

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Vítor Silva Barbosa

MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS NA PATOGÊNESE DAS LESÕES TECIDUAIS EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Leishmania major*

Universidade Federal de Minas Gerais

Programa de Pós-graduação em Patologia

Belo Horizonte

2018

Vítor Silva Barbosa

Monócitos inflamatórios na patogênese das lesões teciduais em camundongos infectados por
Leishmania major

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito para obtenção do título de
Doutor em Patologia Investigativa

Orientador: Dr. Ricardo Gonçalves

Coorientadora: Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli

Belo Horizonte

2018

Barbosa, Vítor Silva.
B238m Monócitos inflamatórios na patogênese das lesões teciduais em camundongos infectados por *Leishmania major* [manuscrito]. / Vítor Silva Barbosa. - - Belo Horizonte: 2018.
76f.: il.
Orientador (a): Ricardo Gonçalves.
Coorientador (a): Lis Ribeiro do Valle Antonelli.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Monócitos. 2. Macrófagos. 3. Leishmaniose. 4. *Leishmania major*. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Gonçalves, Ricardo. II. Antonelli, Lis Ribeiro do Valle. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WH 200

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

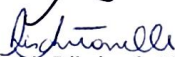
MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS NA PATOGÊNESE DAS LESÕES TECIDUAIS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Leishmania major*


VÍTOR SILVA BARBOSA

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 21 de setembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

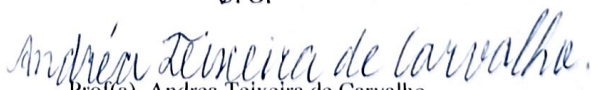

Prof(a) Ricardo Gonçalves - Orientador
UFMG


Prof(a). Lis Ribeiro do Valle Antonelli
FIOCRUZ


Prof(a). Aristobolo Mendes da Silva
UFMG


Prof(a). Ricardo Toshio Fujiwara
UFMG


Prof(a). Alexandre Barbosa Reis
UFOP


Prof(a). Andrea Teixeira de Carvalho
FioCruz

Belo Horizonte, 21 de setembro de 2018.

EPÍGRAFE

“A ciência é, portanto, uma perversão de si mesma, a menos que tenha como fim último, melhorar a humanidade.”

(Nikola Tesla)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos aqueles que estiveram em meu caminho ao longo desse percurso.

Ao meu orientador, Professor Ricardo Gonçalves, com que venho trabalhando e dividindo os bons e os “maus” momentos desde o mestrado, sempre de forma positiva, construtiva, que sem dúvida foram de grande crescimento para mim. Obrigado, Ricardo por toda compreensão, tranquilidade e positividade que fizeram esses seis anos de pós-graduação serem mais leves.

A minha coorientadora, Dra. Lis Ribeiro do Valle Antonelli, pela imensa solicitude todas as vezes que precisei e na persistência para que alcançássemos bons resultados.

Aos professores Alexander Birbrair (Departamento de Patologia) e Dawidson Assis Gomes (Departamento de Imunologia), pela colaboração e disponibilidade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, sem os quais, sabemos ser impossível um desenvolvimento produtivo e colaborativo, seja nas crises da pesquisa ou nos conflitos pessoais.

À minha família. Meus pais, Sandra e João Francisco, que foram e são meus maiores apoiadores em todos os projetos de vida. A minha esposa Marta, que sempre me despertou para os momentos mais importantes e fez com que minha vontade de melhorar e me estruturar não fossem perdidas. Ao meu filho Pedro, que me manteve animado e me dava forças simplesmente com sua presença, transmitindo paz e alegria.

Aos órgãos fomentadores de pesquisa: CAPES, ICB UFMG e Rede de Pesquisa em Doenças Infecciosas Humanas e Animais no Estado de Minas Gerais.

RESUMO

Monócitos são células heterogêneas e dividem-se em subpopulações que apresentam variação de tamanho, superfície de membrana, granulosidade e morfologia nuclear. Componentes do sistema fagocítico mononuclear, apresentam importantes funções relacionadas às respostas imunes. Diferentes subpopulações já foram descritas em várias espécies, com diferentes funções. Os monócitos clássicos murinos (Gr1^+) apresentam alta expressão de CCR2, molécula responsável pela migração dessas células através do gradiente de CCL2 e têm sido relacionados a processos inflamatórios assépticos e infecciosos. Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios em mamíferos, albergados principalmente por macrófagos. Uma vez infectados, macrófagos são inativados, não respondendo de forma efetiva à infecção. A resistência a infecção observada em camundongos C57BL/6 vem sendo atribuída à resposta de linfócitos Th1, devido à produção de $\text{IFN-}\gamma$, estimulando macrófagos infectados e monócitos migrados a controlar a infecção. Em camundongos, monócitos são as primeiras células do sangue periférico a chegarem no local de infecção por *Leishmania major* (*L. major*), antes mesmo da chegada dos neutrófilos. Logo, o papel do monócito como célula efetora, torna-se crucial, tanto no aparecimento das lesões cutâneas quanto na resolução da infecção. O objetivo desse trabalho foi avaliar e descrever o papel dos monócitos murinos na cinética de formação e resolução da lesão e infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, bem como a interação desses monócitos com macrófagos infectados. Nossos resultados demonstram que, *in vitro*, macrófagos primados ou tratados com $\text{IFN-}\gamma$ apresentam capacidade de resistência à infecção menor que quando comparados a macrófagos tratados com monócitos ativados por $\text{IFN-}\gamma$, esses por sua vez são capazes de induzir os macrófagos infectados à morte, eliminando as células hospedeiras permissivas e os parasitos internalizados. Observamos ainda, que monócitos Gr1^+ é a população com maior número de células aderidas aos macrófagos infectados, sendo assim essenciais para o controle da infecção. Camundongos deficientes para CCR2, ao receberem transferência adotiva de células da medula óssea de camundongos WT, passam a ter menor tamanho de lesão, com resposta semelhante aos WT. Nossos resultados demonstram que a migração de monócitos Gr1^+ é essencial para o controle da infecção e também para o surgimento e resolução da lesão.

ABSTRACT

Monocytes are heterogeneous cells and are divided into subpopulations that show variation in size, membrane surface, granularity and nuclear morphology. Components of the mononuclear phagocytic system, monocytes have important functions related to immune responses. Different subpopulations have already been described in several species, with different functions. The classical murine monocytes (Gr1⁺) show high expression of CCR2, the molecule responsible for the migration of these cells through the CCL2 gradient and have been related to aseptic and infectious inflammatory response. Protozoa of the genus *Leishmania* are obligate intracellular parasites in mammals, mainly harbored by macrophages. Once infected, macrophages are inactivated, not responding effectively to infection. The resistance to infection observed in C57BL/6 mice has been attributed to the Th1 lymphocyte response due to the production of IFN- γ , stimulating infected macrophages and migrated monocytes to control infection. In mice, monocytes are the first peripheral blood cells to reach the *Leishmania major* (*L. major*) infection site, even before the neutrophils arrive. Therefore, the role of the monocyte as an effector cell becomes crucial, both in the appearance of cutaneous lesions and in the resolution of infection. The objective of this work was to evaluate and describe the role of murine monocytes in the kinetics of the formation and resolution of lesion and *L. major* infection control in C57BL/6 mice, as well as the interaction of these monocytes with infected macrophages. Our results demonstrate that, *in vitro*, primed-IFN- γ or IFN- γ -treated macrophages have lower resistance to infection than when compared to macrophages treated with IFN- γ -activated monocytes, which in turn are able to induce infected macrophages to death, eliminating permissive host cells and internalized parasites. We also observed that Gr1⁺ monocytes are the population with the highest number of cells adhered to the infected macrophages, being thus essential for the infection control. CCR2-deficient mice showed a smaller size of lesion, with a similar response to WT, when they receive adoptive transfer of bone marrow cells from WT mice. Our results demonstrate that the migration of Gr1⁺ monocytes is essential for the control of the infection and also for the appearance and resolution of the lesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Comparação da infecção por *L. major* em camundongos CCR2^{-/-} e selvagem. Em **A** histograma comparativo resultado de análise por citometria de fluxo, monócitos Gr1^{low} e Gr1^{high}; em **B** tamanho da lesão vs tempo. 19
- FIGURA 2 - Morfologia nuclear de monócitos murinos Gr1⁺ e Gr1⁻, 1000x. Monócitos Gr1⁺ e Gr1⁻ foram isolados por *cell sorting flow cytometry* e aderidos a lamínulas de vidro. Em **A** vemos monócito **Gr1⁺** apresentando núcleo mais basofílico em forma de casco de boi; em **B** monócito **Gr1⁻** apresentando núcleo menos basofílico em formato de rim. 28
- FIGURA 3 - Morfologia nuclear de monócitos humanos. Monócitos humanos foram separados por citometria de fluxo e aderidos a lamínulas de vidro. A coluna da extrema esquerda mostra monócitos clássicos com núcleo mais basofílico e formato de casco de boi; as colunas centrais mostram monócitos intermediários com núcleos de coloração e morfologia diversificada; a coluna da extrema direita mostra monócitos não clássicos com núcleos menos basofílicos que os clássicos e apresentam formato de rim. 29
- FIGURA 4 - Avaliação de proteínas nucleares por microscopia confocal, 600x. Em **A**, monócito Gr1⁺; em **B**, monócito Gr1⁻. 30
- FIGURA 5 - Micrografia de imunofluorescência: em verde (FITC), formas amastigotas de *L. major* e em vermelho (IP), núcleos. Em **A** e **B** macrófagos do grupo *L. major-infect.MØ* (sem estímulo), aumentos de 400x e 1000x, respectivamente; Em **C**, macrófagos do grupo IFN- γ *post-infection*; Em **D**, macrófagos do grupo IFN- γ *primed MØ*; Em **E**, macrófagos do grupo IL-10-*primed MØ* +IFN- γ ; Em **F**, macrófagos do grupo TNF- α -*primed MØ* + IL-10 + IFN- γ . 32
- FIGURA 6 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major-infect.MØ*) e os grupos tratados. Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos/macrófago que o grupo IFN- γ *primed MØ* (P<0,0001); em **B**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ *post-infection* (P=0,0140); em **C**, grupo controle apresenta 34

maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001); em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001).

- FIGURA 7 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (2h). Em **A**, grupo IFN- γ -*primed MØ* apresenta menor quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ *post-infection* (P=0,0381); em **B**, grupo IFN- γ -*primed MØ* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P=0,0052); em **C**, grupo IFN- γ -*primed MØ* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001); em **D**, grupo IFN- γ *post-infection* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001); em **E**, grupo IFN- γ *post-infection* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001); em **F**, grupo IFN- γ -*primed Mo* e IFN- γ +*Leish-infect.MØ*, não apresentam diferença (P= 0,0649).. 36
- FIGURA 8 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major-infect. MØ*) e os grupos tratados (24h). Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed MØ* (P<0,0001); em **B**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ *post-infection* (P<0,0001); em **C**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001); em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001). 37
- FIGURA 9 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (24h). Em **A**, grupo IFN- γ -*primed MØ* e IFN- γ *post-infection* não se diferenciam (P=0,4812); em **B**, grupo IFN- γ -*primed MØ* e IFN- γ +*Leish-infect.MØ* não se diferenciam (P= 0,4188); em **C**, grupo IFN- γ -*primed MØ* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001); em **D**, grupo IFN- γ *post-infection* apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo* (P<0,0001); em **E**, grupo IFN- γ *post-infection* e IFN- γ +*Leish-infect.MØ* não se diferenciam (P= 0,4188); em **F**, grupo IFN- γ -*primed Mo* apresenta menos amastigotas em macrófagos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ*, (P<0,0001). 38

- FIGURA 10 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major-infect.MØ*) e os grupos tratados (48h). Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed MØ (P<0,0001); em **B**, grupo controle e IFN- γ post-infection não se diferem (P=0,1751); em **C**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001); em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo (P<0,0001). 39
- FIGURA 11 - Comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (48h). Em **A**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta menor quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ post-infection (P<0,0001); em **B**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P=0,0128); em **C**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo (P<0,0001); em **D**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo (P<0,0001); em **E**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001); em **F**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menos amastigotas em macrófagos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ* (P<0,0001). 41
- FIGURA 12 - Frequência relativa de macrófagos não infectados após 2h de estímulos. Comparação entre os grupos tratados. Em **A**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ -primed MØ; em **B**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ post-infection; em **C**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ*. 42
- FIGURA 13 - Frequência relativa de macrófagos não infectados após 24h de estímulos. Comparação entre os grupos tratados. Em **A**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ -primed MØ; em **B**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ post-infection; em **C**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ*. 43

- FIGURA 14 - Frequência relativa do tipo de monócitos aderidos a macrófagos do grupo IFN- γ -*primed* Mo. Monócitos com núcleo em forma de casco de boi representam **74%** dos monócitos aderidos. Monócitos com núcleo em forma de rim representam **26%** do total de monócitos aderidos. 44
- FIGURA 15 - Micrografia, 1000x – grupo IFN- γ -*primed* Mo. Setas vermelhas indicando monócitos com núcleo em forma de casco de boi. Setas verdes indicando macrófagos infectados com *L. major*. Setas amarelas indicando formas amastigotas de *L. major*. 45
- FIGURA 16 - Micrografia, 400x - grupo IFN- γ -*primed* Mo. Setas vermelhas indicando monócitos com núcleo em forma de casco de boi. Setas brancas indicando monócitos com núcleo em forma de rim. Setas verdes indicando macrófagos infectados com *L. major*. Setas amarelas indicando formas amastigotas de *L. major*. 46
- FIGURA 17 - Comparação do tamanho da lesão. Maior tamanho de lesão na pata de camundongos CCR2^{-/-} quando comparados aos grupos CCR2^{-/-}Tr, C57BL/6 WT e C57BL/6 WT Tr, da quinta a 10^a semana de infecção (**B**). Valores de “P” disponíveis em **A**. Infecção e transferência adotiva realizadas na semana zero. 47
- FIGURA 18 - Comparação do tamanho da lesão. O grupo CCR2^{-/-}Tr mantém o mesmo tamanho de lesão que os grupos C57BL/6 WT e C57BL/6 WT Tr da primeira a sexta semana e durante a nona semana (**B**). Valores de “P” disponíveis em **A**. Infecção e transferência adotiva realizadas na semana zero. 48

LISTA DE SIGLAS

APC - *Antigen Presenting Cells* (Célula Apresentadora de Antígenos)

APC - *Allophycocyanin*

BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina Sérica Bovina)

CCR2 - *C-C Chemokine Receptor Type 2* (Receptor de quimiocina tipo 2)

CD - *Cluster of Differentiation* (Grupamento de Diferenciação)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CX3CR1 - *CX3C Chemokine Receptor 1* (Receptor 1 de quimiocina)

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetraacético

FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

FSC - *Foward Scatter* (Dispersão Frontal)

g – Gravidade

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ - *Interferon Gamma*

IL - Interleucina

Kg – Quilograma

LPG – Lipofosfoglicano

MFI – *Mean of Fluorescence Intensity* (Média de Intensidade de Fluorescência)

MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Maior de Histocompatibilidade)

mg - Miligrama

mL – Mililitro

NO - *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

PAMP - *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução de Fosfato Tamponada)

PE – *R-Phycoerythrin Fluorescent Protein* (Proteína Fluorescente R-Ficoeritrina)

pH – potencial de Hidrogênio

SSC – *Side Scatter* (Dispersão lateral)

TGF-B - *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de Crescimento Transformante Beta)

Th – *T helper* (T auxiliar)

TNF - *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

LISTA DE ABREVIATURAS

et al. - *et alii* (e outros)

L. - *Leishmania*

min. – minuto(s)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1.	Monócitos	13
1.2.	Heterogeneidade de Monócitos	13
1.3.	Leishmaniose cutânea: infecção por <i>L. major</i>	16
1.4.	Macrófago	17
1.5.	Macrófagos Classicamente Ativados	18
1.6.	Justificativa	18
2.	OBJETIVOS	21
2.1.	Objetivos específicos	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1.	Comissão de Ética	22
3.2.	Cultivo dos parasitos	22
3.3.	Cultivo macrófagos derivados da medula óssea	22
3.4.	Separação de monócitos do sangue periférico	23
3.5.	Separação de subpopulações de monócitos murinos e comparação da morfologia nuclear dos monócitos clássicos e não clássicos	23
3.6.	Avaliação morfológica dos núcleos das subpopulações de monócitos humanos	23
3.7.	Análise de proteínas nucleares	24
3.8.	Estímulo e infecção dos macrófagos	24
3.8.1.	Ensaio de sobrevivência (<i>survival</i>)	24
3.8.2.	Grupos experimentais: interação com monócitos	26
3.9.	Montagem das lâminas e avaliações realizadas	26
3.10.	Transferência adotiva de células da medula óssea	27
3.11.	Análise estatística	27
4.	RESULTADOS	28
4.1.	Morfologia nuclear de monócitos murinos	28
4.2.	Monócitos humanos	29
4.3.	Proteínas nucleares	30
4.4.	<i>Survival</i>	30
4.5.	Macrófagos e monócitos na eliminação de <i>L. major</i>	33
4.5.1.	Duas horas (2h) de tratamento	33
4.5.2.	24h de tratamento	37

4.5.3. 48h de tratamento	39
4.5.4. Frequência de macrófagos não infectados por grupo	42
4.6. Prevalência de subpopulação de monócitos aderidos a macrófagos do grupo “IFN-γ-primed Mo”	43
4.7. Controle da lesão por transferência adotiva	46
5. DISCUSSÃO	49
5.1. Morfologia nuclear de monócitos: clássicos vs não clássicos	49
5.2. Resistência e suscetibilidade de macrófagos a infecção por <i>L.major</i>	51
5.3. Monócitos na resistência a infecção por <i>L. major</i>	53
6. CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	73
Anexo A: ilustração da morfologia das subpopulações de monócitos de cão	73
Anexo B: CUEA 160/2015	74
Anexo C: CUEA 386/2016	75
Anexo D: citometria de imagem das subpopulações de monócitos de cão	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Monócitos

Monócitos são leucócitos do sistema fagocítico mononuclear, considerados células progenitoras circulantes no sangue periférico, originando outros tipos celulares, uma vez nos tecidos. Podem diferenciar-se em macrófagos, células dendríticas e fibróticos (PILLING *et al.*, 2009), sendo assim, fundamentais para reposição dessas células nos tecidos.

Primeiramente classificados pela morfologia e densidade irregulares, os monócitos exibem certo grau de heterogeneidade, apresentando variação de tamanho, superfície de membrana, granulosidade e morfologia nuclear, que em seus extremos pode levar a confusão com granulócitos, linfócitos, células NK (Natural Killer) e células dendríticas (DCs – dendritic cells), tornado difícil classificá-los unicamente por análise histológica (FIGDOR *et al.*, 1982; VAN FURTH *et al.*, 1972). Participam também do sistema imune inato, estando presentes nas respostas inflamatórias, sejam essas provocadas por agentes patogênicos infecciosos ou por agentes agressores não transmissíveis, como neoplasias malignas (H.J. MEDBURY, S.L.S. TARRAN, A.K. GUIFFRE, M.W.Y. WILLIAMS, T.H. LAM, M. VICARETTI, 2008); e placas ateromatosas (QIAN *et al.*, 2012).

1.2. Heterogeneidade de Monócitos

O termo monócitos (*mono* = um, *bitos* = células) sugere que essa população representa uma fração homogênea de células, porém estudos demonstram que monócitos são compostos por diversos subtipos, variando quanto à sua morfologia nuclear, moléculas de superfície, tamanho, granulosidade e perfil genético (YONA; JUNG, 2010). Morfologicamente, apresentam núcleo em forma de ferradura, rim ou feijão. Quando comparados aos linfócitos são maiores e mais complexos, mas em relação aos polimorfonucleares apresentam menor granulosidade (HILGENDORF; SWIRSKI, 2012). Monócitos são células heterogêneas, dividindo-se em subpopulações, como vem sendo descrito em humanos (GRAGE-GRIEBENOW; FLAD; ERNST, 2001; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. W., 1996), camundongos (GORDON; TAYLOR, 2005), porcos (CHAMORRO *et al.*, 2005), primatas não humanos, equinos (ZIEGLER-HEITBROCK, L., 2014), bovinos (HUSSEN *et al.*, 2013) e cães (BARBOSA, 2013). Essa heterogeneidade difere os monócitos não apenas em populações com características fenotípicas distintas, mas também funcionais.

Estudos realizados por nosso grupo demonstram que em cães, células CD14⁺ constituem cerca de 4% da população de leucócitos totais e quando avaliamos essas células observamos duas populações distintas de acordo com a expressão de CD14: uma com alta expressão de CD14 (CD14^{hi}), constituindo cerca de 90% dos monócitos, apresentando núcleo basofílico em forma de casco de boi, com maior capacidade fagocítica; e outra com baixa expressão de CD14 (CD14^{lo}), constituindo cerca de 10% dos monócitos, com núcleo de aspecto menos basofílico e em forma de rim. Os monócitos CD14^{hi} apresentam maior expressão de marcadores de ativação inflamatória, MHC-II, CD11c, CD44 e CD62L, sendo assim, os nomeamos monócitos clássicos. Por outro lado, monócitos CD14^{lo} apresentam expressão menor desses marcadores e menor capacidade de eliminar promastigotas de *L. major* experimentalmente *in vitro*, e foram então nomeados monócitos não clássicos (BARBOSA, 2013).

Em humanos, os monócitos apresentam três subpopulações: 1) CD14⁺⁺CD16⁻, chamada de monócitos clássicos; 2) CD14⁺⁺CD16⁺⁺, chamada de monócitos intermediários e 3) CD14^{low}CD16⁺⁺, chamada de monócitos não clássicos (CROS *et al.*, 2010). Monócitos clássicos diferenciam-se funcionalmente das outras populações por apresentarem maior capacidade de fagocitose. Além disso, são células com alta expressão constitucional de CD62L (L-Selectina) e de CCR2 (C-C chemokine receptor type 2), (TALLONE *et al.*, 2011). Monócitos intermediários apresentam atividade superior de processamento de antígenos e ativação de linfócitos, pois possuem maior expressão de MHC-II (major histocompatibility complex-II), além de maior capacidade angiogênica (HIJRA *et al.*, 2013). Monócitos não clássicos apresentam expressão diminuta de CCR2, porém possuem alta expressão de CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1), receptor da Fractalcina, quimiocina a qual respondem com migração. Eles também possuem capacidade de patrulhar os vasos sanguíneos, aderindo-se fortemente ao endotélio, principalmente através da molécula de superfície CD11a, “engatinhando” pelos vasos, mesmo contra o fluxo sanguíneo (CROS, 2010; LAURA J. APPLEBYA, NORMAN NAUSCHA, NICHOLAS MIDZIB; JUDITH E. ALLENA, 2013)

As funções e características fenotípicas em monócitos humanos foram observadas em outras espécies, sendo a mais estudada delas, o camundongo. Camundongos apresentam duas populações principais de monócitos: 1) Gr1⁺ ou monócitos clássicos possuem alta expressão de GR1⁺, CCR2 e CD62L, sendo associados em seus aspectos funcionais aos monócitos CD14⁺⁺CD16⁻; 2) Gr1⁻ ou monócitos não clássicos, não expressam CCR2 e CD62L, porém apresentam alta expressão de CX3CR1 e CD11a, assim como os monócitos CD14^{low}CD16⁺⁺

em humanos (TAYLOR; GORDON, 2003; ZIEGLER-HEITBROCK, L., 2014) com a mesma função de patrulhamento do endotélio (AUFFRAY *et al.*, 2007; CROS *et al.*, 2010).

A população de monócitos Gr1⁺ foi descrita como sendo maior e mais granulosa e de vida curta (um dia), e expressa esta molécula de superfície (Gr1) relacionada à diferenciação de neutrófilos e descrita há mais de 20 anos (K HESTDAL, F W RUSCETTI, J N IHLE, S E JACOBSEN, C M DUBOIS, W C KOPP, 1991). Esta molécula, sem uma função específica descrita, se mostra presente (alta expressão) em cerca de 50% da população de monócitos do sangue murinho (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003) e serve como diferencial entre as populações de monócitos (alta ou baixa expressão). Os monócitos Gr1⁺ têm sido relatados como participantes em processos inflamatórios como na aterosclerose (FUJISAWA *et al.*, 2017) e infarto (DUTTA; NAHRENDORF, 2015), bem como em processos infecciosos como na toxoplasmose (DUNAY *et al.*, 2008), na listeriose (SUNDERKOTTER *et al.*, 2004), febre do Nilo ocidental (*West Nile Virus*) (GETTS *et al.*, 2008; TERRY *et al.*, 2012), brucelose (*B. melitensis*) (K HESTDAL, F W RUSCETTI, J N IHLE, S E JACOBSEN, C M DUBOIS, W C KOPP, 1991) e leishmaniose (STRAUSS-AYALI; CONRAD; MOSSER, 2007). Por este motivo os monócitos Gr1⁺ têm sido chamados de “monócitos inflamatórios” e foram descritos como células com capacidade de diferenciação em macrófagos ou em células dendríticas, principalmente nas chamadas *Tip*-DCs (SERBINA *et al.*, 2008).

A segunda população de monócitos foi descrita como sendo menor e menos granulosa e apresenta meia vida mais longa, sendo denominada “não clássica” ou “monócito residente” em função de não apresentar características migratórias tão importantes durante inflamação e sim por migrar a tecidos não inflamados (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003). Mais recentemente, Auffray *et al.*, 2007 mostraram que estas células funcionam como “patrulheiros” dos vasos sanguíneos. O monócito Gr1⁻, utilizando-se do receptor de Fractalcina CX3CR1 e de LFA-1 (CD11a/CD18), é capaz de se manter aderido à superfície do endotélio, e até mesmo se movimentar contra o fluxo sanguíneo (CROS *et al.*, 2010). Desta maneira ele realiza o patrulhamento do vaso e em vista de um sinal de perigo, guiado por quimiotaxia, realiza a transmigração através do endotélio, atingindo antes que qualquer outra célula, como por exemplo, no local da infecção por *Listeria monocitogenes* (AUFFRAY *et al.*, 2007).

1.3. Leishmaniose cutânea: infecção por *Leishmania major*

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios principais distintos em seu ciclo de vida: um como promastigota flagelada, fusiforme e móvel, de vida extracelular no trato digestório do inseto vetor e outro como amastigota, forma imóvel e arredondada, de vida intracelular no hospedeiro mamífero (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). As formas promastigotas infectantes da *Leishmania* são liberadas pelo flebótomo vetor (*Lutzomyia* spp. e *Phlebotomus* spp.) dentro da pele do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo, essas são então fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente por macrófagos (LIU *et al.*, 2009). A fagocitose das promastigotas de *Leishmania* é dependente do receptor CR3, uma vez que os parasitos são opsonizados pelo componente C3bi do complemento, o que facilita a fagocitose e atua na inibição da explosão respiratória dos macrófagos, requerida para sobrevivência do parasito (GONÇALVES *et al.*, 2005; REINER, S. L.; LOCKSLEY, 1995; ROSENTHAL *et al.*, 1996). O sítio preferencial de proliferação das amastigotas são os fagolisosomos, que fornecem condições físico-químicas perfeitas para o parasito, com temperatura elevada e o baixo pH, dividindo-se por fissão binária (AFONSO, L. C.; SCOTT, 1993; ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999). Uma vez infectados, os macrófagos tornam-se inativos, não conseguindo responder a infecção (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

Modelos murinos infectados com *Leishmania major* (*L. major*) mostram uma variedade de respostas, desde auto resolução da infecção com desaparecimento da lesão em camundongos C57BL/6, até progressão da infecção com aumento do edema e necrose da região infectada em camundongos BALB/c, caracterizando linhagens de resistência e suscetibilidade a infecção, respectivamente (BEIL *et al.*, 1992; GONCALVES *et al.*, 2011; HOWARD; HALE; CHANLIEW, 1980). A resistência observada no modelo C57BL/6 vem sendo atribuída, de forma simplificada, à resposta de linfócitos Th1, devido à produção de IFN- γ (interferon-gamma) e TNF- α (tumor necrosis fator-alpha) por esses, mantendo o estímulo pró-inflamatório dos fagócitos que residem ou chegam à região da infecção (LAMOUR *et al.*, 2012; O'SHEA; PAUL, 2010). Durante a infecção, os queratinócitos de camundongos resistentes são induzidos rapidamente a produzirem fatores imunomoduladores, como interleucina-12 (IL-12), IL-1 β , IL-4 e grandes quantidades de interleucina-6 (IL-6) (EHRCHEN *et al.*, 2010). Em camundongos de linhagem suscetível, há baixa quantidade de IL-6 liberada pelos queratinócitos, o que também é associado à indução de um perfil Th2, com resposta humoral predominante e alta

produção de citocinas como IL-4 e interleucina-13 (IL-13) (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). Além da resposta epitelial, sabemos que é essencial para que haja resistência à infecção o reconhecimento e eliminação de antígenos de *Leishmania* por células dos linfonodos de drenagem, onde a produção de IL-12 por células dendrítica e macrófagos, induz a resposta Th1 através da liberação de IFN- γ por linfócitos TCD4 e por células Natural Killer (AFONSO, L. *et al.*, 1994), levando até mesmo à inibição da resposta Th2 em camundongos Balb/c, tornando-os mais resistentes à infecção por *L. major* (AFONSO, L. *et al.*, 1994; NABORS *et al.*, 1995)

A doença experimental murina, apresenta-se de forma muito semelhante à forma humana, onde em geral os pacientes resistentes apresentam uma lesão cutânea única que se cura em alguns meses após a infecção. Estes pacientes apresentam um perfil resistente caracterizado por forte produção de IFN- γ e TNF- α , resposta Th1, assim como acontece no camundongo C57BL/6 (BELKAID *et al.*, 2000; LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; SHIRIAN *et al.*, 2013).

1.4. Macrófagos

Macrófagos (M \emptyset) são fagócitos mononucleares e estão amplamente distribuídos por todo organismo nos diversos tecidos, e desempenham funções importantes no desenvolvimento e homeostase, além de participarem das respostas imunes, inata e adaptativa (ZHANG; GONCALVES; MOSSER, 2008). Reconhecem restos celulares, partículas inertes, microrganismos e parasitos, como primeira linha celular de defesa, tornam-se ativados após o reconhecimento de moléculas ativadoras, sejam elas de padrão molecular associado a patógenos (PAMPs) ou associado a danos teciduais (DAMPs), através de receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like receptor*) (DAVID M. MOSSER AND XIA ZHANG, 2008; JOUNAI *et al.*, 2013) ou NLR (NOD - *Like receptor*) (FRANCHI *et al.*, 2009). Respondem de acordo com o tecido onde estão, passando a apresentar características próprias para aquele local, como as células de Kupffer no fígado; células de Langerhans na pele; a micróglia no sistema nervoso central e os osteoclastos no tecido ósseo (EPELMAN; LAVINE; RANDOLPH, 2015).

Vem sendo descritas duas formas principais de populações de macrófagos, os chamados macrófagos M1 ou classicamente ativados (mediada por IFN- γ) e ou macrófagos M2 ou alternativamente ativados (mediada por interleucina-4 – IL-4), classificando os macrófagos em um aspecto linear (MILLS, C. D. *et al.*, 2000; MILLS, CHARLES D. *et al.*, 2017). Porém, evidências demonstraram que macrófagos apresentam um espectro amplo de ativações, com

diferenças bioquímicas, fisiológicas e genéticas. Mosser and Edwards (2008), discutem que estas células na verdade se apresentam em diferentes estados de ativação, e não de diferenciação, com grande plasticidade podendo formar inúmeras “subpopulações”. Inicialmente eles dividem estas células em pelo menos três tipos: 1) classicamente ativados - ativados por IFN- γ , com ação microbicida; 2) reparadores - ativados por IL-4, com ação de reparo tecidual; 3) regulatórios, ativados principalmente por IL-10 e complexo imune, com ação anti-inflamatória (MOSSER; EDWARDS, 2008).

1.5. Macrófagos Classicamente Ativados

Macrófagos classicamente ativados são ativados através da ação de dois sinais. O primeiro sinal é o preparador, sendo a citocina IFN- γ o melhor desses sinalizadores (GONÇALVES; MOSSER, 2015). Após reconhecimento do IFN- γ pelo seu receptor, IFN- γ R (interferon-gamma receptor), são ativados os fatores de transcrição STAT1/2 (*signal transducer and activator of transcription 1 / 2*) que se ligam a sequencias gama-ativadas em diversos genes imunes efetores. O segundo sinal, proveniente de um PAMP, induz a síntese de TNF- α , que possui função autócrina de estímulo ao macrófago, fazendo com que esse produza óxido nítrico (NO – *nitric oxide*), aumentando assim sua capacidade microbicida (HELD *et al.*, 1999; MURRAY, H. W., 1988; NATHAN, 1983). Em geral este é o estado de ativação esperado no caso de controle de agentes infecciosos intracelulares, como o parasito *Leishmania*.

1.6. Justificativa

Macrófagos classicamente ativados são capazes de matar parasitos do gênero *Leishmania*, através da liberação de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*), porém para que isso ocorra é necessário que o macrófago receba estímulos constantes de citocinas como IFN- γ e TNF- α , aumentando a produção de NO juntamente à taxa eliminação do parasito (DE SOUZA *et al.*, 2010; LAMOUR *et al.*, 2012). Esse estímulo pode ser atribuído principalmente às células *bystander*, como linfócitos residentes e vindos da circulação, sendo assim, a chegada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – *peripheral blood mononuclear cells*) é de suma importância para manutenção de níveis elevados de IFN- γ , por exemplo, no sítio da infecção, uma vez que os macrófagos infectados tem a expressão de IFN- γ R reduzida (JI; SUN; SOONG, 2003; KIMA; SOONG, 2013).

Sato *et al.* (2000) demonstraram que a infecção na orelha de camundongos C57BL/6 CCR2^{-/-} resulta em uma lesão muito maior, ou seja, os camundongos se tornariam susceptíveis, mesmo em um background resistente. Em resultados preliminares do nosso grupo, camundongos C57BL/6 deficientes para CCR2 (CCR2^{-/-}), infectados com *L. major* na pata, apresentaram lesão maior que os animais selvagens (WT- *wild type*) após a segunda semana de infecção, confirmando os dados de Sato *et al.* sobre a infecção na orelha. Sabemos que camundongos C57BL/6 WT resolvem a lesão, e são caracterizados como resistentes. Porém, nós e Sato *et al.* (2000) verificamos que a ausência de expressão de CCR2 resultou em aumento da susceptibilidade. Sendo assim, o que justificaria o aumento da lesão em camundongos deficientes em CCR2 (CCR2^{-/-}) Sato *et al.* (2000) creditaram este resultado à uma migração deficiente de células dendríticas e/ou células de Langherans, associado à um desbalanço Th1/Th2. Nossa hipótese, porém, é de que este fenômeno ocorra devido à uma falha de migração de monócitos inflamatórios, que expressam CCR2 e que são capazes de matar os parasitos como já demonstrado por nós anteriormente (Goncalves *et al.*, 2011). Isto porque em nossos resultados preliminares mostramos que além do aumento da lesão, camundongos CCR2^{-/-} não apresentaram monócitos Gr1⁺CCR2⁺ no local da infecção, verificado por citometria de fluxo (dados não publicados – Figura 1). Nossa hipótese sugere que a migração de monócitos Gr1⁺ está diretamente relacionada à resolução da infecção e o consequente desaparecimento da lesão.

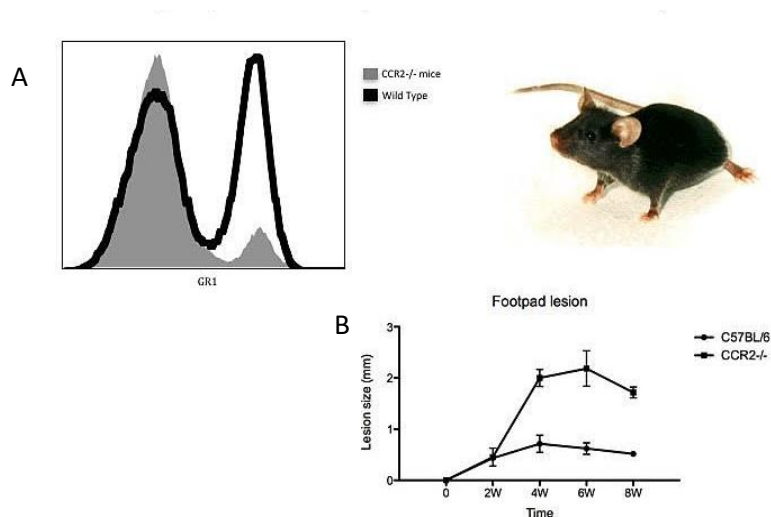


Figura 1: comparação da infecção por *L. major* em camundongos CCR2^{-/-} e selvagem. Em **A** histograma comparativo resultado de análise por citometria de fluxo, monócitos Gr1^{low} e Gr1^{high}; em **B** tamanho da lesão vs tempo.

Em trabalho publicado por nosso grupo, Gonçalves *et al.* (2011) demonstram que em camundongos, monócitos são as primeiras células do sangue periférico a chegarem no local de infecção por *L. major*, antes mesmo da chegada dos neutrófilos. Observaram também, que *in vitro*, monócitos matam promastigotas metacíclicas de *L. major* ainda livres no meio, sem a necessidade de realizarem fagocitose, através da liberação de ROS (Goncalves *et al.*, 2011). Logo, o papel do monócito como célula efetora, torna-se crucial, tanto no aparecimento das lesões cutâneas provocadas pela infecção por *L. major* quanto na resolução da infecção, relacionando os dois eventos à citotoxicidade dos monócitos Gr1⁺.

Além disso, sabemos que parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de inativar os macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como impedindo a sinalização JAK-STAT, atrapalhando assim a produção de NO e consequentemente a eliminação dos parasitos (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005).

Sendo assim, nossa hipótese é de que os macrófagos infectados são incapazes de controlar a infecção por *Leishmania major* em camundongos, mesmo em um ambiente rico em IFN- γ . E o verdadeiro responsável pelo controle da infecção são monócitos inflamatórios ativados, capazes de matar a *Leishmania*, como demonstrado por Goncalves *et al.*, 2011.

Assim, compreender os mecanismos envolvidos na resistência à infecção por *L. major*, através dos mecanismos e funções desempenhadas por duas das principais células de defesa do sistema inato, monócitos e macrófagos, é essencial para que se proponham novos tratamentos ou intervenções que visem o controle da doença no homem.

2. OBJETIVO

Avaliar e descrever o papel dos monócitos murinos na cinética de formação e resolução da lesão e infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6, bem como a interação desses monócitos com macrófagos infectados por *L. major*.

2.1. Objetivos específicos

1) Avaliar a resposta *in vitro* de macrófagos infectados por *L. major* em diferentes tempos de tratamento com IFN- γ .

2) Avaliar a interação *in vitro* de monócitos do sangue periférico e de suas subpopulações com macrófagos infectados por *L. major*.

3) Avaliar o papel dos monócitos na resolução da infecção por *L. major* em camundongos C57BL/6 CCR2^{-/-}, através da transferência adotiva de células da medula óssea provenientes de C57BL/6 selvagens (WT).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comissão de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), sobre os protocolos registrados de números 160/2015 (Anexo 2) e 386/2016 (Anexo 3).

3.2. Cultivo dos parasitos

Formas amastigotas foram isoladas da lesão da pata de camundongos BALB/c infectados por *L. major* da cepa *Friedlin* (MHOM/IL/1980/FN) e cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura celular contendo meio 199 e *Schneider's insect medium* (1:1), suplementados com 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. As garrafas foram acondicionadas em incubadora com temperatura controlada em 25°C.

3.3. Cultivo de macrófagos derivados da medula óssea

O cultivo de macrófagos de medula foi realizado de acordo com Goncalves & Mosser (2015). Brevemente, medula óssea do fêmur e tíbia foi extraída de camundongos C57BL/6 WT, saudáveis. A extração foi realizada em capela de fluxo laminar e as células lavadas em tampão fosfato-salino 10% (PBS - *phosphate buffered saline*), a 4°C, suplementado com 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina. As células foram então centrifugadas e suspensas em meio *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FCS – *fetal calf serum*), 50 IU/ml de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina e 20% de sobrenadante de cultura de fibroblastos L292 contendo fator estimulador de colônia (M-CSF – *macrophage colony stimulating fator*), necessário para diferenciação das células precursoras da medula em macrófagos. As células foram cultivadas em placas de Petri para cultivo, mantidas em incubadora a 37°C, CO₂ a 5% e umidade a 72%, durante oito dias. Após a diferenciação, os macrófagos foram centrifugados, suspensos em meio DMEM completo (na ausência de L929), sua viabilidade avaliada pelo azul de Tripán e a concentração acertada em 5x10⁵ macrófagos por 100 µL.

3.4. Separação de monócitos do sangue periférico

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados com inalação de Isoflurano por 30 segundos, em seguida, o sangue foi completamente coletado por exérese do globo ocular (HOFF, 2000) em tubos com EDTA-K3. Após a exsanguinação terminal, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Monócitos e linfócitos foram separados através de gradiente de *Ficoll* 1.077 g/mL, onde um anel de PBMC foi formado após centrifugação. PBMC foram então marcadas com anticorpo anti-F4/80 conjugado com o fluorocromo ficoeritrina (PE – *phycoerythrin*), em seguida foram separados por *beads* magnéticas anti-PE em colunas de depleção, por seleção positiva, seguindo o protocolo do fabricante (MACS[®] *Cell Separation Kit*).

3.5. Separação de subpopulações de monócitos murinos e comparação da morfologia nuclear dos monócitos clássicos e não clássicos

Para avaliação morfológica das subpopulações de monócitos, linfócitos e monócitos foram separados através de gradiente de *Ficoll* 1.077 g/mL. Após lavagem com PBS 1x e centrifugação da amostra, o *pellet* foi suspenso em PBS 1x suplementado com soro albumina bovina (BSA – *bovine serum albumin*) 0,2% e marcado com os anticorpos anti-F4/80, anti-CD11b e anti-Gr1. Após incubação em gelo por 20 minutos a amostra foi lavada em PBS 1x, centrifugada e levada para separação no citômetro BD FACSAria[™] *Fusion*. Os monócitos foram separados como células F4/80⁺CD11b⁺Gr1⁺ e F4/80⁺CD11b⁺Gr1⁻. Após coleta, as células foram levadas para incubadora a 37°C, CO₂ a 5% e umidade a 72%, por 2h para que essas aderissem à lamínula circular de 13 mm. Uma vez aderida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol gelado e coradas em Panótico Rápido. As amostras foram levadas para análise em microscópio ótico de luz.

3.6. Avaliação morfológica dos núcleos das subpopulações de monócitos humanos

O mesmo procedimento de isolamento de monócitos foi adotado para monócitos humanos, onde células do PBMC foram marcadas com anticorpos anti-CD11b, anti-CD14, anti-CD16 e anti-CD66b. Após exclusão de células CD66b positivas para evitar contaminação com neutrófilos, os monócitos foram separados em suas três populações: monócitos clássicos,

CD14⁺⁺CD16⁻; monócitos intermediários, CD14⁺⁺CD16⁺⁺ e monócitos não clássicos, CD14^{low}CD16⁺⁺. Após coleta, as células foram levadas para incubadora a 37°C, CO₂ a 5% e umidade a 72%, por 2h para que essas aderissem à lamínula circular de 13 mm. Uma vez aderida, as células foram lavadas com PBS 1x, fixadas com metanol gelado e coradas em Panótico Rápido. As amostras foram levadas para análise em microscópio ótico de luz.

3.7. Análise de proteínas nucleares

Após passarem pelo mesmo processo de separação por *sorting* e aderência à lamínula circular, monócitos murinos foram marcados por Hoechst para visualização da morfologia nuclear e anticorpos anti-F4/80, anti-lâmina B *Alexa Flour* 488 (proteína do envelope nuclear); anti-fibrilarina *Alexa Flour* 647 (proteína nucleolar). As lâminas foram montadas após incubação e analisadas por microscopia confocal.

3.8. Estímulo e infecção dos macrófagos

Seguiu-se o protocolo conforme descrito em Mosser & Goncalves (2015). Os macrófagos foram distribuídos em placas de 24 poços sobre lamínulas circulares estéreis de 13 mm, onde foram feitas “bolhas” de 100 µL do meio contendo 5x10⁵ macrófagos. A placa foi mantida na incubadora por duas horas, até que houvesse a completa aderência dos macrófagos à lamínula. Em seguida 100:1 promastigotas de *L. major* foram adicionadas aos macrófagos, com 5% de soro de camundongo não infectado. A interação para todos os grupos foi mantida por 24h, para que houvesse fagocitose das promastigotas e sua diferenciação em amastigotas, estabelecendo a infecção. Após as 24h, os poços foram lavados com DMEM completo e os estímulos adicionados de acordo com o grupo experimental.

3.8.1 Ensaio de sobrevivência (*survival*)

Macrófagos de medula foram cultivados em lamínula de vidro redonda, em placas de 24 poços e tratados com diferentes citocinas, antes da infecção por *L. major*. Os seguintes grupos foram testados:

1) Grupo macrófagos sem estímulos + *Leishmania* (*L. major-infect.MØ*): macrófagos infectados, não tratados;

2) Grupo macrófagos + *Leishmania* + IFN- γ (IFN- γ *post-infection*): macrófagos infectados e posteriormente tratados com IFN- γ *overnight*;

3) Grupo macrófagos + IFN- γ + *Leishmania* (IFN- γ -*primed* MØ): macrófagos foram primados com IFN- γ *overnight* (16h) antes da infecção por *L. major*.

4) Grupo macrófagos + IL-10 + IFN- γ (IL-10-*primed* MØ+IFN- γ): macrófagos foram primados com IL-10 por três horas + IFN- γ *overnight* antes da infecção por *L. major*.

5) Grupo macrófagos + TNF- α + IL-10 + IFN- γ (TNF- α -*primed* MØ+IFN- γ): macrófagos foram primados com TNF- α por três horas + IL-10 por três horas + IFN- γ *overnight* (16h), antes da infecção por *L. major*.

Citocinas:

- IFN- γ recombinante (rIFN- γ): 250UI/mL
- IL-10 recombinante (rIL-10): 10ng/mL
- TNF- α recombinante (rTNF- α): 30ng/mL

Após o período *overnight* com as citocinas, foram adicionadas promastigotas de *Leishmania* na proporção 100:1 macrófago e mantidas por 30 minutos na presença de complemento (5% de soro de camundongo não infectado). As lamínulas foram lavadas para retirar possíveis parasitos não aderidos ou não fagocitados e as células foram mantidas por mais 90 minutos para internalização dos parasitos aderidos. Os grupos foram então mantidos por 24h em estufa de CO₂ a 37°C. Vinte e quatro horas depois o meio foi trocado e adicionado novo meio com as mesmas citocinas relativas a cada grupo.

A placa contendo todos os grupos foi mantida em estufa de CO₂ a 37°C por mais 48h, totalizando 72h de experimento. Ao final do experimento, o meio foi retirado de cada poço e as placas lavadas com PBS. Foi adicionado 300 μ L de metanol gelado e mantido por 10 minutos na geladeira para fixação e permeabilização das células. As amastigotas de *Leishmania* foram coradas utilizando-se soro de camundongo infectado como anticorpo primário por 30 minutos, seguido de exaustiva lavagem com PBS gelado e adição de anticorpo secundário *anti-mouse* IgG-FITC. Os núcleos das células foram corados com iodeto de propídio (IP) por 30 segundos e em seguida as amostras foram lavadas exaustivamente com PBS.

As lâminas foram montadas com solução de Mowiol e levadas para captura em microscópio de fluorescência Zeiss Axio Observer *Inverted*.

3.8.2 Grupos experimentais: interação com monócitos

Os macrófagos foram divididos em cinco grupos distintos: 1) *L. major-infect.MØ*, composto por macrófagos infectados por *L. major*, que não sofreram nenhum tratamento; 2) *IFN- γ -primed.MØ*, composto por macrófagos que receberam o estímulo com 100 UI/mL de IFN- γ durante uma hora antes da infecção; 3) *IFN- γ +Leish-infect.MØ*, composto por macrófagos estimulados com 100 UI/mL de IFN- γ , no momento da infecção, juntamente com a adição das promastigotas; 4) *IFN- γ -post-infection*, composto por macrófagos tratados com 100 UI/mL de IFN- γ após a infecção; 5) *IFN- γ -primed.Mo*, composto por macrófagos tratados com monócitos primados com 100 UI/mL de IFN- γ . Os monócitos do grupo “5” foram primados por uma hora com 100 UI/mL de IFN- γ em incubadora a 37°C, em seguida lavados com DMEM completo, centrifugados, suspensos em DMEM completo e distribuídos na proporção de 2:1 macrófago.

O tempo de estímulo deu-se da seguinte forma: após a infecção, na primeira placa (Placa 2h), todos os grupos receberam seus estímulos e permaneceram incubados por duas horas e então todos os grupos tiveram suas células fixadas com metanol gelado; na segunda placa (Placa 24h) todos os grupos receberam seus estímulos após a infecção, permanecendo incubados por 24h, seguidos da fixação; na terceira placa (Placa 48h) todos os grupos receberam os seus respectivos estímulos após infecção, os estímulos foram repetidos 24h depois, até a fixação das células.

3.9. Montagem das lâminas e avaliações realizadas

Após a fixação as lamínulas foram coradas com Panótico Rápido e montadas em lâminas para microscopia. As amastigotas foram contadas, em campos aleatórios, dentro de 100 macrófagos de cada grupo com auxílio de um microscópio ótico de luz em aumento de 1000x. Determinamos também a frequência de macrófagos não infectados e as comparamos entre os grupos e tempos.

A prevalência da subpopulação de monócitos aderidos a macrófagos infectados também foi determinada, utilizando a morfologia nuclear dos monócitos.

3.10. Transferência adotiva de células da medula óssea

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados com Xilazina (10mg/Kg) e Cetamina (100mg/Kg) via intraperitoneal e eutanasiados por deslocamento cervical. Os ossos, fêmur e tíbia, foram retirados e suas epífises removidas, em seguida foram lavados com PBS estéril gelado e suplementado com 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, com auxílio de seringa agulhada, até retirada do conteúdo da medula. Após retirada da medula, as células foram suspensas em 50mL do PBS e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas novamente com PBS e a suspensão de células da medula óssea foi filtrada em *cell strainer* de 70µm, para que fosse evitada uma possível obstrução de vasos, que poderiam levar o camundongo a morte.

Os camundongos tratados receberam por via intravenosa o volume de 150 µL da suspensão, contendo 5×10^6 células, como tratamento da infecção por *L. major*. E ambos os grupos, tratados e não tratados, foram juntamente infectados na região plantar da pata esquerda traseira, com injeção intradérmica de 2×10^6 parasitos em 10 µL de suspensão.

Os grupos contaram com n=6 e foram divididos da seguinte forma para as variáveis acima:

- Grupo 1: C57BL/6 WT infectados (C57BL/6 WT);
- Grupo 2: C57BL/6 WT infectados e tratados (C57BL/6 WT Tr);
- Grupo 3: C57BL/6 CCR2^{-/-} infectados (C57BL/6 CCR2^{-/-});
- Grupo 4: C57BL/6 CCR2^{-/-} infectados e tratados (C57BL/6 CCR2^{-/-}Tr).

Foi realizada medida, uma vez por semana, da lesão na pata (tamanho do edema) com medidor de espessura digital, durante 10 semanas e o valor para análise calculado com base na diferença da medida obtida da pata oposta saudável.

3.11. Análise estatística

Após realização de teste de normalidade, foi empregado na análise teste não paramétrico e não pareado, o teste Mann-Whitney. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional *GraphPad Prism 5.0* adotando um nível de significância de 95%.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia nuclear de monócitos murinos

Durante nossas análises, observamos uma característica importante dos monócitos. Monócitos Gr1⁺, clássicos, apresentam núcleo de coloração mais basofílica quando comparados aos monócitos Gr1⁻. O formato do núcleo também se difere entre as duas populações, onde os Gr1⁺ apresentam núcleo em forma de casco de boi e os monócitos Gr1⁻, não clássicos, apresentaram núcleo em forma de rim (Figura 2). Há desta forma uma associação entre fenótipo e morfologia nuclear.

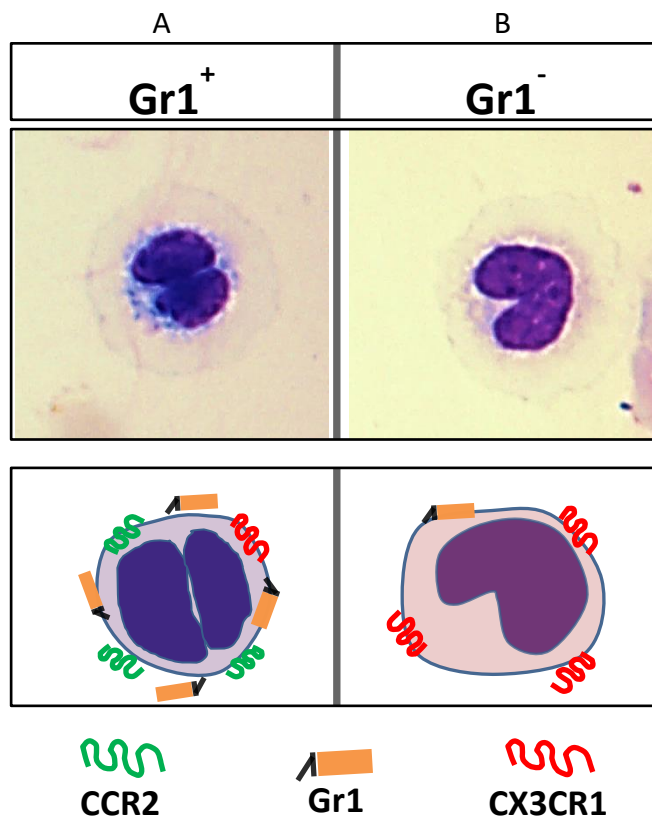


Figura 2: morfologia nuclear de monócitos murinos Gr1⁺ e Gr1⁻, 1000x. Monócitos Gr1⁺ e Gr1⁻ foram isolados por *cell sorting flow cytometry* e aderidos a lamínulas de vidro. Em **A** vemos monócito **Gr1⁺** apresentando núcleo mais basofílico em forma de casco de boi; em **B** monócito **Gr1⁻** apresentando núcleo menos basofílico em formato de rim.

Na tentativa de se observar se tal achado poderia ser conservado entre as espécies, realizamos a análise morfológica do núcleo de monócitos humanos.

4.2. Monócitos humanos

Assim como em camundongos, os monócitos clássicos humanos ($CD14^{++}CD16^{-}$) apresentaram núcleo mais basofílico e em forma de casco de boi, enquanto monócitos não clássicos ($CD14^{low}CD16^{++}$) apresentaram núcleo menos basofílico e em formato de rim. Os monócitos intermediários ($CD14^{++}CD16^{++}$) apresentaram morfologia variada, com células de núcleos iguais aos das populações clássica e não clássica, além de outros formatos, como núcleos com silhueta de borboleta (Figura 3).

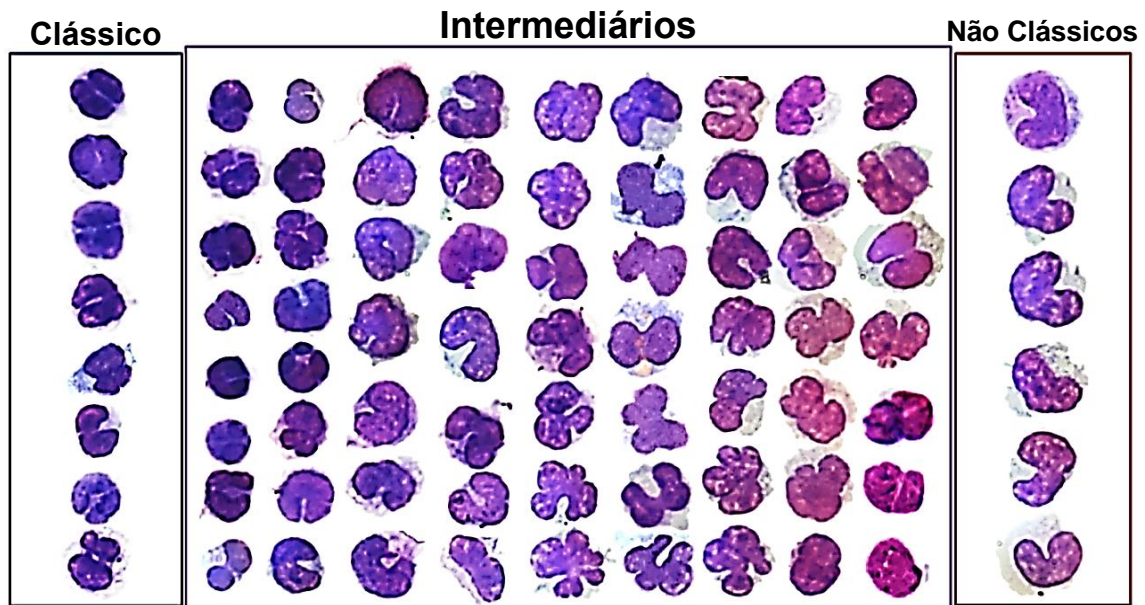


Figura 3: morfologia nuclear de monócitos humanos. Monócitos humanos foram separados por citometria de fluxo e aderidos a lamínulas de vidro. A coluna da extrema esquerda mostra monócitos clássicos com núcleo mais basofílico e formato de casco de boi; as colunas centrais mostram monócitos intermediários com núcleos de coloração e morfologia diversificada; a coluna da extrema direita mostra monócitos não clássicos com núcleos menos basofílicos que os clássicos e apresentam formato de rim.

4.3. Proteínas nucleares

As células cujas imagens foram analisadas expressavam F4/80, confirmando se tratarem de monócitos. A marcação por Hoechst, em azul, nos permitiu a diferenciação das subpopulações pelo formato do núcleo. Observamos que monócitos Gr1⁺, núcleo em forma de casco de boi, aprestaram deposição de lâmina B com invaginação central, acompanhando o formato dos lóbulos nucleares, onde a cromatina é mais condensada. Apresentam também dois nucléolos, paralelos em cada lóbulo, representados pela expressão de fibrilarina (Figura 4A). Monócitos Gr1⁻, núcleo em forma de rim, apresentam deposição menos intensa de lâmina B com pequenas invaginações que também ocorrem em locais em que a cromatina apresenta pontos de condensação, entretanto, esses apresentam seis nucléolos (Figura 4B).

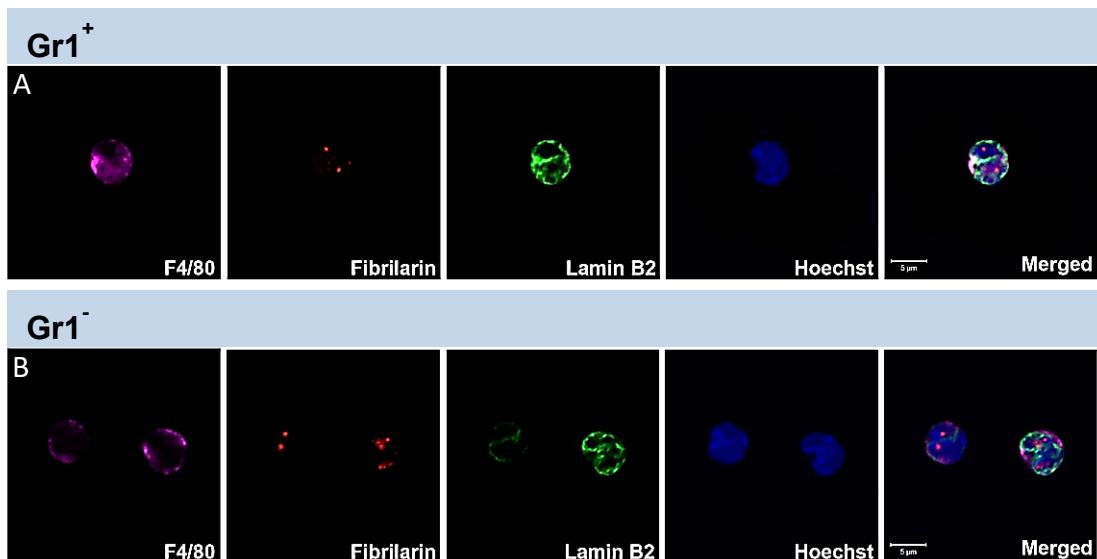


Figura 4: avaliação de proteínas nucleares por microscopia confocal, 600x. Em **A**, monócito Gr1⁺; em **B**, monócito Gr1⁻.

4.4. Survival

Muitos estudos demonstram o efeito inibitório que a *Leishmania* gera nos macrófagos que infecta. Isto ocorre principalmente através da inibição da produção de NO ou ROS (REINER, N. E. *et al.*, 1990), mas também indiretamente pela inibição na formação de uma

resposta imune efetora, como por exemplo inibindo-se a produção de citocinas (REINER, N. E. *et al.*, 1990) ou a apresentação de antígenos (REINER, N. E.; NG; MCMASTER, 1987).

O experimento de sobrevivência, teve como objetivo determinar diferenças na capacidade dos macrófagos de medula, em matar *Leishmania* após diferentes estímulos.

Sob os estímulos de diferentes citocinas observamos que a capacidade de eliminação de *Leishmania* (*killing*) é diretamente dependente do momento em que é aplicada e do tipo de citocina envolvida. O grupo de macrófagos, que recebeu apenas *Leishmania*, mostrou-se incapaz de reduzir o parasitismo, apresentando várias formas amastigotas no citoplasma após 72h de infecção (Figura 5A-B), o mesmo foi observado para o grupo tratado com IFN- γ após a infecção (Figura 5C). Macrófagos primados com IFN- γ apresentam menos amastigotas em seu citoplasma, demonstrando capacidade de controle do parasitismo (Figura 5D), porém, macrófagos primados com IL-10 3h antes do IFN- γ apresentaram resultado igual ao grupo controle (Figura 5E). O grupo primado com TNF- α e após a infecção, estimulado com IFN- γ , demonstrou capacidade de *killing* semelhante ao grupo primado com IFN- γ , mesmo recebendo, antes do IFN- γ , estímulo por IL-10. (Figura 5F).

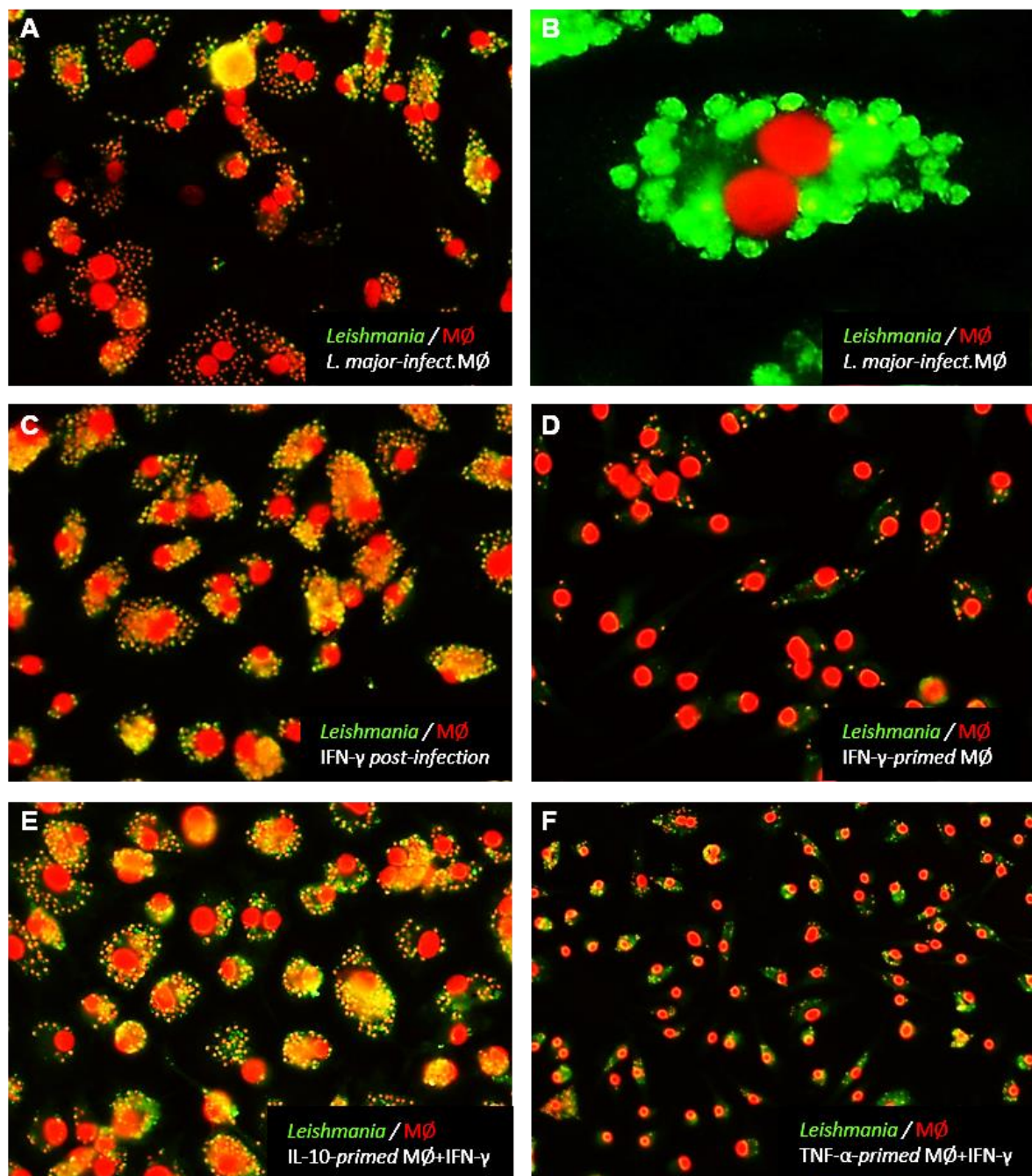


Figura 5: micrografia de imunofluorescência: em verde (FITC), formas amastigotas de *L. major* e em vermelho (IP), núcleos. Em **A** e **B** macrófagos do grupo *L. major*-infect.MØ (sem estímulo), aumentos de 400x e 1000x, respectivamente; Em **C**, macrófagos do grupo IFN- γ post-infection; Em **D**, macrófagos do grupo IFN- γ -primed MØ; Em **E**, macrófagos do grupo IL-10-primed MØ +IFN- γ ; Em **F**, macrófagos do grupo TNF- α -primed MØ+ IL-10 + IFN- γ .

4.5. Macrófagos e monócitos na eliminação de *L. major*

4.5.1. Duas horas (2h) de tratamento

Nossos resultados com macrófagos estimulados *in vitro* demonstraram que a simples presença de IFN- γ após a infecção, não é capaz de matar os parasitos. Este resultado torna difícil explicar como ocorre o controle da *Leishmania* em um camundongo resistente, visto que os macrófagos infectados se tornam refratários ao IFN- γ . Assim, resolvemos testar nossa hipótese, de que seriam os monócitos os responsáveis pela eliminação do parasito. Macrófagos foram então infectados *in vitro* e diferentes estímulos testados no controle ao parasito, incluindo-se agora a adição de monócitos às culturas. A capacidade de eliminação de parasitos *L. major* foi comparada entre os grupos após 2h de estímulo. Observamos que todos os grupos estimulados com IFN- γ e o grupo estimulado com monócitos ativados tiveram redução do número de amastigotas no citoplasma dos macrófagos. Quando comparamos os grupos estimulados ao grupo controle (*L. major-infect.MØ*), todos apresentaram parasitismo significativamente menor (Figura 6).

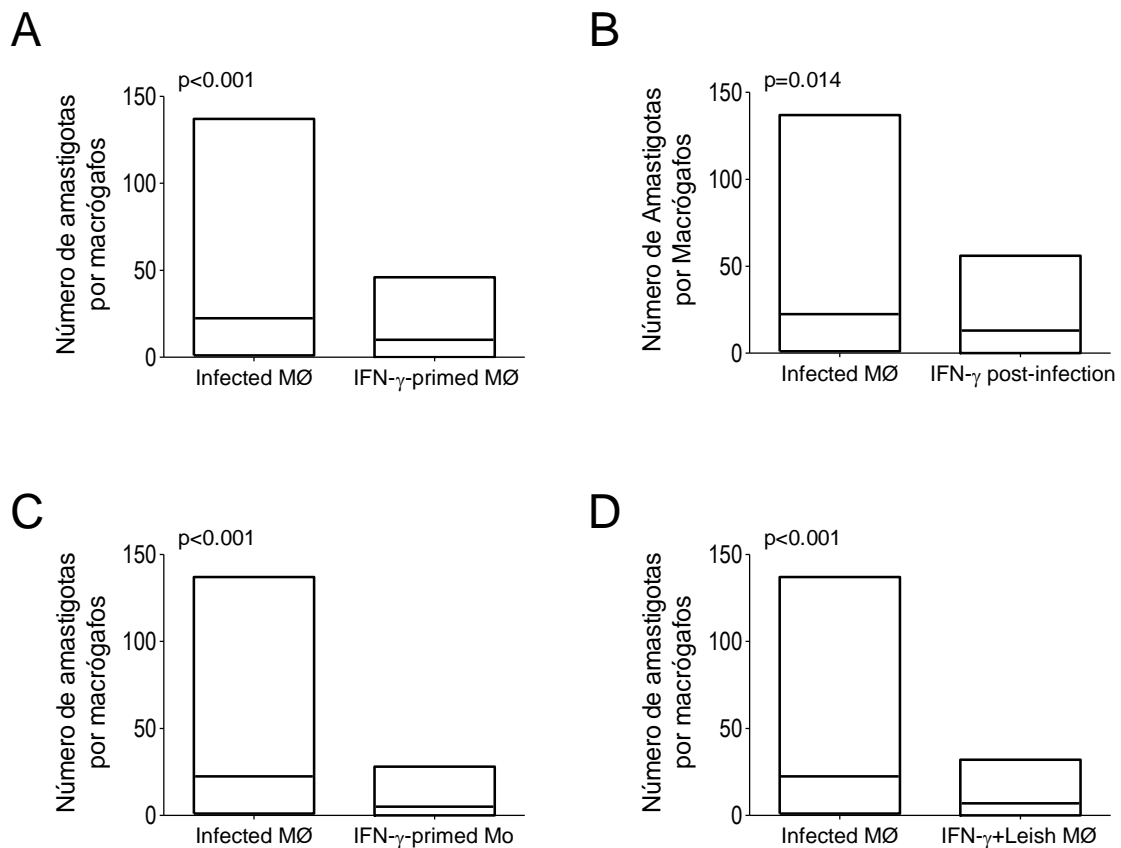


Figura 6: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major*-infect.MØ) e os grupos tratados. Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos/macrófago que o grupo IFN- γ -primed MØ; em **B**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ post-infection; em **C**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ; em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo.

Quando comparamos os grupos tratados, observamos que o grupo “IFN- γ -primed MØ” apresentou menor quantidade de amastigotas/macrófago que o grupo “IFN- γ post-infection” (Figura 7A). O grupo “IFN- γ post-infection” apresentou a menor taxa de eliminação de parasitos entre todos os grupos tratados (Figura 7A, D-E).

Os grupos “*IFN- γ +Leish-infect.M \emptyset* ” e “*IFN- γ -primed Mo*” foram os que apresentaram a maior capacidade de eliminação de *L. major* (Figura 7B, C-E), no entanto, quando comparados entre eles o grupo “*IFN- γ -primed Mo*” apresentou menor quantidade de amastigotas por macrófagos (Figura 7F).

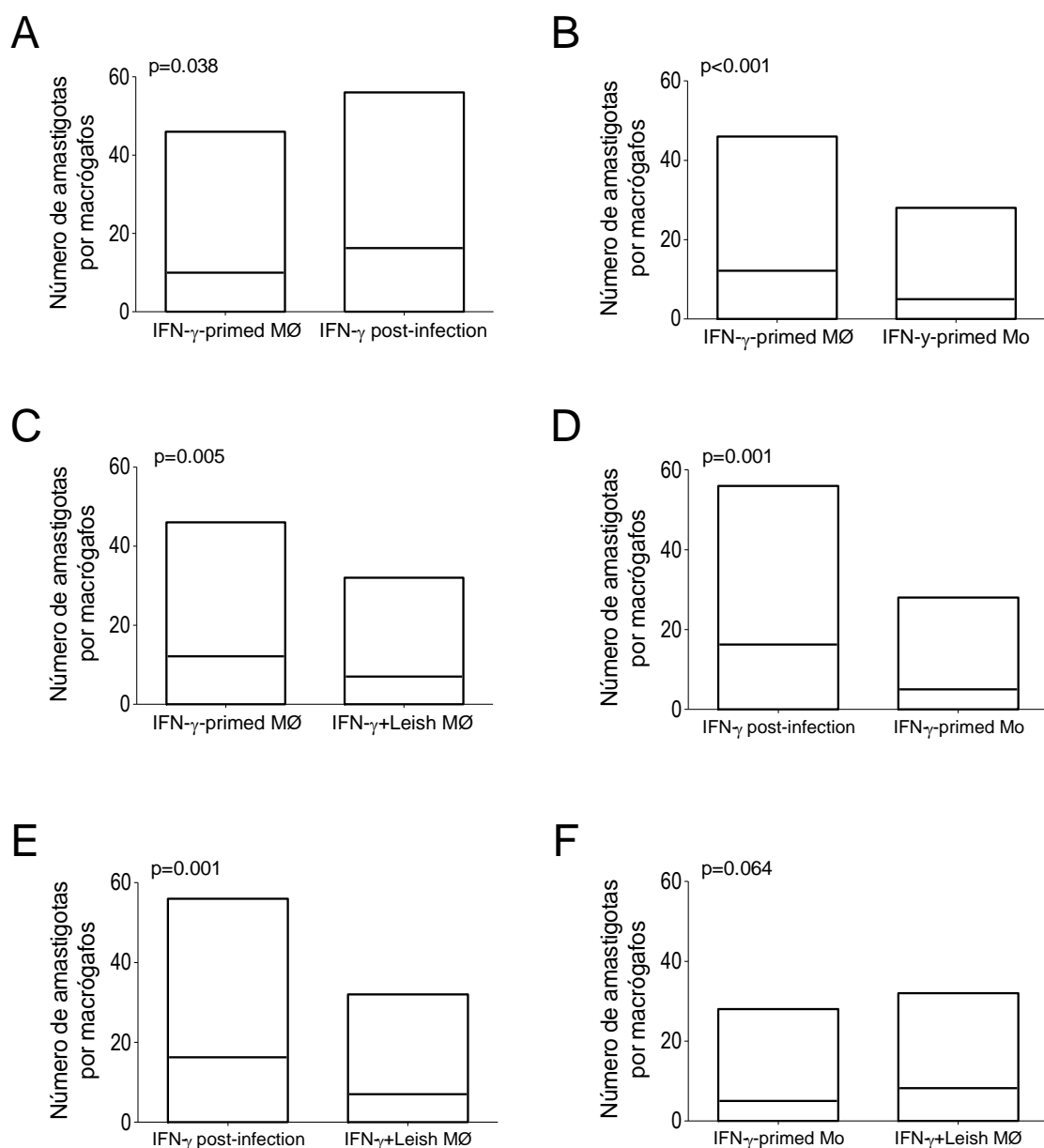


Figura 7: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (2h). Em **A**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta menor quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ post-infection; em **B**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ; em **C**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **D**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **E**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ; em **F**, grupo IFN- γ -primed Mo e IFN- γ +Leish-infect.MØ, não apresentam diferença.

4.5.2. 24h de tratamento

Com 24h de estímulo, os grupos tratados ainda apresentam menor quantidade de parasito que o grupo controle (Figura 8).

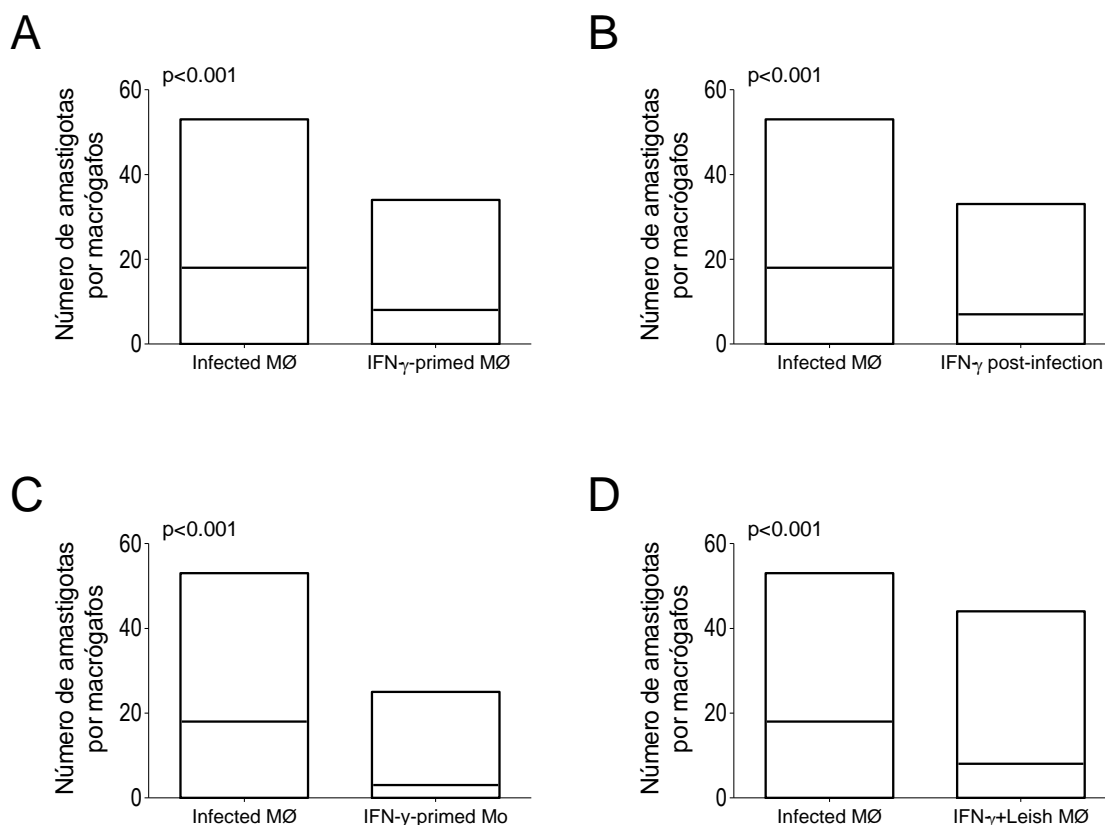


Figura 8: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major-infect. MØ*) e os grupos tratados (24h). Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed MØ; em **B**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ post-infection; em **C**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ; em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo.

Porém os grupos “IFN- γ -primed MØ”, “IFN- γ +Leish-infect.MØ” e “IFN- γ post-infection” passam a apresentar a mesma capacidade de eliminar parasitos (Figura 9A-B e E), sendo que o grupo tratado com monócitos, “IFN- γ -primed Mo”, passou a eliminar mais parasitos que o grupo “IFN- γ +Leish-infect.MØ” e os demais grupos tratados com IFN- γ .

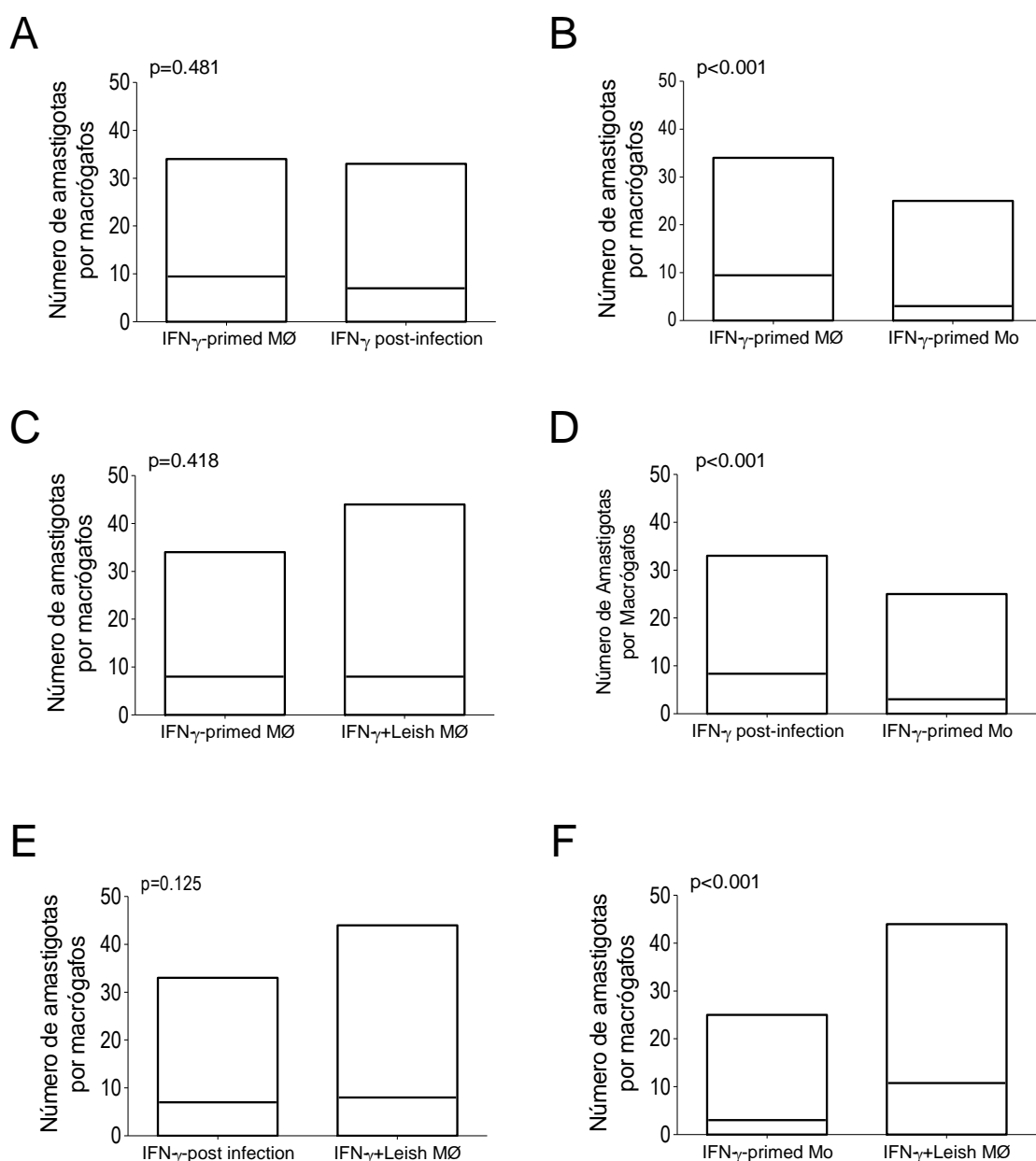


Figura 9: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (24h). Em **A**, grupo IFN- γ -primed MØ e IFN- γ post-infection não se diferenciam; em **B**, grupo IFN- γ -primed MØ e IFN- γ +Leish-infect.MØ não se diferenciam; em **C**, grupo IFN- γ -primed MØ apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **D**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **E**, grupo IFN- γ post-infection e IFN- γ +Leish-infect.MØ não se diferenciam; em **F**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menos amastigotas em macrófagos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ.

4.5.3. 48h de tratamento

Às 48h de estímulo, o grupo “IFN- γ *post-infection*” reduz sua taxa de eliminação, não apresentando diferença do grupo controle (Figura 10B).

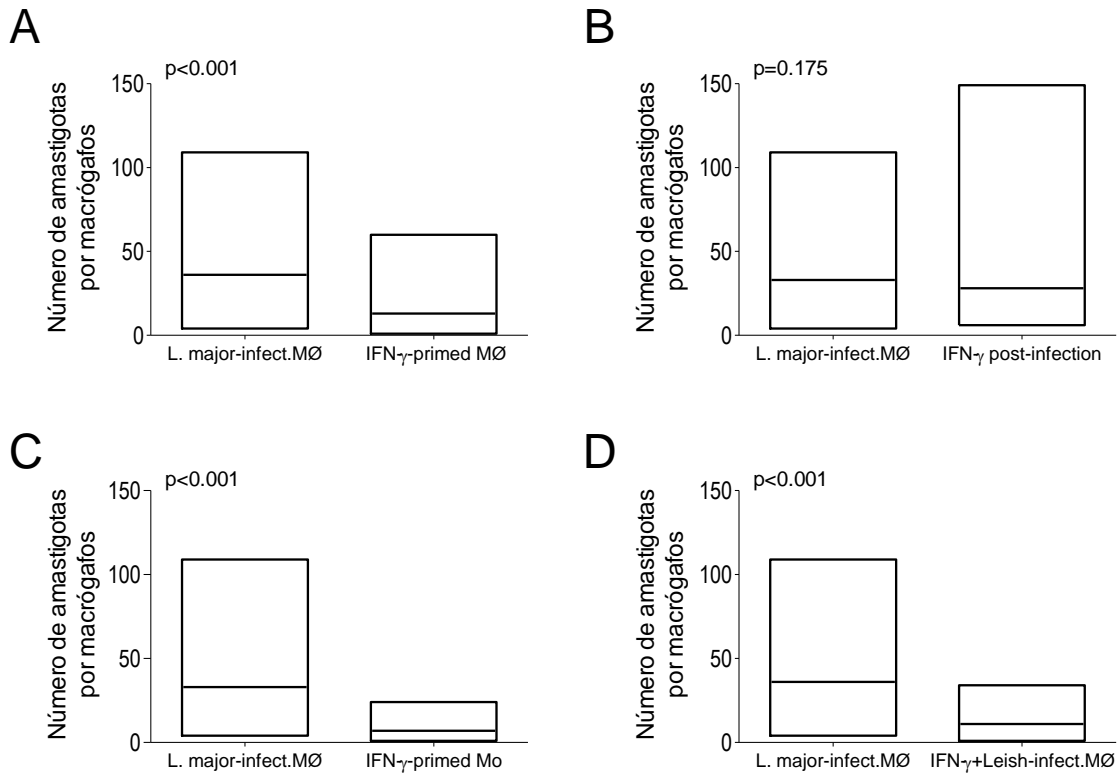


Figura 10: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre o grupo controle (*L. major-infect.MØ*) e os grupos tratados (48h). Em **A**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed MØ*; em **B**, grupo controle e IFN- γ *post-infection* não se diferem; em **C**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +*Leish-infect.MØ*; em **D**, grupo controle apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -*primed Mo*.

Os outros grupos tratados passam a diferenciar-se tanto do grupo “*L. major-infect. MØ*”, quanto do grupo “IFN- γ *post-infection*”, apresentando maior capacidade de eliminação dos parasitos (Figura 11A, D-E).

O grupo “IFN- γ +*Leish-infect.MØ*” e “IFN- γ -*primed Mo*” continuam a ter a maior taxa leishmanicida quando comparados aos grupos “IFN- γ -*primed MØ*” e “IFN- γ *post-infection*” (Figura 11B-E), enquanto “IFN- γ -*primed Mo*” permanece com maior capacidade de eliminação

em relação a “IFN- γ +*Leish-infect.MØ*” (Figura 11F). Destacamos assim, a permanência do grupo tratado com monócitos em apresentar maior capacidade leishmanicida em relação os grupos tratados com IFN- γ , mesmo após 48h de infecção.

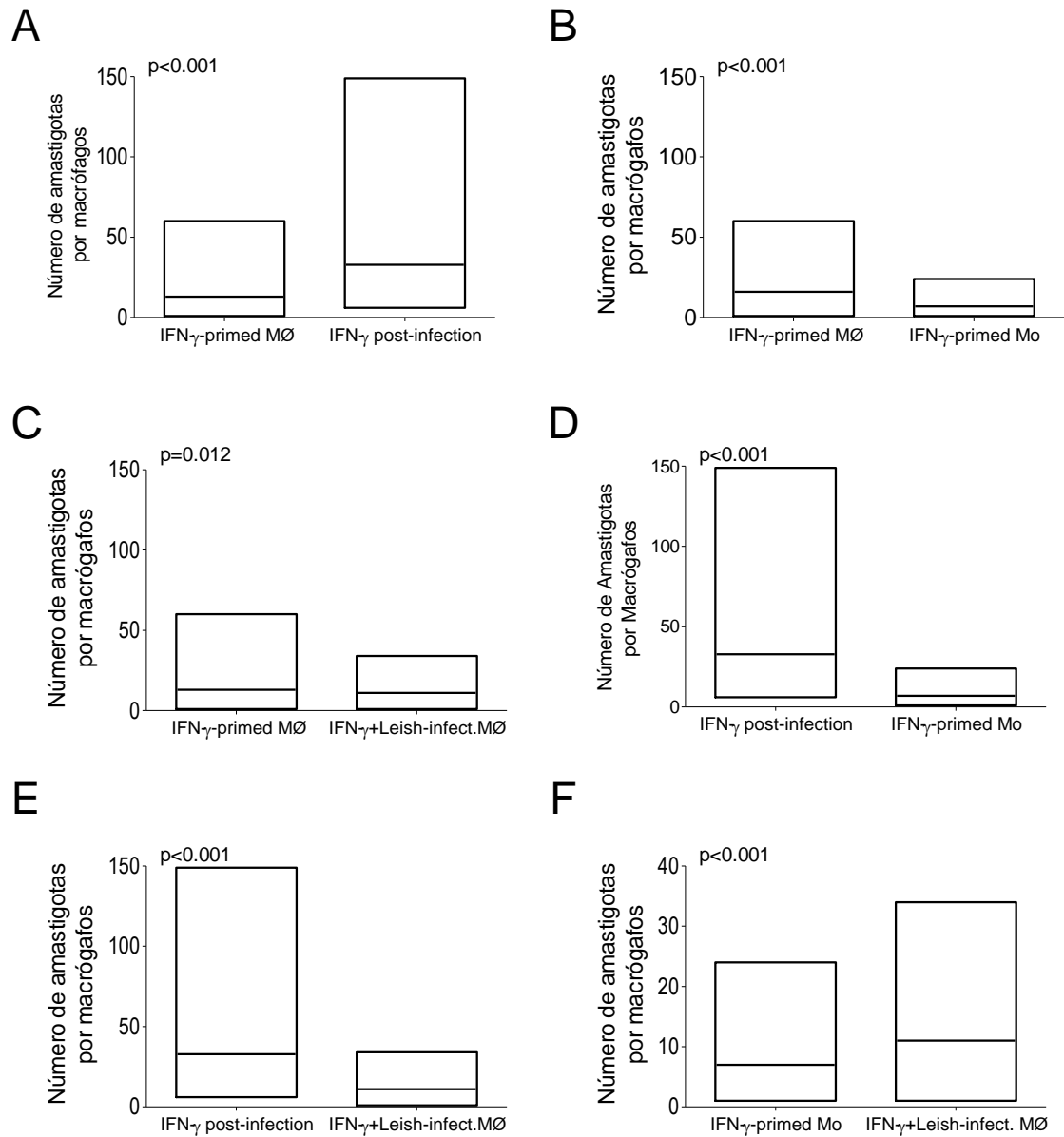


Figura 11: comparação do número de amastigotas/macrófagos entre os grupos tratados (48h). Em **A**, grupo IFN- γ -primed M \emptyset apresenta menor quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ post-infection; em **B**, grupo IFN- γ -primed M \emptyset apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.M \emptyset ; em **C**, grupo IFN- γ -primed M \emptyset apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **D**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ -primed Mo; em **E**, grupo IFN- γ post-infection apresenta maior quantidade de parasitos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.M \emptyset ; em **F**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menos amastigotas em macrófagos que o grupo IFN- γ +Leish-infect.M \emptyset .

4.5.4. Frequência de macrófagos não infectados por grupo

O grupo “IFN- γ -primed Mo” apresentou maior frequência de macrófagos não infectados em relação aos outros grupos tratados. Tanto para o tempo de 2h (Figura 12), quanto para o de 24h de estímulos (Figura 13). Todos os grupos tratados tiveram frequência maior de macrófagos não infectados que o grupo controle. Porém após 48h de infecção todos os macrófagos contados apresentaram ao menos uma amastigota em seu interior, não havendo assim macrófagos não infectados em nenhum dos grupos testados.

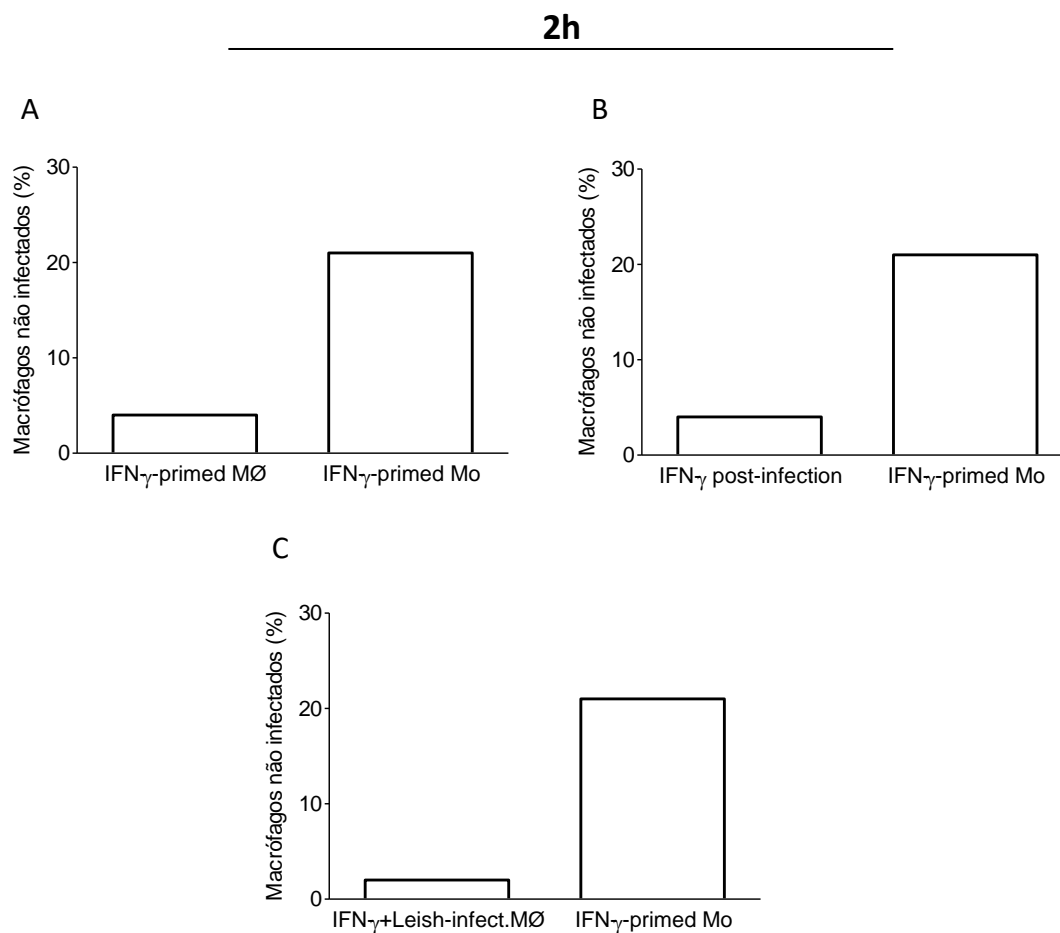


Figura 12: frequência relativa de macrófagos não infectados após 2h de estímulos. Comparação entre os grupos tratados. Em **A**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ -primed MØ; em **B**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ post-infection; em **C**, grupo IFN- γ -primed Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ +Leish-infect.MØ.

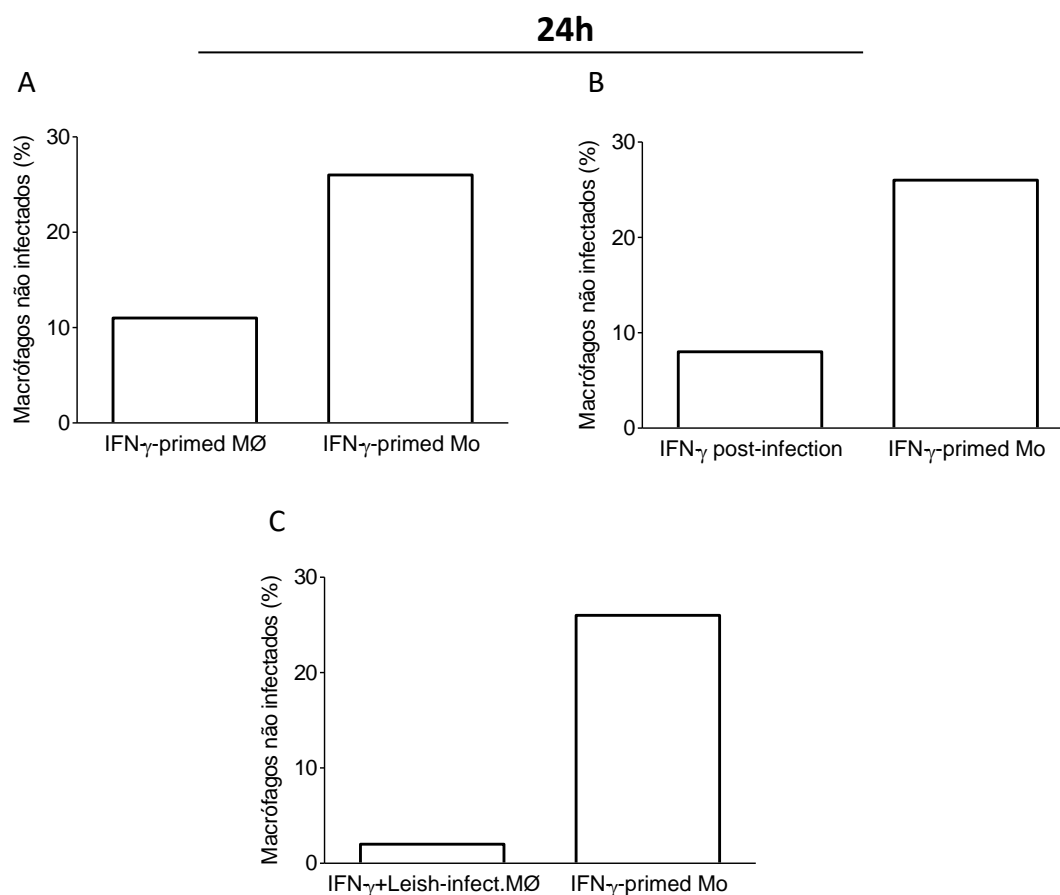


Figura 13: frequência relativa de macrófagos não infectados após 24h de estímulos. Comparação entre os grupos tratados. Em “A”, grupo IFN- γ -*primed* Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ -*primed* MØ; em “B”, grupo IFN- γ -*primed* Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ *post-infection*; em “C”, grupo IFN- γ -*primed* Mo apresenta menor quantidade de macrófagos não infectados que o grupo IFN- γ +*Leish-infected*.MØ.

4.6. Prevalência de subpopulação de monócitos inflamatórios aderidos a macrófagos do grupo “IFN- γ -*primed* Mo”

Observada a eficácia dos monócitos ativados em eliminar parasitos nos diferentes tempos de tratamento, notamos que 74% dos monócitos aderidos aos macrófagos infectados por *L. major*, apresentavam núcleo em forma de casco de boi (Figura 15), formato de núcleo relacionado a monócitos Gr1⁺, os monócitos clássicos murinos. Monócitos com núcleo em

formato de rim também se aderem a macrófagos infectados (Figura 16), porém em menor frequência, 26% (Figura 14).

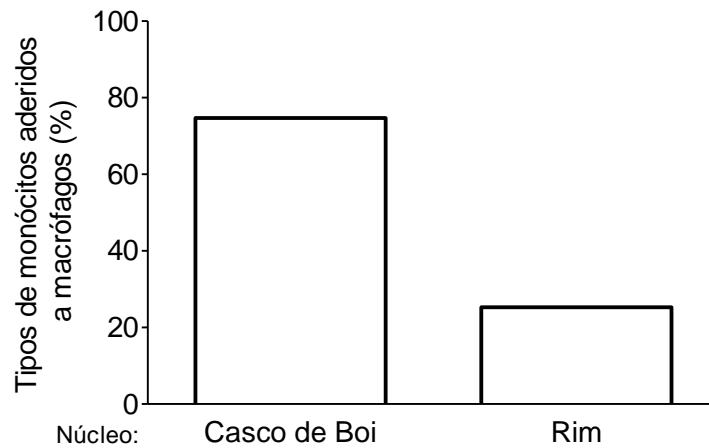


Figura 14: frequência relativa do tipo de monócitos aderidos a macrófagos do grupo *IFN- γ -primed Mo*. Monócitos com núcleo em forma de casco de boi representam **74%** dos monócitos aderidos. Monócitos com núcleo em forma de rim representam **26%** do total de monócitos aderidos.

Observamos que macrófagos do grupo “*IFN- γ -primed Mo*” apresentavam núcleo condensado e o citoplasma estava mais denso e mais corado que o normal, estivessem esses aderidos ou não a monócitos (Figura 15). Esse mesmo processo foi observado nos grupos tratados com *IFN- γ* , porém em menor frequência, sugerindo morte celular.

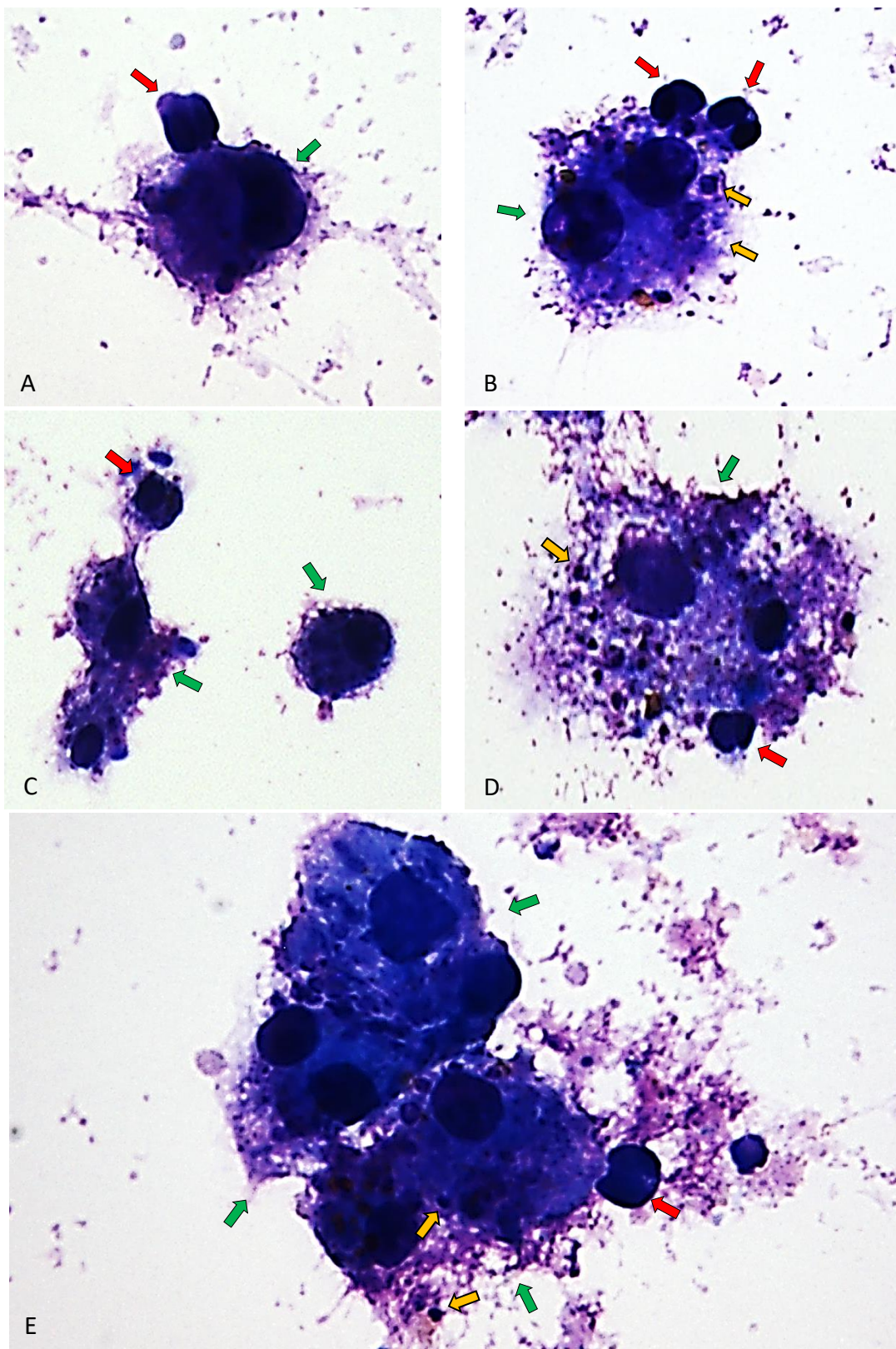


Figura 15: micrografia, 1000x – grupo IFN- γ -primed Mo. Setas vermelhas indicando monócitos com núcleo em forma de casco de boi. Setas verdes indicando macrófagos infectados com *L. major*. Setas amarelas indicando formas amastigotas de *L. major*.

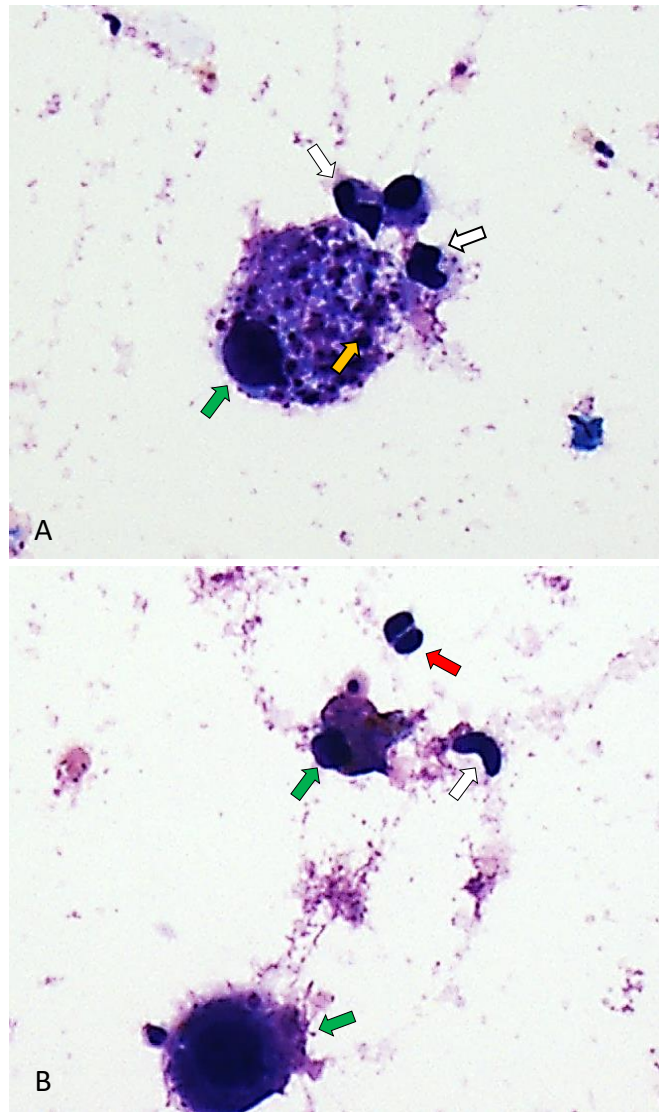


Figura 16: micrografia, 400x - grupo IFN- γ -*primed* Mo. Setas vermelhas indicando monócitos com núcleo em forma de casco de boi. Setas brancas indicando monócitos com núcleo em forma de rim. Setas verdes indicando macrófagos infectados com *L. major*. Setas amarelas indicando formas amastigotas de *L. major*.

4.7. Controle da lesão por transferência adotiva de células

Em virtude de nossa confirmação experimental de que monócitos tem realmente a capacidade de controlar o parasitismo em macrófagos infectados, resolvemos testar esta hipótese *in vivo*.

Desta forma, camundongos $CCR2^{-/-}$ (menos resistentes) foram infectados na pata com 2×10^6 *Leishmania* e juntamente tratados com 5×10^6 células de medula óssea em suspensão, retirados de camundongos C57BL/6 WT, e a lesão na pata foi acompanhada por 10 semanas.

Durante as quatro primeiras semanas de infecção, o aumento da lesão não se diferenciou entre os grupos analisados, porém, a partir da quinta semana já foi possível observar que o grupo de camundongos C57BL/6 $CCR2^{-/-}$ não tratado ($CCR2^{-/-}$), apresentava lesão maior em relação aos demais grupos. Destacamos que o grupo C57BL/6 $CCR2^{-/-}$ tratado ($CCR2^{-/-}$ Tr) com células de medula óssea de C57BL/6 WT apresentou diferença significativa em relação ao grupo $CCR2^{-/-}$ não tratado, com lesão que se manteve menor até a 10ª semana de infecção (Figura 17). As maiores diferenças observadas entre esses dois grupos foram na sexta, oitava e nova semanas, com $P < 0,001$ (Figura 17).

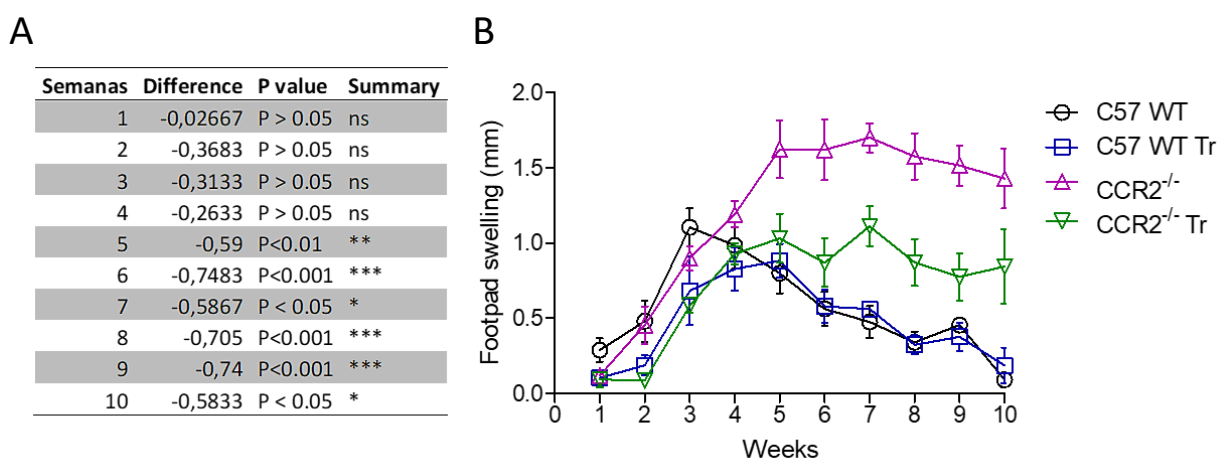


Figura 17: comparação do tamanho da lesão. Maior tamanho de lesão na pata de camundongos $CCR2^{-/-}$ quando comparados aos grupos $CCR2^{-/-}$ Tr, C57BL/6 WT e C57BL/6 WT Tr, da quinta a 10ª semana de infecção (**B**). Valores de “P” disponíveis em **A**. Infecção e transferência adotiva realizadas na semana zero.

O grupo $CCR2^{-/-}$ Tr mantém o mesmo tamanho de lesão que os grupos C57BL/6 WT e C57BL/6 WT Tr, da primeira a sexta semana e durante a nona semana ($P > 0,05$) (Figura 18).

A

Semanas	Difference	P value	Summary
1	-0,1967	P > 0.05	ns
2	-0,3933	P > 0.05	ns
3	-0,519	P > 0.05	ns
4	-0,05733	P > 0.05	ns
5	0,2317	P > 0.05	ns
6	0,308	P > 0.05	ns
7	0,6357	P < 0.01	**
8	0,53	P < 0.05	*
9	0,319	P > 0.05	ns
10	0,753	P < 0.001	***

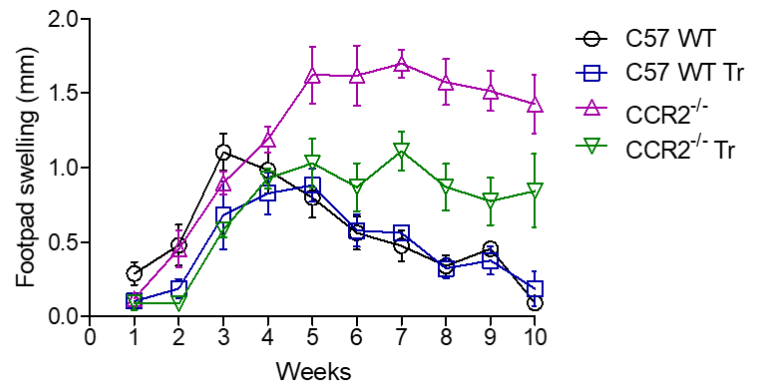
B

Figura 18: comparação do tamanho da lesão. O grupo CCR2^{-/-}Tr mantém o mesmo tamanho de lesão que os grupos C57BL/6 WT e C57BL/6 WT Tr da primeira a sexta semana e durante a nona semana **(B)**. Valores de “P” disponíveis em **A**. Infecção e transferência adotiva realizadas na semana zero.

Os resultados obtidos demonstram que a transferência adotiva melhorou o perfil resistente a infecção nos camundongos CCR2^{-/-}.

5. DISCUSSÃO

5.1. Morfologia nuclear de monócitos: clássicos vs não clássicos

Nosso grupo através do trabalho de Barbosa *et al.* (2013), descreveu durante a caracterização fenotípica e funcional de monócitos do sangue periférico de cães não infectados e naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, que monócitos CD14^{high} apresentam núcleo mais basofílico que monócitos CD14^{low} e em formato de casco de boi, concomitantemente há maior expressão de marcadores relacionados à monócitos ativados e de perfil pró-inflamatório, como MHC-II, CD11c, CD44, CCR2 previamente descritos para outras espécies (EGAN *et al.*, 2013; STRAUSS-AYALI; CONRAD; MOSSER, 2007). Sendo assim esses foram denominados por nós como monócitos clássicos caninos. Os monócitos CD14^{low} por sua vez apresentam menor expressão desses marcadores e núcleo em forma de rim, os quais denominamos, monócitos não clássicos (Anexo 1 e 4) (BARBOSA, 2013).

Após essa observação em cães, decidimos verificar se em outras espécies haveria esta mesma correlação entre morfologia e fenótipo celular. Foi realizada a análise morfológica e fenotípica de monócitos humanos. Feita a separação por *sorting* das subpopulações destas células e usando-se a mesma metodologia aplicada para camundongos, observamos que: monócitos clássicos, CD14⁺⁺CD16⁻, apresentam núcleo mais basofílico e em formato de casco de boi; monócitos não clássicos, CD14^{low}CD16⁺⁺, apresentam núcleo menos basofílico e em formato de rim; monócitos intermediários, CD14⁺⁺CD16⁺⁺, apresentam uma mescla de células com os dois tipos nucleares, além de núcleos com morfologia e intensidade de coloração distintas das outras duas populações (Figura 3). Isso indica que esta é uma característica fenotípica conservada entre as três espécies analisadas, mostrando uma homologia interespecífica não somente quanto aos marcadores e função dos monócitos, mas também uma relação entre morfologia nuclear e função celular, entre cães, camundongos e humanos.

A análise por microscopia confocal mostrou ainda diferenças em proteínas expressas no núcleo, quando comparados monócitos murinos Gr1⁺ vs Gr1⁻. Uma maior expressão de lâmina B, encontrada na subpopulação Gr1⁺, vem sendo relacionada, quando observada em neutrófilos, à capacidade de migrarem mais rapidamente para o sítio inflamatório, passar através de estruturas apertadas e a formação de lóbulos, evitando que a célula desenvolva núcleo ovoide (HOFFMANN *et al.*, 2007).

É a primeira vez que se consegue fazer uma correlação entre morfologia nuclear e função em monócitos, confirmando que há realmente uma profunda diferença entre estas subpopulações, não somente em termos funcionais e fenotípicos, mas também termos morfológicos. E apesar de um dos maiores especialistas em monócitos no mundo, o Dr. Frederic Geissmann, citar em seu artigo de revisão (AUFFRAY; SIEWEKE; GEISSMANN, 2009) que às vezes é muito difícil diferenciar um monócito, de um linfócito, célula dendrítica ou célula *natural killer* (NK), morfológicamente, em nosso trabalho, analisando as subpopulações em três espécies, nos deixa muito confortáveis em afirmar que a maioria dos monócitos após FACS*sorting* apresentavam núcleo em forma de casco de boi ou núcleo em forma de rim, dificilmente sendo confundidas com células de núcleo arredondado, como linfócitos ou NKs.

Mas o que pode representar para a célula em termos funcionais, a apresentação de um núcleo diferente do outro? Aparentemente o núcleo do monócito clássico é bilobulado, semelhante ao núcleo de um eosinófilo, enquanto o monócito não clássico não apresenta lobulações ou invaginações da lâmina nuclear. São escassos os estudos a este respeito, e a maioria trata da questão em neutrófilos. Alguns artigos citam que, por exemplo, no caso de neutrófilos, há uma necessidade em se apresentar um núcleo lobulado, o que aumenta sua motilidade e facilita a diapedese quando migrando para um local inflamado (HOFFMANN *et al.*, 2007; ROWAT *et al.*, 2013). Outros artigos demonstram que provavelmente esta disposição da cromatina está relacionada à sua capacidade de matar ou imobilizar parasitos muito maiores do que eles, através da produção de ETs (*Extracellular DNA Traps*) (SANDRA BONNE-ANNÉE, LAURA A. KEREPESI, JESSICA A. HESS; FABIENNE PAUMET, JAMES B. LOK, THOMAS J. NOLAN, 2014) ou NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (CARVALHO *et al.*, 2015). Em nosso caso, nos estudos de Goncalves *et al.*, 2011, nosso grupo pode observar que monócitos clássicos apresentam maior capacidade de fagocitar parasitos de *Leishmania* do que monócitos não clássicos. Uma hipótese é de que estas células, por apresentarem um núcleo mais maleável, apresentam não somente uma maior capacidade de transmigrar pelo vaso, durante a diapedese, mas também melhor capacidade fagocítica. Neste trabalho também foi demonstrado que monócitos clássicos migram muito mais para o local de infecção do que monócitos não clássicos. Isto vai de encontro com o trabalho de Auffray *et al.*, 2007, que mostram que estas células (Gr1⁻) em camundongos, funcionam como patrulhadores dos vasos sanguíneos à espera de “sinais de perigo”. Elas literalmente “engatinham” sobre o endotélio vascular e quando ativadas por um patógeno, migram muito pouco para o local do estímulo (menos de 1%), funcionando mais como células de alerta, que liberam quimiocinas para atrair

células para aquele local. Outra possibilidade vem de encontro com a maturidade da célula. Neutrófilos, por exemplo, apresentam núcleos com três a cinco lóbulos, porém seus progenitores, bastonetes e metamielócitos, apresentam núcleos em forma de “minhoca” ou em forma de rim. Conforme estas células amadurecem, formam-se lóbulos. Numa infecção aguda, neutrófilos jovens podem ser lançados na corrente sanguínea em maior número, em função da falta de tempo em maturá-los. Em geral estas células apresentam uma menor quantidade de lóbulos em seus núcleos, quando comparados com neutrófilos maduros e menor capacidade migratória para tecidos infectados (HOFFMANN *et al.*, 2007).

Outra observação muito importante está relacionada à expressão de Gr1 na superfície dos monócitos murinos. É bem conhecido que Gr1 é um marcador de superfície muito importante para os neutrófilos murinos, e foi usado por vários anos como um marcador exclusivo para essas células (TEPPER; COFFMAN; LEDER, 1992). Entretanto, em 2003, Geissmann *et al.* demonstraram que monócitos existem em dois subgrupos, um deles expressando Gr1 em sua superfície, como pode ser encontrado em neutrófilos. Aqui estamos mostrando que exatamente essa população que é Gr1⁺ também compartilha outras características com os neutrófilos, apresentando também os núcleos segmentados. Mas no caso dos monócitos, eles têm apenas dois lóbulos em vez de três ou cinco, encontrados em neutrófilos. Isso estaria relacionado à sua ontogenia? E função? Em 2011, mostramos (Goncalves *et al.*, 2011) que os monócitos Gr1⁺ podem migrar para o local da infecção por *Leishmania major*, ainda mais rápido que os neutrófilos, sendo a principal célula a migrar nos primeiros minutos de infecção. O formato do núcleo estaria favorecendo esta rápida migração?

5.2. Resistência e suscetibilidade de macrófagos a infecção por *L. major*

Nos experimentos relativos ao *survival*, quando observamos os resultados obtidos após 2h de estímulo, notamos que os grupos tratados com IFN- γ , seja antes (IFN- γ -primed M \emptyset), durante (IFN- γ +*Leish-infect.M* \emptyset) ou após a infecção (IFN- γ *post-infection*), apresentaram resistência à infecção. Resistência esta demonstrada pelo menor número de amastigotas em relação ao grupo não tratado (*L. major-infect.M* \emptyset). Citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ e TNF- α vem sendo descritas como eficazes em reduzir, *in vitro*, o parasitismo de *L. major* em macrófagos, por estimularem a produção de NO, principalmente em células primadas com essas citocinas (GREEN *et al.*, 1990a; KIMA; SOONG, 2013; LAMOUR *et al.*, 2012; Green *et al.*, 1990; Lamour *et al.*, 2012; Kima e Soong, 2013). Porém, em nossos

resultados observamos que nas primeiras duas horas de tratamento, macrófagos primados com IFN- γ e macrófagos estimulados com IFN- γ no momento da infecção, apresentaram maior resistência à infecção quando comparados ao grupo tratado após a infecção. Macrófagos infectados por *Leishmania* sofrem uma redução da expressão de receptores de IFN- γ (JI; SUN; SOONG, 2003), podendo também apresentar inibição da sinalização JAK-STAT (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005), inibindo por exemplo a resposta da célula ao estímulo por IFN- γ . Sendo assim a resposta da célula é reduzida quando comparada ao estímulo antes da infecção e concomitante a infecção. O fato de o grupo “IFN- γ +*Leish-infect.MØ*” apresentar maior resistência a infecção que o grupo “IFN- γ -primed *MØ*” nos leva a acreditar que o tempo de reação e resposta ao IFN- γ pelos macrófagos é menor que o de inibição de sua ativação pelo parasito. Esses resultados são semelhantes aos mostrados por Proudfoot *et al.* 1996, onde macrófagos estimulados isoladamente com derivados de lipofosfoglicano (LPG) de *L. major*, mantinham-se inertes, sem produção de NO, porém quando esses macrófagos foram estimulados com os derivados de LPG em sinergia com IFN- γ , houve produção de grandes concentrações de NO. Esse sinergismo faz com que a capacidade de eliminação do parasito por macrófagos seja aumentada e torne possível certo nível de controle da infecção.

Acompanhando a cinética da infecção, após 24h de estímulo, observamos que os resultados são semelhantes quando comparados somente os grupos de macrófagos tratados com IFN- γ . Observamos que nesse momento ainda há presença de macrófagos não infectados em todos os grupos, assim como observado no tempo de 2h de tratamento, permitindo que formas amastigotas liberadas de macrófagos infectados sejam fagocitadas e perpetuem a proliferação do parasito. O fato de termos células não infectadas com 2h ou 24h após a infecção poderia explicar também o certo grau de resistência (*killing*) apresentado pelo grupo “IFN- γ *post-infection* “. Isso porque estas células não infectadas, poderia sim responder ao IFN- γ e atacar as células infectadas, assim como observamos com os monócitos. Porém uma análise mais precisa quanto à esta hipótese precisaria ser realizada.

No último tempo estudado, observamos que após 48h, onde os grupos sofreram mais um estímulo após as primeiras 24h de tratamento, macrófagos do grupo “IFN- γ *post-infection*” não apresentaram mais diferença do grupo controle, não mantendo as mesmas taxas de eliminação do parasito, confirmando a incapacidade dessas células de reverterem a infecção, uma vez inativadas ou com sua capacidade microbicida reduzida. Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de inativar a sinalização JAK/STAT (NANDAN; REINER, 1995), relacionada à resposta pró-inflamatória, principalmente quando estimulados por IFN- γ , não

induzindo a produção de óxido nítrico, grande responsável pela eliminação dos parasitos. Acreditamos que a permanência da maior eficácia do grupo “IFN- γ +*Leish-infect.MØ*” em resistir a infecção pode estar ligada a uma possível ação do IFN- γ gerando no macrófago uma potente polarização pró-inflamatória, que inibe qualquer outra influência contrária, gerada pelo parasito (PROUDFOOT *et al.*, 1996) e podendo inclusive o parasito ser, de alguma forma, o segundo sinal para a polarização do macrófago para classicamente ativado. De fato trabalhos demonstram que o pré-tratamento de macrófagos com IFN- γ (*priming*) leva a uma total ativação de macrófagos capaz de inibir qualquer mecanismo de *feedback* inibitório como por exemplo os gerados por IL-10 ou STAT3 ou SOCS (*supressor of cytokine signaling*) (GREEN, S J *et al.*, 1990; HU; CHAKRAVARTY; IVASHKIV, 2008; NACY *et al.*, 1985). Nossos resultados mostram que dependendo da forma com que você ative os macrófagos *in vitro*, os resultados na eliminação da *Leishmania* serão totalmente diferentes. E podemos inclusive confirmar essa potente ação do IFN- γ , inibindo, por exemplo, o efeito da IL-10, que em geral potencializa a suscetibilidade ao parasitismo. A figura cinco (Figura 5) relata muito bem estas respostas diferentes quando sob a influência de diferentes citocinas aplicadas em diferentes momentos da infecção. As citocinas IL-10 e IFN- γ antagonizam a síntese e funções uma da outra (CHOMARAT *et al.*, 1993). A infecção por *L. major* e a presença da IL-10 nos momentos iniciais da infecção também contribui para determinar o perfil de suscetibilidade ao parasito, uma vez que camundongos Balb/c, linhagem suscetível, quando deficientes para IL-10 conseguem controlar a infecção apresentando alta produção de IFN- γ (SCHWARZ *et al.*, 2013).

5.3. Monócitos na resistência a infecção por *L. major*

Monócitos do sangue periférico vêm sendo utilizados como biomarcadores de diversos tipos de doenças, onde a frequência de suas subpopulações é correlacionada à evolução dos processos patológicos e da doença (STANSFIELD; INGRAM, 2015). Na leishmaniose sabemos que monócitos tem papel primordial tanto na progressão quanto na resolução da doença, visto que essas são as primeiras células do sangue periférico a chegarem ao local da infecção por *L. major*, mesmo sendo menos numerosas que neutrófilos, após 1h de infecção (GONCALVES *et al.*, 2011). Monócitos são descritos também, como as células capazes de controlar o parasitismo não apenas eliminando as formas promastigotas, mas também amastigotas intracelulares, e essa capacidade leishmanicida vem sendo atribuída não somente a

produção de NO (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015; STENGER *et al.*, 1994), mas também de ROS (NOVAIS *et al.*, 2014).

Em nossos resultados, o grupo tratado com monócitos ativados por IFN- γ é o que apresenta o menor número de macrófagos infectados, bem como a maior capacidade de resistência à infecção, inicialmente igual ao grupo “IFN- γ +*Leish*-infect.MØ” às 2h de tratamento, mas isoladamente a partir das 24h às 48h de estímulo. Monócitos ativados por IFN- γ aumentam consideravelmente sua explosão respiratória, sendo assim capazes de ativar iNOS e por conseguinte produzirem e liberar NO (STENGER *et al.*, 1994), capaz de eliminar *Leishmania*. Porém, ROS são capazes não somente de eliminar o parasito fora das células, mas também podem eliminar os intracelulares, descrito para monócitos clássicos humanos em infecção por *Leishmania braziliensis* (NOVAIS *et al.*, 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016), capacidade não somente relativa à eliminação de parasitos do gênero *Leishmania*, mas também parasitos do gênero *Plasmodium* (SPONAAS *et al.*, 2009).

Baseados em nossos resultados, acreditamos que a chegada de monócitos ao local da infecção possui dois efeitos principais: 1) eliminação de parasitos e de macrófagos infectados e 2) mais inflamação, induzindo assim, a manutenção da ferida aberta e necrosada (“Úlcera de Bauru”) e com demora na cura.

Considerando que a linhagem resistente C57BL/6 tem sua resposta direcionada a linfócitos Th1, com produção de IFN- γ e TNF- α (WATANABE *et al.*, 2004), faz com que monócitos recém-chegados do sangue periférico sejam ativados por essas citocinas, antes de seu encontro com os parasitos, fazendo com que esses respondam a infecção com ação pró-inflamatória, entre elas a liberação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. De acordo com nossos resultados, monócitos são capazes de ativar sinalizadores de morte em macrófagos infectados, observado pelas características morfológicas dos macrófagos no grupo tratado com monócitos primados com IFN- γ , que apresentam cromatina condensada e citoplasma denso com células de aspecto menor (FINK; COOKSON, 2005; RELLO *et al.*, 2005). Uma vez que as amastigotas são liberadas no meio extracelular, podem infectar outros macrófagos ou serem mortas por monócitos e/ou macrófagos classicamente ativados. Ainda não existem estudos que demonstrem que células *bystander*, como os monócitos e linfócitos no local da infecção, apresentem redução de IFN- γ R, como já relatada ocorrência com macrófagos (KIMA; SOONG, 2013), o que explicaria a manutenção de sua ação leishmanicida, em animais resistentes, em resposta ao IFN- γ no local.

Essa capacidade de controlar infecções tem sido atribuída a monócitos clássicos. Sunderkotter *et al.* (2004) e Serbina *et al.* (2003 e 2006) demonstraram que durante a infecção com *Listeria monocitogenes*, esses monócitos migram para o foco inflamatório e se diferenciam em células produtoras de TNF- α e NO. Esse processo é dependente de CCR2, e camundongos deficientes em CCR2 apresentam menor influxo de monócitos para o sítio da infecção, com consequente diminuição na capacidade de controle da doença (ROMANO *et al.*, 2017). O mesmo foi demonstrado no controle e resistência ao *Toxoplasma gondii*, onde camundongos CCR2^{-/-} apresentaram-se susceptíveis e não controlaram a doença (DUNAY *et al.*, 2008; GRAINGER *et al.*, 2013) e em nossos estudos com infecção por *L. major* (GONCALVES *et al.*, 2011). Nossos resultados também confirmam esta hipótese, visto que camundongos CCR2^{-/-} quando infectados com *Leishmania major*, apresentam lesões maiores e que demoram mais a curar. Acreditamos que isso ocorra em virtude da falta de migração de monócitos clássicos para o local da infecção e ao mesmo tempo em que há aumento do número de neutrófilos, que correspondem a albergue seguro para proliferação do parasito, como demonstrado por Romano *et al.*, 2017.

Sendo assim realizamos o tratamento com transferência de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT para camundongos apresentando deficiência para a molécula receptora da quimiocina CCL2, responsável pelo recrutamento de monócitos e de células derivadas de monócitos clássicos ou inflamatórios, a CCR2. Devido à ausência desse receptor, os animais CCR2^{-/-} que foram infectados e não tratados com transferência adotiva de células, demonstraram maior lesão e também, maior dificuldade de resolução desta. Isso reforça a importância da CCL2 no controle desta infecção, visto que outras citocinas como a CXCL10 também serem capazes de recrutar monócitos (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2010), porém é a ausência do recrutamento via CCR2 que retarda a devida resposta monocitária à infecção. Considerando os resultados *in vitro* em consenso com os resultados *in vivo*, entendemos que a presença de células *bystander* é fundamental para o combate a infecção, visto que células T CD4⁺ de memória residentes (T CD4_{mr}) nos tecidos tem um importante papel no estímulo e recrutamento de monócitos clássicos na manutenção da resposta imunitária, em resposta tardia a infecção, mesmo na ausência de células T CD4⁺ de memória circulantes (GLENNIE *et al.*, 2015; GLENNIE; VOLK; SCOTT, 2017). Por esse motivo acreditamos que a resolução da lesão em nosso modelo experimental ocorre a partir da quinta semana de infecção, com presença maciça de monócitos Gr1⁺, que recebem o estímulo de IFN- γ produzido por T CD4_{mr} e por células derivadas dos próprios monócitos Gr1⁺ que migraram e

diferenciaram-se em macrófagos classicamente ativados e *Tip*-DCs, logo no começo da infecção, via estimulação por T CD4⁺.

Esse processo foi apontado por Glennie, Volk e Scott, 2017 e também por Romano *et al.*, 2017, que demonstram que monócitos clássicos e as células derivadas desses são a principal fonte de ROS e NO no local da infecção, e que mesmo infectados conseguem manter sua ativação, pois as amastigotas em seu interior encontram-se danificadas e incapazes de proliferar, bem diferente do que ocorre com macrófagos, que são inativados após infecção, principalmente se não recebem estímulo primário de IFN- γ , como demonstrado aqui em nosso trabalho e por outros autores (GONÇALVES *et al.*, 2005; MURRAY, P. J.; WYNN, 2011; REINER, S. L.; LOCKSLEY, 1995; ROSENTHAL *et al.*, 1996). Macrófagos inativados seriam mais comuns no início da infecção, tanto pela ausência de células T CD4⁺, quanto pela grande quantidade de neutrófilos que mesmo não sendo o primeiro tipo de leucócito a migrar para a lesão, aparecem em grande quantidade, dificultando a resolução. Por serem ainda, um abrigo seguro para o parasito *Leishmania*, bem como por retardarem a ação de monócitos clássicos na resolução da infecção em camundongos de perfil resistente (GONCALVES *et al.*, 2011; ROMANO *et al.*, 2017).

Segundo nossos resultados, monócitos clássicos foram os que apresentaram maior frequência relativa de aderência aos macrófagos infectados (Figura 14), e acreditamos que esta aderência induza dois possíveis mecanismos de eliminação dos parasitos: 1) citotoxicidade induzida por ROS ou TNF- α levando os macrófagos e parasitos à morte por apoptose (GLENNIE; VOLK; SCOTT, 2017; ROMANO *et al.*, 2017); 2) “*Cell to cell transfer*” (Real *et al.*, 2014), onde monócitos recém chegados, primados com IFN- γ seriam capazes de “roubar” parasitos de dentro de macrófagos, eliminando-os. Claramente, novos estudos serão necessários para que se confirmem estas hipóteses.

Essa relação de controle da infecção à presença de ROS vem sendo cada vez mais bem estabelecida (GONCALVES *et al.*, 2011), não como principal substância envolvida, mas como essencial para a rápida resolução do quadro. Como exemplo podemos usar a lesão formada em camundongos deficientes para oxidação fagocítica (*phox*^{-/-}) infectados por *L. major*, que apresenta desenvolvimento mais crônico, fazendo com que seja necessário muito mais tempo para que se chegue a cura (BLOS *et al.*, 2003). Em humanos infectados por *Leishmania braziliensis*, por exemplo, não foi constatado aumento da expressão do gene NOS2 (*nitric oxidid*

synthase 2), quando comparados aos grupos saudáveis, porém houve aumento da ativação de genes ligados ao *burst* oxidativo relacionados ao NADPH oxidase (NCF1, NCF2, NCF4, CYBA, CYBB), associado principalmente aos monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), que mesmo infectados continuam responsivos (NOVAIS *et al.*, 2014).

Sabemos que em pacientes com leishmaniose cutânea local, a úlcera formada, leva em geral meses para curar, mesmo em pacientes com resposta imune competente (Th1), e que é incomum a presença de parasitos em biópsias de pele ulceradas. Em geral o parasitismo varia bastante, sendo mais abundante no início da infecção, e desaparecendo conforme a lesão se torna ulcerada (NYLÉN, S.; EIDSMO, 2012). Acreditamos que este processo demorado, se dê em função da dificuldade de encontro entre monócitos ativados e macrófagos infectados no curso da lesão ulcerada, bem como na possibilidade de melhor resposta adaptativa no curso de semanas de infecção, contribuindo para ativação e conseqüentemente maior *killing* de *Leishmania* por monócitos Gr1⁺ e por células derivadas (GLENNIE; VOLK; SCOTT, 2017; ROMANO *et al.*, 2017) . Num ambiente de lesão, com alta frequência de parasitos, é possível que mais monócitos sejam atraídos, no início, sem a presença ainda de uma resposta Th1. Estas células se tornariam hospedeiras de mais parasitos. Porém após a forte descarga de IFN- γ gerada por células Th1, os monócitos agora ativados, seriam os responsáveis pelo controle da infecção, mas também pelo aumento da lesão que se tornaria ulcerada. Com o passar do tempo, o parasitismo muito diminuído dificultaria o encontro de monócitos ativados com macrófagos infectados, o que leva a um processo de cura que pode durar vários meses.

A manutenção da lesão pode ser então atribuída tanto à liberação de radicais livres por monócitos Gr1⁺ ativados, quanto à morte dos macrófagos infectados, que ainda não sabemos se são induzidos a necrose ou apoptose, aproximando-se ao que acontece na rejeição de enxerto renal provocado por citotoxicidade de monócitos (GIRLANDA *et al.*, 2008; STEHLING; GRAU; STEINIGER, 2004). Monócitos apresentam citotoxicidade representada por reativos intermediários do oxigênio (ROI – *reactive oxygen intermediates*) e TNF, dentre outros, já descrita em outros processos, como na citotoxicidade contra células tumorais (MUNN; CHEUNG, 1990; STEHLING; GRAU; STEINIGER, 2003; UCHIDA; YANAGAWA, 1984) e na doença do enxerto contra o hospedeiro (SUNDERKOTTER *et al.*, 2004), todos contribuindo para formação da lesão e de forma paradoxal para o controle de doenças.

Atribuimos que o tempo prolongado de manutenção da lesão é necessário para que células suscetíveis sejam eliminadas junto com os parasitos, e que a frequência de monócitos seja constante para que haja controle do parasitismo.

Sendo assim, acreditamos em uma quebra de paradigma quanto ao controle da leishmaniose, onde o IFN- γ produzido pelas células Th1 não age nos macrófagos infectados, que na verdade se tornam refratários à esta citocina. Mas sua ação se dá em monócitos clássicos, que após sua ativação, migram para o local da infecção e eliminam células infectadas e/ou parasitos dentro destas células através de uma forte produção de NO e de ROS ou pela transferência de parasitos “*cell to cell transfer*”.

6. CONCLUSÃO

Monócitos tem papel relevante na resposta à infecção cutânea por *L. major*, atuando diretamente sobre a formação da lesão, bem como na resolução da mesma, promovendo o controle do parasitismo e dos macrófagos infectados.

Monócitos são formados por duas subpopulações que apresentam predominância morfológica distinta: monócitos clássicos, com núcleo em forma de casco de boi e monócitos não clássicos, com núcleo em forma de rim. Esta divisão está de acordo com as classificações fenotípicas e funcionais já muito bem caracterizadas para subpopulações de monócitos, e se mantem conservada entre as espécies humana, canina e murina.

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. *et al.* The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania* major. *Science*, v. 263, n. 5144, p. 235–237, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7904381>>.

AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and immunity*, v. 61, n. 7, p. 2952–9, 1993. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*, v. 112, p. 2993–3002, 1999.

AUFFRAY, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, v. 317, n. 5838, p. 666–670, 2007.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, v. 27, n. 1, p. 669–692, 2009. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.021908.132557>>.

BARBOSA, V. S. *ESTUDO DA HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS DE CÃES INFECTADOS OU NÃO POR Leishmania infantum*. 2013. 74 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-9Q3HTS/disserta__o_conclu_da.pdf?sequence=1>.

BEIL, W. J. *et al.* Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous *Leishmaniasis* in resistant and susceptible mice. *Journal of leukocyte biology*, v. 52, n. 2, p. 135–42, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1506767>>.

BELKAID, Y. *et al.* A Natural Model of *Leishmania* major Infection Reveals a Prolonged “Silent” Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. *The Journal of Immunology*, v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.165.2.969>>.

BLOS, M. *et al.* Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania* major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 5, p. 1224–1234, 2003.

CARVALHO, L. O. *et al.* The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 116, n. 9, p. 1831–1836, 2015.

CHAMORRO, S. *et al.* Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation. *Immunology*, v. 114, n. 1, p. 63–71, 2005.

CHOMARAT, P. *et al.* Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *The Journal of experimental medicine*, v. 177, n. 2, p. 523–7, 1993. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2190918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CROS. Human CD14 dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, v. 33, p. 375–386, 2010.

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.

DAVID M. MOSSER AND XIA ZHANG. Macrophage activation by endogenous danger signals. *North*, v. 214, n. 2, p. 161–178, 2008.

DE SOUZA, M. C. *et al.* The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania* amazonensis infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Tropica*, v. 115, n. 3, p. 262–269, 2010.

DUNAY, I. R. *et al.* Gr1+Inflammatory Monocytes Are Required for Mucosal Resistance to

the Pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity*, v. 29, n. 2, p. 306–317, 2008.

DUTTA, P.; NAHRENDORF, M. Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 35, n. 5, p. 1066–1070, 2015.

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.

EHRCHEN, J. M. *et al.* Keratinocytes Determine Th1 Immunity during Early Experimental *Leishmaniasis*. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 4, p. e1000871, 2010. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000871>>.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity*, v. 41, n. 1, p. 21–35, 2015.

FIGDOR, C. G. *et al.* Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. *Blood*, v. 60, n. 1, p. 46–53, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7082846>>.

FINK, S. L.; COOKSON, B. T. *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infection and Immunity*. [S.l.: s.n.], 2005

FRANCHI, L. *et al.* Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews*, v. 227, n. 1, p. 106–128, 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>>.

FUJISAWA, T. *et al.* Angiopoietin-1 promotes atherosclerosis by increasing the proportion of circulating Gr1+monocytes. *Cardiovascular Research*, v. 113, n. 1, p. 81–89, 2017.

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

GETTS, D. R. *et al.* Ly6c+ “inflammatory monocytes” are microglial precursors

recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. *The Journal of experimental medicine*, v. 205, n. 10, p. 2319–37, 2008. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779347>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2556789>>.

GIRLANDA, R. *et al.* Monocyte infiltration and kidney allograft dysfunction during acute rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, v. 8, n. 3, p. 600–7, 2008.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2813043&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GLENNIE, N. D. *et al.* Skin-resident memory CD4⁺ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 9, p. 1405–1414, 2015. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20142101>>.

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, p. 1–17, 2017.

GONCALVES, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20101751>>.

GONÇALVES, R. *et al.* A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of *L. chagasi* to canine peritoneal macrophages. *BMC Infectious Diseases*, v. 5, p. 1–10, 2005.

GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current Protocols in Immunology*. [S.l: s.n.], 2015. p. 14.1.1-14.1.16.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/0471142735.im1401s111>>.

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, v. 5, n. 12, p. 953–964, 2005.

GRAGE-GRIEBENOW, E.; FLAD, H. D.; ERNST, M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *Journal of leukocyte biology*, v. 69, n. 1, p. 11–20, 2001.

GRAINGER, J. R. *et al.* Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nature Medicine*, v. 19, n. 6, p. 713–721, 2013.

GREEN, S. J. *et al.* Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 144, n. 1, p. 278–83, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2104889>>.

GREEN, S. J. *et al.* *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 145, n. 12, p. 4290–7, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124240>>.

H.J. MEDBURY, S.L.S. TARRAN, A.K. GUIFFRE, M.W.Y. WILLIAMS, T.H. LAM, M. VICARETTI, J. P. F. Monocytes contribute to the atherosclerotic cap by transformation into fibrocytes. 2008, [S.l: s.n.], 2008. p. 53.

HELD, T. K. *et al.* Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 1, p. 206–212, 1999.

HIJDRA, D. *et al.* Phenotypic Characterization of Human Intermediate Monocytes. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. October, p. 4–6, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2013.00339/abstract>>.

HILGENDORF, I.; SWIRSKI, F. K. Making a difference: Monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, v. 14, n. 5, p. 450–459, 2012.

HOFF, J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*, v. 29, n. 10, p. 47–53, 2000. Disponível em: <<http://www.lawte.org/materials/hoff.pdf>>.

HOFFMANN, K. *et al.* The granulocyte nucleus and lamin B receptor: Avoiding the ovoid. *Chromosoma*, v. 116, n. 3, p. 227–235, 2007.

HOWARD, J. G.; HALE, C.; CHAN-LIEW, W. L. Immunological regulation of experimental cutaneous *Leishmaniasis*. 1. Immunogenetic aspects of susceptibility to *Leishmania tvopica* in mice. *Parasite Immunology*, v. 2, n. 4, p. 303–314, 1980.

HU, X.; CHAKRAVARTY, S. D.; IVASHKIV, L. B. *Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. Immunological Reviews.* [S.l: s.n.]. , 2008

HUSSEN, J. *et al.* Phenotypic and Functional Heterogeneity of Bovine Blood Monocytes. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. 1–11, 2013.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 8, p. 4278–4288, 2003.

JOUNAI, N. *et al.* Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 2, 2013. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00168/abstract>>.

K HESTDAL, F W RUSCETTI, J N IHLE, S E JACOBSEN, C M DUBOIS, W C KOPP, D. L. L. AND J. R. K. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *The Journal of Immunology*, v. 147, n. 1, p. 22–28, 1991.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in *Leishmaniasis*. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. JUN, p. 1–5, 2013.

LAMOUR, S. D. *et al.* Metabolic characterization of *Leishmania* major infection in activated and nonactivated macrophages. *Journal of Proteome Research*, v. 11, n. 8, p. 4211–4222, 2012.

LAURA J. APPLEBYA, NORMAN NAUSCHA, NICHOLAS MIDZIB, T. M.; JUDITH E. ALLENA, F. M. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunology Letters*, n. 0165-2478, 2013.

LIU, D. *et al.* *Leishmania* major phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 8, p. 3272–3283, 2009.

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A. L.; HIDE, M. *Study of Leishmania pathogenesis in mice: Experimental considerations. Parasites and Vectors*. [S.l: s.n.], , 2016

MILLS, C. D. *et al.* M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 12, p. 6166–6173, 2000. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.164.12.6166>>.

MILLS, C. D. *et al.* Pillars Article: M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol* . 2000. 164: 6166–6173. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 7, p. 2194–2201, 2017. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701141>>.

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

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunological Reviews*, v. 240, n. 1, p. 286–296, 2011.

MUNN, D. H.; CHEUNG, N. K. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine*, v. 172, n. 1, p. 2317, 1990. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?art>

id=2188164&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MURRAY, H. W. *Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. Annals of Internal Medicine.* [S.l: s.n.], 1988

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 11, p. 723–737, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3073>>.

NABORS, G. S. *et al.* Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania* major infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 8, p. 3142–6, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=42121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NACY, C. A. *et al.* Macrophage activation to kill *Leishmania* major: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. *The Journal of Immunology*, v. 135, n. 5, p. 3505–3511, 1985.

NANDAN, D.; REINER, N. E. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: Selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 11, p. 4495–4500, 1995.

NATHAN, C. F. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *Journal of Experimental Medicine*, v. 158, n. 3, p. 670–689, 1983. Disponível em: <<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.158.3.670>>.

NOVAIS, F. O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n.

8, p. 1288–1296, 2014.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous *Leishmaniasis*. *Parasite Immunology*, v. 34, n. dDC, p. 551–561, 2012.

O'SHEA, J.; PAUL, W. E. *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4 + T cells*. *Science*. [S.l: s.n.], 2010

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. *Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection*. *Trends in Parasitology*. [S.l: s.n.], 2015.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View
Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. *Clinical microbiology reviews*, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

PILLING, D. *et al*. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS ONE*, v. 4, n. 10, p. 31–33, 2009.

PROUDFOOT, L. *et al*. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 20, p. 10984–9, 1996. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

QIAN, B. *et al*. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumour metastasis. v. 475, n. 7355, p. 222–225, 2012.

REINER, N. E. *et al*. Modulation of in vitro monocyte cytokine responses to *Leishmania* donovani. Interferon- γ prevents parasite-induced inhibition of interleukin 1 production and primes monocytes to respond to *Leishmania* by producing both tumor necrosis factor- α and

interleuki. *Journal of Clinical Investigation*, v. 85, n. 6, p. 1914–1924, 1990.

REINER, N. E.; NG, W.; MCMASTER, W. R. Parasite-accessory cell interactions in murine *Leishmaniasis*. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 138, n. 6, p. 1926–1932, 1987.

REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. The Regulation of Immunity to *Leishmania Major*. *Annual Review of Immunology*, v. 13, n. 1, p. 151–177, 1995. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.iy.13.040195.001055>>.

RELLO, S. *et al.* Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis*, v. 10, n. 1, p. 201–208, 2005.

ROMANO, A. *et al.* Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 6, p. e1006479, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006479>>.

ROSENTHAL, L. A *et al.* *Leishmania major*-human macrophage interactions : cooperation between Mac-1 (CD11b / CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion . *Leishmania major*-Human Macrophage Interactions : Cooperation between Mac-1 (CD11b / CD18) and. *Infection and immunity*, v. 1, n. 6, p. 2206–2215, 1996.

ROWAT, A. C. *et al.* Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 12, p. 8610–8618, 2013.

SANDRA BONNE-ANNÉE, LAURA A. KEREPESI, JESSICA A. HESS, J. W.; FABIENNE PAUMET, JAMES B. LOK, THOMAS J. NOLAN, AND D. A. Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *North*, v. 16, n. 6, p. 502–5011, 2014.

SCHWARZ, T. *et al.* T Cell-Derived IL-10 Determines *Leishmaniasis* Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. *PLoS Pathogens*, v. 9, n. 6, 2013.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous *Leishmaniasis*: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SERBINA, N. V. *et al.* Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*, v. 26, n. 1, p. 421–452, 2008. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090326>>.

SHIRIAN, S. *et al.* Three *Leishmania* / *L.* species – *L. infantum* , *L. major* , *L. tropica* – as causative agents of mucosal *Leishmaniasis* in Iran. *Pathogens and Global Health*, v. 107, n. 5, p. 267–272, 2013. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773213Y.0000000098>>.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SPONAAS, A. M. *et al.* Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood*, v. 114, n. 27, p. 5522–5531, 2009.

STANSFIELD, B. K.; INGRAM, D. A. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clinical and Translational Medicine*, v. 4, n. 1, p. 5, 2015. Disponível em:

<<http://www.clintransmed.com/content/4/1/5>>.

STEHLING, O.; GRAU, V.; STEINIGER, B. Cytotoxicity of normal and activated rat monocytes analyzed by flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 56, n. 2, p. 81–8, 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608635>>.

STEHLING, O.; GRAU, V.; STEINIGER, B. Monocyte cytotoxicity during acute kidney graft rejection in rats. *International Immunology*, v. 16, n. 1, p. 101–110, 2004.

STENGER, S. *et al.* Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *The Journal of experimental medicine*, v. 180, n. 3, p.

783–93, 1994. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2191630&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

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. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0307191>>.

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. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.172.7.4410>>.

TALLONE, T. *et al.* Heterogeneity of human monocytes: An optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, v. 4, n. 2, p. 211–219, 2011.

TAYLOR, P. R.; GORDON, S. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*, v. 19, n. 1, p. 2–4, 2003.

TEPPER, R. I.; COFFMAN, R. L.; LEDER, P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science (New York, N.Y.)*, v. 257, n. 5069, p. 548–51, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1636093>>.

TERRY, R. L. *et al.* *Inflammatory monocytes and the pathogenesis of viral encephalitis. Journal of Neuroinflammation*. [S.l.: s.n.], 2012.

UCHIDA, A.; YANAGAWA, E. Natural cytotoxicity of human blood monocytes: Production of monocyte cytotoxic factors (MCF) during interaction with tumor cells. *Immunology Letters*, v. 8, n. 6, p. 311–316, 1984.

VAN FURTH, R. *et al.* The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 46, n. 6, p. 845–852, 1972.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A. *et al.* CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* Infection. *Infection and Immunity*, v. 78, n. 1, p. 301–308, 2010.

WATANABE, H. *et al.* Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, v. 22, n. 5, p. 460–466, 2004.

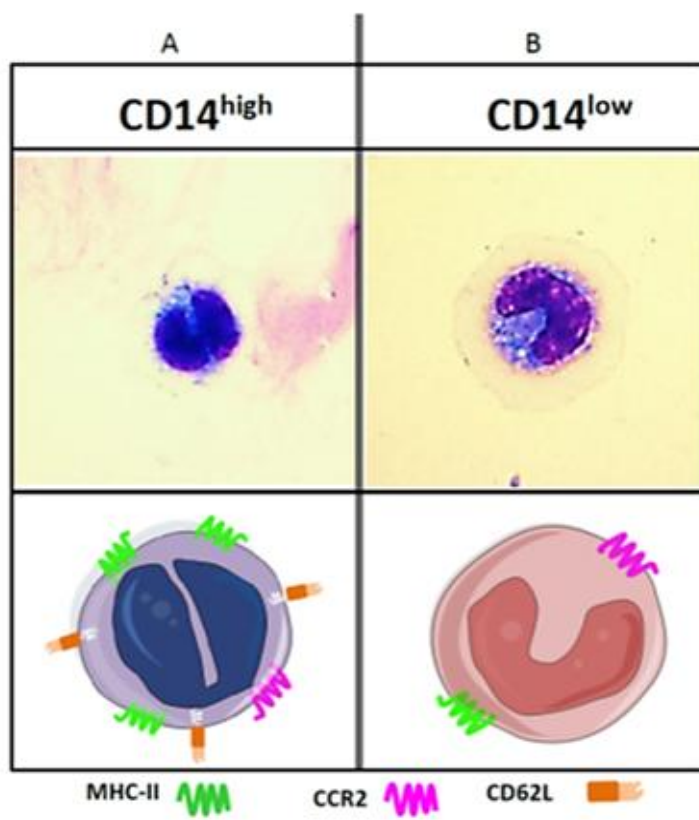
YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: Subsets, origins, fates and functions. *Current Opinion in Hematology*, v. 17, n. 1, p. 53–59, 2010.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Current protocols in immunology / edited by John E.Coligan ...[et al.]*, v. CHAPTER, n. November, p. Unit-14, 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2834554/>>.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunol Today*, v. 17, n. 9, p. 424–428, 1996. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8854561>.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. Reprint of: Monocyte subsets in man and other species. *Cellular Immunology*, v. 291, n. 1–2, p. 11–15, 2014. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.019>>.

ANEXO 1



ANEXO 2



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 160 / 2015, relativo ao projeto intitulado "ESTUDO DO PAPEL DOS MONÓCITOS INFLAMATÓRIOS NA PATOGÊNESE DAS LESÕES TECIDUAIS EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Leishmania major*", 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 15/09/2015. Este certificado espira-se em 15/09/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 160 / 2015, related to the Project entitled "STUDY OF INFLAMMATORY MONOCYTES ROLE IN PATHOGENESIS OF TISSUE INJURIES IN MICE INFECTED *Leishmania major*", 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 15/09/2015. This certificates expires in 15/09/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 15/09/2015.

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

ANEXO 3



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 386/2016
Título do projeto: Papel do monócitos inflamatórios no controle da infecção por Leishmania major em camundongos C57BL/6 CCR2-/-
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Ricardo Goncalves
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Patologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 08/05/2017. Validade: 08/05/2017 à 07/05/2022

Belo Horizonte, 08/05/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_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) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 4

