

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**NÍVEIS DE ARGINASE, ÓXIDO NÍTRICO E O EFEITO DA
PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α EM LINFONODO DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Gabriela Lovizutto Venturin

Farmacêutica

ARAÇATUBA - SP
2015

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

**NÍVEIS DE ARGINASE, ÓXIDO NÍTRICO E O EFEITO DA
PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α EM LINFONODO DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Gabriela Lovizutto Venturin

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

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

ARAÇATUBA – SP
2015

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

V568n Venturin, Gabriela Lovizutto.
Níveis de arginase, óxido nítrico e o efeito da PGE2 na produção de TNF- α em linfonodo de cães com leishmaniose visceral / Gabriela Lovizutto Venturin. - Araçatuba, 2015
59 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Orientadora: Profa. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cães 2. Indometacina. 3. Leishmania infatum. 4. Zoonoses. I. T.

CDD 616.9364

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO*
Campus de Aracatuba
Núcleo Técnico de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Níveis de arginase, óxido nítrico e o efeito da PGE2 na produção de TNF- α em
linfonodo de cães com Leishmaniose Visceral

AUTORA: GABRIELA LOMZUTTO VENTURIN

ORIENTADORA: Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Alexandra Ivo de Medeiros
Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Cáris Maroni Nunes
Dra. CÁRIS MARONI NUNES

Valéria M. S. de Lima
Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

DATA DA REALIZAÇÃO: 4 de dezembro de 2015.

Valéria M. S. de Lima
Presidente da Comissão Examinadora
Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Lovizutto Venturin - nascida em 21 de outubro de 1988, na cidade de Araçatuba/SP, graduada em Farmácia no ano de 2010 pela Universidade Paulista - UNIP – SP. Durante o curso acadêmico desenvolveu atividades tais como estágios extracurriculares, além de participar de simpósios. No ano de 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluna regular do programa de mestrado. Paralelo a estas atividades, desenvolveu projetos no Laboratório de Imunologia Celular. Em 2014 integralizou os créditos. Em 15 de outubro de 2015 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação, com o trabalho intitulado “Níveis de arginase, óxido nítrico e o efeito da PGE₂ na produção de TNF- α em linfonodo de cães com leishmaniose visceral,” o qual faz parte desta dissertação.

EPÍGRAFE

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.”
Rubem Alves

“A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas a inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência.”
Augusto Cury

DEDICATÓRIA

A Deus, por fazer parte da minha vida, por ter me dado condições de lutar e alcançar os objetivos pretendidos.

Aos meus pais Sérgio e Márcia, que são minha fortaleza, me apoiaram, tiveram muita paciência e compreensão, me apoiaram nos momentos de angústia. Agradeço a vocês que fazem parte da minha história.

A minha avó (in memoriam): Maria Garcia Venturian, que cuidou e torceu por mim, e sempre esteve ao meu lado. Espero que esteja orgulhosa vendo essa minha conquista.

AGRADECIMENTOS

À professora Valéria Marçal Félix de Lima que confiou em mim acreditando na minha capacidade, pela persistência e vontade de querer me fazer uma pessoa melhor, pela transmissão do conhecimento, pela dedicação, desempenho, profissionalismo, competência, pelas diversas vezes que me fez enxergar que muitas vezes é necessário começar, recomeçar para que possamos alcançar o sucesso, por ter sido realmente MESTRA.

A Deus por me dar força interior, por ter a capacidade de aprender com tudo aquilo que a vida coloca em meu caminho e com todas as escolhas que faço. Agradeço por tudo que vivi e que me possibilitou chegar até aqui. Que me fez ser quem eu sou. Agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida e pelos momentos difíceis que me fizeram crescer.

A minha família que eu amo muito, meu pai Sérgio, minha mãe Márcia, e ao meu namorado Rafael, que estiveram ao meu lado nos momentos difíceis enfrentados por mim, souberam valorizar o meu trabalho, se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional. Obrigada por tudo!

Aos meus avós, tios e primos pelo carinho, torcida e apoio.

À amiga Juliana Albarracin Garcia pela solidariedade e por ter me ajudado a crescer estendendo a mão e mostrando o caminho que eu deveria seguir.

Aos meus grandes amigos Breno Almeida, Kathlenn Silva, Juliana Perosso e Vanessa Marin Chiku, que com muita paciência, humildade e solidariedade estiveram sempre prontos a me ajudar. As minhas amigas Aline Leal, Flavia Yamamoto e Larissa Melo pelo companheirismo, pelos momentos de alegria, pelos gestos de carinho e atenção durante esses anos.

Aos amigos Alex Nakamura e Jussara pela amizade, carinho e confiança. Com vocês aprendi muitas coisas e guardarei na memória para recordar.

Ao médico veterinário Saulo Avanço, do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, pelo auxílio no manejo dos cães.

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

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

À minha banca de defesa de dissertação de mestrado, Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes e a Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros por aceitar o convite e pelas sugestões que contribuíram para melhorar o meu trabalho.

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO 2.....	38
NÍVEIS DE ARGINASE, ÓXIDO NÍTRICO E O EFEITO DA PGE ₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α EM LINFONODO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Aprovação do comitê de ética.....	42
2.2 Animais.....	43
2.3 Colheita das amostras.....	43
2.4 Cultura de macrófagos aderentes do linfonodo.....	44
2.5 Cultura de leucócitos totais do linfonodo.....	44
2.6 Antígeno Solúvel de <i>Leishmania infatum</i>	44
2.7 Atividade da arginase.....	45
2.8 Dosagem de NO.....	45
2.9 Dosagem de PGE ₂	45
2.10 Determinação das citocinas TNF- α e IL-10.....	46
2.11 Análise estatística.....	46
3 RESULTADOS.....	46
3.1 Dados Clínicos.....	46
3.2 Atividade da arginase, concentração de NO e PGE ₂	48
3.3 PGE ₂ regula a produção de TNF- α e não afeta a produção de IL-10...49	49

4 DISCUSSÃO.....	51
AGRADECIMENTOS.....	53
REFERÊNCIAS	53

NÍVEIS DE ARGINASE, ÓXIDO NÍTRICO E O EFEITO DA PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α EM LINFONODO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica que pode ser fatal para os humanos. A doença é causada por um parasita intracelular, *Leishmania infantum* e é transmitida pela picada do mosquito flebótomo. Em cães com LV observa-se uma intensa reação inflamatória crônica no fígado, baço, pele, medula óssea e gânglios linfáticos. A atividade arginase é importante na LV, pois o aumento dessa enzima pode contribuir para a multiplicação do parasita e para a redução da síntese de óxido nítrico (NO), predispondo o macrófago à infecção. A prostaglandina E₂ (PGE₂) pode regular a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e da interleucina-10 (IL-10), porém nenhum estudo ainda foi realizado em cães com LV. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade arginase em macrófagos aderentes de cultura de linfonodos de 23 cães naturalmente infectados e 18 saudáveis, e os níveis de NO e PGE₂ no sobrenadante dessas culturas. O efeito regulatório de PGE₂ na produção de TNF- α e IL-10 também foi avaliado em cultura de leucócitos totais de linfonodo. Esse estudo ajuda a esclarecer o mecanismo da resposta imunológica na LVC.

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

**ARGINASE LEVELS OF NITRIC OXIDE AND THE EFFECT OF PGE₂ ON
TNF-A PRODUCTION BY LYMPH NODE DOGS WITH VISCERAL
LEISHMANIASIS**

SUMMARY - Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic disease that can be fatal to humans and dogs. The disease is caused by the intracellular parasite *Leishmania infantum* and is transmitted by the bite of the sandfly (phlebotomines). In dogs, VL is observed as an intense chronic inflammatory reaction in the liver, spleen, skin, bone marrow and lymph nodes. Arginase activity is important in VL because an increase of this enzyme may contribute to the multiplication of the parasite and a reduction of nitric oxide (NO) synthesis, predisposing a macrophage to infection. Prostaglandin E₂ (PGE₂) can play a regulatory role in the production of tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10), however, there have been no studies in dogs with LV. This study aimed to evaluate the arginase activity in adherent macrophages cultivated from the lymph nodes of 18 healthy and 23 naturally infected dogs and to examine levels of NO and PGE₂ in the supernatant of these cultures. The regulatory effect of PGE₂ on the production of TNF- α and IL-10 was also evaluated in supernatants of total lymph node leukocytes cultures. These results help to clarify the mechanisms of the immune response in CVL.

Keywords: Dogs, Indomethacin, *Leishmania infantum*, Zoonoses

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania* que incluem a forma cutânea, a visceral e mucocutânea (RIOUX et al., 1990), é transmitida por vetores flebotomíneos (Diptera: *Psychodidae*) (REITHINGER; DAVIES, 1999), do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (DESJEUX, 2001).

Em relação ao ciclo biológico, o protozoário se apresenta sob duas formas: promastigota e amastigota. A forma promastigota flagelada, encontrada no intestino delgado do inseto vetor (hospedeiro intermediário), é transmitida ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo, pela fêmea do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*; já a forma amastigota, parasita intracelular aflagelado, encontrado nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

Os protozoários após serem fagocitados pelos macrófagos adquirem a forma amastigota e são transportados para os linfonodos regionais (SARIDOMICHELAKIS, 2009). A progressão da infecção está relacionada ao vetor, ao parasito e à resposta imune do hospedeiro (BAÑULS et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009)

As espécies de *Leishmania* que induzem à doença visceral é a *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* nas Américas (ALVAR et al., 2004).

A leishmaniose visceral tem sido relatada em pelo menos 98 países, e 90% dos casos de LV globais ocorrem em apenas 6 países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012). No mundo o número oficial de casos relatados de leishmaniose visceral é de aproximadamente 58.000 por ano (ALVAR et al., 2012). A migração das zonas rurais para as zonas urbanas, o rápido crescimento e urbanização não planejada conduziu a uma rápida urbanização da LV no Brasil e em outros países da América do Sul (DESJEUX, 2004).

O cão é o principal reservatório da leishmaniose visceral, que é causada por *L. infantum* no "Velho Mundo" e "*L. chagasi*" no "Novo Mundo"; estes são geralmente considerados como sendo espécies sinónimas transmitidas por insetos do género *Phlebotomus* e *Lutzomyia* respectivamente (WHO, 1990).

Os cães são de extrema importância na manutenção do ciclo epidemiológico da LV, já que apresentam grande quantidade de parasita na pele, podendo infectar os humanos (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). A leishmaniose em cães é prevalente em áreas endêmicas podendo atingir de 20 a 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990).

O parasito é transmitido nos cães principalmente pela picada de flebotomíneos, mas já foi visto que há possibilidade de outras formas de transmissão por artrópodes vetores, como carrapatos e pulgas (COUTINHO et al., 2007; FERREIRA et al., 2009) e também por transfusão sanguínea. (OWENS et al., 2001).

Após a alimentação de flebotomíneos no sangue dos cães os parasitas rapidamente se espalham para os linfonodos e baço, através da linfa e sangue e, eventualmente, atingem os rins e fígado. Eles podem também afetar os órgãos reprodutores, sistema digestivo e respiratório, pele e bexiga (MOLYNEUX; ASHFORD, 1983).

No hospedeiro vertebrado canino, o parasita pode causar lesões e sintomas característicos de leishmaniose visceral canina (LVC), embora alguns cães infectados possam ser assintomáticos, sintomáticos e oligossintomáticos (MANCIANTI; MECIANI, 1988), e alguns podem evoluir para a cura espontânea (FISA et al., 1999).

A LVC é caracterizada como uma doença crônica cujos sinais clínicos mais frequentes observados são apatia, anorexia, perda de peso, febre, palidez das mucosas, intolerância ao exercício, perda de massa muscular, linfadenopatia periférica generalizada, hepatomegalia, esplenomegalia, epistaxe e lesões cutâneas (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os animais portadores apresentam hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear, com a proliferação de macrófago, que na maioria dos casos

resultam em linfadenopatia generalizada. Os linfonodos desses cães costumam apresentar linfadenite crônica. O infiltrado inflamatório é composto por macrófagos, plasmócitos e linfócitos e estão presentes na região cortical e medular (LIMA et al., 2004). Em cães assintomáticos é observada hipertrofia das zonas da cortical, enquanto que nos cães sintomáticos se observa atrofia dessa área (GIUNCHETTI et al., 2008). A infecção dos macrófagos pode ter ocorrido na derme antes da migração para os linfonodos regionais ou nos linfonodos após infiltração de células não infectadas a partir da corrente sanguínea (SAINT-ANDRÉ et al., 1997).

Há um aumento do número de células CD8 +, mas uma diminuição do número de células CD21+, possivelmente devido à sua diferenciação em células plasmáticas (GIUNCHETTI et al., 2008). O resultado final é a linfadenopatia periférica, um dos sinais mais comuns de LVC (KOUTINAS et al., 1999).

O parasito pode se replicar em tecidos como medula óssea, fígado, baço e linfonodos, de forma que a resposta imunológica depende do tecido acometido (GIUNCHETTI et al., 2008; REIS et al., 2009; SANCHEZ et al., 2004).

O principal anticorpo que aumenta nos cães infectados é o IgG (PINELLI et al., 1994). Portanto muitos testes sorológicos indiretos foram desenvolvidos visando o diagnóstico rápido para a doença como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a reação imunoenzimática (ELISA) e os dispositivos imunocromatográficos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). O método sorológico de ELISA indireto tem sido empregado por ser um teste sensível, com facilidades técnicas e econômicas (LIMA et al., 2003).

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por métodos de detecção molecular do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com amplificação do DNA do parasito, em amostra de nódulos linfáticos, pele, conjuntiva, sangue ou medula óssea de cães infectados. A especificidade e sensibilidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de iniciadores, número de cópias do alvo, método de extração de DNA, biópsia do

material e tipos de protocolo da PCR (FRANCINO et al., 2006; GONTIJO; MELO, 2004).

Nos cães infectados a ausência da resposta das células T aos antígenos de *Leishmania* spp. é observada, *in vivo*, com um teste de hipersensibilidade do tipo tardia negativa (DOS-SANTOS et al., 2008), e redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU et al., 1997).

A imunossupressão associada à infecção crônica ocorre devido a altas taxas de apoptose das células T e esse mecanismo pode contribuir para a desorganização da polpa branca do baço e diminuição dos níveis de células T no sangue periférico (LIMA et al., 2012).

A imunidade protetora tem geralmente sido associada ao desenvolvimento da imunidade do tipo celular com resposta linfoproliferativa positiva a antígenos de *Leishmania* spp. (CABRAL et al., 1992) e produção de citocinas, tais como IFN-gama e TNF- α , as quais são necessárias para ativação de macrófagos e morte de parasitas intracelulares (SADICK et al., 1991).

Os macrófagos tem papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp, pois são células parasitadas e, além disso, desencadeiam a resposta adaptativa (OSORIO et al., 2012). A célula T responde ao antígeno através do engajamento do receptor TCR da célula T no MHC associado ao peptídeo no macrófago. A função efetora desta interação é determinada por sinais adicionais da ligação de moléculas coestimulatórias sobre a superfície das células T e seus ligantes nas células apresentadoras de antígeno. Dependendo da natureza e magnitude desses sinais a célula irá gerar citocinas ou desenvolver funções regulatórias ou citotóxicas, indução de memória ou energia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007).

A resposta inflamatória aguda é caracterizada pela presença de macrófagos M1, e as fases inflamatórias crônicas ou de resolução são mediadas pelo enriquecimento de macrófagos M2 (MURRAY; WYNN, 2011). A classificação de macrófagos M1 / M2 é uma consequência da via metabólica do uso da arginina. Nos macrófagos M1 a arginina é metabolizada pela óxido

nítrico sintase (NOS) para gerar NO e citrulina; em macrófagos M2 a arginina é degradada pela arginase em ornitina e ureia (MILLS, 2012). Os macrófagos M1 ou M2 dominantes direcionam os linfócitos T para produzir respostas Th1 ou Th2, respectivamente, amplificando ainda mais as respostas do tipo M1 ou M2 nas respostas imunológica à infecção, tumor ou inflamação (MILLS, 2012).

A arginase é considerada uma enzima do ciclo de ureia no fígado, mas ocorre em vários órgãos e tecidos onde não há um ciclo funcional da ureia (CEDERBAUM et al., 2004). É importante notar que o ciclo de ureia completa tenha sido descrito em macrófagos (HOFMANN et al., 1978).

Duas isoformas distintas da arginase foram identificadas em mamíferos, que são codificadas por genes diferentes e diferem na sua localização celular, bem como em seu modo de regulação: arginase tipo 1, uma enzima citosólica expressa em níveis elevados no fígado como um componente do ciclo de ureia (CEDERBAUM et al., 2004), e a arginase do tipo 2, que é uma enzima mitocondrial com distribuição tecidual generalizada, com maior destaque no rim, glândula mamária lactante, próstata, intestino delgado e cérebro (MUNDER et al., 1999).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS), localizados em diferentes tipos de células (BOGDAN et al., 2000; NATHAN, 1997). Uma vez que o NO é muito instável, a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é utilizada para avaliar o potencial de produção de NO. A produção de NO por macrófagos ativados é necessária para a destruição efetiva de uma vasta gama de agentes patogênicos, tais como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; SHIN et al., 2000; STENGER et al., 1996). O óxido nítrico é uma importante molécula efetora, na regulação da resposta imunológica. A sua atividade leishmanicida foi observada em macrófagos humanos (PANARO et al., 2001) e de camundongos (MAUËL et al., 1991).

Leishmania são parasitas intracelulares obrigatórios; depois da transmissão ao hospedeiro mamífero, eles invadem principalmente

macrófagos, que são células efectoras decisivas que matam ou hospedam os parasitas intracelulares dependendo do balanço de duas enzimas induzíveis, óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e a arginase (KROPF et al., 2004; MUNDER et al., 1999). Estas duas enzimas utilizam um substrato comum, L-arginina, e são reguladas de forma competitiva por citocinas secretadas por células Th1 e Th2 (MODOLELL et al., 1995; MUNDER et al., 1998; MUNDER et al., 1999). As citocinas Th1 que induzem a ativação de macrófagos e a NOS2 oxidam L-arginina, gerando óxido nítrico (NO) (BOGDAN, 2001; WEI et al., 1995). As citocinas Th2 resultam na ativação alternativa de macrófagos e na indução da arginase, que hidrolisa L-arginina em ornitina, um aminoácido que é a principal fonte intracelular para a síntese de poliaminas (GOERDT; ORFANOS, 1999; MUNDER et al., 1998; ROBERTS et al., 2004)

Na Leishmaniose, o metabolismo da L-arginina parece ser um regulador importante da resposta imunológica. Na leishmaniose tegumentar humana a arginase 1 leva à falha da resposta T reduzindo a L-arginina disponível e, em consequência, observa-se hiporesposta das células T (MODOLELL et al., 2009). Na doença visceral em hamster, a indução de arginase é acompanhada de incremento de poliaminas que favorecem o crescimento do parasita (OSORIO et al., 2012). A alta atividade da arginase já foi observada no sangue de pacientes com LV (ABEBE et al., 2013) sendo considerado um marcador do agravamento da doença humana (TAKELE et al., 2013).

Além de suas funções microbicidas o NO contribui para a destruição dos tecidos em doenças inflamatórias / auto-imunes (KOLB; KOLB-BACHOFEN, 1998), pode também exercer funções fisiológicas, de defesa imunitária para a regulação da pressão sanguínea para a inibição da agregação plaquetária (LOWENSTEIN et al., 1994). NO tem demonstrado ser uma molécula crucial e versátil na regulação do tônus vascular, neurotransmissão, inflamação aguda e crônica e de mecanismos de defesa do hospedeiro (MICHEL; FERON, 1997; MAEDA; AKAIKE, 1998; DI VIRGILIO, 2004). O NO Pode atuar como um agente pró-inflamatório e anti-inflamatório (GRANGER; KUBES, 1996) ou agente imunossupressor (MACIEJEWSKI et al., 1995) através dos seus efeitos

inibitórios sobre as células apoptóticas (BRÜNE, et al., 1999; LI; BILLIAR, 2000; OKUDA, et al., 1996).

Semelhante ao NO as prostaglandinas podem também exercer papel pró-inflamatório e anti-inflamatório (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). As prostaglandinas são pequenas moléculas lipídicas que regulam vários processos no corpo, incluindo a função renal, a agregação de plaquetas, a libertação de neurotransmissores e a modulação da função imunológica (GOETZL et al., 1995; PHIPPS et al., 1991). Uma das prostaglandinas mais conhecidas e mais bem estudadas é PGE_2 , que podem ser produzidas por todos os tipos de células do corpo, sendo epitélio, fibroblastos e células inflamatórias infiltrantes que representam as principais fontes de PGE_2 no decurso de uma resposta imune. O processo de síntese de PGE_2 envolve a fosfolipase A2, que mobiliza ácido araquidônico a partir de membranas celulares (LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999), ciclo-oxigenases (COX1 constitutivamente ativa e induzível COX-2) que convertem o ácido araquidônico em prostaglandina H2 (PGH2), e sintase de prostaglandina E (PGES), necessária para a formulação final de PGE_2 (PARK et al., 2006). Enquanto a taxa de síntese de PGE_2 e o processo inflamatório resultante podem ser afetados por fatores adicionais, tais como a disponibilidade local de Ácido Araquidônico, na maioria das condições fisiológicas, a taxa de síntese de PGE_2 é controlada pela expressão local e pela atividade de COX-2.

PGE_2 é conhecida por exercer sua ação por ligações distintas à membrana celular associada à proteína G, acoplada a receptores prostanóides de séries – E (EP) denominados EP1, EP2, EP3, EP4 (KALINSKI, 2012). Esses receptores acoplados à proteína G estão ligados às diferentes vias de transdução, que pode produzir efeitos opostos, tais como ativação ou inibição das respostas celulares (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

PGE_2 se liga à diferentes receptores EP, os quais podem regular a função de muitos tipos de células incluindo macrófagos, células dendríticas e os linfócitos T e B, levando a efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. Como mediador pró-inflamatório, a PGE_2 contribui para a regulação do perfil de

expressão de citocinas de células dendríticas (CD)s e tem sido relatada capaz de polarizar a diferenciação de células T para Th1 ou Th2 (EGAN et al., 2004). Um estudo mostrou que a sinalização de PGE₂-EP4 em células T e células dendríticas facilitam a diferenciação para Th1 e Th17 dependente de IL-23 (YAO et al., 2009). Além disso, a PGE₂ é fundamental para a indução de um fenótipo de célula dendrítica que permite a sua migração para os nódulos linfáticos drenantes (KABASHIMA et al., 2003; LEGLER et al., 2006). Simultaneamente, a estimulação de PGE₂ no início da maturação da célula dendrítica induz à expressão de moléculas co-estimuladoras da superfamília do TNF, resultando em um aumento de ativação de células T (KRAUSE et al., 2009). Em contraste, foi também demonstrado que a PGE₂ pode suprimir a diferenciação de Th1, as funções das células B e reações alérgicas (HARRIS et al., 2002). Além disso, PGE₂ pode exercer ações anti-inflamatórias nas células imunitárias inatas como neutrófilos, monócitos e células NK (HARRIS et al., 2002).

A PGE₂ regula múltiplos aspectos da inflamação em diferentes células imunes (PHIPPS et al., 1991), além disso, tem potentes propriedades imunossupressoras incluindo a inibição da ativação dos macrófagos, quimiotaxia de leucócitos e modulação de quimiocinas (ARMSTRONG, 1995; CHEON et al., 2006).

Células esplênicas murinas infectadas com *Leishmania donovani* produzem mais PGE₂ do que as de camundongos não infectados (REINER; MALEMUD, 1984) e, macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania donovani*, secretam PGE₂ (REINER; MALEMUD, 1985). A PGE₂ pode também regular a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais e células esplênicas de camundongos infectados com *L. donovani* (SAHA et al., 2014).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) tem importantes propriedades pró-inflamatórias, as quais desempenham papéis cruciais na imunidade inata e adaptativa, na proliferação celular e em processos apoptóticos. Essa citocina é produzida principalmente por macrófagos, com ação ampla em várias células

do corpo, incluindo monócitos, células T, células musculares lisas, fibroblastos e adipócito (AGGARWAL, 2003). O TNF- α é uma citocina que tem atividade antitumoral e também atua contra a infecção aguda e crônica (BEUTLER, 2003; POPA et al., 2007). Esta citocina está envolvida na defesa do hospedeiro contra inúmeros patógenos intracelulares, por meio de estimulação de diferentes células efetoras que participam de diversos mecanismos antimicrobianos (BEUTLER; CERAMI, 1987). A ação do TNF- α com IFN- γ , ativa os macrófagos destruindo *Leishmania spp.* (THEODOS et al., 1991). No entanto já foi observado que esta citocina pró-inflamatória pode ter efeito prejudicial em diversas respostas imunes a agentes infecciosos (BEUTLER; GRAU, 1993; VASSALLI, 1992). O papel protetor dessa citocina foi observado no baço de cães com LV, em que fraca correlação negativa foi observada entre a expressão de TNF- α e a carga parasitária no baço (CAVALCANTI et al., 2015). Em camundongos o TNF- α é essencial para o controle da LV (WILHELM et al., 2001). Já foi observado também que o TNF- α aumenta a produção de NO em macrófagos caninos (PINELLI, et al., 2000).

A IL-10 é produzida por diferentes tipos de células, tais como macrófagos, células dendríticas, células B e diferentes subtipos de linfócitos T (KAMANAKA et al., 2006, MOORE et al., 2001). Além disso, a IL-10 pode atuar diretamente sobre as células T CD4+ através da inibição da proliferação e produção de IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5 e TNF- α (JOSS et al., 2000; MOORE et al., 2001; SCHANDENÉ et al., 1994). Em modelos murinos e humanos infectados com *Leishmania spp.*, tem sido relatado que IL-10 pode estar suprimindo a resposta imunológica (BACELLAR et al., 2000, BARRAL et al., 1993), esta citocina pode estar contribuindo para o aumento do parasito na célula e conseqüentemente induzindo à progressão da doença (INIESTA et al., 2002). Em cães com LV os níveis de IL-10 no baço e fígado foram superiores quando comparado aos cães saudáveis (MICHELIN et al., 2011). Já foi relatado que a IL-10 no soro de pacientes com LV aumenta a replicação do parasita em macrófagos humanos e que o bloqueio da IL-10 reduziu o crescimento dos parasitas (NYLÉN et al., 2007).

OBJETIVOS

Avaliar a atividade da arginase em cultura de macrófagos aderentes proveniente dos linfonodos de cães naturalmente infectados e saudáveis, os níveis de NO e PGE₂ no sobrenadante dessas culturas. Adicionalmente objetiva-se avaliar o efeito regulatório de PGE₂ na produção de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de leucócitos totais de linfonodo de cães naturalmente infectados e saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T.; TAKELE, Y.; WELDEGEBREAL, T.; CLOKE, T.; CLOSS, E.; CORSET, C.; HAILU, A.; HAILU, W.; SISAY, Y.; CORWARE, K.; CORSET, M.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MÜLLER, I.; KROPF, P. Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e2134, 2013.
- AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 745-756, 2003.
- ALVAR, J.; CANÁVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.**, v. 7, p. e35671, 2012.
- ARMSTRONG, R.A. Investigation of the inhibitory effects of PGE2 and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 2903-2908, 1995.
- BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine.**, v. 12, p. 1228-1231, 2000.
- BAÑUS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1-109, 2007.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 1097-1106, 2007.
- BEUTLER, B. Tumor necrosis factor (TNF). In: HENRY, H.L.; NORMAN, A.W. (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, p. 536-539, 2003.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin--tumour necrosis factor: a cytokine that mediates injury initiated by invasive parasites. **Parasitol. Today.**, v. 3, n. 11, p. 345-346, 1987.
- BEUTLER, B.; GRAU, G.E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit. Care Med.**, v. 21, n. 10, p. 423-425, 1993.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 121-134, 1998.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 12, p. 64-76, 2000.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRÉ, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 345-351, 1997.
- BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. **Cell. Death. Differ.**, v. 6, p. 969-975, 1999.
- CABRAL, M.; GRADY, J. O.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v. 14, p. 531-539, 1992.

CAVALCANTI, A.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L.E.O.; MESTRE, G.L.; FERREIRA, A.B.; MORGADO, F.N.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; MORAES, M.O.; PORROZZI, R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One.**, v. 10, p. e0123009, 2015.

CEDERBAUM, S.D.; YU, H.; GRODY, W.W., KERN, R.M., YOO, P., IYER, R.K. Arginases I and II: do their functions overlap? **Mol. Genet. Metab.**, v. 81, Suppl 1, p. S38-44, 2004.

CHEON, H.; RHO, Y.H.; CHOI, S.J.; LEE, Y.H.; SONG, G.G.; SOHN, J.; WON, N.H.; JI, J.D. Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. **J. Immunol.**, v. 177, p. 1092-1100, 2006.

COUTINHO, M.T.Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals?. **Vet. Parasitol.**, v. 147, p. 320-325, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n.5, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DI VIRGILIO, F. New pathways for reactive oxygen species generation in inflammation and potential novel pharmacological targets. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, p. 1647-1652, 2004.

DOS-SANTOS, W.L.; JESUS, E.E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A.M.; SANTOS, J.C.; BALEEIRO, C.O.; NASCIMENTO, E.G.; MOREIRA, E.D.; OLIVEIRA, G.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, p 251-259, 2008.

EGAN, K.M.; LAWSON, J.A.; FRIES, S.; KOLLER, B.; RADER, D.J.; SMYTH, E.M.; FITZGERALD, G.A. COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. **Science.**, v. 306, p. 1954-1957, 2004.

FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.R.M.A.F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.

FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, p. 87-97, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 137, n.3/4, p. 214-221, 2006.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS FILHO, O.A.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W., MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, R.C.; REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 121, p. 23-33, 2008.

GOERDT, S.; ORFANOS, C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. **Immunity.**, v. 10, p. 137-142, 1999.

GOETZL, E.J.; AN, S.; SMITH, W.L. Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. **FASEB J.**, v. 9, p. 1051-1058, 1995.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 338-349. 2004.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. Nitric oxide as antiinflammatory agent. **Methods Enzymol.**, v. 269, p. 434-442, 1996.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol.**, v. 23, p. 144-150, 2002.

HOFMANN, F.; KREUSCH, J.; MAIER, K.P.; MUNDER, P.G.; DECKER, K. The urea cycle in different types of macrophages. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 6, p. 990-993, 1978.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L.C.; MOLANO, I.; MOHEDANO, A.; CARCELÉN, J.; MIRÓN, C.; ALONSO, C.; CORRALIZA, I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. **Parasite Immunol.**, v. 24, p. 113-118, 2002.

JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 1683-1690, 2000.

KABASHIMA, K.; SAKATA, D.; NAGAMACHI, M.; MIYACHI, Y.; INABA, K.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. **Nat. Med.**, v. 9, p. 744-749, 2003.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J. Immunol.**, v. 188, p. 21-28, 2012.

KAMANAKA, M.; KIM, S.T.; WAN, Y.Y.; SUTTERWALA, F.S.; LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J.E.; HARHAJ, E.; FLAVELL, R.A. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. **Immunity.**, v. 25, p. 941-952, 2006.

KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator?. **Immunol. Today.**, v. 19, p. 556-561, 1998.

KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 35, p. 376-383, 1999.

KRAUSE, P.; BRUCKNER, M.; UERMOSI, C.; SINGER, E.; GROETTRUP, M.; LEGLER, D.F. Prostaglandin E2 enhances T cell proliferation by inducing the co-stimulatory molecules OX40L, CD70 and 4-1BBL on dendritic cells. **Blood.**, v. 113, p. 2451–2460, 2009.

KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; MODOLELL, M.; PRICE, H.P.; HERATH, S.; ANTONIAZI, S.; GALANOS, C.; SMITH, D.F.; MÜLLER, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1920-1928, 2004.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 162-170, 1999.

LEGLER, D.F.; KRAUSE, P.; SCANDELLA, E.; SINGER, E.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is generally required for human dendritic cell migration and exerts its effect via EP2 and EP4 receptors. **J. Immunol.**, v. 176, p. 966-973, 2006.

LI, J.; BILLIAR, T.R. The role of nitric oxide in apoptosis. **Semin. Perinatol.**, v. 24, p. 46-50, 2000.

LIMA, V.M.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; EUGENIO, F.R.; SANTOS, P.S.; ROZZA, D.B.; MACHADO, G.F. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, n. 2/4, p. 147-153, 2012.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 485-489, 2003.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; DE MELO, M.N.; LUIZ TAFURI, W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.**, v. 92, p. 43-53, 2004.

LOWENSTEIN, C.J.; DINERMAN, J.L.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann. Intern. Med.**, v. 120, p. 227-237, 1994.

- MANCIANTI, F.; MECIANI, N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, p. 1409-1411, 1988.
- MACIEJEWSKI, J.P.; SELLERI, C.; SATO, T.; CHO, H.J.; KEEFER, L.K.; NATHAN, C.F.; YOUNG, N.S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p. 1085-1092, 1995.
- MAEDA, H.; AKAIKE, T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. **Biochemistry (Mosc.)**, v. 63, p. 854-865, 1998.
- MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, p. 73-82, 1991.
- MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2146-2152, 1997.
- MICHELIN, F. A.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.105, n.5, p.373-383, 2011.
- MILLS, C.D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit. Ver. Immunol.**, v. 32, n. 6, p. 463-88, 2012.
- MODOLELL, M.; CHOI, B.S.; RYAN, R.O.; HANCOCK, M.; TITUS, R.G.; ABEBE, T.; HAILU, A.; MÜLLER, I.; ROGERS, M.E.; BANGHAM, C.R.; MUNDER, M.; KROPF, P. Local suppression of T cell responses by arginase-induced L-arginine depletion in nonhealing leishmaniasis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e480, 2009.
- MODOLELL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 1101-1104, 1995.

- MOLYNEUX, D.H.; ASHFORD, R.W. The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals. London: Taylor & Francis, 1983.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. **J. Immunol.**, v. 160, p. 5347-5354, 1998.
- MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORÁN, J.M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 3771-3777, 1999.
- MURRAY, P.J.; WYNN, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11 p. 723–737, 2011.
- NATHAN, C. Perspectives series: nitric oxide and nitric oxide synthases. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2417–2423, 1997.
- NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; MANANDHAR, K.D.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 805-817, 2007.
- OSORIO, E.Y.; ZHAO, W.; ESPITIA, C.; SALDARRIAGA, O.; HAWEL, L.; BYUS, C.V.; TRAVI, B.L.; MELBY, P.C. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PLoS Pathog.**, v. 8, p. e1002417, 2012.
- OKUDA, Y.; SAKODA, S.; SHIMAOKA, M.; YANAGIHARA, T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. **Immunol. Lett.**, v. 52, p. 135-138, 1996.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT K.; HATCHETT, W.; WALTON R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, p. 1076–1083, 2001.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, v. 1, p. 137-143, 2001.

PARK, J.Y.; PILLINGER, M.H.; ABRAMSON, S.B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. **Clin. Immunol.**, v. 119, p. 229-240, 2006.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN L.; PARDOLL, D.M.; LLISON, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p. 17765-70, 2007.

PHIPPS, R.P.; STEIN, S.H.; ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today.**, v. 12, p. 349-352, 1991.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v.62, p.229-335, 1994.

POPA, C.; NETEA, M.G.; VAN RIEL, P.L.C.M.; VAN DER MEER, J.W.M.;

STALENHOEF, A.F.H. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions,

intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research.**, v.48, n.4, p.751-762, 2007.

REINER, N.E.; MALEMUD, C.J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **J. Immunol.**, v. 134, p. 556-563, 1985.

REINER, N.E.; MALEMUD, C.J. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): *ex-vivo* evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. **Cell. Immunol.**, v. 88, p. 501-510, 1984.

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

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 530-541, 1999.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, p. 986-1000, 2011.

RIOUX, J.A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 65, p. 111-125, 1990.

ROBERTS, S.C.; TANCER, M.J.; POLINSKY, M.R.; GIBSON, K.M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 23668-23678, 2004.

SADICK, M. D.; STREET N.; MOSMANN, T. R.; LOCKSLEY, R. M. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate

progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4710-4714, 1991.

SAHA, A.; BISWAS, A.; SRIVASTAV, S.; MUKHERJEE, M.; DAS, P.K.; UKIL, A. Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 193, p. 2330-2339, 2014.

SAINT-ANDRÉ, M.I.; MARCHAL, T.; MOORE, P.F.; MAGNOL, J.P.; BOURDOISEAU, G. Infection of canine langerhans cell and interdigitating dendritic cells by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. **Rev. Med. Vet. (Toulouse)**, v. 148, p. 29-36, 1997.

SANCHEZ, M.A.; DIAS, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; J. CONVIT, J.; TAPIA F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 618–624, 2004.

SANTA ROSA I.C.A.; OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clin. Vet.**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 471-489, 2009.

SCHANDENÉ, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GÉRARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4368-4374, 1994.

SHIN, T.; WEINSTOCK, D.; CASTRO, M.D.; ACLAND, H.; WALTER, M.; KIM, H.Y.; PURCHASE, H.G. Immunohistochemical study of constitutive neuronal and inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of goat with natural listeriosis. **J. Vet. Sci.**, v. 1, p. 77-80, 2000.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 450-458, 1990.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRA, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1/2, p. 1-18, 2009.

STENGER, S.; DONHAUSER, N.; THÜRING, H.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 183, p. 1501-1514, 1996.

TAKELE, Y.; ABEBE, T.; WELDEGEBREAL, T.; HAILU, A.; HAILU, W.; HURISSA, Z.; ALI, J.; DIRO, E.; SISAY, Y.; CLOKE, T.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MÜLLER, I.; KROPF, P. Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e1977, 2013.

THEODOS, C.M.; POVINELLI, L.; MOLINA, R.; SHERRY, B.; TITUS, R.G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 8, p. 2839-2842, 1991.

VASSALLI, P.; GRAU, G.E.; PIQUET, P.F. TNF in autoimmune diseases, graft-versus-host reactions, and pulmonary fibrosis. **Immunol. Ser.**, v. 56, p. 409-430, 1992.

WEI, X.Q.; CHARLES, I.G.; SMITH, A.; URE, J.; FENG, G.J.; HUANG, F.P.; XU, D.; MULLER, W.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature.**, v. 375, p. 408-411, 1995.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.**, v. 166, p. 4012-4019, 2001.

WHO. Control of the Leishmaniases. Geneva: World Health Organization, 1990 (Technical Report Series, n. 793).

YAO, C.; SAKATA, D.; ESAKI, Y.; LI, Y.; MATSUOKA, T.; KUROIWA, K.; SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. **Nat. Med.**, v. 15, p. 633-640, 2009.

CAPÍTULO 2

**NÍVEIS DE ARGINASE, ÓXIDO NÍTRICO E O EFEITO DA PGE₂ NA
PRODUÇÃO DE TNF- α EM LINFONODO DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica podendo ser fatal para os humanos. A atividade arginase, e a síntese de óxido nítrico (NO) podem ou não predispor o macrófago à infecção. Outros fatores reguladores da resposta imunológica são a prostaglandina E₂ (PGE₂) o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-10 (IL-10), porém nenhum estudo foi realizado em cães com LV. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade arginase em macrófagos aderentes de cultura de linfonodos de cães naturalmente infectados e saudáveis, e os níveis de NO e PGE₂ no sobrenadante dessas culturas. O efeito regulatório de PGE₂ na produção de TNF- α e IL-10 foi também avaliado em cultura de leucócitos totais de linfonodo. Nossos resultados mostraram que macrófagos aderentes do linfonodo tem diminuição da atividade arginase enquanto o sobrenadante de cultura mostrou aumento da concentração do NO e PGE₂. No sobrenadante de cultura de leucócitos totais de cães infectados foi observada maior concentração de TNF- α comparado aos saudáveis. A presença do inibidor de COX-1 e COX-2 indometacina diminuiu a concentração de TNF- α no sobrenadante das culturas de leucócitos totais do linfonodo de cães infectados em relação aos cães saudáveis, porém não foi observada alteração nos níveis de IL-10. Concluímos que a PGE₂ tem papel regulador da resposta imunológica na leishmaniose visceral canina e pode estar auxiliando no controle da doença. Esses resultados ajudam a esclarecer o mecanismo da resposta imunológica na LVC.

Palavras-chave: Cães, Indometacina, *Leishmania infantum*, Zoonoses

1 Introdução

A LV é uma doença crônica que pode ser fatal para os humanos (DESJEUX, 2004). A doença é causada por um parasita intracelular, *Leishmania infantum* o qual é transmitido pela picada da fêmea do mosquito flebótomo (flebotomíneos) (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Sua ocorrência tem sido relatada em pelo menos 98 países, e 90% dos casos de LV globais ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia (ALVAR et al., 2012). No mundo o número oficial de casos relatados de leishmaniose visceral é de aproximadamente 58.000 por ano (ALVAR et al., 2012). Em cães com LV observa-se uma intensa reação inflamatória crônica, no fígado, baço, pele, medula óssea (TAFURI et al., 2001) e gânglios linfáticos (MARTÍNEZ-MORENO et al., 1993).

Os macrófagos têm papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp., pois são células parasitadas e, além disso, desencadeiam a resposta adaptativa podendo permitir ou não o crescimento do parasito (OSORIO et al., 2012). Dependendo do balanço de duas enzimas induzíveis, óxido nítrico sintase induzível 2 (iNOS) e arginase os macrófagos podem matar o parasita ou permitir seu crescimento (MUNDER et al., 1999). Nos macrófagos M1 a arginina é metabolizada pela óxido nítrico sintase (NOS) para gerar NO e citrulina (MILLS, 2012), a indução da iNOS leva a oxidação da L-arginina e subsequente produção de citrulina e NO matando o parasita (BOGDAN, 2001), enquanto em macrófagos M2 a arginina é degradada pela arginase em ornitina e ureia (MILLS, 2012). A arginase leva à produção de poliaminas que promovem o crescimento intracelular de *Leishmania* spp. (OSORIO et al., 2012). A alta atividade da arginase já foi observada no sangue de pacientes com LV (ABEBE et al., 2013) sendo considerado um marcador do agravamento da doença humana (TAKELE et al., 2013). Em macrófagos de hamster infectados com *L. donovani* também foi observado um aumento da atividade arginase (OSORIO et al., 2012), porém em cães naturalmente infectados por

Leishmania spp. a atividade arginase ainda não foi avaliada. Os macrófagos M1 ou M2 dominantes direcionam os linfócitos T para produzir respostas Th1 ou Th2, respectivamente, para amplificar ainda mais respostas do tipo M1 ou M2 nas respostas imunológicas à infecção, tumor, ou inflamação (MILLS, 2012).

O NO é uma importante molécula efetora diretamente envolvida na atividade microbicida e citotóxica dos macrófagos humanos (PANARO et al., 2001) e camundongos (MAUËL et al., 1991). Sua produção já foi observada em sobrenadante de macrófagos caninos infectados *in vitro* com promastigotas de *L. infantum* (PANARO et al., 1998) e pode estar envolvido na proteção contra a infecção natural por *Leishmania* spp. (PANARO et al., 2008). A liberação do NO por macrófagos infectados por *Leishmania* spp. e a sua atividade microbicida pode ser regulada por PGE₂ (BRANDONISIO et al., 2001; PANARO et al., 2001).

A PGE₂ regula múltiplos aspectos da inflamação em diferentes células imunes (PHIPPS et al., 1991), além disso, tem potentes propriedades imunossupressoras incluindo a inibição da ativação dos macrófagos, quimiotaxia de leucócitos e modulação de quimiocinas (ARMSTRONG 1995; CHEON et al., 2006). A PGE₂ também é conhecida por exercer sua ação por ligações distintas à proteína G ligada a guanosina trifosfato heterotrimétrica acoplada a diferentes receptores prostanóides denominados receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 (KALINSKI, 2012). A proteína G acoplada a estes receptores pode desencadear diferentes vias de transdução, que podem gerar a ativação ou inibição das respostas celulares (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Células esplênicas murinas infectadas com *Leishmania donovani* produzem mais PGE₂ do que as de camundongos não infectados (REINER; MALEMUD, 1984) e macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania donovani* secretam PGE₂ (REINER; MALEMUD, 1985). A PGE₂ pode regular a produção de TNF- α em macrófagos peritoneais e células esplênicas de camundongos infectados com *L. donovani* (SAHA et al., 2014).

O TNF- α foi observado em maiores concentrações no linfonodo (ALVES et al., 2009), baço e fígado (MICHELIN et al., 2011) de cães com LV. Em camundongos, o TNF- α é essencial para o controle da leishmaniose visceral (WILHELM et al., 2001).

A IL-10 é produzida por diferentes tipos de células, tais como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e diferentes subtipos de linfócitos T (KAMANAKA et al., 2006; MOORE et al., 2001). Além disso, a IL-10 pode atuar diretamente sobre as células T CD4⁺ por meio da inibição da proliferação e produção de IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-5 e TNF- α (JOSS et al., 2000; MOORE et al., 2001; SCHANDENÉ et al., 1994). A IL-10 tem sido indicada como a principal citocina supressora da resposta imune protetora em humanos e em modelos de murinos infectados com LV (BACELLAR et al., 2000; BARRAL et al., 1993). Em cães com LV os níveis de IL-10 no baço e fígado foram superiores quando comparado aos cães saudáveis (MICHELIN et al., 2011).

Embora o TNF- α e a IL-10 sejam importantes na resposta imunológica na LVC sua relação com a PGE₂ ainda não foi caracterizada em cães.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da arginase em cultura de macrófagos aderentes de linfonodos de cães naturalmente infectados e saudáveis, quantificar os níveis de NO e PGE₂ no sobrenadante dessas culturas. E avaliar o efeito regulatório de PGE₂ na produção de TNF- α e IL-10 em sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo. Nossos resultados esclarecem o mecanismo da resposta imunológica na LVC.

2 Material e Métodos

2.1 Aprovação do Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal (COBEA), com a aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araçatuba – Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA - em 15/04/2011, conforme o processo 00679/2011.

2.2 Animais

O grupo infectado foi constituído por 23 cães entre dois e cinco anos de idade, de várias raças e pesos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA), todos soros positivo para o antígeno de *L. infantum* determinado por ELISA indireto (LIMA et al., 2003). Os cães eram sintomáticos e apresentavam pelo menos três dos sinais clínicos de LV: linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, onicogribose, lesões perioculares e caquexia.

Para a confirmação do diagnóstico sorológico foi realizado a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Para tal, o DNA foi extraído de amostras teciduais provenientes do linfonodo utilizando reagente comercial (QiagenEasy-DNA[®], USA), de acordo com as recomendações do fabricante e seguindo protocolo previamente descrito por Perosso et al. (2014). Todos os cães infectados apresentaram amplificação de fragmento de DNA de *Leishmania* spp. em células provenientes do aspirado de linfonodo.

O grupo controle consistiu em 18 cães adultos, saudáveis de diferentes raças e pesos sendo negativos para *L. infantum*, ao teste de ELISA indireto (LIMA et al., 2003) e foi realizado extração de DNA e qPCR de células provenientes do linfonodo como descrito anteriormente. Esses cães não apresentaram DNA de *Leishmania* spp. em células provenientes do aspirados de linfonodo, esses cães apresentaram padrão de hemograma normal.

2.3 Colheita das amostras

Os leucócitos foram obtidos por punção biópsio-aspirativa do linfonodo poplíteo utilizando-se agulha fina (25 x 0,7mm). O aspirado foi diluído em 1mL de tampão de lise de eritrócitos (solução aquosa de cloreto de amônio 0,14M) para eliminação dos eritrócitos contaminantes. Após lavagem dos leucócitos com tampão de fosfato salino (PBS), pH 7,2, essas células foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,03% de L-glutamina, e 100

$\mu\text{L}/\text{mL}$ de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, para posterior contagem utilizando hemocitômetro.

2.4 Cultura macrófagos aderentes do linfonodo

As células aderentes foram obtidas após cultura a 37 °C e 5% de CO_2 em frasco para cultura celular 270 mL (TPP[®], Suíça) por uma hora, com posterior lavagem das células não aderentes. As células aderentes foram raspadas com um raspador de células (TPP[®], Suíça), centrifugadas a 2.000 rpm e ressuspensas em 1mL de meio RPMI 1640, para contagem. As células aderentes do linfonodo ($10^6/\text{mL}$) foram cultivadas em RPMI-1640 suplementado como anteriormente descrito, em placas de 24 poços (TPP[®], Suíça), a 37 °C e 5% de CO_2 , por 20 horas. O sobrenadante de cultura foi colhido e armazenado a -20 °C para a determinação de PGE_2 e NO. As células foram armazenadas na presença de inibidor de proteases Complete EDTA-free (Roche[®], Alemanha) a -20 °C até a determinação da atividade da arginase.

2.5 Cultura de leucócitos totais do linfonodo

Os leucócitos totais do linfonodo ($2 \times 10^6/\text{mL}$) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado, como anteriormente descrito, em placas de cultura de 24 poços estéreis (Jet Biofil[®], JET Bio-Filtration Products Co., Guangzhou, China) sem estímulo (controle negativo), na presença do mitógeno fitohemaglutinina 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (PHA-M, Gibco[®] Phytohemagglutinin, M form, Grand Island, NY, EUA), antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e o inibidor de COX 1 e COX 2 indometacina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) a 37 °C e 5% de CO_2 por 6 dias. Após esse período, os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a -80 °C para dosagem de TNF- α e IL-10.

2.6 Antígeno solúvel de *Leishmania infantum*

O antígeno solúvel foi realizado conforme descrito por Scott et al. (1987) com algumas modificações: foi utilizado o inibidor de protease (Complete

EDTA-free) de acordo com as recomendações do fabricante e a centrifugação final foi de 14.000 rpm.

2.7 Atividade da arginase

A atividade da arginase foi determinada a partir do lisado celular do linfonodo. Para isso, 10^6 células foram lisadas com 50 μ L de Triton X-100 a 0,1%, seguido por 30 minutos de agitação a 37 °C. Em seguida, o lisado foi incubado com 50 μ L de $MnCl_2$ (10mM) e TRIS-HCl 50 mM e a enzima foi ativada por aquecimento, a 56 °C, por 10 min. A hidrólise da L-arginina foi realizada adicionando-se 25 μ L de L-arginina 0,5 M, pH 9,7 e agitando-se a 37 °C, por 60 minutos. A reação foi parada com 400 μ L da mistura de H_2SO_4 (96%): H_3PO_4 (85%): H_2O (1:3:7 v/v/v). A concentração da ureia foi medida a 540 nm após adição de 25 μ L de α -isonitropropiofenone (ISPF) (dissolvido em etanol 100%), aquecido a 100 °C, por 45 minutos (MODOLELL, et al., 1995).

2.8 Dosagem de NO

A produção de NO foi avaliada no sobrenadante da cultura de macrófagos aderentes do linfonodo usando o reagente de Griess padrão (GREEN et al., 1982). Resumidamente, 100 μ L de sobrenadante da cultura de macrófagos foram misturados com volume igual de reagente de Griess, contendo sulfanilamida 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA) diluída em H_3PO_4 5% e N-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lidas utilizando o espectrofotômetro (SpectraCount, Packard Bio Science Company, EUA), em filtro de 540 nm. A concentração de NO foi determinada a partir da comparação a uma curva padrão de nitrito (NO_2) variando 0,78 a 200 μ M. Todas as medições foram realizadas em duplicata.

2.9 Dosagem de PGE_2

A dosagem de PGE_2 foi realizada pelo método ELISA competitivo em sobrenadante de cultura de macrófagos aderentes do linfonodo, utilizando

reagente comercial Prostaglandin E₂ (R&D System, Minneapolis, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. O limite de detecção foi de 39 pg/mL.

2.10 Determinação das citocinas TNF- α e IL-10

Os níveis de TNF- α e IL-10 foram determinados no sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo dos cães naturalmente infectados e saudáveis utilizando-se o teste ELISA de captura reagentes comerciais (Duo Set[®] Canine TNF- α , IL-10) (R&D System, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Count, Packard Bio Science Company, EUA), em filtro de 450 nm. O limite de detecção foi de 0,78 pg/mL. Todas as medições foram realizadas em duplicata.

2.11 Análise estatística

Depois de testar as variáveis quanto à normalidade e homocedasticidade, foram utilizados os testes de Mann-Whitney e o teste de Wilcoxon para investigar diferenças entre os grupos. Os testes foram realizados usando o software GraphPad Prisma 6, (GraphPad Software, La Jolla Califórnia EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Dados clínicos

Os cães infectados foram todos positivos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, o grupo foi composto por 14 fêmeas (60,86%) e 9 machos (39,13%), apresentando os seguintes sinais clínicos: onicogrifose (91,30%), caquexia (60,86%), lesões cutâneas (60,86%), lesões perioculares (43,47%) e linfadenopatia (43,47%) (Tabela 1A). O grupo de cães saudáveis foi constituído de 11 fêmeas (61,11%) e 7 machos (38,88%), clinicamente

saudáveis e todos negativos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum* (Tabela 1B).

Tabela 1A - Dados clínicos dos cães naturalmente infectados com LV

Sexo	Sinais clínicos	ELISA/densidade optica > 0.270
Fêmea	Onicogrifose, lesões cutâneas, linfadenopatia	0,630
Macho	Lesões cutâneas, caquexia, onicogrifose	0,681
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, lesões perioculares	0,430
Macho	Linfadenopatia, onicogrifose, caquexia	0,510
Macho	Linfadenopatia, onicogrifose, lesão periocular	0,480
Fêmea	Caquexia, lesões cutâneas, lesões perioculares	0,365
Fêmea	Onicogrifose, linfadenopatia, lesões cutâneas	0,717
Macho	Linfadenopatia, lesões cutâneas, caquexia	0,919
Macho	Linfadenopatia, onicogrifose, lesões perioculares	0,421
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, lesões cutâneas	0,651
Fêmea	Onicogrifose, linfadenopatia, lesões cutâneas	0,420
Macho	Onicogrifose, caquexia, lesões cutâneas	0,755
Fêmea	Onicogrifose, lesões cutâneas, lesões perioculares	0,828
Macho	Caquexia, onicogrifose, lesões perioculares	0,427
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, lesões perioculares	0,888
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, linfadenopatia	1,095
Fêmea	Onicogrifose, lesões perioculares e lesões cutâneas	1,049
Macho	Onicogrifose, lesões cutâneas, caquexia	1,113
Fêmea	Linfadenopatia, onicogrifose, caquexia	0,738
Fêmea	Onicogrifose, lesões perioculares e lesões cutâneas	1,044
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, lesões cutâneas	0,738
Fêmea	Onicogrifose, caquexia, lesões perioculares	0,812
Macho	Onicogrifose, lesões cutâneas, linfadenopatia	0,456

Tabela 1B - Dados clínicos dos cães naturalmente saudáveis

Sexo	ELISA/densidade optica < 0.270
Fêmea	0,073
Macho	0,142
Fêmea	0,038
Fêmea	0,035
Macho	0,164
Fêmea	0,051
Macho	0,012
Fêmea	0,013
Macho	0,003
Macho	0,034
Macho	0,064
Fêmea	0,060
Macho	0,187
Fêmea	0,050
Fêmea	0,007
Fêmea	0,025
Fêmea	0,087
Fêmea	0,035

3.2 Atividade da arginase, concentração de NO e PGE₂

Devido aos cães sintomáticos apresentarem alta carga parasitária (ALVES et al., 2009) e sabendo-se que as poliaminas, derivadas do metabolismo da L-arginina pela arginase são necessárias para o crescimento do parasita, a atividade da arginase foi avaliada na cultura de macrófagos aderentes de linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. ($n=14$) e de cães saudáveis ($n=11$). A atividade arginase foi maior em cultura de macrófagos do linfonodo dos cães saudáveis (Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$, Figura 1A).

Em consequência da baixa atividade da arginase observada na cultura de macrófagos aderentes do linfonodo de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp., o NO foi determinado no sobrenadante dessas culturas. O NO foi maior no sobrenadante de cultura de macrófagos aderentes dos cães infectados ($n=14$) comparado aos saudáveis ($n=11$) (Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$, Figura 1B).

Devido a alta produção de NO nos sobrenadantes de cultura de macrófagos aderentes de linfonodo de cães infectados e, sabendo-se que a PGE₂ estimula a liberação de NO em macrófagos humanos infectados com

Leishmania spp. (PANARO et al., 2001), os níveis de PGE₂ foram determinados no sobrenadante da cultura de macrófagos aderentes de cães naturalmente infectados ($n=14$) e de cães saudáveis ($n=11$). A PGE₂ foi maior no sobrenadante de cultura de macrófagos aderentes dos cães infectados (Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$, Figura 1C).

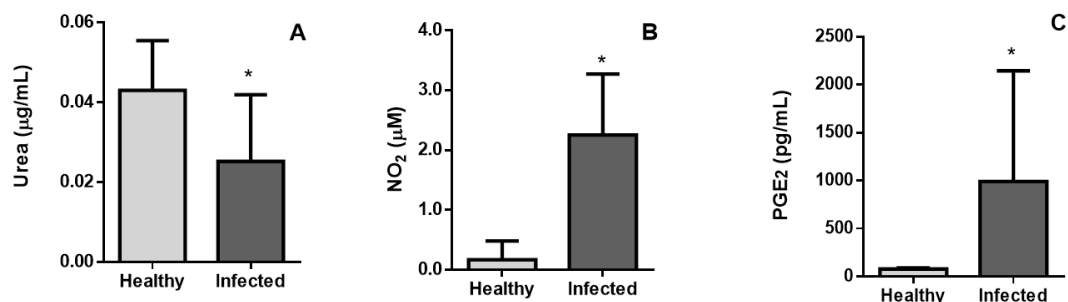


FIGURA 1 - Atividade da enzima arginase em cultura de macrófagos aderentes de linfonodo de cães naturalmente infectados ($n=13$) e saudáveis ($n=9$) (A). Concentração de NO (B) e PGE₂ (C) no sobrenadante da cultura de macrófagos aderentes de linfonodo de cães naturalmente infectados ($n=13$) e saudáveis ($n=9$). Os valores estão representados por média e desvio-padrão. (*) indica diferença estatisticamente significativa, teste de Mann-Whitney ($p<0,05$).

3.3 PGE₂ regula a produção de TNF- α e não afeta a produção de IL-10

A PGE₂ estimula a liberação de NO aumentando a produção de TNF- α (GALEA; FEINSTEIN, 1999) assim, essa citocina foi avaliada no sobrenadante de cultura de leucócitos totais de linfonodos de cães naturalmente infectados ($n=9$) e saudáveis ($n=7$), na presença ou ausência do inibidor de COX-1 e COX-2 indometacina (10µg/mL), de antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (20µg/mL) e do mitógeno fitohemaglutinina (5µL/mL). O TNF- α foi detectado em maior concentração no sobrenadante de cultura de leucócitos totais de linfonodo de cães infectados na presença ou ausência de antígeno de *Leishmania* (Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$). O TNF- α diminuiu no sobrenadante da cultura de leucócitos totais do linfonodo de cães infectados na presença do antígeno e associado ao inibidor indometacina, comparado ao sobrenadante da cultura de células estimuladas somente com o antígeno. (Teste de Wilcoxon, $p<0,05$, Figura 2A).

A PGE₂ é conhecida por ser um indutor importante da citocina IL-10 (STOLINA et al., 2000) assim, essa citocina foi avaliada no sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo de cães naturalmente infectados ($n=10$) e saudáveis ($n=5$), na presença do inibidor de COX-1 e COX-2 indometacina (10 μ g/mL), associado ao antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (20 μ g/mL) e do mitógeno fitohemaglutinina (5 μ L/mL). Os níveis de IL-10 no sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo foram maiores nos cães infectados em relação aos cães saudáveis na presença ou ausência do antígeno (Teste de Mann-Whitney, $p<0,05$, Figura 2B). A IL-10 não mostrou diferença no sobrenadante de cultura leucócitos totais do linfonodo de cães infectados na presença do antígeno e do inibidor indometacina comparado ao sobrenadante da cultura de células estimuladas somente com o antígeno (Testes de Wilcoxon, $p<0,05$).

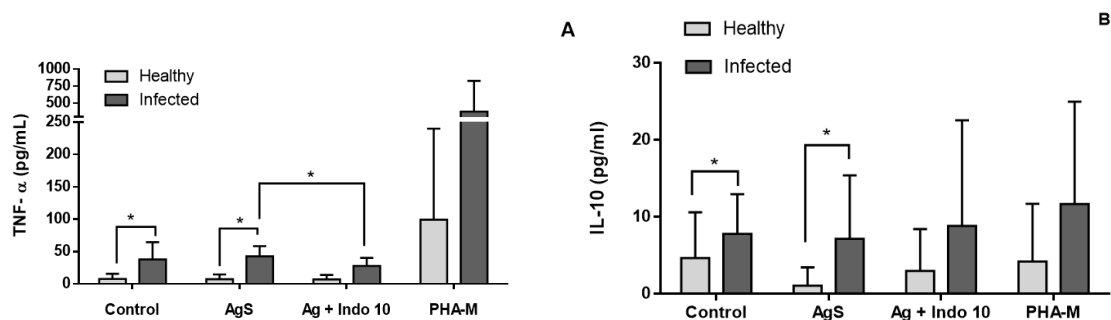


Figura 2 - Concentrações de TNF- α (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo, de cães naturalmente infectados e saudáveis na presença dos mitógeno fitohemaglutinina (5 μ L/mL), antígeno solúvel de *Leishmania infantum* (20 μ g/mL), e inibidor de COX-1 e COX-2 indometacina (10 μ g/mL) associada ao antígeno. Os dados estão representados como média e desvio padrão (*): indica diferenças estatisticamente significativas, teste de Mann-Whitney ($p<0,05$) ou teste de Wilcoxon ($p<0,05$).

4 Discussão

Nós demonstramos uma diminuição da atividade da enzima arginase em cultura de macrófagos aderentes do linfonodo de cães naturalmente infectados com LV, associada ao aumento de NO e PGE₂ no sobrenadante dessas culturas. Nos cães infectados a PGE₂ produzida nestes macrófagos está regulando a produção de TNF- α .

A baixa atividade da arginase em células aderentes de cães infectados é semelhante à observada em monócitos de pacientes com LV quando comparado a pacientes saudáveis (KUMAR et al., 2012, ROY et al., 2014). Este é o primeiro estudo que mostra a baixa atividade da arginase em macrófagos de linfonodo de cães com LVC. Estudo anterior indica alta atividade da arginase em granulócitos de pacientes com LV, e uma minoria de monócitos expressa a enzima (TAKELE et al., 2013). Futuros estudos serão necessários para definir qual célula está produzindo arginase na LVC.

A baixa atividade da arginase observada em linfonodo de cães naturalmente infectados pode ter relação com a alta expressão de iNOS detectada em linfonodo cães com LV (SANCHES et al., 2014). De fato, observamos aumento de NO no sobrenadante dessas culturas, que atuaria como microbicida já que estudo anterior mostrou correlação negativa entre a expressão de NO e o parasitismo no linfonodo (SANCHES et al., 2014).

O aumento da PGE₂ no sobrenadante da cultura de linfonodo demonstrado em cães naturalmente infectados com LV confirma o papel da PGE₂ na leishmaniose visceral, pois aumento de PGE₂ já foi observado em sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos infectados com *L. donovani* (REINER; MALEMUD, 1984) e em sobrenadante de macrófagos peritoneais de camundongos infectados *in vitro* com *L. donovani* (REINER; MALEMUD, 1985). Os macrófagos humanos infectados com *L. infantum* também produzem PGE₂ (MATTE et al., 2001), que está envolvida na imunidade anti-*Leishmania* mediada por NO (PANARO et al., 2001) assim é possível que nos cães esse fenômeno também esteja ocorrendo e que a PGE₂

regule a produção de NO atuando na resposta imune protetora contra outros patógenos intracelulares.

Nossos resultados mostraram altos níveis de TNF- α no sobrenadante de cultura de leucócitos totais do linfonodo de cães infectados com sinais clínicos da doença, semelhante a nossos achados alta expressão de TNF- α foi observada no linfonodo de cães com LV (ALVES et al., 2009). O papel protetor dessa citocina foi observado no baço de cães com LV, onde fraca correlação negativa foi observada entre a expressão de TNF- α e carga parasitária no baço (CAVALCANTI et al., 2015), sugerindo um possível papel protetor dessa citocina em linfonodo em nosso estudo.

Para investigar o efeito da PGE₂ na produção de TNF- α foi realizada cultura de linfonodo de cães naturalmente infectados na presença de indometacina. A inibição da COX-1 e COX-2 diminuiu a produção de TNF- α , sugerindo o seu envolvimento no aumento de TNF- α . Contrastando aos nossos achados foi observado um aumento da TNF- α no sobrenadante de cultura de esplenócitos de camundongos infectados com *L. donovani* e tratados com o inibidor de Cox-2 (SAHA et al., 2014), Esta diferença pode estar relacionada ao modelo experimental usado, e ao tipo de inibidor de prostaglandina.

A produção de TNF- α observada pode também estar influenciando na produção de NO, já que o TNF- α aumenta a produção de NO em macrófagos caninos (PINELLI et al., 2000).

Já foi visto que a PGE₂ é conhecida por ser um indutor importante da citocina IL-10 (STOLINA et al., 2000). A citocina IL-10 tem um importante papel regulador na LVC, sua produção já foi observada em diferentes órgãos alvos da doença (CORREA et al., 2007; MICHELIN et al., 2011). Observamos aumento de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfonodo de cães infectados quando comparado aos saudáveis, semelhante aos nossos achados aumento de RNAm para IL-10 foi observado em linfonodo de cães com LV (ALVES et al., 2009). Entretanto, na presença de indometacina não houve alteração da IL-10. Por outro lado em macrófagos peritoneais infectados com *L. donovani* e células esplênicas de camundongos infectados a PGE₂ aumentou a produção

de IL-10 (SAHA et al., 2014), sugerindo que a regulação da produção de IL-10 difere nessas espécies. Outro fator que poderia estar gerando divergência nos resultados é tipo de inibidor de prostaglandina utilizado.

Concluimos que a PGE₂ tem papel regulador da resposta imunológica e na produção de citocinas na LVC. Esses resultados ajudam a esclarecer o mecanismo da resposta imunológica na LVC.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa, (Processo 2013/06684-9), e à CAPES, por conceder a bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, T.; TAKELE, Y.; WELDEGEBREAL, T.; CLOKE, T.; CLOSS, E.; CORSET, C.; HAILU, A.; HAILU, W.; SISAY, Y.; CORWARE, K.; CORSET, M.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MÜLLER, I.; KROPF, P. Arginase activity - a marker of disease status in patients with visceral leishmaniasis in ethiopia. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e2134, 2013.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.**, v. 7, p. e35671, 2012.
- ALVES, C.F.; DE AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in

dogs naturally infected with *Leishmania*(*Leishmania*) *chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 349-358, 2009.

ARMSTRONG, R.A. Investigation of the inhibitory effects of PGE2 and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. **Br. J. Pharmacol.**, v. 116, p. 2903-2908, 1995.

BACELLAR, O.; D'OLIVEIRA, A.; JERÔNIMO, S.; CARVALHO, E.M. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine.**, v. 12, p. 1228-1231, 2000.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.**, v. 2, p. 907-916, 2001.

BRANDONISIO, O.; PANARO, M.A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. **Parassitologia.**, v. 43, p. 1-6, 2001.

CAVALCANTI, A.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L.E.O.; MESTRE, G.L.; FERREIRA, A.B.; MORGADO, F.N.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; MORAES, M.O.; PORROZZI, R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One.**, v. 10, p. e0123009, 2015.

CHEON, H.; RHO, Y.H.; CHOI, S.J.; LEE, Y.H.; SONG, G.G.; SOHN, J.; WON, N.H.; JI, J.D. Prostaglandin E2 augments IL-10 signaling and function. **J. Immunol.**, v. 177, p. 1092-1100, 2006.

CORREA, A.P.F.L.; DOSSI, A.C.S.; VASCONCELOS, R.O.; MUNARI D.P.; LIMA, V.M.F. Evaluation of Transformation Growth Factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally

infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 267-274, 2007.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n.5, p. 305-318, 2004.

GALEA, E.; FEINSTEIN, D.L. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. **FASEB J.**, v. 13, p. 2125-213, 1999.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, v. 30, p. 1683-1690, 2000.

KALINSKI, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. **J. Immunol.**, v. 188, p. 21-28, 2012.

KAMANAKA, M.; KIM, S.T.; WAN, Y.Y.; SUTTERWALA, F.S.; LARA-TEJERO, M.; GALÁN, J.E.; HARHAJ, E.; FLAVELL, R.A. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. **Immunity.**, v. 25, p. 941-952, 2006.

KUMAR, P.; KUMAR, R.; PANDEY, H.; SUNDAR, S.; PAI, K. Studies on the arginase, 5'-nucleotidase and lysozyme activity by monocytes from visceral leishmaniasis patients. **J. Parasit. Dis.**, v. 36, p. 19-25, 2012.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 485-489, 2003.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S. Immunological and histological study of T- and

B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 51, p. 49-59, 1993.

MATTE, C.; MAION, G.; MOURAD, W.; OLIVIER, M. *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 synthesis. **Parasite Immunol.**, v. 23, p. 177-184, 2001.

MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, v. 49, p. 73-82, 1991.

MICHELIN, F. A.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.105, n.5, p.373-383, 2011.

MILLS, C.D. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 32, n. 6, p. 463-88, 2012.

MODELELL, M.; CORRALIZA, I.M.; LINK, F.; SOLER, G.; EICHMANN, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 1101-1104, 1995.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MUNDER, M.; EICHMANN, K.; MORÁN, J.M.; CENTENO, F.; SOLER, G.; MODELELL, M. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 3771-3777, 1999.

OSORIO, E.Y.; ZHAO, W.; ESPITIA, C.; SALDARRIAGA, O.; HAWEL, L.; BYUS, C.V.; TRAVI, B.L.; MELBY, P.C. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PLoS Pathog.**, v. 8, p. e1002417, 2012.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; DE CAPRARIIS, D.; CAVALLO, P.; CIANCIULLI, A.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? **Parasit. Vectors.**, v. 1, p 10, 2008.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, v. 1, p. 137-143, 2001.

PANARO, M.A.; LISI, S.; MITOLO, V.; ACQUAFREDDA, A.; FASANELLA, A.; CARELLI, M.G.; BRANDONISIO, O. Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. **Cytobios.**, v. 95, p. 151-160. 1998.

PEROSSO, J.; SILVA, K.L.; FERREIRA, S.; AVANÇO, S.V.; DOS SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.R.; DE ALMEIDA, B.F.; DE LIMA, V.M. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 417-423, 2014.

PHIPPS, R.P.; STEIN, S.H.; ROPER, R.L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol. Today.**, v. 12, p. 349-352, 1991.

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

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology.**, v. 136, p. 1915-1934, 2009.

REINER, N.E.; MALEMUD, C.J. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with *Leishmania donovani*: *in vitro* evidence for parasite-induced alterations in cyclooxygenase and lipoxygenase pathways. **J. Immunol.**, v. 134, p. 556-563, 1985.

- REINER, N.E.; MALEMUD, C.J. Arachidonic acid metabolism in murine leishmaniasis (*Donovani*): ex-vivo evidence for increased cyclooxygenase and 5-lipoxygenase activity in spleen cells. **Cell. Immunol.**, v. 88, p. 501-510, 1984.
- RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, p. 986-1000, 2011.
- ROY, S.; MUKHOPADHYAY, D., MUKHERJEE, S.; GHOSH, S.; KUMAR, S., SARKAR, K.; PAL, D.; BHOWMIK, P.; MANDAL, K.; MODAK, D.; GUHA, S.K.; PRAMANIK, N.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, B.; CHATTERJEE, M. A Defective Oxidative Burst and Impaired Antigen Presentation are Hallmarks of Human Visceral Leishmaniasis. **J. Clin. Immunol.**, 2014.
- SAHA, A.; BISWAS, A.; SRIVASTAV, S.; MUKHERJEE, M.; DAS, P.K.; UKIL, A. Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 193, p. 2330-2339, 2014.
- SANCHES, F.P.; TOMOKANE, T.Y.; DA MATTA, V.L.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta Vet. Scand.**, v. 56, p. 57, 2014.
- SCHANDENÉ, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GÉRARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4368-4374, 1994.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **J. Immunol.**, v. 139, p. 221-227, 1987.
- STOLINA, M.; SHARMA, S.; LIN, Y.; DOHADWALA, M.; GARDNER, B.; LUO, J.; ZHU, L.; KRONENBERG, M.; MILLER, P.W.; PORTANOVA, J.; LEE, J.C.; DUBINETT, S.M. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor

reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. **J. Immunol.**, v. 164, p. 361-370, 2000.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 96, p. 203-212, 2001.

TAKELE, Y.; ABEBE, T.; WELDEGEBREAL, T.; HAILU, A.; HAILU, W.; HURISSA, Z.; ALI, J.; DIRO, E.; SISAY, Y.; CLOKE, T.; MODOLELL, M.; MUNDER, M.; TACCHINI-COTTIER, F.; MÜLLER, I.; KROPF, P. Arginase activity in the blood of patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 7, p. e1977, 2013.

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.**, v. 166, p. 4012-4019, 2001.