

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/02/2017.

**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.

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.