

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

**O PAPEL DA HEME OXIGENASE-1 NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Breno Fernando Martins de Almeida

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2016

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

**O PAPEL DA HEME OXIGENASE-1 NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Breno Fernando Martins de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

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

ARAÇATUBA – SP

2016

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

Almeida, Breno Fernando Martins de

Al64p

O papel da heme oxigenase-1 na leishmaniose visceral canina /
Breno Fernando Martins de Almeida. Araçatuba: [s.n], 2016.
75 f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

1. Cão. 2. HSP32. 3. Leishmania infantum. I. T.

CDD: 616.993

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: O papel da heme oxigenase-1 na leishmaniose visceral canina

AUTOR: BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

COORIENTADOR: PAULO CESAR CIARLINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor 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



Prof. Dr. LUIZ DANIEL DE BARROS

Curso de Medicina Veterinária / Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO



Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM

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, 19 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA – Natural de Ituiutaba, Minas Gerais, nascido em 13 de julho de 1985, filho de Dania Martins Ferreira de Almeida e Wilson Fernando de Almeida. Em 2003, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), onde se graduou como Médico Veterinário em setembro de 2008 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Laboratório Clínico Veterinário”, sob orientação do Prof. Dr. Marlos Gonçalves Sousa. Realizou residência médico-veterinária na área de Diagnóstico Veterinário, com ênfase em Patologia Clínica Veterinária no Hospital Veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, com início em fevereiro de 2009 e término em janeiro de 2011. Em março de 2011 ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba – SP, sob a orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini, onde obteve o título de Mestre em janeiro de 2013, com trabalho intitulado “Estresse oxidativo na leishmaniose visceral canina”. Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado do mesmo programa de pós-graduação, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação da Profa. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima e co-orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da FAPESP, de onde também obteve bolsas de Mestrado e Doutorado, atuando sempre em temas relacionados ao estresse oxidativo, imunologia e leishmaniose visceral canina. Atualmente é professor nas Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), sendo responsável pelas disciplinas de Laboratório Clínico Veterinário, Imunologia e Microbiologia, também é Responsável Técnico pelo Laboratório Clínico Veterinário do Hospital Veterinário Roque Quagliato das FIO.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

Walter S. Landor

*Aos meus pais, **Dania** e **Wilson**,
à querida vó **Dirce** e
à minha esposa **Fernanda**.*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/FMVA, Unesp, representada pelo prof. Dr. Max José de Araujo Faria Junior, pela oportunidade de participar dos programas de Residência, Mestrado e Doutorado da Instituição, bem como a todos os professores e funcionários da FMVA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/FMVA pela participação nos cursos de Mestrado e Doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado no início do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa auxílio de Doutorado (Proc. 2013/06068-6) e pelo financiamento do projeto de pesquisa (Proc. 2013/07496-1).

À minha orientadora, Profa. Valéria Marçal Felix de Lima, pela grandiosa orientação, todo o apoio e confiança depositados em mim, foi um privilégio enorme poder trabalhar com uma pesquisadora tão capacitada e responsável.

Ao meu co-orientador Paulo César Ciarlini, pelos conselhos e momentos de conversa agradáveis e por disponibilizar o Laboratório Clínico de Pesquisa para realização de parte do experimento. Também às colegas do mesmo Laboratório Anelise Bosco, Lillian Fonseca, Rafaela Torrecilha, Luciana de Moraes e Taiana Valadares por toda a ajuda.

Aos professores Paulo Sérgio Patto dos Santos e Flávia de Rezende Eugênio pelos procedimentos cirúrgicos dos animais do grupo controle.

À pesquisadora Flavia Lombardi Lopes, por todo o auxílio no Projeto de Pesquisa, auxiliando nas análises de expressão gênica. Também pela colaboração no Exame Geral de Qualificação e Defesa dessa Tese.

À professora Márcia Marinho pela participação no Exame Geral de Qualificação e aos professores Rosemeri Vasconcelos e Luiz Daniel Barros pela participação na Defesa dessa Tese.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, em especial o Médico Veterinário Rafael Cipriano e Graziela Diniz, por todo empenho e auxílio dedicados durante a seleção dos animais.

Aos proprietários dos cães saudáveis do grupo controle por autorizarem a colheita de sangue e inclusão dos animais no experimento.

Às amigas e técnicas de suporte acadêmico Laine Margareth Gabas e Flavia Mari Yamamoto por toda dedicação em sempre ajudar, seja nos momentos de conversa ou nos materiais para lavar.

Aos colaboradores de pesquisa e amigos pós-graduandos do Laboratório de Imunologia Kathlenn Silva, Aline Leal, Vanessa Chiku, Gabriela Venturin, Larissa Melo e Cleber Martini; aos alunos de iniciação científica Ricardo Gardim, Rafaela Nascimento, Bruna Sato, Stefani Karin, Jessica e Gabriel Trivellato; aos colegas de outros laboratórios Luis Gustavo Narciso, Alex Nakamura e Marcos Maioli, saibam que todos contribuíram para essa conquista, seja direta ou indiretamente. Em especial à galera que acordava todo dia cedo para lavar o canil!

À minha esposa Maria Fernanda Fink de Almeida, por todo o companheirismo, atenção e dedicação, que além de me aturar todo esse tempo, ainda ajudou de forma indispensável na realização deste Projeto de Doutorado.

À minha família por todo carinho, empenho, apoio e compreensão dedicados. Sem vocês nada disso seria possível, agradeço profundamente à minha mãe Dania Martins, ao meu pai Wilson Fernando, ao meu irmão Bruno Fernando e à minha avó Dirce Dias.

A Deus por todas as oportunidades conseguidas, sempre iluminando e guiando meus passos.

A todos os meus amigos e familiares aos quais não citei os nomes, todos fazem parte da minha vida e contribuem para o meu crescimento.

Aos cães, objetos do presente estudo.

Enfim, a todos que contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
1 Contextualização do problema	13
2 Objetivos específicos	13
3 Revisão de literatura	14
3.1 Considerações gerais sobre a leishmaniose visceral.....	14
3.2 Resposta imunológica na LVC.....	17
3.3 Estresse oxidativo na LVC.....	19
3.4 A relação entre o estresse oxidativo e a heme oxigenase-1.....	21
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 – O EFEITO DO AUMENTO DE HEME OXIGENASE-1 NA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL	42
1 Introdução	43
2 Material e métodos	45
2.1 Aprovação Ética.....	45
2.2 Seleção dos animais.....	45
2.3 Colheita das amostras e análises laboratoriais.....	46
2.4 Marcadores de estresse oxidativo.....	46
2.5 Ensaio de linfoproliferação.....	47
2.6 Substâncias da via metabólica da HO-1 e interleucinas.....	48
2.7 Expressão gênica de HO-1.....	49
2.8 Carga parasitária.....	50
2.9 Análise estatística.....	51
3 Resultados	51
3.1 Caracterização dos cães com LVC.....	51
3.2 Estresse oxidativo na LVC.....	52

3.3 O aumento de HO-1 ocorre de forma dependente do tecido analisado...	52
3.4 Aumento das substâncias relacionadas ao metabolismo do heme e IL-10 na LVC.....	55
3.5 Correlação entre HO-1 e marcadores de estresse oxidativo, IL-10 e carga parasitária.....	56
3.6 A inibição de HO-1 aumenta a taxa de proliferação dos linfócitos induzida pelo antígeno de <i>Leishmania infantum</i>	56
3.7 O aumento da proliferação celular envolve a menor produção de IL-10 e IL-2 pela inibição de HO-1.....	57
4 Discussão.....	61
5 Conclusão.....	67
Conflito de interesse.....	68
Agradecimentos.....	68
REFERÊNCIAS.....	68

O PAPEL DA HEME OXIGENASE-1 NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO – A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica que causa imunossupressão nos animais doentes, principalmente por prejudicar a resposta imunológica celular, diminuindo a proliferação linfocitária e a capacidade fagocítica das células de defesa. Recentemente, a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) vem ganhando destaque por estar envolvida na regulação da resposta imune celular em algumas condições patológicas, sendo uma enzima induzível por condições de estresse, como o estresse oxidativo que sabidamente ocorre na LVC. Nesse contexto, esse trabalho teve por objetivo determinar o papel da HO-1 na LVC, determinando sua concentração e expressão em cães infectados e saudáveis, correlacionando-a com o estresse oxidativo, carga parasitária e IL-10. Objetivou-se também avaliar o efeito da indução e inibição da enzima sobre a resposta linfoproliferativa de células de linfonodo de cães doentes e sobre a taxa de infecção macrofágica por promastigotas de *Leishmania infantum*, determinando as citocinas envolvidas. Os cães com LVC apresentaram marcante estresse oxidativo e aumento da concentração e expressão de HO-1, obtendo-se correlação positiva entre HO-1 e estresse oxidativo e IL-10 de acordo com o tecido analisado. A inibição de HO-1 aumentou a taxa de proliferação celular na presença de antígeno solúvel de *L. infantum*, enquanto a indução de HO-1 diminuiu a taxa de proliferação antígeno-específica e aumentou a taxa de infecção macrofágica e o número de amastigotas por macrófago. Conclui-se que o aumento do metabolismo da HO-1 observado na LVC está associado ao estresse oxidativo presente nesses cães e pode ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da resposta linfoproliferativa e perpetuação da infecção, com inibição da atividade microbicida macrofágica.

Palavras-chave: cão, HSP32, *Leishmania infantum*

THE ROLE OF HEME OXYGENASE-1 IN CANINE VISCERAL LEISHMANIOSIS

SUMMARY – Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic disease that causes immunosuppression by reducing the cellular response of infected animals, impairing the cell proliferation and the phagocytic ability of defense cells. Recently, heme oxygenase-1 (HO-1) has been highlighted for being involved in regulation of cell response in certain pathological conditions, and for being an enzyme that can be induced by stress conditions, such as oxidative stress, that is known to occur in CVL. In this context, this study aimed to determine the role of HO-1 in CVL, determining its levels and expression in infected and healthy dogs, correlating these findings with oxidative stress, parasite load and IL-10. The effect of induction and inhibition of HO-1 on lymphoproliferative response by lymph node cells of infected dogs and macrophage infection rate by promastigotes of *Leishmania infantum* were also evaluated. Dogs with CVL showed marked oxidative stress and increased levels and expression of HO-1, obtaining a positive correlation between HO-1 and oxidative stress and IL-10 in a tissue-dependent way. Inhibition of HO-1 increased proliferation rate in the presence of *L. infantum* soluble antigen, while induction of HO-1 decreased antigen-specific proliferation and increased macrophage infection rate and number of amastigotes per macrophage. The increase in HO-1 metabolism observed in CVL is associated to oxidative stress present in these dogs and could be one of the mechanisms involved in the inhibition of the lymphoproliferative response, permitting the perpetuation of infection by the inhibition of macrophage microbicidal activity.

Keywords: dog, HSP32, *Leishmania infantum*

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Contextualização do problema

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença infecciosa crônica conhecida causadora de imunossupressão nos cães susceptíveis, causando o surgimento de sinais clínicos característicos da infecção. Recentemente foi evidenciado que esses animais sofrem de estresse oxidativo, com aumento das substâncias oxidantes e redução das antioxidantes no organismo. Em humanos, já foi evidenciado que a leishmaniose visceral (LV) causa o aumento de heme oxigenase-1 (HO-1), enzima que pode ser induzida por condições de estresse como o estresse oxidativo, o que estava relacionado à persistência da infecção. Além disso, já foi demonstrado que o aumento da atividade de HO-1 foi capaz de afetar a imunidade celular, reduzindo a linfoproliferação em humanos e camundongos. Considerando o papel imunorregulatório da HO-1 e que essa enzima é responsável pelo metabolismo da hemoglobina proveniente das hemácias e que grande parte dos cães com LVC apresentam anemia, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel da HO-1 na LVC.

2 Objetivos específicos

1) Determinar se a via metabólica da HO-1 está alterada em cães com LVC:

1.1) Pela determinação da concentração de HO-1 no plasma, baço, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e medula óssea (CMMO);

1.2) Pela avaliação da expressão de HO-1 em tecido esplênico, CMMO e CMSP;

1.3) Pela mensuração das substâncias envolvidas no metabolismo da hemoglobina, como heme livre plasmático e haptoglobina, ferritina e receptor solúvel CD163 (sCD163) plasmáticos e esplênicos, comparando-os a cães saudáveis;

2) Verificar a correlação entre as concentrações e expressão de HO-1 com os marcadores de estresse oxidativo, interleucina-10 (IL-10) e carga parasitária dos cães infectados;

3) Avaliar o papel da HO-1 sobre a resposta proliferativa dos linfócitos de linfonodo de cães infectados:

3.1) Pela avaliação do efeito da indução e inibição da enzima na resposta linfoproliferativa;

3.2) Pela avaliação da produção de IL-2, IL-10 e IFN-gama frente ao estímulo de antígeno solúvel de *Leishmania infantum* na presença de indutor e inibidor de HO-1;

3.3) Pela correlação entre HO-1 e taxa de proliferação celular;

3 Revisão de literatura

3.1 Considerações gerais sobre a leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a leishmaniose é considerada uma enfermidade emergente e negligenciada. É endêmica em 98 países e 90% dos casos concentram-se em Bangladesh, Sudão, Nepal, Índia e Brasil (WHO, 2015), causando de 20 a 50 mil mortes por ano no mundo (ALVAR et al., 2012).

O primeiro caso humano da doença nas Américas foi relatado no Paraguai em um paciente proveniente de Corumbá-MS (MIGONE, 1913). Em 1934 houve os primeiros relatos no Brasil de pacientes com suspeita de febre amarela (PENNA, 1934). A incidência da doença no país tem crescido bastante nas últimas três décadas, o que tem sido atribuído a mudanças na epidemiologia da doença, fenômeno descrito como urbanização da doença. A LV que antes era considerada uma doença tipicamente rural, hoje tem sua maior incidência em grandes áreas urbanas (COSTA, 2008; HARHAY et al., 2011).

No Brasil, essa zoonose é causada pelo protozoário *L. infantum* (sinônimo *L. chagasi*) e transmitida pelos mosquitos fêmeas da família Phlebotominae e gênero *Lutzomyia* spp. Existem dois ciclos da doença: o silvestre, mantido por

canídeos selvagens como a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o urbano, cujo principal reservatório é o cão doméstico (*Canis familiaris*) (LAINSON, 1983; LAINSON; RANGEL, 2005). O cão é especialmente importante na manutenção da doença, uma vez que o homem é considerado hospedeiro acidental e até o momento não existem evidências de que a infecção humana seja capaz de manter a transmissão da LV (LAINSON, 1983; LAINSON; RANGEL, 2005).

A *Leishmania* spp. possui um ciclo de vida digenético. As formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro vertebrado pelos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. Essa forma do parasito é flagelada e é rapidamente fagocitada pelos fagócitos do hospedeiro (KAYE; SCOTT, 2011). A infecção é estabelecida no interior dos macrófagos, onde as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas (FARIA et al., 2012). As formas amastigotas do protozoário passam a se multiplicar no interior dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos por divisão binária, causando o rompimento das células parasitadas. Formas amastigotas circulantes no sangue podem ser ingeridas por flebotomíneos fazendo repasto sanguíneo, iniciando novamente o ciclo (WAKELIN, 1996).

O aumento dos casos de LV em humanos tem sido relacionado ao aumento dos casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (COURA-VITAL et al., 2011; NUNES et al., 2010). A característica dos cães que favorece a maior taxa de disseminação da doença é o intenso parasitismo cutâneo, facilitando a infecção do vetor (VERÇOSA et al., 2012).

No cão, a doença foi primeiramente descrita em 1908 na Tunísia, sendo causada por *L. infantum* (NICOLLE; COMTE, 1908). Nessa espécie, caracteriza-se por uma doença sistêmica que pode afetar qualquer órgão, tecido ou fluido biológico, manifestando sinais clínicos não específicos, mas característicos da infecção. Os sinais clínicos mais comuns observados durante o exame físico são: lesões de pele, linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva, atrofia muscular, intolerância ao exercício, diminuição de apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogrifose,

claudicação, febre, vômito e diarreia (BANETH et al., 2008; CIARAMELLA et al., 2005; KOUTINAS et al., 1999).

Recentemente, um grupo de especialistas criou o *LeishVet Consensus* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) para estabelecer as principais regras de diagnóstico, estadiamento e tratamento da doença na Europa. Nesse sentido, a LVC foi dividida em quatro estágios, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estadiamento da leishmaniose visceral canina proposta pelo *LeishVet Consensus* de acordo com sorologia, sinais clínicos e exames laboratoriais

Estágio clínico	Sorologia	Sinais clínicos	Achados laboratoriais
Estágio I: doença branda	Negativo a baixos títulos de anticorpos	Sinais clínicos brandos como linfadenopatia e dermatite papular	Normalmente sem alterações; perfil renal normal; ausência de proteinúria.
Estágio II: doença moderada	Títulos de anticorpos baixos a elevados	Além dos sinais do estágio I, também aparecem lesões cutâneas como dermatite esfoliativa/onicogrifose, ulcerações, anorexia, perda de peso, febre e epistaxe.	Anemia moderada não regenerativa, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia. Subestágio – (a) perfil bioquímico renal normal e ausência de proteinúria; (b) perfil bioquímico renal normal e proteinúria com UPC entre 0,5-1,0.
Estágio III: doença severa	Títulos de anticorpos moderados a altamente positivos	Sinais clínicos dos estágios I e II associados a lesões por imunocomplexos como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite.	Alterações do estágio II associadas a DRC no estágio I (UPC > 1,0) ou II (creatinina 1,4-2,0 mg/dL) segundo IRIS (2006)*.
Estágio IV: doença muito severa	Títulos de anticorpos moderados a altamente positivos	Sinais clínicos do estágio III associados a tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica, e DRC em estágio final.	Alterações do estágio II associadas a DRC no estágio III (creatinina 2-5 mg/dL) ou IV (creatinina >5 mg/dL) com síndrome nefrótica e marcante proteinúria (UPC > 5)

Adaptado de Solano-Gallego et al. (2009).

*IRIS - International Renal Interest Society (IRIS, 2006);

Abreviações: DRC, doença renal crônica; UPC, relação proteína/creatinina urinária.

Não se conhecem os mecanismos exatos que causam a susceptibilidade à infecção nos cães, mas fatores como idade, sexo, nutrição, genética do hospedeiro, presença de coinfeções e doenças concomitantes, condições imunossupressoras, microambiente de citocinas, carga parasitária, virulência das cepas de *Leishmania* spp., infecções prévias e métodos de transmissão podem polarizar as manifestações clínicas durante a infecção canina (SOLANO-

GALLEGO et al., 2009). Por isso são importantes estudos que avaliem os mecanismos fisiopatológicos da doença canina, na tentativa de entender os processos que levam à susceptibilidade canina.

3.2 Resposta imunológica na LVC

Embora a infecção canina possa se manifestar como uma doença autolimitante, subclínica, ou severa não-autolimitante, acredita-se que a imunidade protetora contra a infecção seja mantida pela imunidade celular (Th1) mediada por linfócitos T CD4+, que secretam interferon-gama (IFN-gama) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) que induzem a atividade anti-*Leishmania* de macrófagos. Enquanto a susceptibilidade à infecção está associada ao predomínio da imunidade humoral (Th2), com marcante produção de imunoglobulinas e redução da imunidade mediada por células, com resposta mista de citocinas do tipo Th1 e Th2 (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008).

A resposta Th1 é induzida principalmente por IL-12, responsável por estimular a síntese de INF-gama pelos linfócitos T CD4+ e conferir proteção contra infecção (TRIPATHI et al., 2007). Já a resposta Th2 é estimulada principalmente pela secreção de IL-4, que causa a secreção de citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento beta (TGF-beta) (ALEXANDER; BRYSON, 2005; TRIPATHI et al., 2007). A susceptibilidade à infecção tem sido atribuída à predominância de IL-4, reduzindo os efeitos das citocinas Th1, tais como IL-12 e IFN-gama, que diminuem a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos, impedindo a destruição do parasito (ALEXANDER et al., 1999). A IL-2 atua principalmente estimulando a proliferação celular de linfócitos T mediada por ativação antigênica, sendo produzida principalmente por linfócitos T CD4+ e é responsável por ativar linfócitos T CD8+ (BACHMANN; OXENIUS, 2007).

A principal causa de morte de cães com LV é a doença renal crônica (DRC) causada por glomerulonefrite resultante da deposição de imunocomplexos nos glomérulos. Esse achado está associado ao aumento da imunidade humoral, induzida por citocinas do tipo Th2, que por não terem efeito

protetor, acabam contribuindo para maior carga parasitária desses animais (COSTA et al., 2003).

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A ausência de resposta dos linfócitos T aos antígenos de *Leishmania* spp. é observada tanto *in vitro* (MORENO et al., 1999) como *in vivo*, com teste de Montenegro negativo (DOS-SANTOS et al., 2008). Em cães infectados com *L. infantum*, ocorre redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU et al., 1997) e desorganização da polpa branca do baço (SANTANA et al., 2008). A imunossupressão associada à infecção crônica ocorre devido a altas taxas de apoptose dos linfócitos T e esse mecanismo pode contribuir para a desorganização da polpa branca do baço e diminuição dos linfócitos T no sangue periférico (LIMA et al., 2012) pelo envolvimento de moléculas como sFAS/sFAS-L (PEROSSO et al., 2014), PD-1 e PDL-1/PDL-2 (CHIKU et al., 2016).

Os macrófagos também têm papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp., pois são as células-alvo do parasita e, além disso, desencadeiam a resposta adaptativa. O linfócito T responde ao antígeno pela ligação do seu receptor TCR ao MHC associado ao peptídeo antigênico no macrófago. A função efetora desta interação é determinada por sinais adicionais, com ligação de moléculas co-estimulatórias sobre a superfície dos linfócitos T e seus ligantes nas células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas e o próprio macrófago. Dependendo da natureza e magnitude desses sinais, o linfócito produzirá citocinas ou desenvolverá funções regulatórias ou citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007).

Os sinais co-estimulatórios são mediados pelas moléculas pertencentes à família B7-CD28, as quais transmitem sinais ativadores (CD28) ou inibidores (CTLA-4, CD152) para os linfócitos T (GREENWALD et al., 2005). Em macrófagos infectados por *Leishmania* spp., além de ocorrer falha no processo de apresentação de antígenos, a avaliação da expressão das moléculas co-estimulatórias indicou diminuição na expressão de moléculas da família B7, reduzindo a proliferação dos linfócitos T (PINELLI et al., 1999). Além disso, já foi

observado que o próprio parasito e seus antígenos podem inibir a expressão de co-estimuladores e diminuir a produção de óxido nítrico (NO) (DIAZ et al., 2012).

Citocinas como IFN-gama e IL-10 têm sido avaliadas por influenciarem a replicação da *Leishmania* spp. nos macrófagos (WALKER et al., 1999). A IL-10 é uma das principais citocinas Th2 e atua como supressora na LVC (CORRÊA et al., 2007), sendo demonstrada inclusive correlação positiva entre IL-10 e a carga parasitária (MICHELIN et al., 2011). IL-2 e IFN-gama, citocinas Th1 envolvidas no processo de linfoproliferação, estão reduzidas em cães suscetíveis e já foi observado *in vitro* que cães sintomáticos apresentam um déficit de resposta linfoide concomitante à redução de IFN-gama, que foi revertido na presença de IL-2 e IFN-gama (CARVALHO et al., 1994). Cães nos estágios mais avançados da doença (severo e muito severo) são mais propensos a desenvolver anergia de linfócitos T, e também respondem aos antígenos de *Leishmania* spp. com menor produção de IFN-gama (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). O IFN-gama também atua em sinergismo com o TNF-alfa para produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (LIEW et al., 1990), uma vez que o TNF-alfa está envolvido na ativação dos macrófagos para produção de ERO, contribuindo para destruição do parasito (TUMANG et al., 1994).

3.3 Estresse oxidativo na LVC

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

O estresse oxidativo pode ser definido como o aumento da produção de radicais livres, resultando em danos teciduais (PEAKE; SUZUKI, 2004). Instala-se pelo esgotamento das defesas antioxidantes celulares, na tentativa de eliminar as ERO produzidas em excesso. Assim, quando os agentes pró-oxidantes superam as defesas antioxidantes do organismo, instala-se o estresse oxidativo propriamente dito (BUTTKE; SANDSTROM, 1994). Tal desordem orgânica pode ser desencadeada após ativação exagerada da produção de ERO

pelas células de defesa, conforme já observado em macrófagos de pacientes humanos infectados (LUZ et al., 2012) e em neutrófilos de cães infectados (ALMEIDA et al., 2013a, 2013b). Nesse sentido, estudos recentes têm evidenciado a disfunção neutrofílica na LVC (ALMEIDA et al., 2013a, 2013b; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010) e sua associação com o estresse oxidativo em cães com LVC (ALMEIDA et al., 2013a).

O sistema de defesa endógeno contra agentes oxidantes é constituído por vitaminas antioxidantes (vitaminas A, C e E), ácido úrico, glutathione, bilirrubinas, albumina e por enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase (YU, 1994). Tais componentes plasmáticos atuam na defesa antioxidante intracelular eliminando superóxido, hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo as reações em cadeia dessas ERO que oxidam os substratos e componentes celulares (JI, 1995).

Dentre as substâncias plasmáticas antioxidantes, a glutathione é a defesa antioxidante não enzimática mais importante, existindo em grandes quantidades no organismo. Esse antioxidante age na eliminação de peróxidos e na regeneração de importantes antioxidantes como o α -tocoferol e o ácido ascórbico (JONES, 2002).

O ácido úrico é outro antioxidante não enzimático que pode proteger o organismo contra o estresse oxidativo, atuando na eliminação de ERO e radicais hidroxila (BECKER, 1993).

A bilirrubina atua como um potente antioxidante em situações de estresse oxidativo devido à capacidade de eliminar ERO, prevenir a peroxidação lipídica, desativar o radical hidroxil e proteger as células de altas concentrações de peróxido de hidrogênio (MACLEAN et al., 2007). Sua função antioxidante se deve também à ampliação do ciclo em que a bilirrubina é oxidada de volta a biliverdina e, então, é reciclada novamente à bilirrubina via biliverdina redutase (AGUIAR et al., 2006).

A ferritina atua como antioxidante ao se ligar ao ferro livre, visto que o excesso de ferro atua como agente oxidante e causa danos ao DNA, com potente efeito citotóxico (HORI et al., 2010).

Além dessas substâncias que atuam como antioxidantes, a capacidade antioxidante total (CAT) também pode ser determinada. A CAT mensura todas as substâncias antioxidantes presentes no plasma e a interação entre elas, obtendo-se assim, o status antioxidante do indivíduo (EREL, 2004).

A capacidade oxidante total (COT) diz respeito ao conjunto das substâncias plasmáticas que atuam como agentes pró-oxidantes, favorecendo o estresse oxidativo (EREL, 2005).

A peroxidação lipídica ocorre como resultado do estresse oxidativo, em que as ERO danificam os ácidos graxos insaturados da camada lipídica celular dos diversos tecidos orgânicos (PRYOR et al., 1976). A peroxidação lipídica pode ser mensurada pela dosagem direta do malondialdeído, resultado da peroxidação lipídica, ou indiretamente por meio da dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DEVASAGAYAM et al., 2003).

O estresse oxidativo parece estar envolvido na patogenia da LV, levando ao desenvolvimento de sinais clínicos e alterações laboratoriais como a anemia, frequentemente observada na doença. Tem sido sugerido que as ERO lesionam as membranas celulares eritrocitárias, causando peroxidação lipídica e predispondo essas células à apoptose (BRITTI et al., 2008; NEUPANE et al., 2008; SAMANTA et al., 2012), o que favoreceria a liberação do heme, substância com capacidade pró-oxidante.

3.4 A relação entre o estresse oxidativo e a heme oxigenase-1

Dentre os agentes antioxidantes, a enzima heme oxigenase-1 (HO-1) tem ganhado destaque, principalmente pelo efeito imunorregulatório (SOARES et al., 2009) e potencial efeito terapêutico (SOARES; BACH, 2009). A HO-1 é codificada pelo gene *Hmox1* e tem sua expressão aumentada sob condições de estresse, como o estresse oxidativo (SOARES et al., 2009).

Ainda não está completamente elucidada a razão pela qual as células respondem ao estresse oxidativo com aumento de HO-1. É possível que o aumento do metabolismo do heme, substância citotóxica oxidante, seja a causa principal, uma vez que células que não expressam o gene *Hmox1* apresentam

efeitos citotóxicos decorrentes de estresse oxidativo (POSS; TONEGAWA, 1997).

A ativação do gene *Hmox1* parece ser dependente da inibição de Bach1, um repressor transcricional capaz de se ligar a vários elementos responsivos ao estresse na região promotora de *Hmox1*, inibindo sua transcrição. O heme induz a ativação da transcrição de *Hmox1* por se ligar ao Bach1, induzindo mudanças conformacionais em Bach1 e impedindo sua ligação aos elementos responsivos ao estresse e possibilitando a ativação de *Hmox1* pela ação do fator de transcrição responsivo ao estresse oxidativo Nrf2 (GOZZELINO et al., 2010).

Logo, a HO-1 atua inibindo o efeito pró-oxidante do heme livre no organismo, evitando danos a células e tecidos por bloquear o estresse oxidativo, citotoxicidade e inflamação (FERREIRA et al., 2008). Um dos papéis da HO-1 no organismo é manter a homeostasia e, sob condições homeostáticas, a haptoglobina é responsável pela ligação à hemoglobina livre, impedindo a formação de heme livre. O complexo estável entre haptoglobina e hemoglobina é reconhecido e internalizado por macrófagos esplênicos se ligando ao receptor CD163 dessas células. A forma solúvel do receptor CD163 (sCD163) é um substituto para expressão do receptor celular e está elevado também em diversas condições inflamatórias (BURDO et al., 2011; FUNDING et al., 2005), inclusive LV em humanos (SCHAER et al., 2005). Uma vez internalizado, o complexo hemoglobina-haptoglobina é quebrado e o heme da hemoglobina é metabolizado pela HO-1 (KRISTIANSEN et al., 2001). Existem evidências de que citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 podem estimular a expressão de CD163 em macrófagos (SULAHIAN et al., 2000), o que poderia contribuir para reduzir a inflamação causada pelo heme livre.

O grupo heme, após ser internalizado pelos macrófagos, 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 a enzima exerce e aos seus metabólitos que têm grande capacidade antioxidante: o Fe induz a produção de ferritina, que possui efeito antioxidante (BALLA et al., 1992); a biliverdina é rapidamente

convertida em bilirrubina que também possui efeito cito-protetor (STOCKER et al., 1987); e o CO também é cito-protetor (BROUARD et al., 2000) e anti-inflamatório (OTTERBEIN et al., 2003).

Existem outras isoformas da HO, como a HO-2, uma enzima não induzível como a HO-1, sendo expressa constitutivamente. Devido a essa característica, a HO-1 tem sido mais estudada nas condições patológicas, existindo poucos estudos sobre HO-2 no desfecho das condições patológicas (SOARES; BACH, 2009), sendo que a maioria envolve modelos experimentais com roedores (DORÉ et al., 1999; QU et al., 2007; SETA et al., 2006; WANG et al., 2006).

O efeito imunorregulatório e anti-inflamatório da HO-1 vem principalmente de observações em ratos e com deficiência na expressão do gene *Hmox1*, observando leucocitose, aumento de IgM, acúmulo de polimorfonucleares e monócitos/macrófagos no baço e em tecidos não linfoides, além de lesão oxidativa tecidual generalizada (SOARES et al., 2009).

Parte desse efeito inflamatório decorrente da ausência de HO-1 pode ser devido à ação pró-inflamatória que o próprio heme livre exerce sobre macrófagos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio do estímulo do receptor do tipo *Toll-4* (TLR-4) nessas células (FIGUEIREDO et al., 2007). Acredita-se que o mecanismo imunorregulatório da HO-1 nos macrófagos seja devido à utilização do TLR-4 pelo heme, de forma que outras substâncias que utilizam o mesmo receptor para ativação celular, como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (OTTERBEIN et al., 2003) e mesmo outros agentes anti-inflamatórios como IL-10 (LEE; CHAU, 2002) deixam de exercer sua função quando essa via foi previamente estimulada. Além disso, a indução farmacológica da HO-1 inibe a atividade de subunidades da NADPH oxidase, reduzindo a produção de ERO nos macrófagos e reduzindo o estresse oxidativo (TAILLÉ et al., 2004).

Além do efeito imunorregulatório sobre os macrófagos, a HO-1 também parece inibir a ativação, proliferação e/ou função de linfócitos T (SOARES et al., 2009). Em humanos, foi observado que o efeito imunorregulatório da indução da expressão de HO-1 deve-se à inibição dos linfócitos T *helper* CD4+, além do fato

de que os próprios subprodutos da enzima podem inibir a ativação e/ou induzir a apoptose dos linfócitos T (PAE et al., 2004). O aumento de HO-1 ainda afeta a proliferação celular por inibir a maturação de células dendríticas e secreção de citocinas pró-inflamatórias (CHAUVEAU et al., 2005; MOREAU et al., 2009), mantendo a capacidade das células de produzir citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (CHAUVEAU et al., 2005).

Já a inibição de HO-1 foi capaz de induzir maturação, proliferação e ativação de linfócitos T *naive* (BURT et al., 2010). O heme livre parece exercer potencial mitógeno sobre linfócitos T *in vitro* (STENZEL et al., 1981), promovendo ativação dessas células (COOPER et al., 1988). Esses achados demonstram que a ativação excessiva de HO-1 poderia contribuir para menor resposta imunológica celular devido à sua ação anti-inflamatória, contribuindo para redução da linfoproliferação em condições infecciosas como a LV.

Outros estudos avaliando o efeito imunorregulatório da HO-1 têm demonstrado que quando a enzima é inibida com dicloreto de estanho(IV)-mesoporfirina IX (SnMsP), ocorre aumento da proliferação inespecífica de linfócitos T CD3+ (BUNSE et al., 2015; BURT et al., 2010), devido a mudanças fenotípicas nos linfócitos e nos monócitos, melhorando a apresentação antigênica via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) tipo I e II (BURT et al., 2010). A inibição de HO-1 também aumentou a expressão de moléculas co-estimulatórias nos monócitos, como CD86 (B7-2), importante para ativação de linfócitos dependente da interação TCR-MHC. Além disso, foi observado que a SnMsP também bloqueou a atividade inibitória de linfócitos Treg sobre a proliferação celular (BURT et al., 2010) e aumentou a quantidade de células de memória (BUNSE et al., 2015; BURT et al., 2010).

A inter-relação existente entre HO-1 e IL-10 tem sido demonstrada em macrófagos humanos e murinos, em que parte do efeito anti-inflamatório da enzima parece ser dependente dessa citocina. Estudos demonstraram que a IL-10, além do estresse oxidativo, também é capaz de induzir a expressão de HO-1. Entretanto, não foi observada correlação entre expressão e atividade de HO-1 com os efeitos anti-inflamatórios de IL-10 (RICCHETTI et al., 2004). Essa ação

anti-inflamatória promovida pela IL-10 parece ser importante para o metabolismo da hemoglobina pela HO-1 nos macrófagos. Tem sido demonstrado que o complexo hemoglobina-haptoglobina internalizado pelos macrófagos via CD163 estimula a secreção de IL-10 e ativa a expressão de HO-1, enquanto a HO-1 metabolizaria o heme proveniente da hemoglobina, a IL-10 exerceria ação anti-inflamatória com objetivo de proteger a célula de lesão oxidativa. Além disso, é possível que a própria IL-10 amplifique a remoção de hemoglobina-haptoglobina por uma alça de retroalimentação positiva estimulando a síntese de CD163 em macrófagos (PHILIPPIDIS et al., 2004).

Uma vez que IL-10 pode estimular a síntese de CD163, e esse receptor também está presente em sua forma solúvel, já foi demonstrado que macrófagos ativados co-cultivados com linfócitos T CD4+ causaram menor proliferação dessas células, o que foi atribuído à maior produção de sCD163, demonstrando uma possível ação anti-inflamatória desse receptor. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela menor proliferação dos linfócitos T ainda precisam ser investigados (HÖGGER; SORG, 2001).

A HO-1 possui papel central no restabelecimento da homeostase em diversas condições patológicas e a ausência de expressão da enzima pode piorar o quadro patológico de diversas doenças inflamatórias como choque endotoxêmico, injúria de isquemia-reperfusão, dentre outras (SOARES et al., 2009). O papel da HO-1 tem sido investigado em diversas doenças inflamatórias e infecciosas, como tuberculose (KUMAR et al., 2008; SHILOH et al., 2008), doenças fúngicas (PENDRAK et al., 2004) e em doenças virais como hepatite (PROTZER et al., 2007) e HIV (DEVADAS; DHAWAN, 2006).

Em se tratando de doenças infecciosas parasitárias, o papel da HO-1 tem sido bem investigado na malária, apresentando resultados divergentes. Em estudos humanos, constatou-se que altas concentrações da enzima determinam maior susceptibilidade à infecção (MENDONÇA et al., 2012), enquanto em modelos experimentais murinos, a maior atividade da enzima está relacionada à maior resistência ao desenvolvimento da forma cerebral da doença (PAMPLONA et al., 2007).

Em humanos e camundongos a malária induz o aumento de HO-1 (MENDONÇA et al., 2012; SCHLUESENER et al., 2001). Diferentes espécies de *Plasmodium* spp. aumentam a expressão de HO-1 no cérebro e fígado de camundongos infectados experimentalmente (EIPHANIO et al., 2008; SEIXAS et al., 2009). Camundongos Balb/c expressam maiores quantidades de HO-1 quando comparados à linhagem C57BL/6, sendo que a menor expressão da enzima parece contribuir para a maior susceptibilidade da linhagem C57BL/6 ao desenvolvimento da forma cerebral da malária durante a infecção por *P. berghei* (PAMPLONA et al., 2007).

Outros estudos demonstraram que a HO-1 é protetora também na forma não cerebral da malária (SEIXAS et al., 2009). Uma vez que o TNF-alfa desempenha um papel deletério nas diversas formas de malária grave (ANDRADE et al., 2010; SINHA et al., 2008), camundongos infectados por *P. chabaudi* têm altas concentrações de TNF-alfa e heme livre plasmáticos, desenvolvendo uma forma letal de falência hepática associada com a morte celular disseminada. A neutralização de TNF-alfa, com anticorpo monoclonal, ou do heme, pela indução de HO-1, foi capaz de proteger os hepatócitos da morte celular e suprimir a falência hepática nesse modelo experimental de malária (SEIXAS et al., 2009).

Estudos avaliando o papel na HO-1 na leishmaniose são escassos e os existentes foram realizados em humanos e modelos murinos (DAS et al., 2013; EL FADILI et al., 2008; LUZ et al., 2012; PHAM et al., 2005), não existindo até o momento estudos elucidando o papel da enzima na LVC.

Em modelos murinos de infecção da LV, foi observado que tanto a infecção por promastigotas quanto o lipofosfoglicano (LPG) isolado de formas promastigotas de *L. infantum* ativaram a produção de HO-1 por macrófagos e que a cobalto protoporfirina IX (CoPP), um indutor de HO-1, aumentou a carga parasitária de macrófagos humanos e murinos. Ainda segundo o mesmo estudo, ao se avaliar o papel da HO-1 na regulação de mediadores pró-inflamatórios em culturas celulares de macrófagos, foi observado que a indução de HO-1 com CoPP reduziu a produção de TNF-alfa sem alteração de IL-10. Os autores

concluíram que a HO-1 promove a sobrevivência de *Leishmania* spp. nos macrófagos por meio da inibição da inflamação e do estresse oxidativo (LUZ et al., 2012).

O efeito antioxidante exercido pela HO-1 parece ser deletério na LV, uma vez que camundongos exauridos de *Hmox1* apresentaram menor carga parasitária em macrófagos que os do tipo selvagem. O efeito antioxidante da enzima seria deletério na leishmaniose por proteger o parasita contra os agentes oxidantes produzidos pelos fagócitos do hospedeiro, uma vez que o aumento de HO-1 induzido pela CoPP causou redução de ERO e de TNF-alfa em macrófagos murinos, além de aumentar a Cu/Zn superóxido dismutase em macrófagos humanos, contribuindo para o aumento da carga parasitária nessas células (LUZ et al., 2012).

Em um outro estudo com LV causada por *L. donovani* em humanos sintomáticos, foi observado aumento de HO-1 no baço e células mononucleares de sangue periférico, de forma que o aumento de HO-1 esplênica se correlacionou positivamente com a carga parasitária nesse órgão. As concentrações de bilirrubina, subproduto de HO-1, e sorbitol desidrogenase (SOD) também estavam aumentadas, enquanto a produção de ROS e glutathione peroxidase (GPx) estavam diminuídas nesses pacientes sintomáticos. Assim, os autores concluíram que a indução de HO-1 permite a sobrevivência do parasito no hospedeiro pelo aumento de SOD e redução de GPx, o que prejudica a produção de ERO devido à ação antioxidante dessas enzimas (DAS et al., 2013).

A redução de ERO em macrófagos parasitados se deve à utilização do heme pela HO-1, uma vez que o heme exerce papel fundamental da ativação da NADPH oxidase ao ativar subunidades da enzima. Confirmando tal achado, foi observado que a utilização do inibidor de HO-1 SnMsP aumentou a produção de superóxido em macrófagos com formas amastigotas do parasito, enquanto o uso de ativadores da enzima inibiu a produção de superóxido nessas células (PHAM et al., 2005).

Além disso, a HO-1 parece estar associada à susceptibilidade de humanos a LV. Estudos *in vivo* demonstraram elevadas concentrações séricas

de HO-1 em humanos sintomáticos com LV causada por *L. infantum* (LUZ et al., 2012) e *L. donovani* e que estes valores reduziram significativamente após o tratamento da doença com miltefosina (DAS et al., 2013) e antimoniato de meglumina (LUZ et al., 2012).

REFERÊNCIAS

AGUIAR, C.; FALCÃO, M.; RAMOS, J. Estresse oxidativo no recém-nascido: a bilirrubina como antioxidante. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 24, n. 4, p. 363–366, 2006.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993–3002, 1999.

ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; BOSCO, A. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 6–12, 2013b.

ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013a.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M. et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e650, 2010.

- BACHMANN, M. F.; OXENIUS, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. **EMBO Reports**, v. 8, n. 12, p. 1142–1148, 2007.
- BALLA, G.; JACOB, H. S.; BALLA, J. et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 18148–18153, 1992.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BECKER, B. F. Towards the physiological function of uric acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 6, p. 615–631, 1993.
- BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 63–66, 2004.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J. P. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 345–351, 1997.
- BRITTI, D.; SCONZA, S.; MORITTU, V. M. et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood of dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 251–254, 2008.
- BROUARD, S.; OTTERBEIN, L. E.; ANRATHER, J. et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1015–1026, 2000.
- BUNSE, C. E.; FORTMEIER, V.; TISCHER, S. et al. Modulation of heme oxygenase-1 by metalloporphyrins increases anti-viral T cell responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 179, n. 2, p. 265–276, 2015.

BURDO, T. H.; LENTZ, M. R.; AUTISSIER, P. et al. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 154–163, 2011.

BURT, T. D.; SEU, L.; MOLD, J. E. et al. Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5279–5288, 2010.

BUTTKE, T. M.; SANDSTROM, P. A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. **Immunology Today**, v. 15, n. 1, p. 7–10, 1994.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; et al. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 12, p. 5949–5956, 1994.

CHAUVEAU, C.; RÉMY, S.; ROYER, P. J. et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1694–1702, 2005.

CHIKU, V. M.; SILVA, K. L. O.; DE ALMEIDA, B. F. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879–888, 2016.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465–467, 2005.

COOPER, H. M.; CORRADIN, G.; PATERSON, Y. The heme moiety of cytochrome C is an autoreactive Ir gene-restricted T cell epitope. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 3, p. 1127–1143, 1988.

CORRÊA, A. P. F. L.; DOSSI, A. C. S.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. et al. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3, p. 267–274, 2007.

- COSTA, C. H. N. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2959–2963, 2008.
- COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B. et al. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 677–684, 2003.
- COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.
- DAS, S.; PANDEY, K.; RABIDAS, V. N. et al. Effectiveness of miltefosine treatment in targeting anti-leishmanial HO-1/Nrf-2-mediated oxidative responses in visceral leishmaniasis patients. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 9, p. 2059–2065, 2013.
- DEVADAS, K.; DHAWAN, S. Hemin activation ameliorates HIV-1 infection via heme oxygenase-1 induction. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 7, p. 4252–4257, 2006.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; BOLOOR, K. K.; RAMASARMA, T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 40, n. 5, p. 300–308, 2003.
- DIAZ, S.; FONSECA, I. P. DA; RODRIGUES, A. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p. 137–144, 2012.
- DORÉ, S.; SAMPEI, K.; GOTO, S. et al. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 10, p. 656–663, 1999.

DOS-SANTOS, W. L. C.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3, p. 251–259, 2008.

EL FADILI, K.; IMBEAULT, M.; MESSIER, N. et al. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 526–533, 2008.

EPIPHANIO, S.; MIKOLAJCZAK, S. A.; GONÇALVES, L. A. et al. Heme oxygenase-1 is an anti-inflammatory host factor that promotes murine plasmodium liver infection. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 5, p. 331–338, 2008.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 930257, 2012.

FERREIRA, A.; BALLA, J.; JENEY, V. et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? **Journal of Molecular Medicine**, v. 86, n. 10, p. 1097–1111, 2008.

FIGUEIREDO, R. T.; FERNANDEZ, P. L.; MOURAO-SA, D. S. et al. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 28, p. 20221–20229, 2007.

FUNDING, M.; VORUM, H.; NEXO, E. et al. Soluble CD163 and interleukin-6 are increased in aqueous humour from patients with endothelial rejection of corneal grafts. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 83, n. 2, p. 234–239, 2005.

- GÓMEZ-OCHOA, P.; LARA, A.; COUTO, G. et al. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1, p. 135–138, 2010.
- GOZZELINO, R.; JENEY, V.; SOARES, M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 323–354, 2010.
- GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 515–548, 2005.
- HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.
- HÖGGER, P.; SORG, C. Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 4, p. 841–843, 2001.
- HORI, A.; MIZOUE, T.; KASAI, H. et al. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. **Cancer Science**, v. 101, n. 2, p. 517–522, 2010.
- INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). **IRIS staging of chronic renal disease**. 2006. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml> Acesso em: 13 Jul. 2016.
- JI, L. Oxidative stress during exercise: Implication of antioxidant nutrients. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1079–1086, 1995.
- JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. **Methods in Enzymology**, v. 348, p. 93–112, 2002.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–383, 1999.

KRISTIANSEN, M.; GRAVERSEN, J. H.; JACOBSEN, C. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198–201, 2001.

KUMAR, A.; DESHANE, J. S.; CROSSMAN, D. K. et al. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 26, p. 18032–18039, 2008.

LAINSON, R. The american leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 5, p. 569–596, 1983.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of american visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

LEE, T. S.; CHAU, L. Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 240–246, 2002.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990.

LIMA, V. M. F. DE; FATTORI, K. R.; DE SOUZA, F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2, p. 147–153, 2012.

LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FEIJÓ, D. F.; et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4460–4467, 2012.

MACLEAN, P. D.; DRAKE, E. C.; ROSS, L. et al. Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 4, p. 600–609, 2007.

MENDONÇA, V. R. R.; LUZ, N. F.; SANTOS, N. J. G. et al. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1445–1454, 2012.

MICHELIN, A.; PERRI, S. H. V.; DE LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 373–383, 2011.

MOREAU, A.; HILL, M.; THÉBAULT, P. et al. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. **FASEB Journal**, v. 23, n. 9, p. 3070–3077, 2009.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C. et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, n. 3-4, p. 181–195, 1999.

MIGONE, L. E. Un cas de kala-azar á Asuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 6, n. 2, p. 118–120, 1913.

NEUPANE, D. P.; MAJHI, S.; CHANDRA, L. et al. Erythrocyte glutathione status in human visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 95–97, 2008.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du Kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 1, p. 299–301, 1908.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1, p. 131–133, 2010.

- OTTERBEIN, L. E.; SOARES, M. P.; YAMASHITA, K. et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 449–455, 2003.
- PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M. et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4744–4751, 2004.
- PAMPLONA, A.; FERREIRA, A.; BALLA, J. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature Medicine**, v. 13, n. 6, p. 703–710, 2007.
- PEAKE, J.; SUZUKI, K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. **Exercise Immunology Review**, v. 10, p. 129–141, 2004.
- PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, n. 2, p. 148–156, 2004.
- PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Médico**, v. 48, p. 949–950, 1934.
- PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN, L.; PARDOLL, D. M. et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 45, p. 17765–17770, 2007.
- PEROSSO, J.; SILVA, K. L. O.; FERREIRA, S. Í. DE S. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3, p. 417–423, 2014.
- PHAM, N.-K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322–8333, 2005.

PHILIPPIDIS, P.; MASON, J. C.; EVANS, B. J. et al. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. **Circulation Research**, v. 94, n. 1, p. 119–126, 2004.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M. 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. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999.

POSS, K. D.; TONEGAWA, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10925–10930, 1997.

PROTZER, U.; SEYFRIED, S.; QUASDORFF, M. et al. Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. **Gastroenterology**, v. 133, n. 4, p. 1156–1165, 2007.

PRYOR, W. A.; STANLEY, J. P.; BLAIR, E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. **Lipids**, v. 11, n. 5, p. 370–379, 1976.

QU, Y.; CHEN-ROETLING, J.; BENVENISTI-ZAROM, L. et al. Attenuation of oxidative injury after induction of experimental intracerebral hemorrhage in heme oxygenase-2 knockout mice. **Journal of Neurosurgery**, v. 106, n. 3, p. 428–435, 2007.

RICCHETTI, G. A.; WILLIAMS, L. M.; FOXWELL, B. M. J. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 3, p. 719–726, 2004.

SAMANTA, S.; GHOSHAL, A.; BHATTACHARYA, K. et al. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. **PloS One**, v. 7, n. 7, p. e42361, 2012.

SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L. A. R. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, 2008.

SCHAER, D. J.; SCHLEIFFENBAUM, B.; KURRER, M. et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. **European Journal of Haematology**, v. 74, n. 1, p. 6–10, 2005.

SCHLUESENER, H. J.; KREMSNER, P. G.; MEYERMANN, R. Heme oxygenase-1 in lesions of human cerebral malaria. **Acta Neuropathologica**, v. 101, n. 1, p. 65–68, 2001.

SEIXAS, E.; GOZZELINO, R.; CHORA, A. et al. Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15837–15842, 2009.

SETA, F.; BELLNER, L.; REZZANI, R. et al. Heme oxygenase-2 is a critical determinant for execution of an acute inflammatory and reparative response. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, p. 1612–1623, 2006.

SHILOH, M. U.; MANZANILLO, P.; COX, J. S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* senses host-derived carbon monoxide during macrophage infection. **Cell Host & Microbe**, v. 3, n. 5, p. 323–330, 2008.

SINHA, S.; MISHRA, S. K.; SHARMA, S. et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. **Malaria Journal**, v. 7, p. 13, 2008.

SOARES, M. P.; BACH, F. H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 2, p. 50–58, 2009.

SOARES, M. P.; MARGUTI, I.; CUNHA, A. et al. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 482–489, 2009.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; ORDEIX, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 317, 2016.

STENZEL, K. H.; RUBIN, A. L.; NOVOGRODSKY, A. Mitogenic and co-mitogenic properties of hemin. **Journal of Immunology**, v. 127, n. 6, p. 2469–2473, 1981.

STOCKER, R.; YAMAMOTO, Y.; MCDONAGH, A. F. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science**, v. 235, n. 4792, p. 1043–1046, 1987.

SULAHIAN, T. H.; HÖGGER, P.; WAHNER, A. E. et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1312–1321, 2000.

TAILLÉ, C.; EL-BENNA, J.; LANONE, S. et al. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b558 expression via the reduction of heme availability. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 27, p. 28681–28688, 2004.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 23, p. 6388–6394, 1969.

- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.
- TUMANG, M. C.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L. L. et al. Role and effect of TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 2, p. 768–775, 1994.
- VERÇOSA, B. L. A.; MELO, M. N.; PUERTO, H. L. DEL et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2, p. 162–170, 2012.
- WAKELIN, D. **Immunity to parasites: how parasitic infections are controlled**. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1996. 224 p.
- WALKER, P. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; KRIEG, A. M. et al. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- γ -dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 12, p. 6970–6975, 1999.
- WANG, J.; ZHUANG, H.; DORÉ, S. Heme oxygenase 2 is neuroprotective against intracerebral hemorrhage. **Neurobiology of Disease**, v. 22, n. 3, p. 473–476, 2006.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2015.
- YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139–162, 1994.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 – O EFEITO DO AUMENTO DE HEME OXIGENASE-1 NA RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO

Na leishmaniose visceral canina (LVC), a resposta imunológica celular de cães infectados susceptíveis é afetada, prejudicando mecanismos como a linfoproliferação e favorecendo a persistência da infecção. Foram investigadas as concentrações e a expressão gênica de heme oxigenase-1 (HO-1), seus metabólitos e IL-10 na LVC, bem como a correlação com marcadores de estresse oxidativo, IL-10 e carga parasitária. O efeito da indução e inibição de HO-1 associado ou não ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (AgS) na resposta linfoproliferativa e produção de IL-2, IL-10 e IFN-gama em células de linfonodo de cães infectados também foi determinado. Foram selecionados 24 cães saudáveis e 20 com LVC nos estágios II e III da doença. HO-1, seus metabólitos e interleucinas foram determinados por ELISA de captura, a expressão gênica de HO-1 foi determinada por RT-PCR em tempo real, a proliferação celular de cães infectados (n=15) foi determinada *in vitro* por citometria de fluxo, determinando expressão, concentrações de HO-1 e citocinas dessas culturas. Cães com LVC apresentaram estresse oxidativo correlacionado ao aumento da expressão de HO-1. As substâncias da via metabólica da HO-1 haptoglobina, ferritina e receptor CD163 solúvel, bem como IL-10 estavam aumentadas no plasma e baço de cães infectados, com correlação positiva entre IL-10 e HO-1. A taxa de proliferação celular na presença de AgS melhorou com inibição de HO-1, concomitantemente à redução de IL-10 e IL-2. O aumento de HO-1 está associado ao estresse oxidativo e IL-10 e parece ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da imunidade celular nos cães com LVC.

Palavras-chave: Hmox, HSP32, *Leishmania infantum*, canina, linfoproliferação.

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária em ampla expansão pelo mundo, estando entre as seis doenças tropicais mais importantes segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015). No Brasil, tem sido relatado um aumento da incidência da doença nos últimos anos (ALVAR et al., 2012) e o aumento da incidência em humanos parece estar associado ao aumento da infecção canina (COURA-VITAL et al., 2011; NUNES et al., 2010), uma vez que o cão é o principal reservatório urbano da doença (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

A doença no cão susceptível é caracterizada por lesões de pele, linfadenomegalia generalizada, perda de peso progressiva com atrofia muscular e fraqueza, intolerância ao exercício, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, epistaxe, onicogrifose, vômito e diarreia (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa são importantes no desenvolvimento da infecção canina, de forma que a imunidade adaptativa parece desempenhar função mais importante. Acredita-se que a susceptibilidade no cão esteja relacionada a uma resposta imune humoral (Th2) exacerbada com redução da resposta imune celular (Th1) (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008). O aumento da produção de IL-10, importante citocina Th2, está associado a progressão da doença canina (BOGGIATTO et al., 2010), enquanto a maior produção de IFN-gama, importante citocina Th1, foi correlacionada com a menor carga parasitária sanguínea de cães doentes (SOLANO-GALLEGO et al., 2016).

Outro mecanismo importante recentemente descrito envolvido na patogenia da leishmaniose visceral canina (LVC) é o estresse oxidativo presente em animais sintomáticos (ALMEIDA et al., 2013b; BILDIK et al., 2004; HEIDARPOUR et al., 2012), fato que pode estar associado à maior produção de espécies reativas de oxigênio, conforme demonstrado em macrófagos humanos (LUZ et al., 2012) e neutrófilos caninos (ALMEIDA et al., 2013a, 2013b).

Todos os mecanismos envolvidos na susceptibilidade à LVC ainda não são completamente conhecidos, tornando o conhecimento da patogenia da

infecção na espécie canina fundamental. Recentemente foi descrito o envolvimento da enzima heme oxigenase-1 (HO-1) na susceptibilidade à infecção em humanos (LUZ et al., 2012). A HO-1 é responsável por metabolizar o heme proveniente da hemoglobina em ferro (que induz a síntese de ferritina), monóxido de carbono e biliverdina (que é prontamente convertida em bilirrubina) (TENHUNEN et al., 1969). Em condições fisiológicas, a hemoglobina proveniente da destruição eritrocitária é ligada à haptoglobina e esse complexo é internalizado por macrófagos pelo receptor CD163. O heme é então metabolizado pela HO-1 dentro do macrófago (KRISTIANSEN et al., 2001).

Estudos têm demonstrado o aumento da concentração HO-1 sérica em pessoas com LV e sua redução após o tratamento da doença, demonstrando o envolvimento da enzima na doença (LUZ et al., 2012). Além disso, tanto o lipofosfoglicano do parasito, quanto a infecção por promastigotas de *Leishmania* spp. aumentam a concentração de HO-1 macrofágica, causando persistência da infecção (LUZ et al., 2012). É possível que o mecanismo envolvido nessa persistência à infecção macrofágica envolva o sequestro do heme pela HO-1, o que impede a completa ativação da NADPH oxidase, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (PHAM et al., 2005).

A HO-1 também parece atuar nos aspectos imunorregulatórios dos linfócitos, inibindo a ativação e/ou proliferação dos linfócitos T pelo aumento da apoptose (PAE et al., 2004). Até o momento não foi determinado o envolvimento da HO-1 na resposta proliferativa de cães com LVC, porém sabe-se que cães infectados apresentam baixa resposta proliferativa (PINELLI et al., 1994) e os mecanismos possivelmente envolvidos nessa baixa resposta celular podem estar relacionados à maior apoptose de linfócitos T (CHIKU et al., 2016; LIMA et al., 2012; PEROSSO et al., 2014). Dessa forma, o conhecimento de mecanismos que melhorem a resposta proliferativa no cão é importante, uma vez que até o momento não existe tratamento completamente eficaz que elimine o parasito nessa espécie.

Visto que a HO-1 é uma enzima induzida por condições de estresse, que o estresse oxidativo está presente na LVC e que a anemia é um achado comum

nesta doença, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações e expressão gênica de HO-1 e seus metabólitos em cães infectados, determinando a correlação entre HO-1, marcadores de estresse oxidativo, IL-10 e carga parasitária. Também foi avaliado o papel regulatório da HO-1 na resposta proliferativa antígeno-específica de células de linfonodo de cães infectados, determinando o efeito da indução e inibição da enzima na resposta proliferativa e na produção de IL-10, IL-2 e IFN-gama.

2 Material e métodos

2.1 Aprovação Ética

O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos no uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-00532-2013). A participação de cada cão do grupo controle foi autorizada por seu tutor, por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

2.2 Seleção dos animais

Grupo Saudável: constituído por 24 cães de tutores que consentiram em participar do experimento, sendo 10 machos e 14 fêmeas, com idade média de 4 ± 2 anos e com padrões raciais variados. Todos os cães eram clinicamente saudáveis e foram acompanhados por três meses antes do procedimento cirúrgico. Nesse período, não apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas, não foram reagentes na sorologia por ELISA indireto e foram negativos na pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de baço e medula óssea.

Grupo Infectado: composto por 20 cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, distribuídos igualmente entre machos e fêmeas e com idade média estimada em 5 ± 2 anos e de padrões raciais variados. Os cães foram submetidos a exame clínico geral, hemograma, bioquímica plasmática e urinálise para estadiamento da LVC segundo *LeishVet Consensus* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Todos

os animais foram positivos na sorologia por ELISA indireto com antígeno bruto total de *L. infantum* segundo metodologia previamente descrita (LIMA et al., 2003) e todos positivos na amplificação do DNA de *Leishmania* spp. em amostras de baço e medula óssea (PEROSSO et al., 2014).

2.3 Colheita das amostras e análises laboratoriais

Após jejum alimentar de 8 a 12 horas, foram colhidos 21 mL de sangue por punção jugular. Destes, 20 mL foram acondicionados em tubos heparinizados (BD Vacutainer®, Franklin Lakes, NJ, EUA) e um mililitro foi acondicionado em tubo com ácido etilenodiaminotetracético dissódico (Na₂EDTA) para realização do hemograma.

O sangue heparinizado foi destinado à obtenção de plasma e isolamento das células mononucleares de sangue periférico (CMSP), pela utilização de gradiente de separação com densidade 1,077 g/mL (Histopaque-1077®, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) segundo as recomendações do fabricante.

O hemograma, as análises bioquímicas plasmáticas e a urinálise foram realizadas segundo metodologias previamente descritas (ALMEIDA et al., 2013b).

A medula óssea foi obtida da crista íliaca direita com agulhas tipo Jamshidi após a indução anestésica dos animais, sendo acondicionada com anticoagulante citrato fosfato dextrose adenina-1 (CPDA-1) (JP Ind. Farmacêutica, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na proporção de 4 partes de medula óssea para 1 parte de anticoagulante. O isolamento das células mononucleares da medula óssea (CMMO) seguiu mesmo protocolo para CMSP.

A esplenectomia parcial foi realizada por excisão cirúrgica, segundo protocolo previamente descrito (LIMA et al., 2012).

2.4 Marcadores de estresse oxidativo

A capacidade antioxidante total (CAT) foi determinada colorimetricamente pelo método de redução do cátion ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfônico]), segundo protocolo previamente descrito (EREL, 2004).

A capacidade oxidante total (COT) foi determinada colorimetricamente pelo método do laranja de xilenol, segundo protocolo previamente descrito (EREL, 2005).

A peroxidação lipídica foi determinada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia previamente descrita (HUNTER et al., 1985) com determinação da absorbância em leitor de placas automatizado (Readwell Touch, Robonik Private, Ltd., Navi Mumbai, Maharashtra, India) a 545 nm. A peroxidação lipídica foi obtida após comparação das amostras a uma curva-padrão com concentrações variando de 0 a 100 μmol de malondialdeído/L. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA).

2.5 Ensaio de linfoproliferação

O ensaio de linfoproliferação foi realizado com 15 cães do Grupo Infectado a partir de células de linfonodo (CL). Após a eutanásia, o linfonodo poplíteo direito foi retirado e macerado para obtenção das CL ($10 \times 10^6/\text{mL}$ em meio RPMI 1640 sem soro fetal bovino), que foram marcadas com fluorocromo intracitoplasmático carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster 2,5 μM (CFSE, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) por 10 minutos a 37°C, segundo as recomendações do fabricante e protocolo previamente publicado (LYONS; PARISH, 1994).

As CL marcadas com CFSE foram cultivadas em placas de cultura estéreis de 24 poços ($10 \times 10^6/\text{mL}$) sem a presença de estímulo algum (controle), na presença do indutor de HO-1 cloreto de cobalto-protoporfirina IX (CoPP) 50 μM , do inibidor de HO-1 dicloreto de estanho(IV)-mesoporfirina IX (SnMsP) 50 μM (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), de antígeno solúvel (AgS) de *L. infantum* (MHOM/BR/00/MERO2) 20 μg de proteína/mL e dos mitógenos concanavalina-A 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ConA) e fitohemaglutinina-M 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (PHA-M) (controles positivos). As CL também foram cultivadas com CoPP e SnMsP em associação de AgS. Um poço sem marcação com CFSE foi realizado para controle de marcação das células.

As CL foram cultivadas por 6 dias a 37°C e 5% de CO₂, e 10.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo capilar (BD Accuri C5 Flow Cytometer, Ann Arbor, MI, EUA). A análise foi realizada em programa computacional (BD Accuri C6 Software, v. 1.0.264.21, Ann Arbor, MI, EUA), sendo selecionada a população de células com tamanho e complexidade compatíveis com a população de linfócitos.

Ensaio paralelos foram realizados sem marcação com CFSE para determinação da expressão gênica e da concentração de HO-1 por ELISA de captura a partir de sedimentos celulares e determinação de IL-2, IFN-gama e IL-10 no sobrenadante das culturas.

O AgS foi produzido conforme protocolo previamente descrito (SCOTT et al., 1987) com as seguintes modificações: formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/00/MERO2) foram armazenadas em solução inibidora de protease (Complete, EDTA-free, Roche, Indianapolis, IN, EUA) e sonicadas. A suspensão foi centrifugada a 20.000 × G por 30 min e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 20.000 × G por 4 h. O sobrenadante da segunda centrifugação foi separado e a concentração de proteína foi mensurada pelo método do ácido bicinonínico (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), segundo recomendações do fabricante, sendo armazenado a -80°C até sua utilização.

2.6 Substâncias da via metabólica da HO-1 e interleucinas

As concentrações de HO-1, ferritina, haptoglobina e sCD163 foram determinados por ELISA de captura utilizando conjunto de reagentes comerciais específicos para a espécie canina (Novateinbio, Woburn, MA, EUA), a partir de 50 µL de plasma ou homogeneizado de baço realizado, segundo protocolo previamente descrito (CORRÊA et al., 2007).

Para determinação de HO-1 das células da linfoproliferação, CMSP e CMMO, 5x10⁶ células foram ressuspensas em 120 µL de solução tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,2) e sonicadas (2 × 20 s, 5 Watts, 4°C). Nenhuma diluição adicional das amostras foi necessária e os valores foram normalizados em

função da concentração de proteína determinada por espectrofotometria pelo método do ácido bicinconínico (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), segundo recomendações do fabricante.

As concentrações de IL-10, IL-2 e IFN-gama foram determinadas por ELISA de captura utilizando conjunto de reagentes comerciais (Canine IL-10 DuoSet; Canine IL-2 DuoSet e Canine IFN-gamma DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), segundo as recomendações do fabricante.

As concentrações de heme livre plasmático foram determinadas bioquimicamente utilizando reagente comercial (QuantiChrom™ Heme Assay Kit, BioAssay Systems, Hayward, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

2.7 Expressão gênica de HO-1

O RNA foi extraído a partir de 25 mg de baço, 5×10^6 células da linfoproliferação, CMMO e CMSP armazenados a -80°C utilizando reagentes comerciais (RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, EUA), segundo o fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, EUA) e todas as amostras apresentaram relação de absorvância 260/280 entre 1,9 e 2,2, sendo posteriormente armazenado a -80°C até o momento da reação de transcrição reversa.

A transcrição reversa (RT) foi realizada com reagente comercial (QuantiTect® Reverse Transcription Kit, Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante, a partir de 100 ng de RNA para amostras do baço e 300 ng para células da linfoproliferação, CMSP e CMMO. Para construção de uma curva-padrão, duas amostras de cada grupo experimental de cada tecido foram aleatoriamente selecionadas e a RT foi realizada a partir de 1 µg de RNA, que foram misturadas num único tubo formando um *pool* de cDNA para cada tecido analisado. O cDNA foi armazenado a -80°C até o momento das reações de amplificação.

Os oligonucleotídeos iniciadores (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA) para cada gene-alvo estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos iniciadores senso (F-*forward*) e antissenso (R-*reverse*) utilizados para determinação da expressão gênica

Gene alvo	OI	Sequência (5' → 3')	Produto (pb)	Acesso GenBank	Referência
HO-1	F	GCGTCGACTTCTTCACCTTC	195	AY563546.1	Primer 3 Plus*
	R	GGTCCTCAGTGTCCTTGCTC			
β-actina	F	CCAGCAAGGATGAAGATCAAG	100	AF021873	Peters et al., (2007)
	R	TCTGCTGGAAGGTGGACAG			
HPRT1	F	CACTGGGAAAACAATGCAGA	123	AY283372	
	R	ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAACA			

* Disponível em: www.primer3plus.com

As reações em cadeia da polimerase quantitativas em tempo real a partir da transcrição reversa (RT-qPCR) foram realizadas em termociclador (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) utilizando reagente comercial (QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit, Qiagen, Valencia, CA, EUA) e 2 µL de cDNA de amostra ou curva-padrão.

As amostras e a curva-padrão, em triplicata, foram incubadas a 95°C por 2 minutos e submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 30 s, com posterior curva de dissociação. Valores de eficiência de reação, do coeficiente de determinação e do coeficiente angular foram obtidos a partir da curva-padrão para cada gene analisado, variando de 97,4 a 101,7%, 0,994 a 0,999 e -3,386 a -3,283, respectivamente. Como controle negativo da reação foi utilizada água livre de nucleases.

A quantificação da expressão gênica foi determinada após interpolação dos *cycles threshold* (Ct) das amostras na curva-padrão e a normalização foi realizada em função da média geométrica dos genes de referência beta-actina e HPRT-1.

2.8 Carga parasitária

A carga parasitária foi determinada dos cães infectados a partir de 25 mg de tecido esplênico e 200 µL de medula óssea. A extração e quantificação do

DNA e a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foi realizada segundo protocolo previamente descrito (PEROSSO et al., 2014).

2.9 Análise estatística

Após análise das variáveis quanto à normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Teste de Bartlett), foram utilizados os testes de t não pareado ou Mann-Whitney para verificar as diferenças entre os grupos Saudável e Infectado. Para verificar o efeito dos tratamentos sobre a linfoproliferação, após análise da normalidade, foi utilizado teste de Friedman com pós teste de Dunn. As correlações foram realizadas pelo coeficiente de Spearman. Os testes foram realizados em programa específico (GraphPad Prism v.6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA, www.graphpad.com), considerando as diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Caracterização dos cães com LVC

Segundo critérios de estadiamento propostos pelo *LeishVet Consensus* (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), os cães com LVC apresentaram-se predominantemente nos estágios II (moderado) e III (severo) da doença, com sinais clínicos como linfadenomegalia, lesões cutâneas (dermatite esfoliativa/seborreica, ulcerações e onicogribose), anorexia, perda de peso e epistaxe, conforme previamente relatado (ALMEIDA et al., 2013a, 2013b). Os achados laboratoriais principais foram anemia moderada não regenerativa normocítica e hipocrômica, hiperproteinemia por hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, função renal bioquímica normal e marcante proteinúria com relação proteína/creatinina urinária (UPC) maior que 1,0 (Tabela 2). Os cães infectados também apresentaram altas titulações de anticorpos contra antígeno bruto total de *L. infantum* por ELISA indireto (Tabela 2).

Outras alterações hematológicas dos cães com LVC incluíram basofilia e neutrofilia associada ou não à leucocitose, linfopenia e eosinopenia (Tabela 2). Cães infectados apresentaram maiores atividades de AST, CK e LDH nos

exames bioquímicos que cães saudáveis, porém os mesmos ainda estavam dentro dos valores de referência para a espécie (Tabela 2).

Os cães saudáveis não apresentaram alterações clínicas (Tabela 2) e laboratoriais (Tabela 2), exceto pelo valor de creatina quinase (CK) acima da referência para a espécie segundo Kaneko et al. (2008).

3.2 Estresse oxidativo na LVC

A presença de estresse oxidativo já foi observado em cães com LVC nos estágios inicial e final da infecção (ALMEIDA et al., 2013b) e para verificar a correlação entre a HO-1 com os parâmetros de estresse oxidativo, também investigamos o estresse oxidativo de cães nos estágios II e III da doença. Foi observado marcante estresse oxidativo com diminuição dos antioxidantes albumina (Figura 1A), bilirrubinas total (Figura 1C) e indireta (Figura 1E) e da CAT (Figura 1F) e aumento da COT (Figura 1G) e peroxidação lipídica (Figura 1H) nos cães infectados. O antioxidante ácido úrico (Figura 1B) estava aumentado nos cães com LVC e não foi observada diferença quanto aos valores de bilirrubina direta (Figura 1D).

3.3 O aumento de HO-1 ocorre de forma dependente do tecido analisado

O aumento da HO-1 em pacientes com LV tem sido associado à susceptibilidade à doença em humanos (LUZ et al., 2012), porém o papel da enzima na LVC ainda não foi investigado. Nesse sentido, determinamos as concentrações e a expressão da enzima nos cães com LVC, comparando-as a cães saudáveis.

Foi observado aumento das concentrações de HO-1 no plasma, homogeneizado de baço e CMSP nos cães infectados e nenhuma diferença foi observada em relação ao homogeneizado de CMMO (Figura 2A). Foi constatado maior expressão gênica de HO-1 nas CMSP e CMMO de cães com LVC, sem diferença significativa no tecido esplênico (Figura 2B).

Tabela 2 - Parâmetros hematológicos, bioquímicos, urinários e de sorologia (média e desvio-padrão) de cães saudáveis (Saudável, n=24) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infetado, n=20)

Variável	Saudável	Infetado	p-valor	Referência
Hemograma¹				
Volume globular (%)	46,70 ± 5,60	28,45 ± 8,25	<0,0001*	37 – 55
Hemácias (x10 ¹² /L)	6,44 ± 0,88	4,44 ± 1,24	<0,0001*	5,5 – 8,5
Hemoglobina (g/dL)	15,13 ± 2,07	8,66 ± 2,71	<0,0001*	12 – 18
VCM (fL)	72,64 ± 2,80	63,85 ± 4,52	<0,0001*	60 – 77
CHCM (%)	32,37 ± 1,66	30,29 ± 1,55	0,0001**	32 – 36
Leucócitos totais (x10 ⁹ /L)	10,83 ± 1,85	15,00 ± 9,92	0,5995**	6,0 – 17,0
Neutrófilos (x10 ⁶ /L)	5.973 ± 1.786	12.740 ± 9.506	0,0022**	3.000 – 11.500
Linfócitos (x10 ⁶ /L)	3.177 ± 916,3	1.305 ± 1.200	<0,0001**	1.000 – 4.800
Monócitos (x10 ⁶ /L)	608,4 ± 435,2	707,7 ± 646,0	0,7586**	150 – 1.350
Eosinófilos (x10 ⁶ /L)	1.029 ± 870,5	210,5 ± 280,4	<0,0001*	150 – 1.250
Basófilos (x10 ⁶ /L)	0 ± 0	57,0 ± 92,59	0,0051*	Raros
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	289,8 ± 79,61	237,6 ± 119,9	0,0953*	160 – 430
PPT (g/dL)	7,01 ± 0,98	9,74 ± 1,76	<0,0001*	6,0 – 8,0
Bioquímica plasmática²				
Proteína total (g/L)	61,5 ± 10,6	86,7 ± 11,9	<0,0001*	54 – 71
Albumina (g/L)	32,06 ± 3,98	22,12 ± 6,69	<0,0001*	26 – 33
Globulina (g/L)	30,69 ± 10,17	63,51 ± 10,18	<0,0001**	27 – 44
ALT (UI/L)	34,05 ± 10,48	33,86 ± 22,69	0,2684**	21 – 102
AST (UI/L)	23,63 ± 5,59	58,05 ± 27,07	<0,0001**	23 – 66
FA (UI/L)	60,0 ± 40,4	86,7 ± 75,5	0,6285**	20 – 156
GGT (UI/L)	3,15 ± 1,0	2,74 ± 1,65	0,0910**	1,2 – 6,4
Bilirrubina total (mg/dL)	0,30 ± 0,12	0,22 ± 0,09	0,0293*	0,1 – 0,5
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,09 ± 0,10	0,14 ± 0,13	0,1766**	0,06 – 0,12
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,21 ± 0,12	0,13 ± 0,12	0,0405**	0,01 – 0,49
Colesterol (mg/dL)	163,6 ± 47,84	183,5 ± 64,56	0,4732**	135 – 270
Triglicerídeos (mg/dL)	62,1 ± 23,7	68,2 ± 24,7	0,3403**	20 – 112
Glicose (mg/dL)	83,9 ± 13,7	90,2 ± 16,0	0,1689*	68 – 118
Ureia (mg/dL)	35,6 ± 9,5	35,4 ± 24,4	0,0534**	10 – 50
Creatinina (mg/dL)	0,99 ± 0,18	0,99 ± 0,28	0,1827**	0,5 – 1,5
CK (UI/L)	96,96 ± 59,55	320,8 ± 254,8	<0,0001**	1,5 – 28,4
LDH (UI/L)	51,9 ± 38,2	155,0 ± 110,2	<0,0001**	45 – 233
Cálcio total (mg/dL)	9,94 ± 1,03	8,92 ± 0,62	0,0004*	9,0 – 11,3
Fósforo inorgânico (mg/dL)	4,66 ± 1,67	5,56 ± 1,69	0,0746**	2,6 – 6,2
Urinálise³				
Densidade urinária	1,043 ± 0,01	1,033 ± 0,01	0,1163*	>1,035
UPC	0,09 ± 0,07	1,66 ± 1,84	<0,0001**	<0,5
Sorologia⁴				
Densidade óptica	0,052 ± 0,03	0,935 ± 0,211	<0,0001*	<0,270

* Teste de t não pareado; ** Teste de Mann-Whitney;

Valores de referência para a espécie canina: ¹ Hematologia (RIZZI et al., 2010), ² Bioquímica (KANEKO et al., 2008), ³ Urinálise (OSBORNE et al., 1995) e ⁴ Sorologia (LIMA et al., 2003).

Abreviações: ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; CHCM, concentração hemoglobínica corpuscular média; CK, creatina quinase; FA, fosfatase alcalina; GGT, gama-glutamil transferase; LDH, lactato desidrogenase; PPT, proteína plasmática total; UPC, relação proteína/creatinina urinária; VCM, volume corpuscular médio.

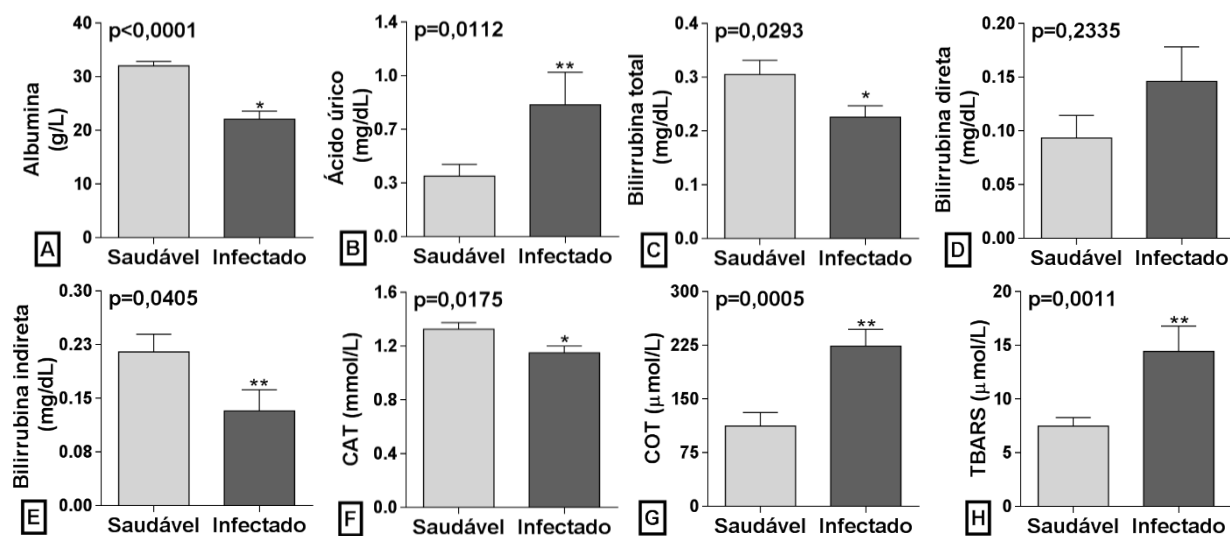


FIGURA 1 - Marcadores de estresse oxidativo: albumina (A), ácido úrico (B), bilirrubinas total (C), direta (D) e indireta (E), capacidade antioxidante total (CAT, F), capacidade oxidante total (COT, G) e peroxidação lipídica mensurada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, H) em cães saudáveis (Saudável, n=24) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infectado, n=20). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (teste de t não pareado) ou ** (teste de Mann-Whitney).

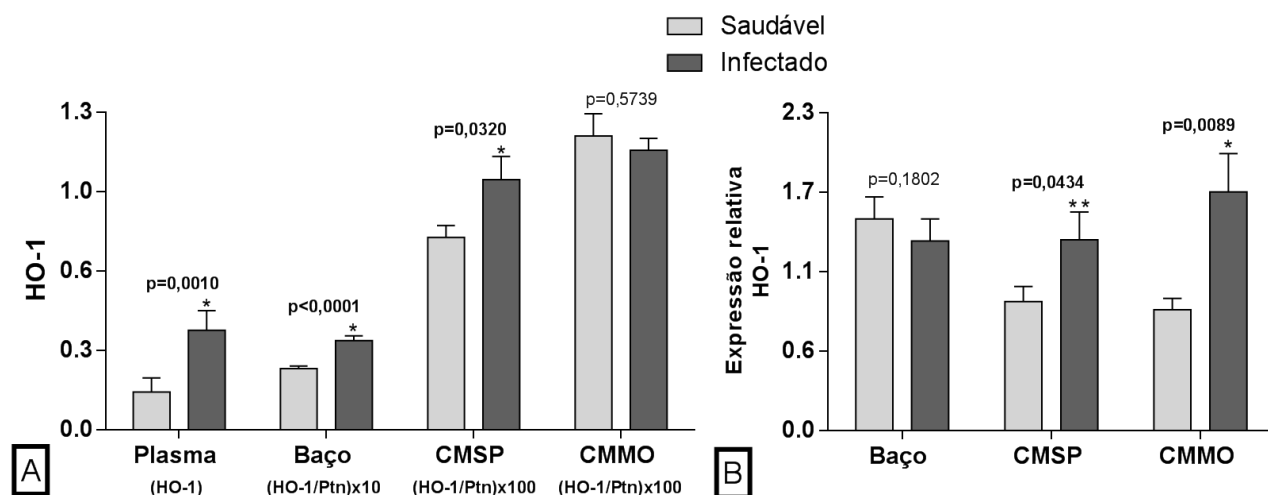


FIGURA 2 - Concentrações de heme oxigenase-1 (HO-1) determinadas plasmáticas, no homogeneizado de baço, células mononucleares de sangue periférico (CMSP) e células mononucleares da medula óssea (CMMO) e normalizadas em função da concentração de proteína em cães saudáveis (Saudável, HO-1 do plasma n=24 e demais variáveis n=10) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infectado, HO-1 do plasma n=20 e demais variáveis n=10) (A). Expressão relativa do gene *Hmox1* que codifica HO-1 em função da média geométrica dos genes-padrão beta-actina e HPRT-1 no baço, CMSP e CMMO de cães saudáveis (Saudável, n=10) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infectado, n=10) (B). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (teste de t não pareado) ou ** (teste de Mann-Whitney).

3.4 Aumento das substâncias relacionadas ao metabolismo do heme e IL-10 na LVC

Além de avaliar a HO-1, também avaliamos IL-10 e a via metabólica da enzima no plasma e baço de cães com LVC, determinando as concentrações de heme livre, ferritina, haptoglobina e sCD163. Similar ao aumento de HO-1, as concentrações plasmáticas e esplênicas de IL-10, ferritina, haptoglobina e sCD163 estavam aumentadas nos cães infectados (Figuras 3 e 4), não sendo observada alteração de heme livre nos grupos avaliados (Figura 3A).

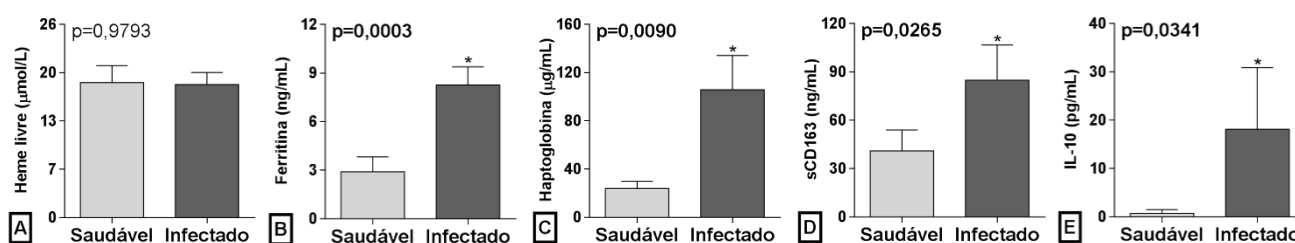


FIGURA 3 - Concentrações plasmáticas de heme livre (A), ferritina (B), haptoglobina (C), receptor CD163 solúvel (sCD163, D) e IL-10 (E) de cães saudáveis (Saudável, n=24) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infectado, n=20). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (teste de Mann-Whitney).

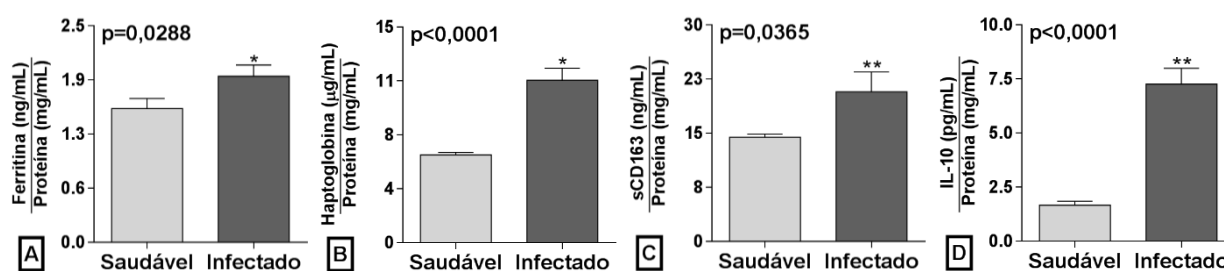


FIGURA 4 - Concentrações de ferritina (A), haptoglobina (B), receptor CD163 solúvel (sCD163, C) e IL-10 (D) no homogeneizado esplênico normalizadas em função da concentração de proteína em cães saudáveis (Saudável, n=10) e naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (Infectado, n=10). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média e a diferença estatisticamente significativa é indicada por * (teste de t não pareado) ou ** (teste de Mann-Whitney).

3.5 Correlação entre HO-1 e marcadores de estresse oxidativo, IL-10 e carga parasitária

Para verificar se há associação entre a HO-1, estresse oxidativo, IL-10 e carga parasitária, esses parâmetros foram correlacionados com a expressão e as concentrações de HO-1 nos tecidos analisados. Observamos correlação positiva entre as concentrações de HO-1 na medula óssea e baço com oxidantes totais e peroxidação lipídica, respectivamente. Enquanto a concentração de HO-1 no baço correlacionou-se negativamente com os antioxidantes albumina, bilirrubinas total e direta e CAT. Foi observada ainda correlação negativa entre HO-1 da medula óssea com os antioxidantes albumina e bilirrubinas total e indireta (Tabela 3).

As concentrações de IL-10 plasmática e esplênica correlacionaram-se positivamente com HO-1 plasmática, enquanto IL-10 esplênica também se correlacionou positivamente com HO-1 esplênica e expressão de HO-1 nas CMMO. Não houve correlação entre a carga parasitária e HO-1 nos tecidos avaliados (Tabela 3).

3.6 A inibição de HO-1 aumenta a taxa de proliferação dos linfócitos induzida pelo antígeno de *L. infantum*

Devido ao aumento de HO-1 na LVC, avaliamos se a inibição da enzima com SnMsP era capaz de melhorar a resposta proliferativa de células do linfonodo de cães infectados. Observamos que a inibição de HO-1 aumentou significativamente a taxa de proliferação celular basal e antígeno-específica, enquanto a indução da enzima reduziu a proliferação antígeno-específica (Figura 5A).

A indução de HO-1 com CoPP e a inibição com SnMsP aumentou e reduziu, respectivamente, de forma significativa as concentrações da enzima determinados por ELISA de captura (Figura 5B). Entretanto, ao se avaliar a expressão gênica, observamos que apenas a indução com CoPP aumentou a expressão de HO-1 de forma significativa, enquanto a inibição com SnMsP não alterou a expressão gênica da enzima (Figura 5C).

Tabela 3 - Correlação de Spearman entre as concentrações e as expressões de heme oxigenase-1 (HO-1) com marcadores de estresse oxidativo e IL-10 em cães saudáveis e com leishmaniose visceral, e entre carga parasitária de cães infectados

Variáveis	HO-1 plasmática (ELISA)	HO-1 CMSP (ELISA)	HO-1 CMMO (ELISA)	HO-1 Baço (ELISA)	Expressão HO-1 CMSP	Expressão HO-1 CMMO	Expressão HO-1 Baço
Albumina	p=0,0509	p=0,5137	p=0,1451	p=0,0026 r=-0,6361	p=0,1043	p=0,0016 r=-0,6571	p=0,5801
Ácido úrico	p=0,9069	p=0,7984	p=0,9233	p=0,0675	p=0,8888	p=0,0414 r=0,4597	p=0,5264
Bil. direta	p=0,3531	p=0,9399	p=0,6278	p=0,1356	p=0,0334 r=0,3414	p=0,0160 r=0,5308	p=0,3502
Bil. total	p=0,5177	p=0,4543	p=0,2077	p=0,0084 r=-0,5724	p=0,7924	p=0,0103 r=-0,5596	p=0,2741
Bil. indireta	p=0,8162	p=0,2383	p=0,1884	p=0,0022 r=-0,6431	p=0,2619	p=0,0072 r=-0,5814	p=0,1609
CAT	p=0,4631	p=0,2708	p=0,8723	p=0,0099 r=-0,5620	p=0,8988	p=0,6195	p=0,8846
COT	p=0,5378	p=0,4413	p=0,0020 r=0,6632	p=0,3695	p=0,0852	p=0,6224	p=0,2928
TBARS	p=0,0730	p=0,4641	p=0,2809	p=0,0227 r=0,5064	p=0,3083	p=0,2426	p=0,0608
IL-10 plasmática	p=0,0275 r=0,4921	p=0,1739	p=0,5126	p=0,1988	p=0,4696	p=0,2529	p=0,2014
IL-10 baço	p=0,0218 r=0,5093	p=0,4263	p=0,8250	p=0,0001 r=0,7564	p=0,4523	p=0,0405 r=0,4617	p=0,3851
Carga parasitária baço	p=0,3923	p=0,3363	p=0,3869	p=0,3129	p=0,7723	p=0,785	p=0,7330
Carga parasitária medula óssea	p=0,6244	p=0,463	p=0,8916	p=0,0806	p=0,1777	p=0,6821	p=0,8382

Abreviações: CAT, capacidade antioxidante total; CMMO, células mononucleares de medula óssea; CMSP, células mononucleares de sangue periférico; COT, capacidade oxidante total; ELISA, Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima; HO-1, heme oxigenase-1; TBARS, peroxidação lipídica mensurada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;

3.7 O aumento da proliferação celular envolve a menor produção de IL-10 e IL-2 pela inibição de HO-1

Ao detectarmos que a inibição de HO-1 melhorou a resposta linfoproliferativa e a indução da enzima piorou a proliferação antígeno-específica dos cães com LVC clínica, avaliamos as concentrações de IL-10 devido à sua função reguladora da resposta linfoproliferativa na LV (STRAUSS-AYALI et al., 2005), IL-2 por sua ação na ativação e proliferação dos linfócitos T (SANTANA; ROSENSTEIN, 2003) e IFN-gama por ser produzido durante a ativação linfocitária e por estar associado à resistência em cães infectados (PINELLI et

al., 1999a; SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Observamos que a inibição de HO-1 com redução das concentrações da enzima (Figura 5B) ocorreu concomitantemente à diminuição de IL-2 (Figura 6B) e IL-10 (Figura 6C) no sobrenadante da cultura celular.

O estímulo das células de linfonodo de cães infectados com AgS aumentou a linfoproliferação (Figura 5A) e reduziu a produção de IL-2 (Figura 6B). Interessantemente, tanto a indução quanto a inibição de HO-1 causaram redução significativa de IL-2 na ausência de AgS, sendo essa redução mais intensa na presença do inibidor de HO-1 SnMsP (Figura 6B).

A produção de IFN-gama não sofreu alteração consistente com inibição ou indução de HO-1, sendo observado apenas redução da produção de IFN-gama na presença do indutor de HO-1 na ausência de AgS e uma tendência de aumento (não significativa) na presença de AgS (Figura 6A).

O mitógeno ConA induziu a maior taxa de proliferação celular (Figura 5A), concomitantemente ocorreu inibição da expressão de HO-1 (Figura 5C) e maiores produções de IFN-gama, IL-2 e IL-10 (Figura 6).

Foi observada correlação negativa entre a expressão de HO-1 e a taxa de proliferação celular na presença do AgS de *L. infantum* ($p=0,0213$, $r=-0,4185$), indicando que quanto maior a expressão de HO-1, menor a proliferação celular.

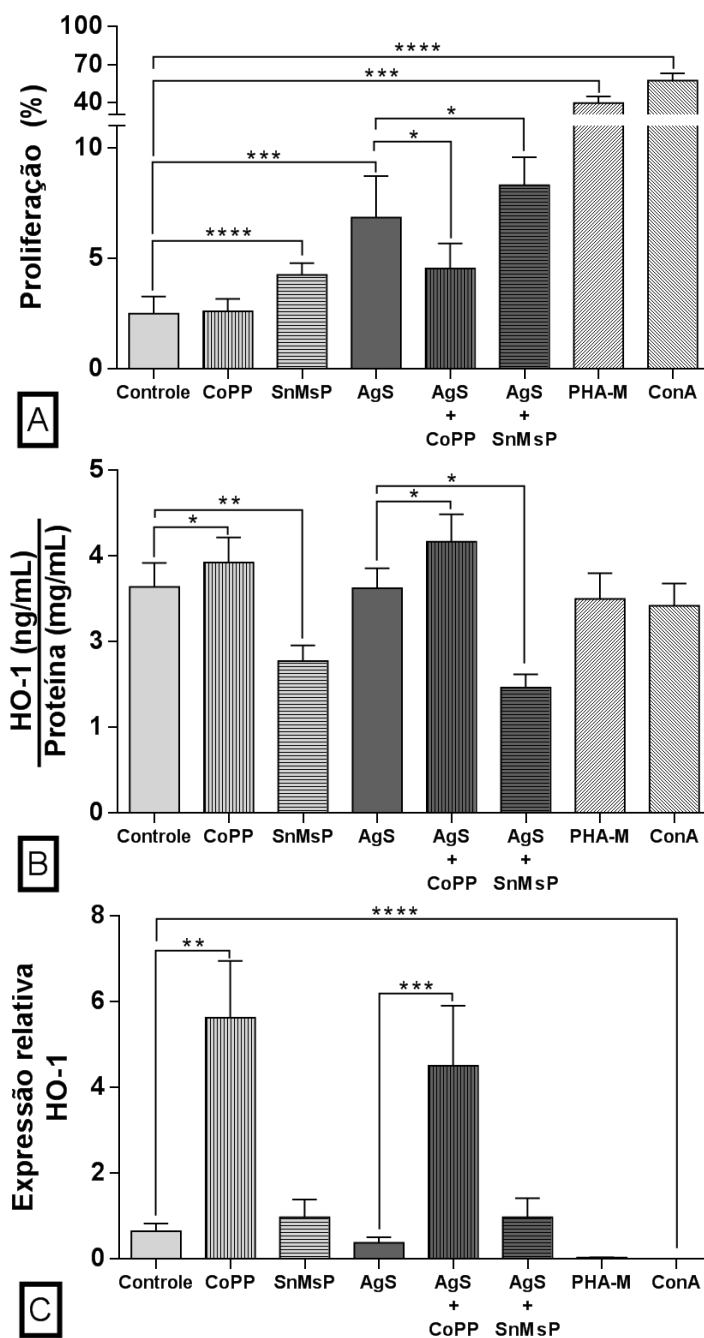


FIGURA 5 - Taxa de proliferação das células de linfonodo de cães com leishmaniose visceral (n=15) marcadas com CFSE e cultivadas por seis dias sem tratamento algum (controle), na presença dos mitógenos fitoemaglutinina-M (PHA-M) e concanavalina-A (ConA), de antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (AgS) em associação ou não de cloreto de cobalto-protoporfirina IX (CoPP) e dicloreto de estanho(IV)-mesoporfirina IX (SnMsP) (A). Concentrações de heme oxigenase-1 (HO-1) determinadas por ELISA de captura e normalizadas em função da concentração de proteína das células de linfonodo submetidas aos mesmos tratamentos previamente descritos, porém sem marcação com CFSE (B). Expressão de HO-1 determinada por RT-qPCR normalizada pela média geométrica dos genes-padrão beta-actina e HPRT-1 das células de linfonodo submetidas aos mesmos tratamentos previamente descritos, porém sem marcação com CFSE (C). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média. Teste de Friedman com comparação múltipla de Dunn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

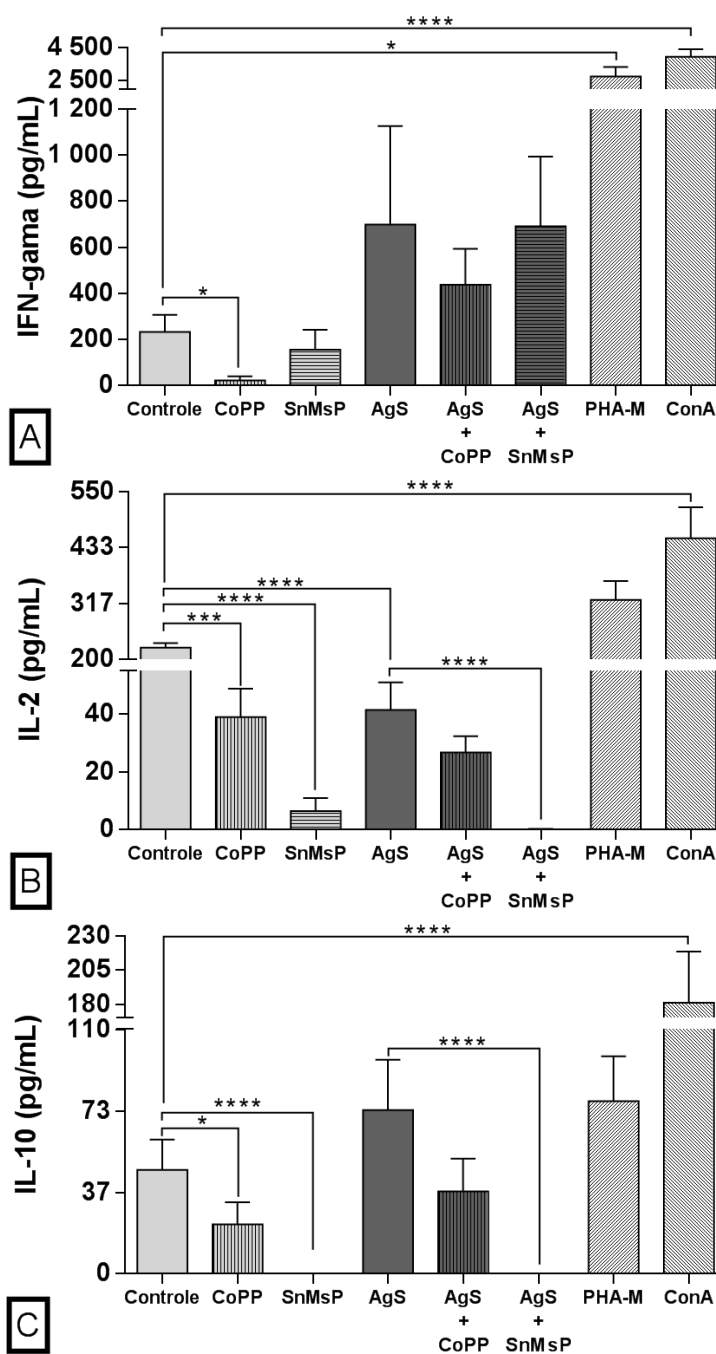


FIGURA 6 - Interferon-gama (IFN-gama, **A**), IL-2 (**B**) e IL-10 (**C**) determinados no sobrenadante da cultura de células de linfonodo de cães com leishmaniose visceral (n=15) sem marcação com CFSE e cultivadas por seis dias sem adição de tratamento algum (controle), na presença dos mitógenos fitoemaglutinina-M (PHA-M) e concanavalina-A (ConA), de antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (AgS) em associação ou não de cloreto de cobalto-protoporfirina IX (CoPP) e dicloreto de estanho(IV)-mesoporfirina IX (SnMsP). Os gráficos são representados por média e erro padrão da média. Teste de Friedman com comparação múltipla de Dunn. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

4 Discussão

Ficou evidenciado que os cães com LVC apresentam marcante estresse oxidativo associado ao aumento da concentração e expressão de HO-1 por meio de correlação positiva entre HO-1 e substâncias oxidantes e correlação negativa entre HO-1 e antioxidantes, demonstrando que o aumento do estresse oxidativo ocorre concomitantemente ao aumento de HO-1 na LVC. A resposta linfoproliferativa antígeno-específica de células de linfonodo de cães doentes diminuiu na presença do indutor e aumentou na presença do inibidor de HO-1. A melhor resposta proliferativa antígeno-específica ocorreu concomitantemente à redução de IL-10 e IL-2 no sobrenadante de cultura celular. Esses dados demonstram que o aumento da HO-1 na LVC pode ser um dos mecanismos responsáveis pela redução da imunidade celular, com menor resposta linfoproliferativa nos cães doentes.

O estresse oxidativo observado na LVC foi decorrente da redução de substâncias antioxidantes e aumento de substâncias oxidantes, o que resultou em maior peroxidação lipídica nos cães doentes, semelhante ao que já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa (ALMEIDA et al., 2013b). Embora o antioxidante ácido úrico estivesse aumentado nos cães infectados, esse aumento não foi suficiente para melhorar o estresse oxidativo, uma vez que a CAT permaneceu reduzida nesses animais.

A correlação positiva observada entre HO-1 e oxidantes e a correlação negativa entre HO-1 e antioxidantes é a primeira evidência de que o estresse oxidativo está correlacionado ao aumento da concentração e expressão de HO-1 na LVC, embora já se conheça que a HO-1 seja induzida por condições de estresse em outras espécies (TAKAHASHI et al., 2007; VILE et al., 1994). Esses achados sugerem que quanto maior a produção de substâncias oxidantes e a peroxidação lipídica, menor a quantidade de antioxidantes e maior a quantidade de HO-1 no baço e medula óssea de cães infectados. Já foi demonstrado em humanos com LV clínica que a indução da HO-1 permite a sobrevivência do parasito pelo aumento da atividade de sorbitol desidrogenase e redução de glutathione peroxidase, prejudicando a produção de espécies reativas de

oxigênio, o que é revertido após o tratamento da doença (DAS et al., 2013). Não foi observada correlação entre HO-1 e carga parasitária de baço e medula óssea dos cães infectados, o que sugere que o estresse oxidativo desempenha um papel mais importante do que a quantidade de parasitos para o aumento das concentrações de HO-1 nos tecidos analisados.

Embora a HO-1 possua ação antioxidante e esteja aumentada na LVC, o estresse oxidativo ainda permaneceu evidente nos cães infectados, o que pode ter contribuído inclusive para o desenvolvimento da anemia nos animais doentes (BRITTI et al., 2008). Nesse sentido, outros estudos avaliando o efeito de terapias antioxidantes nos cães com LVC merecem atenção.

Os aumentos das concentrações plasmáticas, esplênicas e em CMSP de HO-1 observados no presente estudo são a primeira evidência de que essa enzima está envolvida na patogenia da LVC. Estudos avaliando as concentrações de HO-1 na LV ainda são escassos e a maioria envolve estudos *in vitro* com macrófagos (DAS et al., 2013; EL FADILI et al., 2008; LUZ et al., 2012; PHAM et al., 2005). Estudos *in vivo* demonstraram elevadas concentrações séricas de HO-1 em pacientes humanos sintomáticos com LV causada por *L. infantum* (LUZ et al., 2012) e *L. donovani* (DAS et al., 2013) e que estes valores reduziram significativamente após o tratamento da doença com miltefosina (DAS et al., 2013) e antimoniato de meglumina (LUZ et al., 2012). De forma semelhante ao que ocorre em humanos, o aumento de HO-1 nos cães com sinais clínicos decorrentes da LV também parece estar ligado à maior susceptibilidade à doença, porém estudos determinando HO-1 em animais resistentes são necessários para suportar essa hipótese.

Os cães com LV apresentaram maior expressão gênica de HO-1 em CMSP e CMMO, não sendo observada diferença em relação aos cães saudáveis no tecido esplênico. Estudo semelhante em pacientes humanos sintomáticos infectados por *L. donovani* demonstrou maior expressão de HO-1 em CMSP e aspirado esplênico desses pacientes, não observando diferença no aspirado de medula óssea (DAS et al., 2013). A discrepância entre os resultados observados

pode ser atribuída a diferenças quanto ao hospedeiro, cepa de *Leishmania* spp. e fase da doença dos hospedeiros.

Interessantemente, observamos maiores concentrações de HO-1 no tecido esplênico, mesmo na ausência de maior expressão gênica nesse tecido. Esse achado poderia ser justificado pela possibilidade de que macrófagos maduros no baço já apresentem altas concentrações da enzima decorrentes de maior produção quando ainda eram monócitos no sangue e medula óssea, conforme observado pela maior expressão gênica nas CMSP e CMMO. Já foi demonstrado em modelos experimentais de malária em camundongos, que a expressão de HO-1 nem sempre é condizente com as concentrações da proteína e atividade enzimática. Nos estágios finais da infecção, em que as concentrações proteicas e a atividade de HO-1 estavam altas, foi observada redução da expressão gênica (PAMPLONA et al., 2007). Nesse sentido, cães em diferentes estágios de infecção também podem ter contribuído para tal discrepância entre a HO-1 determinada por ELISA e a expressão gênica.

Em outras condições patológicas, o aumento de HO-1 como observado no presente estudo, nem sempre é um indicativo de progressão de doença. O envolvimento da HO-1 em outras doenças causadas por protozoários, como a malária em humanos, apresenta resultados conflitantes. Foi demonstrado que altas concentrações da enzima determinam maior susceptibilidade à infecção em humanos (MENDONÇA et al., 2012). Já em modelos experimentais murinos, a maior concentração de HO-1 estava relacionada à maior resistência ao desenvolvimento da forma cerebral da malária (PAMPLONA et al., 2007). Esses achados demonstram que as consequências do aumento da HO-1 podem variar de acordo com a espécie e a doença em estudo.

Além da concentração de HO-1, avaliamos parte da via metabólica da HO-1 no plasma e baço, observando aumento das concentrações de haptoglobina, sCD163 e ferritina tanto no plasma quanto no baço de cães infectados, não sendo observada diferença quanto aos valores de heme livre. A hemoglobina livre forma um complexo estável com a haptoglobina que é reconhecido e internalizado por macrófagos esplênicos por meio do receptor CD163 dessas

células (TENHUNEN et al., 1969). O Fe por sua vez induz a síntese de ferritina, importante agente antioxidante responsável pelo transporte dessa substância no organismo (BALLA et al., 1992). Todas essas substâncias da via metabólica da HO-1, exceto heme livre, estão aumentadas no plasma e baço de cães infectados, sugerindo maior metabolismo da hemoglobina nos animais infectados.

A ausência de alteração do heme livre plasmático nos cães infectados pode ser decorrente de diferenças quanto ao metabolismo da hemoglobina. Acreditamos que a hemoglobina seja diretamente degradada dentro dos macrófagos (hemólise extravascular) na LVC, evitando a formação de heme livre, o que condiz com o aumento de haptoglobina observado. O aumento desse metabólito já foi descrito em doenças hemolíticas intravasculares como a malária (ANDRADE et al., 2010; SINHA et al., 2008). Tanto a ferritina quanto a haptoglobina são proteínas inflamatórias de fase aguda (CERON et al., 2005) e o aumento dessas substâncias no soro de cães com LV clínica já foi previamente demonstrado (MARTINEZ-SUBIELA; CERON, 2005; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2014; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002), indicando que o aumento dessas proteínas nos cães infectados também pode ser consequência do processo inflamatório.

Observamos elevação das concentrações plasmáticas de sCD163 nos cães infectados, o que já foi demonstrado no soro de pacientes humanos com LV (SCHAER et al., 2005), sendo este o primeiro relato na LVC. Esse receptor é restrito às células da linhagem macrofágica e demonstra a maior ativação macrofágica causada pela infecção (LAW et al., 1993), o que também poderia contribuir para maior produção de ferritina (RAVELLI, 2002). O papel do receptor CD163 na ativação macrofágica ainda não foi completamente elucidado, podendo exercer atividade pró-inflamatória com ativação da secreção de citocinas pró-inflamatórias (VAN DEN HEUVEL et al., 1999), ou atividade anti-inflamatória, em que mediadores anti-inflamatórios como a IL-10 induzem a expressão de CD163 (SULAHIAN et al., 2000), corroborando com nossos achados em que observamos maiores concentrações de IL-10 e sCD163 em

cães infectados. Dessa forma, a inflamação e o estresse oxidativo que ocorrem na LVC parecem contribuir para o aumento de HO-1, haptoglobina e maior ativação macrofágica, corroborando com os resultados do presente estudo pelo aumento das concentrações de haptoglobina, sCD163 e ferritina.

Ao detectarmos o aumento de HO-1 nos cães com LV, avaliamos também se a inibição de HO-1 *in vitro* seria capaz de melhorar a resposta proliferativa de células de linfonodo de cães doentes, bem como determinar as citocinas envolvidas no processo, uma vez que já é conhecida a baixa imunidade celular que esses cães apresentam (BANETH et al., 2008). Observamos redução da resposta proliferativa antígeno-específica com indução de HO-1 e que o aumento da proliferação celular ocorria concomitantemente à redução da concentração de HO-1, sendo observada inclusive correlação negativa entre a expressão de HO-1 e a proliferação celular antígeno-específica.

Esta é a primeira evidência de que a inibição de HO-1 com SnMsP melhora a resposta proliferativa antígeno-específica de células de linfonodo de cães infectados. Estudos prévios em humanos demonstraram que a SnMsP aumenta a proliferação inespecífica de linfócitos T CD3+ (BUNSE et al., 2015; BURT et al., 2010) por induzir a expressão de moléculas co-estimulatórias nos monócitos, como CD86 (B7-2), otimizando a apresentação de antígeno (BURT et al., 2010). Na LVC, a resposta proliferativa de linfócitos T é reduzida devido à supressão da expressão de moléculas da família B7 em macrófagos de cães infectados (PINELLI et al., 1999b). Dessa forma, é possível supor que o inibidor de HO-1 possa restaurar a expressão de moléculas co-estimulatórias ativadoras, otimizando a proliferação celular.

Outro mecanismo que pode ser responsável pelo aumento da resposta proliferativa com SnMsP é que a inibição de HO-1 com essa substância é capaz de bloquear a atividade inibitória de linfócitos Treg sobre a proliferação celular (BURT et al., 2010) e aumentar a quantidade de células de memória (BUNSE et al., 2015; BURT et al., 2010). A indução de HO-1 ainda afeta a proliferação celular por inibir a maturação de células dendríticas e secreção de citocinas pró-inflamatórias (CHAUVEAU et al., 2005; MOREAU et al., 2009), mantendo a

capacidade das células em produzir citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (CHAUVEAU et al., 2005). Esses achados comprovam nossos resultados de que o aumento da HO-1 na LVC reduz a resposta linfoproliferativa, prejudicando a imunidade celular.

A IL-10, importante interleucina anti-inflamatória, estava aumentada no plasma e baço de cães infectados e correlacionou-se positivamente com concentração e expressão de HO-1, além de ter sua síntese praticamente suprimida pela inibição da HO-1 na cultura de células de linfonodo de cães infectados. Esses achados sugerem relação entre a concentração de HO-1 e IL-10, em que o aumento dessa citocina parece estimular a síntese de HO-1 ou vice-versa, prejudicando a imunidade celular de cães infectados. A correlação positiva entre HO-1 e IL-10 corrobora com outros trabalhos que afirmam que a IL-10 possui ação indutora sobre a expressão de HO-1 em monócitos humanos estimulados com lipopolissacarídeos (PETIT-BERTRON et al., 2003) e em macrófagos murinos (LEE; CHAU, 2002). Além disso, a maior atividade de HO-1 causa aumento de monóxido de carbono (CO), um subproduto da enzima, que também apresenta ação anti-inflamatória com redução de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (OTTERBEIN et al., 2000), confirmando nossos resultados dos cães infectados e da cultura de células de linfonodo desses animais.

Observamos que a inibição de HO-1 com SnMsP na presença de antígeno de *L. infantum* reduziu significativamente a produção de IL-2, tratamento em que houve maior proliferação celular. Embora seja aceito que o aumento de IL-2 é necessário para completa ativação e proliferação dos linfócitos T CD4+ (SANTANA; ROSENSTEIN, 2003), outros estudos têm demonstrado o papel imunorregulatório dessa citocina (BACHMANN; OXENIUS, 2007). Altas concentrações de IL-2 seriam cruciais para ativação dos linfócitos Treg (BRUNKOW et al., 2001; FONTENOT et al., 2003) e poderiam induzir a morte de linfócitos pela via FAS/FAS-L após estimulações repetidas (KRAMMER, 2000). Conforme previamente relatado, a utilização de SnMsP seria responsável pela redução da população de linfócitos Treg (BURT et al., 2010), somado a isso,

a redução de IL-2 também parece contribuir ainda mais para a redução de linfócitos Treg e reduziria o estímulo apoptótico da estimulação crônica por antígenos de *Leishmania* spp., contribuindo para o aumento da linfoproliferação observada na presença do inibidor de HO-1. Mais estudos são necessários para avaliar a função da IL-2 na proliferação antígeno-específica na LVC, principalmente considerando que outros estudos têm demonstrado que a redução da proliferação celular observada com a ativação da HO-1 deve-se à inibição da síntese de IL-2 pelo CO, subproduto da enzima (PAE et al., 2004), mas até o momento não existem estudos avaliando o efeito da inibição de HO-1 sobre a produção de IL-2 em células de cães infectados.

O uso de SnMsP foi eficaz em melhorar a resposta proliferativa de células de linfonodo, mas não inibiu a expressão da enzima. Outros estudos têm evidenciado o aumento da expressão de HO-1 com o uso desse inibidor (BURT et al., 2010) ou mesmo com outro inibidor da enzima como a protoporfirina IX de zinco (EL FADILI et al., 2008). Isso sugere que os mecanismos responsáveis pela diminuição das concentrações da enzima sejam outros, que não a diminuição da expressão gênica, provavelmente a nível pós-transcricional.

Considerando que cães com LVC apresentam aumento de HO-1 e que essa enzima possui efeito imunorregulador sobre a proliferação celular (LISTOPAD et al., 2007), demonstramos que a inibição de HO-1 melhora a resposta celular de animais infectados. Assim, novas abordagens terapêuticas para a LVC deveriam considerar a utilização de inibidores farmacológicos de HO-1 juntamente com substâncias antioxidantes para reduzir o estresse oxidativo e reduzir a indução da enzima.

5 Conclusão

O aumento de HO-1 está associado ao estresse oxidativo e aumento de IL-10 e parece ser um dos mecanismos envolvidos na inibição da imunidade celular nos cães com leishmaniose visceral, prejudicando a linfoproliferação antígeno-específica desses animais.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Flavia Mari Yamamoto e Laine Margareth Gabas pelo auxílio laboratorial e FAPESP pelo financiamento da pesquisa (Proc. 2013/07496-1) e bolsa de PhD (Processo 2013/06068-6).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; BOSCO, A. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 1-2, p. 6–12, 2013a.
- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 3, p. 599–605, 2013b.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE, B. B.; REIS-FILHO, A.; SOUZA-NETO, S. M. et al. Plasma superoxide dismutase-1 as a surrogate marker of vivax malaria severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, p. e650, 2010.
- BACHMANN, M. F.; OXENIUS, A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. **EMBO Reports**, v. 8, n. 12, p. 1142–1148, 2007.
- BALLA, G.; JACOB, H. S.; BALLA, J. et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 25, p. 18148–18153, 1992.

- BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BILDIK, A.; KARGIN, F.; SEYREK, K. et al. Oxidative stress and non-enzymatic antioxidative status in dogs with visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 77, n. 1, p. 63–66, 2004.
- BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K. et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2010.
- BRITTI, D.; SCONZA, S.; MORITTU, V. M. et al. Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase in the blood of dogs with Leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 251–254, 2008.
- BRUNKOW, M. E.; JEFFERY, E. W.; HJERRILD, K. A. et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. **Nature Genetics**, v. 27, n. 1, p. 68–73, 2001.
- BUNSE, C. E.; FORTMEIER, V.; TISCHER, S. et al. Modulation of heme oxygenase-1 by metalloporphyrins increases anti-viral T cell responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 179, n. 2, p. 265–276, 2015.
- BURT, T. D.; SEU, L.; MOLD, J. E. et al. Naive human T cells are activated and proliferate in response to the heme oxygenase-1 inhibitor tin mesoporphyrin. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 9, p. 5279–5288, 2010.
- CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005.
- CHAUVEAU, C.; RÉMY, S.; ROYER, P. J. et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1694–1702, 2005.
- CHIKU, V. M.; SILVA, K. L. O.; ALMEIDA, B. F. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879–888, 2016.

- CORRÊA, A. P. F. L.; DOSSI, A. C. S.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. et al. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3, p. 267–274, 2007.
- COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.
- DAS, S.; PANDEY, K.; RABIDAS, V. N. et al. Effectiveness of miltefosine treatment in targeting anti-leishmanial HO-1/Nrf-2-mediated oxidative responses in visceral leishmaniasis patients. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 9, p. 2059–2065, 2013.
- EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277–285, 2004.
- EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.
- EL FADILI, K.; IMBEAULT, M.; MESSIER, N. et al. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 526–533, 2008.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330–336, 2003.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 1169–1180, 2005.

- HEIDARPOUR, M.; SOLTANI, S.; MOHRI, M. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between oxidative stress, liver and kidney variables, trace elements, and clinical status. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1491–1496, 2012.
- HUNTER, M. I.; NLEMADIM, B. C.; DAVIDSON, D. L. Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **Neurochemical Research**, v. 10, n. 12, p. 1645–1652, 1985.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. London: Academic Press, 2008. 904 p.
- KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 789–795, 2000.
- KRISTIANSEN, M.; GRAVERSEN, J. H.; JACOBSEN, C. et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 198–201, 2001.
- LAW, S. K.; MICKLEM, K. J.; SHAW, J. M. et al. A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 9, p. 2320–2325, 1993.
- LEE, T. S.; CHAU, L. Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. **Nature Medicine**, v. 8, n. 3, p. 240–246, 2002.
- LIMA, V. M. F. DE; FATTORI, K. R.; DE SOUZA, F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2, p. 147–153, 2012.
- LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A. et al. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485–489, 2003.
- LISTOPAD, J.; ASADULLAH, K.; SIEVERS, C. et al. Heme oxygenase-1 inhibits T cell-dependent skin inflammation and differentiation and function of antigen-presenting cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 8, p. 661–670, 2007.

- LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FEIJÓ, D. F. et al. Heme oxygenase-1 promotes the persistence of *Leishmania chagasi* infection. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 9, p. 4460–4467, 2012.
- LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 171, n. 1, p. 131–137, 1994.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERON, J. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. **Veterinární Medicína Chech**, v. 50, n. 1, p. 39–46, 2005.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J.; STRAUSS-AYALI, D. et al. Serum ferritin and paraoxonase-1 in canine leishmaniosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, n. 1, p. 23–29, 2014.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D. et al. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 150, n. 8, p. 241–244, 2002.
- MENDONÇA, V. R. R.; LUZ, N. F.; SANTOS, N. J. G. et al. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 4, p. 1445–1454, 2012.
- MOREAU, A.; HILL, M.; THÉBAULT, P. et al. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. **FASEB Journal**, v. 23, n. 9, p. 3070–3077, 2009.
- NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1, p. 131–133, 2010.
- OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B.; LUILICH, J. P. et al. A clinician's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p. 136–210.
- OTTERBEIN, L.; BACH, F.; ALAM, J. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 422–428, 2000.

- PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M. et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4744–4751, 2004.
- PAMPLONA, A.; FERREIRA, A.; BALLA, J. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. **Nature Medicine**, v. 13, n. 6, p. 703–710, 2007.
- PEROSSO, J.; SILVA, K. L. O.; FERREIRA, S. Í. S. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3, p. 417–423, 2014.
- PETERS, I. R.; PEETERS, D.; HELPS, C. R. et al. Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 1, p. 55–66, 2007.
- PETIT-BERTRON, A. F.; FITTING, C.; CAVAILLON, J. M. et al. Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 1, p. 145–154, 2003.
- PHAM, N.-K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322–8333, 2005.
- PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; SLAPPENDEL, R. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2, p. 121–126, 1999a.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M. 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. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999b.

RAVELLI, A. Macrophage activation syndrome. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 14, n. 5, p. 548–552, 2002.

RIZZI, T. E.; MEINKOTH, J. H.; CLINKENBEARD, K. D. Normal Hematology of the Dog. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2010, p. 799–810.

SANTANA, M. A.; ROSENSTEIN, Y. What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms. **Journal of Cellular Physiology**, v. 195, n. 3, p. 392–401, 2003.

SCHAER, D. J.; SCHLEIFFENBAUM, B.; KURRER, M. et al. Soluble hemoglobin-haptoglobin scavenger receptor CD163 as a lineage-specific marker in the reactive hemophagocytic syndrome. **European Journal of Haematology**, v. 74, n. 1, p. 6–10, 2005.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P. et al. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 139, n. 1, p. 221–227, 1987.

SINHA, S.; MISHRA, S. K.; SHARMA, S. et al. Polymorphisms of TNF-enhancer and gene for FcγRIIIa correlate with the severity of falciparum malaria in the ethnically diverse Indian population. **Malaria Journal**, v. 7, p. 13, 2008.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; ORDEIX, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 317, 2016.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S. et al. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 63–73, 2005.

SULAHIAN, T. H.; HÖGGER, P.; WAHNER, A. E. et al. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. **Cytokine**, v. 12, n. 9, p. 1312–1321, 2000.

TAKAHASHI, T.; SHIMIZU, H.; MORIMATSU, H. et al. Heme oxygenase-1: a fundamental guardian against oxidative tissue injuries in acute inflammation. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 745–753, 2007.

TENHUNEN, R.; MARVER, H. S.; SCHMID, R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 23, p. 6388–6394, 1969.

VAN DEN HEUVEL, M. M.; TENSEN, C. P.; VAN AS, J. H. et al. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 5, p. 858–866, 1999.

VILE, G. F.; BASU-MODAK, S.; WALTNER, C. et al. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 7, p. 2607–2610, 1994.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva: World Health Organization, 2015.