

FLÁVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS, COMO
MARCADORES DE PROGNÓSTICO, EM CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM IMUNOTERAPIA VACINAL ASSOCIADA AO
ALOPURINOL**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Belo Horizonte MG
Dezembro de 2017**

FLÁVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS, COMO
MARCADORES DE PROGNÓSTICO, EM CÃES INFECTADOS
NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO
TRATAMENTO COM IMUNOTERAPIA VACINAL ASSOCIADA AO
ALOPURINOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutora Patologia.

Área de Concentração: Patologia Investigativa

Orientador: Ricardo Gonçalves

BELO HORIZONTE, MG

DEZEMBRO DE 2017

Oliveira, Flávia Carvalho Bitencourt de.
OL48m Marcadores de prognóstico [manuscrito]: estudo clínico retrospectivo e prospectivo de cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum* submetidos a protocolo terapêutico. / Flávia Carvalho Bitencourt de Oliveira. - -Belo Horizonte: 2017.
95f.
Orientador (a): Ricardo Gonçalves.
Área de concentração: Patologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Leishmaniose Visceral. 2. Monócitos. 3. Biomarcadores. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Gonçalves, Ricardo. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 715



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO


MARCADORES PROGNÓSTICOS: ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO E PROSPECTIVO DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS A PROTOCOLO TERAPÊUTICO

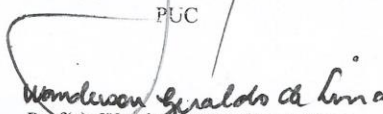
FLAVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

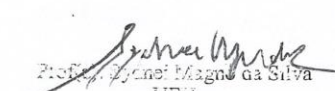
Tese Submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

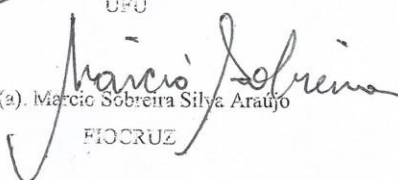
Aprovada em 15 de dezembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Ricardo Gençalves - Orientador
UFMG


Prof(a). Vitor Marcio Kibeiro
PUC


Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima
UFOP


Prof(a). Lynei Mazine da Silva
UFU


Prof(a). Marcio Sobreira Silva Araújo
FIOCRUZ

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA

FLAVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

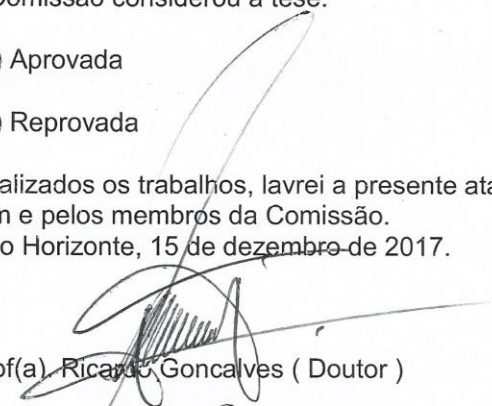
Realizou-se, no dia 15 de dezembro de 2017, às 09:00 horas, UFMG; Instituto de Ciências Biológicas - Bloco C3, sala 290, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *MARCADORES PROGNÓSTICOS: ESTUDO CLÍNICO RETROSPECTIVO E PROSPECTIVO DE CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR Leishmania infantum SUBMETIDOS A PROTOCOLO TERAPÊUTICO*, apresentada por FLAVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA, número de registro 2013709212, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ricardo Goncalves - Orientador (UFMG), Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro (PUC), Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (UFOP), Prof(a). Sydnei Magno da Silva (Universidade Federal de Uberlândia-UFU), Prof(a). Márcio Sobreira Silva Araújo (CPQRR-FIOCRUZ).

A Comissão considerou a tese:

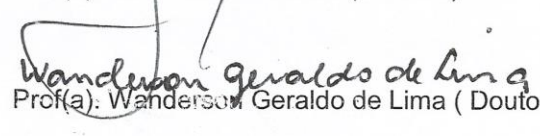
Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2017.


Prof(a). Ricardo Goncalves (Doutor)


Prof(a). Vitor Marcio Ribeiro (Doutor)


Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (Doutor)


Prof(a). Sydnei Magno da Silva (Doutor)


Prof(a). Márcio Sobreira Silva Araújo (Doutor)

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

(Mahatma Gandhi)

Agradecimentos

Gratidão ao meu Deus por me guiar e proteger. Por permitir me (re)descobrir todos os dias e por ter me apresentado o melhor sentimento: GRATIDÃO!

Aos meus pais, pelo imenso amor, confiança, carinho e zelo. Por apoiarem minhas escolhas e entenderem minha ausência. Eterna gratidão e orgulho por tê-los como meus pais!

À Fefê, minha irmã e amiga, pela força, cumplicidade, pelo amor, incentivo e carinho!

Túlio, você se fez presente durante toda essa jornada. Minha eterna gratidão por sua disponibilidade infinita, pelo imenso apoio, por ser a “minha” pessoa, meu companheiro e meu braço direito.

Aos meus amigos e familiares pelo apoio.

Ao professor Ricardo, grande exemplo de mestre. Gratidão por tamanho incentivo, pela oportunidade, confiança, paciência e orientação.

Ao professor Wagner Tafuri por compartilhar seus conhecimentos, pela acolhida, carinho e apoio.

Aos amigos do LPL pela convivência tão agradável e amizade. Nós não só dividimos bancadas e frustrações! Compartilhamos de muitos sonhos, conquistas e alegrias!

“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.”
(Charles Chaplin)

Ao Pedro por toda disponibilidade, cuidado e ajuda durante todo o projeto.

Vítor e Greg por todo auxílio durante esses 4 anos.

A toda equipe do Santo Agostinho Hospital Veterinário, em especial à Rosana e Edilene. Esse trabalho não seria possível sem a dedicação e carinho de vocês!

Às técnicas e secretárias do Departamento de Patologia: Vânia, Raquel, Luciana, Jaqueline, Regina, Marília e Olinda pela convivência e toda ajuda.

A Leishmanios visceral canina (LVC) é uma doença crônica que acomete indiscriminadamente os cães e promove lesões graves no animal levando-o a morte. Além de paciente, o cão é reservatório doméstico do parasito. No Brasil, o tratamento da LVC é praticado desde meados da década de 90 e diversos protocolos são utilizados em diferentes partes do mundo com resultados variados. O tratamento de cães portadores de LVC através da imunoterapia, com a vacina recombinante Leish-Tec®, associada ao alopurinol tem sido descrita na literatura com resultados promissores podendo induzir melhora clínica em cães com LVC. Porém, não é descrito na literatura parâmetros laboratoriais hematológicos que auxiliem o médico veterinário no acompanhamento do paciente e determinação de seu prognóstico. A descoberta desses parâmetros podem auxiliar melhor o acompanhamento dos animais tratados o que pode ser de grande importância na definição de um melhor prognóstico ou para determinar o estado clínico dos cães tratados. Sendo assim, o presente estudo buscou identificar parâmetros hematológicos sanguíneos como biomarcadores, em cães naturalmente infectados e tratados, a fim de utilizar estes dados na predição de prognóstico e conduta terapêutica. Em um primeiro momento do estudo, denominado “Estudo Retrospectivo”, foram incluídos 45 cães sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e que foram submetidos ao protocolo de tratamento por imunoterapia e alopurinol. Foram recolhidos dos prontuários informações sobre a condição clínica do animal e os resultados dos exames laboratoriais. Em segunda parte, denominada “Estudo Prospectivo”, foram incluídos 12 cães também sintomáticos, naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e que foram submetidos ao protocolo de tratamento por imunoterapia e alopurinol. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram analisados. O conjunto de dados obtidos neste trabalho indica que monócitos e plaquetas podem representar importantes parâmetros de prognóstico da resolução da doença e do tratamento, podendo atuar como biomarcadores, melhorando assim a abordagem terapêutica, evitando-se riscos e custos desnecessários e proporcionando melhor benefício ao animal.

Canine visceral leishmaniasis is a chronic disease caused by *L. infantum* which affects dogs and promotes serious injury leading to death. Dogs are the main reservoir of this parasite, having a central role in the transmission to humans. In Brazil canine visceral leishmaniasis have been treated for more than fifteen years. There are several protocols for treatment around the world. Recently, a new treatment protocol has been proposed using immunotherapy with Leistech® vaccine, associated with allopurinol. However, there are no reliable parameters of prognosis for clinical recovery in dogs. This study aimed to characterize parameters from blood as biomarkers in dogs naturally infected and treated in order to use this data as prognosis and therapeutic management. The study included dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, symptomatic and treated with immunotherapy and allopurinol. Medical records containing information on the clinical status, hematological and biochemical tests were analyzed. Our results showed improvement in some clinical parameters evaluated. The data set obtained in this study indicates that monocytes and plateletes may represent important parameters of disease prognosis and treatment, acting as biomarkers, thus improving the therapeutic approach, avoiding risks and unnecessary costs and providing better animal benefits

Tabela 1: Estadiamento clínico da leishmaniose visceral canina baseado no nível de anticorpos, sinais clínicos dados laboratoriais e prognóstico	20
Tabela 2: Associação entre o número absoluto de monócitos e os níveis de gloubulinas séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	43
Tabela 3: Associação do número absoluto de monócitos com o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	43
Tabela 4: Associação entre o número absoluto de monócitos e resultados de gloubulinas séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico.....	61
Tabela 5: Associação entre o número absoluto de monócitos com o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	61
Tabela 6: Associação entre os níveis de CD14 solúveis e o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	66
Tabela 7: Associação entre os níveis de MHCII solúveis e o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	66

Figura 1: Frequência (%) dos sinais clínicos apresentados por cães infectados sintomáticos, antes e depois da administração do protocolo terapêutico	35
Figura 2: Parâmetros eritrocitários: (A) hematócrito, (B) hemoglobina e (C) eritrócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	36
Figura 3: Contagem global, diferencial e da frequência do sangue periférico de (A) leucócitos, (B e C) neutrófilos, (D e E) eosinófilos, (F e G) linfócitos, (H e I) monócitos e (J) plaquetas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	37
Figura 4: Análise da frequência (A) e número absoluto (B) de monócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	39
Figura 5: Níveis séricos de (A) proteínas totais, (B) albumina, (C) globulinas e (D) relação albumina globulinas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	40
Figura 6: Níveis séricos de ureia (A) e creatinina (B) de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	41
Figura 7: Correlação entre o número absoluto de monócitos e (A) global de leucócitos, (B) proteínas totais, níveis séricos de (C) albumina, (D) globulinas, (E) fração albumina/globulinas, (F) ureia e (G) creatinina séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	42
Figura 8: Frequência (%) dos sinais clínicos apresentados por cães infectados sintomáticos, antes e depois da administração do protocolo terapêutico	53
Figura 9: Parâmetros eritrocitários: (A) hematócrito, (B) hemoglobina e (C) eritrócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	54
Figura 10: Contagem global, diferencial e da frequência do sangue periférico de (A) leucócitos, (B e C) neutrófilos, (D e E) eosinófilos, (F e G) linfócitos, (H e I) monócitos e (J) plaquetas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	55
Figura 11: Análise da frequência (A) e número absoluto (B) de monócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	57
Figura 12: Níveis séricos de (A) proteínas totais, (B) albumina, (C) globulinas e (D) relação albumina globulinas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	58
Figura 13: Níveis séricos de ureia (A) e creatinina (B) de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico.	59

Figura 14: Correlação entre o número absoluto de monócitos e (A) global de leucócitos, (B) proteínas totais, (C) albumina, (D) globulinas, (E) fração albuminas globulinas, (F) ureia e (G) creatinina séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	60
Figura 15 Frequência de monócitos, expressão de CD14 sobre o total de leucócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	62
Figura 16: Absorbância referente aos níveis de CD14 solúvel (sCD14) presente no soro de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	63
Figura 17: Absorbância referente aos níveis de MHC de classe II solúvel (sMHCII) presente no soro de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	63
Figura 18: Correlação entre os níveis de absorbância da molécula CD14 solúvel (sCD14) com (A) número absoluto de monócitos, (B) níveis séricos de globulinas, (C) fração A/G, (D) níveis séricos de ureia e (E) creatinina de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	64
Figura 19: Correlação entre os níveis de absorbância da molécula MHCII solúvel (sMHCII) com (A) número absoluto de monócitos, (B) níveis séricos de globulinas, (C) fração A/G, (D) níveis séricos de ureia e (E) níveis séricos de creatinina de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico	65
Figura 20: Absorbância dos níveis de moléculas CD14 solúveis (sCD14) presentes no soro de cães negativos, assintomáticos e sintomáticos soropositivos para leishmaniose visceral canina	71
Figura 21: Absorbância dos níveis de moléculas MHCII solúveis (sMHCII) presentes no soro de cães negativos, assintomáticos e sintomáticos soropositivos para leishmaniose visceral canina	72

CCL2 – Ligante de quimiocina C C do tipo 2
CCR2 - Receptor de Quimiocina C C do tipo 2
CD11a - Cluster de Diferenciação 11a
CD11c - Cluster de Diferenciação 11c
CD14 - Cluster de Diferenciação 14
CD16 - Cluster de Diferenciação 16
CD23 - Cluster de Diferenciação 23
CD44 - Cluster de Diferenciação 44
CD40L - Ligante para Cluster de Diferenciação 40
CD62L - Ligante para Cluster de Diferenciação 62
CX3CR1 - Receptor de Fractalquina do tipo 1
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - Ensaio Imunoenzimático
et al. - *et alii* (e outros)
GPI - Glicosilfosfatidilinositol
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ - Interferon gama
IgE - Imunoglobulina E
IgG - Imunoglobulina G
ICB - Instituto de Ciências Biológicas
IHQ - Imunohistoquímica
IL-1- Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL-12 - Interleucina 12
iNOS - Óxido Nítrico Síntese induzível
LC - Leishmaniose cutânea
LPS - Lipopolissacarídeo
LV- Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
LVH - Leishmaniose visceral humana
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MHCII - Complexo Principal de Histocompatibilidade II

NO - Óxido Nítrico

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS - Organización Panamericana de la Salud

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia Polimerase

PVC-LV - Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WHO - World Health Organization

1 - Introdução.....	16
1.1 - Leishmaniose Visceral	17
1.2 - Monócitos	24
1.3 - Moléculas Solúveis	26
2 - Justificativa.....	28
3 - Capítulo 1: Estudo Retrospectivo.....	31
3.1 - Objetivo geral.....	32
3.2 - Objetivos específicos.....	32
3.3 - Material e Métodos	33
3.3.1 - Seleção da amostra	33
3.3.2 - Critério de inclusão	33
3.3.3 - Análise dos prontuários	33
3.3.4 - Análises estatísticas	34
3.4 - Resultados	35
3.4.1 - Avaliação dos aspectos clínicos	35
3.4.2 - Análise dos exames laboratoriais	36
3.4.2.1 - Análise hematológica	36
3.4.2.2 - Análise do perfil bioquímico	39
4 - Capítulo 2: Estudo Prospectivo	44
4.1 - Objetivo geral	45
4.2 - Objetivos específicos	45
4.3 - Material e Métodos	46
4.3.1 - Comitê de ética	46
4.3.2 - Seleção da amostra	46
4.3.3 - Anuência do proprietário	46
4.3.4 - Exame clínico	46

4.3.5 - Coleta de materiais biológicos	47
4.3.6 - Testes sorológicos	48
4.3.7 - Testes parasitológicos	50
4.3.8 - Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo	51
4.3.9 - Detecção de moléculas solúveis	51
4.3.10 - Análises estatísticas	52
4.4 - Resultados	53
4.4.1 - Avaliação dos aspectos clínicos	53
4.4.2 - Análise dos exames laboratoriais	54
4.4.2.1 - Análise hematológica	54
4.4.2.2 - Análise do perfil bioquímico	57
4.4.3 - Citometria de Fluxo	62
4.4.4 - Detecção de Moléculas Solúveis	62
5 - Capítulo 3: Moléculas Solúveis	67
5.1 - Objetivo geral	68
5.2 - Objetivos específicos	68
5.3 - Material e Métodos	69
5.3.1 - Amostras	69
5.3.2 - Detecção de moléculas solúveis por ELISA	69
5.3.3 - Análises Estatísticas	70
5.4 - Resultados	71
5.4.1 - CD14 solúvel (sCD14)	71
5.4.2 - MHCII solúvel (sMHCII)	72
6 - Discussão	73
7 - Conclusão	81
8 - Referências bibliográficas	83
9 - Anexos	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose Visceral

Presentes em quatro continentes, aproximadamente 102 países tropicais e subtropicais, as leishmanioses representam um conjunto de doenças com altos índices de morbidade e mortalidade. Estima-se cerca de um milhão de novos casos por ano, dentre esses, aproximadamente 180 mil relatos de leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2017).

A LV, também conhecida como Kala-azar, possui ampla distribuição geográfica, sendo endêmica em mais de 80 países em todo o mundo. Cerca de 90% dos novos casos notificados à Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2015, ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. É uma doença crônica e é considerada a forma mais alarmante, uma vez que é fatal em 95% dos casos não tratados adequadamente, sendo responsável por mais de 20 mil mortes anualmente (WHO, 2017).

O agente etiológico da LV no velho mundo (Índia e Leste da África) é a *Leishmania (Leishmania) donovani*; na China, Ásia Central, Sudeste da Europa e Mediterrâneo é a *Leishmania (L.) infantum* e na América Latina a *Leishmania (L.) chagasi* (Lainson; Shaw, 1987; Lukes et al., 2007). Embora diferentes no nome e localização geográfica, técnicas moleculares e bioquímicas confirmaram que a *L. infantum* e *L. chagasi* são a mesma espécie (Lukes et al., 2007; Mauricio & Stothard, 2000). A OMS tem empregado a denominação de *L. infantum* para o agente etiológico da LV nas Américas, passando então a considerar apenas estas duas espécies (*L. donovani* e *L. infantum*) como agente etiológico da LV no mundo (WHO, 2010).

A participação dos cães no ciclo epidemiológico da LV foi primeiramente observada em 1908 por Nicolle & Comte, na Tunísia, após a detecção nestes animais do agente etiológico da LV. No Brasil, em 1936, Evandro Chagas descreveu o primeiro caso diagnosticado *in vivo* de LV, no qual demonstrou a existência da doença no homem e no cão e a infecção do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, classificando o parasito como *Leishmania chagasi* (Chagas, 1936; Chagas et al., 1938). A partir dessa data um amplo estudo foi conduzido no estado do Ceará evidenciando a importância dos cães na epidemiologia da doença (Deane & Deane, 1955). O estudo realizado por Deane (1956) comparou a infecção humana e canina por *L. chagasi*, no qual os autores observaram parasitos na pele de 16% dos humanos e aproximadamente 78% dos cães estudados. Devido à urbanização da doença, o parasito *L. infantum* tem o cão (*Canis familiaris*) como seu principal reservatório, ocupando uma posição de destaque na cadeia epidemiológica devido à sua proximidade com o homem no ambiente doméstico tanto em

áreas rurais como urbanas (Dos Santos et al., 1998; Harhay et al., 2011). Estudos demonstraram a correlação do aparecimento de casos humanos precedidos da infecção canina sendo ainda mais incidente e prevalente que a doença humana, reforçando as hipóteses de principal fonte alimentar do vetor o que favorece a disseminação e manutenção do ciclo de transmissão da LV (Moreno & Alvar, 2002). Além disso, no âmbito doméstico, grande parte dos cães com sorologia reagente não apresenta sinais clínicos, podendo, desta forma, atuar como fonte silenciosa e duradoura de infecção aos flebotomíneos (Costa-Val et al., 2007).

A principal forma de transmissão do parasito ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, subfamília *Phebotominae*, sendo a *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie transmissora da *L. infantum* no Novo Mundo, embora as infecções não vetoriais por via transplacentária (Rosypal et al., 2005), transfusional (Freitas et al., 2012), venéreas (Silva et al., 2000) e por mordida (Naucke et al., 2016) tenham sido relatadas.

A LVC não apresenta sinais clínicos patognomônicos e ainda similares àqueles observados em outras infecções caninas (Cardoso et al., 1998). Ademais, a doença apresenta-se de forma grave, com evolução lenta e de início insidioso cujas manifestações clínicas são intrinsicamente dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico do cão infectado apresenta um espectro de características clínicas que podem variar consideravelmente entre os animais infectados podendo apresentar aparência sadia, denominados animais assintomáticos, que são caracterizados pela ausência de sinais clínicos da doença, porém com carga parasitária e sorologia variável (Baneth et al., 2008; Reis et al., 2006b; Solano-Gallego et al., 2011). Entretanto, esta pode evoluir para uma forma clínica sintomática caracteristicamente debilitante, relacionada ao comprometimento do controle do parasitismo ocasionado pelo exacerbado grau de imunossupressão que conduz o animal inevitavelmente ao óbito (Giunchetti et al., 2006; Mancianti et al., 1988; Pinelli et al., 1994; Reis et al., 2006a, 2006b, 2009).

Alguns aspectos clínicos da LVC assemelham-se ao da LV humana, tais quais: febre irregular, palidez de mucosas e emagrecimento progressivo, até um estado de caquexia, em seu estágio final (Marzochi et al., 1985; Genaro, 1993). Entre os sinais clínicos mais comumente observados na LVC, ausentes na doença humana, destacam-se a presença de alterações dermatológicas como opacificação dos pelos, alopecia, descamação, dermatite localizada ou generalizada. Nas fases mais adiantadas observa-se diarreia, onicogribose, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, ceratoconjuntivite, ceratite com opacificação de

córnea e paresia dos membros posteriores (Genaro, 1993; Giunchetti et al., 2006). É de grande relevância destacar que os sinais clínicos podem ser influenciados por diversos fatores, como o tipo de resposta imunológica apresentada pelo animal, raça, estado nutricional e doenças concomitantes, que podem afetar o curso da infecção (Dantas-Torres et al., 2012; Moreno & Alvar, 2002; Solano-Gallego et al., 2009). Além disso, estudos demonstraram que o agravamento dos sinais clínicos no cão apresenta relação direta com a carga parasitária em diferentes tecidos (Giunchetti et al., 2006; 2008; Reis et al., 2006a; 2006b).

As alterações laboratoriais como anemia normocítica e normocrômica, leucopenia, monocitose com relatos de presença de grandes monócitos ativados e trombocitopenia, em cães naturalmente ou experimentalmente infectados, são frequentes, entretanto, esses achados hematológicos são considerados inespecíficos. Alterações bioquímicas como elevação das proteínas totais com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, alterações nas enzimas hepatocelulares (alanina amino transferase e aspartato amino transferase) e aumento dos níveis de ureia e creatinina também são relatadas (Abranches et al., 1991; Bourdoiseau et al., 1997; Ciaramella et al., 1997; Greene, 2006; Reis et al., 2006a; Solano-Gallego et al., 2011).

Solano-Gallego e colaboradores (2011), a fim de classificar animais infectados em escores clínicos, propuseram um sistema de classificação composto por quatro estádios clínicos: Estádio I, doença discreta, Estádio II, doença moderada, Estádio III, doença grave, e Estádio IV, doença muito grave. Esses estádios foram classificados de acordo com os resultados sorológicos que variam de negativo a alto nível de anticorpos anti-*Leishmania*, associado a alterações de patologia clínica e sinais clínicos (Tabela 1).

Tabela 1: Estadiamento clínico da leishmaniose visceral canina baseado no nível de anticorpos, sinais clínicos dados laboratoriais e prognóstico. (Adaptado de Solano-Gallego et al.,2011).

ESTADIAMENTO CLÍNICO	SOROLOGIA	SINAIS CLÍNICOS	ACHADOS DE PATOLOGIA CLÍNICA	PROGNÓSTICO
ESTÁGIO I DOENÇA DISCRETA	Negativa ou Níveis discretos de anticorpos	Sinais clínicos discretos; Linfadenopatia discreta; Dermatite; Pápula	Perfil renal normal: Creatinina <1,4mg/dL e Proteína/creatinina urinária <0,5	Bom
ESTÁGIO II DOENÇA MODERADA	Níveis de anticorpos discretos a elevados	Estágio I; Dermatite esfoliativa difusa; Onicogrifose; Ulcerações; Anorexia; Perda de peso; Epistaxe	Hipergamaglobulinemia; Creatinina <1,4mg/dL; Proteína/Creatinina urinária 0,5-1	Bom a Reservado
ESTÁGIO III DOENÇA GRAVE	Níveis de anticorpos elevados	Estágios I e II; Lesões por imunocomplexos: vasculites, artrites, uveíte e glomerulonefrite	Estádio II; Creatinina 1,4-2mg/dL; Doença renal crônica (IRIS I); Proteína/Creatinina urinária >1 ou IRIS II	Reservado a Desfavorável
ESTÁGIO IV DOENÇA MUITO GRAVE	Níveis de anticorpos muito elevados	Estágios I, II e III; Tromboembolismo pulmonar; Síndrome nefrótica	Estádio III; Creatinina >5mg/dL; Creatinina sérica 2-5mg/dL; Proteína/creatinina urinária >5; Doença renal crônica (IRIS III); Síndrome nefrótica com proteinúria	Desfavorável

O diagnóstico de LVC deve ter por base uma abordagem completa, considerando a história progressiva do animal, abrangendo uma avaliação clínica e os aspectos laboratoriais de testes sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), imunoenensaio enzimático (Elisa) e testes rápidos imunocromatográficos; ensaios de pesquisa parasitária como citopatologia, histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) e moleculares como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) que confirmam a presença do parasito (Gramiccia, 2011; Ikeda-Garcia et al 2003; Martínez-Moreno et al., 1993; Paltrinieri et al., 2009).

As medidas para o controle da LV inicialmente sugeridas por Deane (1956) e até hoje adotadas pelo Ministério da Saúde brasileiro, através do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVC-LV), preconiza o diagnóstico e tratamento precoce dos

humanos infectados; controle vetorial, através de aspersões de inseticidas com efeito residual; eutanásia dos cães soropositivos, além de uma vigilância sanitária contínua e sistemática (Palatnik et al., 2001). A eutanásia compulsória de cães soropositivos é uma medida questionável, visto que, esta prática leva a diminuição da transmissão da LV na área de cobertura, com duração apenas em médio prazo, sendo que algum tempo após sua interrupção, a incidência e a prevalência da infecção voltam a atingir os antigos níveis (Costa, 2011; Moreno & Alvar, 2002). Além disso, outro problema relacionado à baixa efetividade desta medida de controle é o longo intervalo de tempo, entre o diagnóstico e a remoção dos cães e a reposição do cão eutanasiado por outro suscetível, que pode tornar-se infectado (Dantas-Torres et al., 2012; Dye et al 1996; Moreira et al., 2004). O princípio básico para a prevenção da LVC é evitar o contato entre o vetor infectado e o cão, dessa forma, medidas contra o vetor devem ser adotadas no ambiente e centradas no cão. As medidas recomendadas aos proprietários dos cães livres da infecção ou em tratamento podem ser: (1) uso do colar impregnado com deltametrina 4%, o qual deve ser substituído a cada seis meses; em cães alérgicos ao colar, uso de inseticidas de aplicação tópica à base de permetrina; (2) cuidados de limpeza do ambiente, como retirada de matéria orgânica excessiva; aplicação de inseticidas ambientais centrados nos canis (ambientes em que o animal permanece por mais tempo), como aqueles à base de deltametrina e cipermetrina, em aplicações semestrais; (3) uso de plantas repelentes de insetos, como a citronela; (4) não realização de passeios crepusculares ou noturnos, horários de maior atividade dos flebotômíneos, privilegiando os passeios diurnos (Ribeiro et al., 2007; 2013).

Os tratamentos para LVC são bem variados e utilizam protocolos que combinam drogas que podem ser reunidas em dois grupos: as que apresentam ação direta sobre o parasito quer seja pela ação leishmanicida, quer seja como leishmaniostático (impedindo sua replicação), e os grupos capazes de modular o sistema imune. Os medicamentos mais comuns utilizados para o tratamento da LVC são o alopurinol, domperidona e, mais recentemente no Brasil, a miltefosina (Solano-Gallego et al., 2011). O antimoniato de meglumina teve sua distribuição e uso restrito ao serviço público de saúde, destinado ao tratamento humano, não podendo ser utilizado em nenhuma condição para o tratamento de cães com LV. Em 2008, o ministério da Saúde juntamente com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicaram em Portaria Interministerial nº 1.426, Art. 1º, a proibição, em todo o território nacional, do tratamento de cães infectados com LV ou doentes com produtos de uso humano ou não registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Por se tratar de uma doença que depende da resposta imunitária, estudos têm demonstrado o importante papel dos imunomoduladores no controle da Leishmaniose canina. Ribeiro (2013) descreveu um protocolo, para cães portadores de LVC, através da imunoterapia com dose duplicada da vacina recombinante Leish-Tec®, aprovada pelo Ministério da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, associada ao fármaco alopurinol que tem mecanismo leishmanioestático inibindo a multiplicação do parasito. O protocolo é constituído de três doses duplicadas da vacina a cada 21 dias. Resultados demonstraram que o tratamento induziu melhora clínica e laboratorial em cães com LVC, redução no parasitismo cutâneo e da titulação anti-*L. infantum*, tornando-se uma opção de terapêutica no protocolo de tratamento desta doença em cães.

A resposta clínica ao tratamento de cães doentes pode variar de ineficaz a efetiva, dependendo do estado clínico inicial geral e da resposta específica à terapia. A grande maioria dos cães experimenta melhora clínica no primeiro mês de terapia, no entanto, um período de terapia mais longo pode ser necessário para outros antes que a melhora seja aparente (Pennisi et al., 2005). O significado do termo tratamento bem-sucedido para a LVC é dependente da ótica dos autores envolvidos. Para o proprietário e para o clínico veterinário, o sucesso do tratamento se dá a partir da remissão dos sinais e melhora da condição clínica apresentada pelo animal. Para os parasitologistas, a cura significa completa eliminação do parasito do hospedeiro, enquanto que para os entomologistas, órgãos de saúde pública e epidemiologistas, a incapacidade do animal em transmitir o parasito aos insetos vetores (quebrando o ciclo de transmissão) é suficiente para considerar o tratamento como um sucesso (Baneth & Shaw, 2002).

O grupo *LeishVet*, associação científica europeia focada em pesquisa para auxílio do clínico veterinário na gestão da leishmaniose canina, recomenda o monitoramento dos animais durante o tratamento através da análise de parâmetro clínico-patológicos como exame clínico; sorologia, que deve ser realizada não antes de seis meses após o tratamento inicial e testes laboratoriais de rotina como hemograma completo, perfil bioquímico e análise completa da urina após o primeiro mês de tratamento e depois a cada 3-4 meses durante o primeiro ano. Recomenda-se que o cão clinicamente recuperado realize os exames a cada seis meses ou uma vez por ano (Solano-Gallego et al., 2011).

Em humanos, os critérios de eficácia do tratamento são baseados em sinais clínicos, ausência de febre e redução do baço e laboratorialmente na melhora hematológica com reversão da

pancitopenia (Badaro, 1986; Pastorino et al., 2002). Além disso, durante a infecção em humanos, é evidente a ausência de citocinas como IFN- γ e IL 12. Considera-se cura na LV quando ocorre reativação dessas citocinas (Bacellar et al., 2000). De acordo com o Ministério da Saúde (2013) os critérios de cura para LV, em humanos, são essencialmente clínicos. O desaparecimento da febre acontece por volta do segundo ao quinto dia de medicação específica e a redução do volume do baço e do fígado pode ser verificada nas primeiras semanas. Os parâmetros hematológicos melhoram a partir da segunda semana. A normalização das proteínas séricas se dá de forma lenta e pode levar meses. O retorno do apetite, a melhora do estado geral e o ganho de massa são evidentes desde o início do tratamento. Nessa situação, o controle parasitológico ao término do tratamento é dispensável. Ao final do tratamento, a presença de eosinófilos no sangue periférico é um índice de bom prognóstico. O paciente tratado deve ser acompanhado durante 12 meses. Ao final desse período, se permanecer estável, será considerado clinicamente curado.

Na prática veterinária, o prognóstico da LVC é baseado em alterações bioquímicas, principalmente relacionadas à função renal, que fornecem informações para estabelecimento de um prognóstico para avaliar o estado clínico e evolução dos cães em tratamento (Solano-Gallego et al., 2011). Mesmo existindo alterações hematológicas comuns em cães infectados essas alterações laboratoriais são inespecíficas (Gradoni, 2002) caracterizadas por disfunção na produção de eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Recente trabalho, pertencente ao nosso grupo de estudos, Martins (2016), em dados não publicados, descreveu alterações leucocitárias em camundongos infectados por *Leishmania major*. Neste estudo, foi demonstrado que há uma intensa panleucopenia em camundongos infectados, assim como acontece leishmaniose visceral humana, caracterizada por anormalidades como anemia, leucopenia e trombocitopenia (Badaro e Duarte, 2005; Baranwal et al., 2007). Martins (2016), em dados não publicados, observou que apesar da diminuição geral na frequência e número de leucócitos no sangue, houve aumento de monócitos e este aumento teria correlação direta com o tamanho da lesão e conseqüentemente susceptibilidade à infecção. Barbosa (2013), dados não publicados, também demonstrou resultados semelhantes estudando o sangue cães, naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, através da análise por citometria de fluxo observando maior frequência de monócitos em cães sintomáticos, quando comparados a assintomáticos e não infectados.

1.2 Monócitos

Monócitos são células integrantes do sistema fagocítico mononuclear (SFM), originados a partir de precursores da medula óssea, que correspondem a aproximadamente 10% do total de leucócitos circulantes no sangue periférico de humanos, 4% de camundongos e de 3-10% de cães (Gordon & Taylor, 2005). Por serem capazes de internalizar e eliminar ampla variedade de microrganismos patogênicos como bactérias, vírus e parasitos, de apresentar antígenos e ativar linfócitos T, monócitos vem sendo cada vez mais relacionados à defesa do organismo aliando resposta inflamatória e imunidade inata à imunidade adaptativa (Auffray et al., 2009; Serbina et al., 2008; Shi et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram a capacidade de migração de monócitos de vasos sanguíneos para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos e células dendríticas, contribuindo assim na defesa, remodelamento e reparo tecidual (Auffray et al., 2009; Zawada et al., 2011).

Devido à funcionalidade e a plasticidade dos monócitos, estudos sobre sua biologia e heterogeneidade populacional, em várias espécies, foram realizados e culminaram na divisão em subpopulações baseada em variações fenotípicas quanto à expressão de receptores de superfície.

Os monócitos clássicos, CD14^{hi}CD16⁻ e Gr1⁺, descritos para humanos e camundongos respectivamente, expressam moléculas de superfície como CCR2, CD62L, baixos níveis de CX3CR1, receptor de fractalquina, e tem sido considerados a principal fonte de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1, estando assim relacionados a processos inflamatórios (Geissmann et al., 2003; Serbina et al., 2006; Strauss-Ayali et al., 2007; Sunderkotter et al., 2004). Foi demonstrado, em modelo experimental, que monócitos inflamatórios seriam as primeiras células a chegar ao sítio de infecção. Nesse estudo também foi demonstrado que o recrutamento de monócitos inflamatórios para o sítio da infecção foi dependente de CCL2, principal citocina apontada no recrutamento de monócitos (Goncalves et al., 2011). Camundongos deficientes em CCR2 apresentam menor migração de monócitos para o sítio da infecção, com consequente diminuição na capacidade de controle da doença. Em 2006, Serbina e colaboradores demonstraram a migração de monócitos clássicos para o sítio da infecção e sua diferenciação em células produtoras de TNF- α e NO, na infecção de camundongos com *Listeria monocitogenes*. Estudo envolvendo modelo experimental, com infecção por *Leishmania major*, observou que grande parte das células recrutadas, para o sítio da infecção, eram células de linhagem mielóide, especificamente monócitos

inflamatórios com alta expressão de moléculas como MHC-II, ROS e iNOS (Glennie et al., 2017).

Estudos tem desmonstrado monócitos inflamatórios como importantes mediadores de proteção contra infecções virais (Aldridge et al., 2009; Lim et al., 2011), bacterianas (Moyat et al., 2015; Peters et al., 2001; Serbina et al., 2003), fúngicas (Hohl et al., 2009; Osterholzer et al., 2009) e parasitárias (Robben et al., 2005; Strauss-Ayali et al., 2007; León et al., 2007) e correlacionados com a clínica de pacientes em doenças como malária (Antonelli et al., 2014), doença crônica cardiovascular infantil (Rogacev et al., 2011), na doença de Kawasaki (Katayama et al., 2000), na artrite reumatoide (Walter et al., 2013) e na doença de Crohn (Grip et al., 2007).

A população não clássica de monócitos humanos (CD14^{lo}CD16^{hi}) e de camundongos (Gr1⁻), também conhecida como “Patrulhadores”, expressa altos níveis de CX3CR, entretanto não expressa CCR2. Estudos têm os associados à baixa produção de TNF- α e alta produção de IL-10 (Cros et al., 2010; Skrzeczyska-Moncznik et al., 2008; Strauss-Ayali et al., 2007). Auffray e colaboradores (2009) demonstraram, em infecção por *Listeria monocitogenes*, que monócitos realizam o patrulhamento dos vasos e, através de quimiocinas e moléculas como CX3CR1 e CD11a, realizam a transmigração pelo endotélio, chegando antes de outras células ao local da infecção.

Recente trabalho do nosso grupo de pesquisa, dados não publicados, realizado por Barbosa (2013), descreveu a caracterização fenotípica e funcional de monócitos do sangue periférico de cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, classificando monócitos caninos em subpopulações: uma população de monócitos, com alta expressão de CD14 (CD14^{high}), que possuem maior expressão de marcadores relacionados à monócitos ativados e de perfil pró-inflamatório como já descritos em outras espécies como MHC-II, CD11c, CD44, CD62L (Egan et al., 2013; Strauss-Ayali et al., 2007) e por isso nomeados monócitos clássicos. E outra população com baixa expressão de CD14 (CD14^{low}), apresentando menor expressão desses marcadores, denominada monócitos não clássicos.

Na defesa contra a *Leishmania*, os monócitos e macrófagos desempenham um papel importante na fagocitose de promastigotas, visto que, todas as espécies de *Leishmania* parasitam o SFM do hospedeiro. Como primeira resposta ao contato com o protozoário, estas células estimulam a produção de IL-12 (Gorak; Engwerda; Kaye, 1998) e indução de IFN- γ e TNF por células Th1 necessário para a atividade efetora dos monócitos

macrófagos (Belkaid; Butcher; Sacks, 1998; D'Apos; Oliveira et al., 2002). A ação de IFN- γ e TNF aumenta a atividade produzida dos macrófagos infectados induzindo potencial leishmanicida por estimular a síntese de iNOS (óxido nítrico síntese induzível) e ROS (espécies reativas de oxigênio), moléculas tóxicas capazes de eliminar o parasito (Liew, 2002; Nathan et al., 1991).

1.3 Moléculas Solúveis

A maioria das proteínas do organismo possui sua forma em estado solúvel que pode ser proveniente de sua clivagem. Moléculas solúveis são descritas na literatura de forma pontual e pouco compreendida, acredita-se em seu importante papel por conferir atividade de sinalização a células que não expressam receptores de membrana para sua ativação no combate contra patógenos. Algumas dessas moléculas têm sido estudadas sendo correlacionadas e caracterizadas como biomarcadores sorológicos de diagnóstico e prognóstico em doenças diversas. CD23 solúvel (sCD23), por exemplo, tem sido empregado no diagnóstico de doenças como linfoma não-Hodgking cerebral, neurotoxoplasmoses, demência (Bossolasco et al., 2001), malária cerebral (Nacher et al., 2002), alergia alimentar (Li et al., 2006) e artrite (Rambert et al., 2009) e no prognóstico de adenocarcinoma pancreático, quando associado à dosagem de IgE (Fu et al., 2008). Estudos demonstraram que outra molécula solúvel, o CD40L, é um poderoso marcador bioquímico na atividade inflamatória trombótica em pacientes com síndromes coronárias agudas (Bilgir et al., 2012; Heeschen et al., 2003), associado a doenças degenerativas como Alzheimer (Own; Tan; Mullan, 2001) e câncer (Huang et al., 2012). Franzmann et al., 2005 avaliaram o papel da CD44 solúvel (sCD44) na saliva e o caracterizaram como um potencial marcador molecular para câncer de cabeça e pescoço e concluíram que o exame pode ser efetivo para detectar esse tipo de câncer em todos os estágios.

Moléculas de MHC-II solúveis (sMHCII) foram observadas por Calne e colaboradores (1967) em estudo com fígado de porcos transplantados (Pfeiffer et al., 2000; Puppo et al., 1997). sMHC-II estão presentes em fluidos corporais de indivíduos saudáveis e estão envolvidas na manutenção da auto-tolerância e também relacionadas ao funcionamento saudável do sistema nervoso central (Aultman et al., 1999; Schwartz; Ziv, 2008). Alterações das concentrações fisiológicas de MHC solúvel (sMHC) tem papel fundamental e foram registradas em numerosas condições patológicas, como encefalite viral, AIDS (Aultman et

al., 1999), artrite reumatoide (Verbruggen et al., 2002; Wolf et al., 1998), gravidez patológica (Pfeiffer et al., 2000; Steinborn et al., 2003), asma (Rizzo et al., 2005), hepatite C e uveíte crônica e aguda (Heiligenhaus et al., 2004).

A molécula de CD14 solúvel (sCD14) têm sido descritas como marcador de diagnóstico e prognóstico. Trabalhos tem demonstrado correlação entre altos índices da molécula no soro de pacientes com periodontite (Hayashi et al., 1999), tuberculose (Hoheisel et al., 1995), brucelose (Ayaslioglu et al., 2005), sépsese (Landmann et al., 1995; Hiki et al., 1998), politraumatizados (Krüger et al., 1991), em doenças autoimunes sistêmicas (Nockher et al., 1994), em condições inflamatórias como na doença de Kawasaki (Takeshita et al., 2000), na dermatite atópica (Wüthrich et al., 1992; Thijs et al., 2017), na artrite reumatoide (Yu et al., 1998), em doenças do fígado (Oesterreicher et al., 1995), em pacientes com esclerose múltipla (Lutterotti et al., 2006), HIV positivos (Nockher et al., 1994), em pacientes com malária (Wenisch et al., 1996) e pacientes com leishmaniose visceral humana (Dos Santos et al., 2016).

CD14 é uma glicoproteína de superfície celular expressa principalmente em células de resposta imune inata, como monócitos, macrófagos, neutrófilos e células B; que reconhece ligantes na superfície celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas servindo como um receptor de alta afinidade para LPS (lipopolissacarídeos).

Além de presente na membrana (mCD14), CD14 também é encontrado em um estado circulante solúvel (sCD14) (Durieux et al., 1994; Bufler et al., 1995). Há duas possíveis origens para o sCD14, a primeira seria pela liberação da célula como um precursor, antes da ancoragem na membrana, de tamanho semelhante ao de membrana (54kDa) ou então por clivagem proteolítica através da ação de enzimas que atuam na âncora de GPI, dando origem a uma forma menor (49kDa) (Ziegler-Heitbrock et al., 1993). A forma solúvel da molécula pode ser encontrada no plasma, soro, sobrenadante de cultura celular inclusive. Estudos tem demonstrado sua presença, em altas concentrações no leite materno, também podendo proteger contra o desenvolvimento de alergias (Landmann et al., 1995; Savilahti et al., 2005). O papel exato do CD14 em situações fisiológicas e patológicas não está bem definido, porém sabe-se da sua importância em células que não expressam mCD14 tais como mucosa gengival e células epiteliais da bexiga e cólon (Uehara et al., 2001). Além disso, estudo demonstrou a participação da molécula na inibição da ativação dos macrófagos diminuindo a resposta inflamatória (Glück et al., 2001).

É sabido que na LVC a alteração no número de determinados tipos celulares ocorre devido ao estímulo imune originado no local da infecção, além de que alterações podem ocorrer também devido ao parasitismo medular que induz a diminuição da produção de algumas células.

Estudos têm demonstrado alterações em parâmetros hematológicos e bioquímicos de cães com leishmaniose nos quais cães sintomáticos, em geral, apresentam intensa leucopenia, linfocitopenia, neutrofilia, monocitopenia e trombocitopenia em relação aos cães assintomáticos (Alvar et al., 2004; Amusatogui et al., 2003; Baneth et al., 2008; Ciaramella et al., 2005; Guerra et al., 2009; Reis et al., 2006a, 2006b). Também é observada hiperproteinemia, devido a maior produção de anticorpos específicos (Ferrer, 1992; Ikeda-Garcia et al., 2007; Koutinas et al., 1999), além da inversão do quociente albuminas globulinas de acordo com a progressão clínica do animal (Keenan et al., 1984; Reis et al., 2006b). Outros pesquisadores observaram alterações nas enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase, além dos níveis de ureia (Abreu-Silva et al., 2008; Freitas et al., 2012).

Trabalho do nosso grupo de pesquisa Goncalves e colaboradores (2011) descreveram o importante papel de monócitos inflamatórios durante a infecção por *L. major*, em camundongos, que envolve a participação de plaquetas e a rápida migração de monócitos para o local da infecção onde são capazes de matar os parasitos. Foi possível observar que durante a ativação destas células pela *Leishmania*, o número e frequência de monócitos no sangue aumentavam. Martins (2016), dados recentes não publicados, demonstraram, que o aumento da frequência e número de monócitos no sangue está diretamente relacionado à lesão da pata em camundongos experimentalmente infectados com *L. major*. Em 2013 Barbosa, dados não publicados, realizou a caracterização de monócitos caninos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, através da citometria de fluxo, demonstrando aumento na frequência destas células em cães sintomáticos, quando comparados a cães assintomáticos ou não infectados.

Devido à ausência de parâmetros laboratoriais pouco invasivos indicativos de prognóstico no tratamento da LVC, o entendimento, a identificação e caracterização do comportamento de células sanguíneas tanto nas fases iniciais quanto no curso da infecção ou durante o tratamento, poderia ser de grande importância para melhor acompanhamento de animais tratados ou com recidivas. A alterações na frequência, número absoluto ou fenótipo das

células leucocitárias pode representar importante método de prognóstico de evolução da doença e do seu tratamento atuando como biomarcadores a fim de melhorar a abordagem terapêutica. Além disso, o uso de células sanguíneas é um meio pouco invasivo, rápido, barato, eficaz e já realizado na conduta para acompanhamento da doença em animais tratados ou não.

**3 CAPÍTULO 1:
ESTUDO RETROSPECTIVO**

3.1 Objetivo geral

Analisar fatores clínicos e laboratoriais para a identificação de parâmetros hematológicos, como marcadores biológicos, em cães naturalmente infectados, por *Leishmania infantum*, submetidos a um protocolo terapêutico a fim de utilizar estes dados na predição de prognóstico e conduta terapêutica.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar os prontuários contendo os parâmetros clínicos descritos, antes e após a administração da conduta terapêutica;

3.2.2 Avaliar os prontuários contendo exames do perfil hematológico: hemograma completo com série vermelha, plaquetas e leucograma completo antes e após a administração da conduta terapêutica;

3.2.3 Avaliar os prontuários contendo exames do perfil bioquímico: Proteínas totais, albumina, globulinas, uréia e creatinina séricas antes e após a administração da conduta terapêutica;

3.2.4 Correlacionar condição clínica e os resultados dos exames laboratoriais.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Seleção da amostra

A partir do acesso ao banco de dados do Santo Agostinho Hospital Veterinário, *Software DoctorVet®*, foi realizado levantamento de prontuários de cães soropositivos. Todos os dados destes prontuários foram consultados e então selecionados os animais que participaram deste estudo.

3.3.2 Critério de Inclusão

Foram incluídos no estudo 45 cães atendidos pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário, naturalmente infectados por *L. infantum*, sintomáticos, de ambos os sexos, idade e raça variadas, que obtiveram resultado positivo para LVC em pelo menos um dos exames que confirma a infecção através de métodos sorológicos e/ou e que foram submetidos ao protocolo terapêutico para tratamento de LVC com imunoterapia vacinal, Leish-Tec®, e que são mantidos em uso constante de alopurinol, na dose de 10-20mg/kg a cada 12 horas.

3.3.3 Análise dos Prontuários

Foram recolhidas dos prontuários informações sobre a condição clínica; os resultados dos exames parasitológicos diretos, como esfregaços de aspirado de medula óssea, e imunohistoquímica de fragmento da face interna da orelha do cão, obtida a partir de biópsia; o perfil sorológico, que consistiu na diluição reativa final da RIFI e resultado de teste de Elisa; e aos exames laboratoriais, como hemograma completo e o perfil renal do paciente, a partir de dosagens de uréia e creatinina séricas e do perfil de proteínas séricas. Estes dados foram selecionados de forma temporal considerando o estado clínico e laboratorial dos animais no momento que precedeu o início da administração do protocolo terapêutico, chamado de “Antes” e no período de 180 dias após a última administração do protocolo terapêutico, denominado “Depois”.

3.3.4 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelos testes que mais se aplicaram a cada caso com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Para confirmar os padrões de normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Resultados que assumiram distribuição normal foram analisados por Teste t de Student Pareado. Os dados foram expressos por média e as diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p < 0.05$. Para resultados que assumiram distribuição não paramétrica, foi realizado o teste de Wilcoxon para comparação entre os grupos.

Os dados foram expressos por mediana e as diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p < 0.05$.

Foram utilizados os testes de Fisher's e Qui-quadrado para análise de contingência e coeficiente de Spearman para todos os dados.

3.4 Resultados

3.4.1 Avaliação dos aspectos clínicos

A análise dos prontuários, descrevendo aspectos clínicos antes e após a conduta terapêutica, foi realizada e os dados demonstraram as alterações clínicas apresentadas na Figura 1, como esplenomegalia, palidez de mucosa, onicogribose, dermatite, linfadenopatia, lesões de pele e alopecia. Foi observada melhora dos sinais clínicos após a administração do protocolo terapêuti

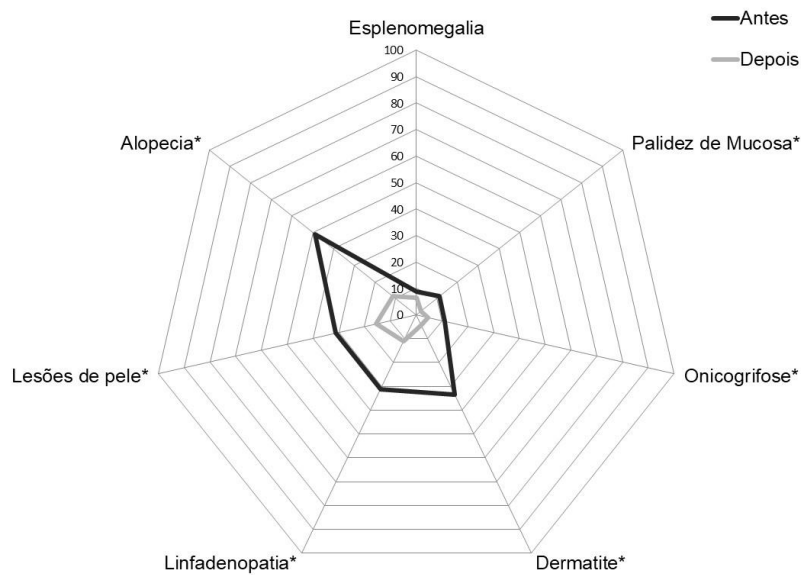


Figura 1: Frequência (%) dos sinais clínicos apresentados por cães infectados sintomáticos, antes e depois da administração do protocolo terapêutico.

3.4.2 Análise dos Exames Laboratoriais

3.4.2.1 Análise Hematológica

3.4.2.1.1 Eritrograma

A análise do hemograma revelou aumento significativo dos valores do hematócrito (Figura 2A), hemoglobina (Figura 2B) e de eritrócitos (Figura 2C) após a última administração do protocolo terapêutico quando comparado ao início do tratamento.

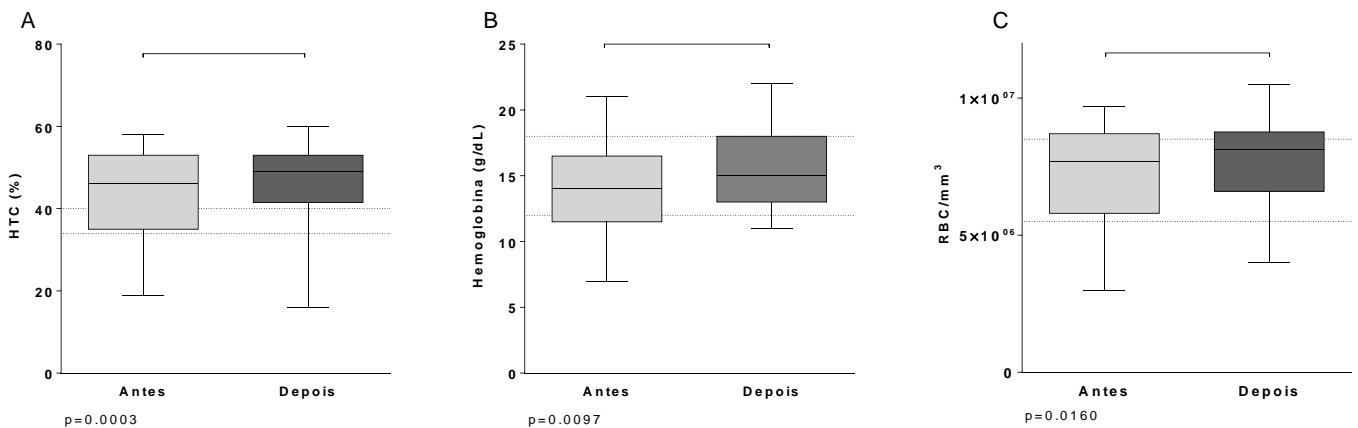
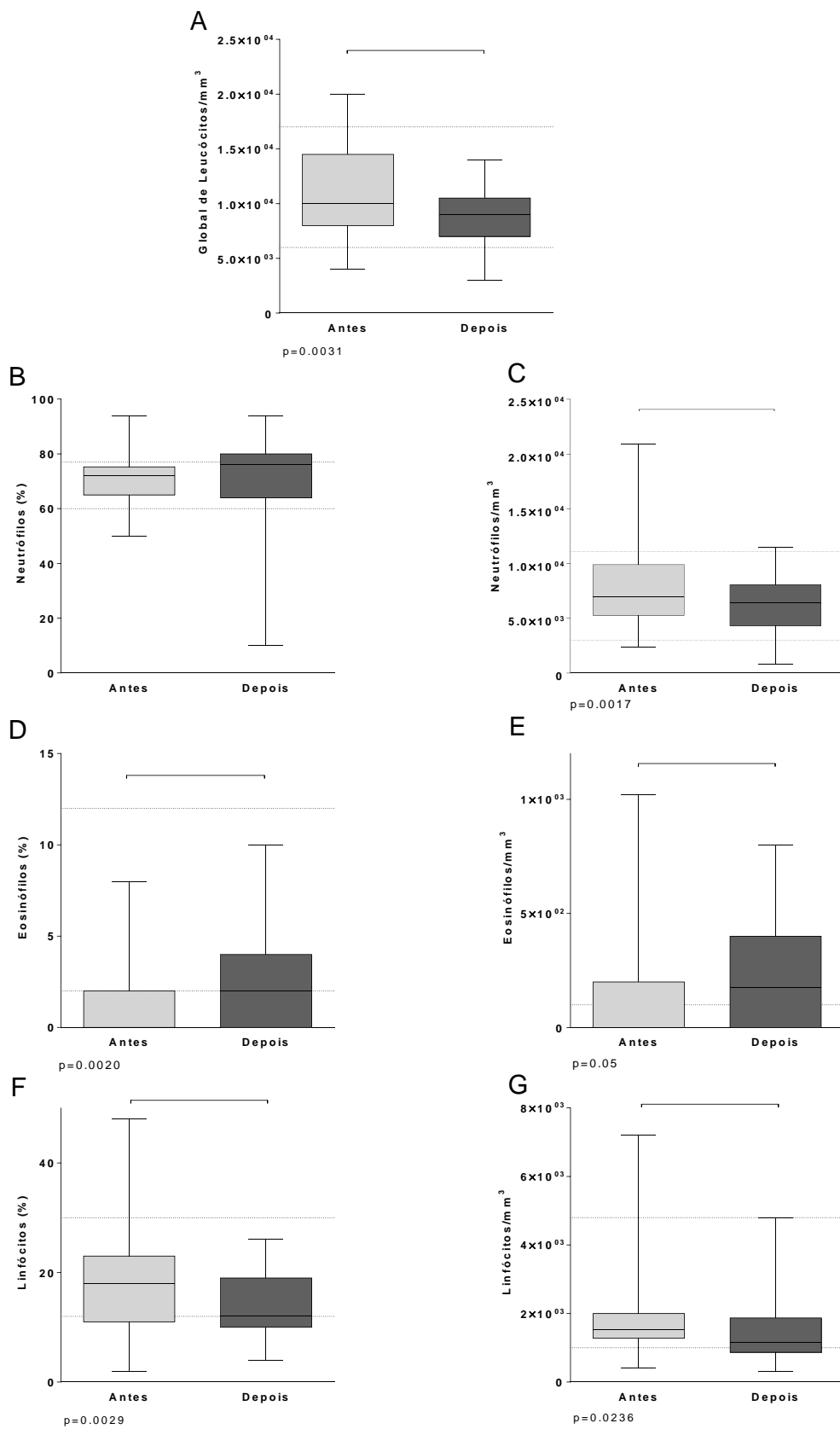


Figura 2: Parâmetros eritrocitários: (A) hematócrito, (B) hemoglobina e (C) eritrócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

3.4.2.1.2 Leucograma

A análise dos dados do leucograma revelou diminuição significativa no número de leucócitos totais (Figura 3A), na frequência de linfócitos (Figura 3F) e monócitos (Figura 3H); e no número absoluto de neutrófilos (Figura 3C), linfócitos (Figura 3G) e monócitos (Figura 3I). Por outro lado, foi observado aumento significativo na frequência (Figura 3D) e número absoluto (Figura 3E) de eosinófilos e na contagem de plaquetas (Figura 3J) após a última administração do protocolo terapêutico quando comparado ao início do tratamento.



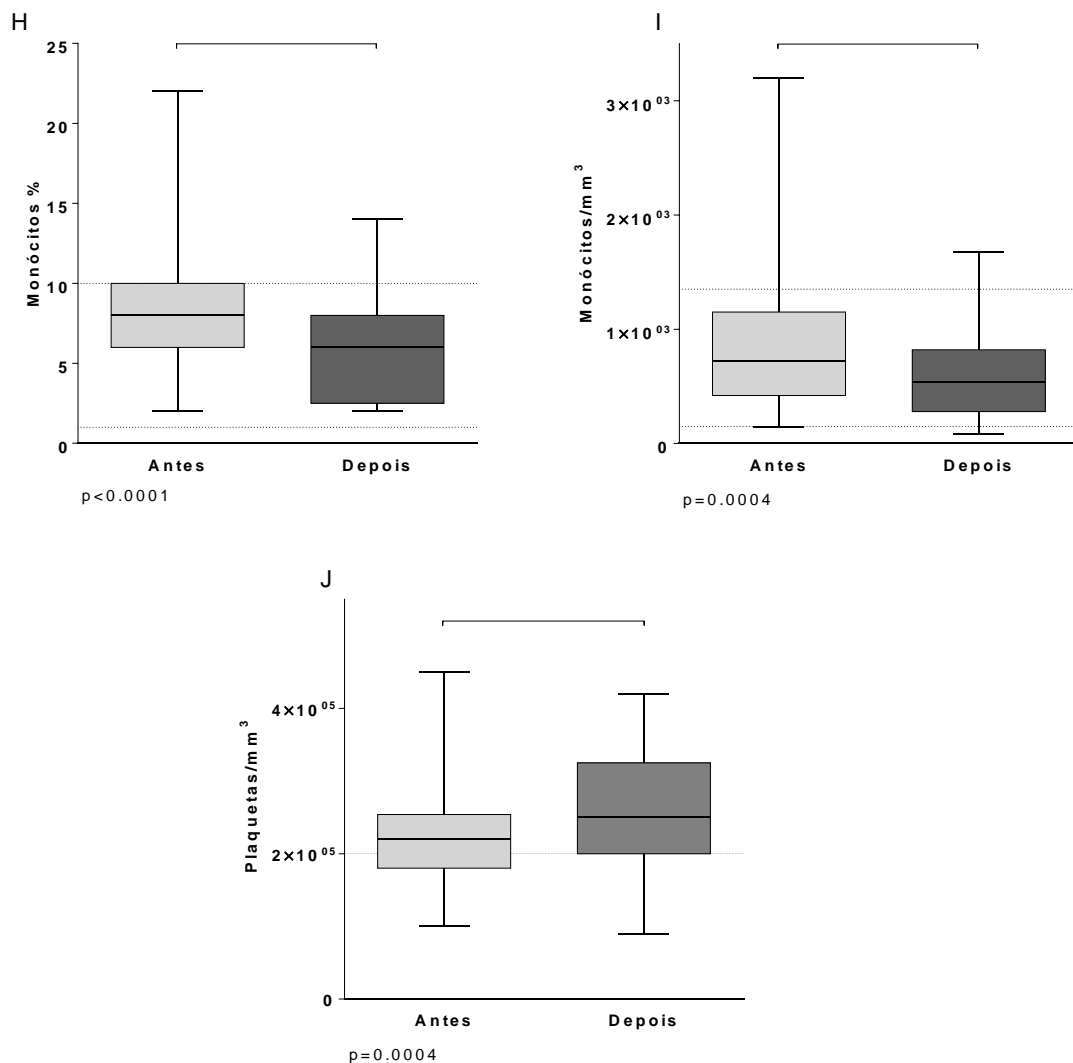


Figura 3: Contagem global, diferencial e da frequência do sangue periférico de (A) leucócitos, (B e C) neutrófilos, (D e E) eosinófilos, (F e G) linfócitos, (H e I) monócitos e (J) plaquetas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

Ao observar diminuição, significativa, na frequência e no número absoluto de monócitos, concordando com os achados de Barbosa (2013) e Martins (2017), traçamos como objetivo verificar se a redução dessas células, após a administração do protocolo terapêutico, seria proveniente dos mesmos cães antes da administração do protocolo terapêutico.

A análise dos dados confirmou, significativamente, que os cães que tiveram decaimento de monócitos obtiveram sua frequência (Figura 4A) e número absoluto (Figura 4B) maiores anteriormente à administração do protocolo terapêutico.

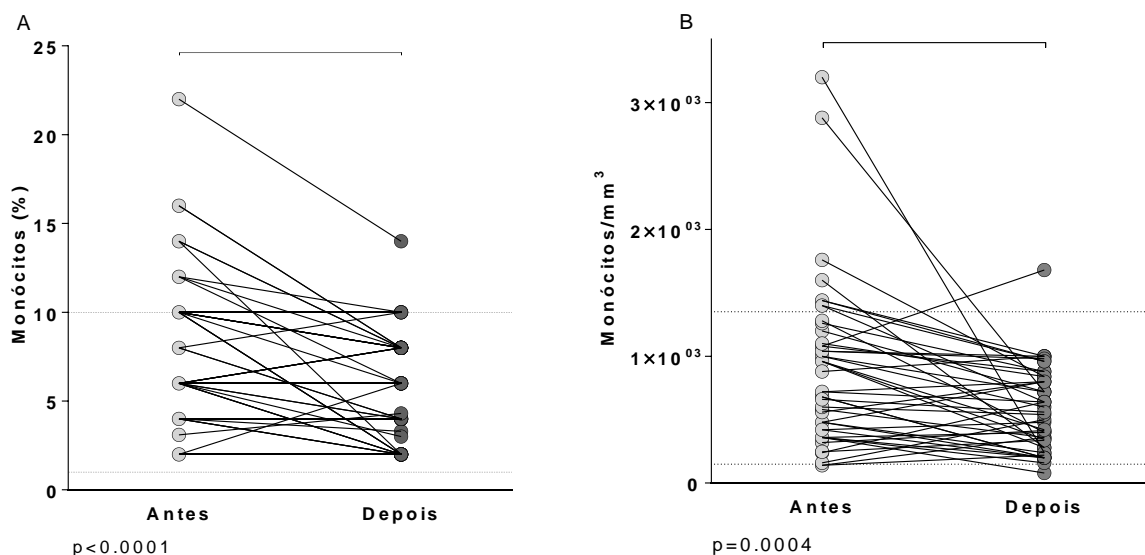


Figura 4: Análise da frequência (A) e número absoluto (B) de monócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

3.4.2.2 Análise do Perfil Bioquímico

O perfil bioquímico é considerado de grande importância na conduta veterinária. Valores de globulinas, relação A/G (albumina e globulinas), uréia e creatinina séricas já são utilizados na prática veterinária como parâmetros de prognóstico na avaliação dos animais durante a conduta terapêutica.

3.4.2.2.1 Proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina e globulinas séricas

A avaliação dos resultados do perfil bioquímico dos cães, após a administração do protocolo terapêutico, não demonstrou alterações significativas na quantificação de proteínas totais (Figura 5A). Entretanto, foi observado aumento significativo nos valores de albumina (Figura 5B) e diminuição significativa dos valores de globulinas séricas (Figura 5C) concordando com o aumento significativo nos valores da relação albumina globulinas (Figura 5D).

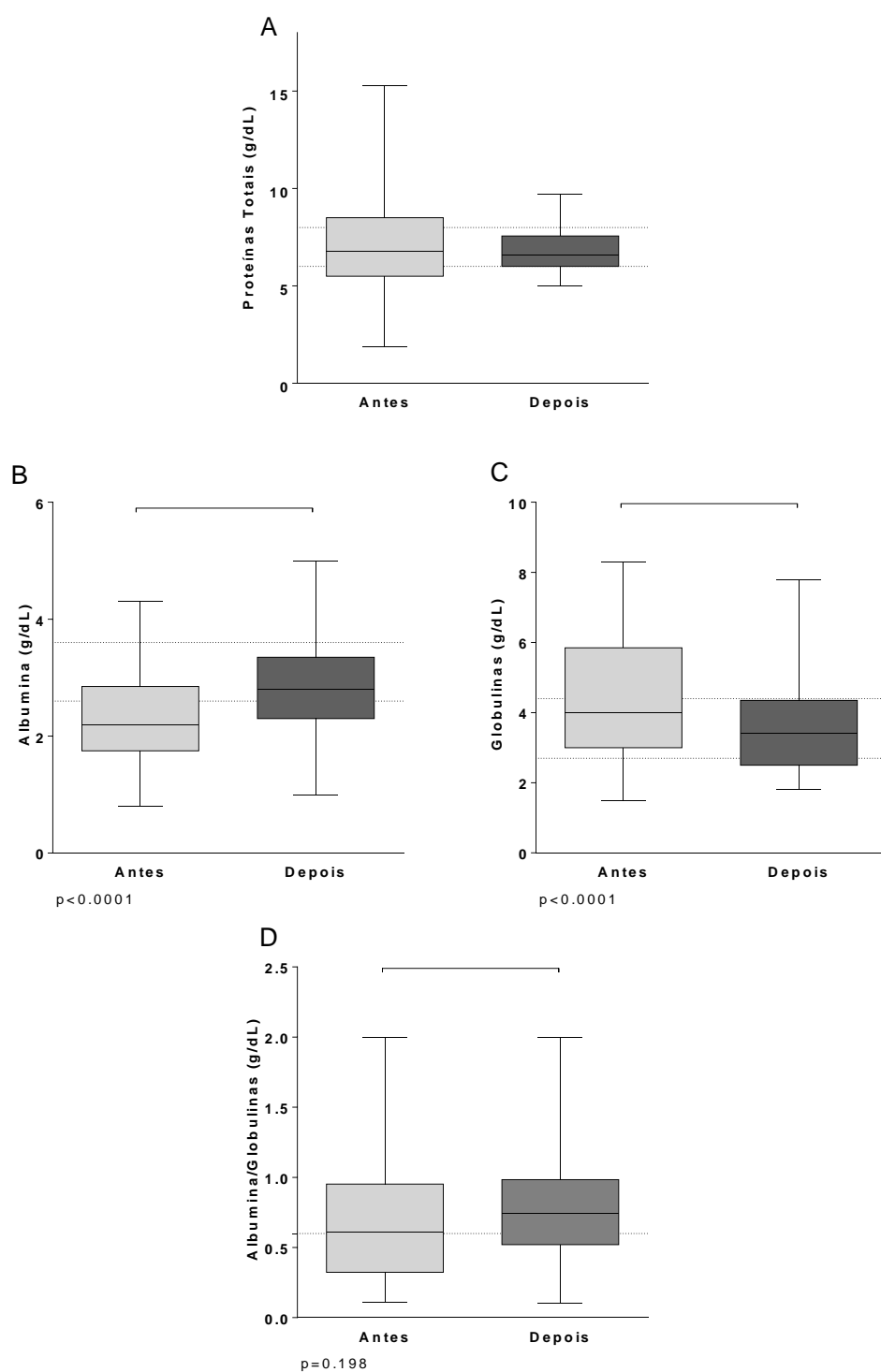


Figura 5: Níveis séricos de (A) proteínas totais, (B) albumina, (C) globulinas e (D) relação albumina globulinas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

3.4.2.2.2 Ureia e creatinina séricas

A avaliação dos resultados demonstrou diminuição significativa dos níveis de ureia (Figura 6A) e creatinina (Figura 6B) séricas após a administração do protocolo terapêutico.

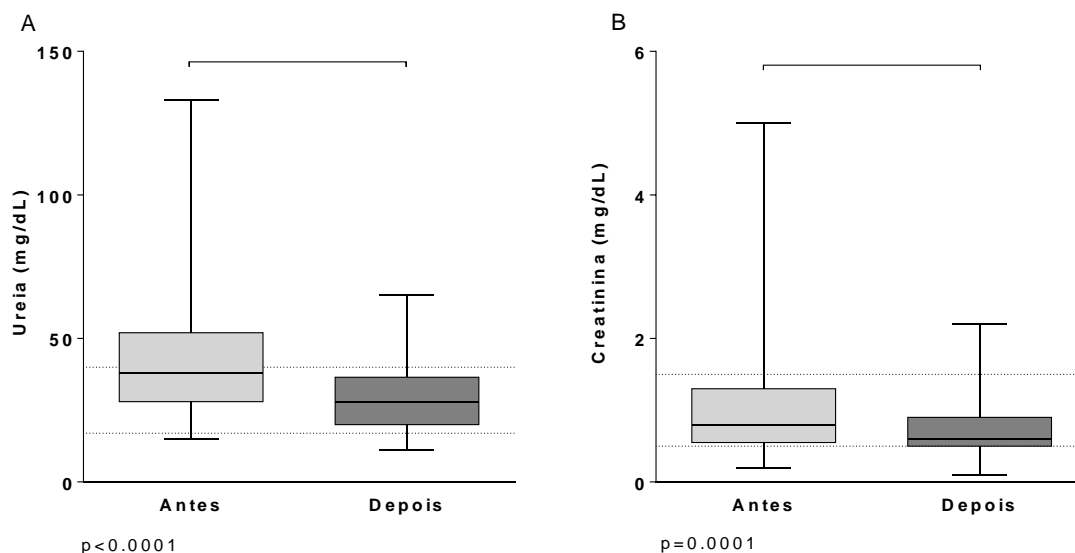


Figura 6: Níveis séricos de ureia (A) e creatinina (B) de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário

Diante dos resultados obtidos verificamos se haveria correlação entre a alteração do número absoluto de monócitos e parâmetros de prognóstico já utilizados na prática veterinária. Desse modo, a diminuição do número absoluto de monócitos foi correlacionada a fatores hematológicos, como o global de leucócitos totais e a fatores bioquímicos como proteínas totais, albumina, globulinas, fração albumina globulinas, ureia e creatinina séricas.

Dentre os aspectos relacionados foi observada correlação positiva entre o número de leucócitos totais e monócitos ($p < 0.001$; $r = 0.5413$) (Figura 7A) e ureia e monócitos ($p < 0.05$; $r = 0.2845$) (Figura 7F).

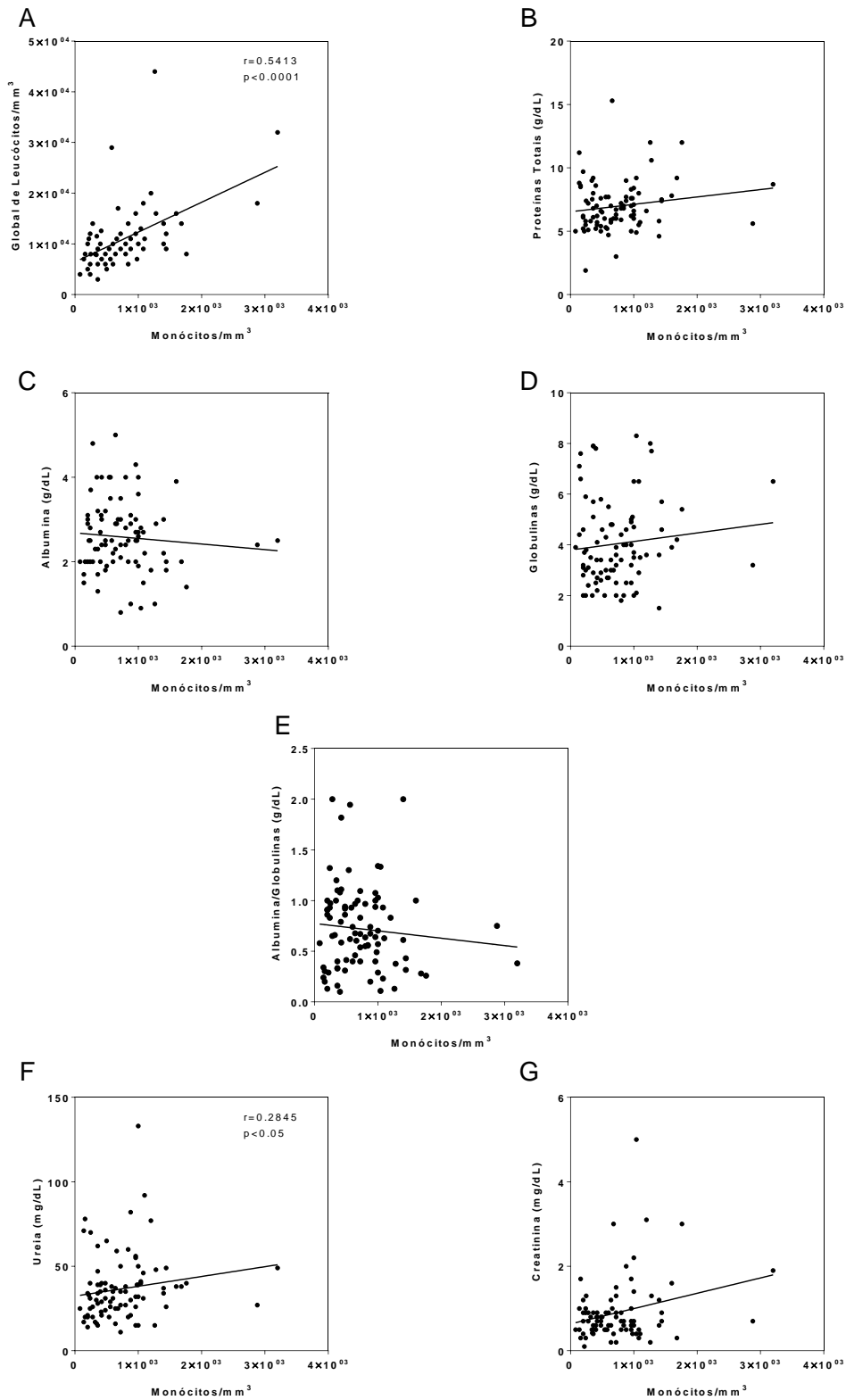


Figura 7: Correlação entre o número absoluto de monócitos e (A) global de leucócitos, (B) proteínas totais, níveis séricos de (C) albumina, (D) globulinas, (E) fração albumina/globulinas, (F) ureia e (G) creatinina séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas $p<0.05$.

Mesmo que não tenha sido demonstrada correlação significativa entre o número absoluto de monócitos e os níveis de globulinas foi observado, significativamente ($p < 0.0001$), que 100% dos cães que obtiveram queda no número absoluto de monócitos, após a administração do protocolo terapêutico, também obtiveram queda nos níveis de globulinas séricas (Tabela 2).

Tabela 2: Associação entre o número absoluto de monócitos e os níveis de globulinas séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fischer's $p < 0.0001$).

MONÓCITOS	GLOBULINAS		TOTAL
	AUMENTOU	DIMINUIU	
AUMENTOU	11	0	11
DIMINUIU	0	34	34
TOTAL	11	34	45

Verificamos se haveria correlação entre a alteração do número absoluto de monócitos e o status clínico do animal após a administração do protocolo terapêutico. Nossos resultados demonstraram, significativamente ($p < 0.0001$), que 100% dos cães que obtiveram melhora clínica também demonstraram queda dos números absolutos de monócitos, após a administração do protocolo terapêutico, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Associação do número absoluto de monócitos com o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fischer's $p < 0.0001$).

MONÓCITOS	AVALIAÇÃO CLÍNICA		TOTAL
	MELHOROU	PIOROU	
AUMENTOU	0	11	11
DIMINUIU	34	0	34
TOTAL	34	11	45

**4 CAPÍTULO 2:
ESTUDO PROSPECTIVO**

4.1 Objetivo geral

Analisar fatores clínicos e laboratoriais para a identificação de parâmetros hematológicos, como marcadores biológicos, em cães naturalmente infectados, por *Leishmania infantum*, submetidos a protocolo terapêutico a fim de utilizar estes dados na predição de prognóstico e conduta terapêutica.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Avaliar parâmetros clínicos dos animais, descritos nos prontuários, antes e após a administração da conduta terapêutica;

4.2.2 Avaliar o perfil hematológico: hemograma completo com série vermelha, plaquetas e leucograma completo antes e após a administração da conduta terapêutica;

4.2.3 Avaliar os prontuários contendo exames do perfil bioquímico: Proteínas totais, albumina, globulinas, uréia e creatinina séricas antes e após a administração da conduta terapêutica;

4.2.4 Avaliar quantitativamente e qualitativamente, por citometria de fluxo, as subpopulações de monócitos, baseados na expressão de CD14, do sangue periférico;

4.2.5 Correlacionar condição clínica com os resultados dos exames laboratoriais.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Comitê de Ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais com protocolo 199/2013 (ANEXO A).

4.3.2 Seleção da amostra

4.3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo 12 cães, naturalmente infectados por *L. infantum*, sintomáticos, de sexo, idade e raça variados, que obtiveram primeiro resultado positivo para LVC em pelo menos um dos exames que confirma a infecção, através de métodos sorológicos (teste imunocromatográfico ou Elisa Idexx e RIFI) e molecular (PCR) que foram submetidos ao primeiro tratamento com protocolo terapêutico para LVC com imunoterapia vacinal, Leish-Tec®, e que são mantidos em uso constante de Alopurinol, na dose de 10-20mg/kg a cada 12 horas.

Todos os dados foram selecionados de forma temporal considerando o estado clínico e laboratorial dos animais no momento que precedeu o início da administração do protocolo terapêutico, chamado de “Antes” e no momento após a última administração do protocolo terapêutico. 42 dias após o início do protocolo, que foi nomeado “Depois”.

4.3.3 Anuência do proprietário

Após a avaliação clínica, laboratorial e confirmação da soropositividade dos animais foi agendada uma entrevista com o proprietário de cada cão selecionado. Na entrevista os proprietários foram informados dos objetivos do projeto e foi solicitada sua concordância para a utilização dos dados dos exames clínicos e laboratoriais de cada cão. Esta autorização foi obtida com a assinatura, do proprietário, em um termo de anuência (ANEXO B).

4.3.4 Exame clínico

Todos os procedimentos foram conduzidos no Santo Agostinho Hospital Veterinário, localizado no bairro Santo Agostinho, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Os animais selecionados passaram inicialmente por exame físico e os sinais clínicos foram registrados em ficha de avaliação individual.

4.3.5 Coleta de materiais biológicos

Após o exame clínico, os animais foram encaminhados para coleta de materiais biológicos para realização de exames hematológicos (hemograma, níveis séricos de ureia, creatinina, proteínas séricas totais, albumina e fração albumina/globulinas); sorológicos (teste de Elisa Idexx, RIFI e Elisa) e parasitológico (PCR de pele e medula óssea) com a finalidade de confirmar a infecção por *L. infantum*.

4.3.5.1 Coleta de sangue

Amostras de sangue periférico foram coletados de cada animal, 10mL, através de venopunção jugular após tricotomia e antissepsia local, com o auxílio de uma seringa descartável estéril com agulha descartável estéril de calibre 21G1 (0.80mm x 25mm) da marca BD®. Após a coleta, 2mL do sangue foram transferidos para um tubo contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), o qual foi homogeneizado por meio de movimento de inversão do frasco 10 vezes conforme indicação do fabricante do aparelho processador e destinado ao laboratório de patologia clínica, do Santo Agostinho Hospital Veterinário, para realização do hemograma e de testes bioquímicos.

O restante do material utilizado para realização do hemograma e análise bioquímica foi enviado ao laboratório do Departamento de Patologia Geral, ICB/UFMG, para realização das técnicas de Citometria de Fluxo, para marcação de CD14 nas células do sangue e ELISA sanduiche para detecção de moléculas solúveis no soro. Para a realização de exames sorológicos de imunocromatografia, ELISA e RIFI 4mL da amostra sanguínea foram armazenados em tubo para coleta de soro e encaminhados para o Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

4.3.5.2 Biopsia de pele

A tricotomia e antissepsia da face interna da orelha foi realizada após aplicação de 4mg/kg, por via subcutânea, de cloridrato de lidocaína (Cloridrato de Lidocaína 1%, Hipolabor, Brasil) sem vasoconstritor, como anestésico local, na face interna de uma das orelhas. Procedeu-se então a retirada de um fragmento da pele com o auxílio de um “punch” de 5mm de diâmetro (Punch para Biópsia®, Kolplast ci LTDA, Brasil). O fragmento retirado foi depositado em papel filtro estéril para remoção do excesso de sangue. Logo após, o material foi acondicionado em tubos eppendorf DNase e RNase free para realização da técnica de qPCR no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

4.3.5.3 Coleta da medula óssea

Após tricotomia e antissepsia, a medula óssea foi coletada através de punção do aspirado medular, na extremidade anterior do manúbrio. O conteúdo medular foi aspirado com agulha de 1,25mm x 38mm, acoplada a uma seringa de 10mL. O conteúdo aspirado foi armazenado em tubo DNase e RNase free e mantidos a -20°C e enviados para a realização da qPCR no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

4.3.6 Testes Sorológicos

4.3.6.1 - ELISA (Ensaio Imunoenzimático)

A reação de ELISA é o teste preconizado pelo Ministério da Saúde para a triagens de cães nos inquéritos sorológicos do Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral. O Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG já realiza rotineiramente a técnica, para a detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, em parceria com o Santo Agostinho Hospital Veterinário.

As amostras de soro obtidas foram submetidas ao protocolo de ELISA realizado segundo técnica descrita por Voller et al. (1976), com modificações. Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, após ruptura por ultra-som a 40ω BRANSON 1510®, Branson Ultrasonics Co., EUA) e centrifugação a 1360g (Centrífuga Excelsa Baby II®, FANEM, Brasil) por 10 minutos. Foi

dosada a quantidade de proteínas através dos métodos de Lowry (LOWRY et al. 1951), e ajustada para 20µg por mililitro em PBS e armazenado em freezer à 20°C em alíquotas, até o momento de uso. Foi utilizado como conjugado antiimunoglobulina de cão IgG, marcada com Peroxidase VI (Bethyl Lab. Inc., EUA) na diluição 1:2000. O bloqueio dos sítios inespecíficos presentes na microplaca foi realizado com adição de solução de PBS-Caseína 2% (Calbiochem, Alemanha) por 30 minutos. Foram utilizadas microplacas de polietileno (Falcon®, BD Lab., EUA) de 96 orifícios e fundo plano. Cada orifício foi sensibilizado com 2µg de antígeno, diluídos em 100µl de tampão carbonato, constituído de 159mg de Na₂CO₃ (Merck, Alemanha) e 293mg de NaHCO₃ (Merck, Alemanha), diluídos em 100ml de água destilada, durante um período mínimo de 24 horas. Para a realização do teste, o excesso de antígeno foi retirado da placa pela lavagem de cada orifício por cinco vezes, com solução de lavagem contendo 0,9% (p/v) de cloreto de sódio e 0,05% (v/v) de Tween 20®. A solução para bloqueio de sítios inespecíficos contendo 2% (p/v) de caseína (Sigma Aldrich, EUA) em PBS foi adicionada na ordem de 150µl por orifício, seguida de incubação por 30 minutos a 37°C. O excesso de solução de bloqueio foi retirado por duas lavagens sucessivas, com a solução de lavagem.

Os soros a serem testados foram diluídos em tampão de incubação contendo 0,05% (v/v) de Tween 20® e 0,25% de caseína (p/v). Foi aplicado 100µl da solução diluída em cada orifício, sendo utilizado, para isso, a diluição 1:400. A seguir, o material foi incubado por 45 minutos a 37°C e a retirada de excesso do soro diluído foi efetuada por uma série de cinco lavagens, com a solução de lavagem. Um volume de 100µl de conjugado 70 diluído a seu título foi acrescentado a cada orifício. Após nova incubação por 45 minutos a 37°C, o excesso de conjugado foi eliminado por nova série de cinco lavagens. Em seguida, 100µl de solução de OPD (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionada aos orifícios. A reação ocorreu à 37°C, no escuro, durante 10 minutos, e foi interrompida por adição de 25µl de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (Bio-Rad 2550®, EUA), a 495nm.

4.3.6.2 RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta)

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) foi utilizada para detectar anticorpos anti-Leishmania. O Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG já realiza rotineiramente a técnica em parceria com o Santo Agostinho Hospital Veterinário. A técnica de RIFI foi realizada baseada na técnica descrita por Camargo (1964), com modificações. Para a obtenção do título desejado, os soros a serem testados foram diluídos na razão dois, a partir de 1:40, em solução tampão fosfato (PBS) constituída de 850mg de NaCl (Merck, Alemanha), 132mg de NaHPO₄ (Merck, Alemanha), 15,6mg de NaH₂PO₄.H₂O (Merck, Alemanha), dissolvidos em 100ml de água destilada, com pH ajustado para 7.4. Foram colocados 25µl da solução obtida sobre cada região demarcada de uma lâmina, na qual foi previamente fixado o antígeno, constituído por formas íntegras de promastigotas de *L. infantum*, cepa MHOM/BR/1967/BH46. Após a incubação das lâminas em câmara úmida por 30 minutos em estufa a 37°C, estas foram lavadas com PBS, cobertas com o tampão por cinco minutos, lavadas em água destilada e secadas sob ventilação artificial (Ventilador Britânia B20, Brasil), e a cada região demarcada da lâmina foi acrescentado 25µl do conjugado diluído a seu título em PBS com Tween 2% (v/v) (Tween® 20, Merck, Alemanha), acrescido de Azul de Evans 1% (EVANS BLUE®, Sigma Aldrich, EUA).

O conjugado, constituído por anti IgG de cão, marcado com Isotiocianato de Fluoresceína (Bethyl Lab. Inc., EUA) foi diluído na proporção de 1:1500. Seguiram-se nova incubação, lavagem e secagem. A lâmina foi, então, coberta com glicerina tamponada e lamínula, e a leitura procedida em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX 41®, Japão). Soros conhecidamente positivos e negativos foram usados na mesma lâmina como controle da reação.

4.3.7 - Testes Parasitológicos

4.3.7.1 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

PCR específico realizado em amostras de pele da ponta da orelha e medula foi utilizado para confirmar a positividade dos animais para *L. infantum*. O Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG já realiza rotineiramente a técnica em parceria com o Santo Agostinho Hospital Veterinário.

Após a extração do DNA de cada amostra, foi realizada PCR em tempo real. Foi utilizada a plataforma ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo o protocolo descrito por Nicolas et al. (2002), com algumas modificações nos ciclos, a reação ocorreu da seguinte forma: 50° por 2min, 95° por 2min para a desnaturação do DNA, seguidos pela amplificação utilizando 40 ciclos de 10s a 95°C, 10s a 56°C e 30s a 72°C e para finalizar o ciclo de “melting” dado pela maquina, de 15s a 95°C, 30s a 60°C e 15s a 95°C.

4.3.8 Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo

A comparação entre a frequência de monócitos clássicos e não clássicos, foi realizado antes e após a administração do protocolo terapêutico, baseado na expressão de CD14^{high} e CD14^{low}. O experimento foi realizado de acordo com o protocolo utilizados por Barbosa et al., 2013.

Sangue periférico foi coletado em tubos a vácuo contendo K3EDTA. Amostras do sangue foram marcadas de acordo com protocolo BD FACSTM Lysing Solution (BD Pharmingen, #349202). Em tubos do tipo Falcon, 200µL de sangue total foram incubados com concentração de anticorpos previamente tituladas, à temperatura ambiente (20° - 22°C) durante 15min ao abrigo da luz. O anticorpo utilizado foi anti-CD14 PerCP-CyTM5.5 (BD PharmingenTM). As hemácias foram lisadas e os leucócitos fixados adicionando solução de lise (BD FACSTM Lysing Solution), durante 10min. à temperatura ambiente e em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas por sete minutos a 1300 rpm, ressuspendidas em 300µL de paraformaldeído 2% e transferidas para tubos (1,2mL) para citometria de fluxo.

As aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACS CaliburTM (BD Biosciences) e os dados foram obtidos no programa CellQuest (BD Biosciences), em seguida analisados com FlowJo v8.8.7 softwares (©Tree Star Inc.).

4.3.9 Detecção de moléculas solúveis por ELISA

Moléculas, como sCD14, sCD16, sCD11b, sCD18, sCD11a, sCD11c, sMHC-II, sCD80, sCD45RO e sCD44 foram detectadas através da técnica de ELISA sanduíche usando anticorpos específicos. Os soros dos animais infectados obtidos foram aliquotados e armazenado em freezer -80°C até o momento dos experimentos.

O protocolo para a análise dos níveis séricos de moléculas solúveis foi realizado, antes e após a administração do o protocolo terapêutico, de acordo com o descrito em Yang et al. (2007). Foi dosada a quantidade de proteína através do método de Lowry (Lowry et al. 1951), e ajustada para 10µg por mililitro em PBS e armazenado em freezer à 20°C em alíquotas, até o momento de uso. Foram utilizadas placas de 96 poços e fundo plano. Cada soro a ser testados foi diluído (1:1600) em tampão carbonato e adicionado permanecendo na placa durante um período de 24 horas. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado por solução de PBS-BSA 1% por 60 minutos a 37°C. Em seguida, o material foi incubado por 120 minutos a 37°C com anticorpo primário específico para cada molécula. O excesso foi retirado com a solução de lavagem. Logo após, o material foi incubado por 60 minutos a 37°C com anticorpo secundário específico e o excesso de conjugado foi eliminado por nova série de lavagens. Em seguidas, 50µl de solução de OPD (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionada aos orifícios. A reação ocorreu à 37°C, no escuro, durante 20 minutos, e foi interrompida por adição de 50µl de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente.

A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (Bio-Rad 2550®, EUA), a 492nm.

4.3.10 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelos testes que mais se aplicaram a cada caso com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Para confirmar os padrões de normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Resultados que assumiram distribuição paramétrica foram analisados por Teste t de Student Pareado. Os dados foram expressos por média e as diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p < 0.05$. Para resultados que assumiram distribuição não paramétrica, foi realizado o teste de Wilcoxon para comparação entre os grupos. Os dados foram expressos por mediana e as diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p < 0.05$. Foi utilizado teste de Fisher's para análise de contingência e coeficiente de Spearman para a análise das correlações.

4.4 Resultados

4.4.1 Avaliação dos aspectos clínicos

Como no estudo retrospectivo, os aspectos clínicos foram avaliados antes e após a conduta terapêutica. A análise dos prontuários demonstrou alterações clínicas, apresentadas na Figura 9, como perda de massa corporal, esplenomegalia, palidez de mucosa, onicogribose, dermatite, linfadenopatia, lesões de pele e alopecia.

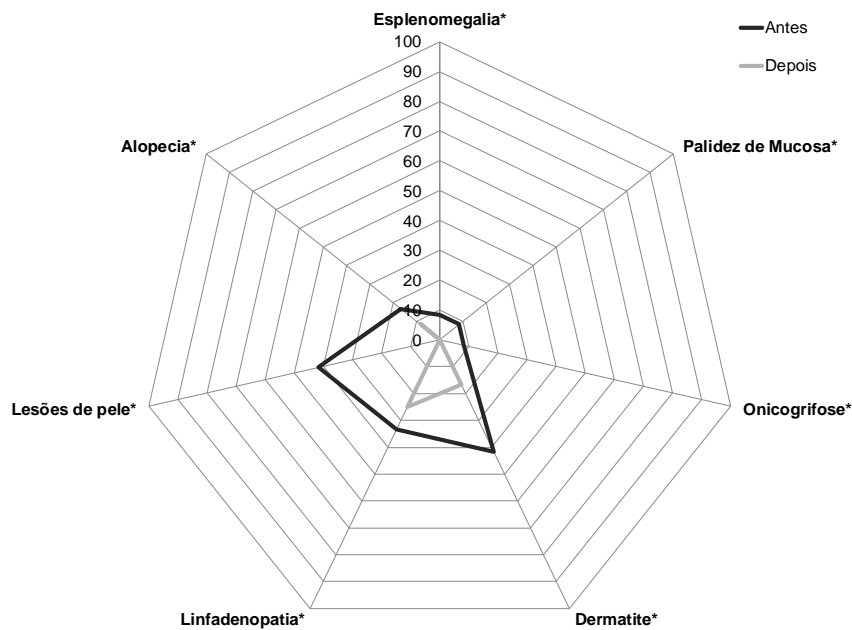


Figura 8: Frequência (%) dos sinais clínicos apresentados por cães infectados sintomáticos, antes e depois da administração do protocolo terapêutico.

4.4.2 Análise dos exames boratorias

4.4.2.1 Análise hematológica

4.4.2.1.1 Eritrograma

A análise dos dados do eritrograma não revelou diferenças significativas para os valores de hematócrito (Figura 9A), hemoglobina (Figura 9B) e eritrócitos (Figura 9C) após a última administração do protocolo terapêutico.

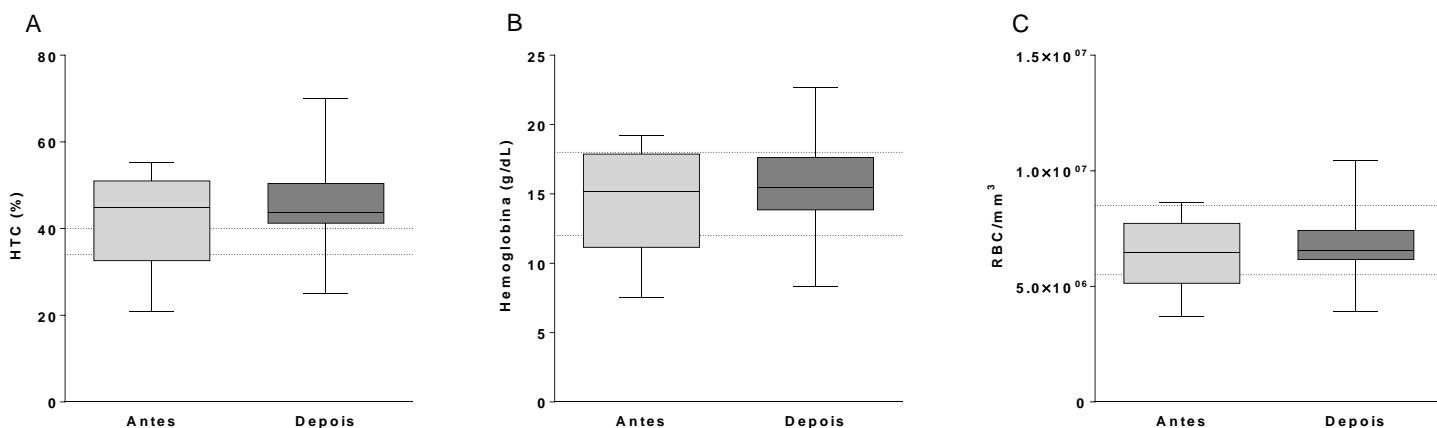
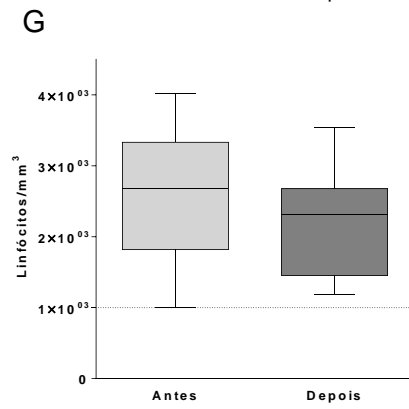
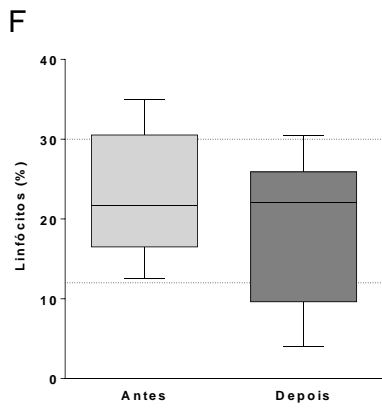
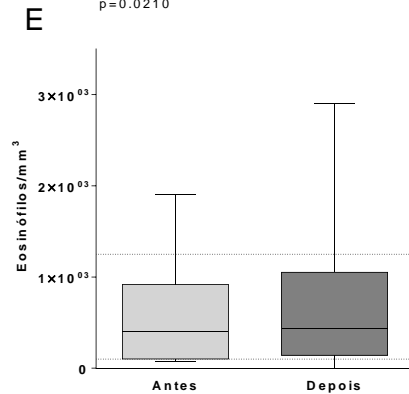
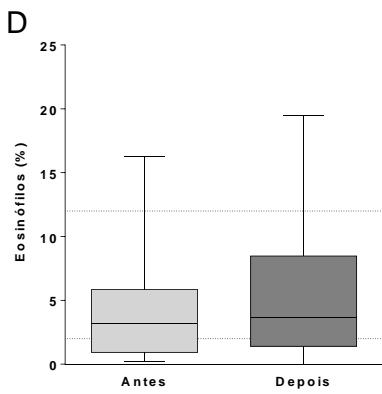
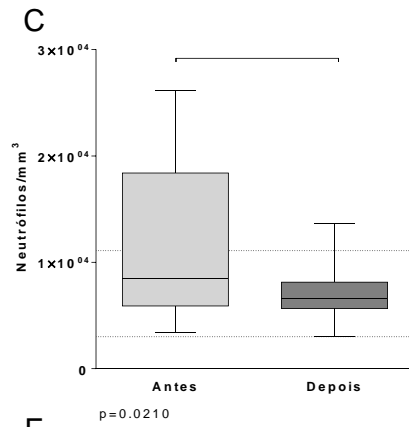
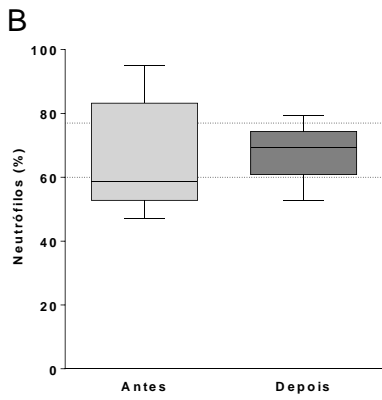
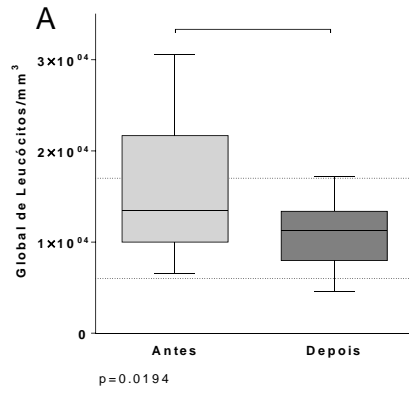


Figura 9: Parâmetros eritrocitários: (A) hematócrito, (B) hemoglobina e (C) eritrócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

4.4.2.1.2 Leucograma

A análise dos dados do leucograma revelou diminuição significativa no número de leucócitos totais (Figura 10A), no número absoluto de neutrófilos (Figura 10C) e na frequência e número absoluto de monócitos (Figuras 10H e 10I). Também foi observado aumento significativo na contagem de plaquetas (Figura 10J) após a última administração do protocolo terapêutico.



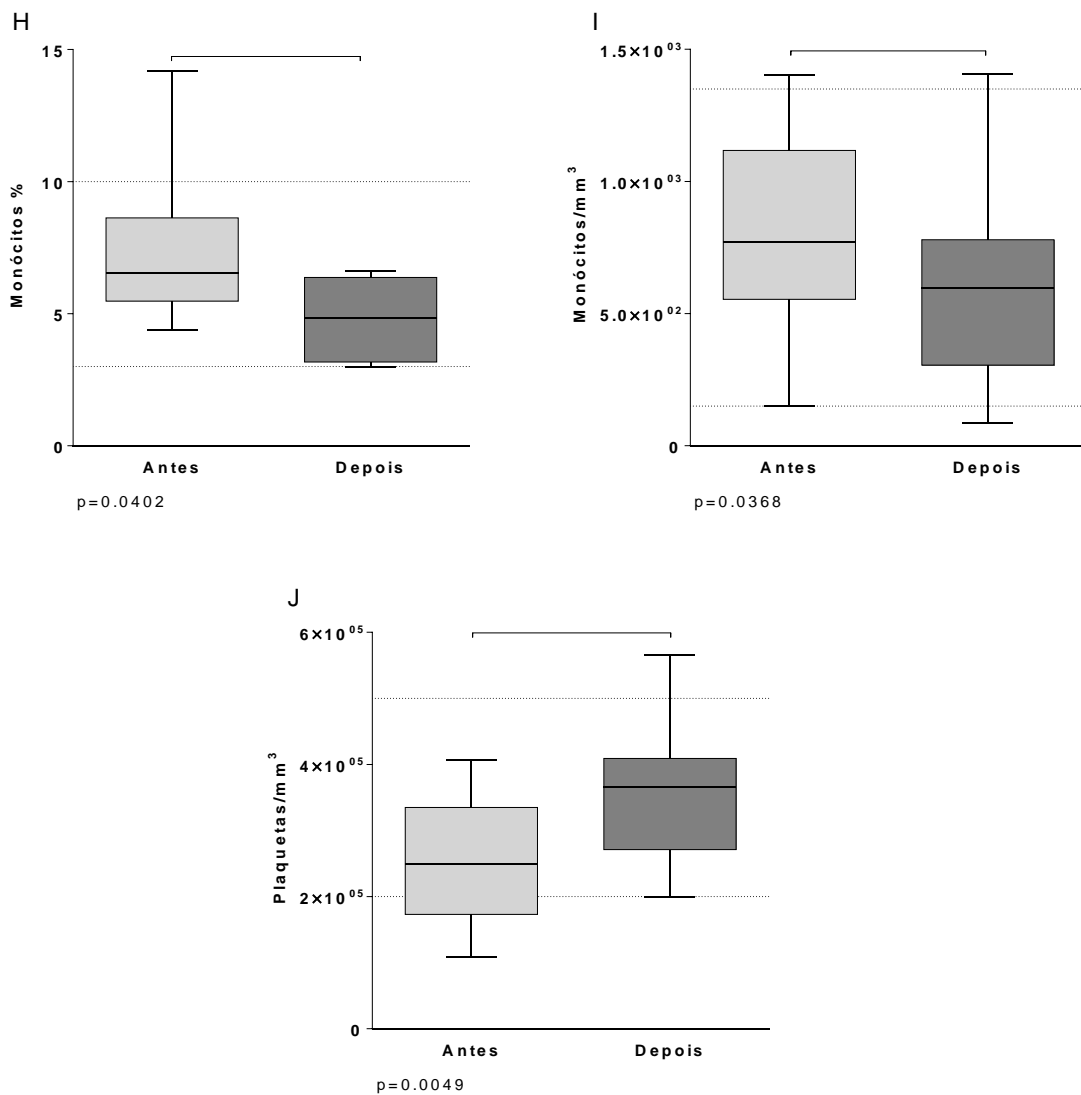


Figura 10: Contagem global, diferencial e da frequência do sangue periférico de (A) leucócitos, (B e C) neutrófilos, (D e E) eosinófilos, (F e G) linfócitos, (H e I) monócitos e (J) plaquetas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p<0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

No estudo retrospectivo também foi observada diminuição significativa na frequência e número absoluto de monócitos. Dessa forma, seguindo o mesmo perfil do estudo retrospectivo verificamos se o decréscimo de monócitos, após a administração do protocolo terapêutico, seria referente aos mesmos cães no tempo anterior ao tratamento. A análise dos dados confirmou, significativamente, que o decaimento da frequência e número absoluto de monócitos provinha dos mesmos cães que obtiveram sua frequência e número absoluto de

monócitos maior anteriormente à administração do protocolo terapêutico, como demonstrado na Figura 11.

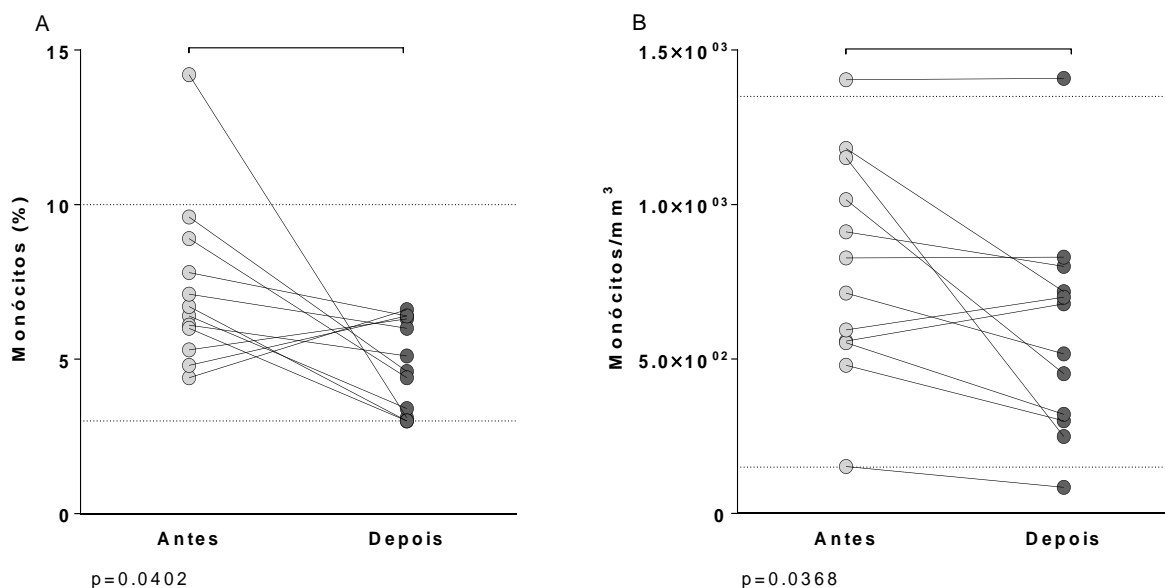


Figura 11: Análise da frequência (A) e número absoluto (B) de monócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

4.4.2.2 Análise do perfil bioquímico

4.4.2.2.1 Proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina e globulinas séricas

A avaliação do perfil bioquímico dos cães, após a administração do protocolo terapêutico, não demonstrou alterações significativas na quantificação de proteínas totais (Figura 12A), albumina (Figura 12B), globulinas (Figura 12C) e da relação albuminaglobulinas (Figura 12D).

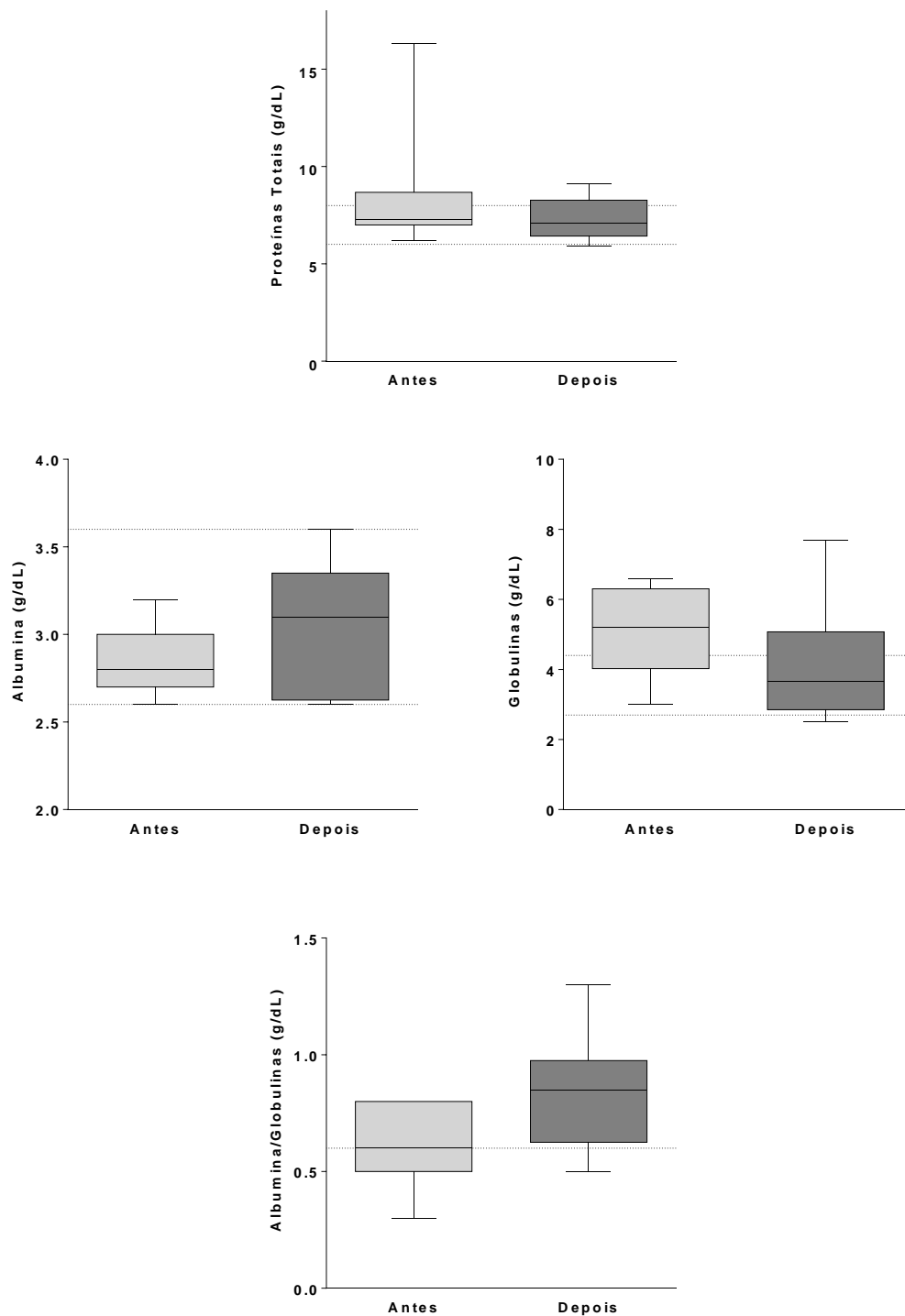


Figura 12: Níveis séricos de (A) proteínas totais, (B) albumina, (C) globulinas e (D) relação albumina globulinas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário

4.4.2.2.2 Ureia e creatinina séricas

A avaliação dos parâmetros bioquímicos não demonstrou alterações significativas para níveis de ureia (Figura 14A) e creatinina (Figura 14B) séricas após a administração do protocolo terapêutico.

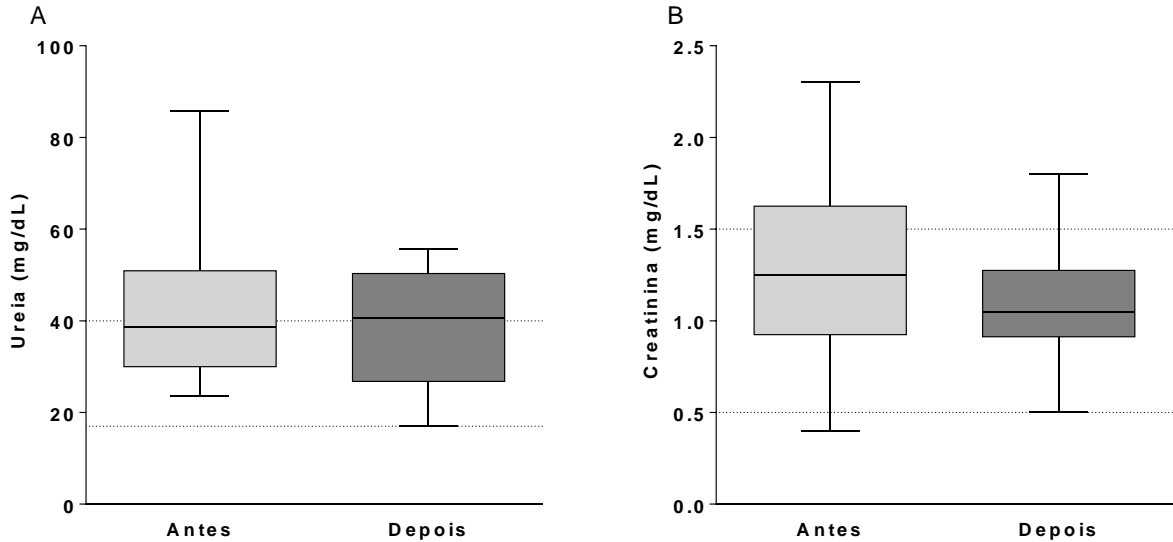


Figura 13: Níveis séricos de ureia (A) e creatinina (B) de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário

Como foi realizado no estudo retrospectivo, verificamos se haveria correlação entre a alteração do número absoluto de monócitos e de parâmetros de melhora clínica já estabelecidos na prática veterinária. Desse modo, a diminuição do número absoluto de monócitos foi correlacionada a fatores hematológicos, como a global de leucócitos totais e a fatores bioquímicos como proteínas totais, albumina, globulinas, fração albumina globulinas, ureia e creatinina séricas. Dentre os aspectos relacionados somente foi observada correlação positiva entre o número de leucócitos totais e monócitos ($p < 0.05$; $r = 0.6504$) (Figura 14A).

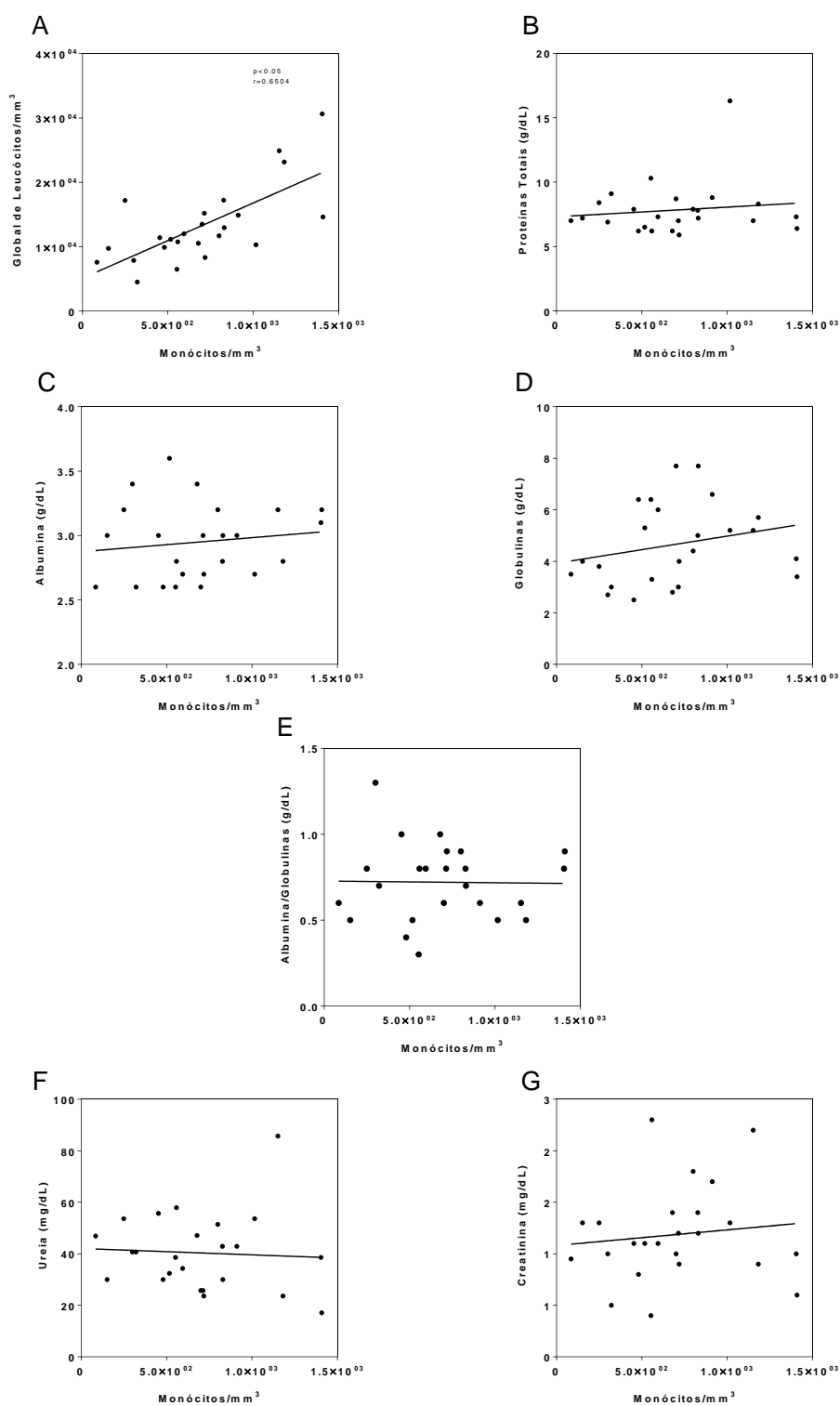


Figura 14: Correlação entre o número absoluto de monócitos e (A) global de leucócitos, (B) proteínas totais, (C) albumina, (D) globulinas, (E) fração albuminas globulinas, (F) ureia e (G) creatinina séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. Diferenças significativas ($p < 0.05$).

Do mesmo modo, como no estudo retrospectivo, foi observado cães que obtiveram queda nos números absolutos de monócitos, após a administração do protocolo terapêutico, também obtiveram queda nos níveis de globulinas séricas (Tabela 4).

Tabela 4: Associação entre o número absoluto de monócitos e resultados de globulinas séricas de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fischer's $p < 0.05$).

MONÓCITOS	GLOBULINAS		TOTAL
	AUMENTOU	DIMINUIU	
AUMENTOU	3	0	3
DIMINUIU	0	9	9
TOTAL	3	9	12

Em relação à alteração no número absoluto de monócitos e o status clínico dos animais, após administração do protocolo terapêutico, nossos resultados demonstraram, assim como no estudo retrospectivo, que os cães que obtiveram melhora clínica também demonstraram queda nos números absolutos de monócitos após a administração do protocolo terapêutico, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Associação entre o número absoluto de monócitos com o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fischer's $p < 0.05$).

MONÓCITOS	AVALIAÇÃO CLÍNICA		TOTAL
	MELHOROU	PIOROU	
AUMENTOU	0	3	3
DIMINUIU	9	0	9
TOTAL	9	3	12

4.4.3 Citometria de Fluxo

A análise da frequência de células CD14⁺ em cães infectados com *L. infantum*, antes e após a conduta terapêutica, não demonstrou diferença significativa (Figura 15A).

A verificação individual de cada cão demonstrou apenas um caso de aumento da frequência de monócitos (Figura 15B). Entretanto não houve alteração na frequência de cada população, permanecendo cerca de 80% CD14^{hi} e 20% CD14^{lo}.

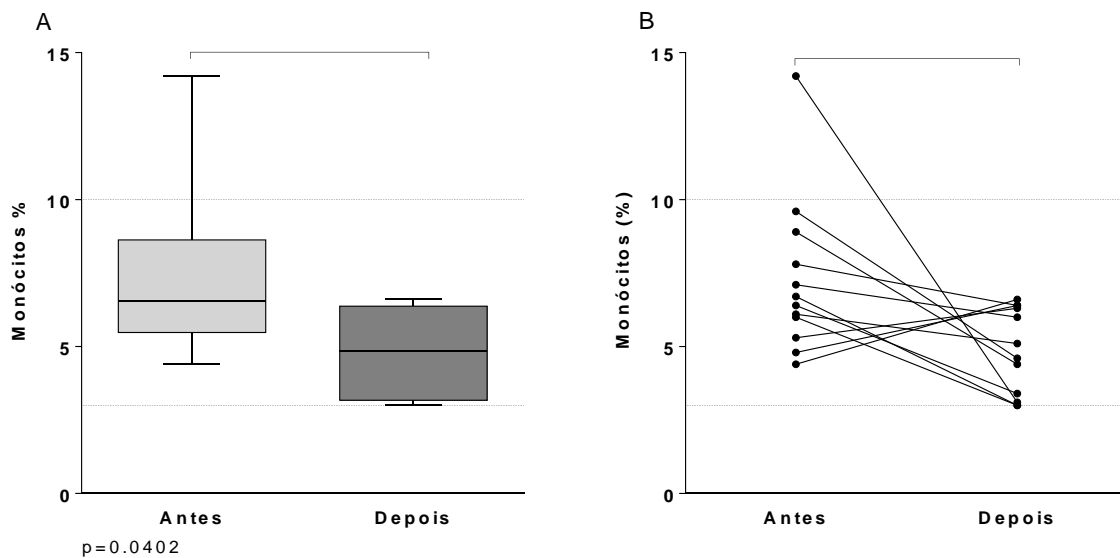


Figura 15: Frequência de monócitos, expressão de CD14 sobre o total de leucócitos de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras. A área pontilhada representa o intervalo de referência, para cães, utilizada pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário.

4.4.4 Detecção de Moléculas Solúveis

Com o intuito de caracterizar novos marcadores biológicos de evolução clínica da LVC, avaliamos a presença de moléculas solúveis no soro dos cães, antes e após a conduta terapêutica, pela técnica de ELISA.

Os resultados obtidos não demonstraram presença das moléculas sCD16, sCD11b, sCD18, sCD11a, sCD11c, sCD80, sCD45RO e sCD44 detectáveis no soro dos cães antes e após a conduta terapêutica. Porém, foi detectado e observado significativamente, menor absorvância na mensuração de sCD14 (Figura 16) e sMHCII (Figura 17) no soro dos cães após o protocolo terapêutico quando comparado aos níveis obtidos anteriormente ao início da conduta.

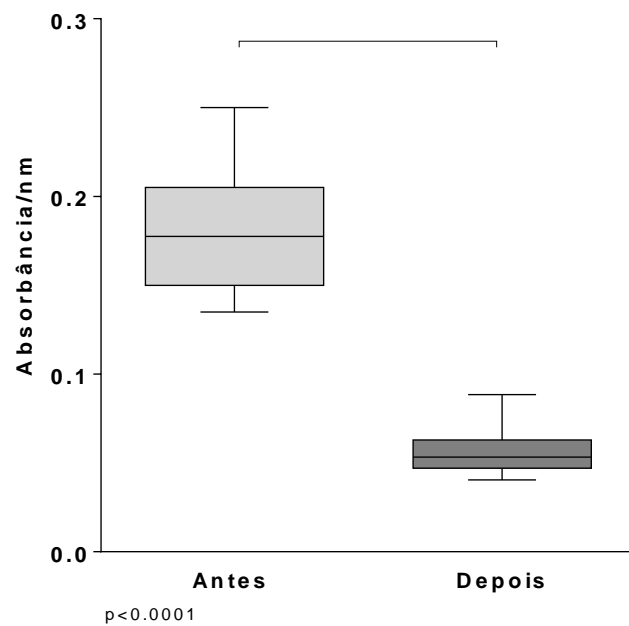


Figura 16: Absorbância referente aos níveis de CD14 solúvel (sCD14) presente no soro de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras.

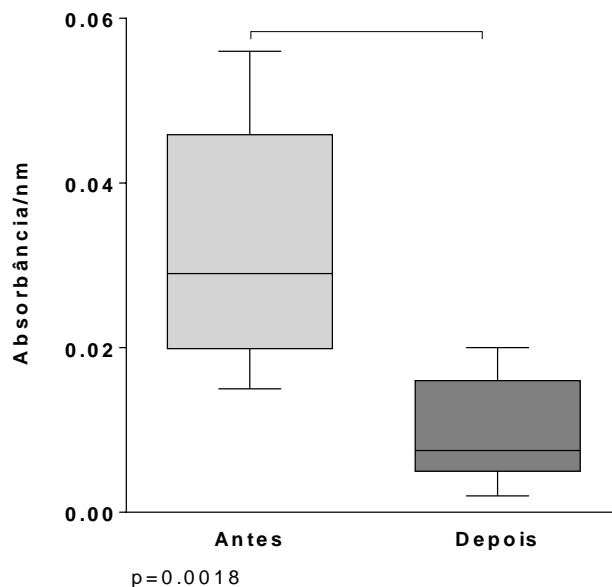


Figura 17: Absorbância referente aos níveis de MHC de classe II solúvel (sMHCII) presente no soro de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras.

Devido aos resultados obtidos, correlacionamos os níveis de sCD14 e sMHCII com o número absoluto de monócitos, globulinas fração albumina/globulinas, ureia e creatinina, parâmetros já utilizados na prática veterinária para avaliação prognóstica. Nossos resultados

demonstraram correlação, significativa, positiva entre o número absoluto de monócitos e moléculas CD14 solúveis ($r=0.5111$) demonstrado na Figura 18A.

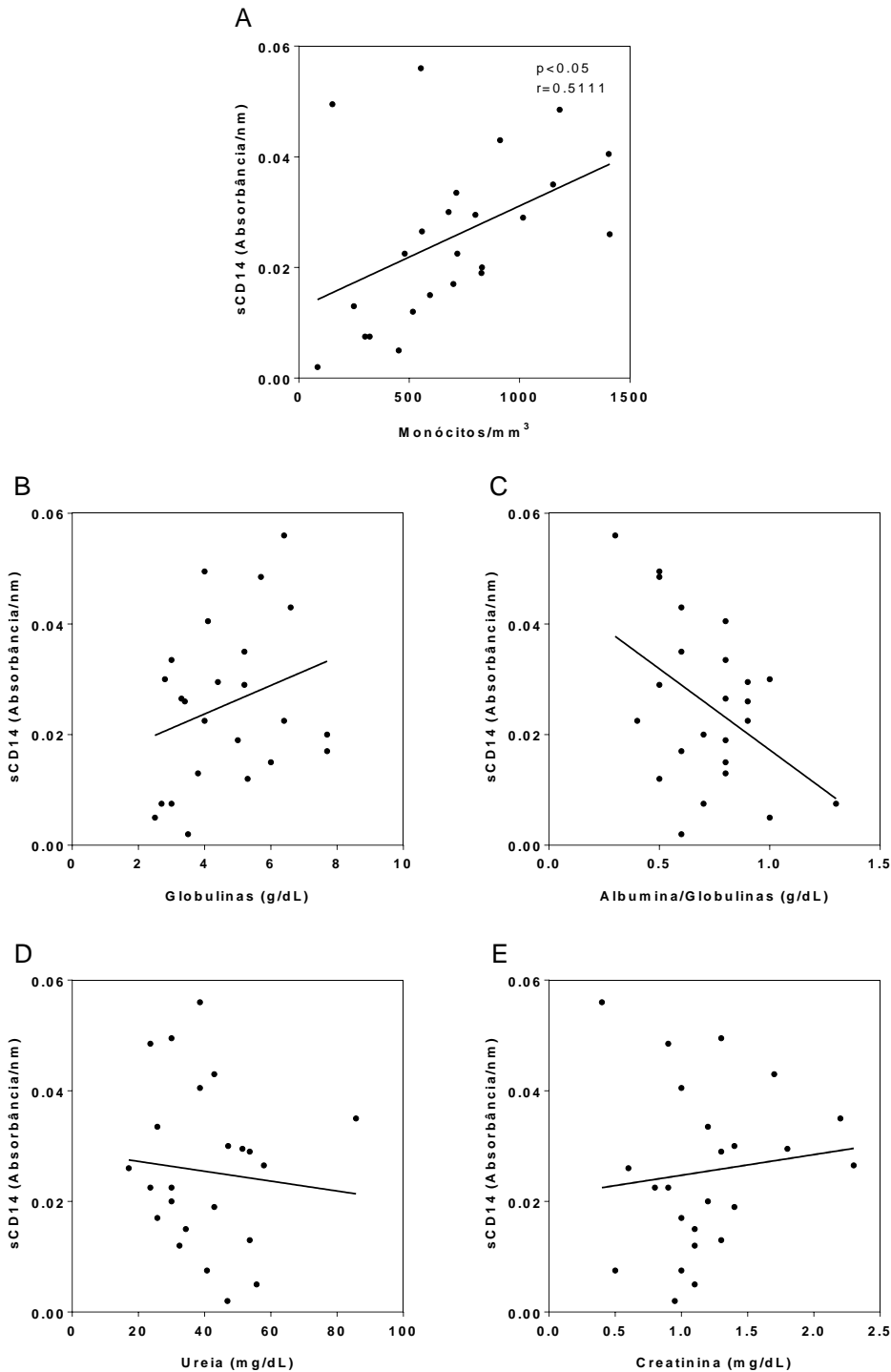


Figura 18: Correlação entre os níveis de absorbância da molécula CD14 solúvel (sCD14) com (A) número absoluto de monócitos, (B) níveis séricos de globulinas, (C) fração A/G, (D) níveis séricos de ureia e (E) creatinina de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. Diferenças significativas $p < 0.05$

Em relação às moléculas MHCII solúveis, foi observado correlação positiva entre os níveis de globulinas séricas ($r=0.0454$) e correlação negativa ($r=-0.4751$) entre os níveis da relação albumina/globulina como demonstrado na Figura 19B e Figura 19C, respectivamente.

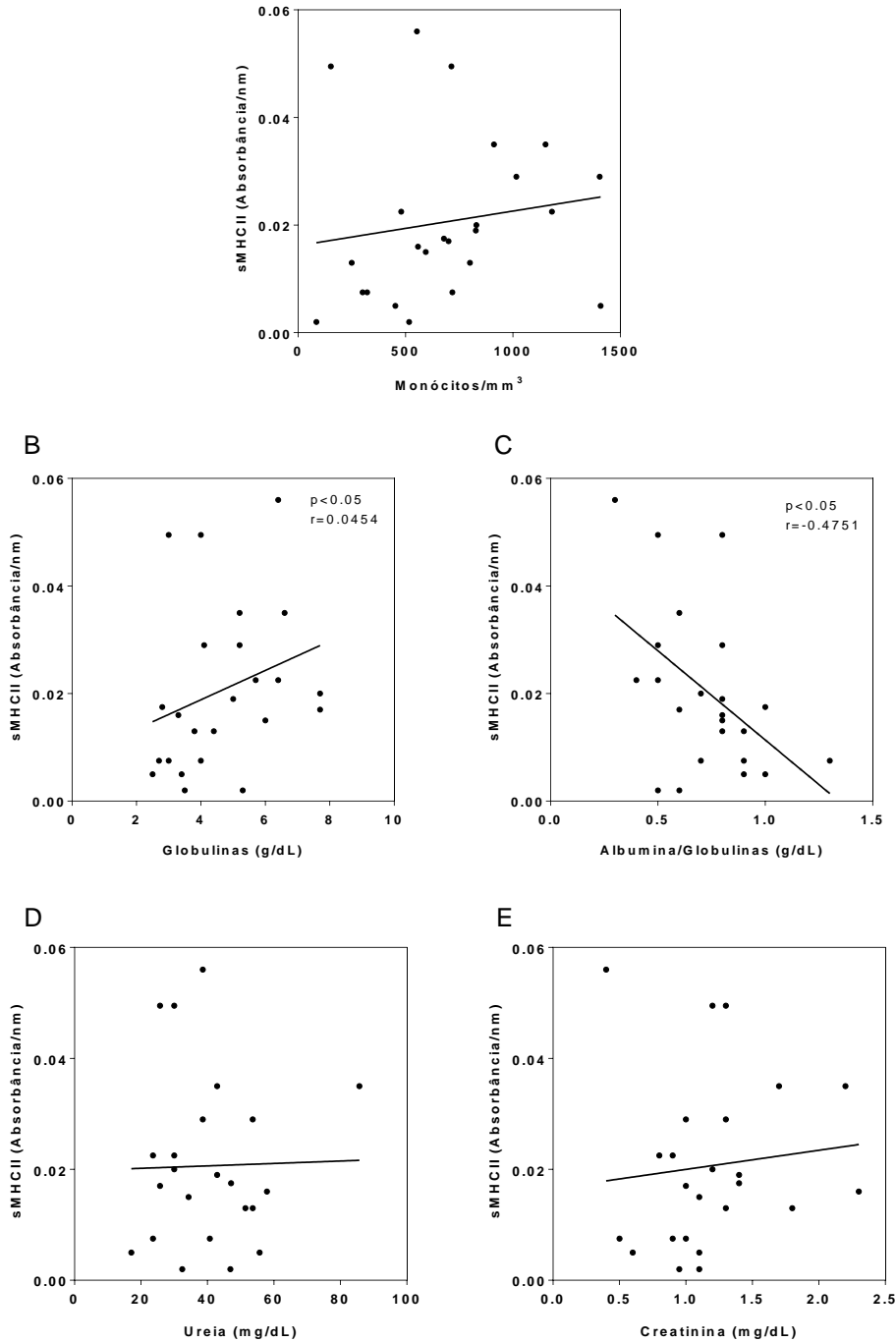


Figura 19: Correlação entre os níveis de absorvância da molécula MHCII solúvel (sMHCII) com (A) número absoluto de monócitos, (B) níveis séricos de globulinas, (C) fração A/G, (D) níveis séricos de ureia e (E) níveis séricos de creatinina de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico. Diferenças significativas $p<0.05$.

Em relação ao status clínico do animal, após a administração do protocolo terapêutico, nossos resultados demonstraram que os cães que obtiveram melhora clínica também demonstraram queda na absorbância de sCD14 (Tabela 6) e sMHCII (Tabela 7).

Tabela 6: Associação entre os níveis de CD14 solúveis e o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fisher's $p < 0.05$).

sCD14	AVALIAÇÃO CLÍNICA		TOTAL
	MELHOROU	PIOROU	
AUMENTOU	0	3	3
DIMINUIU	9	0	9
TOTAL	9	3	12

Tabela 7: Associação entre os níveis de MHCII solúveis e o status clínico de cães infectados sintomáticos antes e depois a última administração do protocolo terapêutico (Fisher's $p < 0.05$).

sMHCII	AVALIAÇÃO CLÍNICA		TOTAL
	MELHOROU	PIOROU	
AUMENTOU	0	3	3
DIMINUIU	9	0	9
TOTAL	9	3	12

5 CAPÍTULO 3:
MOLÉCULAS SOLÚVEIS

5.1 Objetivo geral

Verificar a diferença dos níveis de absorbância de moléculas solúveis, entre as formas clínicas da LVC, com finalidade de confirmar tais moléculas como possíveis marcadores biológicos para a doença.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Avaliar a presença de sCD14 e sMHCII no soro de cães negativos, assintomáticos e sintomáticos.

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Amostras

Amostras de soro de cães negativos para LVC (n=5) foram gentilmente cedidos pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário e pelo Laboratório de Patologia da Leishmanioses da Universidade Federal de Minas Gerais. As mostras de soro de cães positivos, assintomáticos (n=5) e sintomáticos (n=5), para LVC foram cedidos gentilmente pelo professor Sydney Magno da Silva da Universidade Federal de Uberlândia.

5.3.2 Detecção de moléculas solúveis por ELISA

sCD14 e sMHC-II foram detectadas através da técnica de ELISA sanduíche usando anticorpos específicos. Os soros dos animais infectados obtidos foram aliquotados e armazenado em freezer -80°C até o momento dos experimentos.

O protocolo para a análise dos níveis séricos de moléculas solúveis foi realizado, antes e após a administração do o protocolo terapêutico. Cada soro a ser testado foi diluído (1:1600) em tampão carbonato e adicionado poço permanecendo na placa durante um período de 24 horas. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado por solução de PBS-BSA 1% por 60 minutos a 37°C. Em seguida, o material foi incubado por 120 minutos a 37°C com anticorpo primário específico para cada molécula. O excesso foi retirado com a solução de lavagem. Logo após, o material foi incubado por 60 minutos a 37°C com anticorpo secundário específico e o excesso de conjugado foi eliminado por nova série de lavagens. Em seguida, 50µl de solução de OPD (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionada aos orifícios. A reação ocorreu à 37°C, no escuro, durante 20 minutos, e foi interrompida por adição de 50µl de H₂SO₄ 4N (Merck, Alemanha) em cada orifício. Em qualquer etapa, após as lavagens, as placas foram secadas por inversão sobre papel absorvente. A leitura foi efetuada em leitor de ELISA (Bio-Rad 2550®, EUA), a 492nm.

5.3.3 Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelos testes que mais se aplicaram a cada caso com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Para confirmar os padrões de normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Nesse estudo os resultados que assumiram distribuição não paramétrica foram analisados por ANOVA com teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns, para comparação entre os grupos, os dados foram expressos por mediana e as diferenças foram consideradas significativas quando valores de $p < 0.05$.

5.4 Resultados

De acordo com os resultados obtidos na análise da mensuração, através da absorbância, de moléculas solúveis obtidas no estudo prospectivo, traçamos como objetivo de o trabalho verificar se haveria diferença de absorbância das moléculas solúveis sCD14 e sMHCII em animais negativos, assintomáticos e sintomáticos.

5.4.1 CD14 solúvel (sCD14)

Foi observada maior absorbância nos níveis de sCD14 em cães infectados em relação aos cães controle, apresentando maior evidência nos cães sintomáticos, que apresentam maior absorbância dos níveis de sCD14 em relação aos cães assintomáticos (Figura 21).

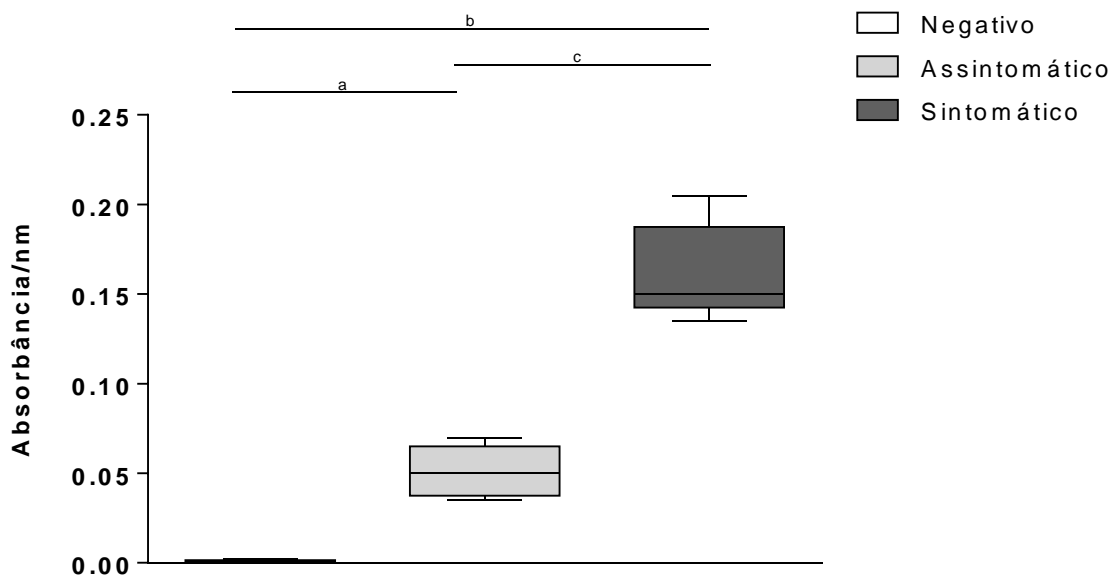


Figura 20: Absorbância dos níveis de moléculas CD14 solúveis (sCD14) presentes no soro de cães negativos, assintomáticos e sintomáticos soropositivos para leishmaniose visceral canina. Diferenças significativas $p < 0.05$.

a - Diferença significativa entre o grupo negativo e grupo assintomático.

b - Diferença significativa entre o grupo negativo e grupo sintomático.

c - Diferença significativa entre o grupo assintomático e o grupo sintomático.

5.4.2 MHCII solúvel (sMHCII)

Foi observada maior absorbância nos níveis de sMHCII em cães infectados em relação aos cães controle (Figura 22).

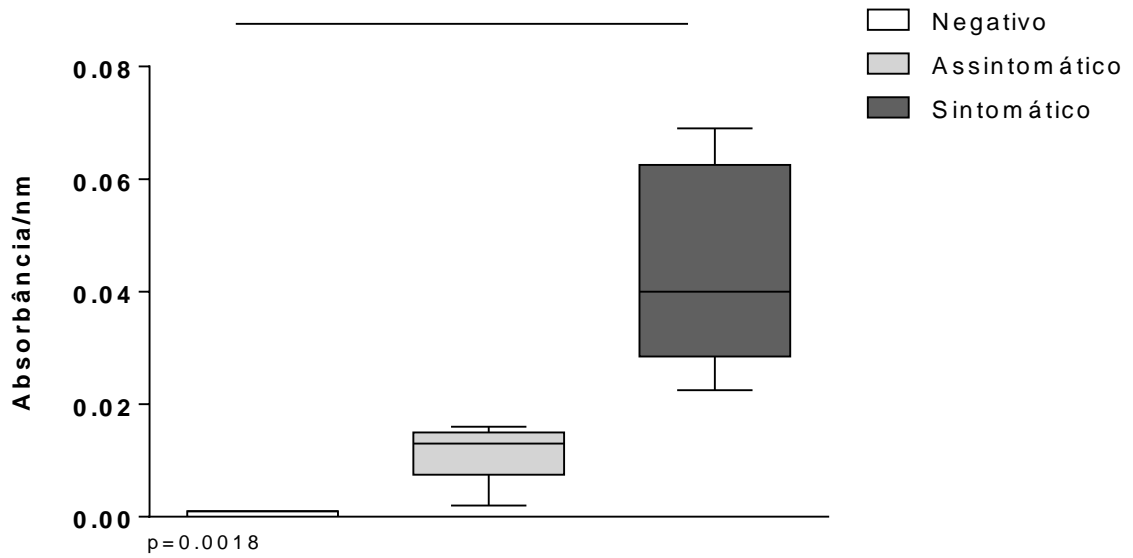


Figura 21: Absorbância dos níveis de moléculas MHCII solúveis (sMHCII) presentes no soro de cães negativos, assintomáticos e sintomáticos soropositivos para leishmaniose visceral canina. As diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas pelas linhas conectoras.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os sinais clínicos mais relatados, nos prontuários analisados, encontram-se entre os achados mais frequentes em cães acometidos por LV: alopecia, presença de úlceras, linfadenopatia, lesões dermatológicas, onicogribose, perda de peso, anemia, hiperglobulinemia e hepatoesplenomegalia (Alvar et al., 2004; Amusatogui et al., 2003; Costa Val et al., 2007; Ferrer, 2002).

Estudos das alterações hematológicas em cães infectados por *L. infantum* são importantes na avaliação do estado clínico do animal e de seu prognóstico. Relatos na literatura abordam alterações dos parâmetros hematológicos, associados ao quadro clínico da LVC (Ikeda-Garcia et al., 2007; Reis et al., 2006b). Nosso trabalho demonstrou no estudo retrospectivo aumento significativo do hematócrito, de hemoglobina e de eritrócitos após a conduta terapêutica. Porém, no estudo prospectivo não houve alteração significativa, para esses valores, entre os tempos observados. Isso talvez se deva em função dos diferentes tempos dos estudos, visto que o estudo retrospectivo foi realizado através da análise dos parâmetros após seis meses do início da conduta terapêutica, enquanto o estudo prospectivo foi realizado após apenas 42 dias do início da conduta.

Pesquisadores consideram a anemia como um achado pouco frequente na LVC (Alvar et al., 2004; Amusatogui et al., 2003; Moreno et al., 1999), o que se repetiu no nosso estudo, visto que tanto no estudo retrospectivo quanto na análise prospectiva os animais se mantiveram dentro dos valores de referência. Porém, ao compararmos os tempos antes e depois da conduta terapêutica observa-se aumento significativo dos valores de hemoglobina e do eritrograma, o que pode significar um reflexo de melhora clínica dos animais. Apesar de ser considerado um achado pouco frequente, a anemia tem importância clínica na leishmaniose canina visto que alguns animais podem apresentar quadros anêmicos graves. A causa da anemia na LVC é pouco conhecida e acredita-se que esteseja associada à perda sanguínea por epistaxe e ulcerações na pele, eritrólise, inflamação generalizada ou insuficiência renal crônica (Slappendel & Greene, 1990; Koutinas et al., 1999). Além disso, é observada uma diminuição intensa da eritropoiese devido à hipoplasia ou aplasia medular (De Luna et al., 1999; Koutinas et al., 1999; Tropa de Abreu et al., 2011).

De Luna et al. (1999), estudando cães naturalmente infectados por *L. infantum* observaram uma redução da fluidez da membrana dos eritrócitos, o que aumentaria sua rigidez e alteraria o mecanismo de citoaderência, que favoreceria o sequestro esplênico das células, sua retirada da circulação, determinando, conseqüentemente, a anemia. Esta também é responsável por

alguns dos sinais clínicos da LVC, como apatia, fraqueza e emaciação, embora o quadro clínico seja também a soma de distúrbios causados pela presença do parasito e da resposta inflamatória produzida (Feitosa et al., 2000; Costa Val et al., 2007).

O tratamento visa principalmente eliminar o parasito e desta forma, sua influência na medula óssea e no sistema imunológico diminui, fazendo com o órgão volte ao seu funcionamento normal na produção celular. Nesse trabalho, mesmo os resultados do estudo prospectivo não apresentando diferenças significativas, acreditamos que estes parâmetros associados a outros, discutidos a seguir, podem formar um “pacote” de informações a serem consideradas durante a avaliação clínica do animal tratado. Ressaltando que estes são considerados parâmetros mais tardios qual a recuperação costuma surgir algumas semanas ou meses após o término do tratamento, concordando com os resultados observados no estudo retrospectivo.

De um modo geral, a LVC, assim como a LVH, caracteriza-se por uma inabilidade significativa da imunidade celular em nível sistêmico e compartimentalizado. Cabe ressaltar que diversos autores consideram esta imunossupressão, o ponto chave para o desencadeamento das formas graves e fatais na LV. A imunossupressão na LVC é observada tanto no contexto *ex vivo*, com uma pancitopenia, como no contexto *in vitro* quais células mononucleares caninas não respondem ao estímulo antígeno-específico do parasito, apresentando baixíssima atividade linfoproliferativa (Pinelli et al., 1994; Reis et al., 2009). Alguns autores acreditam que esta inabilidade de ativação celular, também ocorre *in vivo*, como mostram Cardoso et al. (2007) e Cabral et al., (1992) em suas avaliações pelo teste de intradermorreação, no qual cães assintomáticos apresentam maior capacidade responsiva do que cães sintomáticos.

Discrepâncias podem ser encontradas na literatura sobre leucograma de cães com LVC. Apesar de alguns autores considerarem que as mudanças na concentração de leucócitos (WBC) são infrequentes (Amusatogui et al., 2003; Costa Val et al., 2007; Ribeiro et al., 2013) trabalhos relatam alterações no leucograma que incluem neutrofilia (Ciaramella et al., 1997) e leucocitose neutrofílica e monocítica com linfopenia e eosinopenia (Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999). Nesse trabalho, a avaliação do leucograma de cães do estudo retrospectivo não evidenciou leucocitose ou leucopenia, porém, alguns animais apresentaram eosinopenia e trombocitopenia anteriormente ao tratamento. Foi observado aumento significativo de plaquetas e eosinófilos e diminuição significativa de leucócitos totais, no número absoluto de neutrófilos, na frequência e número absoluto de linfócitos e monócitos

após a conduta terapêutica. Esses resultados se basearam somente na comparação dos dados antes e depois do tratamento, a avaliação dos dados baseados em valores de referência não mostraram alterações em praticamente nenhum analito, o que é cabível ser analisado na prática clínica veterinária pois os parâmetros de referência são em geral, muito amplos, o que dificulta a representação da real situação clínica do animal. O acompanhamento individualizado de cães tratados talvez seja a melhor forma de análise evolução clínica independentemente dos valores de referência hematológicos.

No estudo prospectivo foi observado que, anteriormente ao tratamento, alguns cães apresentavam leucocitose, neutrofilia, eosinopenia e trombocitopenia. Da mesma forma, a mediana de todos os parâmetros analisados ainda se encontrava dentro dos valores normais de referência. Quando realizamos a comparação antes e depois da administração do protocolo terapêutico foi observada diminuição significativa de leucócitos totais, no número absoluto de neutrófilos e na frequência e número absoluto de monócitos. Mais uma vez, o tempo de abordagem aqui deve ser ressaltado, no qual o estudo retrospectivo avaliou os cães seis meses após o início da primeira dose de imunoterapia, enquanto a avaliação prospectiva avaliou os animais muito mais cedo. Esse achado pode demonstrar monócitos e plaquetas como parâmetros mais precoces de evolução clínica em resposta ao tratamento.

Monócitos são células de grande relevância na LVC. Gonçalves e colaboradores (2011) descreveram a migração de monócitos inflamatórios, atraídos por plaquetas ativadas, para os sítios de infecção na pele aonde auxiliam no controle do parasito. Uma vez no tecido, já diferenciados em macrófagos e células dendríticas (DC), tornam-se alvos preferenciais do protozoário *Leishmania* além de desempenharem papel importante na produção de ROS e NO, responsáveis pelo controle da infecção (Diaz-Gandarilla et al., 2013; Kavosi et al., 2009; Tafuri et al., 1996). A presença e participação dos monócitos no controle da infecção tardia, após ativação de linfócitos TCD4+ de memória, também foi demonstrada (Glennie et al., 2017). Além disso, já no local da infecção, monócitos estão envolvidos no mecanismo de reparo tecidual através da diferenciação dos mesmos em macrófagos e células dendríticas com a elevada produção de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias durante o processo inflamatório e resolutivo respectivamente (Auffray et al., 2009; Gordon et al., 2005).

Dados dos nossos estudos, retrospectivo e prospectivo, demonstraram que os animais apresentavam, em mediana, frequência e números absolutos maiores de monócitos no sangue antes do tratamento. Após o tratamento estes números foram significativamente menores.

Esse resultado corrobora com trabalho do nosso grupo de pesquisa no qual Martins (2016), em sua tese demonstrou, com avaliação através da técnica de citometria de fluxo e contagem diferencial no sangue, que durante a infecção com *L. major*, camundongos infectados apresentaram aumento na frequência e número absoluto de monócitos no sangue. Além disso, neste trabalho, foi demonstrado que durante o tratamento com Anfotericina B, os camundongos controlaram a lesão na pata e isso repercutiu também na diminuição da frequência e número absoluto de monócitos no sangue periférico. Esta diminuição foi detectada imediatamente após o tratamento, que, quando interrompido, apresentou alterações com retomada no aumento do número de monócitos com apenas uma semana pós-interrupção. Barbosa (2013), em sua dissertação, também observou aumento na frequência de monócitos de cães naturalmente infectados quando comparados a cães controle ou assintomáticos, em estudo com citometria de fluxo. Esses dados somados aos observados no presente trabalho reforçam a importância dessa célula na participação da inflamação e controle da doença.

Monócitos são células da resposta imune inata, que respondem rapidamente a sinais de perigo e rapidamente acessam os locais de infecção ou agressão, vindos do sangue (Goncalves et al., 2011; Landmann et al., 1995; Robben et al., 2005). Para isso, em geral, aumentam em número no sangue periférico, capacidade que pode estar relacionada a um comportamento peculiar destas células. Em 2009, Swirski e colaboradores demonstraram que o baço é um reservatório de monócitos, que ficam alojados nos cordões esplênicos e subcapsulares, prontos para cair na circulação, caso requisitados (Swirski et al., 2009). Esta reserva é muito maior do que o número encontrado de monócitos circulantes. Dese modo, acreditamos que durante a doença o intenso parasitismo e inflamação crônica contribuam para o constante recrutamento de monócitos para os tecidos afetados, que precisam migrar pelo sangue, provavelmente originados do baço e da medula óssea.

Os monócitos são as principais células progenitoras de macrófagos teciduais, o que justificaria o aumento observado no sangue dos animais infectados. Apesar de não ser possível considerar que os animais antes do tratamento apresentavam monocitose, visto que os números de referência para cães variam muito, pudemos constatar significativamente que grande parte dos animais apresentou menor número de monócitos após o tratamento e que esses animais melhoraram seu status clínico. Ou seja, as informações de hemogramas antes e durante a conduta terapêutica podem ser utilizadas para se determinar se há alterações na população de monócitos, e desta forma, utilizar estes dados como uma referência para o sucesso ou não do tratamento. O mais importante é que esse parâmetro não se trataria de um exame adicional ao

acompanhamento do tratamento, mas sim, observação a ser realizada em um exame já rotineiro, beneficiando a economia com outros exames poucos conclusivos ou que só demonstram resultado positivo tardiamente.

Outra alteração que chamou atenção nas nossas análises foram as plaquetas. Anteriormente ao tratamento foi observado, em ambos os estudos, cães com número de plaquetas abaixo da faixa de normalidade. Após o tratamento, foi significativo o aumento do número de plaquetas, em ambos os estudos. Esses achados corroboram com a literatura que evidencia trombocitopenia em cães com LVC (Alvar et al., 2004; Amusategui et al., 2003; Ciaramella et al., 2005; Costa Val et al., 2007; Foglia Manzillo et al., 2013; Freitas et al., 2012; Rizzo et al., 2005). A ocorrência de trombocitopenia em cães reagentes para LV pode decorrer da alteração da parede vascular por vasculite devido aos imunocomplexos circulantes (Feldman et al., 2000), além de distúrbios de trombocitopoese aumento na destruição plaquetária e após o comprometimento do funcionamento renal e/ou hepático (Slappendel & Ferrer, 1998). Outro mecanismo na diminuição do número de plaquetas na LV pode estar associado à presença de imunoglobulinas anti-plaquetas (Terrazano et al., 2006), descrita em 63,3% dos cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Ciaramella et al., 2005). Além disso, trabalhos descreveram que plaquetas podem ser rapidamente mobilizadas para locais de infecção onde modulam processos imunitários e inflamatórios secretando citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (Semple et al., 2010; Smyth et al., 2009; Yeaman, 2010). O papel das plaquetas tem sido descrito as infecções bacterianas (Yeaman, 2010) e parasitárias (Van Der Heyde et al., 2005). Goncalves et al., (2011) descreveram a importante participação das plaquetas na ativação de monócitos inflamatórios em camundongos experimentalmente infectados por *Leishmania major*, demonstrando que plaquetas podem ser mobilizadas, ativadas e consumidas no curso desta doença.

A dosagem de globulinas e relação A/G são parâmetros de prognóstico já utilizados na prática veterinária. A produção de anticorpos em cães com LVC é aferida pelos níveis de globulinas séricas e é apontada como causadora da hiperproteinemia (Ikeda-Garcia et al., 2007; Koutinas et al., 1999; Reis et al., 2006a). A inversão do quociente albuminas/globulinas está correlacionada com progressão clínica do animal com LVC (Keenan et al., 1984; Reis et al., 2006a). O aumento significativo dessa relação indica melhora na capacidade responsiva do animal aos parasitos. A literatura indica que esta relação tende a ser baixa em cães sintomáticos, devido a hipergamaglobulinemia, que em alguns casos pode estar associada à proteinúria decorrentes da LVC (Amusategui et al., Costa Val, 2004, Reis et al., 2006a,

Ribeiro et al., 2007). No estudo retrospectivo, não foi evidenciada alteração na dosagem de proteínas séricas. Porém, foi observado aumento significativo na dosagem de albumina sérica e da relação A/G e diminuição significativa na dosagem de globulinas dos cães após a conduta terapêutica. No estudo prospectivo, não foram observadas diferenças significativas desses mesmos parâmetros antes e após a conduta. Parâmetros bioquímicos costumam alterar tardiamente, algumas semanas ou meses após o término do protocolo, o que explica a não alteração dos mesmos no estudo prospectivo, concordando com os resultados observados no estudo retrospectivo que teve maior tempo entre os exames realizados. Mesmo não havendo correlação entre a frequência e número absoluto de monócitos com a dosagem bioquímica no soro dos animais, durante o protocolo terapêutico, acreditamos que esses parâmetros devem ser avaliados de forma conjunta já que em nosso trabalho, tanto no estudo retrospectivo quanto no prospectivo, foi observado paralelismo de cães com decaimento de monócitos e globulinas.

Dentre os parâmetros utilizados como marcadores de prognóstico para LVC, está a avaliação da função renal. No estudo retrospectivo, foi observada diminuição significativa nas dosagens séricas de uréia e creatinina após o protocolo. Não foram observadas diferenças significativas no estudo retrospectivo. Como na dosagem bioquímica, os parâmetros para avaliação renal alteram-se após semanas ou meses após o término do protocolo, o que explica a falta de variação dos mesmos no estudo prospectivo e a mudança no perfil dos resultados observados no estudo retrospectivo que teve maior tempo entre as análises. Provavelmente, os rins dos animais do estudo prospectivo, ainda que competentes para filtrar e eliminar toda a creatinina estão sofrendo injúrias gradativas pela ação dos imunocomplexos e pela proteinúria, consequentes da LVC. A associação concomitante da doença renal com a evolução da LVC já foi relatada por vários autores (Bonfanti & Zatelli, 2004, Costa Val, 2004). Nossos resultados demonstraram, no estudo retrospectivo, correlação entre alteração do número absoluto de monócito e a dosagem sérica de ureia, sugerindo que essas células, juntamente a parâmetros avaliados para função renal podem ser de grande utilidade na prática veterinária para o prognóstico da doença. São necessários mais estudos complementares para esclarecer e entender os mecanismos envolvendo sCD14 e sMHCII e sua influência na imunopatogênese da LVC.

Moléculas solúveis têm sido estudadas, correlacionadas e caracterizadas como biomarcadores sorológicos de diagnóstico e prognóstico em doenças diversas.

Nosso interesse por essas moléculas partiu do trabalho de Dos Santos et al. (2016), que avaliaram a alteração dos níveis de CD14 solúveis em pacientes portadores de LV. No estudo, os autores desassociaram altos níveis de sCD14 com níveis elevados de LPS no soro dos pacientes infectados correlacionado a molécula com manifestações clínicas e laboratoriais de LV e a estimulação da produção das citocinas IL-27, IL-10 e IL-6. Também foi observada diminuição dos níveis dessa molécula após o tratamento. Em nosso estudo foi observado que os animais que melhoraram clinicamente obtiveram níveis de CD14 solúveis diminuídos após o tratamento, corroborando com os dados obtidos no estudo com LV humana. Além disso, os níveis de MHC-II solúveis também mostraram alteração após o tratamento dos cães infectados. Na comparação entre as formas clínicas da leishmaniose visceral canina, foi possível verificar-se também uma diferença significativa entre animais sintomáticos, assintomáticos e não infectados, tanto de sCD14 quanto de MHCII.

São necessários estudos complementares para esclarecer e entender os mecanismos envolvendo sCD14 e sMHCII e suas influências na imunopatogênese daLVC. Porém, podem os considerar estas moléculas como marcadores de evolução clínica durante o tratamento de animais com leishmaniose visceral, visto que a importância da molécula de sCD14 já foi descrita na LV humana (Dos Santos et al., 2016) e trabalhos sugerem que a molécula de sMHCII poderia competir com o MHCII de membrana (mMHCII) para a ligação em TCR (receptor de células T) e assim modular as respostas imunes celulares e humorais (Marios-Frankiskos et al., 2010), além de estar envolvida na indução de apoptose de células TCD4+ (Nag et al., 1996), na ativação de células TCD8+ (Ge et al., 2002) e redução da atividade de células NK (natural killer) (Webb et al., 1994). Trabalho em modelo experimental demonstrou que moléculas de sMHCII não apenas promovem a expressão de marcadores supressivo em células TCD4+, como também podem suprimir a produção de IL-2 e induzir a produção IL-10, na ausência de células apresentadoras de antígeno, reduzindo a sinalização de ativação de células T, atuando como potentes reguladores da resposta imune (BAKELA et al., 2015).

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho sugere que o hemograma completo, durante o acompanhamento de cães em tratamento para a leishmaniose visceral, pode ser considerado um bom biomarcador de prognóstico para o acompanhamento da evolução clínica e sucesso do tratamento. Sendo monócitos e plaquetas os melhores parâmetros a serem considerados.

Esses dados associados aos resultados de globulinemia e relação albumina globulinas, parâmetros já utilizados na prática veterinária, poderiam melhor auxiliar na análise da evolução do estado clínico dos animais tratados.

A análise das moléculas sCD14 e sMHC-II pode ser também utilizadas como parâmetros de status clínico de cães com leishmaniose visceral, além de servirem como maradores de acompanhamento da evolução clínica de animais tratados.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. et al. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, v.77, n.4, Aug, p.557-6, 1991.
- ABREU-SILVA, A. L., LIMA, T. B., DE MACEDO, A. A., MORAES-JÚNIOR, F. J., DIAS, E. L., BATISTA, Z. S., CALABRESE, K. S., MORAES, J. L., REBÊLO, J. M., GUERRA, R. M. (2008). Seroprevalence, clinical and biochemical data of dogs naturally infected by *Leishmania* and phlebotominae sandfly fauna in an endemic area in São Luis Island, Maranhão State, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17 Suppl 1:197-203.
- ALDRIDGE, J. R. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 13, p. 5306–5311, 2009.
- ALVAR, J., CAÑAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J., NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v. 57, p. 1-87, 2004.
- AMUSATEGUI, I., SAINZ, A., RODRIGUEZ, F., TESOURO, M. A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.* v.18, p.147-156
- ANTONELLI, L. R. V et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute *Plasmodium vivax* malaria. *PLoS pathogens*, v.10, n. 9, p. e1004393, 2014.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, v. 27, p. 669-92, 2009.
- AULTMAN, D. et al. Soluble HLA in human body fluids. *Human Immunology*, v. 60, n. 3, p. 239–244, 1999.
- AYASLIOGLU, E.; TEKELI, E.; BIRENGEL, S. Significant Elevation of Serum Soluble CD14 Levels in Patients with Brucellosis. *Jpn.J.Infect.Dis.*, v. 58, n. 1, p. 11–14, 2005.
- BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA JR., A.; JERONIMO, S.; CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, v. 12, n.8, p. 1228-1231, 2000.
- BADARO R, JONES TC, CARVALHO EM, SAMPAIO D, REED SG, BARRAL A, et al. New perspective on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. infect. Dis.*1986 Dec, 166: 1124-1132.
- BADARO R, DUARTE. Leishmaniose visceral (Calazar). *Tratado de infectologia: Atheneu, São Paulo; 2005. vol. 2, cap. 97; p. 1234-1259.*
- BAKELA, K. et al. Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4+ T cells. *Immunology*, v. 144, n. 1, p. 158–169, 2015.
- BANETH, G; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, v. 106, p.315-314, 2002.
- BANETH, G., KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P., FERRER, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24(7):324-30.
- BARANWAL, A. K. et al. Fulminant hepatic failure complicating visceral leishmaniasis in an apparently immunocompetent child. *Indian J Pediatr.* v. 74, n. 5, maio. 2007.

- BARBOSA, V. S. Estudo da heterogeneidade de monócitos de cães infectados ou não por leishmania infantum. 2013. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- BELKAID, Y.; BUTCHER, B.; SACKS, D. L. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *European journal of immunology*, v. 28, n. 4, p. 1389–1400, 1998.
- BILGIR, F. et al. Soluble CD40 ligand, high sensitive C-reactive protein and fetuin-A levels in patients with essential thrombocythemia. *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis*, v. 46, n. 1, p.67–71, 2012.
- BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Evaluation of proteinuria in leishmaniotic patient. In: *International Congress On Canine Leishmaniasis*, 1., 2004, Nápoles. Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 3-18, 2004.
- BOSSOLASCO, S. et al. Soluble CD23 in cerebrospinal fluid: a marker of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma in the brain. *AIDS*, v. 15, n. 9, p. 1109–1113, 2001.
- BOURDOISEAU G, BONNEFONT C, HOAREAU E, BOEHRINGER C, STOLLE T, CHABANNE L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally Leishmania infantum infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997;(59):21-30.
- BUFLER, P. et al. Soluble lipopolysaccharide receptor (CD14) is released via two different mechanisms from human monocytes and CD14 transfectants. *European Journal of Immunology*, v. 25, n. 2, p. 604–610, 1995.
- CABRAL, M., O'GRADY, J. E., ALEXANDER, J. (1992). Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*. 14, 531-539
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. (1998). Leishmania and canine Leishmaniosis. *Rev. Port. C. Vet.*, v. 93, p. 122-141.
- CARDOSO, L., SCHALLIG, H. D., CORDEIRO-DA-SILVA, A., CABRAL, M., ALUNDA, J. M., RODRIGUES, M. (2007). Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 117(1-2):35-41.
- CHAGAS, E. VISCERAL LEISHMANIASIS IN BRAZIL. *Science*, v. 84, n. 2183, p. 397 LP-398, 1936.
- CHAGAS, E. et al. Leishmaniose Visceral Americana: (Relatorio dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937) *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1938.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, L.; GRADONI, R.; AMBROSIO, L.; CORTESE, A.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 naturally infected by Leishmania infantum. *Veterinary Record*, v. 141, p.539–543.
- CIARAMELLA, P., PELAGALLI, A., CORTESE, L., PERO, M. E., CORONA, M., LOMBARDI, P., AVALLONE, L., PERSECHINO, A. (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *Vet. J*. 169(3):465-7.

- COSTA, C. H. (2011). How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44(2):232–242.
- COSTA VAL, A. P. Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossomas. 2004. 125p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.
- COSTA-VAL, A. P., CAVALCANTI, R. R., GONTIJO, N. F., MICHALICK, M. S. M., ALEXANDER, B., WILLIAMS, P., MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, 174, 636–643. 2007.
- CROS, J. et al. Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*, v. 33, n. 3, p. 375–386, 2010.
- D&APOS; OLIVEIRA, A. et al. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 1, p. 7–10, 2002.
- DANTAS-TORRES, F., SOLANO-GALLEGO, L., BANETH, G., RIBEIRO, V. M., DE PAIVA-CAVALCANTI, M., OTRANTO, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 28(12):531-8.
- DEANE, L. M., DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *Hospital.* 47, 75-87, 1955.
- DEANE, L., M. Leishmaniose visceral no Brasil – estudo sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. 1a ed. Rio de Janeiro: Serviço nacional de educação sanitária. 1956, 161 p.
- DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. (2000). Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, p.213-216.
- DIAZ-GANDARILLA, J. A. et al. PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA (2)-COX-2 inhibition, activating ROS production against *Leishmania mexicana*. *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 215283, 2013. ISSN 2314-6141
- DOS SANTOS, S. O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 12, n. 3, p. 315–317, 1998.
- DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 1, 2016.
- DURIEUX, J. J et al. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: Characterization and release by normal human monocytes. *European Journal of Immunology*, 9, p. 2006–2012, 1994.
- DYE, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 125-130.
- EGAN, C. E. et al. CCR2 and CD44 Promote Inflammatory Cell Recruitment during Fatty Liver Formation in a Lithogenic Diet Fed Mouse Model. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, 2013.

- FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. (2000). Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária, São Paulo*. v.5, n.28, p.36-44.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN N. C. (2000). *Schalm's Veterinary Hematology*, 5 ed., Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 63-128.
- FERRER, L. (1992). Leishmaniasis In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. (Eds.) *Kirk's Current Veterinary Therapy 11th ed.: Small Animal Practice*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.266-270.
- FERRER, L. (2002). Canine leishmaniasis: evaluation of the immunocompromised patient. In *Proceedings of the 27 th annual world congress of the World Small Animal Veterinary Association, Granada, Spain, 3-6 October*.
- FOGLIA MANZILLO, V. et al. Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 5, 2013.
- FRANZMANN, E. J. et al. Salivary soluble CD44: A potential molecular marker for head and neck cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, v. 14, n. 3, p. 735–739, 2005.
- FREITAS, J. C., NUNES-PINHEIRO, D. C., LOPES NETO, B. E., SANTOS, G. J., ABREU, C. R., BRAGA, R. R., CAMPOS, R. M., OLIVEIRA, L. F. (2012). Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*45(1):24-9.
- FU, S. L. et al. Immunoglobulin E antibodies from pancreatic cancer patients mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v.153, n. 3, p. 401–409, 2008.
- GE, Q. et al. Soluble peptide-MHC monomers cause activation of CD8+ T cells through transfer of the peptide to T cell MHC molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 21, p. 13729–13734, 2002.
- 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, Jul 2003.
- GENARO, O. *Leishmaniose visceral canina experimental (Tese de Doutorado em Parasitologia)*. Belo horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 202 p, Doutorado em Parasitologia. 1993.
- GIUNCHETTI, R. C., W. MAYRINK. et al. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*, v.135, n.2-3, Aug-Oct, p.100-7, 2006.
- GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK W. et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, v.84, n.2, Apr, p.269-77, 2008.
- GLENNIE, N. D.; VOLK, S. W.; SCOTT, P. Skin-resident CD4+T cells protect against *Leishmania major* by recruiting and activating inflammatory monocytes. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 4, 2017.
- GLÜCK, T. et al. Parameters influencing membrane CD14 expression and soluble CD14 levels in sepsis. *European Journal of Medical Research*, v. 6, n. 8, p. 351–8, 2001.
- GONCALVES, R. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med*. v. 208, n. 6, jun. 2011.

- GORAK, P. M. A.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *European Journal of Immunology*, v. 28, n.2, p. 687–695, 1998.
- GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005. ISSN 1474-1733.
- GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION*, 2., 2002, Sevilha. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Sevilha: [s.n.], 2002, p. 7-14.
- GRAMICCIA M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Vet Parasitol* 2011;181:23-30.
- GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3^a ed. Canada: Saunders Elsever, 2006. cap. 73, p. 685-698.
- GRIP, O. et al. Increased subpopulations of CD16+ and CD56+ blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 13, n. 5, p. 566–572, 2007.
- GUERRA, L. L., TEIXEIRA-CARVALHO, A., GIUNCHETTI, R. C., MARTINS-FILHO, O. A., REIS, A. B., CORREA-OLIVEIRA, R. (2009). Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitology research*. 104, 611-622.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil *Trends in Parasitology*, 2011.
- HAYASHI, J.; MASAKA, T.; ISHIKAWA, I. Increased levels of soluble CD14 in sera of periodontitis patients. *Infection and immunity*, v. 67, n. 1, p. 417–20, 1999.
- HEESCHEN, C. et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, v. 348, n. 12, p.1104–1111, 2003.
- HEILIGENHAUS, A. et al. Soluble HLA class I and HLA-DR plasma levels in patients with anterior uveitis. *Tissue Antigens*, v. 63, n. 4, p. 369–375, 2004.
- HIKI, N. et al. Endotoxin binding and elimination by monocytes: Secretion of soluble CD14 represents an inducible mechanism counteracting reduced expression of membrane CD14 in patients with sepsis and in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Infection and Immunity*, v. 66, n. 3, p. 1135–1141, 1998.
- HOHEISEL, G. et al. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest*, v.108, n. 6, p. 1614–1616, 1995.
- HOHL, T. M. et al. Inflammatory Monocytes Facilitate Adaptive CD4 T Cell Responses during Respiratory Fungal Infection. *Cell Host and Microbe*, v. 6, n. 5, p. 470–481, 2009.
- HUANG, J. et al. Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. *Blood*, v. 120, n. 15, p. 3030–3038, 2012.
- IKEDA-GARCIA, F. A., CIARLINI, P. C., FEITOSA, M. M., GONÇALVES, M. E., LUVIZOTTO, M. C. R., LIMA, V. M. F. (2003). Perfil hematológico de cães infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: Estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica veterinária*. v.47, p. 42-48.
- IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; DE LIMA, V.M.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.; FEITOSA, M.M. (2007). Clinical

and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, v.143, p. 254-259.

KAVOOSI, G.; ARDESTANI, S. K.; KARIMINIA, A. The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, v. 136, n. 10, p. 1193-9, Sep 2009. ISSN 1469-8161

KATAYAMA, K. et al. CD14+CD16+ monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 121, n. 3, p. 566–570, 2000.

KEENAN, C. M., HENDRICKS, L. D., LIGHTNER, L., WEBSTER, H. K., JOHNSON, A. J. (1984). Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.* 21, 74-79.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.35, p.376-383.

KRÜGER, C. et al. Serum CD14 levels in polytraumatized and severely burned patients. *Clinical and experimental immunology*, v. 85, n. 2, p. 297–301, 1991.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press Inc, London, p.1-120, 1987.

LANDMANN, R. et al. Increased circulating soluble cd14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *Journal of Infectious Diseases*, v. 171, n. 3, p. 639–644, 1995.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, 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.

LI, H. X. et al. Transcytosis of IgE-antigen complexes by CD23a in human intestinal epithelial cells and its role in food allergy. *Gastroenterology*, v. 131, n. 1, p. 47–58, 2006.

LIEW, F. Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nature reviews. Immunology*, v. 2, n. 1, p.55–60, 2002.

LIM, J. K. et al. Chemokine Receptor Ccr2 Is Critical for Monocyte Accumulation and Survival in West Nile Virus Encephalitis. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 1, p. 471–478, 2011.

LUKES, J.; MAURICIO I. L. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.22, 2007.

LUTTEROTTI, A. et al. Increased serum levels of soluble CD14 indicate stable multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 181, n. 1–2, p. 145–149, 2006.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 82, n. 4, p. 566-567, 1988.

MARIOS-FRANKISKOS, S. et al. Serum-derived MHC class II molecules: Potent regulators of the cellular and humoral immune response. *Immunobiology*, v. 215, n. 3, p. 194–205, 2010.

- MARTINS, T. A. Biomarcadores de resistência e susceptibilidade na infecção experimental por leishmania (leishmania) major. 2016. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
- MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, S. (1993). Immunological and histological study of T- and B- lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.51, p.49–59
- MARZOCHI, M. C., COUTINHO, S. G., DE SOUZA, W. J., DE TOLEDO, L. M., GRIMALDI, J. G., MOMEN, H., PACHECO, R. S., SABROZA, P. C., DE SOUZA, M. A., RANGEL JUNIOR, F. B. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 349-357.1985
- MAURICIO, I. L.; STOTHARD J. R.. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, v.16, n.5, May, p.188-9, 2000.
- MOREIRA, E. D., JR., MENDES DE SOUZA, V. M., SREENIVASAN, M., NASCIMENTO, E. G., PONTES DE CARVALHO, L. (2004). Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet. Parasitol.* 122: 245-252.
- MORENO, J.; NETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLES, F.; BLANCO, F.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immuno. Immunopathol.*, v. 71, n. 3-4, p. 181-195, 1999.
- MORENO, J., ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, 18, 399-405. 2002.
- MOYAT, M. et al. Role of inflammatory monocytes in vaccine-induced reduction of *helicobacter felis* infection. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 11, p. 4217–4228, 2015
- NACHER, M. et al. Relationship between reactive nitrogen intermediates and total immunoglobulin E, soluble CD21 and soluble CD23: Comparison between cerebral malaria and nonsevere malaria. *Parasite Immunology*, v. 24, n. 8, p. 395–399, 2002.
- NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunology*, v. 3, n. 1, p. 65–70, 1991.
- NAG, B. et al. Soluble MHC II-peptide complexes induce antigen-specific apoptosis in T cells. *Cell Immunol*, v. 170, n. 1, p. 25–33, 1996.
- NAUCKE, T. J.; AMELUNG, S.; LORENTZ, S. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites & vectors*, v. 9, p. 67, 2016.
- NOCKHER, W. A et al. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, v. 96, n. 1, p. 15–19, 1994.
- NOCKHER, W. A.; BERGMANN, L.; SCHERBERICH, J. E. Increased soluble CD14 serum levels and altered CD14 expression of peripheral blood monocytes in HIV-infected patients. *Clinical and experimental immunology*, v. 98, n. 3, p. 369–74, 1994.
- OESTERREICHER, C. et al. Increased in vitro production and serum levels of the soluble lipopolysaccharide receptor sCD14 in liver disease. *Journal of Hepatology*, v. 23, n. 4, p. 396–402, 1995.
- OWN, T.; TAN, J.; MULLAN, M. CD40 signaling and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochemistry International*, v. 39, n. 5–6, p. 371–380, 2001.

- PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.
- PALTRINIERI S, RAVICINI S, ROSSI G, ROURA X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. *Vet J*. 2010 Dec;186(3):393-5. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.08.019. Epub 2009 Sep 15.
- PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.; OSELKA, G.W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M, M. (2002). Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *J. Pediatr.*, v. 78, p.120-127.
- PENNISI, M. G. et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, v. 29, n. SUPPL. 2, p. 301–303, 2005.
- PETERS, W. et al. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, n. 0027–8424, p. 7958–7963, 2001.
- PFEIFFER, K. A. et al. Soluble HLA levels in early pregnancy after in vitro fertilization. *Human Immunology*, v. 61, n. 6, p. 559–564, 2000.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v. 64, n. 1, p. 229-235, 1994.
- PUPPO, F. et al. Soluble HLA antigens: New roles and uses. *Immunology Today Anais*.1997.
- RAMBERT, J. et al. Molecular blocking of CD23 supports its role in the pathogenesis of arthritis. *PLoS ONE*, v. 4, n. 3, 2009.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A. 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, Aug, p.68-75, 2006a.
- REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, v.112, n.3-4, Aug 15, p.102-16, 2006b.
- REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO A. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*, v.146, n.2, Nov, p.303-11, 2006c.
- REIS, A. B.; MARTINS-FILHO O. A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v.128, n.1-3, Mar 15, p.87-95, 2009.
- REIS, A. B., GIUNCHETTI, R. C., CARRILLO, E., MARTINS-FILHO, O. A., MORENO, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 26: 341-349.
- RIBEIRO, V.M. Treatment and control aspects of canine leishmaniasis. *Clínica Veterinária*.ano XII, n 71, novembro/dezembro, ISSN 1413-571X, 66 – 76, 2007.
- RIBEIRO, V. M.; BAHIA, E. M.; TELES, P. P. A. Evaluation of immunotherapy assessment Leish-Tec associated with allopurinol in dogs naturally infected by *Leishmania infantum* - preliminary results. In: *WorldLeish 5, 2013, Porto de Galinhas. WORLDLEISH 5 Fifth World Congress on Leishmaniasis, 2013. v. único. p. 630.*

- RIZZO, R. et al. Defective production of soluble HLA-G molecules by peripheral blood monocytes in patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 115, n. 3, p. 508–513, 2005.
- ROBBEN, P. M. et al. Recruitment of Gr-1 + monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 11, p. 1761–1769, 2005.
- ROGACEV, K. S. et al. CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *European Heart Journal*, v. 32, n. 1, p. 84–92, 2011.
- ROSYPAL, A. C. et al. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *The Journal of parasitology*, v. 91, n. 4, p. 970–2, 2005.
- SAVILAHTI, E. et al. IgA antibodies, TGF-beta1 and -beta2, and soluble CD14 in the colostrum and development of atopy by age 4. *Pediatric research*, v. 58, n. 6, p. 1300–5, 2005.
- SCHWARTZ, M.; ZIV, Y. Immunity to self and self-maintenance: a unified theory of brain pathologies. *Trends in Immunology*, v. 29, n. 5, p. 211–219, 2008.
- SEMPLE, J. W.; FREEDMAN, J. Platelets and innate immunity *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010.
- SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.
- SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, v. 7, n. 3, p. 311–317, 2006.
- SERBINA, N. V. et al. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, v. 26, n. 1, p. 421–452, 2008.
- SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation *Nature Reviews Immunology*, 2011.
- SILVA, E. S., GONTIJO, C. M., PACHECO, R. S., FIÚZA, V. O., BRAZIL, R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 96, 285-291. 2000.
- SILVA, M.S. Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (CUNHA & CHAGAS, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- SKRZECZYSKA-MONCZNIK, J. et al. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 67, n. 2, p. 152–159, 2008.
- SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. (1990). Leishmaniasis. In: MILLS, L.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W. B. Saunders co., p.769-777.
- SMYTH, S. S. S. et al. Platelet functions beyond hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 7, n. 11, p. 1759–1766, 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J. E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J., FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTÚS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet. Parasitol.*, v. 96, n. 4, p. 265-276, 2001.

- SOLANO-GALLEGO L, FERNANDEZ-BELLON H, MORELL P, FONDEVILA P, ALBEROLA J, RAMIS A, et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol.* 2004;(130):7-12.
- SOLANO-GALLEGO, L. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28. ISSN 1873-2550. 2009.
- SOLANO-GALLEGO L, MIRO G, KOUTINAS A. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*; 4:86. 2011.
- STEINBORN, A. et al. Soluble HLA-DR levels in the maternal circulation of normal and pathologic pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 188, n. 2, p. 473–479, 2003.
- STRAUSS-AYALI, D.; CONRAD, S. M.; MOSSER, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 82, n. 2, p. 244–252, 2007.
- SUNDERKOTTER, C. et al. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, v. 172, n. 7, p. 4410–4417, 2004.
- SWIRSKI, F. K. et al. Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science*, v. 325, n. 5940, p. 612–616, 2009.
- TAFURI, W. L. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 38, n. 2, p. 81-9, Mar-Apr 1996. ISSN 0036-4665
- TAFURI WL, SANTOS RL, ARANTES RME, ALVES RG, MELO MN, MICHALICK MSM. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* 2004;292(1-2):17-23.
- TAKESHITA, S. et al. Increased levels of circulating soluble CD14 in Kawasaki disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 119, n. 2, p. 376–381, 2000.
- TERRAZANO, G.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; ZAPPACOSTA, S.; DiLORIA, A.; SANTORO, D.; RUGGIERO, G.; CIARAMELLA, P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 110, n. 3-4, p. 331-337, 2006.
- THIJS, J. L. et al. Moving toward endotypes in atopic dermatitis: Identification of patient clusters based on serum biomarker analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 3, p. 730–737, 2017.
- TROPIA DE ABREU, R., CARVALHO, M. G., CARNEIRO, C. M., GIUNCHETTI, R. C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., COURA-VITAL, W., CORRÊA-OLIVEIRA, R., REIS, A. B. (2011). Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One.* 10; 6(5):e18873.
- UEHARA, A. et al. Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans in the presence of soluble cd14. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 189, n. 4, p. 185–192, 2001.
- VAN DER HEYDE HC, GRAMAGLIA I, SUN G, WOODS C. Platelet depletion by anti-CD41 (alphaIIb) mAb injection early but not late in the course of disease protects against

Plasmodium berghei pathogenesis by altering the levels of pathogenic cytokines. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1956-63. Epub 2004 Oct 19.

VERBRUGGEN, L. A. et al. Soluble HLA-DR levels in serum are associated with therapy and genetic factors in rheumatoid arthritis. *Human Immunology*, v. 63, n. 9, p. 758–764, 2002.

WALTER, G. J. et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺CD45^{ro}⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cells. *Arthritis and Rheumatism*, v.65, n. 3, p. 627–638, 2013.

WEBB, B. J. et al. The lack of NK cytotoxicity associated with fresh HUCB may be due to the presence of soluble HLA in the serum. *Cell Immunol*, v. 159, n. 2, p. 246–61., 1994.

WENISCH, C. et al. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute Plasmodium falciparum malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 105, n. 1, p. 74–78, 1996.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>

WOLF, R. E. et al. Soluble HLA-I in rheumatic diseases. *Human Immunology*, v. 59, n. 10, p. 644–649, 1998.

WÜTHRICH, B.; KÄGI, M. K.; JOLLER-JEMELKA, H. Soluble CD14 but not interleukin-6 is a new marker for clinical activity in atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, v. 284, n. 6, p.339–342, 1992.

XAVIER, S, C. Aspectos clínicos, histopatológicos e parasitológicos da pele de cães naturalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi. 2002. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

YEAMAN MR. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol*. 2010 Mar;5(3):471-506.

YU, S. et al. Pathological significance of elevated soluble CD14 production in rheumatoid arthritis: In the presence of soluble CD14, lipopolysaccharides at low concentrations activate RA synovial fibroblasts. *Rheumatology International*, v. 17, n. 6, p. 237–243, 1998.

ZATELLI, A. The nephropatic leishmaniotic patient. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS, 1., 2004, Nápoles. Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis, Nápoles: [s.n.], 2004. p. 83-85.

ZAWADA, A. M. et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, v. 118, n. 12, 2011.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L.; ULEVITCH, R. J. CD14: Cell surface receptor and differentiation: n marker. *Immunology Today*, v. 14, n. 3, p. 121–125, 1993.

9.1 Anexo A: Certificado CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 199 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Estudo de Marcadores de Resistência e Susceptibilidade Através da Análise de Monócitos de Cães Infectados com *Leishmania infantum*", que tem como responsável Ricardo Gonçalves, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 17/09/2013. Este certificado espira-se em 17/09/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 199 / 2013, related to the Project entitled "STUDY OF MARKERS OF RESISTANCE AND SUSCEPTIBILITY THROUGH ANALYSIS OF MONOCYTES FROM DOGS INFECTED WITH *LEISHMANIA INFANTUM*", under the supervision of Ricardo Gonçalves, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 17/09/2013. This certificate expires in 17/09/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 17/09/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2 Anexo B: Termo de anuência do proprietário

DECLARAÇÃO:

Eu, (nome do proprietário), declaro estar de acordo que o meu cão, seja examinado (a) pelo Médico Veterinário Dr. Pedro Paulo de Abreu Teles, CRMV-MG N°14021, sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. Vitor Márcio Ribeiro, CRMV-MG N° 1883.

As amostras coletadas pelo Santo Agostinho Hospital Veterinário para os exames complementares ao diagnóstico poderão ser utilizadas também para pesquisa e os resultados incluídos na tese intitulada:

“AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS SANGUÍNEOS, COMO MARCADORES DE PROGNÓSTICO, EM CÃES INFECTADOS NATURALMENTE POR *Leishmania infantum* SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM IMUNOTERAPIA VACINAL ASSOCIADA AO ALOPURINOL” do curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Será guardado absoluto sigilo quanto aos dados pessoais de seu proprietário para todos os efeitos legais.

Belo Horizonte, ____/_____/201__.

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Documento de Identidade: _____