

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SANIDADE ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS CANINOS (DH82) POR DUAS ESPÉCIES DE *Leishmania*:
Leishmania amazonensis e *Leishmania chagasi***

Natalia Rocha Nadaes

Março 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
SANIDADE ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS CANINOS (DH82) POR DUAS ESPÉCIES DE *Leishmania*:
Leishmania amazonensis e *Leishmania chagasi***

Natalia Rocha Nadaes

Sob orientação da professora

Dra. Lucia Helena Pinto da Silva

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ

Março de 2014

636.70896

N126c

T

Nadaes, Natalia Rocha, 1987-

Caracterização da infecção da linhagem de macrófagos caninos (DH82) por duas espécies de *Leishmania* : *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* / Natalia Rocha Nadaes. - 2014.

50 f.: il.

Orientador: Lucia Helena Pinto da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

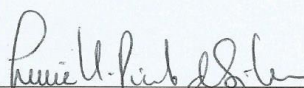
Bibliografia: f. 43-53.

1. Cão - Doenças - Teses. 2. *Leishmania* - Teses. 3. Leishmaniose - Teses. 4. Macrófagos - Teses. 5. Protozoologia veterinária - Teses I. Silva, Lucia Helena Pinto da, 1975- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.


NATALIA ROCHA NADAES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal.

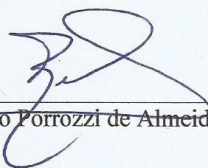
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 31/03/2014.



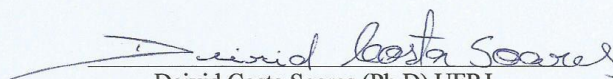
Lucia Helena Pinto da Silva (Ph.D) UFRRJ



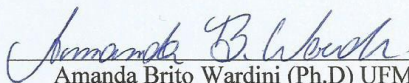
Débora Decote Ricardo de Lima (Ph.D) UFRRJ



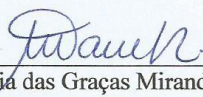
Renato Porrozzi de Almeida (Ph.D) FIOCRUZ



Deivid Costa Soares (Ph.D) UFRJ



Amanda Brito Wardini (Ph.D) UFMG



Maria das Graças Miranda Danelli

Agradecimentos

- Agradeço em primeiro lugar a minha mãe, Rosane, que sempre foi um porto seguro e sinônimo de conforto e segurança em minha vida, e minhas irmãs Mariana e Julia, que apesar de todas as brigas sei que sempre poderei contar com o apoio e compreensão delas.
- Agradeço a toda minha família, avós, tios e primos, que me incentivaram durante essa jornada.
- Agradeço aos meus amigos, Victor e William, que sempre estiveram ao meu lado.
- Agradeço a todos do Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária (UFRRJ), aprendi muito com vocês e vou guardar ótimas lembranças.
- Agradeço as minhas amigas Amanda, Aline, Bianca, Carolina, Debora, Isabela, Michelle e Nádia. Uma amizade que nasceu nos corredores do laboratório e que vou levar comigo para onde eu for.
- Agradeço as amigas Danielle e Isabel por todo carinho e amizade.
- Agradeço ao Leandro pelos conselhos, pela ajuda, por toda a paciência e por ter se mostrado um grande amigo.
- Agradeço a professora Graça Danelli por sempre me ajudar quando precisei dentro do laboratório e por ser também uma amiga fora dele.
- Agradeço a professora Debora Decote, por toda ajuda e pelas conversas descontraídas durante o café.
- Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses (UFRJ), e em especial a professora Elvira Saraiva, por me receberem de maneira calorosa, permitindo assim, que eu completasse esse projeto.
- Agradeço a minha orientadora, Lucia, que acreditou na minha capacidade e me ajudou no meu crescimento científico.
- Agradeço as agências financiadoras CNPq e FAPERJ.

Resumo

NADAES, Natalia Rocha **Caracterização da infecção da linhagem de macrófagos caninos (DH82) por duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi***. 2014. 64p. Mestrado em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A leishmaniose canina está presente em diversos países do Novo e Velho Mundo. A América Latina possui uma incidência estimada em milhões de cães infectados, podendo chegar à 75% da população em áreas endêmicas. A infecção canina pela *Leishmania chagasi* é a mais comum, embora o cão possa se infectar por outras espécies de *Leishmania*, e o relato desse fato tem sido cada vez mais frequente. A maioria dos estudos usa macrófagos murinos como modelo de estudo da leishmaniose *in vitro*. Nosso trabalho tem por objetivo caracterizar a infecção dos macrófagos caninos da linhagem DH82 por *L. amazonensis* e *L. chagasi*, visando propor um possível modelo canino *in vitro*. Nossos resultados mostraram que a linhagem de macrófagos caninos DH82 interage com formas promastigotas de ambas as espécies de *Leishmania*, no entanto há uma maior interação com *L. amazonensis* do que com *L. chagasi*. Além disso, observamos que a *L. amazonensis* é mais infectiva para os macrófagos caninos DH82 do que a *L. chagasi*. A opsonização por anticorpos específicos facilita a interação e aumenta a sobrevivência de *L. chagasi* comparada a *L. chagasi* não opsonizada. O perfil de interação e infecção de *L. amazonensis* e *L. chagasi* é semelhante entre as linhagens de macrófagos caninos DH82 e RAW 264.7. A análise da expressão de MHC II e CD80 na superfície dos macrófagos caninos DH82 mostraram que essas células apresentam uma expressão basal e que a infecção por ambas as espécies de *Leishmania* não modula a expressão de MHCII, mas a expressão basal de CD80 parece aumentar na presença de *L. amazonensis*. Foi observado um aumento da expressão de MHCII e CD80 nas células estimuladas por LPS, no entanto os parasitos parecem não modular a expressão de ambas as moléculas nas células estimuladas pelo LPS. A detecção de NO e ROS nos macrófagos caninos DH82, mostraram que essas células possuem níveis basais de NO e ROS, e que após estímulo com LPS há um aumento desses radicais. A análise da produção de NO ou ROS nas células basais ou estimuladas pelo LPS na presença de *L. amazonensis* e *L. chagasi* não mostrou alteração. Apesar das diferenças encontradas entre o nosso modelo experimental proposto e alguns resultados já descritos na literatura para outros macrófagos, a linhagem de macrófago canino DH82 pode ser um possível modelo experimental canino de infecção *in vitro* por *Leishmania*.

Palavras-chave: Leishmaniose canina, macrófagos caninos, DH82, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*

Abstract

NADAES, Natalia Rocha **Characterisation of the infection of a canine macrophage (DH82) by two *Leishmania* species: *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi***. 2014. 64p. Master in Veterinarian Science. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Canine leishmaniasis occurs in many countries from both Old and New World. Latin America presents an estimated incidence of millions case of infected dogs, reaching up to 75% of the population in endemic areas. Canine infection by *Leishmania chagasi* species is the most common, even though the dog may be infected by other *Leishmania* species, and reports of this fact are ever more often. Most studies use murine macrophages as a model of studying leishmaniasis *in vitro*. In this study, we characterize the infection of canine DH82 macrophages cell line by *L. amazonensis* and *L. chagasi* in order to propose a possible *in vitro* canine model. Our results demonstrated that the canine DH82 macrophages cell line interacts with promastigotes of both *Leishmania* species, however *L. amazonensis* interact more than *L. chagasi*. Furthermore, we have observed that *L. amazonensis* is more infective to canine DH82 macrophages than *L. chagasi*. Specific antibody opsonization facilitates interaction and increases the survival rates of *L. chagasi* when compared to non-opsonized *L. chagasi*. The analysis of interaction and infection profile of DH82 and RAW 264.7 macrophages cell lines by *L. amazonensis* and *L. chagasi* showed to be similar. Expression analysis of MHC II and CD80 on canine macrophage DH82 surface showed that these cells have a basal expression and that none of the *Leishmania* species modulate the expression of MHCII, but basal expression of CD80 seems to be increased in the presence of *L. amazonensis*. In LPS- stimulated cells was observed an increase of CD80 and MHCII expression, however, the parasites do not appear to modulate the expression of both molecules in LPS-stimulated cells. NO and ROS detection in canine DH82 macrophages showed that these cells have basal levels of NO and ROS, and that, after stimulation with LPS, there is an increase of it. The detection of NO and ROS in *L. amazonensis* or *L. chagasi* infected macrophages, showed that none of the species induced NO or ROS on basal or LPS-stimulated cells. Despite the differences found among our proposed experimental model and others described in the literature, canine DH82 macrophage cell line may be a possible canine experimental model of infection by *Leishmania*.

Key words - Canine leishmaniasis, canine macrophage, DH82, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*

Lista de Abreviações

CD11b – membro da família de integrinas beta dois

CD11c – membro da família de integrinas beta dois

CD80 – Molécula co-estimulatória B7-1

CD86 – Molécula co-estimulatória B7-2

CR – Receptor de complemento

DH82 – Linhagem de macrófagos caninos

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FcR – Receptor para a porção Fc do anticorpo

gp63 – Glicoproteína de 63kDa

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IFN- γ - Interferon-gama

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

iNOS– Óxido nítrico sintetase induzida

K1 – Linhagem de macrófagos caninos

K6 – Linhagem de macrófagos caninos

La – *Leishmania amazonensis*

Lc – *Leishmania chagasi*

Lc ops. - *Leishmania chagasi* opsonizada por anticorpos

LPG – Lipofosfoglicano

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHCII – Complexo de histocompatibilidade do tipo II

MS – Ministério da Saúde

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetase

O_2^- - Ânion super óxido

O30D – Linhagem de macrófago canino

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RAW264.7 – Linhagem de macrófagos murinos

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TGF- β – Fator transformador de crescimento beta

TLR – Receptor semelhante ao Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Sumário

Introdução.....	1
Leishmaniose	1
O Parasito	1
O Ciclo de Vida	2
Leishmaniose Canina	3
Medidas públicas de controle da leishmaniose visceral canina no Brasil	7
Macrófagos	7
Interação da <i>Leishmania</i> com macrófagos	8
Interação de macrófagos caninos e <i>Leishmania</i>	9
Justificativa	10
Objetivo Geral	12
Objetivos Específicos	12
Metodologia	13
Parasitas	13
Titulação do soro imune	13
Oponização da <i>Leishmania chagasi</i> por soro imune	13
Macrófagos	13
Ensaio de fagocitose <i>Leishmania</i> x Macrófagos	13
Determinação do Índice de Infecção	14
Expressão das moléculas MHC II e CD80	14
Detecção de NO e ROS	14
Análise estatística	14
Resultados	15
A linhagem DH82 interage com ambas as espécies: <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> e a opsonização facilita a interação de <i>L. chagasi</i> em macrófagos caninos DH82	15
A espécie <i>L. amazonensis</i> infecta mais a linhagem DH82 do que a espécie <i>L. chagasi</i>	18
As linhagens de macrófago murina RAW264.7 e canina DH82 apresentam perfil semelhante de interação e infecção pelas espécies de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> <i>in vitro</i>	19
A opsonização por anticorpos aumenta a infectividade de <i>L. chagasi</i> em macrófagos caninos DH82	20
<i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> não modulam a expressão de MHC II e CD80 em macrófagos caninos DH82	22
Avaliação da Produção de Óxido Nítrico (NO) e de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pelos Macrófagos Caninos DH82 em Repouso e Estimulados com LPS na Presença ou Não de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	25
Discussão	28
Conclusões	33
Bibliografia	34

INTRODUÇÃO

Leishmaniose

As leishmanioses representam um desafio a ser superado, sendo considerada uma doença negligenciada. Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou os resultados de um levantamento global sobre a situação da leishmaniose no mundo (ALVAR *et al.*, 2012). Esse estudo encontrou 98 países, com transmissão endêmica da leishmaniose nos cinco continentes. Anualmente, são registrados mais de duzentos e vinte mil casos de leishmaniose cutânea, enquanto a forma visceral acomete mais de cinquenta e oito mil pessoas. O Brasil está listado entre os seis países com maior número de casos de leishmaniose visceral, e entre os dez países com o maior número de casos estimados para a leishmaniose cutânea.

No homem, a doença pode se apresentar de quatro formas clínicas distintas: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>).

A forma cutânea se apresenta como lesões ulceradas da pele, que geralmente se curam de forma espontânea em poucos meses, e pode ser causada por diversas espécies de *Leishmania* como: *L. major*, *L. tropica*, e *L. aethiopica* no Velho Mundo e pelas espécies: *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* e *L. lindenbergi* no Novo Mundo (MURRAY *et al.*, 2005). A forma cutânea difusa apresenta lesões de pele crônicas e disseminadas pelo corpo do paciente, enquanto a forma mucocutânea, geralmente surge meses ou anos após o primeiro episódio de leishmaniose cutânea, e causa destruição progressiva da mucosa oral e nasal, podendo levar à completa destruição do septo nasal e palato (CHAPUIS *et al.*, 2007).

A forma visceral pode ser causada pela *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo, e *L. chagasi* no Novo Mundo, e representa a forma mais severa da doença, sendo fatal, se não for tratada. Na forma visceral, há a disseminação do parasito pelo organismo acometendo diversos órgãos, causando hepatomegalia e esplenomegalia febre, fadiga e perda de peso (CHAPUIS *et al.*, 2007).

Além do homem, outras espécies de mamíferos são susceptíveis a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* como canídeos, gambás e roedores (ASHFORD, 1996). As espécies de animais silvestres e domésticos são consideradas reservatórios e apresentam papel central no ciclo de transmissão da doença ao homem, sendo os canídeos, os principais reservatórios das espécies de *Leishmania* viscerotrópicas no Mediterrâneo, Ásia, e Américas do Sul e Norte. A princípio, a *Leishmania donovani* é a única espécie capaz de gerar uma parasitemia elevada no homem, e, portanto, permitir a transmissão homem-homem sendo considerada uma antroponose (CHAPUIS *et al.*, 2007; PALATNIK-DE-SOUZA & DAY, 2011).

O parasito

Os protozoários do gênero *Leishmania*, pertencem a Ordem Kinetoplastida e a Família Trypanosomatidae. A região do tubo digestivo do flebotômíneo, onde ocorre o desenvolvimento do parasito divide o gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (CRUZ *et al.*, 2010). Quando a metacicloquênese ocorre na região anterior ao piloro, o parasito pertence ao subgênero *Leishmania*, enquanto que, quando o parasito se diferencia a partir da região posterior ao piloro é classificado como subgênero *Viannia*. Nas Américas encontramos os dois subgêneros, enquanto no Velho Mundo, apenas o subgênero *Leishmania* está presente (CRUZ *et al.*, 2010).

Estes parasitos são heteroxenos, necessitam de um hospedeiro vertebrado e um invertebrado para completar o seu ciclo de vida, e apresentam 2 formas distintas: formas

promastigotas, extracelulares e flageladas, que estão presentes no trato digestivo do inseto vetor (LAINSON & SHAW, 1987), e as formas amastigotas, que não apresentam flagelo livre, e estão presentes no interior de macrófagos, onde se multiplicam em vacúolos (ROSSEAU *et al.* 2001).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos para o hospedeiro vertebrado por dípteros flebotomíneos da Família Psychodidae, subfamília Phlebotomine, sendo as espécies do gênero *Phlebotomus* as de importância no Velho Mundo, e as do gênero *Lutzomyia* importantes no Novo Mundo (SHIMABUKURO & GALATI, 2011).

O ciclo de vida

O flebotomíneo se infecta ao ingerir formas amastigotas de *Leishmania* spp. em um hospedeiro vertebrado infectado. No intestino do flebotomíneo, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, que se multiplicam ativamente até o rompimento da matriz peritrófica, que ocorre através da secreção de quitinase pelos parasitos (SCHLEIN *et al.*, 1991). Os promastigotas procíclicos se ligam às células epiteliais do intestino inserindo o seu flagelo entre as microvilosidades, essa ligação é mediada pelo lipofosfoglicano (LPG), o glicoconjugado majoritário presente na superfície dos promastigotas (PIMENTA *et al.*, 1992). Após a eliminação dos restos da digestão do sangue, os promastigotas migram em direção a probóscide. Durante essa migração, os promastigotas passam pelo processo de diferenciação chamado metaciclogênese, onde passam de um estágio não-infectante (procíclico), para um estágio infectante (metacíclico) (SACKS *et al.*, 1985) (**Fig. 1**). Em um próximo repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas são transmitidas durante a picada e fagocitadas por macrófagos presentes no tecido. No interior do fagolisossoma dos macrófagos, as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam, por divisão binária, até a ruptura da célula e fagocitose por outros macrófagos, mantendo a infecção no hospedeiro vertebrado (NADERER & McCONVILLE, 2007).

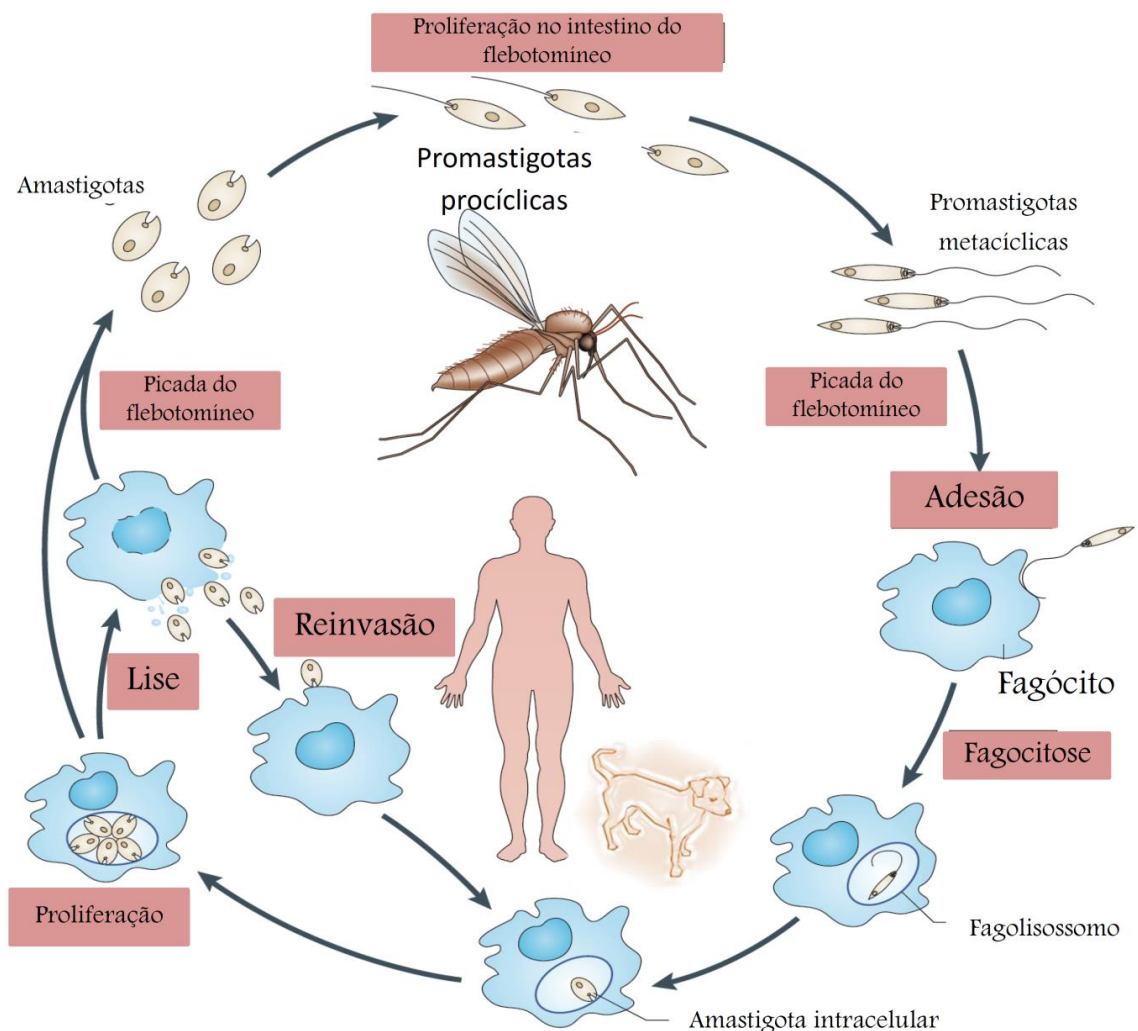


Figura. 1: Ciclo de vida *Leishmania* spp. Adaptado de Palatnik-de-Souza & Day (2011).

Leishmaniose canina

A leishmaniose canina está presente em aproximadamente 50 países (BANETH *et al.*, 2008; DANTAS-TORRES, 2009), distribuídos em todos os continentes, com exceção da Oceania (BANETH *et al.*, 2008; OTRANTO *et al.*, 2009).

A real incidência da *Leishmania* spp. na população canina é de difícil predição, devido à diferenças de sensibilidade dos métodos diagnósticos e a falta de trabalhos epidemiológicos em algumas regiões. (LÓPEZ-CÉSPEDES *et al.*, 2012). Estima-se que milhões de cães estejam infectados na América Latina (WERNECK *et al.*, 2006), em algumas regiões a prevalência da leishmaniose canina pode alcançar índices de até 75% (CORTADA *et al.*, 2004).

O cão pode ser infectado por diversas espécies do gênero *Leishmania* (Tabela 1) sendo a forma visceral causada pela *L. chagasi*, a mais comum e também a de maior importância para a saúde pública (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012).

<i>Leishmania</i> spp.	Distribuição Geográfica
<i>L. amazonensis</i>	Brasil
<i>L. arabica</i>	Arábia Saudita
<i>L. braziliensis</i>	América do Sul
<i>L. colombiensis</i>	Venezuela
<i>L. guyanensis</i>	Colômbia
<i>L. infantum</i>	África, Américas, Ásia, Europa
<i>L. major</i>	Egito, Arábia Saudita
<i>L. mexicana</i>	Equador, Estados Unidos da América
<i>L. panamensis</i>	Colômbia, Equador, Panamá
<i>L. peruviana</i>	Peru
<i>L. pifanoi</i>	Equador
<i>L. tropica</i>	Índia, Irã, Marrocos, Síria

Tabela 1. Espécies de *Leishmania* reportadas em cães do Novo e Velho Mundo. Adaptado de Dantas-Torres e colaboradores (2012).

Há muito já se reconhece o cão, como o principal reservatório urbano da *L. chagasi* (BANETH, *et al.*, 2008; LÓPEZ-CÉSPEDES, *et al.*, 2012), e seu papel no ciclo urbano da doença pode ser atribuído a sua proximidade com o homem (DESJEUX, *et al.*, 2004; DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006). Tanto os cães sintomáticos quanto os assintomáticos são capazes de infectar o flebotomíneo (BANETH, *et al.*, 2008), apesar da infectividade dos cães sintomáticos ter se mostrado maior que a dos cães assintomáticos em um estudo realizado por Michalsky e colaboradores (2007).

Os cães infectados podem ou não apresentar sintomatologia, que varia em diferentes graus de severidade (BANETH, *et al.*, 2008). Os cães podem apresentar um quadro viscerocutâneo com evolução crônica (GRAMICCIA, 2011) e aparecimento de lesões cutâneas, linfadenopatia, esplenomegalia, ceratoconjuntivite, epistaxe e onicogrifose (**Fig. 2**) (CIARAMELLA, *et al.* 1997) ou apenas apresentarem alguns sintomas inespecíficos como febre, caquexia e apatia, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico.



Figura 2. Sinais clínicos da leishmaniose canina. (a) ceratoconjuntivite; (b) lesão facial com dermatite esfoliativa; (c) epistaxe; (d) onicogribose; (e) lesão ulcerativa. Beneth e colaboradores (2008).

No modelo murino de infecção por *L. major*, a dicotomia de Th1/Th2 relacionando resistência e susceptibilidade, respectivamente, está bem estabelecido (REINER & LOCKSLEY, 1995; LAUNOIS et al, 1998). No modelo canino, a susceptibilidade ou resistência do animal está correlacionada com o balanço entre a resposta imune humoral e celular do indivíduo (REIS, *et al.*, 2009; PINELLI *et al.*, 1994) e a persistência e multiplicação dos parasitos (MORENO & ALVAR, 2002). Estudos experimentais em cães infectados por *L. infantum* mostraram que, anos após a infecção, cães resistentes ou assintomáticos possuem uma forte resposta linfoproliferativa e nenhum anticorpo foi detectado no soro desses animais, entretanto, cães sintomáticos ou suscetíveis desenvolveram uma fraca resposta linfoproliferativa e apresentaram altos níveis de anticorpos não protetores no soro. Resultados similares foram observados em cães naturalmente infectados (PINELLI *et al.*, 1994). O principal mecanismo efetor de uma resposta imune protetora envolvido na resposta contra *L. chagasi* em cães é a ativação dos macrófagos por interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) e fator de necrose tumoral-alfa ($\text{TNF-}\alpha$), levando a morte das formas amastigotas do parasito através da produção de óxido nítrico pela via da L-arginina como foi observado em cães infectados com *L. chagasi* após tratamento para a leishmaniose. (VOULDOUKIS *et al.*, 1996) . A correlação de produção de NO e atividade leishmanicida também foi demonstrada na linhagem de macrófago 030D infectada com *L. infantum* (PINELLI *et al.*, 2000).

Dessa forma, a morte do parasito requer um “milieu” favorável de citocinas, especialmente $\text{IFN-}\gamma$ e a produção de óxido nítrico pela NO sintetase, (PINELLI *et al.*, 1995, 1999, 2000; ZAFRA *et al.*, 2008) além da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, e co-estimulatórias B7 (CD80, CD86). Em contrapartida, a ausência de uma resposta de célula T adequada para o controle do parasito leva ao aparecimento de sinais clínicos, como altos níveis de anticorpos contra *Leishmania* e alta

carga parasitária na pele, medula óssea, fígado, baço e linfonodos (SANCHEZ *et al.*, 2004; SARIDOMICHELAKIS, 2009, REIS *et al.*, 2010).

O curso da doença no cão é bastante variável, e a soroconversão pode ocorrer entre 1-22 meses pós infecção (OLIVA, *et al.*, 2006) e, apenas, uma pequena parcela da população canina infectada apresenta sinais clínicos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; LEONTIDES *et al.*, 2002). Dessa maneira, os testes moleculares realizados com material de medula óssea ou sangue periférico são os primeiros a se tornarem positivos, seguido dos testes sorológicos e da detecção do parasito nos tecidos (citologia) (GRAMICCIA, 2011). O diagnóstico da doença no cão pode ser feito através de exame citológico da medula óssea ou linfonodo, técnicas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) ou o ensaio imunoenzimático (ELISA) ou testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que além de detectar a presença do parasito, pode identificar a espécie envolvida (GRAMICCIA, 2011), e também o teste rápido imunocromatográfico (COURAL-VITAL *et al.*, 2014) (Fig. 3).

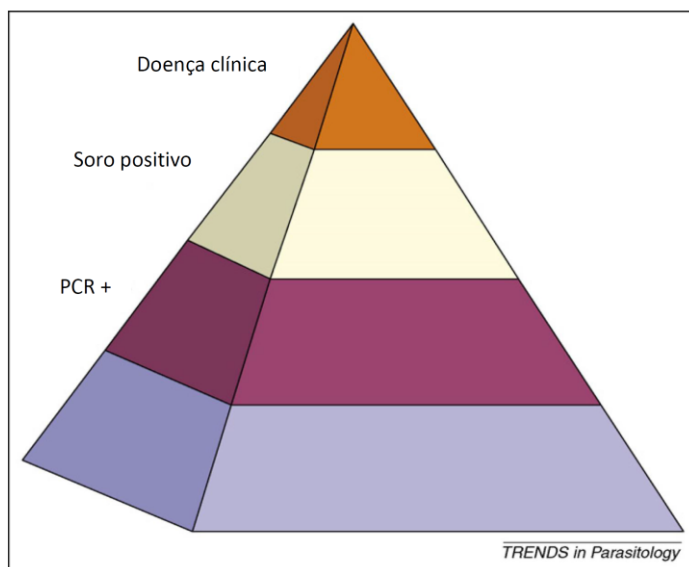


Figura 3. Apresentação esquemática da distribuição da leishmaniose entre a população canina de áreas endêmicas. Adaptado de Beneth e colaboradores (2008).

Em 2007, foram descritos os primeiros casos de leishmaniose canina causados pela espécie *Leishmania amazonensis*, e embora no homem essa espécie esteja correlacionada com a forma cutânea da doença, no cão a infecção por essa espécie causa um quadro visceral semelhante ao causado pela *L. chagasi* (TOLEZANO *et al.*, 2007).

A leishmaniose tegumentar canina, causada pela *Leishmania braziliensis*, embora menos frequente que a forma visceral, é uma doença comum no Brasil (CAVALCANTI, *et al.*, 2013; GONTIJO & CARVALHO, 2003) e aparentemente, o cão seria a interseção entre o ciclo de transmissão silvestre e o doméstico da leishmaniose cutânea (CASTRO *et al.*, 2006). No entanto como a maioria dos estudos são relacionados à leishmaniose visceral canina, não há relatos sólidos sobre a infecção e a imunologia da doença cutânea no cão.

Medidas públicas de controle da leishmaniose visceral canina no Brasil

Apesar da eutanásia de animais com leishmaniose não ser aceita por motivos éticos e sociais em diversos países, existem outros países como o Brasil, que adotam a eliminação de animais positivos como medida de controle e tentativa de erradicação da leishmaniose humana (MORENO & ALVAR, 2000).

A portaria interministerial dos ministérios da Saúde (MS) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), portaria nº 1.426/2008, proíbe o tratamento da leishmaniose visceral em cães e determina a eutanásia de todo animal infectado com *L. chagasi* ou doente (teste sorológico reagente ou exame parasitológico positivo). De uma forma geral, a estratégia de eutanásia dos animais positivos é controversa, mesmo no meio científico, que apresenta resultados contraditórios com relação à eficácia do programa (PALATNIK-de-SOUSA *et al.*, 2001; MORENO & ALVAR, 2000). O método diagnóstico recomendado foi revisado em 2011, e o teste cromatográfico rápido “Dual-Path Plataform” (DPP; Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil) passou a ser indicado como método de triagem, devendo ser seguido da realização do ELISA dos animais reagentes para que hajam diagnóstico da leishmaniose visceral canina (Ministerio da Saude, 2011).

Em Outubro de 2012, um grupo de estudos formado por médicos veterinários, pesquisadores e membros do grupo de estudos sobre leishmaniose animal se reuniram para discutir a eficácia das medidas de controle da leishmaniose visceral canina adotadas pelo governo brasileiro. O grupo amparado por diferentes achados científicos, nacionais e internacionais, propõe a revisão das normas de controle da leishmaniose visceral canina no Brasil. Dentre as principais mudanças sugeridas pelo grupo estão: (1) mudanças na política de educação e conscientização da população em áreas endêmicas; (2) controle da população canina domiciliada e semi-domiciliada e implementação de campanhas públicas de vacinação contra a raiva, leptospirose e também contra a leishmaniose canina; (3) combate do flebotômico vetor; (4) padronização e alteração dos padrões de positividade dos testes sorológicos [o título considerado positivo passaria a ser o de 1/160, em vez do título 1/40], além da confirmação da espécie por testes moleculares em áreas endêmicas para *L. braziliensis* ou outra espécie; (5) o direito do proprietário de cães positivos escolherem entre o tratamento consciente desses animais ou a eutanásia (RIBEIRO *et al.*, 2013)

Macrófagos

Os macrófagos são considerados as principais células fagocíticas do organismo e interligam a resposta imune inata e a adaptativa através da internalização e processamento de antígenos, e a posterior apresentação desses aos linfócitos T (GUILLIAMS *et al.*, 2014).

Macrófagos são fagócitos mononucleares, derivados dos monócitos circulantes, que migram da circulação para diferentes tecidos do organismo. Os macrófagos teciduais apresentam características comuns a toda população, mas também apresentam novas funções e receptores quando se encontram em repouso nos diferentes tecidos (BUENO *et al.*, 2005; JANEWAY *et al.*, 2007). Os macrófagos apresentam 3 funções básicas no organismo: (1) remoção de patógenos, mas também de células mortas e *debris* celulares através da fagocitose; (2) modular a resposta inflamatória a partir da secreção de citocinas, enzimas ou ainda outros fatores; (3) apresentação de antígenos e ativação da resposta imune adaptativa (WEISSLEDER *et al.*, 2014).

Quando um patógeno invade um tecido no organismo, os macrófagos residentes são as primeiras células do sistema imune inato, que irão interagir com o agente invasor, no entanto,

como o número dessas células é limitado, neutrófilos, e posteriormente monócitos, são atraídos da circulação para o sítio de infecção (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

Monócitos reconhecem os patógenos através de diferentes receptores de superfície. A ligação do patógeno a alguns desses receptores, é capaz de desencadear o processo de fagocitose por parte dessas células (ADEREM & UNDERHILL, 1999). A fagocitose é um processo ativo, que leva ao englobamento e internalização do patógeno em uma vesícula denominada fagossoma. O fagossoma passa por um processo de acidificação, que por si só já é capaz de eliminar alguns patógenos, porém quando esse processo sozinho não é suficiente, ocorre à formação do fagolisossoma, a partir da fusão do fagossoma com lisossomas. Os lisossomas contêm enzimas, proteínas e peptídeos capazes de mediar à eliminação do patógeno fagocitado (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

Os macrófagos, quando ativados, produzem diversos produtos com ação microbicida complementar à ação do fagolisossoma, num processo denominado respiração oxidativa (“*burst oxidativo*”). A produção do óxido nítrico (NO) pela ação da enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), e de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido (O_2^-) produzido pela enzima NADPH oxidase, e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD), são os principais exemplos de produtos tóxicos produzidos pelas células fagocíticas durante esse processo (ADEREM & UNDERHILL, 1999; BOGDAN *et al.*, 2000, 2000). Outra característica dos macrófagos ativados é o aumento da expressão de moléculas do MHC, envolvidas na apresentação de antígenos aos linfócitos T e da expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86) envolvidas no segundo sinal de ativação, necessário para a completa ativação dos linfócitos T.

A ativação dos macrófagos é dividida em ativação clássica ou alternativa. A ativação clássica (inflamatória) é mediada por citocinas secretadas pelos linfócitos Th 1 como a IL-2, TNF- α , e INF- γ , mas principalmente o INF- γ , que ativa os macrófagos levando-os a produzirem óxido nítrico (NO). A ativação alternativa é mediada por citocinas produzidas por células Th 2, tais como IL-4 e IL-13, que induzem um perfil anti-inflamatório no macrófago (LIU & UZONNA, 2012).

Interação da *Leishmania* com macrófagos

A presença de formas promastigotas no tecido após a picada do flebotomíneo, atrai para o local neutrófilos e macrófagos (ANTOINE *et al.*, 1998). Em questão de minutos, as formas promastigotas são fagocitadas. Apesar do parasito conseguir infectar satisfatoriamente neutrófilos, o curto tempo de vida dessas células, tornam os macrófagos as células determinantes para a manutenção da infecção a longo prazo (ANTOINE *et al.*, 1998). O maior desafio do parasito após sua entrada no hospedeiro mamífero é estabelecer a infecção intracelular nos macrófagos sem ativar os mecanismos inflamatórios dessa célula (KAYE & SCOTT, 2011).

O desdobraimento da infecção é determinado tanto por fatores inerentes à resposta imune do hospedeiro, quanto pela capacidade do parasito de ativar/desativar os macrófagos durante o decorrer da infecção (LIU & UZONNA, 2012).

O processo de reconhecimento e englobamento das formas promastigotas envolve um processo de ligação e reconhecimento intermediado por receptores celulares do macrófago, como os receptores de fibronectina e de manose-fucose (MR) que reconhecem e se ligam diretamente a moléculas de superfície da *Leishmania* como a glicoproteína de 63 kDa (gp63) e/ou LPG, ou ainda de maneira indireta, através da opsonização por proteínas do sistema complemento ou por anticorpos específicos, onde o reconhecimento ocorre pelos receptores de complemento CR1 e

CR3, ou receptores da fração Fc do anticorpo (FC γ R) (MOSSER & ROSENTHAL, 1993; KANE & MOSSER, 2000).

Foi mostrado por Linehan e colaboradores (2000) que a ativação do receptor de manose-fucose induz uma resposta inflamatória por parte dos macrófagos, talvez por isso que formas metacíclicas infectantes de *L. chagasi* mostram-se capazes de entrar nos macrófagos sem ativar esse receptor, enquanto a forma procíclica não infectante ativa-o (UENO *et al.*, 2009). Outra forma da *Leishmania* garantir sua sobrevivência ao processo de fagocitose seria a sua capacidade de modular a produção de IL-10 e TGF- β pelos macrófagos, citocinas reconhecidas pelo seu papel na inibição das funções inflamatórias dos macrófagos (KANE & MOSSER, 2000, 2001).

Já foi demonstrado que a opsonização, por imunoglobulinas G (IgG), das formas amastigotas promove o seu reconhecimento através dos receptores Fc de macrófagos com a consequente liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, que irão modular a ativação dos macrófagos de maneira favorável a sobrevivência do parasito (KANE & MOSSER, 2001).

O metabolismo intracelular da arginina possui um papel crítico na sobrevivência ou morte do parasito. A L-arginina, nos macrófagos, pode tanto ser catabolizada pela enzima oxido nítrico sintetase induzida (iNOS) para a geração do óxido nítrico, molécula prejudicial à sobrevivência intracelular das amastigotas, quanto pela enzima arginase levando a posterior síntese de poliaminas, como a putresceína, a spermidina e a spermina, que são nutrientes essenciais para a *Leishmania* spp. (WANASEN & SOONG, 2008). O metabolismo intracelular da L-arginina é diretamente influenciado pelo estado metabólico do macrófago (inflamatório ou anti-inflamatório), e por isso a capacidade que a *Leishmania* tem de induzir um perfil anti-inflamatório nos macrófagos é importante não só para evitar sua exposição à uma molécula altamente tóxica, o óxido nítrico (NO), mas também essencial para garantir um microambiente rico em nutrientes essenciais para seu desenvolvimento e proliferação (NADERER & McCONVILLE, 2008; WANASEN & SOONG, 2008).

Outro mecanismo utilizado pelo parasito para sobreviver em macrófagos foi demonstrado por Leao e colaboradores (1995), onde formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, endocitavam moléculas de MHC II produzidas pelos macrófagos murinos diferenciados de medula óssea, e que essas moléculas eram degradadas no interior dos megassomas presentes em amastigotas, uma estrutura semelhante ao lisossoma. Carvalho e colaboradores (2008) encontraram resultados que corroboram com o conceito de que a *Leishmania* seja capaz de modular a expressão de moléculas de MHC II, quando detectaram que células dendríticas murinas, infectadas com *L. braziliensis in vitro*, expressavam menos MHC II do que o controle não infectado.

Interação de macrófagos caninos e *Leishmania*

A maioria dos dados sobre os mecanismos iniciais da interação de macrófagos com o parasito *Leishmania* e da imunomodulação dessas células durante a infecção tem sido obtidos com o uso de modelos experimentais murinos (HANDMAN & BULLEN 2002, NADERER & McCONVILLE, 2008). Esses estudos se baseiam na obtenção de macrófagos a partir de progenitores da medula óssea, ou de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos ou de linhagens transformadas de monócitos murinos. A maioria dos dados com cães são provenientes de estudos clínicos com cães experimentalmente ou naturalmente infectados. Alguns poucos trabalhos descrevem os mecanismos iniciais da interação da *Leishmania* com macrófagos caninos (PINELLI *et al.*, 1999, MADEIRA *et al.*, 1999; BUENO *et al.*, 2005; SAMPAIO *et al.*, 2007),

provavelmente pela dificuldade da obtenção de macrófagos desses animais, que são normalmente provenientes da diferenciação de monócitos isolados e purificados de sangue periférico.

A importância das espécies reativas de oxigênio (ROS) e do óxido nítrico (NO) dentre os mecanismos de morte do parasito por macrófagos murinos, são bastante difundidos pela literatura (RODRIGUES *et al.*, 2007). Quando falamos de macrófagos caninos encontramos poucos trabalhos que correlacionam a presença de óxido nítrico (NO) ou sua enzima precursora, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) com a ativação e a capacidade dos macrófagos caninos de controlarem a proliferação intracelular das amastigotas (ZAFRA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2007; PINELLI *et al.*, 2000).

Muitos avanços na elucidação de mecanismos patológicos em geral tem sido possíveis pela disponibilidade de linhagens celulares. No caso de estudo com células caninas, existem algumas linhagens de macrófagos disponíveis, como, K1, K6, 030D e DH82 (BARNES *et al.*, 2000; PINELLI *et al.*, 2000; MAIA *et al.* 2007).

A linhagem de macrófagos-monócitos caninos DH82, utilizada em nosso estudo, foi obtida a partir do cultivo de células da medula óssea de um cão de raça Golden retriever de 10 anos com histiocitoma maligno, essas células crescem aderidas e apresentam um tamanho médio de 25-35µm com citoplasma basofílico e núcleo de redondo à ovalado em posição excêntrica. (WELLMAN *et al.*, 1988).

As células dessa linhagem apresentam receptor Fc, moléculas do complexo de MHC II, MHC I, expressam marcadores de superfície de células mielóides como o CD11c, o CD11b e o CD80, apresentam receptores semelhantes ao Toll do tipo 4 (TLR4), produzem óxido nítrico e também produzem diversas citocinas como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (WASSERMAN *et al.*, 2012; FUJIMOTO *et al.*, 2011; HARRUS *et al.*, 2003; WELLMAN *et al.*, 1988)

Um único estudo com *Leishmania* utilizando a linhagem de macrófagos caninos DH82 mostrou que esta célula é capaz de se infectar com *L. chagasi* de forma semelhante aos macrófagos derivados de monócitos de sangue periférico de voluntários humanos saudáveis (MAIA *et al.* 2007).

JUSTIFICATIVA

A inibição do crescimento ou a destruição da *Leishmania* no interior de macrófagos é um mecanismo essencial para eliminar ou reduzir a infecção. A capacidade de resistir aos processos microbicidas da célula hospedeira é uma importante característica dos parasitos do gênero *Leishmania*, que pode determinar o curso da doença nos cães afetados. Portanto, o estudo da interação entre espécies do gênero *Leishmania*, como a *L. chagasi* e *L. amazonensis*; e sua célula hospedeira, faz-se necessário pela importância de contribuir para tentar esclarecer os diferentes mecanismos iniciais envolvidos neste processo. A grande variedade de espécies ou cepas de *Leishmania* no continente americano contribui para o agravamento da situação epidemiológica desta doença, ainda hoje sem a proteção efetiva de uma vacina e com a falta de um tratamento realmente eficaz e menos agressivo. Contudo, sendo o cão o principal reservatório do parasito e uma importante fonte de infecção, que parece contribuir para o aumento de casos da leishmaniose humana, o estabelecimento de um modelo de estudo da interação de *Leishmania* com macrófagos caninos, constitui uma importante ferramenta para o estudo desta doença e pode proporcionar um modelo experimental *in vitro* para outras áreas como terapia e a imunomodulação.

OBJETIVO GERAL

O objetivo primordial deste projeto foi caracterizar a infecção da linhagem de macrófago canino DH82 por duas espécies de *Leishmania* (*Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*), assim como, estabelecer um possível modelo experimental *in vitro* para futuros estudos.

Objetivos específicos

- a. Avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos caninos durante a infecção com parasitos *Leishmania* de duas diferentes espécies (*L. amazonensis*, *L. chagasi*)

- b. Verificar o papel da opsonização por anticorpos na interação de macrófagos caninos DH82 com *L. chagasi*

- c. Determinar a cinética de infecção dos macrófagos caninos DH82 com as diferentes espécies de *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. chagasi*) em 24 e 48 horas

- d. Comparar a o perfil de infecção da linhagem de macrófago canino DH82 com a linhagem de macrófago murino RAW 264.7.

- e. Verificar o papel da opsonização por anticorpos no índice de infecção de macrófagos DH82 por *L. chagasi*

- f. Avaliar a expressão de moléculas de MHC de classe II e da molécula co-estimulatória CD80 nos macrófagos caninos infectados ou não, na presença ou não de estímulo

- g. Determinar a produção de óxido nítrico por macrófagos caninos infectados ou não, na presença ou não de estímulo com LPS por citometria de fluxo

- h. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos caninos infectados ou não, na presença ou não de estímulo por citometria de fluxo

METODOLOGIA

Parasitas:

As culturas de *L. amazonensis* (MHOM /BR/75/Josefa), *L. chagasi* cepa C46 (LIMP/NUPEB/UFOP), isolada de um cão infectado, foram mantidas em *Schneider Insect Medium* (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cripion, SP, Brasil) a 26 °C. Após 5-6 dias de cultivo, os parasitos foram lavados em PBS (tampão fosfato salina) a 2700 x g por 10 minutos a 22°C. As células foram ressuspensas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

Titulação do soro imune:

Formas promastigotas de *L. chagasi* com 5-6 dias de cultivo foram lavadas e contadas, como descrito anteriormente. (10⁶) células foram ressuspensas em 50µL de PBS. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 50µL de PBS em 12 poços, em seguida, foi feita a diluição seriada do soro de cão, obtido de animal naturalmente infectado por *L. chagasi* (50µL), no último poço não foi adicionado soro e este foi usado como controle negativo. Posteriormente, foi adicionado 10⁶ promastigotas (50µL) em todos os poços. Após incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, a placa foi observada em microscópio invertido, e a diluição com características de aglutinação semelhante ao controle negativo (1:100) foi escolhida para uso.

Opsonização da *Leishmania chagasi* por soro imune:

Formas promastigotas de *L. chagasi* foram incubadas em PBS com o soro imune diluído 1:100 por 30 minutos em temperatura ambiente. Ao final da incubação, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer.

Macrófagos:

A linhagem de macrófagos murinos RAW264.7 foi mantida em meio RPMI 1640 (Sigma) acrescido de 10% de SFB (Cripion) a 37°C com 5% de CO₂. Os macrófagos caninos DH82, gentilmente cedidos pelo Prof. Marcelo Bahia Labruna, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, foram cultivados em meio DMEM (Sigma) suplementado com 5% de SFB (Cripion) em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Ensaio de fagocitose *Leishmania* x Macrófagos:

Macrófagos, foram plaqueados em lamínulas de vidro de 13mm em placas de 24 poços, e as células não aderentes foram lavadas após 2 horas de incubação a 37°C/5% CO₂. Após esse período as células foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* na proporção de 5 parasitos: 1 macrófago. Durante todo o tempo de incubação, as células infectadas com *L. amazonensis* foram mantidas em estufa a 34°C com 5% de CO₂, enquanto que as células infectadas com *L. chagasi* opsonizadas ou não ficaram em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 2 horas de interação, as lamínulas foram lavadas com PBS a 37°C e fixadas em metanol. A coloração das lamínulas foi feita pelo método de panótico rápido (Laborclin). A determinação do índice de associação (% de macrófagos infectados x número de parasitos /macrófago) foi feito após contagem de no mínimo 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000x).

Determinação do Índice de Infecção:

Macrófagos (10^5 /mL) foram plaqueados sobre lâminulas de vidro de 13mm em placas de 24 poços e infectados com *L. amazonensis*, *L. chagasi* ou *L. chagasi* opsonizada, conforme descrito acima por 16 horas. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS 37°C e fixadas em metanol após 24 e 48h de infecção. A coloração das lamínulas foi feita pelo método de panótico rápido (Laborclin). A determinação do índice de infecção (% de macrófagos infectados x número de parasitos /macrófago) foi feito após contagem de no mínimo 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000x).

Expressão das moléculas MHC II e CD80:

Macrófagos (10^6) foram plaqueados em placas de 6 poços, e infectados ou não com *L. amazonensis* ou *L. chagasi* na proporção de 5 parasitos : 1 macrófago e/ou estimulados ou não com LPS 2 µg. Após 16 horas, as culturas foram lavadas para a remoção dos parasitos livres e foi acrescido meio novo aos poços. As culturas foram mantidas por 24 horas de infecção, a 34°C ou a 37°C /5% CO₂ de acordo com a espécie. Ao final do experimento, as placas foram lavadas e as células foram soltas e fixadas em paraformoldeído 4%, e depois incubadas por 20 minutos com solução de bloqueio (PBS contendo 1% BSA (soro albumina bovino) e 2% de soro de cão). Posteriormente, as células foram incubadas com os anticorpos anti-MHCII canino conjugado com FITC (1/20) (AbD Serotec) ou com anticorpo anti-CD80 murino conjugado com FITC (1/100) (BD Pharmingen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Ao término da incubação as células foram lavadas e o “*pellet*” foi resuspenso em 400µL de PBS. O percentual de células positivas foi avaliado por citometria de fluxo (FACSCalibur), após a aquisição de 10.000 eventos. As análises foram feitas no programa CellQuest.

Deteção de NO e ROS:

Macrófagos (10^6) foram plaqueados em placas de 6 poços, e infectados ou não com *L. amazonensis* ou *L. chagasi* na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e/ou estimulados ou não com LPS 2 µg. Após 16 horas, as culturas foram lavadas para a remoção dos parasitos livres e foi acrescido meio novo aos poços. As culturas foram mantidas por 24 horas de infecção, a 34°C ou a 37°C /5% CO₂ de acordo com a espécie. Ao término da incubação, as placas foram lavadas e adicionou-se aos poços as sondas DAF-FM (1µM) (Molecular Probes), para a deteção do NO intracelular, ou DCFH-DA (0,5µM) (Invitrogen), que detecta ROS intracelular. A sonda foi deixada em contato com as células por 45 minutos, no escuro, a 37°C. Após esse período, os poços foram lavados e foi acrescentado 1000µL de BSS (solução salina balanceada). As placas foram incubadas por mais 15 minutos, no escuro, a 37°C. Ao final das incubações, as células foram soltas, por método mecânico (rodinho) e ressuspensas em 400µL de PBS. O percentual de células DAF ou DCF positivas, e a intensidade média de fluorescência foram avaliadas por citometria de fluxo (FACSCalibur), após a aquisição de 10.000 eventos. As análises foram feitas no programa CellQuest.

Análise estatística

Os dados serão analisados pelo teste *t* de *Student* para comparação de dois grupos. As análises serão realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O valor de *p* será considerado significativo quando menor ou igual a 0,05.

RESULTADOS

A linhagem DH82 interage com ambas as espécies: *L. amazonensis* e *L. chagasi* e a opsonização facilita a interação de *L. chagasi* em macrófagos caninos DH82.

A fim de avaliarmos a capacidade de interação da linhagem de macrófagos caninos DH82 com duas espécies distintas de *Leishmania*, macrófagos caninos DH82 foram incubados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, e *L. chagasi* por 2 horas e o índice de associação determinado.

Nossos resultados mostraram que ambas as espécies de *Leishmania* foram capazes de interagir com a linhagem de macrófagos caninos, entretanto a espécie *L. amazonensis* interagiu 2,4 vezes mais comparado a *L. chagasi* em 2 horas (**Fig. 4**).

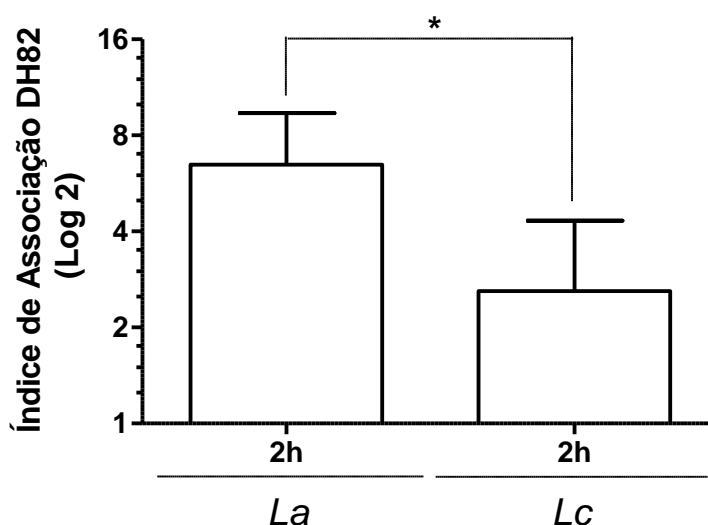


Fig.4. Índice de Associação da linhagem DH82 com *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e incubados com *L. amazonensis* (La) e *L. chagasi* (Lc) na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 34 °C ou a 37°C/5% CO₂. Após 2 horas, as lamínulas foram fixadas e coradas com Panotico Rápido. A determinação do índice de associação foi feito após contagem de ≥ 200 células em microscópio óptico. *p<0,05.

Com o intuito de verificar se a opsonização aumentaria a interação de *L. chagasi* com os macrófagos caninos, nós incubamos macrófagos DH82 com promastigotas de *L. chagasi* opsonizadas com soro imune de cães positivos para a leishmaniose visceral. Os resultados mostraram que a opsonização por anticorpos aumentou a entrada [2 horas] do parasito em 13 vezes comparado com a *L. chagasi* não-opsonizada (**Fig. 5**) indicando que, a opsonização tem um papel importante na interação de promastigotas de *L. chagasi* com as células DH82.

Esta diferença na interação com os macrófagos caninos entre as espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi*, assim como, o papel da opsonização na interação de *L. chagasi* com os macrófagos caninos, pode ser evidenciada na imagem de microscopia óptica de campo claro, onde observamos claramente uma maior interação de *L. infatum chagasi* com DH82 após opsonização (**Fig. 6**)

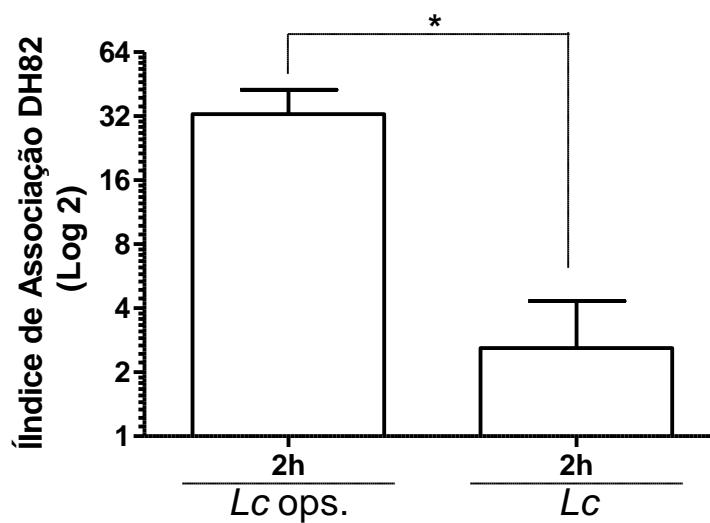


Fig. 5. Índice de Associação da linhagem DH82 com *L. chagasi* opsonizada (*Lc ops*) e não opsonizada (*Lc*) por anticorpos. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e infectados com *L. chagasi* na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 37°C/5% CO₂. Após 2 horas, as lamínulas foram fixadas e coradas com Panotico Rápido. A determinação do índice de associação foi feita após contagem de 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000x).*P<0,05.

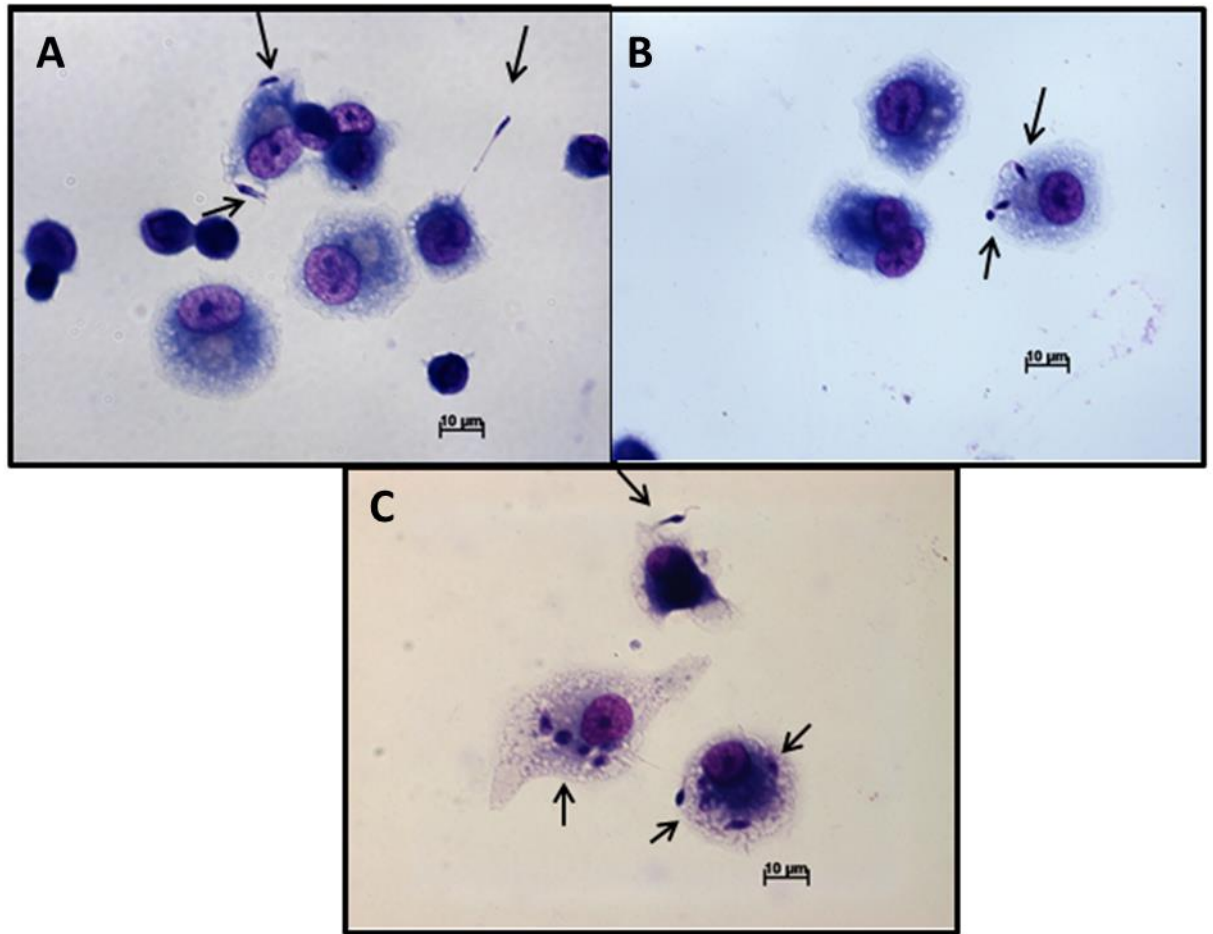


Fig. 6. Macrófagos caninos DH82 após 2 horas de interação com *L. amazonensis* (A), *L. chagasi*, (B) e *L. chagasi* opsonizada (C) por anticorpos. Seta indica os parasitos no interior da célula ou na superfície.

O aumento do índice de associação da *L. chagasi* opsonizada em relação à *L. chagasi* não-opsonizada, no tempo de 2 horas, foi reflexo tanto do aumento do percentual de macrófagos infectados quanto do número de parasitos por macrófagos (Fig. 7A e B).

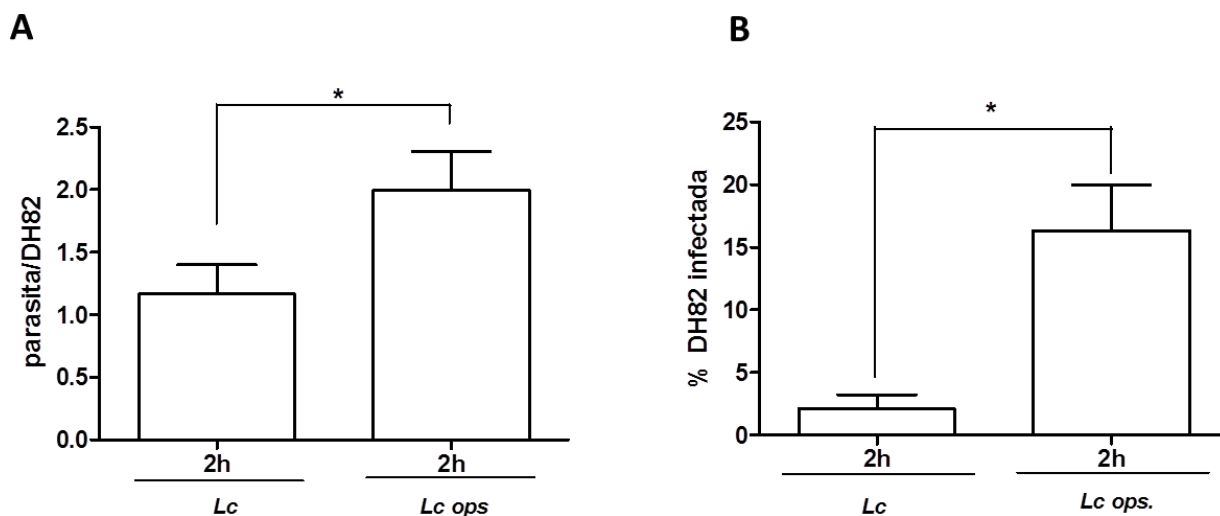


Fig. 7. Interação da linhagem DH82 infectada com *L. chagasi* opsonizada (*Lc ops*) e não opsonizada (*Lc*) por anticorpos. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e infectados com *Leishmania* na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 37°C/5% CO₂. Após 2 horas, as lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico Rápido. A determinação do índice de parasito por macrófago (A) e a % de células infectadas (B) foi feita após contagem de 200 células em microscópio óptico. *P<0,05.

A espécie *L. amazonensis* infecta mais a linhagem DH82 do que a espécie *L. chagasi*.

Visto que ambas as espécies conseguem interagir com a linhagem de macrófagos caninos DH82, nós avaliamos a infectividade de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em 24 e 48 horas pós infecção. Nossos resultados mostraram que ambas as espécies de *Leishmania* foram capazes de infectar a linhagem de macrófagos caninos DH82, entretanto a espécie *L. amazonensis* infectou 4 vezes mais comparado a *L. chagasi* em 24 horas e 9 vezes mais em 48 horas. (Fig. 8). Em 48 horas, foi observado uma redução na sobrevivência da *Leishmania* nos macrófagos DH82 comparada a 24 horas de 1.4 e 2.2 vezes em relação a *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente (Fig. 8).

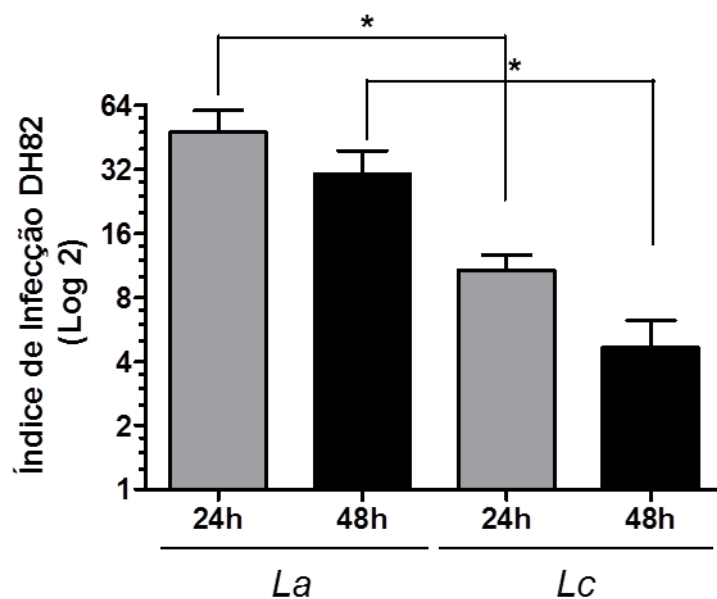


Fig. 8. Índice de infecção da linhagem DH82 (24 e 48h) com *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e infectados com *L. amazonensis* (La) e *L. chagasi* (Lc) na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 34 °C ou a 37°C/5% CO₂. Após 24 ou 48 horas de infecção, as lamínulas foram fixadas e coradas com Panotico Rápido. A determinação do índice de infecção foi feito após contagem de ≥ 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000x). * $p < 0,05$.

As linhagens de macrófago murina RAW264.7 e canina DH82 apresentam perfil semelhante de interação e infecção pelas espécies de *L. amazonensis* e *L. chagasi* in vitro.

A maioria dos trabalhos mostra a interação do parasito *Leishmania* com macrófagos murinos, assim decidimos avaliar se a interação e a infectividade apresentada pelos parasitos para a linhagem canina era diferente daquela observada para a linhagem murina. Esse ensaio revelou que de forma semelhante ao que foi observado com a linhagem de macrófagos caninos, em 2 horas as células murinas interagiram 2,55 vezes mais com a espécie *L. amazonensis* comparado a espécie *L. chagasi* (Fig. 9A e C). Além disso, observamos que as formas promastigotas de *L. amazonensis* interagiram 2,66 vezes mais com a linhagem RAW264.7 do que com a linhagem DH82 (Fig. 9A e C).

Quando analisamos a infecção da *L. amazonensis* observamos que semelhante ao que acontece com a linhagem canina DH82, a *L. amazonensis* apresenta uma infectividade 3,8 e 4,6 vezes maior para a linhagem murina RAW 264.7 do que a *L. chagasi* em 24 e 48 horas, respectivamente (Fig. 9B e D). Na comparação entre as linhagens, observamos que em 48 horas de infecção, houve uma redução de 1,4 e 2,5 na sobrevivência de *L. amazonensis* em relação a 24 horas nas linhagens DH82 e RAW264.7, respectivamente (Fig. 9B).

Em relação a *L. chagasi*, foi observado que em 2 horas a espécie *L. chagasi* interagiu aproximadamente 3 vezes mais com as células murinas do que com os macrófagos caninos de forma semelhante ao observado para a espécie *L. amazonensis*. No entanto, o perfil de infectividade com *L. chagasi* não apresentou diferença significativa nos tempos de 24 e 48 horas entre as duas linhagens de macrófagos testadas. (Fig. 9C e D).

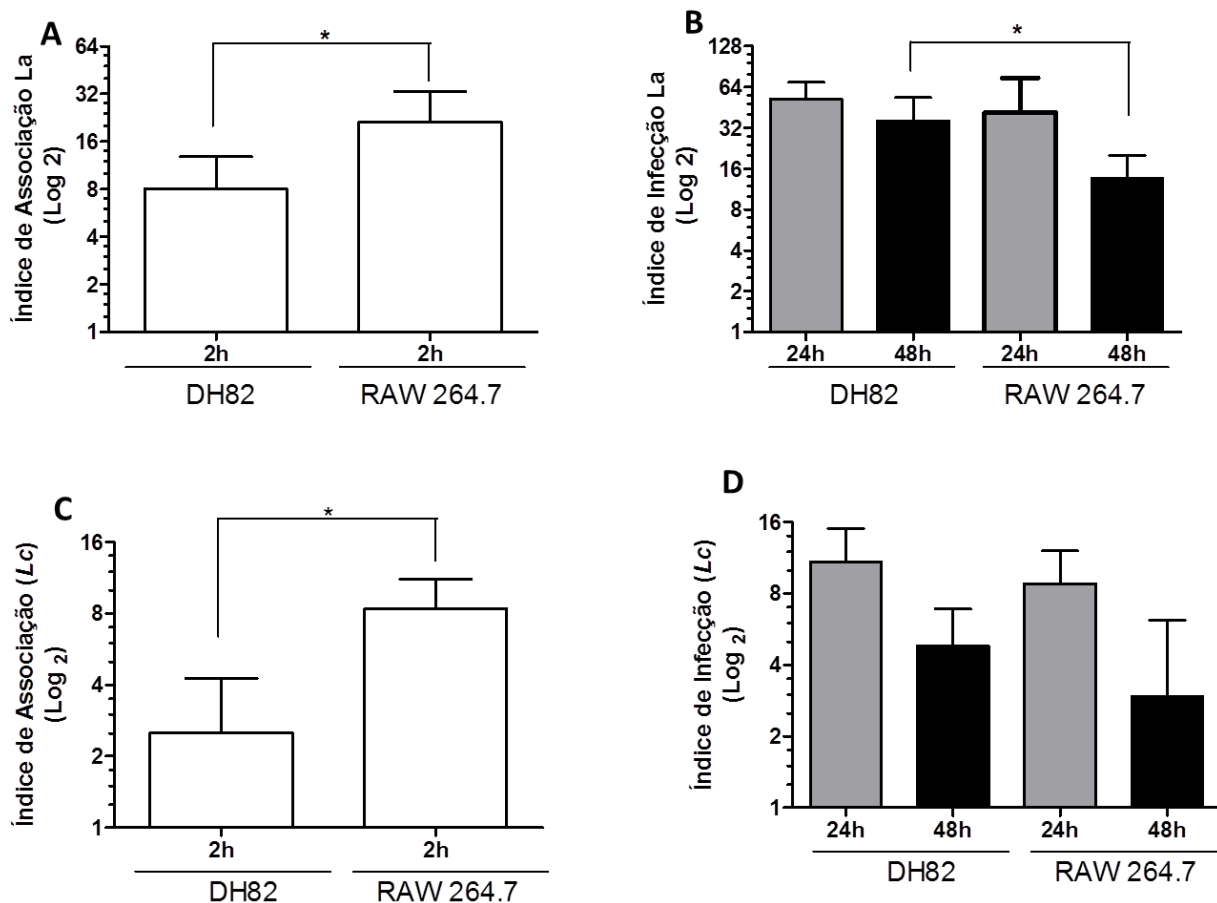


Fig. 9. Índice de infecção das linhagens DH82 e RAW264.7. Macrófagos caninos (DH82) e murinos (RAW 264.7) foram plaqueados e infectados com *L. amazonensis* (A, B) e *L. chagasi* (C, D) na proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 34 ou 37°C /5% CO₂. Após 2 horas (A, C), 24 e 48 horas de infecção (B, D), as lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico Rápido. A determinação do índice de infecção foi feito após contagem de 200 células em microscópio óptico $p < 0,05$.

A opsonização por anticorpos aumenta a infectividade de *L. chagasi* em macrófagos caninos DH82.

Uma vez que a opsonização de *L. chagasi* aumentou sua interação com a linhagem de macrófagos caninos DH82, nós verificamos se a opsonização aumentaria a sobrevivência da *L. chagasi* quando comparado a *L. chagasi* não-opsonizada nos macrófagos caninos DH82 em 24 e 48 horas.

Os resultados mostraram que houve um aumento significativo na sobrevivência de *L. chagasi* opsonizada em relação a não-opsonizada. Foi observado um aumento de 4,5 vezes e 2,4 vezes em 24 e 48 horas, respectivamente (Fig. 10 A).

Quando avaliamos o número de parasitos por macrófagos e percentual de macrófagos infectados em 48 horas, nós observamos que apesar do número de parasitos por DH82 não ter diferença significativa na infecção com *L. chagasi* ou *L. chagasi* opsonizada por anticorpos (Fig. 10B), o percentual de DH82 infectada pela *L. chagasi* opsonizada foi 2,33 vezes maior que dos macrófagos infectados por *L. chagasi* não opsonizada (Fig. 10C). O maior percentual de

macrófagos caninos DH82 infectados pela forma *L. chagasi* opsonizada se refletiu no índice de infecção de 48 horas, que foi 2,4 vezes maior do que o índice de infecção com a *L. chagasi* não opsonizada (**Fig. 10D**).

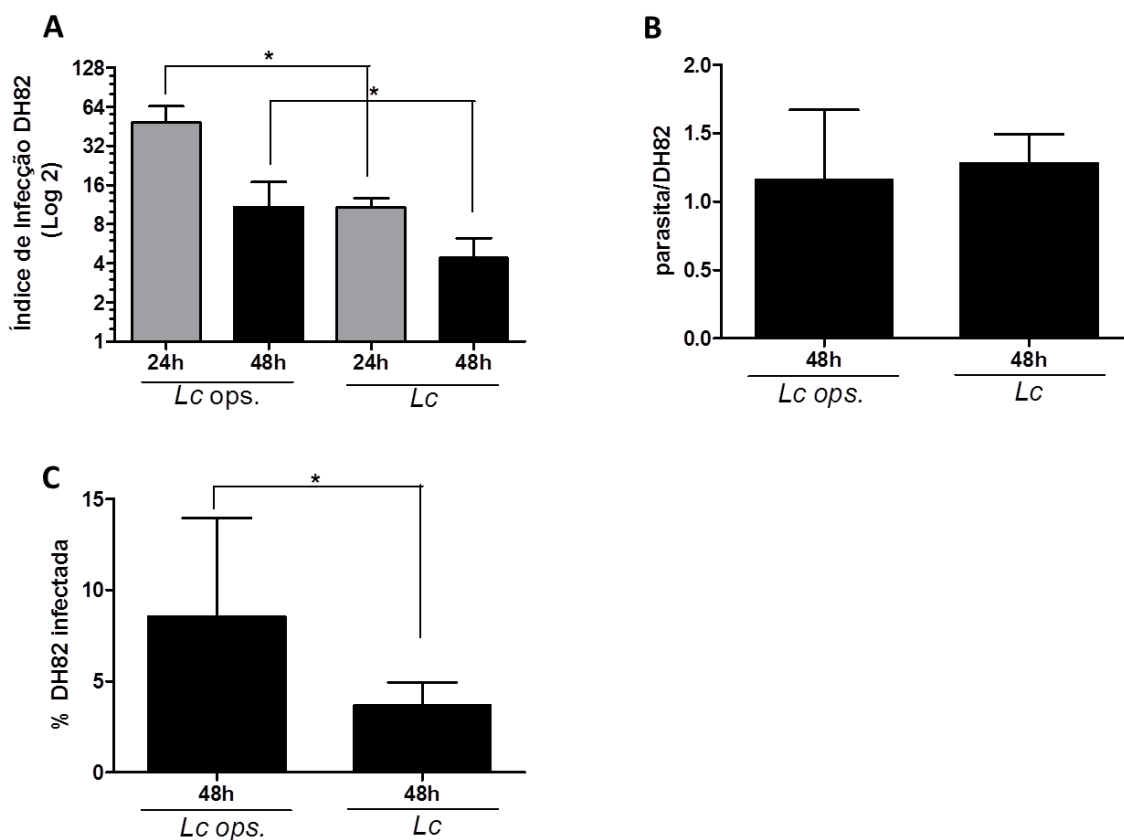


Fig. 10. Índice de infecção da linhagem DH82 (24 e 48 h) com *L. chagasi* opsonizada (*Lc ops*) e não opsonizada (*Lc*) por anticorpos. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e infectados com *Leishmania* proporção 5 parasitos: 1 macrófago e mantidos a 37°C/5% CO₂. Após 24 ou 48 horas, as lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico Rápido. A determinação do índice de infecção (**A**), do número de parasitos por macrófago (**B**) e a % de células infectadas (**C**) foi feito após contagem de 200 células em microscópio óptico. *P<0,05.

A análise da imagem de microscopia óptica de 48 horas de infecção dos macrófagos caninos com *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. chagasi* opsonizada reflete o que analisamos no índice de infecção, os macrófagos estão mais infectados pela *L. amazonensis* do que pela *L. chagasi*, ainda que a opsonização aumente a sobrevivência de *L. chagasi* comparada a não-opsonizada (**Fig. 11**)

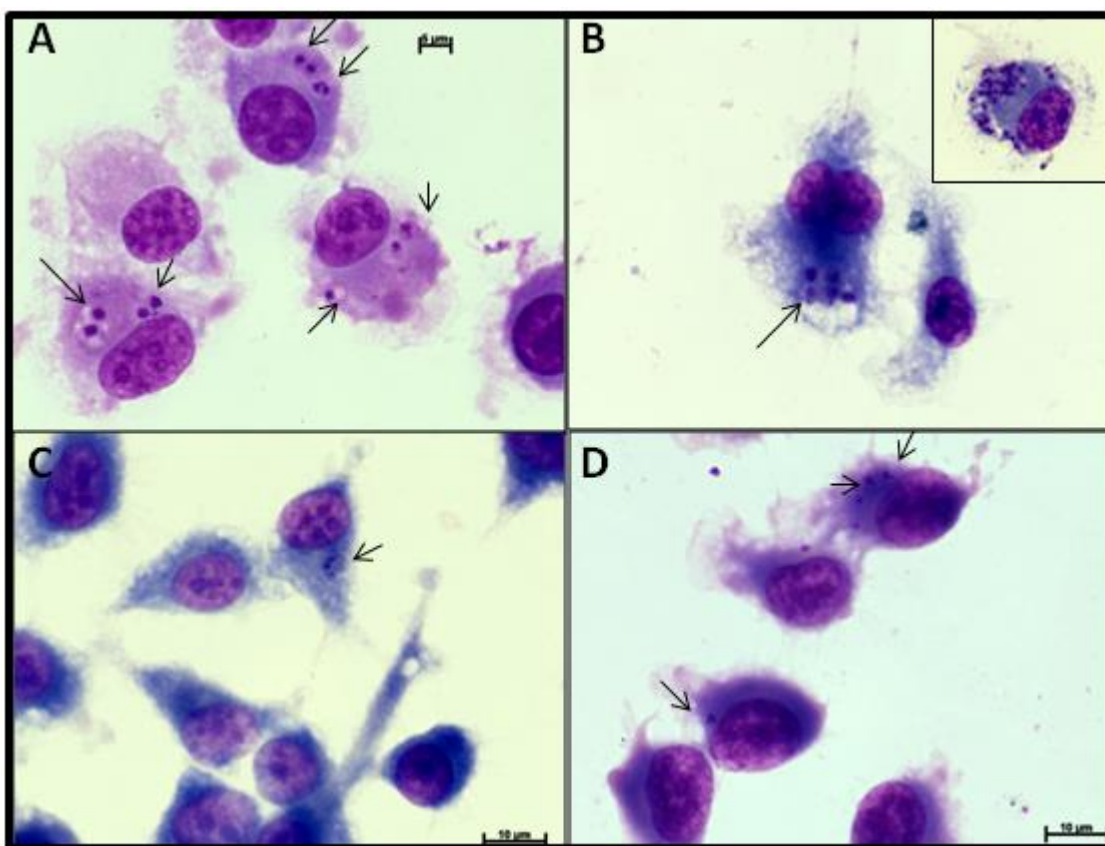


Fig. 11. Macrófagos caninos DH82 após 48 horas de infecção com *L. amazonensis* (A, B), *L. chagasi*, (C) e *L. chagasi* opsonizada (D) por anticorpos. Seta indica os parasitos no interior de vacúolos. **Fig. B** inserto indica macrófagos caninos muito infectados e amastigotas de *L. amazonensis* sendo liberados.

***L. amazonensis* e *L. chagasi* não modulam a expressão de MHC II e CD80 em macrófagos caninos DH82.**

Uma vez que os macrófagos são células apresentadoras de antígenos, nós avaliamos a expressão da molécula MHC II e da molécula co-estimulatória CD80 em macrófagos DH82 e se a infecção por *Leishmania* poderia modular essa expressão.

Nossos resultados mostraram que as células DH82 expressam de forma constitutiva a molécula MHCII (33,73% \pm 8,786 das células) e quando estimuladas com LPS, observa-se um aumento do número de células MHC⁺ (75,11 % \pm 12,16). Não foi observado diferença significativa no percentual de células MHC⁺ na presença das espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi*, nas células em repouso (não estimuladas) e nem nas células estimuladas por LPS (**Fig. 12A**)

Em relação à molécula CD80, nossos resultados mostraram que os macrófagos DH82 expressam à molécula CD80 de forma constitutiva em 28,32% das células e, quando estimuladas com LPS, foi observado um aumento de 1,8 vezes, onde detectamos 51,27% de células CD80⁺ (**Fig. 12B**).

Além disso, nossos resultados sugerem que a *L. chagasi* não é capaz de modular a expressão basal da molécula de CD80 na superfície das células DH82 em repouso, no entanto, quando incubamos com *L. amazonensis*, observamos um aumento de 1,45 vezes da expressão de

CD80 em relação à expressão basal, sugerindo que a *L. amazonensis* poderia induzir um aumento na expressão de CD80 nestes macrófagos. Já nas células estimuladas com LPS, a presença dos parasitos *L. chagasi* e *L. amazonensis* aumentou 1,12 e 1,34 vezes, respectivamente, o percentual de células CD80⁺ em relação as células estimuladas com LPS (**Fig. 12B**),

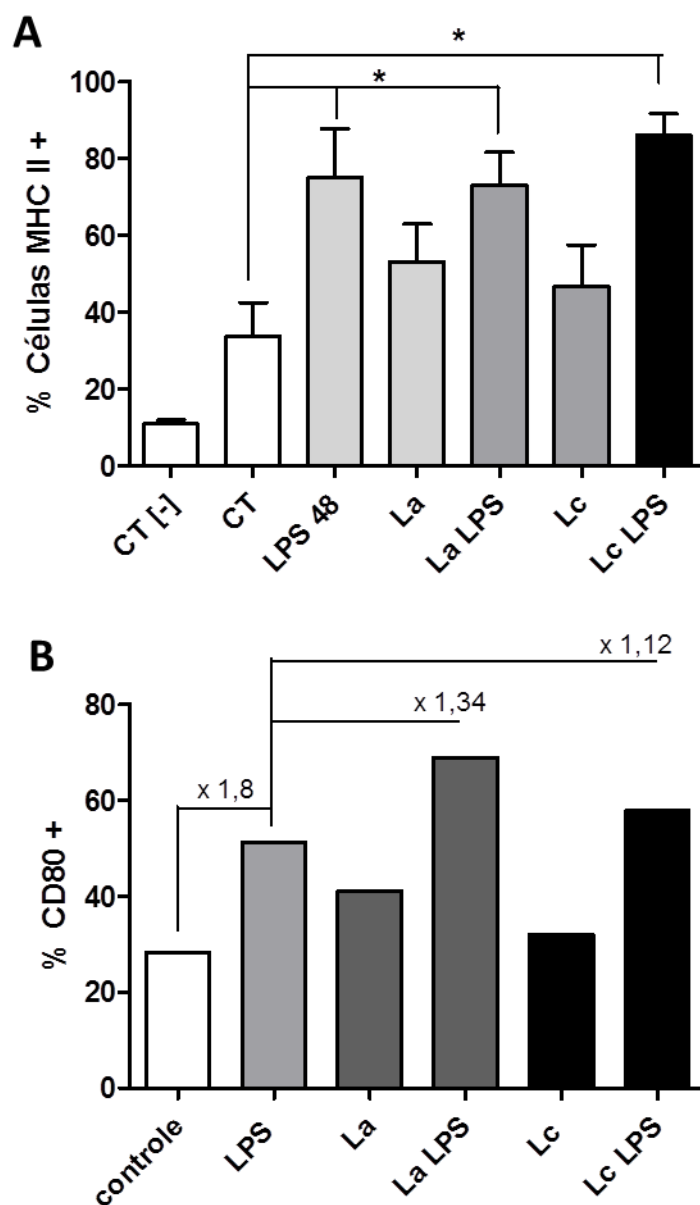


Fig. 12. Expressão da molécula MHCII (A) e da molécula co-estimulatória CD80 (B) em macrófagos DH82. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados, infectados com *L. amazonensis* (*La*) e/ou *L. chagasi* (*Lc*) e/ou estimulados com 2 μ g de LPS (*La* LPS ou *Lc* LPS), ou não e mantidos a 34 ou 37 °C / 5% CO₂. Ao final do período de 24 h de infecção, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD80 murino conjugado a FITC (1/20) (BD Pharmingen) ou com o anticorpo anti-MHCII canino conjugado com FITC (1/20) (AbD Serotec). Macrófagos DH82 sem marcação foram usados como controle. O percentual de células CD80+ positivas [dado representativo de 2 experimentos independentes] e de MHC II [média de 4 exp. independentes] foi avaliado por citometria de fluxo (FACSCalibur).

Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos caninos DH82 em repouso e estimulados com LPS na presença ou não de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

A produção de NO e ROS por macrófagos é um eficiente mecanismo microbicida dessas células e altamente tóxicos para *Leishmania*, assim decidimos avaliar a produção desses radicais de nitrogênio e oxigênio em macrófagos caninos DH82. Em nossos experimentos, incubamos macrófagos caninos estimulados ou não com LPS e/ou infectados ou não com *L. amazonensis* e *L. chagasi* e observamos que a célula sem estímulo já apresentava uma intensidade média de fluorescência quando incubada com a sonda fluorescente intracelular DAF-FM, usada para a detecção de NO. Observamos que os macrófagos caninos não foram capazes de aumentar a intensidade de fluorescência de forma significativa frente ao estímulo com LPS e que a presença dos parasitos também não modulou a produção de NO (Fig. **13A**). Entretanto, quando analisamos o percentual de células DAF positivas após o estímulo com LPS, nós percebemos um aumento significativo da porcentagem de células DAF+, e que a presença das espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi*, não modulou a produção de NO nos macrófagos em repouso, e nem, nos macrófagos caninos estimulados pelo LPS (Fig. **13B**).

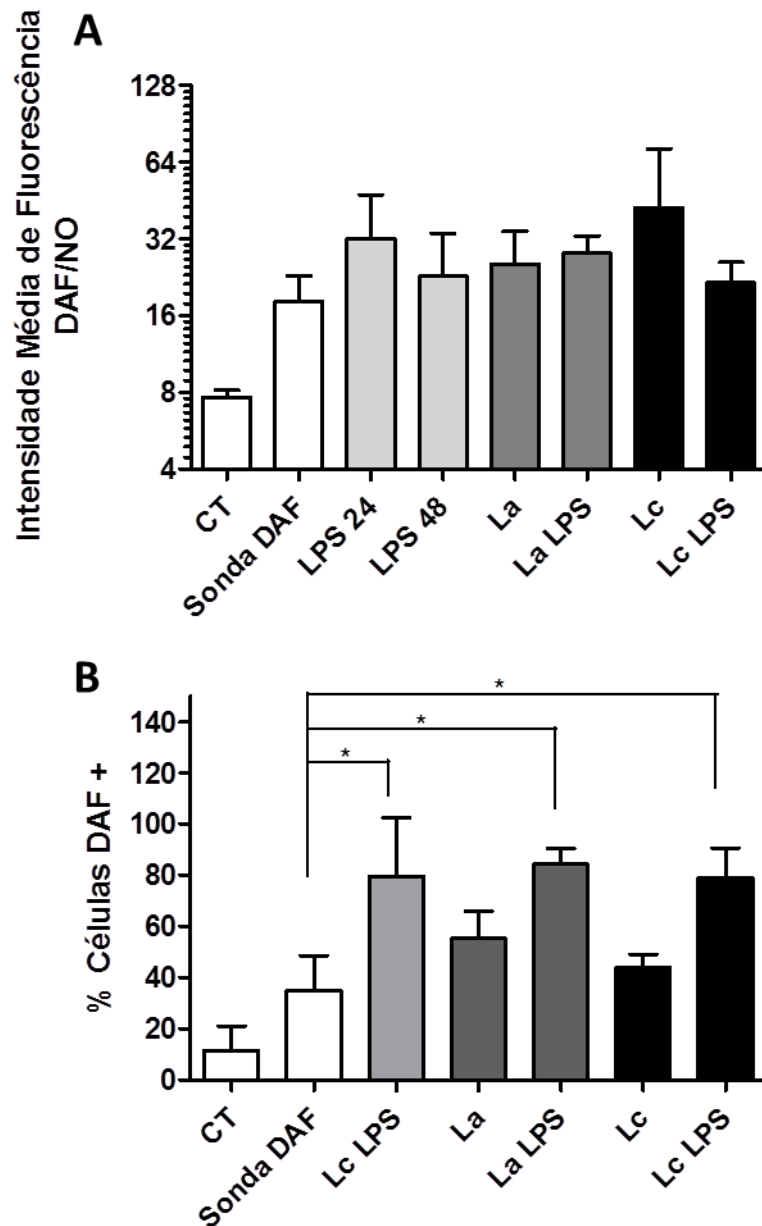


Fig. 13. Detecção de NO em macrófagos caninos DH82 por citometria de fluxo. Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados e infectados ou não com *L. amazonensis* (La) ou *L. chagasi* (Lc) e/ou estimulados ou não com 2µg de LPS (La LPS ou Lc LPS). Macrófagos DH82 sem nenhuma marcação, foram utilizados como controle (CT). Ao final do período de 24 h de infecção, as células foram incubadas com a sonda DAF-FM (1µM). A intensidade média de fluorescência (A) e a porcentagem de células DH82 DAF+ (B) foram avaliadas por citometria de fluxo (FACSCalibur).

A detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células DH82 foi realizada através da técnica de citometria de fluxo com a marcação pela sonda intracelular DCFH-DA. Os dados obtidos, no entanto, foram contrários aos observados para NO. Em nosso modelo, não foi observado um aumento significativo da porcentagem de células DH82 DCF+

(dado não mostrado), entretanto, observamos um aumento da intensidade média de fluorescência de 1,46 vezes nos macrófagos caninos quando estimulados com LPS. De forma semelhante ao observado na detecção de NO, macrófagos caninos sem estímulo apresentavam níveis basais de ROS e a presença do parasito não modulou a produção ou indução de ROS em células em repouso ou estimuladas pelo LPS (**Fig. 14**).

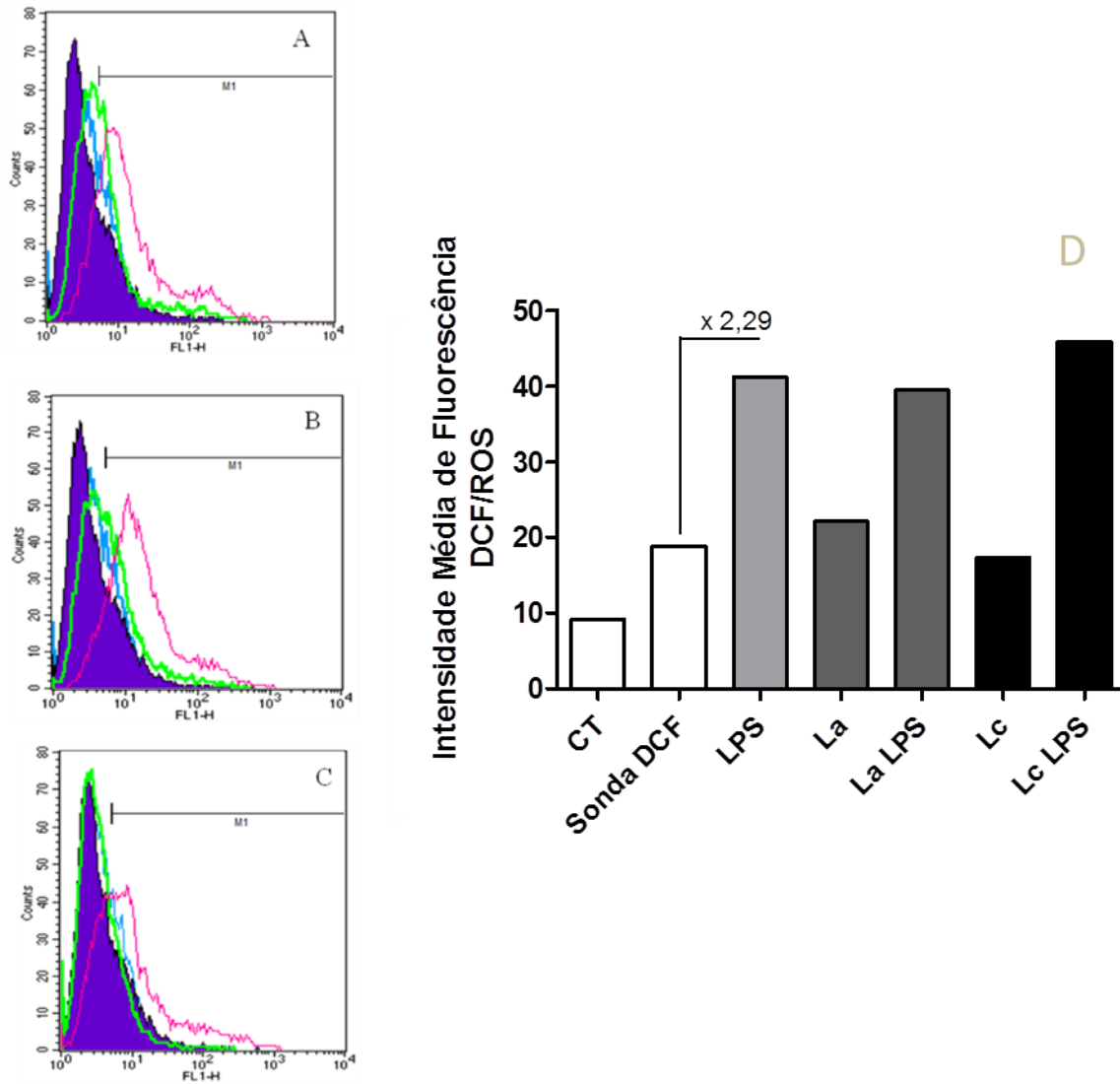


Fig. 14 Detecção de ROS em macrófagos caninos DH82 . Macrófagos caninos (DH82) foram plaqueados, e infectados ou não com *L. amazonensis* (*La*) ou *L. chagasi* (*Lc*) e/ou estimuladas ou não com 2µg de LPS. Ao final do período de 24 h de infecção, as células foram incubadas com a sonda DCFH-DA (0,5µM) (Invitrogen). As células foram adquiridas e a intensidade média de fluorescência analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur). **A-** histograma DH + LPS. **B** histograma DH + *La* e/ou LPS, **C-** histograma DH + *Lc* e/ou LPS. **D-** gráfico representativo do histograma.

DISCUSSÃO

O estudo da leishmaniose canina se faz importante, uma vez que o cão é um paciente, um alvo das estratégias de controle da doença e também um excelente modelo para estudo da leishmaniose humana, já que apresentam sintomatologias similares (MORENO & ALVAR, 2002). Infecções experimentais de cães para estudos científicos são realizadas desde o início do século XX, quando o papel do cão na epidemiologia da doença foi comprovado (MORENO & ALVAR, 2002). Contudo, devido aos altos custos na manutenção desses animais em canis apropriados e das questões éticas envolvendo o uso de animais em experimentação, o uso de linhagens celulares se torna fundamental para elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na interação do parasito com sua célula hospedeira.

A interação de macrófagos com o parasito *Leishmania* é um fator importante na progressão da infecção no hospedeiro vertebrado, e apesar do cão ser um hospedeiro natural do parasito, além de ser considerado um reservatório para a infecção humana, ainda pouco se sabe sobre a interação dos macrófagos caninos com parasitos desse gênero (RODRIGUES *et al.*, 2007). Devido à importância dos macrófagos no desenvolvimento da doença e a relevância no estabelecimento de um modelo canino para estudos na área, nós nos propusemos a caracterizar a infecção dos macrófagos caninos da linhagem DH82 com as espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

Ao analisarmos como os macrófagos caninos DH82 se comportam na presença da *Leishmania* sp., observamos que eles são capazes de interagir com promastigotas de *L. amazonensis* e de *L. chagasi* (**Fig. 4**). Nossos resultados mostram que ambas as espécies se ligam aos macrófagos caninos DH82, no entanto houve uma maior interação (entrada) de *L. amazonensis* do que de *L. chagasi* (**Fig. 4**). A diferença na capacidade de interação encontrada entre a *L. amazonensis* e *L. chagasi* com a linhagem de macrófagos canina, provavelmente está relacionada com características intrínsecas da espécie de *Leishmania*, e poderia ser atribuída a possíveis diferenças na constituição de moléculas de superfície da *Leishmania* como, por exemplo, o LPG que é reconhecidamente uma molécula envolvida na interação *Leishmania*/macrófago e apresenta diferenças intra e inter espécies (McCONVILLE *et al.*, 1995; SCHNEIDER *et al.*, 1994; CHANG *et al.*, 1990; MOSSER & ROSENTHAL, 1993; KANE & MOSSER, 2000; SPÄTH *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2012).

Já foi descrito por alguns grupos que formas amastigotas de *Leishmania* presente em lesões estão cobertas por IgG, o que leva ao aumento da interação entre a *Leishmania* e o macrófago (GUY & BELOSEVIC, 1993; PETERS *et al.*, 1995). Uma vez que cães infectados sintomáticos apresentam altos níveis de anticorpos não imunizantes (PINELLI *et al.*, 1994; BARBIERI, 2006), e que em áreas endêmicas, estariam sujeitos à reinfecção, resolvemos estudar o papel da opsonização por anticorpos das formas promastigotas com os macrófagos caninos DH82, que apresentam receptores para a fração Fc do anticorpo (WELIMAN *et al.*, 1985; BARNES *et al.*, 2000). Nós verificamos que a opsonização por anticorpos aumentou a interação da linhagem DH82 com promastigotas de *L. chagasi* (**Fig. 5**) e esse aumento era refletido tanto na carga parasitária dos macrófagos quanto no percentual de células infectadas (**Fig. 7 A e B**). Esses resultados são condizentes com os descritos por outros autores, onde após a opsonização de formas promastigotas por anticorpos, foi observado aumento na capacidade de adesão das formas promastigotas aos macrófagos (MOSSER & ROSENTHAL, 1993).

Outro aspecto observado nos nossos resultados é que a interação dos macrófagos murinos RAW264.7 com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi maior que a interação com macrófagos DH82 (**Fig. 9A e C**). Maia colaboradores (2007) compararam a infectividade de

promastigotas de duas cepas de *L. infantum* usando diferentes macrófagos e observaram que macrófagos peritoneais de camundongo interagem mais com os parasitos do que com a linhagem canina DH82, que se comportou de forma semelhante aos macrófagos derivados de monócitos humanos. Essa diferença entre as linhagens de macrófagos caninos e murinos observada em nossos dados, provavelmente se deve a diferenças entre possíveis receptores envolvidos no reconhecimento do parasito. Para macrófagos murinos está bem estabelecido o papel de receptores Fc, de complemento, de manose-fucose, assim como de fibronectina no reconhecimento de *Leishmania* (MOSSER & ROSENTHAL, 1993; KANE & MOSSER, 2000). Já no modelo canino, encontramos apenas um trabalho que mostra que proteínas do sistema complemento aumenta a ligação de *L. chagasi* em monócitos obtidos de cães experimentalmente e naturalmente infectados (SAMPAIO et al., 2007), sugerindo assim a participação de receptores do complemento no reconhecimento do parasito.

Ao analisarmos a capacidade de infecção das espécies de *Leishmania* nos macrófagos caninos em 24 e 48 horas, observamos que a espécie *L. amazonensis* é mais infectiva que a *L. chagasi*, mesmo quando opsonizada (**Fig. 8 e 10 C**). Em contraste aos nossos resultados, Madeira e colaboradores (1999) realizaram um estudo, onde a capacidade de infecção da *L. amazonensis* e de *L. chagasi* em macrófagos peritoneais de cães era comparada após 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Em 24 horas pós infecção foi observado uma maior porcentagem de células infectadas por *L. chagasi* do que por *L. amazonensis*, entretanto nos outros tempos não havia diferença significativa entre as duas espécies. Essa diferença observada em relação aos nossos resultados pode ser devido ao modelo utilizado, visto que Madeira e colaboradores (1999) usaram formas amastigotas das duas espécies de *Leishmania* para estabelecer a infecção nos macrófagos caninos, enquanto nós usamos formas promastigotas do parasitos.

A avaliação da capacidade de infecção de *L. amazonensis* e *L. chagasi* na linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7 foi semelhante à observada nos macrófagos caninos DH82, a *L. amazonensis* foi mais infectiva que a *L. chagasi* (**Fig. 9. B,D**). Observamos que os macrófagos caninos DH82 são mais permissivos a infecção pela *L. amazonensis* do que os macrófagos murinos, uma vez que o índice de infecção dos macrófagos DH82 em 48 horas é 2,71 vezes maior que o dos macrófagos RAW264.7 (**Fig. 9B**), já a comparação da infecção da *L. chagasi* não revelou diferença significativa entre o índice de infecção dos macrófagos murinos e caninos em 48 horas de infecção (**Fig. 9D**). Esse resultado nos surpreendeu já que esperávamos encontrar uma maior susceptibilidade no modelo de linhagem canina à *L. chagasi*, espécie de importância reconhecida na infecção de cães (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012). Este dado nos leva a pensar sobre a possibilidade de que os cães possam ser ainda mais susceptíveis à infecção pela *L. amazonensis*, ressaltando a importância da realização de testes moleculares para a determinação da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção de cães positivos; e a outra possibilidade é que existam diferenças entre essas duas linhagens que as tornam mais permissivas ou não a infecção pela *L. amazonensis*, já que ambas são linhagens transformadas de macrófagos.

No caso da opsonização aumentar a infecção de *L. chagasi* nos macrófagos caninos DH82, demonstra que esses macrófagos se comportam de forma semelhante aos macrófagos murinos. Kane e Mosser (2001) demonstraram que a opsonização por anticorpos (IgG) de amastigotas favorece a sobrevivência intracelular de *L. amazonensis* e *L. major* em macrófagos murinos de medula óssea e isto ocorre devido ao aumento da produção de IL-10 e da diminuição da produção de IL-12 e TNF- α , produzindo um efeito anti-inflamatório nos macrófagos.

Macrófagos estão envolvidos com a apresentação de antígenos às células T CD4, e por isso são capazes de interligar a resposta imune celular e humoral, e a principal molécula

envolvida nesse processo é o MHCII. O reconhecimento por parte dos linfócitos T CD4 dos peptídeos expostos no MHCII é capaz ativar os macrófagos (RAMACHANDRA *et al.*, 2009) e por tanto a regulação da expressão do MHCII é considerado um mecanismo de evasão apresentado por alguns microrganismos (ASHIRU *et al.*, 2009; IBANA *et al.*, 2011; HARRUS *et al.*, 2003)

Com relação à expressão da molécula MHCII pelos macrófagos caninos DH82, observamos que nossos resultados estão de acordo com a literatura. Assim como visto por Wellman e colaboradores (1985) e Wasserman e colaboradores (2012), os macrófagos caninos da linhagem DH82 expressam de forma constitutiva a molécula de MHCII e os nossos índices de expressão basal dessa molécula estão em concordância com os dados encontrados por Harrus e colaboradores (2003) que acharam 46% dos macrófagos DH82 expressando MHCII de forma basal, sem estímulo, enquanto nós encontramos 33,73% \pm 8,786. Além disso, nós observamos que os macrófagos DH82 são capazes de responder ao estímulo com LPS aumentando sua expressão (**Fig. 12A**), de forma semelhante ao observado por Wasserman e colaboradores (2012) e também por Harrus e colaboradores (2003).

Quando observamos a expressão do MHCII em macrófagos DH82 após a infecção com *L. amazonensis* ou *L. chagasi*, observamos que nenhuma das duas espécies foi capaz de modular a expressão dessa molécula nos macrófagos caninos DH82 em repouso ou estimulados pelo LPS (**Fig. 12A**). De forma semelhante, Pinelli e colaboradores (1999) também observaram que *L. infantum* não era capaz de reduzir a expressão do MHCII em macrófagos caninos derivados de monócitos.

Nossos dados com relação a expressão de MHCII em macrófagos caninos infectados por *Leishmania* sp., juntamente com os achados prévios da literatura (PINELLI *et al.*, 1999), sugerem que a expressão do MHCII em macrófagos caninos infectados possui um mecanismo de regulação distinto dos macrófagos murinos infectados, uma vez que foi observado que a *L. amazonensis* em macrófagos murinos diferenciados de medula óssea (LEAO *et al.*, 1995) e que *L. braziliensis* em células dendríticas murinas (CARVALHO *et al.*, 2008) são capazes de reduzir a expressão do MHCII durante a infecção.

Apesar das espécies de *Leishmania*, aqui estudadas, não terem sido capazes de modular a expressão de MHCII nos macrófagos caninos DH82, Harrus e colaboradores (2003) mostram que essas células são susceptíveis à modulação da expressão do MHCII. O grupo de Harrus demonstrou que os macrófagos DH82, após infecção com *Ehrlichia canis* eram incapazes de expressar MHCII.

Tendo em vista o importante papel que moléculas co-estimulatórias, como o CD80, desempenham na ativação da célula T, nós avaliamos sua expressão nos macrófagos caninos DH82. Assim como foi visto para o MHCII, nós encontramos uma expressão basal constitutiva de CD80 nos macrófagos caninos DH82 de 28% e também observamos que os níveis de expressão do CD80 quase dobravam quando as células eram estimuladas com LPS (**Fig. 12B**), da mesma forma, foi observado por Wasserman e colaboradores (2012) um aumento na expressão dessa molécula após estímulo com LPS. Quando avaliamos a expressão de CD80 após a infecção com *L. amazonensis*, encontramos resultados que sugerem que essa espécie poderia ser capaz de induzir um aumento na expressão basal dessa molécula co-estimulatória nos macrófagos caninos DH82, no entanto esse aumento não foi observado na infecção pela *L. chagasi*, que não modulou a expressão do CD80 nem para mais, nem para menos durante a infecção (**Fig. 12 B**).

Dados na literatura mostram a capacidade da *Leishmania* sp. modular a expressão de CD80. Pinelli e colaboradores (1999) avaliaram a expressão de moléculas co-estimulatórias da

Família B7 (CD80 e CD86) em macrófagos diferenciados de monócitos caninos infectados por *L. infantum* e observaram que a infecção diminuía os níveis de expressão das moléculas dessa família, sem diferenciar a expressão de CD80 da expressão de CD86. Favali e colaboradores (2007) avaliaram a expressão das moléculas CD80 e CD86 em células dendríticas diferenciadas de monócitos humanos infectados por *L. amazonensis* e observaram que quando infectadas pela *L. amazonensis* as células dendríticas reduzem a expressão do CD80 e aumentam a expressão do CD86.

A óxido nítrico sintetase (NOS) é uma enzima que está amplamente distribuída pelos diferentes tecidos dos mamíferos em uma de suas isoformas (FERRARI *et al.*, 2011). A isoforma induzida da óxido nítrico sintetase (iNOS) está intimamente associada com a atividade microbicida desempenhada pelos macrófagos no processo de fagocitose de bactérias, fungos e protozoários uma vez que a produção de óxido nítrico (NO), pela NOS e de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o ânion superóxido (O_2^-) produzido pela enzima NADPH oxidase, e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD) são essenciais no processo de combate à esses microrganismos (FERRARI *et al.*, 2009; 2011; ADEREM & UNDERHILL, 1999; BOGDAN *et al.*, 2000, 2000).

A fim de verificarmos a capacidade da linhagem canina DH82 produzir NO e ROS e uma vez que se reconhece o papel do NO e do ROS na atividade microbicida dos macrófagos contra diferentes microrganismos, incluindo protozoários, nós avaliamos sua produção em células em repouso, estimuladas com LPS e/ou na presença de *L. amazonensis* ou *L. chagasi*.

Ao avaliarmos a produção de NO pela presença de nitrito no sobrenadante das culturas através da técnica de Griess, nós detectamos níveis baixíssimos ou indetectáveis de NO, mesmo quando os macrófagos caninos eram estimulados com LPS (dados não mostrados). Wasserman e colaboradores (2012) conseguiram detectar a presença de nitrito no sobrenadante de culturas de macrófagos caninos DH82, utilizando a reação de Griess, no entanto os dados apresentados por eles mostraram uma grande produção basal de NO de aproximadamente 90 μ M nos macrófagos caninos em repouso, sem no entanto, observarem qualquer alteração nas concentrações de nitrito medida no sobrenadante, após estímulo com diferentes concentrações de LPS. Dessa forma, decidimos testar outra técnica para tentar caracterizar a produção de NO pelos macrófagos caninos DH82. Nossos dados de citometria utilizando a sonda intracelular DAF-FM mostram que os macrófagos DH82 apresentam níveis basais de marcação pela sonda (**Fig. 13A**), sugerindo que o NO está presente, mas provavelmente em quantidades não detectáveis pela reação de Griess, uma vez que o mecanismo de ação dessa sonda se baseia na entrada do diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA) no interior da célula, onde será convertido a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) por meio da ação de esterases intracelulares, que na presença de NO e oxigênio, forma o triazolofluoresceína (DAF-2T), esse composto irá emitir a fluorescência detectada nos ensaios de citometria de fluxo. A análise dos dados pela intensidade de fluorescência mostra que os macrófagos DH82 não foram capazes de aumentar os níveis intracelulares de NO de forma significativa após estímulo com LPS e nem na presença de uma ou outra espécie de *Leishmania*. (**Fig. 13A**). No entanto, quando analisamos o percentual de células DAF⁺, nós observamos um aumento da porcentagem de células que possuíam NO intracelular após o estímulo com LPS (**Fig. 13B**). Além disso, vimos que as espécies de *Leishmania* não são capazes de induzir a produção de NO nos macrófagos DH82 em repouso e nem modulam a produção de NO nos macrófagos estimulados com LPS no nosso modelo e nas nossas condições experimentais (**Fig. 13A e B**). Dados sobre a expressão de iNOS em macrófagos caninos derivados de monócitos infectados com *L. chagasi* mostram que há um pequeno aumento na

expressão de iNOS, mas o aumento era maior quando o macrófago era estimulado por INF- γ e LPS e infectado (SISTO *et al.*, 2001).

Os nossos resultados de ROS seguiram o mesmo padrão que os observados nos dados de NO. Os macrófagos DH82 sem estímulo apresentavam níveis basais de ROS e ocorre um aumento quando esses macrófagos são estimulados com LPS (**Fig. 14**). Já a presença do parasito não modulou a produção de ROS nas células em repouso ou estimuladas pelo LPS (**Fig. 14**). Apesar de no nosso modelo não termos encontrado diferença na produção de ROS nos macrófagos DH82 infectados, existem trabalhos que mostram que macrófagos infectados por *Leishmania* sp. apresentam alteração no nível de produção de ROS para mais ou para menos, dependendo do macrófago envolvido. Murray e colaboradores (1981) mostraram que macrófagos murinos aumentam a produção de ROS após a infecção com *L. tropica* ou *L. donovani*, enquanto Passwell e colaboradores (1994), mostraram que a infecção de macrófagos humanos por *L. donovani*, *L. major* e *L. mexicana* levam a uma diminuição na produção de ROS.

Nossos resultados apontam para a possibilidade do uso da linhagem DH82 como um modelo experimental para o estudo da interação *Leishmania* x célula canina uma vez que mostramos que esses macrófagos caninos interagem e são infectados por promastigotas das espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi* e apresentam uma dinâmica de infecção semelhante aos dos macrófagos murinos RAW 264.7, amplamente utilizados como modelo de estudo *in vitro* da leishmaniose. Apesar de não conseguirmos observar no nosso modelo e condições experimentais de infecção por *Leishmania*, diferenças na produção de NO e ROS pelos macrófagos caninos DH82 na presença de ambas as espécies de *Leishmania* testadas como demonstrado para outros macrófagos e espécies de *Leishmania*, apresentamos pela primeira vez dados sobre a produção de NO e ROS nos macrófagos caninos DH82, que podem contribuir para o melhor conhecimento desta linhagem canina, já que existem pouquíssimos trabalhos que caracterizam essa célula. Da mesma forma, mostramos dados sobre o efeito da infecção por *L. amazonensis* e *L. chagasi* sobre a expressão de MHCII e CD80 nos macrófagos caninos DH82. De qualquer maneira, deve se levar em consideração que se trata de uma linhagem de macrófagos transformada e experimentos com macrófagos caninos primários são necessários para corroborarem os dados, assim como são realizados com estudos utilizando linhagem de macrófagos murinos.

CONCLUSÕES

- 1 – A *Leishmania amazonensis* e a *L. chagasi* interagem e infectam a linhagem de macrófagos caninos DH82.
2. A *L. amazonensis* interage mais e é mais infectiva para a linhagem de macrófagos caninos DH82 do que a *L. chagasi*.
- 3 – A opsonização por anticorpos das formas promastigotas de *L. chagasi* aumenta tanto o índice de associação quanto a sobrevivência intracelular em 24 e 48 horas comparado a *L. chagasi* não opsonizada.
- 4 – A infecção pela *L. amazonensis* e pela *L. chagasi* nos macrófagos caninos DH82 apresentam um perfil de infecção semelhante aos macrófagos murinos RAW264.7.
- 5 – Por citometria de fluxo foi possível detectar que os macrófagos DH82 produzem óxido nítrico de forma basal, e aumentam a produção após estímulo com LPS, no entanto promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. chagasi* não são capazes de modular a produção de NO em macrófagos em repouso ou estimulados pelo LPS no nosso modelo.
- 6 – De forma semelhante ao observado para a produção de NO, os macrófagos DH82 produzem espécies reativas de oxigênio de forma basal, e essa produção aumenta após estímulo com LPS, no entanto promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. chagasi* não são capazes de modular a produção de ROS em macrófagos em repouso ou estimulados pelo LPS no nosso modelo de estudo.
- 7 – Os macrófagos caninos DH82 expressam de forma constitutiva a molécula de histocompatibilidade do tipo II (MHCII) em sua membrana celular, e essa expressão aumenta após estímulo com LPS, entretanto essa expressão não é modulada pela infecção por *L. amazonensis* ou *L. chagasi*.
- 8 – Os macrófagos caninos DH82 expressam de forma constitutiva a molécula co-estimulatória CD80 e é capaz de aumentar essa expressão após estímulo com LPS. Na presença de promastigotas de *L. amazonensis* há um aumento da expressão basal, no entanto, isto não é observado para *L. chagasi*.

BIBLIOGRAFIA

Acessado

em

30/01/2014:

http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html

ADEREM, A.; UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu Rev Immunol.** 17:593-623. 1999.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v.7, n.5. 2012.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.** v.6, n.10, p.392-401. 1998.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol.** v.14, n.5, p.523-32. 1996

ASHIRU, O.; BENNETT, N. J.; BOYLE, L.H.; THOMAS, M.; TROWSDALE, J.; WILLS, M. R. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. **J Virol.** v.83, n.23, p.12345-54. 2009.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NORONHA, F. S.; TURCO, S. J.; SOARES, R. P. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **J Exp Med.** 1981 May 1;153(5):1302-15. **PLoS Negl Trop Dis.** v.6, n.2. 2012.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.** v.24, n.7, p. 324-330. 2008.

BARBIÉRI, CL. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.** v. 28, p. 329–337. 2006.

BARNES, A.; BEE, A.; BELL, S.; GILMORE, W.; MEE, A.; MORRIS, R.; CARTER, S. D. Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82. **Vet Immunol Immunopathol.** v.75, n.1-2, p.9-25. 2000.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunol Rev.** v.173, p.17-26. 2000.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr Opin Immunol.** v.12 n.1, p.64-76. 2000.

BUENO, R.; MELLO, M. N.; MENEZES, C. A.; DUTRA, W. O.; SANTOS, R. L. Phenotypic, functional, and quantitative characterization of canine peripheral blood monocyte-derived macrophages. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.100, n.5, p.521-4. 2005.

CARVALHO, L. P.; PEARCE, E. J.; SCOTT, P. Functional dichotomy of dendritic cells following interaction with *Leishmania braziliensis*: infected cells produce high levels of TNF-

alpha, whereas bystander dendritic cells are activated to promote T cell responses. **J Immunol.** v.181, n.9, p.6473-80. 2008.

CASTRO, EA.; THOMAZ-SOCCOL, V.; AUGUR, C.; LUZ, E. *Leishmania (Viannia) braziliensis: epidemiology of canine cutaneous leishmaniasis* in the State of Paraná (Brazil). **Exp Parasitol.** v.117, n.1, p.13-21. 2006.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature.** v. 5, p. 7-16. 2007.

CHAMIZO, C., MORENO, J., ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 103, p. 67–75, 2005.

CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annu Rev Microbiol.** v.44, p.499-529. 1990.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record, England.** p. 539–543. 1997.

CORTADA, V.M.; DOVAL, M.E.; SOUZA LIMA, M.A.; OSHIRO, E.T.; MENESES, C.R.; ABREU-SILVA, A.L.; CUPOLILO, E.; SOUZA, C.S.; CARDOSO, F.O.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; BRAZIL, R.P.; CALABRESE, K.S.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Canine visceral leishmaniosis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res Commun.** v.28, n.5, p.365-74. 2004.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D.; LEAL, G. G.; MOREIRA, N. D.; OLIVEIRA, L. A.; de MENEZES MACHADO, E. M.; MORAIS, M. H.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS One.** v. 9, n.3. 2014.

CRUZ, C. F. R. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no município de Bandeirantes – Paraná, entre 200 e 2009. **São Paulo: FSP-USP.** 2010.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors.** v.2, s. 1:s1. 2009.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev Inst de Med Trop São Paulo.** n.48, v.3, p.151-6. 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol, Microbiol Infect Dis.** v.27, n.5, p.305-18. 2004.

- FAVALI, C.; TAVARES, N.; CLARÊNCIO, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **J Leukoc Biol.** v.82, n.6, p.1401-6. 2007.
- FERRARI, C. K.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Nitric oxide, health and disease. **J Appl Biomed.** v.7, p.163-173. 2009.
- FERRARI, C. K.; SOUTO, P. C.; FRANÇA, E. L.; HONORIO-FRANÇA, A. C. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** v.59, n.6, p.441-8. 2011.
- FUJIMOTO, Y.; NAKATANI, N.; KUBO, T.; SEMI, Y.; YOSHIDA, N.; NAKAJIMA, H.; ISERI, T.; AZUMA, Y. T.; TAKEUCHI, T. Adenosine and ATP affect LPS-induced cytokine production in canine macrophage cell line DH82 cells. **J Vet Med Sci.** 2012 Jan;74(1):27-34.
- GUILLIAMS, M.; BRUHNS, P.; SAEYS, Y.; HAMMAD, H.; LAMBRECHT, B.N. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. **Nat Rev Immunol.** v.14, n.2, p.94-108. 2014.
- GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of Leishmania major amastigotes into macrophages. **Infect Immun.** v.61, n.4, p.1553-8. 1993.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.36, n.1, p. 71-80. 2003.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasitol.** v.181, n.1, p.23-30. 2011.
- HARRUS, S.; WANER, T.; FRIEDMANN-MORVINSKI, D.; FISHMAN, Z.; BARK, H.; HARMELIN, A. Down-regulation of MHC class II receptors of DH82 cells, following infection with Ehrlichia canis. **Vet Immunol Immunopathol.** v.96, n.3-4, p.239-43. 2003.
- IBANA, J. A.; SCHUST, D. J.; SUGIMOTO, J.; NAGAMATSU, T.; GREENE, S.J.; QUAYLE, A.J. Chlamydia trachomatis immune evasion via downregulation of MHC class I surface expression involves direct and indirect mechanisms. **Infect Dis Obstet Gynecol.** 2011:420905. 2011.
- JANEWAY, C. A. J; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Imunobiologia: O Sistema immune na saúde e na doença* 6^o edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2007
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr Opin Hematol.** v.7, n.1, p.26-31. 2000.
- KANE, M. M.; MOSSER, D.M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **J Immunol.** v.166, n.2, p.1141-7. 2001.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.** v.9, n.8, p.604-15. 2011.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B. . Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 115, p. 135-145, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. eds.; *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. **London: Academic Press**. p. 1-119. 1987.

LAUNOIS, P.; TACCHINI-COTTIER, F.; PARRA-LOPEZ, C.; LOUIS, J. A. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. **Int Rev Immunol**. v.17, n.1-4, p.157-80. 1998.

LIU, D.; UZONNA, J.E.; The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**. v.12, n.2, p.83. 2012.

LÓPEZ-CÉSPEDES, A.; LONGONI, S.S.; SAURI-ARCEO, C.H.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; ESCOBEDO-ORTEGÓN, F.J.; BARRERA-PÉREZ, M.A.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; MARÍN, C. *Leishmania* spp. epidemiology of canine leishmaniasis in the Yucatan Peninsula. **ScientificWorldJournal**. 2012:945871. 2012.

McCONVILLE, M. J.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C.; SCHNEIDER, P. Structure of *Leishmania* lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. **Biochem J**. v.310, n Pt 3, p.807-18. 1995.

McMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunol Rev**. v.201, p.206-24. 2004.

MADEIRA, M.; BARBOSA-SANTOS, E.; MARZOCHI, M. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermatropic *Leishmania* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 94, n.5, p.645-8. 1999.

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Trop**. v.103, n.2, p.150-5. 2007.

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; DA ROCHA LIMA, A.C.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; DOS SANTOS, S.L.; BARATA, R.A.;

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina; Nota técnica conjunta número 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. 2011.

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

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Semin Cell Biol**. v.4, n.5, p.315-22. 1993.

MURRAY, H. W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophags. **J Exp Med.** v.153, n.5, p.1302-15. 1981.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, p. 1561-77. 2005.

NADERER T.; MCCONVILLE, M. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol.** v.10, n.2, p.301-8. 2008.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **J Clin Microbiol.** v.44, n.4, p.1318-22. 2006.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BREITSCHWERDT, E.B. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. **Trends in Parasitology.** v.25, n.4, p. 157-63. 2009.

PALATNIK-de-SOUSA, C. B.; dos SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; da COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.** v.65, n.5, p.510-7. 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; DAY, M.J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasit Vectors.** v.4, n.197. 2011.

PASSWELL, J. H.; SHOR, R.; SMOLEN, J.; JAFFE, C. L. Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. **Int J Exp Pathol.** v.75, n.4, p.277-84. 1994.

PETERS, C.; AEBISCHER, T.; STIERHOF, Y.D.; FUCHS, M.; OVERATH, P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **J Cell Sci.** v.108, p.3715-3724. 1995.

PIMENTA, P. F.; TURCO, S. J.; McCONVILLE, M. J.; LAWYER, P. G.; PERKINS, P. V.; SACKS, D. L. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science.** v.256, n.5065, p.1812-5. 1992.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-*Leishmanial* activity. **Vet Parasitol.** v.92, n.3, p.181-9. 2000.

PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur J Immunol.**v.25, n.6, p.1594-600. 1995.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun.** v.62, n.1, p.229-35. 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG.; E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect Immun.** v.67, n.1, p.237-43. 1999.

REINER, S.L., LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 151–177, 1995.

REIS, A.B.; GIUNCHETTI, R.C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine *Leishmaniasis*. **Trends Parasitol.** v.26, n.7, p.341-9. 2010.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** v.128, n.1-3, p.87-95. 2009.

RIBEIRO, V. M.; DA SILVA, S. M.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; Nogueira, F. dos S.; WERKHAÜSER, M.; DA FONSECA, A. L.; DANTAS-TORRES, F.; BRASILEISH –A Study Group about Animal Leishmaniasis. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasit Vectors**, v., n.1, p.8. 2013.

RODRIGUES, C. A.; BATISTA, L.F.; TEIXEIRA, M. C.; PEREIRA, A. M. SANTOS, P.O., de SÁ OLIVEIRA, G. G.; de FREITAS, L. A.; VERAS, P.S. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Vet Parasitol.** v.143, n.3-4, p.197-205. 2007.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J.F.; ANJUÈRE, F.; FRAGAKI, K.; FICHOUX, Y.L.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC microbiology.** v.1, n.17. 2001.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. **Am J Trop Med Hyg.** v. 34, p. 456-459. 1985.

SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P.; ARRUDA, F. C.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C.F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A.P.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. 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, n.11. 2007.

SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral *Leishmaniasis*: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** v.70, n.6, p.618-24. 2004.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine *Leishmaniasis*: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet Dermatol.** v.20, p.471-89. 2009.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; SHLOMAI, J. Chitinase secreted by *Leishmania* functions in the sandfly vector. **Proc Biol Sci.** v.245, n.1313, p.121-6. 1991.

SCHNEIDER, P.; SCHNUR, L. F.; JAFFE, C. L.; FERGUSON, M. A.; McCONVILLE, M. J. Glycoinositol-phospholipid profiles of four serotypically distinct Old World *Leishmania* strains. **Biochem J.** v.304, n.2, p.603-9. 1994.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. P. Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotrop.** v. 11. 2011.

SPÄTH, G. F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S. M.; AVILA, H. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.97, n.16, p.9258-63. 2000.

SISTO, M.; BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Inducible nitric oxide synthase expression in *Leishmania*-infected dog macrophages. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** v.24, n.4, p.247-54. 2001.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.; TANIGUCHI, H.H.; ARAÚJO, M.F.; BARBOSA, J.A.; BARBOSA, J.E.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.** v.149, n.3-4, p.280-4. 2007.

UENO, N.; BRATT, C.L.; RODRIGUEZ, N.E.; WILSON, M.E. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum* chagasi promastigotes. **Cell Microbiol.** v.11, n.12, p.1827-41. 2009.

VOULDOUKIS, I.; DRAPIER, J.C.; NÜSSLER, A.K.; TSELENTIS, Y.; DA SILVA, O.A.; GENTILINI, M.; MOSSALAYI, D.M.; MONJOUR, L.; DUGAS, B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob Agents Chemother.** v.40, p.253–256, 1996.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol Res.** v.41, n.1, p.15-25. 2008.

WANG, J. H.; REINHERZ, E. L. Structural basis of T cell recognition of peptides bound to MHC molecules. **Mol Immunol.** v.38, n.14, p.1039-49. 2002.

WASSERMAN, J.; DIESE, L.; VanGUNDY, Z.; LONDON, C.; CARSON, W. E.; PAPENFUSS, T. L. Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultured canine tumor cells. **Vet Immunol Immunopathol.** v.145, n.1-2, p.420-30. 2012.

WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G.J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In Vitro Cell Dev Biol.** v.24, n.3, p.223-9. 1988.

WEISSLEDER, R.; NAHRENDORF, M.; PITTET, M, J,; Imaging macrophages with nanoparticles. **Nat Mater.**v.13, n.2, p.125-38. 2014.

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ECIJA, R.A.; BARRAGÁN. A.; MARTÍNEZ-MORENO. A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Vet Immunol Immunopathol** . v.123, n.3-4, p. 353-9. 2008.