

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/05/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1
com a apoptose de células monucleares de sangue
periférico e leucócitos de baço de cães com
leishmaniose visceral**

Aline Aparecida Correa Leal

Médica Veterinária

ARAÇATUBA - SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1
com a apoptose de células monucleares de sangue
periférico e leucócitos de baço de cães com
leishmaniose visceral**

Aline Aparecida Correa Leal

Orientadora: Prof^a. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP
2016

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Leal, Aline Aparecida Correa

L473i

Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com a apoptose de células mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral / Aline Aparecida Correa Leal.

Araçatuba: [s.n.], 2016.
48f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016

Orientadora: Prof.^a. Adjunto: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cães. 2. Leishmania infantum. 3. Zoonoses I. T.

CDD 616.9364

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com apoptose de células mononucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral

AUTORA: **ALINE APARECIDA CORREA LEAL**

ORIENTADORA: **VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. MARIA CECILIA RUI LUVIZOTTO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP

Araçatuba, 06 de maio de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Aline Aparecida Correa Leal - nascida em 10 de setembro de 1984, na cidade de Promissão/SP, graduada em Medicina veterinária no ano de 2011 pela Universidade Estadual Paulista - UNESP – Araçatuba-SP. Realizou especialização no ano de 2012 na mesma universidade, através da residência em Diagnóstico Veterinário com ênfase em laboratório clínico veterinário. No ano de 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluna especial do programa de mestrado, passando a aluna regular em 2014. Em 26 de julho de 2015 integralizou os créditos e em 05 de fevereiro de 2016 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação, com o trabalho intitulado “Produção de ROS e NO na Leishmaniose canina e sua relação com a apoptose celular”.

EPÍGRAFE

“Sonhar grande ou sonhar pequeno custam o mesmo preço.”

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Célio e Edna, que me apoiaram em todos os momentos da minha caminhada acadêmica.

Ao meu marido Vinicius, que por muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesma.

Aos meus amigos, os quais muitas vezes foram meu braço direito e fizeram desta etapa mais alegre e tranquila.

Aos animais, sem os quais não seria capaz de realizar nossos experimentos e sem os quais não saberia para que estudar.

AGRADECIMENTOS

À professora Valéria Marçal Félix de Lima que aceitou passar esses dois anos e meios ao meu lado, orientando-me de forma a proporcionar tanto meu crescimento científico como o desenvolvimento pessoal.

A minha família, por ser meu alicerce em momentos difíceis e meus companheiros nos momentos de alegria.

Aos meus grandes amigos Breno Almeida, Kathlenn Silva, Juliana Perosso e Vanessa Chiku, que sempre estiveram ao meu lado no laboratório, ajudando tanto no desenvolvimento do projeto como no companheirismo nos dias mais difíceis. Aos meus amigos Gabriela Venturin, Flavia Yamamoto, Larissa Melo e Alex Nakamura pelo companheirismo e pelos momentos de apoio.

À direção da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, à chefia do DCCRA e a todos os funcionários da unidade.

À minha banca de qualificação Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra. Flavia Lopes e Profa. Dra. Juliana Peiró pelas relevantes considerações sobre o meu trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa (2013/06684-9), à CAPES e a FAPESP (2014/08931-6) por conceder a bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
OBJETIVOS.....	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO 2.....	26
Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com a apoptose de células monucleares de sangue periférico e leucócitos de baço de cães com leishmaniose visceral	27
1 INTRODUÇÃO.....	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1 Seleção dos Animais	33
2.2 Isolamento, cultura, marcação e determinação das taxas de ROS, NO e apoptose	33
2.3 Produção de NO e ROS por PBMC de células de cães controle e infectados.....	34
2.4 Atividade da enzima HO-1 em células monucleares sanguíneas e leucócitos de baço.....	35
2.5 Análise estatística.	35
3 RESULTADOS.....	36
4 DISCUSSÃO.....	39
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS	44

Interações entre os níveis de NO, ROS e atividade HO-1 com apoptose de células mononucleares de sangue periférico e baço de cães com leishmaniose visceral

RESUMO - Leishmania são protozoários intracelulares obrigatórios que infectam células fagocitárias de mamíferos ocasionando a leishmaniose visceral canina (LVC). Por apresentarem um intenso parasitismo cutâneo, os cães infectados possuem papel chave na transmissão da doença. Para sobreviver no hospedeiro, as leishmanias são capazes de desenvolver mecanismos de escape por alterações das respostas de células fagocitárias, tais como o NO e o ROS responsáveis pela morte intracelular do parasita. A HO-1 também pode estar envolvida na regulação da resposta imune, porém seu papel na leishmaniose visceral canina ainda não está claro. A produção excessiva de NO, ROS e HO-1 pode ser prejudicial e estar relacionada com a apoptose e desregulação imunológica na LVC. Assim o este estudo teve a finalidade de investigar os níveis de ROS, NO e atividade HO-1 em células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço e sua correlação com a apoptose celular. Para isso foram utilizadas células mononucleares sanguíneas e leucócitos de baço de cães infectados e saudáveis. As células foram isoladas e cultivadas durante 24 horas, na sequência foram incubadas com sondas para NO ou ROS e foi determinada a apoptose celular. Todas as análises foram realizadas por citometria de fluxo. Após a lise das células em cultura, a atividade HO-1 foi determinada no lisado celular por método colorimétrico. O metabolismo oxidativo estava reduzido e a taxa de apoptose dos mononucleares sanguíneos aumentada, por influência do ROS. Os níveis de ROS e NO estavam diminuídos nos leucócitos do baço de cães infectados, e maior taxa de apoptose celular foi observada nos leucócitos de baço de cães infectados. A atividade da HO-1 obtida estava reduzida tanto nos mononucleares do sangue como nos leucócitos do baço dos animais infectados, quando comparados aos animais saudáveis, porém não mostrou correlação com a

apoptose. Concluímos que os mecanismos indutores de apoptose diferem nos sítios de infecção, ou seja, no baço os reativos de oxigênio e de nitrogênio estão envolvidos com a inibição do processo de morte celular, no entanto a atividade de hemooxigenase pode ter influência na apoptose.

Palavras chave: Cães, *Leishmania infantum*, Zoonoses.

Interactions between the levels of NO, ROS and HO-1 activity and apoptosis mononuclear cells from peripheral blood and spleen of dogs with visceral leishmaniasis

SUMMARY - Leishmania are obligate intracellular protozoan that infects phagocytic mammalian cells causing canine visceral leishmaniasis (CVL). Because they have an intense cutaneous parasitism, infected dogs have key role in disease transmission. To survive in the host, the Leishmania are able to develop escape mechanisms by changes in phagocytic cell responses, such as the NO and the ROS responsible for the death of intracellular parasites. The HO-1 may also be involved in regulating the immune response, but their role in canine visceral leishmaniasis is not yet clear. The excessive production of NO, ROS and HO-1 can be detrimental and to be related to immune dysregulation and apoptosis in LVC. So this study aimed to investigate the levels of ROS, NO and HO-1 activity in mononuclear cells of peripheral blood leukocytes and spleen and its correlation with cell apoptosis. For this they used blood mononuclear cells and spleen leukocytes from infected and healthy dogs. Cells were isolated and cultured for 24 hours following probes were incubated with NO or ROS and cell apoptosis was determined. All analyzes were performed by flow cytometry. After lysis of the cells in culture, HO-1 activity in cell lysate was determined by a colorimetric method. Oxidative metabolism was reduced and the apoptosis rate of increased blood mononuclear, influenced by ROS. The levels of ROS and NO were decreased in leukocytes from the spleen of infected dogs, and increased apoptotic rate was observed in spleen leukocytes from infected dogs. The activity of HO-1 was obtained in both reduced blood mononuclears as in the splenic leukocytes from infected animals compared with healthy animals, but was not correlated with apoptosis. We concluded that the apoptosis-inducing mechanisms differ at sites of infection, or spleen reactive

oxygen and nitrogen are involved with the inhibition of cell death, however hemooxygenase activity may play a role in apoptosis.

Keywords: Dogs, *Leishmania infantum*, Zoonoses

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são doenças causadas por cerca de 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*. Esses parasitas já foram descritos em cerca de 98 países, colocando em risco cerca de 350 milhões de pessoas (DEJAUX, 2004; WHO, 2010). Nesses países existe a predominância da forma visceral da doença, que é a mais severa das leishmanioses, podendo ser fatal quando não tratada adequadamente (MURREY, 2002).

Endêmica no Brasil, a leishmaniose visceral (LV) tem sua maior incidência na região nordeste com 92% do total de casos, seguida pelas regiões sudeste (4%), norte (3%) e centro-oeste (1%) (OMS, 1990). No Brasil, como outros países da América do Sul, a migração para as áreas urbanas contribuiu para a expansão da LV (DESJEUX, 2004). No estado de São Paulo, o primeiro relato de leishmaniose visceral canina (LVC) ocorreu em 1998, na cidade de Araçatuba (GALIMBERTTI et al., 1999).

Embora existam diferentes espécies de *Leishmania*, o ciclo de vida desses protozoários é similar, sendo todos heteroxenos, ou seja, necessitam de diferentes hospedeiros para completar seu ciclo. Assim, esses protozoários se apresentam em duas formas distintas, sendo a forma amastigota encontrada no interior de células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, tais como o homem e os cães, e a forma flagelada promastigota, encontrada no tubo digestivo do flebotomíneos (FOREYT, 2005). O envolvimento de outros vetores tem sido relatado, tais como pulgas (FERREIRA et al., 2009) e carrapatos (COUTINHO; LINARD 2007), bem como a contaminação do hospedeiro através de transfusões de sangue.

Após a inoculação cutânea pelo vetor, os parasitas rapidamente difundem-se para os linfonodos e baço através da linfa e sangue, podendo atingir rins, fígado, órgãos reprodutores, sistema digestivo e respiratório, bexiga (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) onde causa lesões e sinais clínicos que são característicos da LV. Os cães infectados podem ser sintomáticos,

oligosintomáticos ou assintomáticos (ALVAR, et al., 2004) e alguns podem evoluir para a cura espontânea (FISA, et al., 1999). Os animais infectados também podem ser classificados em quatro estágios de infecção, conforme a apresentação clínica da doença (SOLANO-GALLEGO, 2009).

A forma assintomática representa 20 a 40% da população de cães soropositivos, dos quais 80% desenvolvem os sinais clínicos tardiamente (NOLI, 1999). No Brasil, em áreas urbanas da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população soropositiva (QUEIROZ, et al., 2009). Os sinais mais frequentes de LVC são linfadenopatia, onicogrifose, perda de peso, caquexia e anormalidades locomotoras (SEMIÃO-SANTOS et al., 1995), e os achados laboratoriais como a hipergamaglobulinemia e hepatoesplenomegalia (LANGONI et al., 2005). Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal (ALVAR et al., 2004).

No ambiente silvestre os principais reservatórios são mamíferos, especialmente roedores, xenartras, carnívoros, primatas e marsupiais (GRIMALDI, TESH, 1993). Contudo, fora desse ambiente os cães são os principais reservatórios desempenhando assim função fundamental na manutenção do ciclo epidemiológico da doença, sendo infectados antes que o homem. A prevalência da leishmaniose em cães de áreas endêmicas pode atingir 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990), sendo mais prevalente que em humanos. Devido a presença de maior quantidade de parasitos na pele canina, existe a possibilidade de maior infecção do vetor (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

A resistência à infecção na LVC está associada aos baixos níveis de anticorpos específicos e a existência de imunidade celular, da qual fazem parte as linfócitos T CD4+ (Th1), que ativam de macrófagos (PINELLI et al., 1994). A ativação dos linfócitos T CD4+ (Th2) pelo parasita resulta no aumento da sua sobrevivência e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas sobre os macrófagos (BARBIÉRI, 2006). Os linfócitos T CD8+ também parecem estar envolvidas com a infecção, estando presentes em

maior número após o tratamento da doença (BARBIÉRI, 2006). Pinelli et al. (1999) observaram que essas células são capazes de lisar macrófagos canino infectados por *L. infantum* e produzir IFN- γ , que ativa os macrófagos, estimulando assim o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o óxido nítrico (NO), responsáveis pela morte intracelular do parasita (PANARO et al., 2008).

Além da imunossupressão observada na LVC, o estresse oxidativo tem se destacado como uma das desordens orgânicas observadas em cães sintomáticos (BILDIK et al., 2004), o qual também pode estar relacionado a um possível efeito imunossupressor na imunidade inata (ALMEIDA et al., 2013; ALMEIDA, 2013).

Por replicar e viver obrigatoriamente nos macrófagos, a sobrevivência da *Leishmania* spp. Nestas células depende da ação de duas enzimas induzíveis, a óxido nítrico sintase induzível 2 e arginase 1 (NADERER, 2008). O IFN-gama, induz ativação clássica de macrófagos e expressão de iNOS, que oxida a arginina em duas etapas levando a produção de NO, o metabólito responsável pela morte do parasita. Além do papel microbicida do NO *in vitro*, já evidenciado na LVC (PINELLI et al., 2000). Ele também pode estar envolvido na imunopatologia da doença, pois em diferentes parasitoses sua produção excessiva está associada com a ausência de resposta linfocitária (BOGDAN, 2001).

As diferentes concentrações de óxido nítrico podem inibir ou estimular a taxa de apoptose celular (THOMAS et al., 2008; WINK et al., 2008), como já demonstrado em diferentes tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (BOGDAN, 2001). Wink et al. (2003), observaram que em baixas concentrações o NO promove a sobrevivência e a replicação celular, além de diminuir a taxa de apoptose, enquanto que em altas concentrações ele promove a parada do ciclo da célula causando danos ao DNA ocasionando a apoptose.

Recentemente tem sido demonstrado que o parasita e seus antígenos inibem a expressão de co-estimuladores estimulatórios e diminuem a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012). Contudo, a ação de co-estimuladores

inibitórios podem induzir a apoptose ou mesmo outras vias importantes para a manutenção do organismo, quanto a resposta imune a doença (CHIKU et al., 2016).

O NO está intimamente ligado a atividade leishmanicida nos cães (PANARO et al., 1998; PANARO et al., 2001; PINELLI et al., 2000), quando foi inibida a produção de NO ocorreu menor atividade leishmanicida nos macrófagos (PINELLI, 2000).

Em cultura celular o NO, que é gasoso, rapidamente é convertido a nitrito e nitrato. Estudos anteriores somente avaliaram NO medindo o nitrito, utilizando o método de Griess (GUEVARA et al., 1998). Contudo, para a aferição desse metabólito é imprescindível um método preciso e confiável, pois suas características, tais como a meia vida curta, podem interferir na análise (EMBOLA et al., 2002). O uso de sondas (*probes*) intracelulares faz com que seja realmente analisado o NO, sem interferências de outras moléculas biologicamente semelhantes ou quando as concentrações de NO são muito pequenas (MURPHY et al., 2011).

Neutrófilos, monócitos e macrófagos podem controlar parasitas por meio das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas durante a fagocitose em um processo chamado de explosão respiratória (RB), parte essencial da resposta imunológica inata (BRÜNE, 2013)

Vários estudos indicam que macrófagos murinos matam as promastigotas *in vitro*, pela produção de ROS (GANTT et al., 2001). Além disso, ratos deficientes na produção de ROS tiveram o aumento da susceptibilidade à doença, quando infectados com *Leishmania donovani*. Contudo parasitas, tais como, as leishmanias podem inibir essa resposta imune e evadir-se das técnicas de defesa do hospedeiro, como a explosão respiratória (COOMBS, 1989; PHAM et al., 2005). Em cães infectados com *L. infantum* já foi comprovado que esses mecanismos de defesa podem estar alterados (HEIDARPOUR et al., 2012). O estresse oxidativo tem grande importância na infecção por *L. infantum*, pois quanto maior sua taxa, maiores

serão os sinais que o animal apresenta (BILDIK et al., 2004; BRITTI et al., 2008).

Outro processo associado à regulação da resposta imunológica na LV é a apoptose (DAS et al., 1999), que pode influenciar ou não o desenvolvimento da doença (ALEXANDER et al., 2001). Em cães com leishmaniose, a apoptose das células T pode estar ligada à supressão da imunidade celular (LIMA et al., 2012) e conseqüentemente à progressão da doença. Cães infectados com *Leishmania infantum* apresentam redução no número de linfócitos T CD4+ e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos, seguida da disseminação do parasita para vários órgãos (BOURDOISEAU et al., 1997). Segundo Alvar et al.(2004), existe uma correlação direta entre os níveis das células T CD4+ e a resposta celular ao parasito, sendo a recuperação do animal doente após o tratamento acompanhada pelo aumento da porcentagem destas células.

Como mecanismo de defesa, a apoptose também pode causar inflamação durante as infecções parasitárias gerando sinais clínicos característicos da doença. Contudo, isso depende do estímulo ou receptores envolvidos na fagocitose de células necróticas ou apoptóticas que geraram sinais anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios, que causam a ativação de macrófagos (VERÇOSA et al., 2012). Cães com sintomas de LV apresentam uma reação inflamatória severa com altos índices de apoptose nas lesões de pele, podendo essas ter algum tipo de contribuição para a persistência da *Leishmania* spp. no sítio inflamatório (VERÇOSA et al., 2012).

A supressão imunológica observada em cães naturalmente infectados com *L. infantum* pode estar relacionada com o mecanismo de apoptose de linfócitos T. Lima et al. (2012) relataram um aumento da taxa de apoptose em linfócitos T no baço e no sangue periférico de cães infectados, enquanto Silva et al. (2013) mostraram que na infecção canina mFAS e mFASL estão envolvidos na apoptose dos linfocitos T destes mesmos tecidos. Ainda segundo Perosso et al. (2014), sFAS pode atuar conjuntamente com as moléculas de

mFAS e mFASL ativando o sistema apoptótico diminuindo a quantidade de células T.

Outro receptor que pode atuar na apoptose dos linfócitos T são os receptores PD1 e seus ligantes, que além de serem reguladores negativos da linfoproliferação podem também ativar a apoptose destas células (CHIKU et al, 2016).

Sabe-se também que o metabolismo oxidativo está aumentado em células mononucleares (MELO et al., 2014) e neutrófilos (ALMEIDA et al., 2013) de sangue periférico de cães com LV, sendo que a produção intermitente de reativos de oxigênio leva a lesão da membrana celular e conseqüentemente inicia a apoptose destas células (ZAMZAMI et al., 1996).

Na LV, além da apoptose a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) parece atuar nos mecanismos efetores envolvido com a imunidade. Em modelos experimentais indutores desta enzima aumentaram a carga parasitária em macrófagos peritoneais. E em humanos com LV altos níveis da enzima HO-1 foram detectados no soro (LUZ et al., 2012). A enzima HO-1, codificada pelo gene *Hmox1*, tem ganhado destaque devido aos seus efeitos imunoregulatórios, inibindo a proliferação e/ou função de células T, sendo sua expressão aumentada sob condições de estresse (SOARES et al., 2009).

A HO-1 atua inibindo o efeito pró-oxidante do heme livre no organismo, o qual pode ser prejudicial às células e tecidos por induzir o estresse oxidativo, citotoxicidade e inflamação (FERREIRA et al., 2008). Assim, após a quebra do complexo hemoglobina-haptoglobina, o grupo heme é quebrado pela HO-1 em ferro instável (Fe), biliverdina e monóxido de carbono (CO) (TENHUNEN et al., 1969).

A ação da enzima contra o estresse oxidativo parece estar ligada ao efeito citoprotetor que ela exerce e aos seus metabólitos que têm grande capacidade antioxidante: o Fe induz a produção de ferritina (BALLA et al., 1992); a biliverdina é rapidamente convertida em bilirrubina que possui efeito citoprotetor (STOCKER et al., 1987); e o CO também é citoprotetor (BROUARD et al., 2000) além de anti-inflamatório (OTTERBEIN et al., 2003).

Apesar disso, o papel da HO-1 ainda não está estabelecido na LVC. Em humanos, a presença de altas concentrações HO-1 parece estar associada com a presença da doença (LUZ et al., 2012). Luz et al. (2012), afirmaram em seu estudo que a presença de promastigotas estimula a produção de HO-1 em macrófagos murinos. Pham et al. (2005) sugerem que a presença de amastigotas e promastigotas regulam os níveis de HO-1, sendo a presença das amastigotas um estímulo mais rápido. Trabalhos recentes tem evidenciado que a enzima HO-1 pode controlar a produção de NO e inibir o processo apoptótico (MORSE, 2002). Chung e colaboradores sugerem que o NO induz a HO-1. A indução de HO-1 pelo óxido nítrico protege células T da apoptose induzida via FAS, e essa via pode ainda exercer um papel anti-inflamatório (CHUNG et al., 2008).

Embora algumas moléculas indutoras de apoptose estejam esclarecidas é possível que outros metabolitos possam contribuir na indução de apoptose, como já dito anteriormente, o óxido nítrico quando excessivamente produzido pode induzir apoptose. Em cães sintomáticos com LV, alta produção de iNOS foi observada no baço, porém nenhum estudo foi realizado para avaliar se a produção de NO tem correlação com a apoptose já documentada no baço e sangue periférico.

Esses conhecimentos poderão ser úteis para o entendimento da imunopatologia na LVC, e poderão originar futuras terapias baseado em drogas antiapoptóticas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa e por conceder a bolsa de mestrado (Processo 2014/08931-6).

Referências

- ALVAR J. et al. Canine Leishmaniasis. **Adv. Parasitol.** n.57, p. 1-88. 2004.
- BILDIK, A. et al. Oxidative stress and nonenzymatic antioxidative status in dogs with visceral Leishmaniasis. **Reser. of Vet. Sci.** n. 77, p. 63–66. 2004.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature**, n. 2, p.907-916, 2001.
- BRANDONISIO, O. et al. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. **Clin. and exper. Med.** n.2, p.125–129, 2002.
- BRANDONISIO, O. et al. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Vet. Immunol. and Immunopat.** n. 53, p.95–103, 1996.
- BRITTI D. et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Vet. Res. Commun.** n.32, p.251–254. 2008.
- BROUARD, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M. and Soares, M. P. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **J. Exp. Med.** n.192, p.1015–1026, 2000.
- BRÜNE, B. et al. Redox control of inflammation in macrophages. **Antioxid. Redox Signal** n.19, p.595–637. 2013.
- BRÜNE, B.; von Knethen, A.; Sandau, K. B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.** n.351, p.261-272,1998.
- DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis**, v. 27, p.305-318, 2004.

- DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol.** n.26, p.137-144, 2012.
- EL FADILI, K. et al. Antimicrobial agents and chemotherapy, v.18, p.4866-4874. 2008.
- EREL, O.; Kocygit, A.; Aktepe, N.; Avci, S.; Leukocyte adenosine deaminase, superoxide dismutase activities and lipid peroxidation in cutaneous Leishmaniasis. **Acta Paras. Turcica.** n.21, p.160–161, 1997.
- ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The J. of Immunol.** p.5542-5550, 2013.
- Gantt, K. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol.** n.167, p.893–901, 2001.
- Genaro, A. M. et al. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. **J. Clin. Invest.** n.95, p.1884-1890, 1995.
- GINEL, P. J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Res Vet Sci.** n.85, p.510–514, 2008.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J. Immunol.**, n.144, p.278–283, 1990.
- GRIMALDI, J. R.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.** n.6, p.230–250, 1993.
- GOMEZ-OCHOA, P. et al. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.172, p.135–138, 2010.
- HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M.; KHOSHNEGAH, J. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitol. Res.** n.111, p.1491–1496, 2012.
- KATSURA, M.; FORSTER, L. A.; FERNS, G. A. A.; ANGGARD, E. E. Oxidative modification of low-density lipoprotein by human polymorphonuclear leucocytes

- to a form recognised by the lipoprotein scavenger pathway. **Bioch. et Biophys. Acta**, n.1213, p. 231–237, 1994.
- KIM, Y. M.; TALANIAN, R. V.; BILLIAR, T. R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. **J. Biol. Chem.** n.272, p.31138-31148, 1997.
- KIM, Y. M. et al. Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. **J. Biol. Chem.** n.270, p.5710-5713, 1995.
- KOLB, J. P. Mechanisms involved in the pro- and antiapoptotic role of NO in human leukemia. **Leukemia** n.14, p.1685-1694, 2000.
- LANGONI, S. S.; SANCHEZ-MORENO, M.; LOPEZ, J. E. R.; MARIN, C. *Leishmania infantum* secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of canine Leishmaniasis. **Comp. Immunol. Microbiol. and Infect. Dis.** n.36, p.499-506, 2013.
- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunol.** n. 71, p.556–559, 1990.
- Lima, V. M. F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.** n.184, p.147-153, 2012.
- Lima, V. M. F. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, n.36, p. 485-489, 2003.
- LUZ, N. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **J. Immunol.**, n.188, v.9, p.4460-7, 2012.
- MADESH, M.; RAMACHANDRAN, A.; BALASUBRAMANIAN, K. A. Nitric oxide prevents anoxia-induced apoptosis in colonic HT29 cells. **Arch. Biochem. Biophys.** n.366, p.240-248, 1999.
- MANNICK, J. B. et al. Nitric oxide produced by human B-lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cel.** n.179, p.1137-1146, 1994.
- MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-

dependent process that produces nitrogen derivatives. **J Leuk Biol**, n. 49, p.73-82, 1991.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, 120, 2006.

MOLINA, R. et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** n.88, p.491-493, 1994.

MOOKERJEE, B. J. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani* infected macrophages. **Antimicrob. Agents. Chemother.** n.50, p.1788–1797, 2006.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. () The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cell. Microbiol.** n.10, p.301–308, 2008.

NOVAIS, F. O. et al. Human Classical Monocytes Control the Intracellular Stage of *Leishmania braziliensis* by Reactive Oxygen Species. **The J. of Infect. Dis.** n.209, p.1288–96, 2014.

NOVAIS, O. F. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The J. of Immunol.** n.183, p.8088-8098, 2009.

PAE, H. O.; CHUNG, H. T. Heme oxygenase-1: its therapeutic roles in inflammatory diseases. **Immune Network** n.9, p.12–19, 2009.

PANARO, M. A. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasit. Vectors**, n.1, p.1-10, 2008.

PANARO, M. A. et al. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, n.1, p.137-143, 2001.

PANARO, M. A. et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with

- interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide. **Int. J. Clin. Lab. Res.** n. 29, p.122–127, 1999.
- PANARO, M. A. et al. Evaluation of nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog macrophages. **Immunophar. Immunotoxicol.** n.20, p.147–158, 1998.
- PARK, J. L.; LUCCHESI, B. R. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. **Annals of Thoracic Surgery.** n.68, p.1905-1912, 1999.
- PEROSSO J. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.205, p.417–423, 2014.
- PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infect. Immun.** n.12, p.8322-33, 2005.
- PINELLI, E. et al. 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.**, n.67, p.237-43, 1999.
- ROJAS M. et al. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J. Immunol.** n.162, p.6122, 1999.
- ROMÃO, P. R. T. et al. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de pesquisa e extensão em saúde- UNESC*, 3. 2007.
- RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.** n.28, p.289–309, 2000.
- Saavedra, J. E. et al. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and toxicity in the liver. **J. Med. Chem.** n.40, p.1947- 1954, 1997.

- SARKAR A. et al. Chatterjee M Monitoring of Intracellular Nitric Oxide in Leishmaniasis: Its Applicability in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Cytometry Part.** v.79A, p.35-45, 2011.
- SANCHES, F. P. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Vet. Scand.** n.56, p.57, 2014.
- SANTOS, F. R. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Res.** n.108, p.1397–1403, 2011.
- SEMIÃO-SANTOS et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol. Res.** n.81, p.235-239, 1995.
- SERARSLAN, G.; YILMAZ, H. R.; SOGUT, S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.** n.30, p.267–271, 2005.
- SILVA, K. L. et al. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.** n.197, p.470-476, 2013.
- SIMON, H. U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis** n.5, p.415-418, 2000.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.** n.28, p.1-18, 2009.
- STENGER, S. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.** n.183, p.1501, 1996.
- VIEIRA, P. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** n.121, p.76–82, 2009.
- VUOTTO, M. L. et al. Chemiluminescence activity in whole blood phagocytes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Luminescence** n.15, p.251–255, 2000.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Technical Report Series 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis, Geneva, Switzerland, p. 86, 2013.

ZAMZAMI, N. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **Journal of Experimental Medicine** n.183, p.1533–1544, 1996.