

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Vítor Silva Barbosa

ESTUDO DA HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS DE
CÃES INFECTADOS OU NÃO POR *Leishmania infantum*

Belo Horizonte

2013

Vítor Silva Barbosa

ESTUDO DA HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS DE CÃES INFECTADOS OU
NÃO POR *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientador: Dr. Ricardo Gonçalves

Coorientador: Dr. Wagner Luiz Tafuri

Belo Horizonte

2013

Vítor Silva Barbosa

ESTUDO DA HETEROGENEIDADE DE MONÓCITOS DE CÃES INFECTADOS OU
NÃO POR *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Investigativa.

Orientador: Dr. Ricardo Gonçalves

Ricardo Gonçalves (Orientador – UFMG)

Liz Ribeiro do Valle Antonelli – CPqRR/FIOCRUZ

Ricardo Toshio Fujiwara - UFMG

Wagner Luiz Tafuri - UFMG

Belo Horizonte, 17 de dezembro de 2013.

Dedico essa dissertação à minha esposa Marta, ao meu filho Pedro, aos meus pais e irmãos e, *in memoriam*, meus avós Martinho e Bernadete

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus pela oportunidade de chegar até aqui, mesmo que por caminhos árduos, que me talharam, tornando-me uma pessoa melhor.

Aos meus pais e avós que me conduziram, apoiaram, consolaram nos momentos difíceis e deram força e incentivo para que eu concluísse essa etapa de minha vida. À minha esposa Marta que me apoiou, ajudou e acreditou na possibilidade de realização desse projeto de vida, juntamente com meu filho querido que me alegra pela sua coragem e força de vencer e superar os obstáculos que estão à sua frente. Duas pessoas que hoje são o meu mundo.

Aos colegas do Laboratório de Patologia das Leishmanioses;

Ao Professor Wagner Tafuri pelo acolhimento;

Ao Professor Ricardo Gonçalves, pelo apoio, paciência e dedicação;

À Dra. Lis Antonelli pelas colaborações tão essenciais;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico);

E a todos que ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigado!

Questionaram Mahatma Gandhi quais os fatores que destroem a humanidade. E ele respondeu:

- A Política sem princípios, o Prazer sem compromisso, a Riqueza sem trabalho, a Sabedoria sem caráter, os Negócios sem moral, a Ciência sem humanidade e a Oração sem caridade.

RESUMO

Monócitos do sangue periférico compõem o maior grupo de células progenitoras circulantes. Suas funções vêm sendo reveladas com o estudo de suas subpopulações, especialmente em humanos e camundongos, em processos patológicos provenientes de doenças crônicas não infecciosas ou infecciosas transmissíveis. Dentre essas doenças estão as leishmanioses, das quais a mais grave é a forma visceral, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Esses são parasitos intracelulares obrigatórios em células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro mamífero, como monócitos, macrófagos e células dendríticas. O cão (*Canis familiares*) representa o principal reservatório desse parasito, tendo papel central na transmissão a humanos. No Brasil, o parasito *Leishmania (Leishmania) chagasi* (sin. *L. infantum*) é o principal causador da leishmaniose visceral canina (LVA). Esse estudo objetivou caracterizar subpopulações de monócitos do sangue periférico de cães naturalmente infectados ou não infectados por *L. infantum* e comparar seus aspectos fenotípicos e funcionais. Amostras de sangue periférico foram colhidas de cães de diferentes grupos: não infectados (n=5) e infectados (assintomáticos (n=5) e sintomáticos (n=5)). As células foram marcadas por anticorpos contra as moléculas: CCR2, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CD80, CX3CR1 e MHC-II e analisadas por citometria de fluxo. 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 ferradura, 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 em forma de rim. Na análise das demais moléculas de superfície observou-se diferenças na expressão entre as populações. Em cães com LV não há diferença de frequência entre as populações, todavia há aumento da frequência de células CD14⁺ totais em cães infectados. Notamos também acentuada redução da expressão de moléculas relacionadas à ativação dos monócitos como CCR2, CD11c, CD45RO, CD62L e MHC-II, principalmente no grupo de cães sintomáticos, indicando possível inibição de sua ação no controle da doença.

Palavras-chave: Monócitos, Cão, Leishmaniose, *L. infantum*.

ABSTRACT

Peripheral blood monocytes are the largest group of circulating progenitor cells. Its functions have been revealed through the study of their subpopulations, especially in humans and mice in pathological processes from infectious or noninfectious chronic diseases. Among the studied infectious diseases there is the leishmaniasis, which the most severe is the visceral leishmaniasis. Protozoa of the genus *Leishmania* are obligate intracellular parasites in cells of the mononuclear phagocyte system of the mammalian host, as monocytes, macrophages and dendritic cells. The dog (*Canis familiaris*) is the main reservoir of this parasite, having a central role in the transmission to humans. In Brazil, the parasite *Leishmania (Leishmania) chagasi* (*syn. L. infantum*) is the main cause of the canine visceral leishmaniasis. This study aimed to characterize subpopulations of peripheral blood monocytes from uninfected or *L. infantum* naturally infected dogs and compare their phenotypical and functional aspects. Blood samples were collected from dogs from different groups: uninfected (n=5) and infected (asymptomatic (n=5) and symptomatic (n=5) with *L. infantum*). Cells were labeled by antibodies against the molecules: CCR2, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CD80, CX3CR1 e MHC-II and the samples were obtained by flow cytometry. CD14⁺ cells represented about 4% of the total leucocytes and when analyzing those cells, it was observed two distinct populations according to CD14 expression: a population with high expression of CD14 (CD14^{hi}), constituting about 90% of the monocytes showing basophilic and horseshoe-shaped nucleus with greater phagocytic capacity, and another with low expression of CD14 (CD14^{lo}), constituting about 10% of monocytes, showing less basophilic and kidney-shaped nucleus. The analysis of the other molecules showed different levels of expression between the two populations. In dogs with visceral leishmaniasis no difference in frequency was observed between populations, however there is an increase of CD14⁺ cells in infected dogs. We also noticed marked reduction of the expression of molecules related to the activation of monocytes (CCR2, CD11c, CD45RO, CD62L and MHC-II), especially in the group of symptomatic dogs, indicating a possible inhibition on the capacity of these cells to control the disease.

Keywords: Monocytes, Dog, Leishmaniasis, *L. infantum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Estratégia de seleção (*gating strategy*) adotada para caracterização das populações. A) aquisição de células (1×10^6 eventos) em função do tempo; B) Para avaliar os leucócitos foi realizada a seleção das células de interesse após exclusão de *doublets*; C) Seleção de leucócitos; D) Células CD14⁺; E) seleção CD14⁺/SSC e F) em vermelho CD14^{hi}SSC^{hi}; em azul CD14^{hi}SSC^{lo} e em alaranjado CD14^{lo}SSC^{lo}. *Dotsplot* representativos de um animal não infectado. G) média da porcentagem de monócitos sobre leucócitos totais de cães do grupo Controle. 34
- FIGURA 2 - Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises estatísticas, comparadas entre as populações de monócitos CD14^{hi}SSC^{hi}, CD14^{hi}SSC^{lo}, CD14^{lo}SSC^{lo}. A) CD14; B) MHC-II; C) CX3CR1; D) CD62L; E) CD11a; F) CD11b; G) CD56; H) CD16; I) CCR2; J) CD11c; K) CD80; L) CD44 e M) CD45RO. 36
- FIGURA 3 - Imagens representativas da aquisição pós-*sorting*, representando as três populações de células CD14⁺. A) CD14^{hi}SSC^{lo} (*gate* P4); B) CD14^{lo}SSC^{lo} (*gate* P5) e C) CD14^{hi}SSC^{hi} (*gate* P6). 39
- FIGURA 4 - Fotomicrografia das células obtidas por *sorting* e coradas por Panótico. Em aumento de 1000x: A) monócito CD14^{hi}; B) monócito CD14^{lo}; C-D) setas verdes indicando monócitos CD14^{lo} e setas vermelhas indicando monócitos CD14^{hi}; E) seta verde indicando monócito CD14^{lo} e seta alaranjada indicando neutrófilo. Em aumento de 400x: F) seta verde indicando monócito CD14^{lo}, seta vermelha indicando monócito CD14^{hi} e setas alaranjadas indicando neutrófilos. 39
- FIGURA 5 - Imagem representativa das populações de monócitos caninos de acordo com a expressão de CD14 e granulosidade. Monócitos CD14^{lo} constituindo cerca de 10% e monócitos CD14^{hi} constituindo cerca de 90%. 40
- FIGURA 6 - Monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo} apresentaram capacidade fagocítica de formas promastigotas de *L. infantum*. A) porcentagem de monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} com formas promastigotas aderidas; B) porcentagem de monócitos CD14^{lo}SSC^{lo} com formas promastigotas aderidas; C e E) monócitos CD14^{lo}SSC^{lo} com formas promastigotas aderidas; B e F) monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} com formas promastigotas aderidas. 41
- FIGURA 7 - Imagens representativas do aumento de monócitos caninos em cães infectados de acordo com a expressão de CD14 e da porcentagem de monócitos sobre o total de eventos analisados. Em A (Controle), B (Assintomático) e C (Sintomático), aumento da população CD14⁺ representado pela quantidade e intensidade dos *dots* em vermelho. D) monócitos representam cerca de 4% no grupo Controle; E) monócitos representam cerca de 7% no grupo Assintomático; F) monócitos representam cerca de 9% no grupo Sintomático. G) gráfico de comparação da porcentagem de monócitos entre cães do grupo Controle (cor roxa), Assintomático (cor verde) e Sintomático (cor amarela). 42
- FIGURA 8 - Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises 44

estatísticas, comparadas entre os grupos de cães Controle (cor roxa), Assintomáticos (cor verde) e Sintomáticos (cor amarela). A) CD14 B)CCR2; C) CD11b; D) CD11a; E) CD62L e F) MHC-II.

FIGURA 9 -

Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises estatísticas, comparadas entre os grupos de cães Controle (cor roxa), Assintomáticos (cor verde) e Sintomáticos (cor amarela). A) CD11c; B) CD80; C) CD44; D) CD45RO; E) CD56; F) CD16 e G) CX3CR1. Letras diferentes significam diferença estatística.

45

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)

CCZ - Centro de Controle de Zoonoses

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

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

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

DAB - *Diaminobenzidin*

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetraacético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

EUA – Estados Unidos da América

FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FITC - *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

FSC - *Foward Scatter* (Dispersão Frontal)

Foxp3 - Fator *forkhead box P3*

g – Gravidade

Gp63 - Glicoproteína 63

HE - Hematoxilina e Eosina

HLA-DR - *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno Leucocitário Humano)

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IHQ – Imuno-histoquímica

IFN- γ - *Interferon Gamma*

Ig – Imunoglobulina

IL - Interleucina

Kg – Quilograma

LPG – Lipofosfoglicano

LPL – Laboratório de Patologia das Leishmanioses

LPS - Lipopolissacarídeo

LSA - *Leishmania Soluble Antigen* (Antígeno Solúvel de *Leishmania*)

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

M – Molar

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

MG – Minas Gerais

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

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mRNA – *Ribonucleic Acid Messenger* (Ácido ribonucléico mensageiro)

ng - Nanograma

NO - *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

OMS - Organização Mundial de Saúde

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

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

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

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

pH – potencial de Hidrogênio

PPD - *Purified Protein Derivative of Tuberculin*

RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta

RPM – Rotações por Minuto

SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear

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)

TLR - *Toll Like Receptor* (Receptor do Tipo Toll)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO - World Health Organization

LISTA DE ABREVIATURAS

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

L. - *Leishmania*

Lu. – *Lutzomyia*

min. – minuto(s)

sin./syn. (sinonímia/synonymy)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO	18
2.1 Leishmaniose visceral canina	18
2.1.1 <i>Ciclo biológico da Leishmania infantum</i>	19
2.1.2 <i>Resposta Imune</i>	19
2.2 Monócitos	21
2.2.1 <i>Funções dos monócitos</i>	21
2.2.2 <i>Monócitos e seus principais marcadores</i>	22
2.2.3 <i>Heterogeneidade dos monócitos</i>	23
2.2.3.1 <u>Diferenças funcionais entre as subpopulações</u>	25
2.3 Monócitos caninos	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Comitê de ética	28
4.2 Grupos experimentais	28
4.2.1 <i>Grupo Controle - Cães não infectados</i>	28
4.2.2 <i>Grupo infectado - Cães naturalmente infectados</i>	28
4.3 Exame clínico	29
4.4 Testes sorológicos - ELISA e RIFI	29
4.5 Testes parasitológicos	29
4.5.1 <i>Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase chain reaction - PCR)</i>	29
4.5.2 <i>Imuno-histoquímica (IHQ)</i>	30

4.6 Análise fenotípica por citometria de fluxo	30
4.7 <i>Sorting</i> e avaliação citológica (<i>cytospin</i>)	31
4.8 Teste de fagocitose	31
4.9 Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33
5.1 Caracterização dos monócitos (Avaliação quantitativa e qualitativa de subpopulações de monócitos)	33
<i>5.1.1 Expressão de CD14</i>	33
<i>5.1.2 Análise fenotípica</i>	35
5.2 Morfologia celular	38
5.3 Teste de fagocitose dos monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo}	41
5.4 Monócitos na Leishmaniose visceral canina	42
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	66

1. INTRODUÇÃO

Monócitos do sangue periférico compõem o maior grupo de células progenitoras circulantes. São capazes de migrar para os tecidos diferenciando-se em macrófagos e células dendríticas (DCs – *Dendritic Cells*) e desempenham importante papel na inflamação, reparo tecidual, imunidade e homeostase (Gordon e Taylor, 2005; Auffray, Sieweke e Geissmann, 2009; Yona e Jung, 2010). Assim como linfócitos, os monócitos apresentam heterogeneidade, mostrando singularidades quanto à sua diferenciação, fenótipo e destino. Suas funções vêm sendo reveladas com o estudo de suas subpopulações, principalmente em humanos e camundongos, em processos patológicos provenientes de doenças infecciosas transmissíveis ou não e doenças crônicas não transmissíveis (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007; Cros *et al.*, 2010; Saha e Geissmann, 2011; Appleby *et al.*, 2013). Dentre as doenças infecciosas estudadas estão as leishmanioses, causadas por protozoários digenéticos, do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastidae (Ross, 1903). Esse gênero está distribuído pela Ásia, Europa, Oriente Médio e Américas causando as diversas formas da doença (Figueiredo *et al.*, 2013), das quais a mais grave é a leishmaniose visceral que leva a maioria dos indivíduos infectados à morte no período de dois anos, caso não sejam tratados (WHO, 2011).

No Brasil, o parasito *Leishmania (Leishmania) chagasi* (sin. *L. infantum*) é o principal causador da leishmaniose visceral canina (LVC) e o flebótomo hematófago *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor dessa zoonose. O cão (*Canis familiares*) representa importante reservatório desse parasito, tendo papel central na transmissão a humanos, principalmente em regiões de degradação ambiental associadas à migração humana e ao processo de urbanização, representando sério problema de saúde pública (Deane, Deane e Alencar, 1955; Pinto *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013).

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro mamífero, dentre eles os monócitos. Órgãos como linfonodos, baço, medula óssea, fígado, trato gastrointestinal e pele, pelo fato de terem quantidade considerável dessas células, estão associados às lesões histopatológicas clássicas observadas na LVC, (Anosa e Idowu, 1983; Keenan *et al.*, 1984; Tafuri *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2013). Monócitos e macrófagos estão relacionados também à eliminação da *Leishmania spp.* através da síntese de citocinas, das quais, TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*) e IFN- γ (*Interferon-Gamma*) desempenham papel central, induzindo formação e liberação de espécies reativas do oxigênio e óxido nítrico (ROS - *Reactive Oxygen Species* e NO -

Nitric Oxide, respectivamente) que controlam a proliferação e eliminam o parasito (Titus, Sherry e Cerami, 1989; Kavooosi, Ardestani e Kariminia, 2009; Goncalves *et al.*, 2011; Diaz-Gandarilla *et al.*, 2013).

Apesar da importância do cão na epidemiologia da LV, pouco se sabe sobre monócitos caninos e sua resposta frente à infecção por *Leishmania spp.* ou mesmo se existem subpopulações, como ocorre em outras espécies. Estudos recentes demonstram alterações na expressão de receptores relacionados aos monócitos do sangue periférico em cães naturalmente infectados com *L. infantum* (Reis *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2011; Daneshvar *et al.*, 2012), porém não apresentam caracterização fenotípica dessas células e suas possíveis alterações durante a doença. Esse trabalho, portanto objetivou descrever subpopulações de monócitos do sangue periférico de cães quanto à expressão de suas principais moléculas de superfície e dessa forma, determinar a função dessas células e as alterações fenotípicas que ocorrem em cães com leishmaniose visceral.

2. REVISÃO DA LITERTURA

2.1 Leishmaniose visceral canina

Leishmaniose visceral (LV) é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente a população pobre de países em desenvolvimento por estar associada à desnutrição, fraqueza do sistema imunológico, habitações precárias e falta de recursos. Por ano, ocorrem cerca de 500.000 novos casos em humanos distribuídos pelos 60 países onde é endêmica, sendo 90% deles na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (WHO, 2011). Também conhecida como Kala azar, é transmitida durante repasto sanguíneo pelo flebótomo hematófago infectado e o cão infectado apresenta síndrome clínica caracterizada por atrofia muscular, perda de peso, lesões na pele e onicogribose, porém alguns indivíduos não apresentam esses sinais, mesmo após meses ou anos de infecção (Pinelli *et al.*, 1994; Dantas-Torres, 2009; Matlashewski *et al.*, 2011).

Várias espécies de *Leishmania* já foram isoladas ou molecularmente caracterizadas de cães com leishmaniose na América do Sul, tais como, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. colombiensis*, *L. infantum* (syn. *L. chagasi*), *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. pifanoi* (Mayrink *et al.*, 1979; Tolezano *et al.*, 2007; Dantas-Torres, 2009).

O parasito *L. infantum*, espécie causadora da LVC na América do Sul, tem o cão como seu principal reservatório e a estimativa é de milhões de animais infectados nesta região (Baneth *et al.*, 2008). A incidência de infecção humana está diretamente relacionada ao número de cães infectados. Com base na similaridade dos sinais clínicos o cão tem sido sugerido como um bom modelo para compreender a patogênese da doença humana uma vez que esses animais apresentam considerável número de sinais e características também observados na infecção humana (Moreno e Alvar, 2002). Pesquisas afirmam que a maior parte dos cães infectados pela *L. infantum* são susceptíveis e acabam por desenvolver a doença patente, enquanto uma pequena porcentagem se mostra resistente compreendendo um grupo em que não há manifestação dos sinais ou, caso ocorra, há espontânea remissão destes. A apresentação mais evidente da doença nos cães é a leishmaniose viscero-cutânea, onde se observam alterações do tegumento, renais, hepáticas, esplênica e oculares (Nieto *et al.*, 1992; García-Alonso *et al.*, 1996).

2.1.1 Ciclo biológico da *Leishmania infantum*

O parasito *L. infantum* apresenta dois estágios principais distintos em seu ciclo de vida: um como promastigota, forma flagelada, fusiforme e móvel, de vida extracelular no trato digestório do inseto vetor e outro como amastigota, forma aflagelada, imóvel e arredondada, de vida intracelular no hospedeiro mamífero (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

A fêmea do vetor flebótomo *Lutzomyia longipalpis* é um hematófago obrigatório. Em cães, por exemplo, sugam o sangue preferencialmente em áreas da pele onde há poucos pelos, como a região da ponte nasal, pina da orelha, região inguinal e perianal. O sangue do cão infectado por *L. infantum* contendo formas amastigotas entra, portanto no sistema digestório do inseto vetor. No intestino do inseto as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, de forma ovoide e de pouco movimento. Após a digestão do sangue ingerido as formas procíclicas transformam-se em promastigotas metacíclicas, forma infectante para o hospedeiro mamífero, que migram para faringe e probóscide do inseto. No repasto sanguíneo, as formas amastigotas são inoculadas, fagocitadas por células do SFM, inativam os fagócitos por estarem protegidas das enzimas líticas nos fagolisossomos, principalmente pelas moléculas de lipofosfoligãnos (LPG) e pela glicoproteína gp63 (Killick-Kendrick, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Dentro das células do hospedeiro, as amastigotas se multiplicam exponencialmente até romper as células infectadas e serem fagocitadas por outras células, se disseminando pelo organismo (Killick-Kendrick, 1999; Cunningham, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Um flebótomo infectado é capaz de inocular de uma a 1000 formas promastigotas metacíclicas em cada repasto sanguíneo (Warburg *et al.*, 1986).

2.1.2 Resposta imune

A resposta imune contra *Leishmania* é regulada, em grande parte, por células T CD4 ou linfócitos T auxiliares (Th – *T helper*) que têm a capacidade de produzir variedade de citocinas em resposta a esses antígenos (London, Abbas e Kelso, 1998). Estudo realizado por Jaffe (1999), com o objetivo de se verificar o perfil da resposta imunológica na LV, mostrou no modelo murino que os animais apresentavam cura quando desenvolviam resposta predominantemente celular do tipo Th-1. Os fatores que determinam o desenvolvimento patente das manifestações clínicas da LV não estão completamente identificados. A deficiente produção de IFN- γ , após a exposição

ao antígeno *Leishmania*, é um fator relatado normalmente e está associado com incremento de células T CD4 expressando um perfil de citocinas Th-2, com a produção de IL-4 e IL-10, mas não de IL-2 (Interleucina-2) ou IL-12 (Gama *et al.*, 2004).

Segundo Pinelli *et al.* (1994), em cães, a infecção sintomática está associada com a crescente produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta imune celular periférica, associada à decrescente produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α com ineficiente eliminação do parasito. Desta forma, cães sensíveis à LV tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, enquanto que, os resistentes apresentam expressiva resposta celular (Ferrer *et al.*, 1995). Entretanto, até o momento, o exato papel das citocinas do subtipo Th-2, em cães portadores de LV, não está completamente definido. Enquanto há uma correlação positiva entre patologia e incremento da produção de IL-10 em humanos, o envolvimento dessa citocina em cães portadores de LV ainda é controverso. Com o intuito de verificar o perfil tecidual de citocinas em cães naturalmente infectados com LV, Quinnell *et al.* (2001) mediram os níveis de mRNA para IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 e IL-18 em aspirados de medula óssea. Os níveis de IFN- γ mostraram-se mais elevados nos cães com LV em comparação aos cães saudáveis. Observou-se, também, correlação positiva significativa entre a presença de mRNA para IFN- γ e os níveis de IgG1 anti-*Leishmania*. Contrariamente, não houve correlação com os níveis de IgG2, IgG4 e resposta linfoproliferativa ao antígeno de *Leishmania*.

A LVC está associada tanto à ativação policlonal das células B, por componentes antigênicos do parasito, quanto à efetiva resposta clonal específica com produção de imunoglobulinas (Ig) anti-*Leishmania* (Quinnell *et al.*, 2003). Martinez-Moreno *et al.* (1993), em pesquisa avaliando a atividade de linfócitos T e B em cães infectados por LV, concluíram que a presença da *Leishmania* leva a ativação dos linfócitos B com posterior transformação destes em plasmócitos. A resposta humoral específica da LVC caracteriza-se pela produção de elevados níveis de IgG anti-*Leishmania*, permitindo ampla utilização do diagnóstico sorológico (Canãvate *et al.*, 2005). Assim sendo, técnicas sorológicas constituem importantes ferramentas no diagnóstico e estudo da doença, estando fundamentadas na detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* (Gradoni, 2002).

2.2 Monócitos

Integrantes do SFM, os monócitos são originados na medula óssea a partir de um progenitor mielóide comum e liberados na corrente sanguínea após sua formação. Correspondem a aproximadamente 10% do total de leucócitos circulantes em humanos, 4% em camundongos (Gordon e Taylor, 2005; Yona e Jung, 2010) e segundo o Manual de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (RS) (2007) de 3-10% do total de leucócitos do sangue periférico em cães.

2.2.1 Funções dos monócitos

O sistema imunológico dos mamíferos os protege de uma gama de organismos patogênicos, dos mais comuns aos mais raros, prevalentes em seu meio ambiente representados aqui por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs – *Dendritic Cells*) que são importantes mediadores celulares na resposta imune inata. Monócitos do sangue periférico, entretanto, vem sendo cada vez mais, relacionados à defesa do organismo contra ampla variedade de microrganismos patogênicos, aliando resposta inflamatória e imunidade inata à imunidade adaptativa, pois são capazes de apresentar antígenos e ativar linfócitos T (Auffray, Sieweke e Geissmann, 2009). Monócitos são fagócitos capazes de internalizar e eliminar bactérias, vírus e parasitos (Cros *et al.*, 2010). Considerados o maior grupo de células progenitoras circulantes, migram dos vasos sanguíneos para os tecidos, diferenciando-se em macrófagos e DCs contribuindo assim na defesa, remodelamento e reparo tecidual (Serbina *et al.*, 2008; Auffray, Sieweke e Geissmann, 2009).

Monócitos apresentam em sua constituição, ampla variedade de receptores do tipo *scavengers*, que reconhecem entre outros, lipídios, células em processo de morte, restos celulares e metabólitos. Apresentam também receptores para padrões moleculares associados a patógenos e a danos, PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e DAMPs (*Damage-Associated Molecular Pattern Molecules*). Uma vez estimulados, esses receptores induzem a fagocitose de patógenos juntamente com produção de ROS, NO, aumento da mieloperoxidase e síntese de citocinas pró-inflamatórias, ativando assim a capacidade microbicida dos monócitos (Serbina *et al.*, 2008; Saha e Geissmann, 2011). Porém essas mesmas moléculas estão relacionadas à patogênese de doenças infecciosas (Getts *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2011) e inflamatórias como artrite, aterosclerose, diabetes do tipo I e II, doenças cardiovasculares e câncer (Gacka *et al.*, 2010; Woollard e Geissmann, 2010; Feng *et al.*, 2011; Hilgendorf e Swirski, 2012; Hettinger *et al.*, 2013).

2.2.2 Monócitos e seus principais marcadores

Monócitos humanos e bovinos são identificados pela expressão de CD14, molécula de superfície constituinte do complexo receptor de lipopolissacarídeos, juntamente com TLR4 (*Toll Like Receptor 4*) e a proteína MD-2 (*Lymphocyte Antigen 96*) (Shimazu *et al.*, 1999) e pela presença de expressão de CD16 (FcγRIII), receptor de baixa afinidade da fração cristalizada (Fc) da imunoglobulina G (IgG) (Hussen *et al.*, 2013). A expressão de CD14 vem sendo relacionada à maturidade do monócito, isto é, quanto maior a expressão de CD14 maior o grau de maturidade. O mesmo é descrito quanto expressão de CD56, molécula de aderência célula-célula, relacionada a monócitos inflamatórios em humanos (Grip *et al.*, 2007). Em murinos os monócitos são classificados de acordo com a expressão de Gr1 (*Granulocyte-Differentiation Antigen-1*), relacionada à diferenciação de neutrófilos (Hestdal *et al.*, 1991). Gr1 é um epitopo presente tanto na molécula Ly6C (*Lymphocyte Antigen 6C*) quanto na Ly6G (*Lymphocyte Antigen 6G*), ambas podem ser utilizadas como marcadores, porém Ziegler-Heitbrock *et al.* (2010), considerem o uso preferencial de Ly6C como marcador. A expressão de MHC-II, molécula responsável pela apresentação de antígenos, em ambas as espécies, é indicativo de ativação, observado principalmente após migração para o tecido durante processos inflamatórios, juntamente com expressão aumentada de CD11c (CR4), molécula de aderência ao endotélio e receptora do fator C3b do complemento inativado (iC3b) (Gordon e Taylor, 2005).

A ativação de monócitos também vem sendo relacionada à alta expressão de outras moléculas, tais quais: CCR2 (*C-C Chemokine Receptor Type 2*) ou CD192, receptor da quimiocina CCL2 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 2*) ou MCP-1, responsável por recrutar monócitos para o local inflamado (Geissmann, Jung e Littman, 2003); CD62L e CD44, moléculas relacionadas à aderência celular e receptora de ácido hialurônico, respectivamente, também são relacionados à ativação monocítica e migração para o sítio inflamatório, assim como à recirculação para órgãos linfoides (Xu *et al.*, 2008); CD45RO, que em monócitos é relacionada à população produtora de altos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α (Brichard *et al.*, 2001); e CD80 (B7-1) que age em conjunto com CD86 (B7-2), molécula coestimuladora durante apresentação antigênica a linfócitos, ligante ao CD28 e CTLA-4.

Monócitos também expressam a molécula CX3CR1 (*CX3C Chemokine Receptor 1*), receptora de fractalquina (CX3CL1 - *Chemokine (C-X3-C motif) Ligand 1*), cuja função está relacionada à aderência ao endotélio e migração dessas células para o tecido, independente da presença de inflamação (Clark, Staniland e Malcangio,

2011; Shi e Pamer, 2011). A aderência ao endotélio tem importância destacada quanto à migração para o tecido, principalmente durante processos inflamatórios. A molécula CD11a (LFA-1 - *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*), ligante de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), desempenha papel central na aderência celular ao endotélio ativado pelas citocinas IL-1 β e TNF- α , facilitando a migração para o tecido (Dransfield *et al.*, 1992; Cros *et al.*, 2010), papel também desempenhado pelo CD11b (CR3/MAC-1), receptor do fator C3bi do complemento.

2.2.3 Heterogeneidade dos monócitos

O termo monócitos (mono = um, citos = 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, fenótipo, tamanho, granulosidade e perfil genético (Yona e Jung, 2010). Morfológicamente, 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 e Swirski, 2012).

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 DCs, tornado difícil classificá-los unicamente por análise histológica (Van Furth *et al.*, 1972; Figdor *et al.*, 1982).

Estudos sobre a biologia dos monócitos apontaram variações fenotípicas quanto à expressão dos receptores de superfície em várias espécies. Em humanos, monócitos foram inicialmente classificados através da expressão de CD14 (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007), e posteriormente, de CD16. Dessa forma, identificaram-se duas populações principais de monócitos: uma apresentando alta expressão de CD14 e não expressando CD16 (CD14^{hi}CD16⁻) constituindo 90-95% do total de monócitos circulantes e outra com baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD16 (CD14^{lo}CD16^{hi}) constituindo 5-10% do total, nomeadas respectivamente de monócitos “clássicos” e “não clássicos”. Os clássicos foram assim chamados por serem a maior população e estarem relacionados à resposta inflamatória, expressando CCR2 e CD62L com baixos níveis de CX3CR1, e os não clássicos por serem a minoria e estarem relacionados à reposição de células residentes nos tecidos, expressando CX3CR1 e CD11a (Gordon e Taylor, 2005; Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007). Há ainda a descrição de uma terceira população caracterizada pela

expressão de CD14^{High} e CD16⁺ com um perfil inflamatório (Rothe et al., 1996; Tanaka et al., 1999), chamados de monócitos intermediários (Ziegler-Heitbrock et al., 2010; Ziegler-Heitbrock e Hofer, 2013). Esses mesmos autores também descreveram uma população CD16⁺ com expressão pouco perceptível de CD14 (CD14^{dim}CD16⁺), que assim como CD14^{High}CD16⁺, foi considerada um subpopulação de monócitos CD16⁺. Mais tarde os monócitos CD16⁺, foram divididos em quatro populações distintas: com alta expressão de CD14 e baixa expressão de CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺); alta expressão de CD14, CD16 e HLA-DR (CD14⁺⁺CD16⁺⁺HLA-DR^{hi}); uma expressando CD14 e com alta expressão de CD16 (CD14⁺CD16⁺⁺) e uma população com baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD16 (CD14^{dim}CD16⁺⁺). Todas essas populações expressam CX3CR1 (Appleby et al., 2013).

Monócitos humanos se diferenciam dos murinos em relação à expressão de moléculas de superfície, como por exemplo, CD11b, CD14 e CD11c, presentes em humanos e F4/80 e CD11b, em camundongos (Muller, 2001). Segundo Geissmann, Jung e Littman, 2003, em camundongos existem duas populações descritas: a primeira, constituída de monócitos maiores e mais granulosa e de vida curta, expressa a molécula de superfície Gr1 (Hestdal et al., 1991). Essa molécula, com função desconhecida, está presente em cerca de 50% da população de monócitos do sangue periférico de camundongos, distinguindo-os fenotipicamente da segunda população: Gr1⁻, população de 50% que não expressam tal molécula (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007).

A heterogeneidade de monócitos foi também descrita em ratos, porcos e bovinos. Em ratos com base na expressão da molécula CD43. Duas populações são descritas, sendo uma com alta expressão de CD43, positiva para CX3CR1 e CD11c (CD43^{hi}CX3CR1⁺CD11c⁺) e negativa para CCR2 (CCR2⁻), constituindo cerca de 80-90% da população de monócitos. E outra com baixa expressão de CD43, negativa para CD11c e com baixos níveis de expressão de CX3CR1 (CD43^{lo}CX3CR1^{lo}CD11c⁻), porém positiva para CCR2⁺, constituindo cerca de 10-20% dos monócitos do sangue periférico (Yrliid, Jenkins e Macpherson, 2006). Em suínos são descritas quatro populações baseado na expressão de SLA-DR (*Swine Leucocyte Antigen DR*), CD14 e CD163. Duas populações positivas para CD163 e SLA-DR, porém uma negativa e outra positiva para CD14. E duas negativas para CD163 e positivas para CD14, sendo uma positiva para SLA-DR e outra negativa (Chamorro et al., 2005). Em bovinos as populações de monócitos são distribuídas da mesma forma que em humanos, com base na expressão de CD14 e CD16, apresentando as mesmas três populações principais: monócitos clássicos (CD14^{hi}CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{lo}CD16⁺) (Hussen et al., 2013).

2.2.3.1 Diferenças funcionais entre as subpopulações

Monócitos são funcionalmente distintos e isso vem sendo demonstrado através de ensaios funcionais e análises fenotípicas dessas células no sangue periférico e em lesões de diversas doenças (Shi e Pamer, 2011; Wong *et al.*, 2012). As populações CD14^{hi}CD16⁻ e Gr1⁺, em humanos e camundongos respectivamente, são relacionados à processos inflamatórios. Essas células expressam moléculas como CCR2, CD62L, baixos níveis de CX3CR1 e tem sido consideradas a principal fonte de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 (Geissmann, Jung e Littman, 2003; Serbina *et al.*, 2003; Sunderkotter *et al.*, 2004; Serbina e Pamer, 2006). 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, além de aumentar a expressão de MHCII, CD80, CD86 e CD11c, todos marcadores de ativação de monócitos inflamatórios (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007). 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. O mesmo foi demonstrado no controle e resistência ao *Toxoplasma gondii*, onde camundongos CCR2^{-/-} apresentam-se susceptíveis e não controlaram a doença (Dunay *et al.*, 2008). Estudos recentes mostraram também que essas células são atraídas rapidamente para o foco de infecção e que, *in vitro*, são capazes de matar parasitos de *Leishmania major* através da produção de ROS (Goncalves *et al.*, 2011). Na análise do sangue periférico de mulheres com câncer de mama, foi observado aumento na população de monócitos CD16⁺, principalmente no período inicial da doença, e sua proliferação é possivelmente causada pelo aumento na produção de CCL2 (Feng *et al.*, 2011).

A população não clássica de monócitos humanos (CD14^{lo}CD16^{hi}) e de camundongos (Gr1⁻), não expressa CCR2, entretanto expressa altos níveis de CX3CR1 (Cros *et al.*, 2010). Esses monócitos aderem à face luminal do endotélio, e utilizando-se das moléculas CX3CR1 e CD11a, movimentam-se ao longo da superfície endotelial, mesmo contra o fluxo sanguíneo, podendo migrar para o tecido, processo denominado de patrulhamento. Logo, esses monócitos recebem o nome de “Patrulheiros” ou “Patrulhadores” (Shi e Pamer, 2011). Aufray *et al.* (2007) mostraram, em infecção por *Listeria monocitogenes*, que os monócitos realizam o patrulhamento dos vasos e em vista de sinal de perigo, guiado por quimiotáticos, realizam a transmigração através do endotélio, chegando antes de outras células ao local da infecção. Pouco se sabe sobre as funções dos monócitos “Patrulhadores”, mas a

esses vêm sendo associada baixa produção de TNF- α e alta produção de IL-10 (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007; Skrzeczynska-Moncznik *et al.*, 2008). Camundongos CX3CR1^{-/-}, com lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono (CCl-4), apresentam aumento nos níveis intra-hepáticos de CCL2 e TNF- α , e baixos níveis de IL-10, indicando a função protetora dessas monócitos por se diferenciarem em macrófagos com perfil anti-inflamatório (Karlmark *et al.*, 2010).

2.3 Monócitos caninos

Monócitos de cão vêm sendo descritos como uma única população de células mononucleares do sangue periférico (PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), inicialmente distinguidas de linfócitos através da análise por citometria de fluxo, por seu tamanho e granulosidade (Sampaio *et al.*, 2007). Em estudos mais recentes, monócitos caninos são classificados como uma população de PBMC que se distingue de linfócitos pela maior granulosidade e pela expressão de CD14 (Amorim *et al.*, 2011) e, além disso, expressam outras moléculas de superfície como MHC-II, CD1c, CD80/CD86, CD11b/CD18, CD45 e CD44 (Stein *et al.*, 2008). Entretanto não existem estudos que demonstrem uma divisão dos monócitos caninos em subpopulações, fenotipicamente e funcionalmente distintas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar subpopulações de monócitos do sangue periférico de cães infectados ou não por *Leishmania infantum* e determinar suas funções e seus marcadores relacionados à resistência e susceptibilidade à doença.

3.2 Objetivos Específicos

1. Correlacionar o estado clínico dos cães aos dados obtidos na citometria de fluxo.
2. Avaliar quantitativamente e qualitativamente subpopulações de monócitos do sangue periférico de cães normais e com LV, baseados na frequência dessas células e na expressão de CCR2, CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD16, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CD80, CX3CR1 e MHC-II;
3. Isolar e caracterizar morfológicamente as populações de monócitos do sangue periférico de cães.
4. Caracterizar funcionalmente as populações de monócitos do sangue periférico de cães, quanto a sua capacidade de interagir e fagocitar formas promastigotas de *L. infantum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 199/2013). Todos os procedimentos envolvendo os animais foram conduzidos de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Grupos experimentais

4.2.1 Grupo Controle - Cães não infectados

Cinco cães de idade não definida, negativos para infecção por *Leishmania* foram doados pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Carandaí, Minas Gerais. Como critério de inclusão, esses animais receberam tratamento anti-helmíntico, antiectoparasitário e foram imunizados contra parvovírus, cinomose, leptospirose, para-influenza e hepatite (HTLP5CV-L vaccine PfizerH). Eles foram assim mantidos por um período de 30 dias no canil do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em Belo Horizonte - MG. Ração comercial e água foram fornecidos *ad libitum*. Para os testes sorológicos (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e RIFI (Reação Da Imunofluorescência Indireta) e parasitológicos (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) e (IHQ - Imuno-Histoquímica), empregados rotineiramente para diagnóstico, os cães tiveram resultado negativo.

4.2.2 Grupo infectado - Cães naturalmente infectados

Dez cães sem raça definida, naturalmente infectados com *L. infantum*, foram doados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Ribeirão das Neves, Minas Gerais. Os animais desse grupo receberam o mesmo tratamento dos cães controle, descritos no item 4.2.1. A infecção foi confirmada através dos mesmos testes empregados aos cães controle.

4.3 Exame clínico

Exame clínico foi realizado em todos os cães positivos para *L. infantum* para avaliação da condição física, sinais vitais, linfonodos periféricos (poplíteos e cervicais) e alterações dermatológicas. Os animais foram classificados de acordo com a presença ou não de sinais clínicos de LV e divididos em dois grupos: Grupo I, assintomáticos, composto por cinco cães que não exibiram sinais indicativos da LV e Grupo II, sintomático, consistindo de cinco cães que exibiram sinais clínicos incluindo linfadenomegalia e/ou alterações cutâneas (alopecia, dermatite esfoliativa seca ou ulcerações e onicogriposes), ceratoconjuntivite e caquexia.

4.4 Testes sorológicos - ELISA e RIFI

Após coagulação à temperatura ambiente, o sangue coletado foi submetido à centrifugação a 1500g durante 40min. O soro obtido foi transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5mL e congelado a -20°C até seu uso.

A detecção de anticorpos IgG específicos anti-*Leishmania*, nos soros obtidos, foram realizados pelo método de ELISA de acordo com a técnica descrita por Voller *et al.* (1979). Os antígenos utilizados foram produzidos a partir de formas promastigotas de *L. chagasi*, cepa MHOM/BR/1967/BH46, já rotineiramente utilizados no Laboratório de Sorologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG.

A RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) foi utilizada para detectar anticorpos anti-*Leishmania*. Os controles positivos consistiram de soro obtido a partir de cães infectados, ao passo que o soro de animais não infectados foi utilizado como controle negativo (Amorim *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013).

4.5 Testes parasitológicos

4.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase chain reaction - PCR)

PCR específicos realizados em amostras de pele da pua da orelha foi utilizado para confirmar a positividade dos animais para *L. infantum*. Vinte e cinco miligramas de amostras de pele da orelha foram extraídos utilizando o *DNeasyH Blood & Tissue Kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. *Primers* LV1 (59 ACGAGGTCAG CTCCACTCC 39) e LV2 (59 CTGCAACGCC TGTGTCTACG 39) utilizados para amplificação do DNA (*deoxyribonucleic acid*) são

específicos para uma sequência de DNA repetitivo em *L. infantum* (Alves *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2013).

4.5.2 Imuno-histoquímica (IHQ)

A reação imuno-histoquímica foi utilizada para realizar o diagnóstico de carga parasitária pela análise da pele da orelha. Cortes em lâminas desparafinados foram hidratados e incubados com 4% de peróxido de hidrogênio 30v/v em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a 10%, pH 7,2, seguido de incubação com soro de cabra normal (diluído 1:50). Soros heterólogos imunes dos cães naturalmente infectados com *L. infantum* (diluído 1:100 em PBS 0,01M) foram usados como anticorpos primários para reatividade cruzada (Tafari, Santos *et al.*, 2004). As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida, em seguida lavadas com PBS, incubadas com anticorpo secundário de cabra anti-rato e anti-coelho biotinizados (DAKO-Link, LSAB2 kit, Califórnia, EUA), lavadas uma vez com PBS, e incubadas com um complexo de estreptoavidina-peroxidase (DAKO-Link, LSAB2 kit, Califórnia, EUA) durante 20min à temperatura ambiente. A reação foi revelada com 0,024% de diaminobenzidina (DAB: Sigma, St. Louis, USA) e 0,16% de peróxido de hidrogênio 40v/v. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina de Harris, desidratadas, limpas e montadas com lamínulas (Tafari *et al.*, 2004; Figueiredo *et al.*, 2013).

4.6 Análise fenotípica por citometria de fluxo

Sangue periférico foi coletado em tubos a vácuo contendo K₃EDTA. Amostras do sangue foram marcadas de acordo com protocolo *BD FACS™ Lysing Solution (BD Pharmingen, #349202)*. Resumidamente, em tubos do tipo *Falcon*, 100µL de sangue total foram incubados com concentração de anticorpos previamente tituladas, à temperatura ambiente (20° - 22°C) durante 15min ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD14 PerCP-Cy™5.5 (*BD Pharmingen™*, clone M5E2), mouse anti-CD16 PE (*BD Pharmingen™*, clone 3G8), anti-HLA-DR APC (*BioLegend Inc.*, clone L243), mouse anti-dog CD11a (*©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec*, clone CA11.4D3) marcado com *Zenon®* PE, mouse anti-dog CD11b (*©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec*, clone CA16.3E10) marcado com *Zenon® Alexa Floor 647®*, anti-CD11c (*©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec*, clone CA11.6A1) marcado com *Zenon®* PE, anti-CCR2 PE (*R&D Systems, Inc.*, clone 48607), anti-CX3CR1 biotinizado (*eBioscience, Inc.*, clone 2A9-1) marcado com streptavidina APC (*Biolegend Inc.*, product #405207), anti-CD62L (*eBioscience, Inc.*, clone Dreg56), anti-

CD44 *Pacific Blue*TM (Biolegend Inc., clone IM7), Anti-CD45RO APC (eBioscience, Inc., clone UCHL1), anti-CD80 FITC (Biolegend Inc., clone 2D10) e anti-CD56 APC (eBioscience, Inc., clone B159). As hemácias foram lisadas e os leucócitos fixados adicionando solução de lise (*BD FACS*TM *Lysing Solution*), durante 10min. à temperatura ambiente e em seguida as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas por sete minutos a 1300 *rpm*, ressuspendidas em 300µL de paraformaldeído 2% e transferidas para tubos (1,2mL) para citometria de fluxo. As aquisições foram realizadas em citômetro de fluxo BD LSRFortessaTM *Cell Analyzer* (BD Biosciences) 14 cores (16 parâmetros) e os dados foram obtidos de pelo menos 1×10^6 eventos no programa *BD FACS Diva Software* (BD Biosciences), em seguida analisados com *FlowJo v8.8.7 software* (©Tree Star Inc.).

4.7 **Sorting e avaliação citológica (cytospin)**

Dez mililitros de sangue periférico foram coletados em tubos a vácuo contendo K₃EDTA e as hemácias foram lisadas com *ACK lysing buffer* (Lonza), em seguida os leucócitos foram marcados com anti-CD14 PerCP-CyTM5.5 mouse (*BD Pharmingen*TM, clone M5E2) durante 20min. em temperatura ambiente ao abrigo da luz. A amostra foi então centrifugada e o *pellet* suspenso em 2mL de PBS 10% estéril contendo 2% de BSA e 0,38% de citrato de sódio. As células foram adquiridas em um *BD Biosciences FACS Aria*TM *II cell sorter* e as populações de interesse separadas em tubos contendo PBS 10%. Suspensões celulares foram homogeneizadas e para cada citocentrifugado (*cytospin*) foram adicionados 150µL da suspensão contendo 1×10^5 células. Para isso foi utilizada uma citocentrífuga (*StatSpin CytoFuge 2 Compact Cyto centrifuge System, Iris Sample Processing - Backing Plates*) com rotação de 1.000*rpm* por dois minutos. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem por uma hora, protegidas da luz e então coradas com Panótico Rápido e analisadas por microscopia óptica de luz, para análise morfológica e contagem diferencial das células.

4.8 **Teste de fagocitose**

Para avaliarmos a interação das populações com formas promastigotas de *L. infantum*, foi coletado 1mL do sangue periférico de cães não infectados com *L. infantum*, em seguida as hemácias foram lisadas com 10mL de *ACK lysing buffer* (Lonza) e a reação de lise interrompida com 5mL de PBS 10% após 5min. As amostras foram então centrifugadas e o *pellet* de leucócitos totais ressuspendido em

1mL de meio DMEN completo. A quantidade de 1×10^5 células em 100 μ L de suspensão foi colocada sobre lamínula circular de vidro em uma placa de 24 poços. A placa com as células foi então levada à estufa, a 37°C, por um período de 30min., em seguida o meio foi completado para um volume de 500 μ L por poço e a placa levada para estufa por mais 30min. Após fixação das células na lamínula, a mesma foi lavada com PBS 10% e adicionado aos poços 1×10^6 promastigotas de *L. infantum* (cepa BH46) em suspensão de 500mL com soro de cão negativo à 5%. A placa foi levada novamente à estufa por um período de 45min. ou 2h, em seguida os leucócitos e parasitos foram fixados com metanol e as lamínulas coradas em Panótico e analisadas em microscópio de luz.

4.9 Análise estatística

Para comparação entre os grupos utilizamos o *One-way* ANOVA seguido pelo método de comparações múltiplas de *Tukey*. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional *GraphPad Prism* 5.0 adotando um nível de significância de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização dos monócitos (Avaliação quantitativa e qualitativa de subpopulações de monócitos)

5.1.1 Expressão de CD14

Após exclusão de eventos adquiridos em condições não ideais do fluxo, como possíveis bolhas de ar, através da visualização por tempo de aquisição (Fig.1A), e exclusão de grumos celulares através da seleção de *singlets* celulares (Fig.1B), observamos que no cão o perfil de distribuição dos leucócitos, de acordo com o tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*), se assemelhando ao descrito em humanos (Lyons *et al.*, 2006).

Ao analisar células CD14 positivas (CD14⁺), segundo tamanho e granulosidade, observamos que estão localizadas, principalmente, entre as populações de linfócitos (pequenos e pouco granulosos) e de neutrófilos (mais granulosos). Algumas células, no entanto, permeiam as populações de linfócitos e neutrófilos (Fig.1C e 1F), evidenciando a necessidade de distinguir essas células por marcadores específicos. Células CD14⁺ constituem cerca de 4% do total (Fig.1D) e quando avaliamos essas células em relação à granulosidade (CD14⁺/SSC), notamos três populações distintas: uma com alta expressão de CD14 e alta granulosidade (CD14^{hi}SSC^{hi}), constituindo cerca de 2% dos monócitos; outra com alta expressão de CD14 e baixa granulosidade (CD14^{hi}SSC^{lo}), constituindo cerca de 90% dos monócitos e uma com baixa expressão de CD14 e baixa granulosidade (CD14^{lo}SSC^{lo}), constituindo cerca de 8% dos monócitos (Fig.1E).

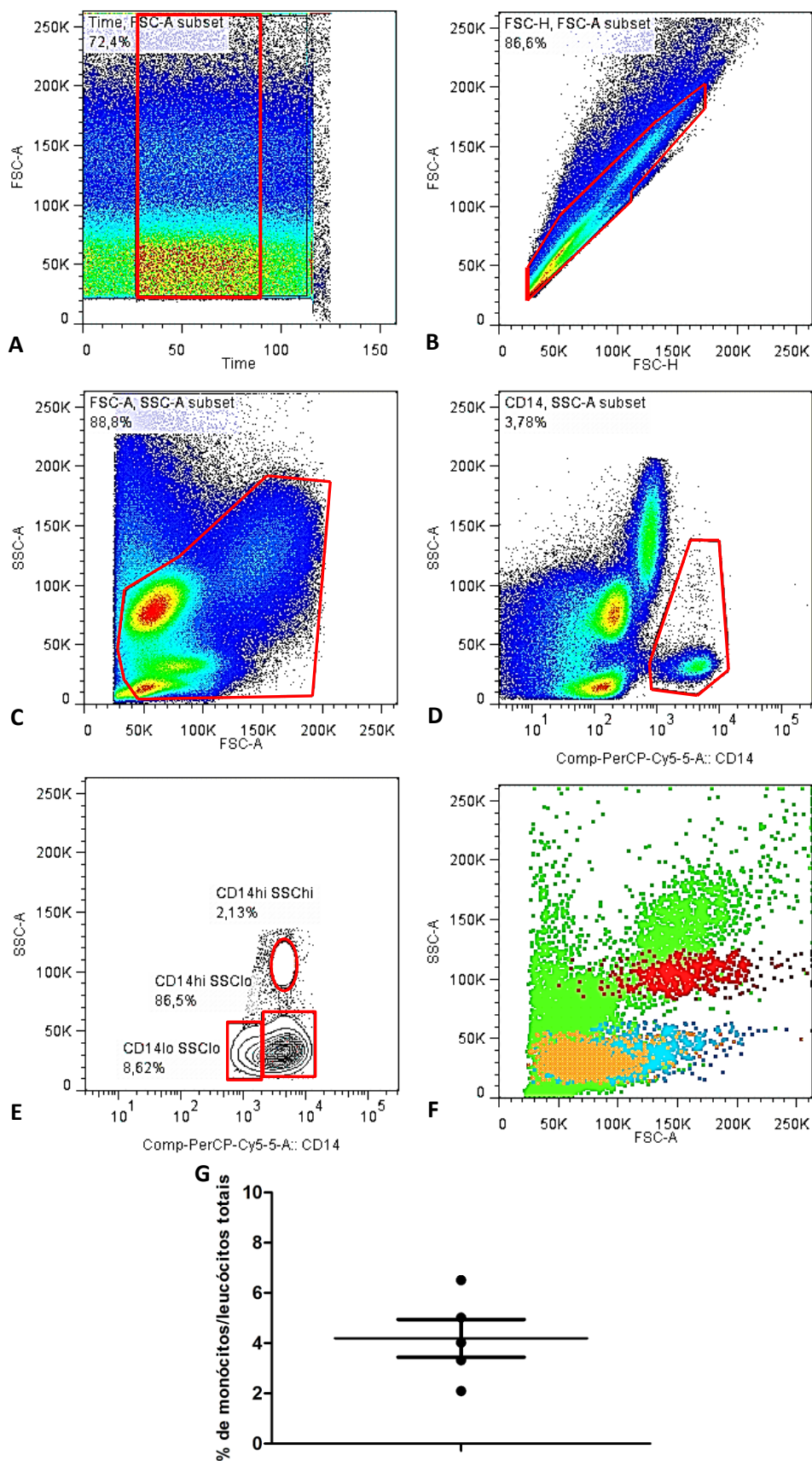


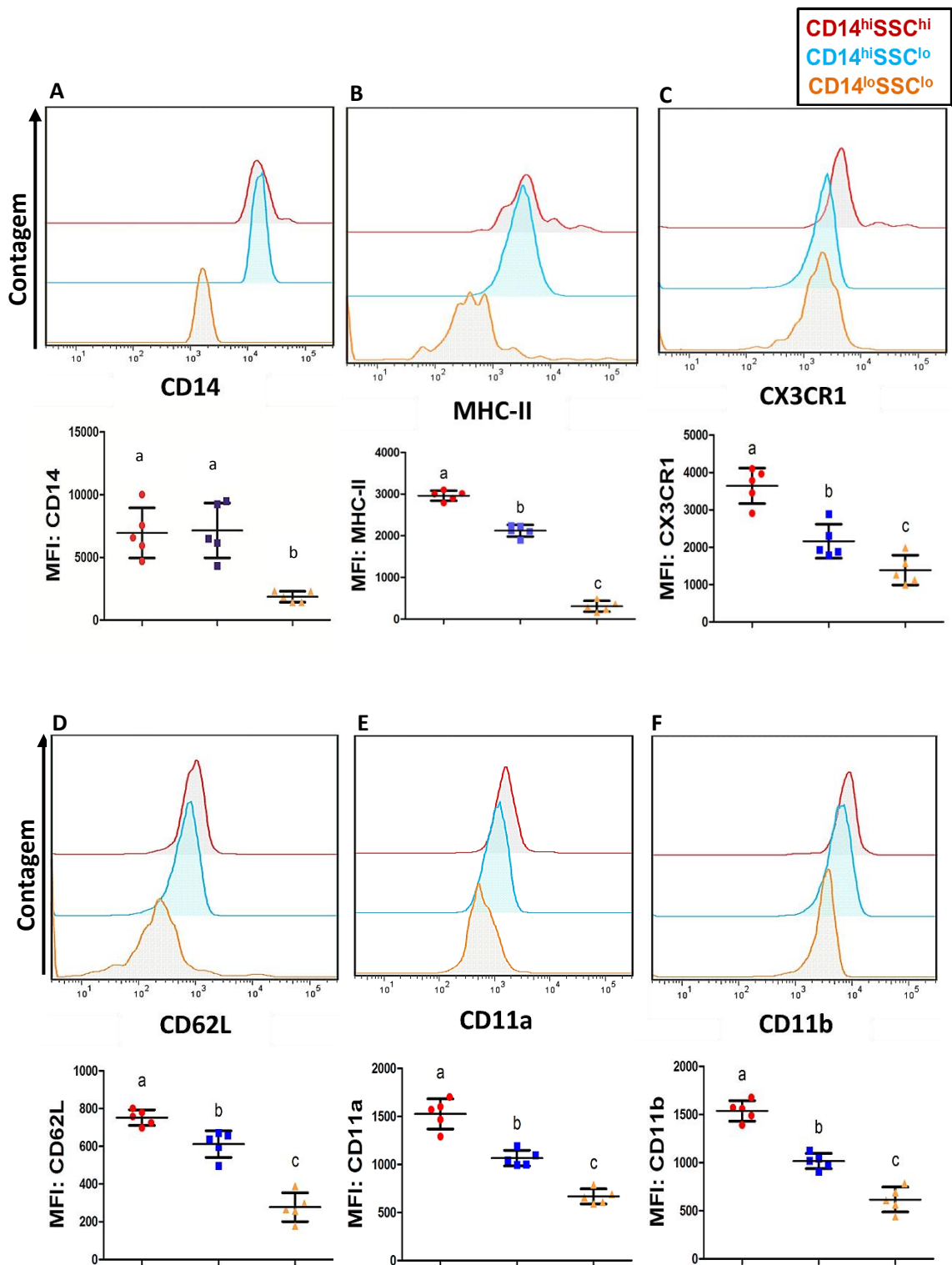
Figura 1: Estratégia de seleção (gating strategy) adotada para caracterização das populações. A) aquisição de células (1×10^6 eventos) em função do tempo; B) Para avaliar os leucócitos foi realizada a seleção das células de interesse após exclusão de *doublets*; C) Seleção de leucócitos; D) Células CD14⁺; E) seleção CD14⁺/SSC e F) em vermelho CD14^{hi}SSC^{hi}, em azul CD14^{hi}SSC^{lo} e em alaranjado CD14^{lo}SSC^{lo}. *Dotsplot* representativos de um animal não infectado; G) média da porcentagem de monócitos sobre leucócitos totais de cães do grupo Controle.

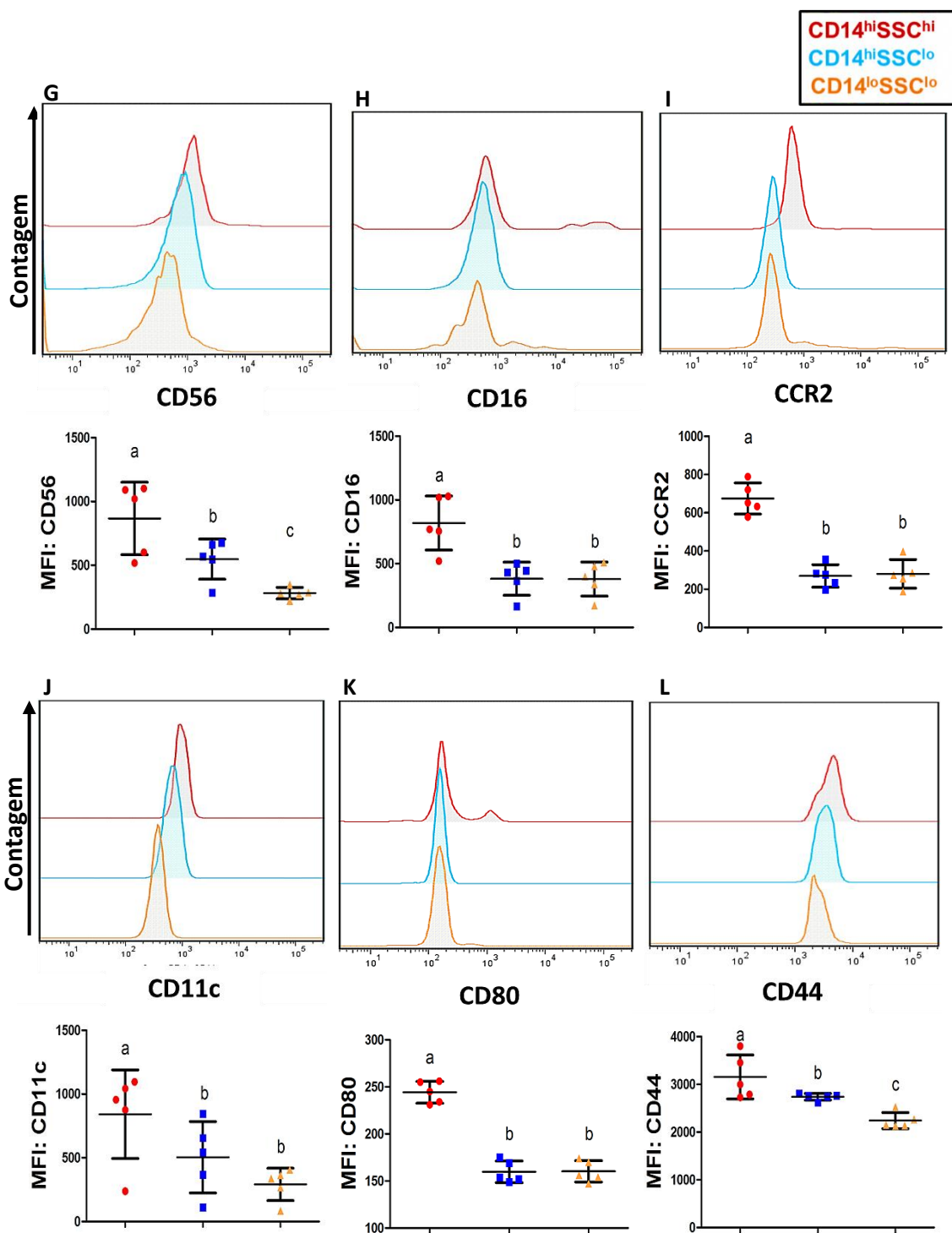
5.1.2 Análise fenotípica

Com exceção da molécula CD14, as demais moléculas (CCR2, CD11a, CD11b, CD11c, CD16, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CD80, CX3CR1 e MHC-II) tiveram frequências similares dentro das três populações acima definidas, a saber: CD14^{hi}SSC^{hi}, CD14^{hi}SSC^{lo}, CD14^{lo}SSC^{lo}, não sendo possível, portanto, definir subpopulações através da frequência dessas moléculas. Ao compararmos, entretanto, a média da intensidade de fluorescência (MFI - *Median Fluorescence Intensity*), observamos diferentes níveis constitutivos de expressão dessas moléculas entre as três subpopulações CD14⁺: MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II (MHC-II), é mais expressa nas células CD14^{hi}SSC^{hi} do que em CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo}, e mais expressa em CD14^{hi}SSC^{lo} do que em CD14^{lo}SSC^{lo} ($p < 0,0001$) (Fig.2B).

O mesmo foi observado para CX3CR1 ($p < 0,0001$) (Fig.2C), CD62L ($p < 0,0001$) (Fig.2D), CD11a ($p < 0,0001$) (Fig.2E), CD11b ($p < 0,0001$) (Fig.2F) e CD56 ($p = 0,0014$) (Fig.2G). A expressão de CD16 ($p = 0,0014$) (Fig.2H), CCR2 ($p < 0,0001$) (Fig.2I), CD11c ($p < 0,0001$) (Fig.2J), e CD80 ($p < 0,0001$) (Fig.2K) é maior em CD14^{hi}SSC^{hi} em relação a CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo} não havendo diferença estatística entre esses dois últimos. Entretanto a expressão de CD44 ($p = 0,0011$) (Fig.2L) e CD14 ($p = 0,0005$) (Fig.2A) é maior em CD14^{hi}SSC^{hi} e CD14^{hi}SSC^{lo} em relação a CD14^{lo}SSC^{lo} e a expressão de CD45RO difere-se apenas entre CD14^{hi}SSC^{hi} e CD14^{lo}SSC^{lo}, sendo maior no primeiro ($p = 0,0181$) (Fig.2M).

As moléculas CD11c, CD14, CD44 e CD45RO têm comportamento diferente sob duas análises: fenotípica e estatística. Fenotipicamente CD11c é mais expressa em CD14^{hi}SSC^{hi} do que CD14^{hi}SSC^{lo} e em CD14^{hi}SSC^{lo} do que em CD14^{lo}SSC^{lo} como visto na imagem superior da figura 2J. Ao passo que estatisticamente, a expressão de CD11c não se difere entre as populações CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo}, como demonstrado no gráfico da figura 2J.





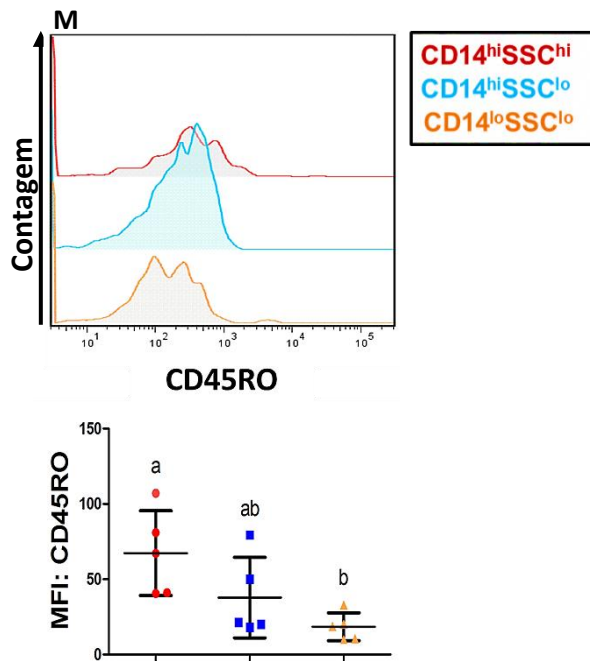


Figura 2: Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises estatísticas, comparadas entre as populações de monócitos $CD14^{hi}SSC^{hi}$, $CD14^{hi}SSC^{lo}$, $CD14^{lo}SSC^{lo}$. A) CD14; B) MHC-II; C) CX3CR1; D) CD62L; E) CD11a; F) CD11b; G) CD56; H) CD16; I) CCR2; J) CD11c; K) CD80; L) CD44 e M) CD45RO. Letras diferentes significam diferença estatística.

5.2 Morfologia celular das células $CD14^{hi}SSC^{hi}$, $CD14^{hi}SSC^{lo}$, $CD14^{lo}SSC^{lo}$

Após o *sorting* e verificação das populações adquiridas, onde “P4” representa a população $CD14^{hi}SSC^{lo}$ (Fig.3A), “P5” $CD14^{lo}SSC^{lo}$ (Fig.3B) e “P6” $CD14^{hi}SSC^{hi}$ (Fig.3C), a análise das lâminas do citocentrifugado revelou morfologia diferente entre as populações, sendo $CD14^{hi}SSC^{lo}$ constituída de monócitos de núcleo basofílico em forma de ferradura (Fig.4A), enquanto os monócitos $CD14^{lo}SSC^{lo}$ (Fig.4B) apresentam núcleo mais eosinofílico em relação a $CD14^{hi}SSC^{lo}$ (Fig.4C e 4D). A população $CD14^{hi}SSC^{lo}$ apresentou 72% de pureza pós-*sorting*, com 28% de monócitos $CD14^{lo}SSC^{lo}$ contaminantes. A população $CD14^{lo}SSC^{lo}$ apresentou 80% de pureza, com 20% de monócitos $CD14^{lo}SSC^{lo}$ contaminantes. Entretanto ao analisarmos a população $CD14^{hi}SSC^{hi}$, observamos que essa constituía-se de um número pequeno de monócitos morfologicamente semelhantes aos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ e $CD14^{lo}SSC^{lo}$, que provavelmente estavam aderidos a outros tipos celulares, principalmente à neutrófilos e raros eosinófilos encontrados nas lâminas (Fig. 4E e 4F).

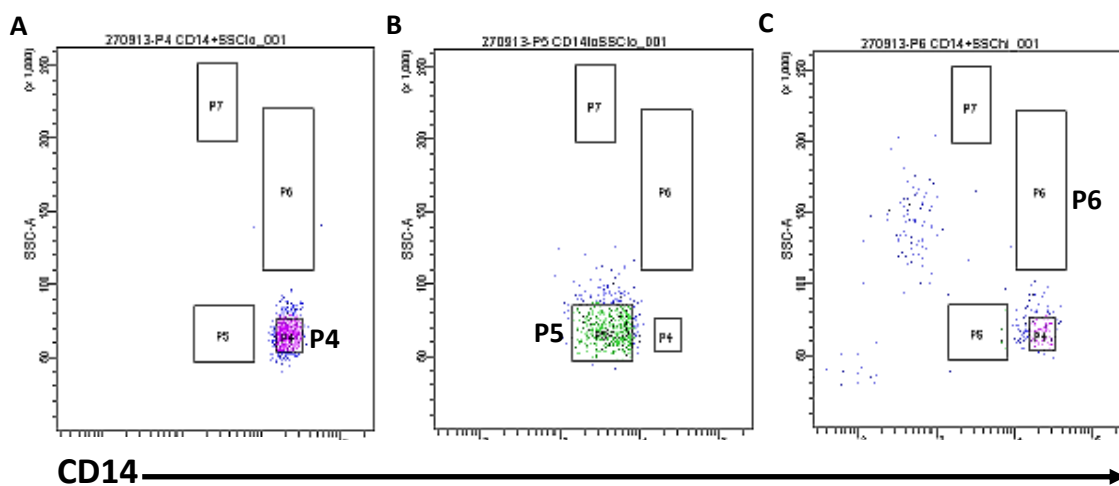
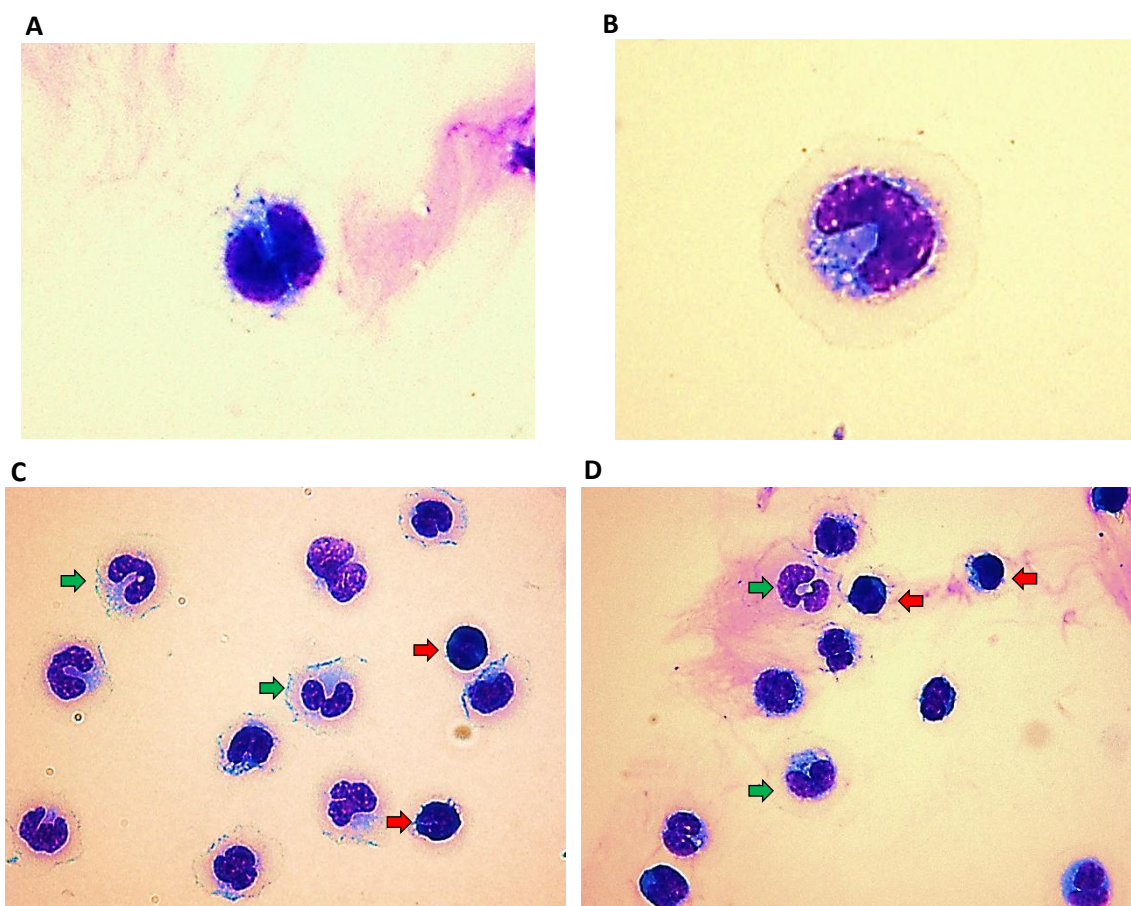


Figura 3: Imagens representativas da aquisição pós-sorting, representando as três populações de células CD14⁺. A) CD14^{hi}SSC^{lo} (gate P4); B) CD14^{lo}SSC^{lo} (gate P5) e C) CD14^{hi}SSC^{hi} (gate P6).



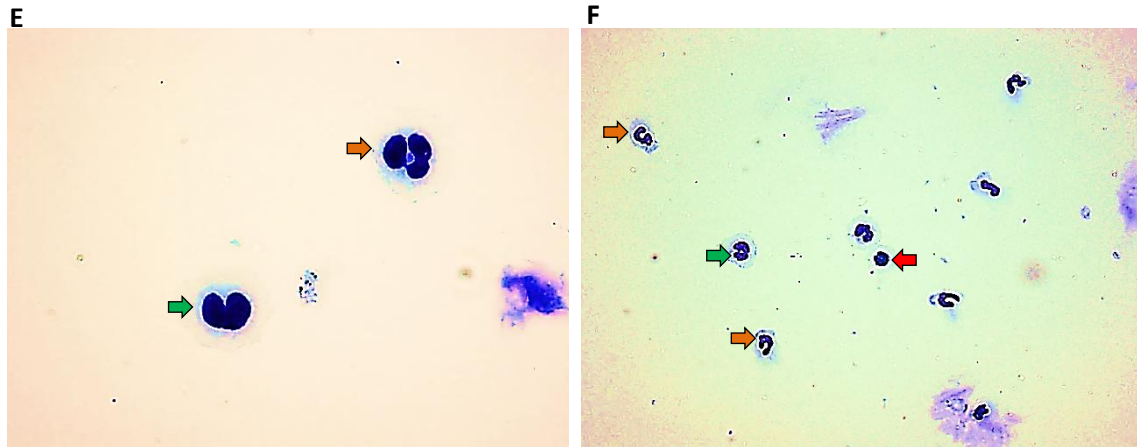


Figura 4: Fotomicrografia das células obtidas por *sorting* e coradas por Panótico. Em aumento de 1000x: A) monócito CD14^{hi}; B) monócito CD14^{lo}; C-D) setas verdes indicando monócitos CD14^{lo} e setas vermelhas indicando monócitos CD14^{hi}; E) seta verde indicando monócito CD14^{lo} e seta alaranjada indicando neutrófilo. Em aumento de 400x: F) seta verde indicando monócito CD14^{lo}, seta vermelha indicando monócito CD14^{hi} e setas alaranjadas indicando neutrófilos.

Sendo assim, monócitos do sangue periférico de cães dividem-se em duas subpopulações: uma CD14^{hi} constituindo cerca de 90% e outra CD14^{lo} constituindo cerca de 10% da população (Fig. 5).

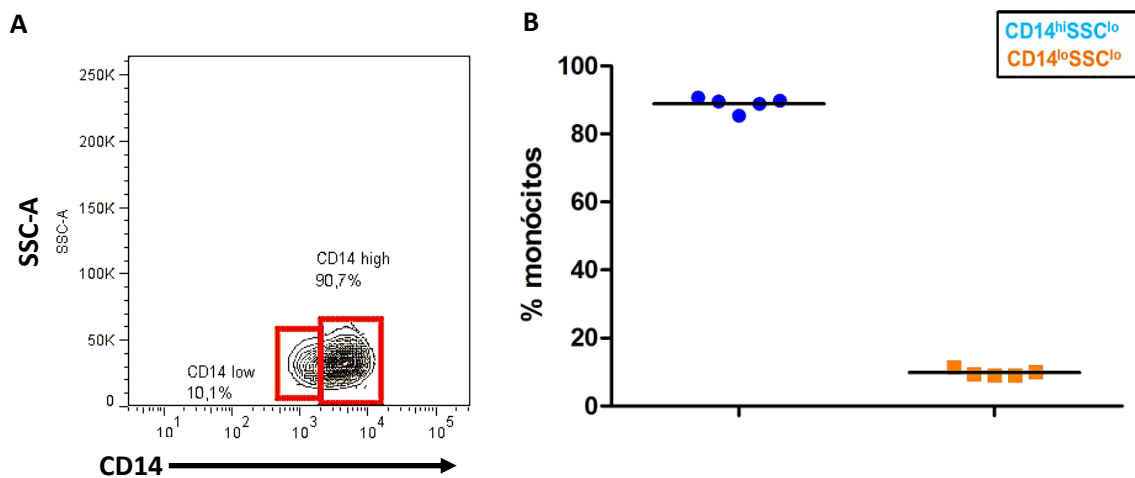
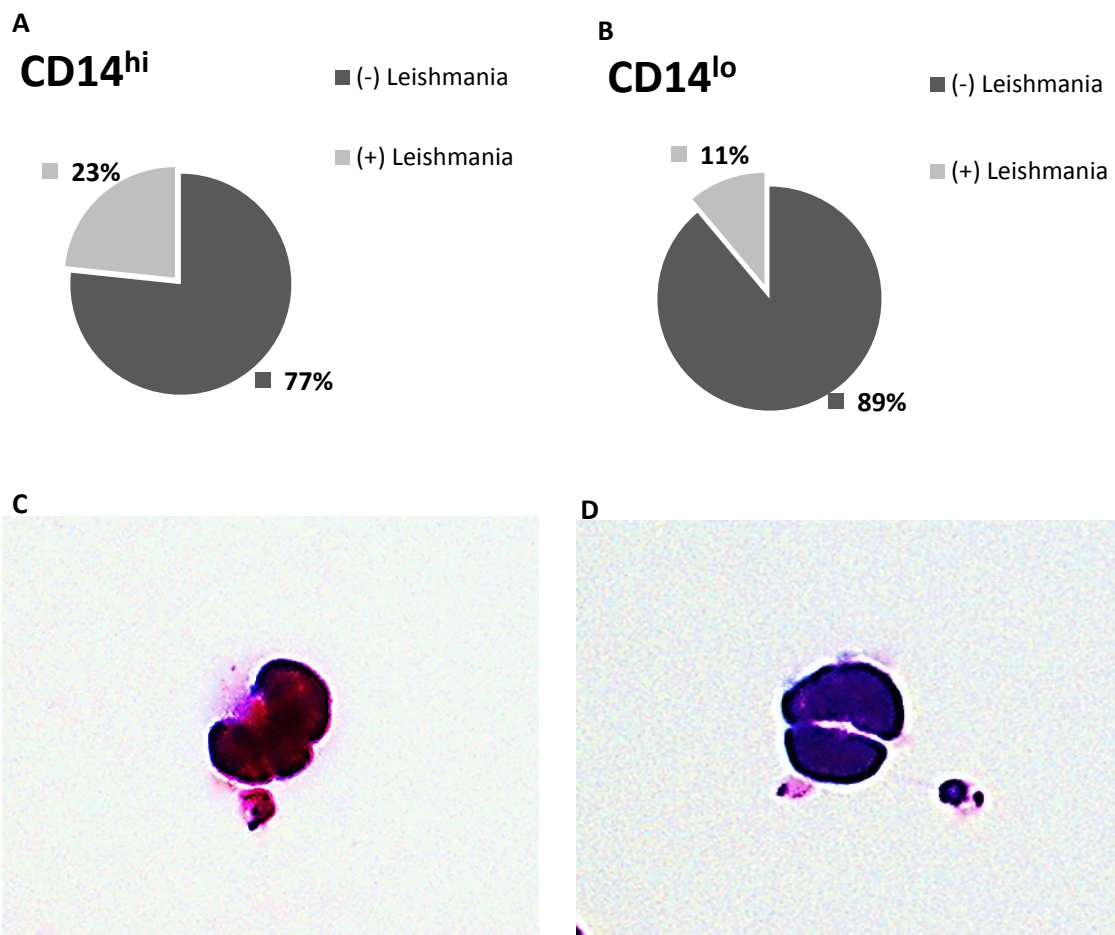


Figura 5: Imagem representativa das populações de monócitos caninos de acordo com a expressão de CD14 e granulocidade. A) monócitos CD14^{lo} constituindo cerca de 10% e monócitos CD14^{hi} constituindo cerca de 90%; B) média da porcentagem de monócitos CD14^{hi} e CD14^{lo} sobre o total de monócitos do sangue periférico de cães.

5.3 Teste de fagocitose dos monócitos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ e $CD14^{lo}SSC^{lo}$

Foram realizados experimentos de adesão e de fagocitose com os monócitos. Leucócitos totais (1×10^5 células) foram isolados do sangue e colocados para aderir em lamínulas de vidro redondas em placas de 24 poços por uma hora a $37^\circ C$ em atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida adicionamos 1×10^6 formas promastigotas de *L. infantum* para cultura de 45 minutos e de duas horas. Observamos que as duas populações de células, fenotípica e morfológicamente caracterizadas como monócitos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ (Fig.6 D e F) e $CD14^{lo}SSC^{lo}$ (Fig.6 C e E) foram capazes de aderir e fagocitar promastigotas de *L. infantum*. A cada 100 monócitos de cada uma das subpopulações observou-se que $CD14^{hi}SSC^{lo}$ apresentou maior percentual de células infectadas em relação aos $CD14^{lo}SSC^{lo}$, correspondendo a 23% (Fig.6 A) e 11% (Fig.6 B), respectivamente. Em síntese observamos 1,15 promastigota para cada monócito infectado.



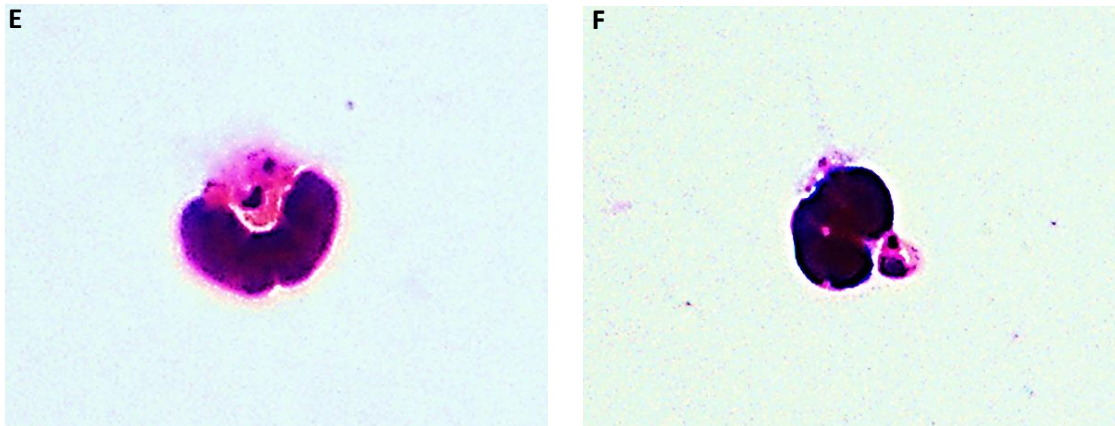
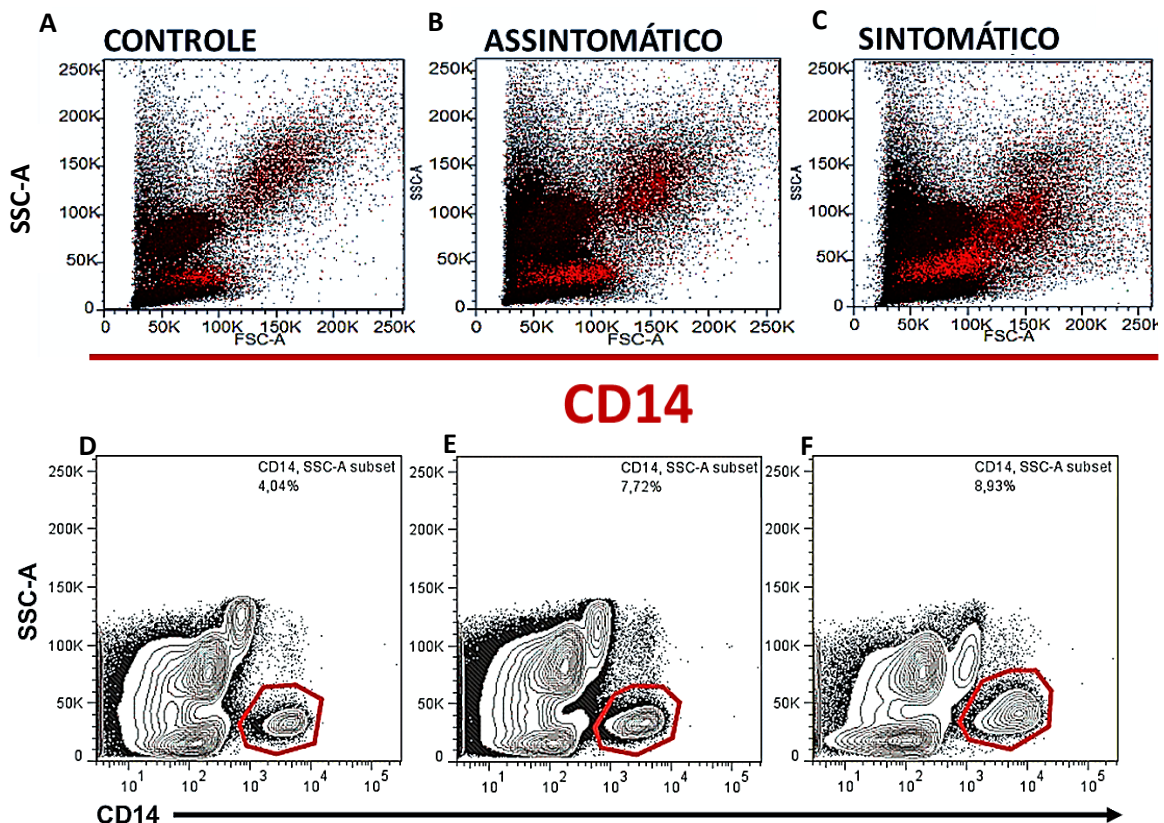


Figura 6: Monócitos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ e $CD14^{lo}SSC^{lo}$ apresentaram capacidade fagocítica de formas promastigotas de *L. infantum*. A) porcentagem de monócitos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ com formas promastigotas aderidas; B) porcentagem de monócitos $CD14^{lo}SSC^{lo}$ com formas promastigotas aderidas; C e E) monócitos $CD14^{lo}SSC^{lo}$ com formas promastigotas aderidas; B e F) monócitos $CD14^{hi}SSC^{lo}$ com formas promastigotas aderidas.

5.4 Monócitos na leishmaniose visceral canina

A análise das células $CD14^{+}$ em cães infectados com *L. infantum* indicou aumento em frequência dessas células (Fig.6A, 6B e 6C) de aproximadamente 4% em cães controle (Fig.6D e 6G) para cerca de 7% em cães infectados assintomáticos (Fig.6E e 6G) e 9% em sintomáticos (Fig.6F e 6G). Entretanto não houve alteração na frequência de cada população, permanecendo cerca de 90% $CD14^{hi}$ e 10% $CD14^{lo}$.



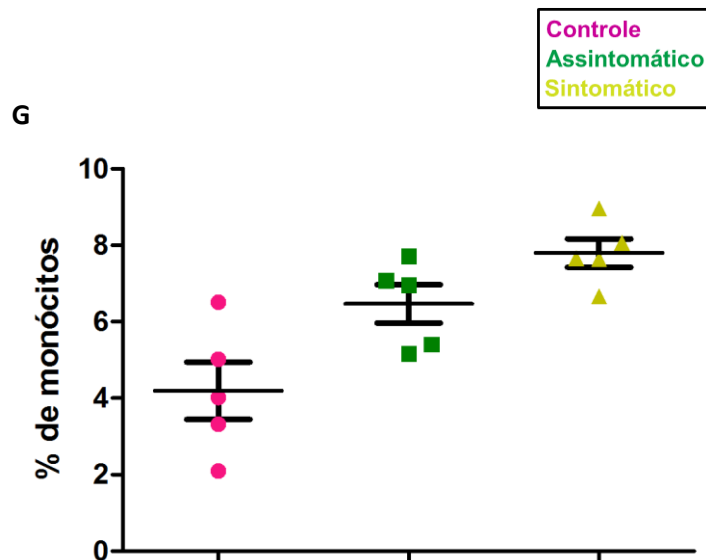


Figura 7: Imagens representativas do aumento de monócitos caninos em cães infectados de acordo com a expressão de CD14 e da porcentagem de monócitos sobre o total de eventos analisados. Em A (Controle); B (Assintomático) e C (Sintomático), aumento da população CD14⁺ representado pela quantidade e intensidade dos *dots* em vermelho; D) monócitos representam cerca de 4% no grupo Controle; E) monócitos representam cerca de 7% no grupo Assintomático; F) monócitos representam cerca de 9% no grupo Sintomático; G) gráfico de comparação da porcentagem de monócitos entre cães do grupo Controle (cor roxa), Assintomático (cor verde) e Sintomático (cor amarela).

Observamos redução no nível de expressão de CD14 nos cães infectados em relação aos cães controle (Fig.7A), apresentando maior evidência nos cães sintomáticos, que apresentam expressão menor de CD14 em relação aos cães assintomáticos. O mesmo foi observado quanto à expressão de CCR2 ($p < 0,0001$) (Fig.7B), CD11b ($p < 0,0001$) (Fig.7C), CD11a ($p < 0,0001$) (Fig.7D), CD62L ($p < 0,0001$) (Fig.7E) e MHC-II ($p < 0,0001$) (Fig.7F).

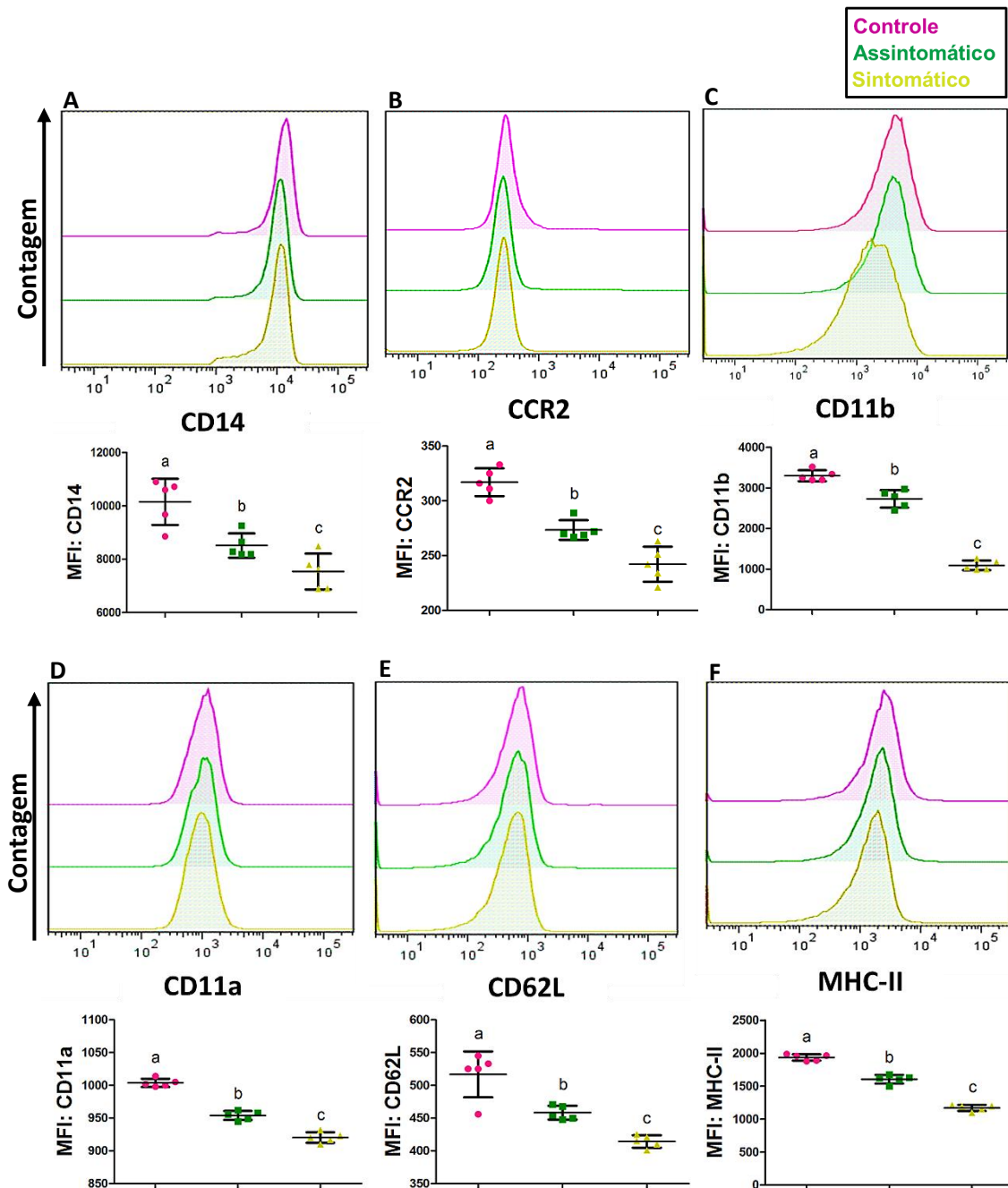
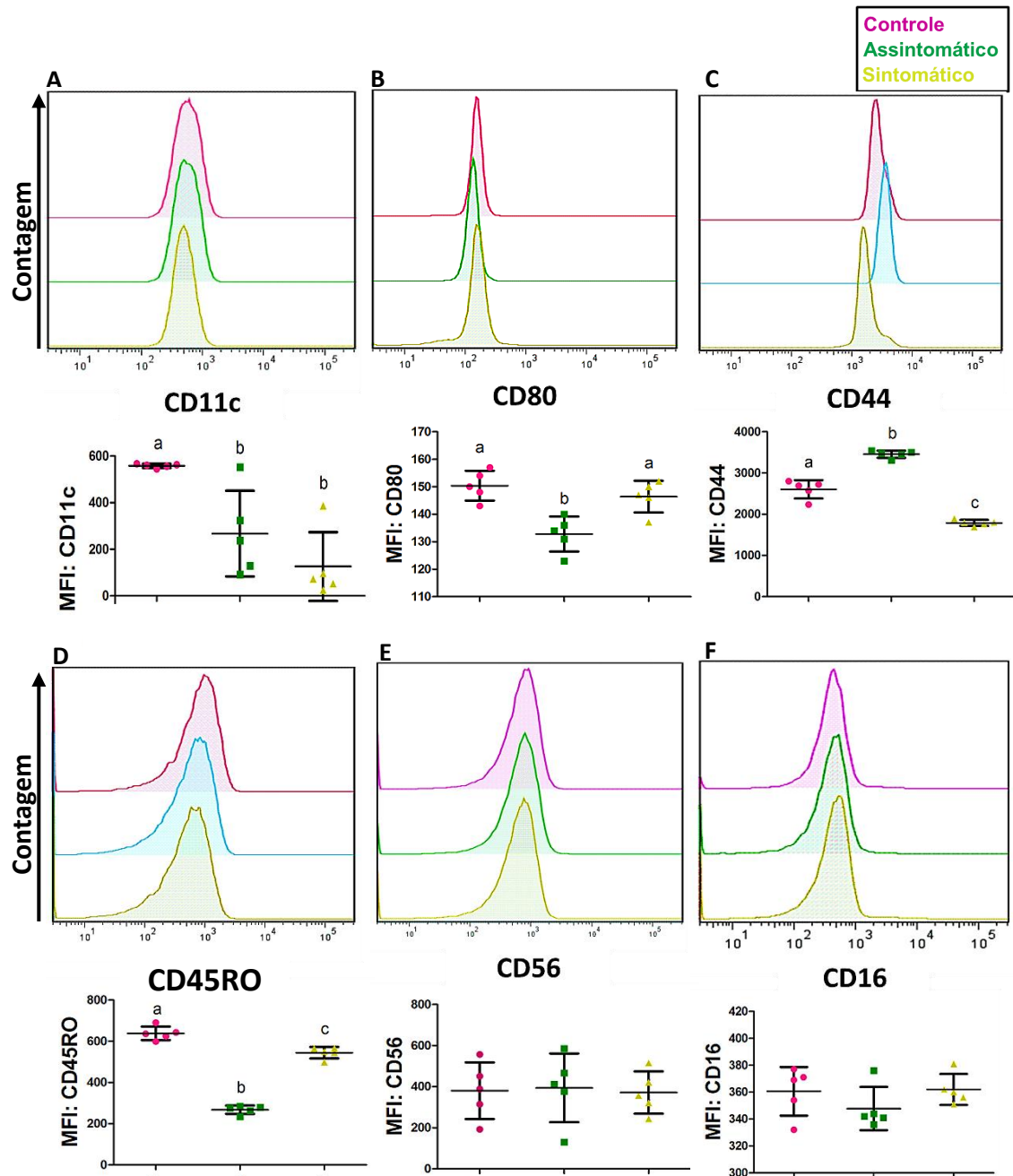


Figura 8: Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises estatísticas, comparadas entre os grupos de cães Controle (cor roxa), Assintomáticos (cor verde) e Sintomáticos (cor amarela). A) CD14 B) CCR2; C) CD11b; D) CD11a; E) CD62L e F) MHC-II.

Quanto às outras moléculas, observamos que CD11c é mais expressa nos cães controle do que nos infectados, não se diferenciando entre os *status* clínico ($p=0,0002$) (Fig.8G); CD80 mostra-se reduzido no grupo de animais assintomáticos em relação ao controle e sintomático ($p=0,0012$) (Fig.8H); CD44 mostrou-se mais expresso em cães do grupo assintomático em relação aos outros dois grupos, sendo

menor nos sintomáticos (Fig.8I) ao contrário do observado para CD45RO, menor nos assintomáticos ($p < 0,0001$) (Fig.8J).

Não houve diferença estatística quanto à expressão de CD56 ($p = 0,6634$) (Fig.8K), CD16 ($p = 0,3122$) (Fig.8L) e CX3CR1 ($p = 0,0531$) (Fig.8M) entre os grupos.



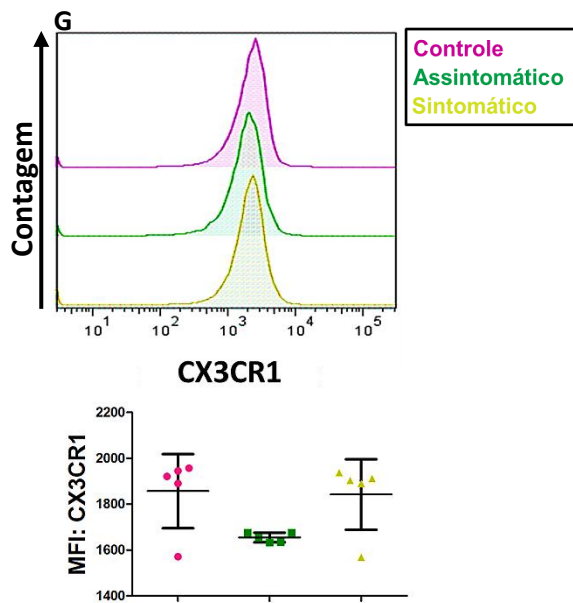


Figura 9: Imagens representativas da expressão dos receptores através da média da intensidade de fluorescência e suas respectivas análises estatísticas, comparadas entre os grupos de cães Controle (cor roxa), Assintomáticos (cor verde) e Sintomáticos (cor amarela). A) CD11c; B) CD80; C) CD44; D) CD45RO; E) CD56; F) CD16 e G) CX3CR1. Letras diferentes significam diferença estatística.

6. DISCUSSÃO

Estudos em humanos e camundongos vêm mostrando que monócitos representam uma população heterogênea de células circulantes, com diferenças no tamanho, granulosidade, fenótipo e funções (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010; Hussen *et al.*, 2013). Pelo fato de não haver caracterização fenotípica de monócitos caninos, buscamos aqui caracterizar populações dessas células em cães saudáveis (animais não infectados com *L. infantum*) e compará-las às mesmas em cães com leishmaniose visceral. Propomo-nos analisar monócitos na LVC, pois uma vez no tecido, já diferenciados em macrófagos e células dendríticas (DC), tornam-se alvos preferenciais do protozoário *Leishmania* além de desempenharem papel importante na produção de ROS e NO, responsáveis pelo controle da infecção (Tafari *et al.*, 1996; Kavosi, Ardestani e Kariminia, 2009; Goncalves *et al.*, 2011; Diaz-Gandarilla *et al.*, 2013).

Quanto à morfologia, os monócitos são descritos como células maiores que linfócitos e menos granulosas que os polimorfonucleares, apresentando núcleo em forma de ferradura, rim ou feijão (Hilgendorf e Swirski, 2012). Além disso, tais células são definidas por seus marcadores de superfície que se mostram relativamente conservados em diferentes espécies, no que se refere a marcadores como CCR2, CD62L, CX3CR1, dentre outros (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007).

Por citometria de fluxo, nossos resultados demonstraram que monócitos caninos são representados por duas subpopulações que diferenciam entre si por apresentarem diferenças na granulosidades (SSC) e na expressão de CD14. As populações de monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo} apresentam granulosidade semelhante porém são diferentes quanto ao tamanho, sendo monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} maiores do que CD14^{lo}SSC^{lo}. Completando essa observação, após separação dessas células por *sorting*, pudemos observar importantes diferenças morfológicas, principalmente relacionadas ao formato e coloração do núcleo. Monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} apresentam núcleo em forma de ferradura e de aspecto mais basofílico, enquanto monócitos CD14^{lo}SSC^{lo}, apresentam núcleo em forma de rim com aspecto mais eosinofílico. Essas diferenças também foram observadas por outros trabalhos relacionados à descrição de monócitos em humanos, ratos e camundongos, onde geralmente os monócitos inflamatórios ou clássicos (CD14^{hi}CD16⁻ humanos; CD43^{low} rato; Gr1⁺ camundongos) são maiores do que os patrulhadores ou não clássicos (CD14^{dim}CD16⁺ humanos; CD43^{hi} rato; Gr1⁻ camundongos) (Geissmann, Jung e Littman, 2003; Mizuno *et al.*, 2005; Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007). Mas nosso trabalho mostra pela primeira vez diferenças específicas relacionadas ao núcleo destas células. Núcleos que se coram com afinidades diferentes por um corante,

demonstram apresentar composições diferentes. Mais estudos serão necessários para concluirmos o que isso pode significar na diferença de função entre as subpopulações de monócitos caninos.

A terceira população de células CD14 positivas por nós observada e que tem o fenótipo CD14^{hi}SSC^{hi} apresenta-se com características de uma população maior e mais granulosa que as outras, com perfil, na citometria, bem semelhante ao tamanho de eosinófilos e com granulosidade semelhante à de neutrófilos. Porém ao realizarmos a separação dessas células por *sorting*, observamos uma população heterogênea formada por monócitos CD14^{hi}SSC^{lo}, neutrófilos e eosinófilos. Acreditamos que durante o processamento e isolamento dessas células, por estarem mais ativadas, acabaram por se agregar formando *clusters* de células que ao passarem pelo *sorting*, foram separadas. Vale ressaltar que embora CD14^{hi}SSC^{hi} não seja uma população de monócitos isolados, essas foram as células que apresentavam sempre maior expressão de todas as moléculas analisadas, comprovando que possivelmente estavam mais ativadas e por isso se agregavam. Agregados de células do sangue já foram amplamente demonstradas e discutidas na literatura (Arber *et al.*, 1991; Zemishlany *et al.*, 1998) ou relacionadas ao estresse oxidativo (Pitzele e Sze, 1974; Fedorova *et al.*, 2004). Dessa forma, concluímos que essa terceira população, na verdade, não se trata de uma subpopulação de monócitos e sim de agregados celulares, ainda sem uma explicação oportuna.

Como dito anteriormente, as populações de monócitos caninos se diferenciam de acordo com a expressão de CD14, assim como visto inicialmente em humanos e bovinos (Hussen *et al.*, 2013), porém essas populações não se diferenciam em relação à expressão de CD16. É interessante que todos os marcadores de superfície testados nesse trabalho foram detectados através de anticorpos contra moléculas humanas, o que demonstra alta conservação de moléculas monocíticas entre essas espécies, tendo o mesmo sido observado para bovinos (Hussen *et al.*, 2013). Porém no caso dos caninos, não foi possível uma diferenciação baseada em CD16. Apesar de muitas semelhanças de alguns marcadores entre as espécies até hoje analisadas, há particularidades espécie-específica. O CD14, que separa monócitos humanos, caninos e bovinos em diferentes populações, apresenta expressão tão fraca em camundongos que não são utilizados como marcadores nessa espécie (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010). A tentativa de se encontrar marcadores específicos que pudessem diferenciar melhor as subpopulações de monócitos em cães, fez com que explorássemos a expressão de diversas moléculas, já descritas como fundamentalmente expressas na superfície dessas células em outras espécies. Algumas dessas moléculas já consagradas em outras espécies, por estarem relacionadas à capacidade migratória e

funcional, foram consideradas (CCR2, CD11a, CD11c, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CX3CR1 e MHCII), ao passo que outras (CD11b, CD14, CD16 e CD80), foram utilizadas somente como marcadores celulares por se apresentarem na superfície de monócitos, mesmo sem função claramente definida.

Com o objetivo de demonstrar essas moléculas supracitadas, em cães saudáveis, para a escolha dessas, foi levado em consideração, evidências sobre monócitos humanos e camundongos, onde os inflamatórios são caracterizados como dependentes de gradiente de CCL2 para migrarem para o sítio inflamatório, assim como da expressão de CD62L (Tedder, Steeber e Pizcueta, 1995; Serbina *et al.*, 2003). Em inflamação peritoneal experimental em camundongos, que receberam, por transferência adotiva, monócitos mutados expressando proteína verde fluorescente (GFP - *Green Fluorescent Protein*), monócitos Gr1⁺CCR2^{hi}CD62L⁺ (GFP^{low}), migraram para região da infecção, ao contrário dos monócitos Gr1⁻CCR2^{low}CD62L⁻ (GFP^{high}), que não chegaram ao local inflamado (Geissmann, Jung e Littman, 2003; Tacke e Randolph, 2006). Em ratos, monócitos CCR2⁺ também são amplamente recrutados para o tecido inflamado (Yrlid, Jenkins e Macpherson, 2006).

A expressão de MHC-II e CD11c é aumentada em monócitos ativados, principalmente após migrarem para o tecido inflamado, expressão essa característica de DCs e macrófagos inflamatórios, células teciduais diferenciadas de monócitos (Gordon e Taylor, 2005; Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007). O aumento da expressão de MHC-II demonstra a capacidade dos monócitos de apresentar antígenos, bem como de estimular linfócitos T (Auffray, Sieweke e Geissmann, 2009). Em certas situações, esses monócitos podem converter linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺CD127^{lo} FoxP3⁺), em linfócitos produtores de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IFN- γ e TNF- α), principalmente de IL-17, como em pacientes com artrite reumatoide (Walter *et al.*, 2013).

A produção de citocinas pró-inflamatórias é atribuída a monócitos clássicos ou classicamente ativados. Em humanos, monócitos CD14^{hi}CD16⁻, vem sendo relacionados ao quadro inflamatório da Doença de Crohn, esses monócitos apresentam expressão aumentada de CD56 em pacientes portadores da doença, em comparação com indivíduos saudáveis (Grip *et al.*, 2007) o mesmo foi observado em pacientes com artrite reumatoide, que apresentam maior quantidade desses monócitos no sangue periférico quando comparados aos controles saudáveis. Esses mesmos monócitos, CD14^{hi}CD56⁺, produzem altos níveis de ROS, bem como das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-23 quando estimulados *in vitro* com LPS e pacientes tratados com anticorpos anti-TNF- α apresentam redução no números de monócitos CD56⁺ (Krasselt *et al.*, 2013). Em nosso caso, a expressão de CD56 em monócitos de cães, é elevada

na população CD14^{hi}SSC^{lo}, indicando que essas células podem representar importante papel na produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-23) e de ROS, sendo assim, fundamental no controle de processos infecciosos.

Monócitos humanos CD14^{hi}CD45RO⁺, provenientes do sangue periférico de adultos saudáveis, quando estimulados em cultura por proteína derivada da tuberculina purificada - PPD (*Purified Protein Derivative of Tuberculin*), apresentam produção elevada de IL-1 β e TNF- α quando comparados a monócitos CD45RO⁻, sendo assim considerados pró-inflamatórios (Brichard *et al.*, 2001). Nossos resultados mostram que assim como em humanos, monócitos caninos CD14^{hi} apresentam alta expressão de CD45RO, podendo assim associar a esses, capacidade inflamatória quando ativados.

Na análise fenotípica de células CD44⁺, no fígado de camundongos com hepatite induzida por dieta litogênica, observou-se que os monócitos emergentes no local da inflamação são caracterizados pela coexpressão de Gr1⁺CCR2⁺iNOS⁺, caracterizando assim, monócitos clássicos (Egan *et al.*, 2013).

As populações de monócitos caninos não se diferem quanto à expressão de CCR2, porém a expressão de CD62L é significativamente maior em monócitos CD14^{hi} em comparação com monócitos CD14^{lo}. Monócitos CD14^{hi} também apresentam maior expressão de CD11c, CD44, CD45RO, CD56 e MHC-II, e desta forma podemos então inferir que esses representam a população de monócitos clássicos em cães, com possível capacidade inflamatória.

A população CD14^{hi} de cão saudável apresenta maior expressão de CX3CR1, fato esse também verificado em células humanas (Cros *et al.*, 2010; Appleby *et al.*, 2013). Curiosamente, em humanos e camundongos, monócitos que apresentam alta expressão dessa molécula são classificados como monócitos não clássicos, ou patrulhadores (Cros *et al.*, 2010). Essa diferença em relação aos nossos dados pode estar relacionada com a forma na qual essas células foram caracterizadas em camundongos e em humanos. Nos primeiros trabalhos que citam a expressão de CX3CR1 em camundongos e humanos, não foi utilizado um anticorpo anti-CX3CR1, sendo a marcação tendo sido realizada através da utilização de fractalquina ligada a porção Fc de um anticorpo e depois detectada através de um anticorpo anti-IgG ligado a um fluorocromo (Geissmann, Jung e Littman, 2003). Em nosso caso, utilizamos anticorpo anti-CX3CR1, o que deve justificar a diferença. Além do fato de estarmos descrevendo populações de monócitos em cães, que podem se comportar de forma diferente. Aos monócitos não clássicos é atribuída a produção de citocinas de reparo e anti-inflamatórias, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*) e IL-10, respectivamente, atuando assim como protetores

em processos patológicos. Em modelo experimental de fibrose hepática induzida por CCL₄ (tetracloreto de carbono), camundongos C57BL/6 WT (*wild type*) e C57BL/6^{CX3CR1^{-/-}} (deficiente para expressão de CX3CR1) apresentaram áreas extensas de necrose hepática e níveis aumentados de ALT (alanina aminotransferase). Cinco dias após a indução das lesões, camundongos WT estavam completamente recuperados, entretanto, camundongos CX3CR1^{-/-} apresentaram prolongamento das lesões hepáticas e maior desenvolvimento de fibrose, em relação os animais WT (Karlmark *et al.*, 2010). Todavia, Cros *et al.* (2010), demonstraram que dependendo da forma como são estimulados, mesmo monócitos humanos CD14^{dim}CD16⁺CX3CR1^{hi} apresentam atividade pró inflamatória, em resposta à vírus e quando estimulados por complexos imunes contendo ácidos nucleicos, via TLR7-TLR 8-MyD88-MEK.

A expressão elevada da molécula CD11a e CD11b em monócitos CD14^{hi}, encontrada no nosso trabalho, corrobora com a hipótese desses serem os primeiros monócitos a chegar no sítio inflamatório, pelo fato de serem integrinas responsáveis pela adesão dos leucócitos às células endoteliais favorecendo a diapedese (Lima *et al.*, 2007). Esse fato contribui para explicar o maior número de *Leishmanias* aderidas a essa população, como já demonstrado em outros trabalhos, visto a importância do CD11b na interação com a membrana plasmática e internalização do parasito na célula (Mosser e Edelson, 1985; 1987). Nossos dados, porém, são diferentes dos apresentados por Aufrey *et al.* (2008), e Cros *et al.* (2010), que demonstraram que a expressão de CD11a é maior nos monócitos patrulhadores, em camundongos e em humanos.

O que pudemos observar sobre a expressão de moléculas de superfície caracterizando diferentes subpopulações, é que é possível diferenciá-las e lhes atribuir peculiaridades funcionais. Ainda sim, se fazem necessários ensaios funcionais que caracterizem a capacidade fagocítica dessas células, bem como sua capacidade de apresentar antígenos e estimular a ativação e proliferação de linfócitos T, permitindo assim compreendermos seus papéis junto à imunidade adquirida e sua influência no controle da LVC. A avaliação do perfil das citocinas, produzidas sob o estímulo de LPS (lipopolissacarídeos) ou antígeno solúvel de *Leishmania* em cultura, contribuirá para elucidar a função dessas células e seu papel pró-inflamatório ou regulador. Porém, baseado na análise dos nossos resultados, algumas suposições podem ser discutidas. É sabido, por exemplo, que após internalização da forma promastigota metacíclica da *Leishmania* em células mononucleares fagocíticas do hospedeiro mamífero, essas são inativadas, cancelando sua função microbicida (Mosser e Edelson, 1987; Goncalves *et al.*, 2005). Após se diferenciarem em formas amastigotas, essas se multiplicam por divisão binária até ocupar todo o citoplasma.

Em alguns casos o núcleo dessas células chega a deslocar-se lateralmente para dar lugar ao vacúolo com as formas amastigotas. O processo ininterrupto de divisão das amastigotas determina o abarrotamento de parasitos dentro dos macrófagos, até que esses se rompem, liberando as amastigotas que infectarão novas células (Russell e Wright, 1988).

Em ensaio sobre fagocitose com monócitos caninos, observamos que ambos, CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{hi}SSC^{lo}, apresentam capacidade fagocítica. Entretanto monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} apresentaram maior capacidade fagocítica, demonstrada pela maior frequência de células com promastigota aderida e/ou internalizada. Isso pode ser explicado pelo fato dessa população apresentar maior expressão de CD11b, molécula responsável pela aderência e internalização da *Leishmania* (Mosser e Edelson, 1985; Lima *et al.*, 2007). Curiosamente, só observamos promastigotas aderidas a monócitos em culturas de 45min, pois na de duas horas, não observamos parasito, que provavelmente foram mortos por monócitos e polimorfonucleares ativados através da liberação de ROS, como demonstrado por Gonçalves *et al.* (2011), onde monócitos ativados foram capazes de eliminar *in vitro* promastigotas de *L. major*, explicando também o baixo número de parasitos aderidos ou internalizados em cada monócito.

Quanto à expressão das moléculas estudadas em cães naturalmente infectados, os nossos resultados puderam demonstrar que os monócitos de cães infectados, principalmente os provenientes de cães sintomáticos, possivelmente perdem sua capacidade de ativar e combater a infecção, evidenciada pela redução da expressão de MHC-II e CD11c, moléculas relacionadas à atividade inflamatória dos monócitos (Gordon e Taylor, 2005; Daneshvar *et al.*, 2012). Em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, formas amastigotas apresentam capacidade de internalizar e degradar a molécula MHC-II, demonstrada através da análise por microscopia imunoelétrica de macrófagos crioseccionados, infectados com *L. amazonensis*, onde formas amastigotas do parasito apresentaram estruturas pertencentes ao MHC-II (De Souza Leao *et al.*, 1995). Tafuri *et al.* (1997), mostraram através do estudo imunocitoquímico do fígado e órgãos linfoides associados (baço, linfonodos e placas de Payer), que a expressão dos antígenos do MHC-II é reduzida nos linfonodos cervicais e abdominais de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, indicando que a infecção é capaz de reduzir a expressão de MHC-II.

A baixa expressão de CCR2 em monócitos de cães infectados pode indicar deficiência dessas células em chegar ao local infectado, visto que em processos inflamatórios decorrentes de infecções a produção local de CCL2 vem se mostrando essencial no recrutamento de monócitos ativados, que atuam juntamente com macrófagos e DCs classicamente ativadas na eliminação de parasitos (Serbina *et al.*,

2003; Sunderkotter *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Serbina e Pamer, 2006; Dunay *et al.*, 2008; Serbina *et al.*, 2008). Na LV, a infecção experimental por *L. donovani* tem sido associada à indução de um rápido acúmulo hepático de mRNA codificadores para CCL2 (Cotterell, Engwerda e Kaye, 1999). Em um outro estudo, a indução de CCL2, CCL4 e CCL5 foi observada na pata de camundongos resistentes a infecção por *L. major* ou *L. amazonensis*, na fase inicial e tardia da infecção (Ji, Sun e Soong, 2003). Camundongos C57BL/6, linhagem sabidamente resistentes à infecção por *L. major*, quando deficientes para CCR2, tornam-se suscetíveis, falhando em gerar resposta Th1 (Sato *et al.*, 2000; Quinones *et al.*, 2007). Desta forma, no nosso caso, seria conveniente aos parasitos que essas células não migrassem para os locais de infecção.

O processo de internalização das formas metacíclicas infectantes de *Leishmania* pode ser mediado por receptores presentes na superfície de células do SFM, entre os quais, os receptores da porção Fc (Woelbing *et al.*, 2006), receptores de manose-fucose (Blackwell, 1985), receptores TLR-2 e TLR-3 (Flandin, Chano e Descoteaux, 2006) e receptores do complemento do tipo 3 (CD11b/CD18 ou CR3) (Mosser e Edelson, 1985). O CR3 é descrito como um receptor capaz de potencializar a internalização e sobrevivência de formas amastigotas de *Leishmania* opsonizadas com a fração C3bi do complemento (Mosser e Edelson, 1985). Gonçalves *et al.* (2005) e Sampaio *et al.* (2007) descreveram a importância, *in vitro*, de CR3 na interação de monócitos circulantes caninos com *L. chagasi*. A redução de expressão de CD11b em macrófagos peritoneais de cães infectados, cultivados e expostos a *L. infantum*, foi demonstrada por Gonçalves *et al.* (2005). De Amorim *et al.* (2011), em estudos *in vivo*, mostrou que há redução na expressão de CD11b em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Esses mesmos cães com resultado de IHQ e xenodiagnóstico negativos, apresentaram uma maior expressão de CD11b/CD18 e MHCII em monócitos do sangue periférico, quando comparados aos valores observados em cães positivos nos dois exames parasitológicos, propondo assim, indicativo de resistência à infecção ou uma possível modulação da resposta imune eficaz na eliminação dos parasitos. Nossos resultados mostram que os níveis de expressão de CD11b, tornam-se reduzidos em cães infectados com *L. infantum*, sendo essa redução mais evidente em cães do grupo sintomático, ou seja, animais que apresentavam pelo menos um sinal da doença.

Observamos que cães assintomáticos apresentam, em seus monócitos, maior expressão de CD44 quando comparados aos cães controle e aos sintomáticos. Já foi demonstrado que essa molécula, juntamente com CD62L, tem papel fundamental na recirculação dos monócitos inflamatórios para linfonodos e tecidos linfoides durante o

processo inflamatório (Xu *et al.*, 2008). Isso pode indicar que a presença de monócitos inflamatórios em órgãos linfoides modula a resposta linfocitária para um perfil Th1, visto a capacidade que monócitos clássicos apresentam em mudar o perfil de resposta de linfócitos T (Walter *et al.*, 2013). Essa resposta pode indicar certo grau de resistência à leishmaniose ou de combate à infecção, visto a prevalência de monócitos CD44⁺ em processos inflamatórios, como demonstrado por Egan *et al.* (2013) em hepatite experimentalmente induzida em camundongos B6 CCR2^{-/-} e CD44^{-/-}. Esses apresentam redução significativa no aparecimento de hepatite e na formação de esteatose hepática em relação ao grupo controle (B6), mesmo sendo esses animais submetidos à dieta hipercolesterolêmica (Egan *et al.*, 2013).

Pretendemos ainda realizar ensaios funcionais com as duas populações de monócitos que descrevemos, em culturas realizadas pós-*sorting*, onde concluiremos com mais clareza as respostas dessas células após estímulos. Dessa forma, buscaremos evidenciar seus papéis em processos inflamatórios e infecciosos, de acordo com o perfil de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas por cada população. Uma vez obtidos esses resultados, realizaremos os mesmos experimentos com monócitos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, assintomáticos e sintomáticos, para melhor compreendermos as alterações dessas células durante a doença.

7 CONCLUSÕES

1. Monócitos tanto de cães saudáveis quanto de cães naturalmente infectados com *L. infantum* se subdividem em duas populações que apresentam frequências diferentes: CD14^{hi}SSC^{lo} e CD14^{lo}SSC^{lo}.
2. Monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} apresentam núcleo basofílico em forma de ferradura.
3. Monócitos CD14^{lo}SSC^{lo} apresentam núcleo eosinofílico em forma de rim.
4. A população de monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} tanto de cães saudáveis quanto de cães naturalmente infectados com *L. infantum* expressam mais: CD11a, CD11b, CD14, CD44, CD45RO, CD56, CD62L, CX3CR1 e MHC-II.
5. A população de monócitos CD14^{hi}SSC^{lo} de cães não infectados apresenta maior capacidade fagocítica de *L. infantum* em relação aos monócitos CD14^{lo}SSC^{lo}.
6. Cães naturalmente infectados com *L. infantum* sintomáticos apresentam expressão menor de CCR2, CD11a, CD11b, CD14, CD44, CD62L e MHC-II em relação aos assintomáticos, ao passo que, as moléculas CD45RO e CD80 tem menor expressão em cães assintomáticos, ambos na população de monócitos CD14⁺.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 4, p. 349-58, Apr 15 2009. ISSN 0165-2427

AMORIM, I. F. et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27679, 2011. ISSN 1932-6203

ANOSA, V. O.; IDOWU, A. L. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 30, n. 8, p. 600-8, Sep 1983. ISSN 0514-7166

APPLEBY, L. J. et al. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. **Immunol Lett**, v. 152, n. 1, p. 32-41, Apr 2013. ISSN 1879-0542

ARBER, N. et al. Heterotypic leukocyte aggregation in the peripheral blood of patients with leukemia, inflammation and stress. **Nouv Rev Fr Hematol**, v. 33, n. 3, p. 251-5, 1991.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 669-92, 2009. ISSN 0732-0582

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-30, Jul 2008. ISSN 1471-4922

BLACKWELL, J. M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 79, n. 5, p. 606-12, 1985. ISSN 0035-9203

BRICHARD, B. et al. Intracellular cytokine profile of cord and adult blood monocytes. **Bone Marrow Transplant**, v. 27, n. 10, p. 1081-6, May 2001. ISSN 0268-3369

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, Jan 2005. ISSN 0019-2805

CLARK, A. K.; STANILAND, A. A.; MALCANGIO, M. Fractalkine/CX3CR1 signalling in chronic pain and inflammation. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 10, p. 1707-14, Oct 2011. ISSN 1873-4316

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T cell-dependent manner. **Eur J Immunol**, v. 29, n. 1, p. 203-14, Jan 1999. ISSN 0014-2980

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. 375-86, Sep 24 2010. ISSN 1097-4180

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp Mol Pathol**, v. 72, n. 2, p. 132-41, Apr 2002. ISSN 0014-4800

DANESHVAR, H. et al. Alteration in mononuclear cell subpopulations in dogs immunized with gentamicin-attenuated Leishmania infantum. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1689-96, Nov 2012. ISSN 1469-8161

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**, v. 2 Suppl 1, p. S1, 2009. ISSN 1756-3305

DE SOUZA LEAO, S. et al. Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J Cell Sci**, v. 108 (Pt 10), p. 3219-31, Oct 1995. ISSN 0021-9533

DEANE, L. M.; DEANE, M. P.; ALENCAR, J. E. [Control of Phlebotomus longipalpis by DDT house spraying endemic foci of kala-azar in Ceara]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop**, v. 7, n. 1, p. 131-41, Jan 1955. ISSN 0034-7256

DIAZ-GANDARILLA, J. A. et al. PPAR activation induces M1 macrophage polarization via cPLA(2)-COX-2 inhibition, activating ROS production against Leishmania mexicana. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 215283, 2013. ISSN 2314-6141

DRANSFIELD, I. et al. Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. **J Cell Biol**, v. 116, n. 1, p. 219-26, Jan 1992. ISSN 0021-9525

DUNAY, I. R. et al. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen Toxoplasma gondii. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 306-17, Aug 15 2008. ISSN 1097-4180

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, p. e65247, 2013. ISSN 1932-6203

FEDOROVA, T. F. et al. [Blood cell aggregation and oxidative stress in pathogenesis of ischemic stroke]. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, n. Supl 10, p. 39-46, 2004. ISSN 1997-7298

FENG, A. L. et al. CD16+ monocytes in breast cancer patients: expanded by monocyte chemoattractant protein-1 and may be useful for early diagnosis. **Clin Exp Immunol**, v. 164, n. 1, p. 57-65, Apr 2011. ISSN 1365-2249

FERRER, L. et al. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Rec**, v. 136, n. 20, p. 514-6, May 20 1995. ISSN 0042-4900

FIGDOR, C. G. et al. Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation. **Blood**, v. 60, n. 1, p. 46-53, Jul 1982. ISSN 0006-4971

FIGUEIREDO, M. M. et al. Expression of Toll-like Receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunol**, v. 14, n. 1, p. 22, May 14 2013. ISSN 1471-2172

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 2, p. 411-20, Feb 2006. ISSN 0014-2980

GACKA, M. et al. Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes. **J Diabetes Complications**, v. 24, n. 1, p. 1-8, Jan-Feb 2010. ISSN 1873-460X

GAMA, M. E. et al. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 1, p. 129-36, Jan 2004. ISSN 0100-879X

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 71-82, Jul 2003. ISSN 1074-7613

GETTS, D. R. et al. Ly6c+ "inflammatory monocytes" are microglial precursors recruited in a pathogenic manner in West Nile virus encephalitis. **J Exp Med**, v. 205, n. 10, p. 2319-37, Sep 29 2008. ISSN 1540-9538

GONCALVES, R. et al. A sensitive flow cytometric methodology for studying the binding of L. chagasi to canine peritoneal macrophages. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 39, 2005. ISSN 1471-2334

GONCALVES, R. et al. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. **J Exp Med**, v. 208, n. 6, p. 1253-65, Jun 6 2011. ISSN 1540-9538

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 953-64, Dec 2005. ISSN 1474-1733

GRIP, O. et al. Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 13, n. 5, p. 566-72, May 2007. ISSN 1078-0998

HESTDAL, K. et al. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. **J Immunol**, v. 147, n. 1, p. 22-8, Jul 1 1991. ISSN 0022-1767

HETTINGER, J. et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. **Nat Immunol**, Jun 30 2013. ISSN 1529-2916

HILGENDORF, I.; SWIRSKI, F. K. Making a difference: monocyte heterogeneity in cardiovascular disease. **Curr Atheroscler Rep**, v. 14, n. 5, p. 450-9, Oct 2012. ISSN 1534-6242

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 49-53, Feb 2006. ISSN 0952-7915

HUSSEN, J. et al. Phenotypic and functional heterogeneity of bovine blood monocytes. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71502, 2013. ISSN 1932-6203

Jl, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with Leishmania amazonensis. **Infect Immun**, v. 71, n. 8, p. 4278-88, Aug 2003. ISSN 0019-9567

KARLMARK, K. R. et al. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1769-82, Nov 2010. ISSN 1527-3350

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

KEENAN, C. M. et al. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. **Vet Pathol**, v. 21, n. 1, p. 74-9, Jan 1984. ISSN 0300-9858

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**, v. 17, n. 3, p. 279-89, May-Jun 1999. ISSN 0738-081X

KRASSELT, M. et al. CD56+ monocytes have a dysregulated cytokine response to lipopolysaccharide and accumulate in rheumatoid arthritis and immunosenescence. **Arthritis Res Ther**, v. 15, n. 5, p. R139, 2013. ISSN 1478-6362

LIMA, W. G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 117, n. 1-2, p. 129-36, May 15 2007. ISSN 0165-2427

LONDON, C. A.; ABBAS, A. K.; KELSO, A. Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 63, n. 1-2, p. 37-44, May 15 1998. ISSN 0165-2427

LYONS, M. et al. Adenovirus type 5 interactions with human blood cells may compromise systemic delivery. **Mol Ther**, v. 14, n. 1, p. 118-28, Jul 2006. ISSN 1525-0016

MATLASHEWSKI, G. et al. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 4, p. 322-5, Apr 2011. ISSN 1474-4457

MAYRINK, W. et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 73, n. 2, p. 123-37, Apr 1979. ISSN 0003-4983

MIZUNO, K. et al. Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. **Clin Exp Immunol**, v. 142, n. 3, p. 461-70, Dec 2005. ISSN 0009-9104

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol**, v. 18, n. 9, p. 399-405, Sep 2002. ISSN 1471-4922

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J Immunol**, v. 135, n. 4, p. 2785-9, Oct 1985. ISSN 0022-1767

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J.. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania* major. **Nature**, v. 327, n. 6120, p. 329-31, May 28-Jun 3 1987. ISSN 0028-0836

MULLER, W. A. New mechanisms and pathways for monocyte recruitment. **J Exp Med**, v. 194, n. 9, p. F47-51, Nov 5 2001. ISSN 0022-1007

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun**, v. 62, n. 1, p. 229-35, Jan 1994. ISSN 0019-9567

PINTO, A. J. et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Acta Vet Scand**, v. 53, p. 67, 2011. ISSN 1751-0147

PITZELE, S.; SZE, S. Effects of Dipyridamole (Persantine) on Blood Cell Aggregation during Acute Hypovolemic Shock in the Dog. **Cardiovasc Dis**, v. 1, n. 5, p. 377-383, 1974. ISSN 0093-3546

QUINNELL, R. J. et al. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 91, n. 3-4, p. 161-8, Feb 10 2003. ISSN 0165-2427

QUINONES, M. P. et al. CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania* major. **Parasite Immunol**, v. 29, n. 4, p. 211-7, Apr 2007. ISSN 0141-9838

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin Exp Immunol**, v. 146, n. 2, p. 303-11, Nov 2006. ISSN 0009-9104

ROSS, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. **Br Med J**, v. 2, n. 2237, p. 1261-2, Nov 14 1903. ISSN 0007-1447

ROTHER, G. et al. Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 16, n. 12, p. 1437-47, Dec 1996. ISSN 1079-5642

RUSSELL, D. G.; WRIGHT, S. D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania promastigotes*. **J Exp Med**, v. 168, n. 1, p. 279-92, Jul 1 1988. ISSN 0022-1007

SAHA, P.; GEISSMANN, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 1, p. 2-4, Jan 2011. ISSN 1440-1711

SAMPAIO, W. M. et al. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Vet Res**, v. 3, p. 11, 2007. ISSN 1746-6148

SATO, N. et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J Exp Med**, v. 192, n. 2, p. 205-18, Jul 17 2000. ISSN 0022-1007

SERBINA, N. V. et al. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 421-52, 2008. ISSN 0732-0582

SERBINA, N. V.; PAMER, E. G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. **Nat Immunol**, v. 7, n. 3, p. 311-7, Mar 2006. ISSN 1529-2908

SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59-70, Jul 2003. ISSN 1074-7613

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 762-74, Nov 2011. ISSN 1474-1741

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **J Exp Med**, v. 189, n. 11, p. 1777-82, Jun 7 1999. ISSN 0022-1007

SILVA, L. C. et al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **Int J Exp Pathol**, Feb 19 2013. ISSN 1365-2613

SKRZECZYNSKA-MONCZNIK, J. et al. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. **Scand J Immunol**, v. 67, n. 2, p. 152-9, Feb 2008. ISSN 1365-3083

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009. ISSN 1873-2550

STEIN, V. M. et al. Immunophenotypical characterization of monocytes in canine distemper virus infection. **Vet Microbiol**, v. 131, n. 3-4, p. 237-46, Oct 15 2008. ISSN 0378-1135

STRAUSS-AYALI, D.; CONRAD, S. M.; MOSSER, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. **J Leukoc Biol**, v. 82, n. 2, p. 244-52, Aug 2007. ISSN 0741-5400

SUNDERKOTTER, C. et al. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4410-7, Apr 1 2004. ISSN 0022-1767

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v. 211, n. 6-8, p. 609-18, 2006. ISSN 0171-2985

TAFURI, W. L. et al. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and type 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, n. 2, p. 81-9, Mar-Apr 1996. ISSN 0036-4665

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v. 292, n. 1-2, p. 17-23, Sep 2004. ISSN 0022-1759

TANAKA, M. et al. Surface phenotype analysis of CD16⁺ monocytes from leukapheresis collections for peripheral blood progenitors. **Clin Exp Immunol**, v. 116, n. 1, p. 57-61, Apr 1999. ISSN 0009-9104

TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; PIZCUETA, P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. **J Exp Med**, v. 181, n. 6, p. 2259-64, Jun 1 1995. ISSN 0022-1007

TITUS, R. G.; SHERRY, B.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 170, n. 6, p. 2097-104, Dec 1 1989. ISSN 0022-1007

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol**, v. 149, n. 3-4, p. 280-4, Nov 10 2007. ISSN 0304-4017

VAN FURTH, R. et al. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. **Bull World Health Organ**, v. 46, n. 6, p. 845-52, 1972. ISSN 0042-9686

WALTER, G. J. et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4⁺CD45^{ro}⁺CD25⁺CD127^(low) regulatory T cells. **Arthritis Rheum**, v. 65, n. 3, p. 627-38, Mar 2013. ISSN 1529-0131

WARBURG, A. et al. Scanning electron microscopy of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Z Parasitenkd**, v. 72, n. 4, p. 423-31, 1986. ISSN 0044-3255

WOELBING, F. et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **J Exp Med**, v. 203, n. 1, p. 177-88, Jan 23 2006. ISSN 0022-1007

WONG, K. L. et al. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunol Res**, v. 53, n. 1-3, p. 41-57, Sep 2012. ISSN 1559-0755

WOOLLARD, K. J.; GEISSMANN, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. **Nat Rev Cardiol**, v. 7, n. 2, p. 77-86, Feb 2010. ISSN 1759-5010

XU, H. et al. Critical but divergent roles for CD62L and CD44 in directing blood monocyte trafficking in vivo during inflammation. **Blood**, v. 112, n. 4, p. 1166-74, Aug 15 2008. ISSN 1528-0020

XU, H. et al. Differentiation to the CCR2+ inflammatory phenotype in vivo is a constitutive, time-limited property of blood monocytes and is independent of local inflammatory mediators. **J Immunol**, v. 175, n. 10, p. 6915-23, Nov 15 2005. ISSN 0022-1767

YANG, Z.; MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Activation of the MAPK, ERK, following *Leishmania amazonensis* infection of macrophages. **J Immunol**, v. 178, n. 2, p. 1077-85, Jan 15 2007. ISSN 0022-1767

YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. **Curr Opin Hematol**, v. 17, n. 1, p. 53-9, Jan 2010. ISSN 1531-7048

YRLID, U.; JENKINS, C. D.; MACPHERSON, G. G. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. **J Immunol**, v. 176, n. 7, p. 4155-62, Apr 1 2006. ISSN 0022-1767

ZEMISHLANY, Z. et al. Elevated adhesiveness/aggregation of peripheral blood leukocytes in patients with major depression. **J Affect Disord**, v. 50, n. 1, p. 3-9, Jul 1998. ISSN 0165-0327

ZIEGLER-HEITBROCK, L. et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74-80, Oct 21 2010. ISSN 1528-0020

ZIEGLER-HEITBROCK, L.; HOFER, T. P. Toward a refined definition of monocyte subsets. **Front Immunol**, v. 4, p. 23, 2013. ISSN 1664-3224

ANEXO 1

Em síntese, em nossos resultados foi possível observar:

Caracterização de células CD14 ⁺ em cães		
Saudáveis		Infectados com <i>L. infantum</i>
CD14 ^{hi} SSC ^{hi}		CD14 ^{hi} SSC ^{hi}
CD14 ^{hi} SSC ^{lo}	=	CD14 ^{hi} SSC ^{lo}
CD14 ^{lo} SSC ^{lo}		CD14 ^{lo} SSC ^{lo}

Expressão de moléculas em monócitos (MFI)			
Moléculas	Saudáveis e Infectados		Assintomáticos
	CD14 ^{hi} SSC ^{lo}	CD14 ^{lo} SSC ^{lo}	CD14 ⁺
CCR2	=		>
CD11a	>		>
CD11b	>		>
CD11c	=		=
CD14	>		>
CD16	=		=
CD44	>		>
CD45RO	>		<
CD56	>		=
CD62L	>		>
CD80	=		<
CX3CR1	>		=
MHCII	>		>

Morfologia		
Monócito	CD14 ^{hi} SSC ^{lo}	CD14 ^{lo} SSC ^{lo}
Núcleo	Basofílico	Eosinofílico
	Ferradura	Rim

Fagocitose		
Monócito	CD14 ^{hi} SSC ^{lo}	CD14 ^{lo} SSC ^{lo}
	>	

ANEXO 2

Esboço do artigo a ser elaborado, como solicitado pelo colegiado.

STUDY OF HETEROGENEITY IN DOGS MONOCYTES INFECTED OR NOT BY LEISHMANIA INFANTUM

INTRODUCTION

Blood monocytes develop in the bonemarrow from a dividing common myeloid progenitor that is shared with granulocytes. Monocytes are subsequently released to the peripheral circulation as nondividing cells. Peripheral blood monocytes are recognized as the largest pool of circulating progenitor cells and form a vital part of the immune system, exerting important functions in homeostasis, tissue repair, immunity, and inflammation (Gordon e Taylor, 2005; Auffray, Sieweke e Geissmann, 2009; Yona e Jung, 2010). Monocytes play an important role in organism defense, including phagocytosis of opsonized pathogens, digestion and processing of foreign antigens, antigen presentation by major histocompatibility complex class I (MHC-I) or major histocompatibility complex class II (MHC-II) molecules and release of several inflammatory effector molecules. They also determine the direction and intensity of inflammatory reactions elicited in response to given pathogens by production of selected cytokines with immunomodulating activity (Hume, 2006; Hussen *et al.*, 2013).

Monocytes also exhibit heterogeneity among their populations as has been observed in lymphocytes, showing singularities as to its differentiation, phenotype, and fate, whose functions have been revealed through the study of their subpopulations, particularly in humans and mice in pathologies arising from infectious or non-communicable diseases (Strauss-Ayali, Conrad e Mosser, 2007; Cros *et al.*, 2010; Saha e Geissmann, 2011; Appleby *et al.*, 2013). Among the infectious diseases studied is leishmaniasis, caused by digeneans protozoa of the genus *Leishmania* (Ross, 1903) which are obligate intracellular parasites in cells of the mononuclear phagocyte system (MPS) of the mammalian host (Tafari *et al.*, 1996). The most important is that visceral leishmaniasis leads most infected individuals death within two years if not treated (WHO 2011site). In Brazil, the parasite *Leishmania (Leishmania) chagasi (L. infantum)* is the main cause of canine visceral leishmaniasis (CVL) and the dog (*Canis familiaris*) is the main reservoir of the parasite, taking a central role in transmission to humans, especially in areas of environmental degradation associated with human migration and

urbanization process, representing serious public health problem (Deane, Deane e Alencar, 1955; Pinto *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013).

Despite the importance of dogs in the epidemiology of visceral leishmaniasis little is known about canine monocytes and their response against the infection by *Leishmania* spp. or if divided into subpopulations as in other species, as recent studies have demonstrated alterations in receptor expression related to peripheral blood monocytes in dogs naturally infected with *L. infantum* (Reis *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2011; Daneshvar *et al.*, 2012). The aim of this work is to study monocytes subpopulations and markers of susceptibility and resistance by the analysis of peripheral blood monocytes of naturally infected dogs and to describe the behavior of these cells during infection.

METHODOLOGY

Ethical statement

This study was approved by the Comissão de Ética no Uso de Animais - **CEUA** - da Universidade Federal de Minas Gerais (protocol 199/2013). All procedures involving animals were conducted according to guidelines of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Uninfected dogs

Five dogs (control group) of unknown age, negative for Leishmania infection were obtained from the Control Zoonosis Center of the Municipality of Carandaí, Belo Horizonte Metropolitan area, Minas Gerais (MG) State, Brazil. In all tests the dogs (n = 5) had negative results. This protocol received the approval of the CETEA/UFMG (protocol 139/2012).

Naturally infected dogs

Ten adult mongrels dogs, naturally infected with *L. infantum*, were obtained from the Zoonosis Center of metropolitan area of Belo Horizonte (Municipality of Ribeirão das Neves, state of Minas Gerais, Brazil). Prior to inclusion in the study, dogs received anti-helminthic and anti-ectoparasitic treatment and were immunized against parvovirus, distemper, leptospirosis, para-influenza, and hepatitis (HTLP5CV-L vaccine PfizerH). They were maintained for 30 days in kennels at the Department of Parasitology of Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil. Commercial dog food and water were

provided ad libitum. Infection was confirmed by serological tests, polymerase chain reaction, and immunohistochemistry. Dogs (n = 10) showed positive results in all tests.

Clinical examination

Clinical examinations were carried out on ten infected dogs to evaluate body condition, vital signs, palpable peripheral lymph nodes (cervical and popliteal), and dermatological signs. Animals were categorized according to the presence of clinical signs of visceral leishmaniasis, and infected dogs were divided into two groups: Group I, asymptomatic, consisted of five dogs showing no classic symptoms of leishmaniasis; Group II, symptomatic was five dogs that exhibited classic signs of CVL including lymphadenopathy, cutaneous alterations (alopecia, dry exfoliative dermatitis or ulcers), onychogryphosis, keratoconjunctivitis, and cachexia.

Indirect immunofluorescence antibody test (IFAT)

IFAT was used to detect Leishmania antibodies. Antigen was prepared from *L. infantum* MHOM/BR/1967/BH46 promastigotes and fixed on slides. Serum samples were diluted at 1:40 in phosphate buffered saline (PBS), and 25 mL was placed on demarcated regions of the slide. The slide was incubated in a humid chamber at 37°C for 30 min, washed with PBS, and dried at room temperature. Then 25 mL of a commercially available fluorescein-conjugated anti-dog IgG (Bethyl® Laboratories, Montgomery, TX, USA) diluted at 1:1500 in PBS containing 2% Tween (Tween 80, Merck®, Germany) was added to each demarcated region of the slide, followed by incubation, washing, and drying. Samples presenting fluorescence at 1:40 dilution were considered positive (Amorim *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Determination of anti-Leishmania IgG was carried out using standard ELISA. Leishmania soluble antigen was derived from *L. chagasi* strain MHOM/BR/1967/BH46 promastigote forms ruptured ultrasonically. Aliquots (100 µL) of soluble antigen dissolved in 0.05 M carbonate buffer (pH 9.6) to a final concentration of 2 mg/mL were transferred to individual wells of a 96-well microplate and incubated overnight at 4°C. Coated wells were washed five times with PBS containing 0.2% Tween-20, and antigenic sites were saturated with 150 µL PBS containing 0.2% Tween-20 and 2% casein (Sigma®, St Louis, MO, USA; product # C0376) for 30 min at 37°C, washed three times with PBS, and a 100 µL-aliquot of serum sample (diluted 1:400) was placed into each well. Plates were incubated for 45 min at 37°C, washed five times with PBS, and a 100 µL aliquot of diluted enzyme-labelled immunoglobulin was added to each

well. The titer of rabbit-anti-canine-IgG conjugates (Sigma®; product #A6792) was 1/10000. Following incubation for 45 min at 37°C, plates were washed five times with PBS and a 100 µL aliquot of 4% (w/v) ortho-phenylenediamine in phosphate/citrate buffer (pH 5) containing 4 µL of 30 (v/v) hydrogen peroxide was added to each well. Reaction mixture was incubated at 37°C for 10 min. Reaction was stopped by addition of 25 µL 2M sulphuric acid to the well, and absorbance was measured at 492 nm using a BioRad (São Paulo, SP, Brazil) model 550 ELISA reader. The cut-off point was the mean absorbance reading of the VL-negative controls plus two standard deviations (Amorim *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2013).

Polymerase chain reaction (PCR)

Specific PCR carried out on ear skin samples was used to confirm that animals were positive to *L. infantum*. Twenty-five mg ear skin samples were extracted using the DNeasyH Blood & Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers LV1 (59 ACGAGGTCAGCTCCACTCC 39) and LV2 (59 CTGCAACGCCTGTGTCTACG 39) used for DNA amplification were specific for a repetitive DNA sequence in *L. infantum*. Amplified PCR products were analyzed on 5% silver-stained polyacrylamide gels (Alves *et al.*, 2009; Figueiredo *et al.*, 2013). All dogs were positive. Five dogs negative for *Leishmania* infection were used as controls.

Immunohistochemical (IHC)

The immunohistochemistry reaction was used for diagnosis by parasite load in the ear skin. Deparaffinized slides were hydrated and incubated with 4% hydrogen peroxide (30 v/v) in PBS 10%, pH 7.2, followed by incubation with normal goat serum (diluted 1:50). Heterologous immune sera from dogs naturally infected with *L. infantum* (diluted 1:100 in 0.01 M PBS) were used as a primary cross-reactive antibody (Tafari *et al.*, 2004). Slides were incubated for 18–22 h at 4°C in a humid chamber, washed with PBS, incubated with biotinylated goat anti-mouse and anti-rabbit (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA), washed once with PBS, and incubated with streptavidin-peroxidase complex (Link-DAKO, LSAB2 kit, California, USA) for 20 min at room temperature. Reaction was developed with 0.024% diaminobenzidine (DAB: Sigma, Saint Louis, USA) and 0.16% hydrogen peroxide (40 v/v). Slides were counterstained with Harris's hematoxylin, dehydrated, cleared, and mounted with coverslips (Figueiredo *et al.*, 2013). All dogs were positive. Five dogs negative for *Leishmania* infection were used as controls.

Phenotypic analysis by flow cytometry analysis

Peripheral blood samples for flow cytometry were collected in vacuum tubes blood collection containing K₃EDTA as anticoagulant. Blood samples were stained according to a whole-blood technique using BD FACS™ Lysing Solution (BD Pharmingen, #349202) protocol. Briefly, Falcon tubes containing 100 µL of whole blood were stained in the dark for 15 minutes at room temperature (20° to 25°C) with the appropriate amount of PerCP-Cy™5.5 mouse anti-human CD14 (BD Pharmingen™, #550787), PE mouse anti-human CD16 (BD Pharmingen™, #555407), APC anti-human HLA-DR (BioLegend Inc., product #307610), mouse anti-dog CD3 (©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec, product #MCA1774GA) labeled by Zenon® Alexa Floor 488®, mouse anti-dog CD11a (©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec, product #MCA1776) labeled by Zenon® Alexa Floor 488®, mouse anti-dog CD11b (©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec, product #MCA1777S) labeled by Zenon® Alexa Floor 488®, mouse anti-dog CD11c (©Bio-Rad Laboratories, Inc. AbDSerotec, product #MCA1778S) labeled by Zenon® Alexa Floor 488®, PE mouse anti-human CCR2 (R&D Systems, Inc., product #FAB151P), biotin rat anti-human CX3CR1 (eBioscience, Inc., product #13-6099-82) labeled by APC streptavidin (Biolegend Inc., product #405207), mouse anti-human CD62L (eBioscience, Inc., product #17-0629-42), Pacific Blue™ rat anti-mouse/human CD44 (Biolegend Inc., product #103020), FITC mouse anti-human CD80 (Biolegend Inc., product #305206). Erythrocytes were lysed and leukocytes fixated for 10 minutes with BD FACS™ Lysing Solution before being washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged for seven minutes at 1,300 *rpm*. Flow cytometry was performed on a BD LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD Biosciences) 17-color flow cytometer, and data were acquired from at least 1x10⁶ events, gated morphologically (bivariate plot of forward versus side scatter) with BD FACS Diva Software (BD Biosciences), before analysis using FlowJo v8.8.7 software (©Tree Star Inc.).

Cytokines and chemokines analysis

Analysis of cytokines and chemokines was performed as previous described (Yang, Mosser e Zhang, 2007). Approximately 2-5x10⁵ sorting monocytes were grown in culture plates of 48 wells with DMEM/F12 medium with 10% FCS and were stimulated with LPS for 16 hours. The supernatant was collected from each well and subjected to ELISA. Cytokines (IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ and TNF-α) were evaluated by sandwich ELISA (BD Pharmingen kit) using specific antibodies according to the manufacturer's instructions. Sensitizing the microplate was added 100 µL / well of monoclonal antibodies (anti-IL-4/MAB754, anti-IL10/MAB7352, anti-TGF-β/MAB100B,

anti-IFN- γ /MAB781 and anti-TNF- α / MAB1507, R & D Systems Inc, Minneapolis, USA) using different dilutions in PBS, pH 7.4 and brought to incubation for 12-16h at room temperature. After blocking and washing the reaction was stopped by adding 50 μ L / well of 1M H₂SO₄. The optical density was determined using microplate reader with a 450 nm. The quantification of the cytokines present in the samples was determined by optical density to the standard curve obtained with known concentrations of the cytokines analyzed by software SOFTMax® PRO 4.0 which performs logarithmic transformations.

Cytological evaluation

Cell suspensions homogenized in PBS and for each cytocentrifuged (cytospin) was used 150 μ L of suspension containing 1×10^5 cells. For this one we have used cytocentrifuge (Shandon Cytospin® 2) with a rotation of 1000 rpm for two minutes. After preparation of cytospins, the slides were kept at room temperature for one hour to dry protected from light. The slides were then stained using the staining Diff Quick Kit for one minute in the solution A and one minute in solution B for analysis by conventional optical microscopy.

RESULTS

Characterization of monocytes (quantitative and qualitative evaluation of subpopulations of monocytes)

After exclusion of events acquired in non-ideal flow conditions, through visualization by acquisition time (Fig. 1A), and exclusion of cellular clusters through the selection of cell singlets (Fig. 1B), we observed that the dog's profile distribution of leukocytes, according to the size (FSC - Forward scatter) and granularity (SSC - Side Scatter), similar to that described in humans (Lyons et al, 2006).

By analyzing CD14 positive cells (CD14⁺), according to size and granularity, we observe that are located mainly between populations of lymphocytes (small, little grainy), and neutrophil (more granular). Some cells, however, permeate the populations of lymphocytes and neutrophils (Fig. 1C and 1F), highlighting the need to distinguish these cells for specific markers. CD14⁺ cells constitute about 4 % of the total (Fig.1D) and when evaluating these cells relative to the granularity (CD14⁺ / SSC), we note three distinct populations : one with high expression of CD14 and high granularity (CD14^{hi}SSC^{hi}), constituting about 2% of monocytes, another high expression of CD14 and low granularity (CD14^{hi}SSC^{lo}), constituting about 90% of

monocytes and a low CD14 expression and low granularity (CD14^{lo}SSC^{lo}), constituting approximately 8% of monocytes (Fig.1E).