES, J. P. et al. Leishmania infection inhibits macrophage motility by altering f-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cell Microbiol**, v., n., p., 2016.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit Vectors**, v. 9, n., p. 264, 2016.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. [control of phlebotomus longipalpis by ddt house spraying endemic foci of kala-azar in ceara.]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 7, n. 1, p. 131-141, 1955.

DELLACASA-LINDBERG, I.; HITZIGER, N.; BARRAGAN, A. Localized recrudescence of toxoplasma infections in the central nervous system of immunocompromised mice assessed by in vivo bioluminescence imaging. **Microbes Infect**, v. 9, n. 11, p. 1291-1298, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 9, p. 692, 2004a.

_____. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004b.

DIEU, M. C. et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J Exp Med**, v. 188, n. 2, p. 373-386, 1998.

DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **J Infect Dev Ctries**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2008.

DIXIT, N.; SIMON, S. I. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: Temporal and spatial cues for leukocyte arrest. **Front Immunol**, v. 3, n., p. 188, 2012.

DOS-SANTOS, W. L. et al. Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniosis. **Parasitol Res**, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2004.

ELICES, M. J. et al. Vcam-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin vla-4 at a site distinct from the vla-4/fibronectin binding site. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 577-584, 1990.

ENGWERDA, C. R. et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during leishmania donovani infection. **Am J Pathol**, v. 161, n. 2, p. 429-437, 2002.

FERNANDEZ-FLORES, A.; RODRIGUEZ-PERALTO, J. L. Morphological and immunohistochemical clues for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis and the interpretation of cd1a status. **J Am Acad Dermatol**, v. 74, n. 3, p. 536-543, 2016.

FIORINI, M.; MESSINA, M. F.; BARRACCHIA, A. Peripheral intramonocytic and intraneutrophil leishmanias observed in a chronic myelomonocytic leukemia (cmmol) patient. **Haematologica**, v. 87, n. 8, p. EIM21, 2002.

FROES, A. M. et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-leishmania chagasi amastigote antibodies of different animal species. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 99, n. 3-4, p. 135-141, 2004.

FURTADO, J. M. et al. Migration of toxoplasma gondii-infected dendritic cells across human retinal vascular endothelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 11, p. 6856-6862, 2012.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, 2003.

GERHARDT, T.; LEY, K. Monocyte trafficking across the vessel wall. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 321-330, 2015.

GINSBERG, M. H. Integrin activation. **BMB Rep**, v. 47, n. 12, p. 655-659, 2014.

GOLIAS, C. et al. Physiology and pathophysiology of selectins, integrins, and igsf cell adhesion molecules focusing on inflammation. A paradigm model on infectious endocarditis. **Cell Commun Adhes**, v. 18, n. 3, p. 19-32, 2011.

GREGG, B. et al. Replication and distribution of toxoplasma gondii in the small intestine after oral infection with tissue cysts. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1635-1643, 2013.

GUAZZONE, V. A. et al. Expression of cell adhesion molecules, chemokines and chemokine receptors involved in leukocyte traffic in rats undergoing autoimmune orchitis. **Reproduction**, v. 143, n. 5, p. 651-662, 2012.

HAN, J. et al. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaiibbeta3. **Curr Biol**, v. 16, n. 18, p. 1796-1806, 2006.

HANDMAN, E. Cell biology of leishmania. **Adv Parasitol**, v. 44, n., p. 1-39, 1999.

HARKER, K. S. et al. Toxoplasma gondii modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. **J Leukoc Biol**, v. 93, n. 5, p. 789-800, 2013.

HEINZEL, F. P. et al. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper t cell subsets. **J Exp Med**, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HEINZEL, F. P. et al. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by cd4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7011-7015, 1991.

HEINZEL, F. P. et al. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with leishmania major. **J Exp Med**, v. 177, n. 5, p. 1505-1509, 1993.

HENDERSON, R. B. et al. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 328-335, 2003.

HERMIDA, M. D. et al. Leishmania amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC Infect Dis**, v. 14, n., p. 450, 2014.

HERTER, J.; ZARBOCK, A. Integrin regulation during leukocyte recruitment. **J Immunol**, v. 190, n. 9, p. 4451-4457, 2013.

HOLSCHER, C. et al. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing balb/c mice. **J Immunol**, v. 176, n. 2, p. 1115-1121, 2006.

HUO, Y. et al. The chemokine kc, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. **J Clin Invest**, v. 108, n. 9, p. 1307-1314, 2001.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different leishmania species drive distinct neutrophil functions. **Trends Parasitol**, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016.

HYNES, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 673-687, 2002.

IMAI, T. et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor cx3cr1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 521-530, 1997.

JIMENEZ, N. et al. Gridded aclar: Preparation methods and use for correlative light and electron microscopy of cell monolayers, by tem and fib-sem. **J Microsc**, v. 237, n. 2, p. 208-220, 2010.

KAHN, J. et al. Calmodulin regulates l-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 809-818, 1998.

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of leishmania infections. **Microbes Infect**, v. 2, n. 14, p. 1765-1773, 2000.

KELLERMANN, S. A. et al. The cc chemokine receptor-7 ligands 6ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 3859-3864, 1999.

LACHENMAIER, S. M. et al. Intracellular transport of toxoplasma gondii through the blood-brain barrier. **J Neuroimmunol**, v. 232, n. 1-2, p. 119-130, 2011.

LAFUENTE, E. M. et al. Riam, an ena/vasp and profilin ligand, interacts with rap1-gtp and mediates rap1-induced adhesion. **Dev Cell**, v. 7, n. 4, p. 585-595, 2004.

LAPPIN, M. B. et al. Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. **Immunology**, v. 98, n. 2, p. 181-188, 1999.

LAUDANNA, C. et al. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. **Immunol Rev**, v. 186, n., p. 37-46, 2002.

LEE, J.; PACKARD, R. R.; HSIAT, T. K. Blood flow modulation of vascular dynamics. **Curr Opin Lipidol**, v. 26, n. 5, p. 376-383, 2015.

LEHMANN, J. C. et al. Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (icam-1) and icam-2 in lymphocyte trafficking. **J Immunol**, v. 171, n. 5, p. 2588-2593, 2003.

LEITINGER, B.; HOGG, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 5, p. 963-972, 2002.

LEON, B.; LOPEZ-BRAVO, M.; ARDAVIN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective t helper 1 responses against leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007.

LEY, K. Arrest chemokines. **Microcirculation**, v. 10, n. 3-4, p. 289-295, 2003.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived il-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to leishmania. **Nat Med**, v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, n., p. 83, 2012.

LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate immunity to leishmania infection: Within phagocytes. **Mediators Inflamm**, v. 2014, n., p. 754965, 2014.

LUO, B. H.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev Immunol**, v. 25, n., p. 619-647, 2007.

MARSHALL, B. T. et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v. 423, n. 6936, p. 190-193, 2003.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, n., p. 451-483, 2009.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: Modulation of proinflammatory mediators. **J Infect Dis**, v. 185, n. 5, p. 673-681, 2002.

MCEVER, R. P. Selectins: Initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovasc Res**, v. 107, n. 3, p. 331-339, 2015.

MCEVER, R. P.; ZHU, C. Rolling cell adhesion. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 26, n., p. 363-396, 2010.

MCFARLANE, E. et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with leishmania donovani. **Infect Immun**, v. 76, n. 2, p. 532-541, 2008.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MCLAUGHLIN, F. et al. Tumor necrosis factor (tnf)-alpha and interleukin (il)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (icam)-2 expression on the endothelium. **Cell Adhes Commun**, v. 6, n. 5, p. 381-400, 1998.

MEHL, A. M. et al. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by epstein-barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa b to activate transcription. **J Biol Chem**, v. 276, n. 2, p. 984-992, 2001.

MOLL, H. et al. 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.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTRESOR, A. et al. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. **Front Immunol**, v. 3, n., p. 127, 2012.

MORRIS, R. V. et al. Sandfly maxadilan exacerbates infection with leishmania major and vaccinating against it protects against l. Major infection. **J Immunol**, v. 167, n. 9, p. 5226-5230, 2001.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of leishmania. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 286-296, 2011.

MULLER, W. A. Transendothelial migration: Unifying principles from the endothelial perspective. **Immunol Rev**, v. 273, n. 1, p. 61-75, 2016.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. Xxii. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 52, n. 1, p. 145-176, 2000.

NGO, V. N.; TANG, H. L.; CYSTER, J. G. Epstein-barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive t cells and activated b cells. **J Exp Med**, v. 188, n. 1, p. 181-191, 1998.

NIESSEN, C. M.; LECKBAND, D.; YAP, A. S. Tissue organization by cadherin adhesion molecules: Dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 691-731, 2011.

ODEGAARD, J. I. et al. Macrophage-specific ppargamma controls alternative activation and improves insulin resistance. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1116-1120, 2007.

OLSON, T. S.; LEY, K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, n. 1, p. R7-28, 2002.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**, v. 69 Suppl 1, n., p. S10-18, 2014.

PAN, S. Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 7, p. 1669-1682, 2009.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

PIERRES, A.; BENOLIEL, A. M.; BONGRAND, P. Studying molecular interactions at the single bond level with a laminar flow chamber. **Cell Mol Bioeng**, v. 1, n. 4, p. 247-262, 2008.

PIERRES, A. et al. Cell membrane alignment along adhesive surfaces: Contribution of active and passive cell processes. **Biophys J**, v. 84, n. 3, p. 2058-2070, 2003.

PIERRES, A. et al. Dynamic adhesion of cd8-positive cells to antibody-coated surfaces: The initial step is independent of microfilaments and intracellular domains of cell-binding molecules. **J Cell Biol**, v. 125, n. 4, p. 945-953, 1994.

PINHEIRO, N. F., JR. et al. Leishmania infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infect Immun**, v. 74, n. 7, p. 3912-3921, 2006.

PROUDFOOT, A. E.; UGUCCIONI, M. Modulation of chemokine responses: Synergy and cooperativity. **Front Immunol**, v. 7, n., p. 183, 2016.

PRYCE, G.; SANTOS, W.; MALE, D. An assay for the analysis of lymphocyte migration across cerebral endothelium in vitro. **J Immunol Methods**, v. 167, n. 1-2, p. 55-63, 1994.

RAVI, M.; RAMESH, A.; PATTABHI, A. Contributions of 3d cell cultures for cancer research. **J Cell Physiol**, v., n., p., 2016.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res Vet Sci**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of leishmania major through recruitment of tlr4 by neutrophil elastase. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3988-3994, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate leishmania major infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.

ROBERT, P. et al. What is the biological relevance of the specific bond properties revealed by single-molecule studies? **J Mol Recognit**, v. 20, n. 6, p. 432-447, 2007.

ROBERT, P. et al. A novel leukocyte adhesion deficiency iii variant: Kindlin-3 deficiency results in integrin- and nonintegrin-related defects in different steps of leukocyte adhesion. **J Immunol**, v. 186, n. 9, p. 5273-5283, 2011.

ROBERT, P. et al. Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion. **Biophys J**, v. 95, n. 8, p. 3999-4012, 2008.

ROBERT, P. et al. Biophysical description of multiple events contributing blood leukocyte arrest on endothelium. **Front Immunol**, v. 4, n., p. 108, 2013.

ROCHA-PERUGINI, V. et al. Tetraspanins cd9 and cd151 at the immune synapse support t-cell integrin signaling. **Eur J Immunol**, v. 44, n. 7, p. 1967-1975, 2014.

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Dev Biol**, v. 341, n. 1, p. 126-140, 2010.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, n., p. 453-483, 2001.

SALLUSTO, F.; BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nat Immunol**, v. 9, n. 9, p. 949-952, 2008.

SANZ, A. B. et al. Macrophages and recently identified forms of cell death. **Int Rev Immunol**, v. 33, n. 1, p. 9-22, 2014.

SARANGAPANI, K. K. et al. Low force decelerates l-selectin dissociation from p-selectin glycoprotein ligand-1 and endoglycan. **J Biol Chem**, v. 279, n. 3, p. 2291-2298, 2004.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHMIDT, E. P. et al. Adhesion molecules: Master controllers of the circulatory system. **Compr Physiol**, v. 6, n. 2, p. 945-973, 2016.

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 26, n., p. 421-452, 2008.

SHAMRI, R. et al. Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended lfa-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. **Nat Immunol**, v. 6, n. 5, p. 497-506, 2005.

SHIO, M. T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **J Trop Med**, v. 2012, n., p. 819512, 2012.

SHYY, J. Y.; CHIEN, S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. **Circ Res**, v. 91, n. 9, p. 769-775, 2002.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, n., p. 151-185, 2005.

SIMS, T. N.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: Integrins take the stage. **Immunol Rev**, v. 186, n., p. 100-117, 2002.

SRIVASTAVA, A. et al. Identification of tlr inducing th1-responsive leishmania donovani amastigote-specific antigens. **Mol Cell Biochem**, v. 359, n. 1-2, p. 359-368, 2012.

STAMPER, H. B., JR.; WOODRUFF, J. J. An in vitro model of lymphocyte homing. I. Characterization of the interaction between thoracic duct lymphocytes and specialized high-endothelial venules of lymph nodes. **J Immunol**, v. 119, n. 2, p. 772-780, 1977.

_____. Lymphocyte homing into lymph nodes: In vitro demonstration of the selective affinity of recirculating lymphocytes for high-endothelial venules. **J Exp Med**, v. 144, n. 3, p. 828-833, 1976.

STEIGERWALD, M.; 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.

STRAZZA, M. et al. Static adhesion assay for the study of integrin activation in t lymphocytes. **J Vis Exp**, v., n. 88, p., 2014.

TEES, D. F.; GOETZ, D. J. Leukocyte adhesion: An exquisite balance of hydrodynamic and molecular forces. **News Physiol Sci**, v. 18, n., p. 186-190, 2003.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan leishmania infantum chagasi. **Infect Immun**, v. 79, n. 1, p. 108-117, 2011.

TRAUB, O.; BERK, B. C. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 5, p. 677-685, 1998.

UENO, N. et al. Real-time imaging of toxoplasma-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 4, p. 580-595, 2014.

VAN KOOYK, Y.; VAN VLIET, S. J.; FIGDOR, C. G. The actin cytoskeleton regulates lfa-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 26869-26877, 1999.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of leishmania spp.: Invading and evading. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat Rev Immunol**, v. 15, n. 11, p. 692-704, 2015.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiol Rev**, v. 79, n. 1, p. 181-213, 1999.

WANG, H.; LIM, D.; RUDD, C. E. Immunopathologies linked to integrin signalling. **Semin Immunopathol**, v. 32, n. 2, p. 173-182, 2010.

WAYMAN, A. M. et al. Triphasic force dependence of e-selectin/ligand dissociation governs cell rolling under flow. **Biophys J**, v. 99, n. 4, p. 1166-1174, 2010.

WHEAT, W. H. et al. Lutzomyia longipalpis salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of cd80/86, ccr7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic t cells. **J Immunol**, v. 180, n. 12, p. 8286-8298, 2008.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Mol Microbiol**, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: An epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 91, n. 22, p. 287-296, 2016.

XIE, J.; TATO, C. M.; DAVIS, M. M. How the immune system talks to itself: The varied role of synapses. **Immunol Rev**, v. 251, n. 1, p. 65-79, 2013.

YAGO, T. et al. Catch bonds govern adhesion through l-selectin at threshold shear. **J Cell Biol**, v. 166, n. 6, p. 913-923, 2004.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Leishmania infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin

Received: 10 March 2015

Accepted: 10 July 2015

Published: 07 August 2015

Cláudio Pereira Figueira¹, Djalma Gomes Ferrão Carvalhal^{1,2}, Rafaela Andrade Almeida¹, Micely d' El-Rei Hermida¹, Dominique Touchard³, Phillipe Robert³, Anne Pierres³, Pierre Bongrand³ & Washington LC dos-Santos¹

Contact with *Leishmania* leads to a decreases in mononuclear phagocyte adherence to connective tissue. In this work, we studied the early stages of bond formation between VLA4 and fibronectin, measured the kinetics of membrane alignment and the monocyte cytoplasm spreading area over a fibronectin-coated surface, and studied the expression of high affinity integrin epitope in uninfected and *Leishmania*-infected human monocytes. Our results show that the initial VLA4-mediated interaction of *Leishmania*-infected monocyte with a fibronectin-coated surface is preserved, however, the later stage, leukocyte spreading over the substrate is abrogated in *Leishmania*-infected cells. The median of spreading area was $72 [55-89] \mu\text{m}^2$ for uninfected and $41 [34-51] \mu\text{m}^2$ for *Leishmania*-infected monocyte. This cytoplasm spread was inhibited using an anti-VLA4 blocking antibody. After the initial contact with the fibronectin-coated surface, uninfected monocyte quickly spread the cytoplasm at a $15 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ratio whilst *Leishmania*-infected monocytes only made small contacts at a $5.5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ratio. The expression of high affinity epitope by VLA4 (from $39 \pm 21\%$ to $14 \pm 3\%$); and LFA1 (from $37 \pm 32\%$ to $18 \pm 16\%$) molecules was reduced in *Leishmania*-infected monocytes. These changes in phagocyte function may be important for parasite dissemination and distribution of lesions in leishmaniasis.

Leishmaniasis is a disease caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania*. Infected sand flies transmit the disease through the skin during blood feeding. Once inoculated into the skin, *Leishmania* infects mononuclear phagocytes. The infected cells may remain at the inoculation site or disseminate through the body, causing lesions in the skin, mucosae or internal organs¹⁻³. The disease is characterized by skin and mucosal ulcers or by fever, emaciation, hepatosplenomegaly, hypersplenism, anemia, thrombocytopenia and increased susceptibility to bacterial infections, leading to death⁴.

The mechanisms that control *Leishmania* dissemination through different host tissues are poorly understood. However, evidence suggests that *Leishmania* infection and the parasite burden modulate the migratory capability of mononuclear phagocytes^{5,6}. In previous studies, we showed that infection with different *Leishmania* species (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* or *L. infantum*) impairs the adherence of monocytes and macrophages to connective tissue⁷. Such impairment in leukocyte adhesion is due to interference with integrin function⁵. For example, the inhibitory effect of *Leishmania* infection on inflammatory macrophage adherence to fibronectin is reversed by replacement of the Ca^{++} and Mg^{++} present in the medium with Mn^{++} , which causes signaling-independent integrin activation⁵. Furthermore,

¹Fundação Oswaldo Cruz-Bahia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Brazilian Ministry of Health, Salvador, Brazil.

²Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brazil. ³Laboratoire Adhésion Cellulaire et Inflammation, Parc Scientifique de Luminy, Aix-Marseille Université, Marseille, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to W.L.C.S. (email: wluis@bahia.fiocruz.br)

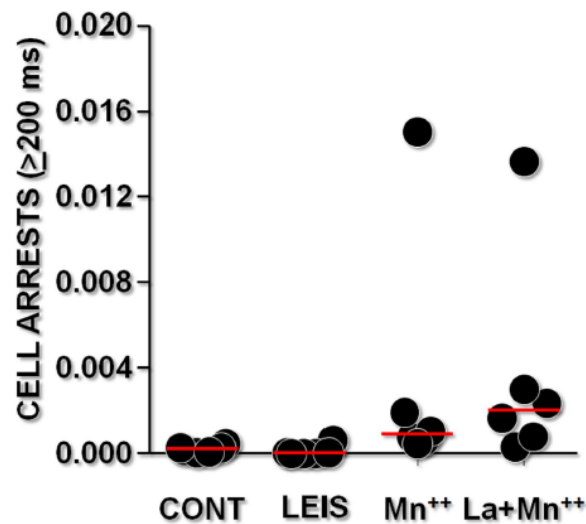


Figure 1. Monocyte adhesion under flow. Monocytes cultured alone or with *Leishmania* were driven along fibronectin-coated surfaces in a laminar flow chamber in medium alone or in medium containing 10 mM MnCl₂. The trajectories of the individual cells were monitored for 2 min for quantitative determination of the number of total detectable arrests with durations between ~200 ms and 2 min.

infection with *Leishmania* downregulates the expression of the genes encoding the chemokine receptors CCR4 and CCR5 in murine inflammatory macrophages and the genes encoding CCR2 and CCR5 in murine dendritic cells⁵⁶. In addition, *Leishmania* infection leads to decreased dendritic cell migration in response to the chemokines CCL2 and CCL3 in murine dendritic cells⁶. The function of VLA4, a β1 integrin involved in leukocyte adhesion to fibronectin, is modulated by *Leishmania* infection⁵. This molecule may be present on the leukocyte surface in different conformations, and it mediates rolling or firm adherence of the cell to the substrate⁸. When macrophages adhere firmly to the substrate, they spread extensively. This spreading stabilizes the adherence and allows cell haptotaxis toward increasing chemokine concentrations⁹. Hence, coordinated VLA4 activation is crucial for cell emigration or retention in the tissues.

In this work, we expand the observations of our previous studies on the impairment of *Leishmania*-infected macrophage adhesion to connective tissue. We examine the effect of *Leishmania* infection on the rolling and spreading of infected monocytes over fibronectin. We used a flow chamber and applied an algorithm to measure different parameters of monocyte rolling. The kinetics of monocyte spreading over fibronectin was examined by interference reflection microscopy (IRM), and the spreading area was estimated by morphometric analysis using scanning electron microscopy. Furthermore, we used a reporter antibody to study the affinity state of the VLA4 expressed by infected and uninfected monocytes.

Results

Rolling of *Leishmania*-infected monocytes on fibronectin. To identify *Leishmania*-induced changes in the VLA4-mediated rolling of monocytes, we used an *in vitro* model of laminar flow to compare this adhesion step in uninfected and *Leishmania*-infected cells. *Leishmania*-infected monocytes displayed numerous transient arrests, with a frequency comparable with that found for uninfected monocytes (Fig. 1). After Mn⁺⁺ stimulation, the frequency of arrests increased in both uninfected and *Leishmania*-infected monocytes. Taken together, these results demonstrate that *Leishmania* infection did not interfere with VLA4-mediated monocyte rolling or initial binding to fibronectin.

Spreading of *Leishmania*-infected human monocytes on fibronectin. Because we did not observe changes in the initial step (rolling) of infected monocyte adherence to fibronectin, we used SEM to compare the cytoplasmic spreading of uninfected and *Leishmania*-infected human monocytes on fibronectin. Most of the monocytes cultured with medium alone displayed a flattened cell phenotype with extensive cytoplasmic spreading and irregular edges (Fig. 2A). Uninfected monocytes cultured with medium alone or cultured with 3 μm latex beads showed similar phenotypes (Fig. 2E), as did uninfected monocytes treated with Mn⁺⁺ just before the adhesion assay (used as a control for high-affinity adhesion, Fig. 2D). On the other hand, most of the monocytes cultured with *Leishmania* had a rounded morphology with low levels of cytoplasmic spreading (Fig. 2B), which was similar to the morphology observed when the monocytes were treated with EDTA before the adhesion assay (used as a negative control for

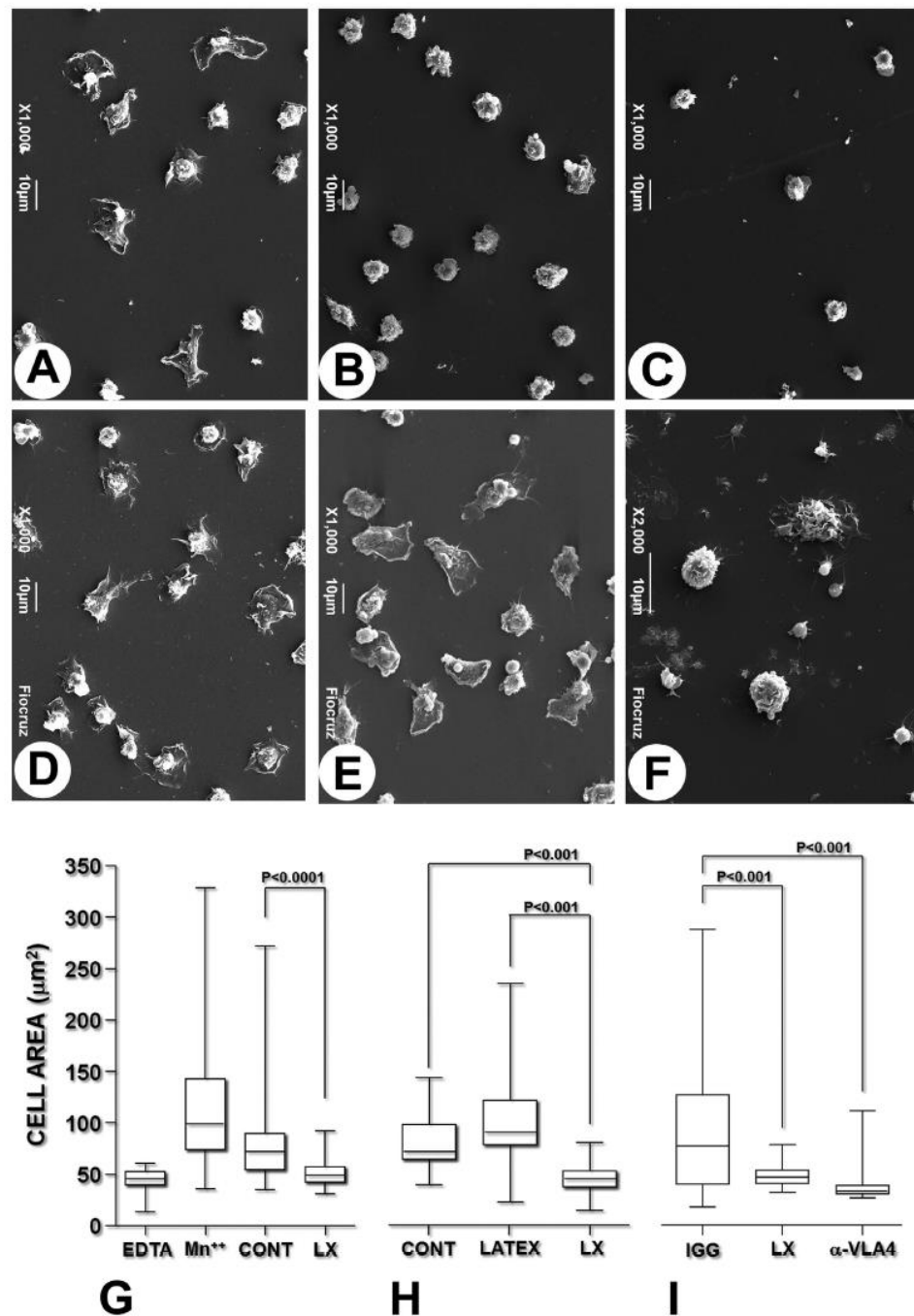


Figure 2. Spreading of human monocyte cytoplasm on fibronectin after *Leishmania* infection. Peripheral blood monocytes were cultured with medium alone (A,C,D,F) or with medium containing *Leishmania* (B) or 3 μM latex beads (E) for 18 h. The cells were then allowed to adhere for 1 h to fibronectin-coated coverslips: (A) – Uninfected (control) monocytes; (B) – monocytes cultured with *Leishmania*; (C) – uninfected cells treated with 0.5 mM EDTA; (D) – uninfected cells treated with 0.5 mM MnCl₂; (E) – uninfected cells cultured with latex beads; (F) – uninfected cells treated with anti-VLA4 antibody. The graph shows the area over which the cytoplasm of the monocytes had spread after the various treatments. The data are representative of six (G) and two (H,I) different experiments (Kruskal-Wallis test).

cytoplasmic spreading, Fig. 2C). The spread area (μm^2) of the monocyte cytoplasm, 72 [55–89] (median [lower and upper quartiles]), was larger for the monocytes cultured with medium alone than for the monocytes cultured with *Leishmania* (49 [43–57]; Mann-Whitney test, $P < 0.0001$, Fig. 2G).

Treatment with the anti- $\alpha 4$ chain 9F10 anti-VLA4 blocking antibody inhibited monocyte spreading to the same extent as exposure of the cells to *Leishmania* (Fig. 2F,I).

To determine whether monocyte infection with *Leishmania* was specifically necessary for the inhibition of cytoplasmic spreading, we combined SEM with amastigote identification in the interior of the monocytes using a technique described by Jiménez and colleagues (2010) (Fig. 3)¹⁰. The area of the cytoplasmic spread of the amastigote-containing monocytes (41 [34–51]) was smaller than that observed for monocytes cultured with medium alone (66 [47–89], $P < 0.05$) or that for monocytes that had been cultured with the parasites but did not contain amastigotes (53 [44–73], $P < 0.05$, Fig. 3D).

Monocyte-*Leishmania* contact and leukocyte adherence to connective matrix components. To confirm that infection—and not soluble substances released by the *Leishmania* or by the infected leukocytes—would interfere with monocyte adherence to connective matrix components, we performed an adhesion assay using monocytes cultured in contact with the parasites or separated from them by a permeable membrane in transwell chambers. Only monocytes that were cultured in contact with *Leishmania* displayed decreased adherence to fibronectin or to collagen (Fig. 4). The monocytes in contact with the parasite showed a 96.2% decrease in adherence to fibronectin and a 92.5% decrease in adherence to collagen in comparison with the uninfected control monocytes cultured with medium alone. Monocytes cultured in a chamber separate from the one containing the *Leishmania* showed no change in adherence to the connective matrix components (Fig. 4).

Kinetics of cell–surface contact between *Leishmania*-infected monocytes and fibronectin.

Because we showed that the spreading capacity was impaired in *Leishmania*-infected monocytes, we used IRM to compare the kinetics of membrane contact of infected and uninfected monocytes with fibronectin-coated coverslips. Upon contact with the surface, uninfected monocytes quickly began to spread and initiated stable adhesion (Fig. 5A and supplementary video S1), while the *Leishmania*-infected monocytes contacted the substrate only through small and unstable adhesion areas (Fig. 5B and supplementary video S2). The uninfected monocyte–substrate contact area linearly increased at a rate of approximately $15\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, which was three-fold higher than the rate of *Leishmania*-infected monocytes ($5.5\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, Fig. 5C). The final area of cytoplasmic spread of *Leishmania*-infected monocytes ($22.8\mu\text{m}^2$) was smaller than that of the uninfected cells ($67.98\mu\text{m}^2$, $P < 0.0004$, Fig. 5D).

Integrin activation on *Leishmania*-infected human monocytes. Integrin molecules may assume different conformational states, which may correlate with their affinity for their ligands⁸¹¹. We estimated the percentage of cells expressing a high-affinity VLA4 epitope in uninfected and *Leishmania*-infected monocytes using a reporter monoclonal antibody (HUTS-4) and flow cytometry. The expression of high-affinity $\beta 1$ -integrin was lower among the *Leishmania*-infected monocytes ($14 \pm 3\%$) than among the uninfected monocytes ($36 \pm 21\%$, Fig. 6A). Interestingly, even after stimulation with Mn^{++} , the expression of the high-affinity VLA4 epitope was lower in the *Leishmania*-infected monocytes ($35 \pm 5\%$) than in the uninfected monocytes ($68 \pm 5\%$, Fig. 6B).

To determine whether this disturbance in the integrin configuration was restricted to VLA4 or was a more generalized effect of *Leishmania* infection, we studied the expression of the high-affinity epitope of LFA1, a beta-2 integrin expressed by leukocytes. The expression of the LFA1 high-affinity epitope was lower in *Leishmania*-infected monocytes ($18 \pm 16\%$) than in uninfected monocytes ($37 \pm 32\%$, Fig. 7A). Even after stimulation with Mn^{++} , the expression of the LFA1 high-affinity epitope remained lower in the *Leishmania*-infected monocytes ($52 \pm 13\%$) than in the uninfected monocytes ($67 \pm 20\%$); however, this difference was not statistically significant (Fig. 7B).

Discussion

In previous studies, we demonstrated that co-culture with *Leishmania* inhibits mononuclear phagocyte adhesion to connective tissue and extracellular matrix components⁵⁷. This decrease in leukocyte adhesion correlated with the parasite burden in these mononuclear phagocytes and was reversed by integrin activation with Mn^{++5} . There were no consistent changes in adhesion molecules expression in *Leishmania*-infected cells⁵⁷. These observations suggest that the control of integrin function rather than integrin expression was impaired in infected cells. In this work, we expand our investigation of the effects of *Leishmania* infection on monocyte adhesion. We examined the early stages of VLA4-mediated bond formation between the connective matrix and the cells under conditions of flow, and we observed the late stages of integrin-mediated phagocyte spreading over the substrate. The data presented here show that early bond formation during monocyte interaction with the connective matrix remains unchanged; however, the subsequent cytoplasmic spreading over the extracellular matrix components is inhibited by *Leishmania* infection. We also revealed decreased expression of the high-affinity epitopes of the integrins on infected monocytes and confirmed that infection, and not simply contact with *Leishmania*, is necessary for inducing changes in monocyte adhesion.

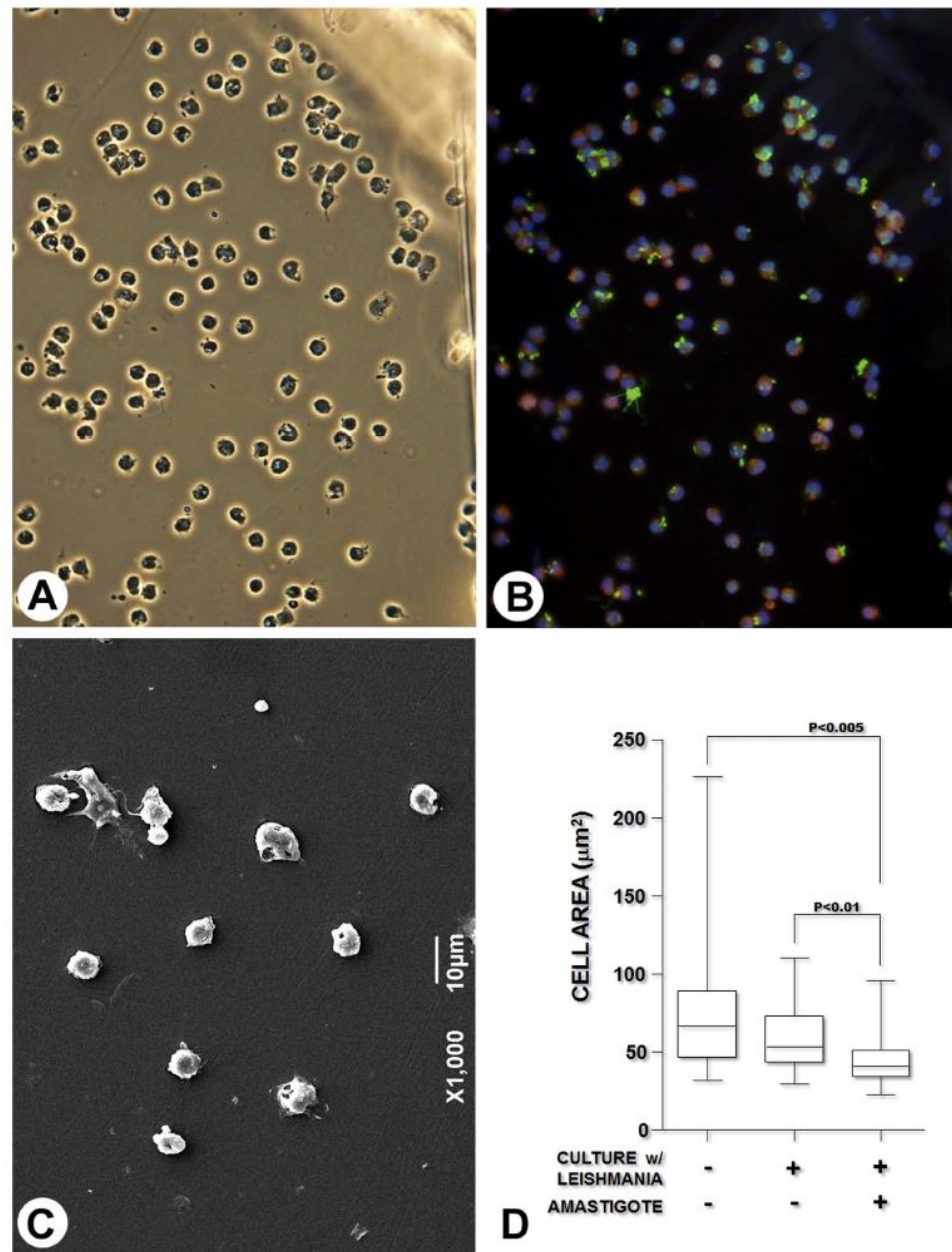


Figure 3. Correlative analysis of the cytoplasmic spreading of human monocytes cultured with medium alone or with medium containing *Leishmania*. The cells were allowed to adhere to precoated Aclar coverslips containing a grid to allow the identification of the same cell in immunofluorescence and scanning electron microscopy preparations as described in Materials and Methods. **(A)** – Phase contrast image showing the cells adhered to the Aclar membrane with part of the grid used as a reference. **(B)** – Immunofluorescence image showing uninfected human monocytes or monocytes containing *Leishmania* amastigotes (blue = DAPI; red = phalloidin; green = *Leishmania* amastigotes). **(C)** – Scanning electron microscopy image showing the area corresponding to the insert in part B. **(D)** – Graphical representation of the area of cytoplasmic spread of uninfected monocytes cultured with medium alone (without contact with *Leishmania*), uninfected monocytes cultured with *Leishmania* or monocytes containing amastigotes (Kruskal-Wallis test).

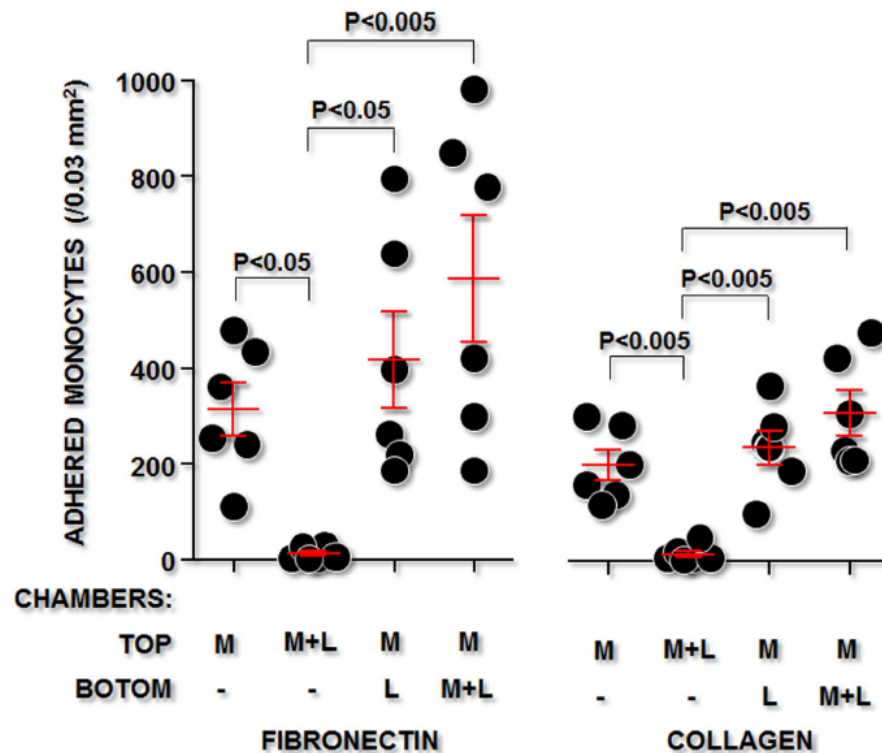


Figure 4. The effect of soluble factors from *Leishmania* on the adhesion capacity of human monocytes. Human monocytes were cultured in the top chamber of transwell modules either alone (M) or with *Leishmania* (M + L). The bottom chamber contained medium, *Leishmania* (L), or macrophages and *Leishmania* (M + L). After 24 h, the cells in the top chamber were collected and subjected to the adhesion assay on surfaces coated with fibronectin or collagen.

VLA4 may be present in different conformations on the leukocyte surface, allowing tethering, rolling or firm adhesion to endothelial cells and matrix components, such as fibronectin, that may be distributed in the connective matrix or on bound to the endothelial cell surface^{8,12}. We used a flow chamber to investigate whether *Leishmania* infection would change these early contacts mediated by the VLA4 integrin. Flow chambers have been used to mimic leukocyte–endothelial interactions in blood vessels. However, these chambers also provide a highly sensitive means of detecting individual bond formation and rupture when they are operated with a shear rate on the order of 10 s^{-1} in association with an image processing system that can allow the detection of events only a few tens of milliseconds in duration¹³. As shown in this work, human monocytes were able to form low-frequency binding contacts with collagen or fibronectin that allowed the monocytes to roll over the surfaces covered with these connective matrix components. The kinetics of this process was not altered after monocyte co-cultivation with *Leishmania*. Even when Mn^{++} was used to induce integrin activation, both control and infected cells displayed a similar increase in adhesion frequency and in adhesion strengthening. This result suggests that *Leishmania* infection did not affect the capability of integrin to mediate the initial binding to connective matrix components.

In static models of leukocyte adhesion to endothelial cells or to connective tissue components, the initial integrin-mediated binding is followed by progressive spreading of the cell cytoplasm, as shown in our previous work and confirmed in this study^{5,14}. This step involves an extensive reorganization of leukocyte adhesion receptors and the cellular cytoskeleton to allow close membrane contact with the substrate¹⁵. The process is triggered upon contact with a small region of the membrane that expands to a large area, and it involves membrane deformability and changes in the conformation/affinity and alignment of adhesion receptors¹⁶. In this study, we used IRM to monitor these events during adherence of uninfected and *Leishmania*-infected monocytes to fibronectin-coated coverslips. Although the *Leishmania*-infected monocytes developed protrusions of the membrane after the first contact with the substrate, they were not able to spread their cytoplasm over the fibronectin-coated surface; instead, only small contact zones were maintained. This observation was further corroborated by morphometric assessment of the area of the substrate covered by cytoplasm using scanning electron microscopy. Uninfected control cells flattened and exhibited wide and thin cytoplasmic expansion over the fibronectin during the

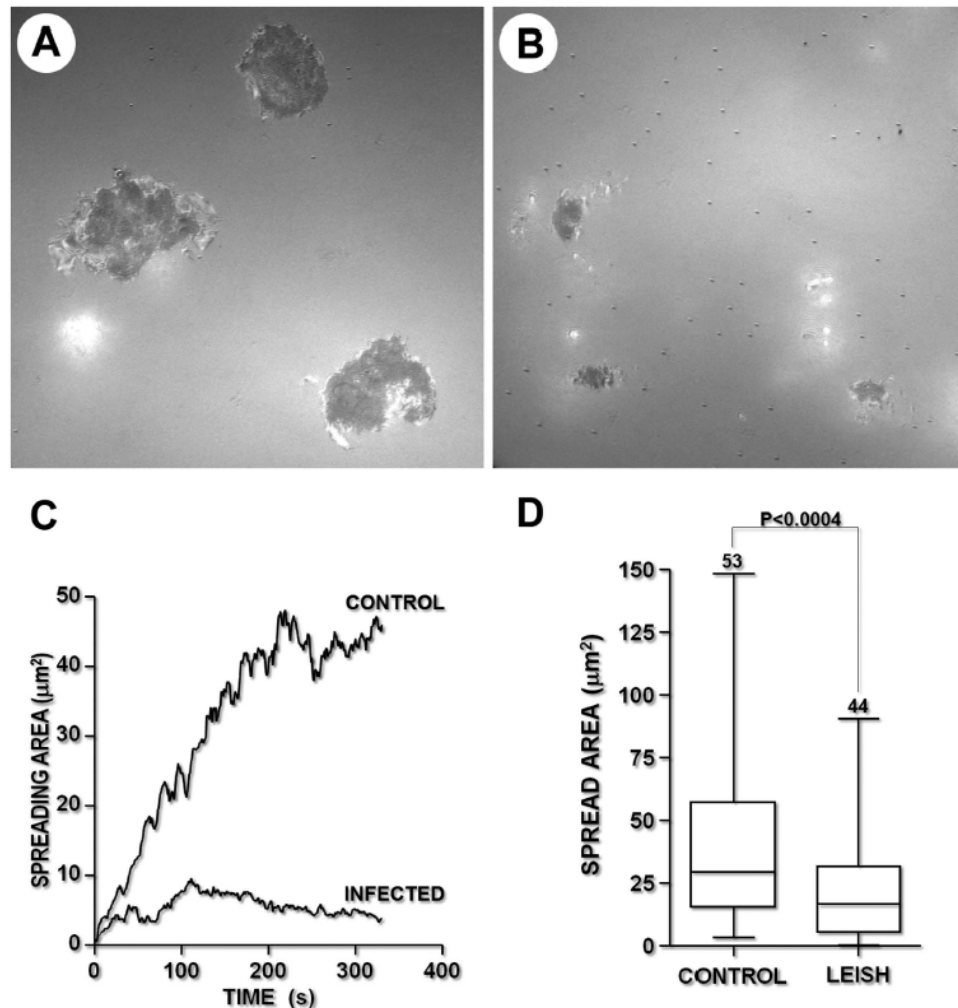


Figure 5. Kinetics of the cytoplasmic spreading of uninfected (A) or *Leishmania*-infected (B) human monocytes on a fibronectin-coated surface, estimated by IRM. The data on the kinetics of cytoplasmic spreading are shown in graph C, which shows uninfected monocytes (CONTROL) and monocytes cultured with *Leishmania* (INFECTED). (D): Estimate of the cell contact area obtained from random fields. The graph is representative of four independent experiments. Scale bar, 5 μm .

60 min incubation period. The cytoplasmic spreading was inhibited in the presence of VLA4-blocking antibodies. Most of the *Leishmania*-infected monocytes remained round or emitted only small cytoplasmic projections, appearing similar to those observed in the presence of the anti-VLA4 antibody. Taken together, these observations suggest that although leukocyte membrane deformability may be preserved in *Leishmania*-infected cells, infection interferes with the mechanisms that control integrin function. At least two different processes are involved in integrin-mediated firm adherence of leukocytes to the connective tissue: changes in integrin affinity and integrin aggregation in small clusters at the adhesion points¹⁷. Both of these processes are potentially affected by *Leishmania* infection: *Leishmania* infection may disrupt lipid raft formation on the leucocyte surface. This change may affect integrin clustering at the focal adhesion points¹⁸. In this study, using conformation reporter antibodies in flow cytometry, we showed a decrease in expression of the high-affinity VLA4 epitope on the surfaces of *Leishmania*-infected cells.

The mechanisms of affinity regulation and capacity to mediate rolling or firm adhesion differ among integrin families. The lack of the I domain in the VLA4 alpha chain may be responsible for most of these functional differences⁸. However, in this study, we showed that *Leishmania* infection induced lower expression of the high-affinity epitopes of both beta-1 (VLA4) and beta-2 (LFA1) integrins. This observation suggests that a more general impairment in the inside-out pathways of integrin activation is present during *Leishmania* infection. For instance, *Leishmania* infection has an inhibitory effect on a variety of

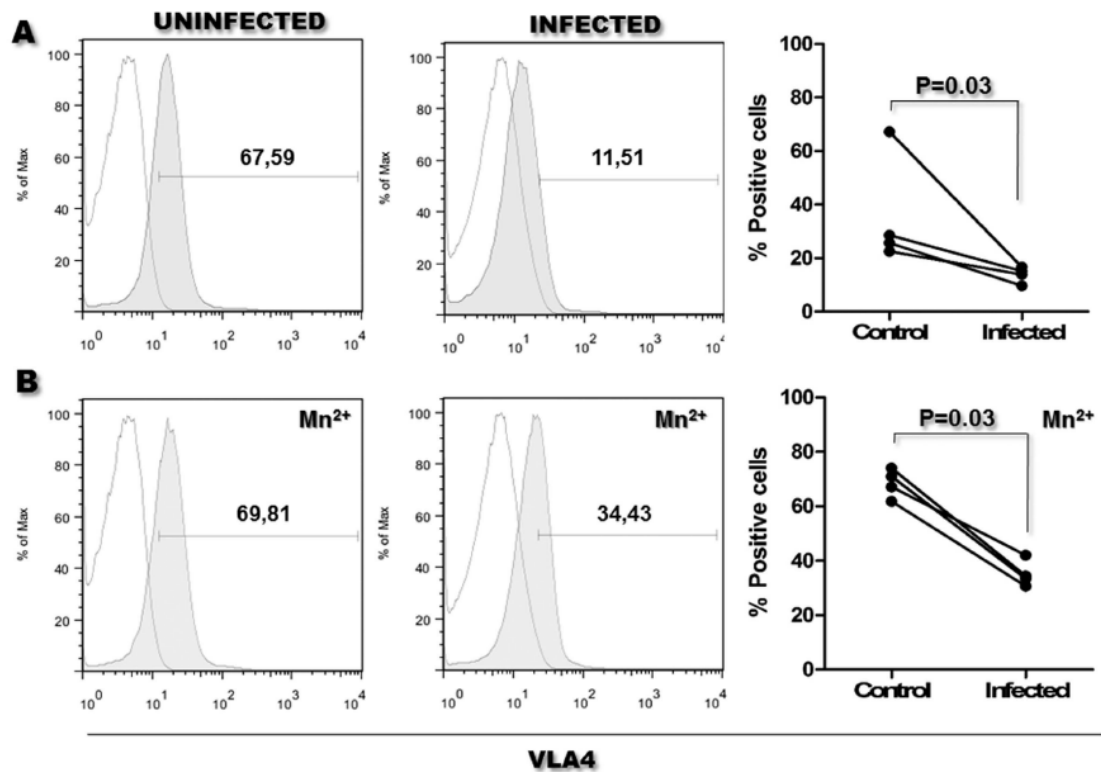


Figure 6. High-affinity VLA-4 epitope expression on infected monocytes. For single-color staining, 1×10^6 monocytes were cultivated in medium alone or in medium containing *Leishmania*. The cells were resuspended in medium alone (A) or in medium containing Mn^{2+} (B). The cells were then stained with an anti-VLA4 high-affinity epitope antibody and analyzed by flow cytometry. Empty histograms: cells incubated with isotype control antibody. Grey histograms: cells incubated with the anti-VLA4 high-affinity epitope antibody. Scatterplots: Each pair of data connected by line represents an independent experiment using the same batch of monocytes, cultured with medium alone (Control) or with medium containing *Leishmania* (Infected) (Mann-Whitney test).

signal transduction pathways potentially affecting integrin function (reviewed by Shio and colleagues in 2012¹⁹). Furthermore, *Leishmania* infection decreases the gene expression of various chemokine receptors by mice mononuclear phagocytes^{5,6}. Further studies are necessary to investigate the pathways leading to the changes in integrin affinity reported in this study and whether the capability to form integrin clusters at the cell-substrate interface is also altered in *Leishmania*-infected cells.

Toxoplasma gondii, another intracellular protozoan, promotes a similar effect, inhibiting the adherence and cytoplasmic spread of human monocytes over endothelial cell monolayers²⁰. The decrease in cytoplasmic spreading after leukocyte contact with *Leishmania* was not observed when the cells were incubated with $3 \mu m$ latex particles, which are the same size as the parasite. These data suggest that phagocytosis alone or cell deformation by internalized particles was not sufficient to disturb the function of integrins on the infected cells. In contrast, infection of the monocytes was required for the inhibition of their spreading capacity. Only a non-significant trend toward a decrease in the cytoplasmic area was observed in monocytes that contained no amastigotes after co-culture with *Leishmania*. This observation concurs with the experiments using transwell chambers shown in this study. In these experiments, uninfected monocytes subjected to soluble molecules potentially released by *Leishmania* promastigotes or by *Leishmania*-infected cells had no change in adherence to the connective tissue. Moreover, in a previous study, we showed that, although incubation with live infectious *Leishmania* inhibited inflammatory macrophage adhesion to fibronectin, incubation of leukocytes with killed amastigotes, even at a high parasite-to-macrophage ratio, produced no changes in leukocyte adherence to fibronectin⁵.

Finally, integrins are important for cell migration and homing in different tissues. They are also involved in the cellular signaling that leads to lymphocyte priming and activation. The impairment in leukocyte integrin function shown here may interfere with the course of *Leishmania* infection. In cutaneous leishmaniasis, promastigotes are injected into the skin, where they infect leukocytes. These leukocytes may remain at the injection site or migrate to the draining lymph nodes where they present parasite

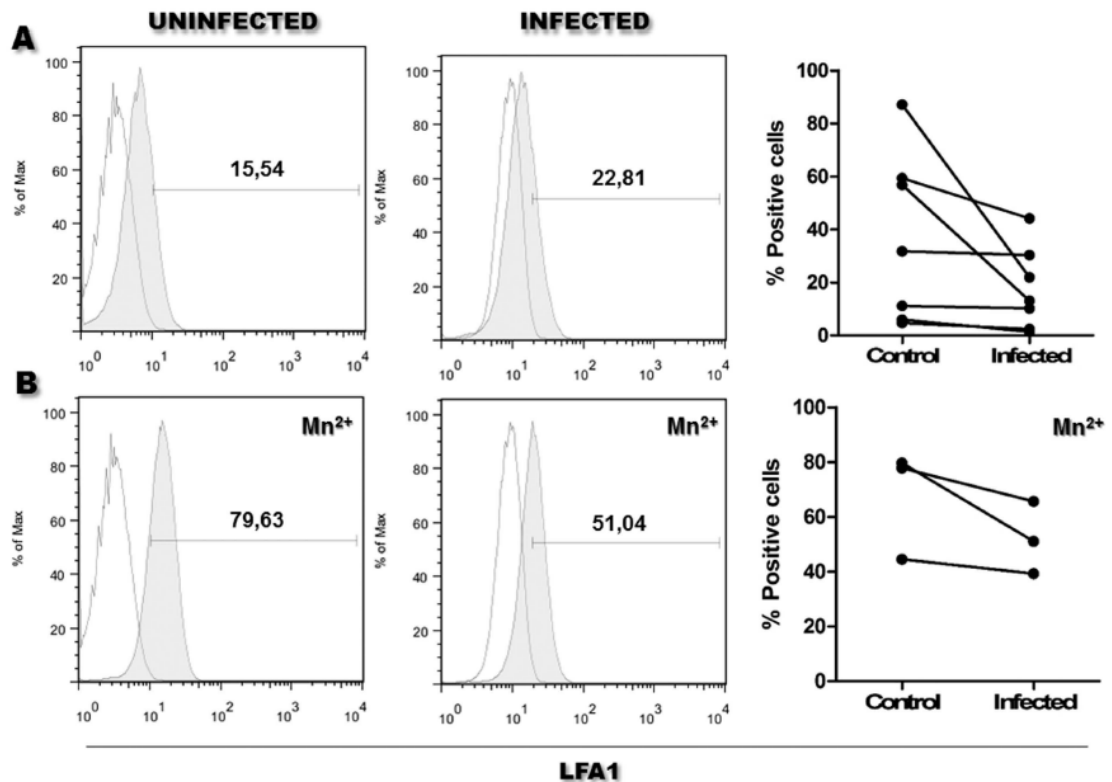


Figure 7. High-affinity LFA1 epitope expression on infected monocytes. For single-color staining, 1×10^6 monocytes were cultured in medium alone or in medium containing *Leishmania*. The cells were resuspended in medium alone (A) or in medium containing Mn²⁺ (B). The cells were then stained with a specific LFA1 high-affinity epitope marker and analyzed by flow cytometry. Empty histograms cells incubated with isotype control antibody. Grey histograms cells incubated with the anti-LFA1 high affinity epitope antibody. Scatterplots: Each pair of data connected by line represents an independent experiment using the same batch of monocytes, cultured with medium alone (Control) or with medium containing *Leishmania* (Infected) (Not significant Mann-Whitney test).

antigens to T lymphocytes. In a recent study, we showed that dendritic cells migrate less efficiently from an inflammatory site to a draining lymph node after coculture with *Leishmania*³. The persistence of these cells at the inoculation site may favor the late development of ulcers in the skin. Both LFA1 and VLA4 participate in assembly and signaling through the immunological synapse during lymphocyte activation. Further studies are necessary to investigate the potential modulatory effect of integrin dysfunction during the disease caused by *L. amazonensis* and other *Leishmania* species capable of changing phagocyte adhesion⁷.

Materials and Methods

Ethics statement. The study was conducted in accordance with resolution No. 196/96 of the Brazilian National Health Council. The only human specimen used was peripheral blood monocytes isolated from discarded buffy-coats from undisclosed donors. All the procedures are in accordance with the Helsinki Declaration of 1964 and were approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Subjects of Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz-BA (Decision No. 262/2012).

Human monocytes. Peripheral blood monocytes were isolated from healthy volunteers or from buffy coats provided by the Etablissement Français du Sang (EFS) or the Hemocenter of Bahia (HEMOBA). Peripheral blood mononuclear cells were purified by centrifugation over a Ficoll-Paque™ Plus solution (GE Health care, Sweden). Monocytes were obtained using a Percoll (Pharmacia, Sweden) gradient, as previously described²¹, or by negative selection using magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA). The monocytes were cultured in complete RPMI (Gibco, USA) - RPMI containing 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 50 mg/mL gentamicin (Sigma-Aldrich, USA).

Parasites and phagocyte infections. Stationary phase *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 or LV79 strain) parasites were grown in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, USA) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 50 mg/mL gentamicin at 24 °C. The monocytes were resuspended at 2×10^6 /mL in 2 mL of complete RPMI alone or containing *L. amazonensis* or 3- μ m-diameter latex beads (Sigma-Aldrich, USA), with ten parasites or particles per leukocyte. The cell suspensions were cultured for 16–18 h at 37 °C with 5% CO₂ in non-adherent polypropylene tubes, washed with HBSS (Sigma-Aldrich, USA) and utilized in the adhesion assays and flow cytometry experiments. The infection rates were estimated using cytospin preparations stained with Giemsa. In all the experiments, the infection rates were between 75 and 90%.

In some experiments, 2×10^6 monocytes/mL were cultured in the top chamber of a transwell module with a 0.4 μ m pore size (Corning, USA). The following preparations were present in the bottom chamber: (1) medium alone; (2) 2×10^7 *Leishmania* promastigotes/mL in complete RPMI; or (3) 2×10^6 monocytes/mL plus 2×10^7 promastigotes/mL in complete RPMI. The cells from the top chamber were used in the adhesion assays.

Substrate preparation for adhesion assays. The wells of 96-well plates, 12-mm-diameter glass coverslips and 12-mm-diameter Aclar® films (EMS, USA) were covered with collagen (Sigma-Aldrich, USA) or human plasma fibronectin (Sigma-Aldrich, USA) as proposed by Pinheiro and colleagues (2006)⁵.

Immunofluorescence reaction for *Leishmania* detection. The Aclar films containing adherent formaldehyde-fixed monocytes were washed with HBSS, incubated with HBSS containing bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) (1%) and Tween-20 (Ludwig Biotec, Brazil) (0.05%) (HBSS-BSA-Tween) for 30 min at RT followed by addition of a polyclonal rabbit anti-*Leishmania* antibody²² at a 1:500 dilution in HBSS-BSA-Tween for 2 h at RT. The cells were washed and incubated with an anti-rabbit antibody-Alexa488 (Invitrogen, USA) at a 1:200 dilution in HBSS-BSA-Tween at RT for 1 h. The Aclar films were mounted on a glass slide using Vectashield-DAPI mounting media (Vector, USA). Images of uninfected or amastigote-containing monocytes were recorded using a fluorescence microscope (Olympus BX51, Japan) for correlative analysis. The Aclar films were carefully removed from the slides, fixed in glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, USA) (2%) and processed for scanning electron microscopy.

Monocyte adhesion under laminar flow. The adhesion experiments were performed as described previously¹⁴. Briefly, the monocytes were subjected to laminar flow through a channel (2 mm width and 0.1 mm height) inserted into a well of a 24-well chamber. The shear rate was ~ 10 s⁻¹; thus, the cells attached to the surface were subjected to a viscous force on the order of 7 pN²³. Images were acquired with a video camera (HyperHAD; Sony France, Clichy, France) attached to an Olympus IX 50 inverted microscope with a 10 \times objective set within a closed box maintained at 37 °C. The pixel size was $1 \times 1 \mu$ m². Sequences, typically 2 min in duration, were digitized and DivX compressed with a Win-TV digitizer (Hauppauge, France) for subsequent analysis. The films were decomposed into frames using ImageJ software (1.48v; NIH, USA). Subsequently, the TrajFSerie program (written in Java) used these tables to create a file containing the trajectory of each cell. This file was processed with Igor software (Wavemetrics, EUA) to detect and measure the duration of the stops of each cell. The numbers of detectable arrests (remaining for 200 ms or longer) and the numbers of permanent arrests (i.e., arrests lasting 2 min) were thus determined.

Adhesion assays and VLA4-blocking experiments. These analyses were performed in 96-well plates, on 12-mm-diameter glass coverslips (Fisher Scientific, USA) or on 12-mm-diameter Aclar films that were previously labeled on one of their surfaces with a 1 mm grid. The wells of the 96-well plates, the glass coverslips and the Aclar film were coated with human plasma fibronectin (10 μ g/mL) for 1 h at 37 °C, washed three times in HBSS and incubated with a 0.1% solution of BSA for 30 min. The BSA solution was discarded, and the monocytes (cultured either alone or with *Leishmania*) were seeded into the wells and incubated for 1 h at 37 °C with 5% CO₂ and treated as described below. In some experiments, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ in the medium were replaced by incubating the leukocytes in 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA) for 5 min, washing in Ca⁺⁺- and Mg⁺⁺-free HBSS and resuspending the cells in HBSS containing 1% BSA and 0.5 mM MnCl₂ (Sigma-Aldrich, USA). In some experiments, interactions between VLA4 and fibronectin were blocked by incubating the cells with an anti-CD49d antibody (clone 9F10; BD Pharmingen, USA) at 20 μ g/mL for 30 min on ice before they were added to the plate. Control cells were incubated with an isotype-matched antibody (BD Pharmingen, USA).

A total of 8×10^4 cells in 200 μ L of medium were dispensed into each well of the 96-well plate. At the end of the incubation, the wells were washed four times with warm HBSS and fixed with 1% glutaraldehyde in warm HBSS.

A total of 5×10^5 cells in 500 μ L of medium were dispensed into each well of the 24-well plate containing the glass coverslips. At the end of the incubation, the medium in the wells containing the glass coverslips was carefully replaced with 2.5% glutaraldehyde and 2% freshly prepared formaldehyde, and the coverslips were processed for scanning electron microscopy.

A total of 5×10^5 cells in 500 μ L of medium were dispensed into each well of the 24-well plate containing the grid-labeled Aclar films. At the end of the incubation, the cells were fixed by carefully replacing the medium with a freshly prepared 2% formaldehyde solution, incubated overnight at 4 °C and processed for *Leishmania* identification by immunofluorescence followed by scanning electron microscopy.

Scanning electron microscopy. The coverslips or Aclar films containing attached and fixed monocytes were washed three times with 0.1 M sodium cacodylate (Aldrich-Sigma, USA) (pH 7.4) for 1 h, dehydrated in ethanol and dried using a critical point apparatus (Leica EM CPD030, Austria) with CO₂. The coverslips were mounted on aluminum stubs, sputter-coated with gold (DESCK IV; Denton Vacuum, USA), and examined using a scanning electron microscope (JSM6394LV; JEOL, Japan) operated at 12 kV. Images of randomly selected fields were collected, and the area of the cell cytoplasm was estimated using ImageJ software (1.48v; NIH, USA). The measurements were made without knowledge regarding the group memberships of each sample.

Interference Reflection Microscopy Analysis. This technique is used to study the interaction of living cells with a substrate in culture. Aliquots (2 mL) of a cell suspension containing 2×10^6 monocytes alone or 2×10^6 monocytes plus *Leishmania* at a ratio of 2 or 10 promastigotes/monocyte were incubated for 16–18 h at 37 °C with 5% CO₂. The cells were then washed three times with complete medium by centrifugation at 1500 rpm/7 min. The cell concentration was adjusted to 2.0×10^5 cells/mL, and the cells were transferred into the IRM chamber and dispensed onto coverslips coated with human plasma fibronectin that were previously positioned in the inverted microscope (Axiovert 135 Zeiss, Germany), which was equipped with a heated stage set at 37 °C. Interference reflection microscopy was performed with an antilex objective (63 \times magnification, 1.25NA). To evaluate the spreading kinetics, sequential images of the same field were acquired at a frame rate of 1 per second for 15 min after the addition of the cells to the chamber. Then, at intervals of 15 min, additional images of randomly selected fields were acquired for cell area analysis. Cell adhesion area analysis was performed using Essaiw software¹⁶.

Flow cytometry analysis. Uninfected or *Leishmania*-infected monocytes were counted and resuspended in FACS buffer (PBS containing 1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide) and treated with 5% mouse serum plus 5% FBS for 30 min on ice to block non-specific staining. The cells ($1-2 \times 10^6$) were then incubated with the following fluorescein-conjugated antibodies: HUTS-4 (anti- β 1 integrin monoclonal antibody, Milli-Mark, UK), mAb24 (anti- β 2 integrin, Hycult Biotec, USA) or an isotype-matched negative control. All antibody incubations were performed at 4 °C for 20 min and were followed by three washes with FACS buffer. The cells were analyzed on a FACSAria III flow cytometer using Diva software (Becton-Dickinson, USA).

Expression and analysis of the results. The numerical data are presented in graphical format and represent the absolute values, means, medians, lower and upper quartiles (in brackets), or proportions as stated. For comparisons of the absolute values between two groups, the Mann-Whitney test was used. For comparisons involving more than two groups, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test for selected pairs of groups was used in accordance with our experimental design²⁴. The level of significance was established at $P < 0.05$.

References

- Leon, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*. *Immunity* **26**, 519–531 (2007).
- Moll, H., Fuchs, H., Elank, C. & 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* **23**, 1595–1601 (1993).
- Hermida, M. D., Doria, P. G., Taguchi, A. M., Mengel, J. O. & dos-Santos, W. *Leishmania* amazonensis infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. *BMC Infectious Diseases* **14**, 450 (2014).
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R. & Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**, 1561–1577 (2005).
- Pinheiro, N. F., Jr. *et al.* *Leishmania* infection impairs β 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* **74**, 3912–3921 (2006).
- Steigerwald, M. & Moll, H. *Leishmania* major modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect Immun* **73**, 2564–2567 (2005).
- Carvalho, D. G. *et al.* 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 (2004).
- Chigae, A. & Sklar, L. A. Aspects of VLA-4 and LFA-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. *Frontiers in Immunology* **3**, 242 (2012).
- Montresor, A., Toffali, L., Constantin, G. & Laudanna, C. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Frontiers in Immunology* **3**, 127 (2012).
- Jimenez, N. *et al.* Gridded Aclar: preparation methods and use for correlative light and electron microscopy of cell monolayers, by TEM and FIB-SEM. *Journal of Microscopy* **237**, 208–220 (2010).
- Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P. & Humphries, M. J. Linking integrin conformation to function. *Journal of Cell Science* **122**, 165–170 (2009).
- Alon, R. *et al.* The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* **128**, 1243–1253 (1995).
- Robert, P., Sengupta, K., Puech, P. H., Bongrand, P. & Limozin, L. Tuning the formation and rupture of single ligand-receptor bonds by hyaluronan-induced repulsion. *Biophys J* **95**, 3999–4012 (2008).
- Robert, P. *et al.* A Novel Leukocyte Adhesion Deficiency III Variant: Kindlin-3 Deficiency Results in Integrin- and Nonintegrin-Related Defects in Different Steps of Leukocyte Adhesion. *J Immunol* **186**, 5273–5283 (2011).

15. van Kooyk, Y., van Vliet, S. J. & Figdor, C. G. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem* **274**, 26869–26877 (1999).
16. Pierres, A. *et al.* Cell membrane alignment along adhesive surfaces: contribution of active and passive cell processes. *Biophys J* **84**, 2058–2070 (2003).
17. Cluzel, C. *et al.* The mechanisms and dynamics of $(\alpha)v(\beta)3$ integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* **171**, 383–392 (2005).
18. Leitinger, B. & Hogg, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci* **115**, 963–972 (2002).
19. Shio, M. T. *et al.* Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J Trop Med* **2012**, 819512 (2012).
20. Harker, K. S. *et al.* *Toxoplasma gondii* modulates the dynamics of human monocyte adhesion to vascular endothelium under fluidic shear stress. *Journal of leukocyte biology* **93**, 789–800 (2013).
21. de Almeida, M. C., Silva, A. C., Barral, A. & Barral Netto, M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**, 221–223 (2000).
22. Proes, A. M. *et al.* Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species. *Vet Immunol Immunopathol* **99**, 135–141 (2004).
23. Pierres, A., Tissot, O., Malissen, B. & Bongrand, P. Dynamic adhesion of CD8-positive cells to antibody-coated surfaces: the initial step is independent of microfilaments and intracellular domains of cell-binding molecules. *J Cell Biol* **125**, 945–953 (1994).
24. Kirkwood, B. R. & Sterne, J. A. C. *Essential medical statistics*. (Wiley-Blackwell, 2003).

Acknowledgments

We thank Dr. Eric Ghigo and Prof. Jean Louis Mège, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses Transmissibles et Emergentes, CNRS UMR 6236, Institut Fédératif de Recherche 43, Université de la Méditerranée, Faculté de Médecine, Marseille, France for all necessary support for the infection of human monocytes used in rolling experiments. We thank Dr. Nathanael Pinheiro Jr. for insightful discussions regarding the analysis of some scanning microscopy images. This work was supported by CAPES-COFEUCB, grant #0364/2011. DGFC and CPF received a scholarship from CAPES, and WLCS has a Research scholarship from CNPq.

Author Contributions

C.P.F., D.G.F.C., P.R., R.A.A., M.E.R.H. and D.T. performed experiments; C.P.F., D.G.F.C., R.A.A., M.E.R.H., D.T. and W.L.C.S. analyzed the results and produced the figures; C.P.F., D.G.F.C., M.E.R.H., D.T., P.R., A.P., P.B. and W.L.C.S. designed the research; and C.P.F., D.G.F.C., M.E.R.H., P.B. and W.L.C.S. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Figueira, C. P. *et al.* *Leishmania* infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. *Sci. Rep.* **5**, 12862; doi: 10.1038/srep12862 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>