

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora,

o texto completo desta

TESE

será

disponibilizado somente a partir

de

16/08/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Campus de Araçatuba

GABRIELA LOVIZUTTO VENTURIN

**EFEITO REGULADOR DA PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α E
IL-17 NA ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE
CANINA**

Araçatuba

2019

GABRIELA LOVIZUTTO VENTURIN

**EFEITO REGULADOR DA PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF- α E
IL-17 NA ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE
CANINA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

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

Araçatuba

2019

V469e

Venturin, Gabriela Lovizutto

Efeito regulador da PGE2 na produção de TNF-alpha e IL-17 na atividade microbicida na leishmaniose canina / Gabriela Lovizutto Venturin. -- Araçatuba, 2019

60 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Prostaglandin. 2. Receptors Prostaglandin E. 3. Leishmania. 4. Dogs. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: EFEITO REGULADOR DA PGE₂ NA PRODUÇÃO DE TNF-2 E IL-17 NA ATIVIDADE
MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA

AUTORA: GABRIELA LOVIZUTTO VENTURIN
ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Valéria M. S. de Lima

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Gisele Fabrino Machado

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Júliana Regina Peiró
Profa. Dra. JÚLIANA REGINA PEIRÓ
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Sandra Helena Penha de Oliveira
Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Aparecida de Fátima Michelin
Profa. Dra. APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN
Curso de Farmácia / Universidade Paulista/UNIP- Câmpus de Araçatuba

Araçatuba, 15 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me acolher, ouvir meus pedidos e não me abandonar. Nos momentos de aflição, sua paz se faz presente em minha vida e isso me deu força para continuar a caminhada e vencer mais esta etapa em minha vida.

Agradeço a Nossa Senhora Aparecida pela intercessão, por me proteger, ouvir minhas súplicas, por dar coragem e sabedoria durante horas e horas de estudo para que eu pudesse concluir o doutorado.

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Valéria, pela disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para a realização desse estudo. O apoio prestado, a forma interessada e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho me fez crescer. Suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o meu crescimento. Serei eternamente grata pelo apoio.

Aos meus queridos pais pelo dia de hoje, um dos mais importantes da minha vida, conclusão do doutorado e eu tenho muito ou tudo a agradecer a vocês. Vocês se sacrificaram, abdicaram de tempo e projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e ter uma boa formação profissional e pessoal. Vocês seguraram as minhas mãos e caminharam juntos comigo me incentivando a seguir em frente mesmo diante dos obstáculos da vida. Obrigada, Pai e Mãe! Amo vocês!

Ao meu esposo Rafael, que me confortou nos momentos difíceis, confiou em mim e mostrou que eu seria capaz de concluir meu trabalho. Suas atitudes me encorajaram. Obrigada! Amo você!

Aos tios e primos, que com carinho e sabedoria, torceram por mim nas tomadas de decisões, me aconselharam para que eu alcançasse o meu sucesso. Sou grata a todos vocês.

Aos amigos de laboratório Larissa, Jaquelina, Gabriela, Marilene, Sidnei, Fabiana, por toda a cumplicidade, ajuda e companheirismo. Levarei todos vocês sempre em meu coração.

À Técnica de Laboratório Flávia Mari Yamamoto, obrigada pela ajuda nos experimentos. Fico feliz em saber que estou finalizando esta etapa e que a levarei como amiga para sempre em minha vida.

Aos professores Paulo Sérgio Patto e Flávia de Rezende Eugênio e ao colega Carlos Eduardo de Siqueira, pois foram importantíssimos nas cirurgias. Nossas manhãs foram muito animadas e aprendi muito com vocês!

À minha banca de qualificação Profa. e Orientadora Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, Profa. Dra. Gisele Fabrino Marques e Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira pelas relevantes considerações sobre o meu trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba pela oportunidade, por toda a infraestrutura oferecida e por ser tão bem recebida por todos.

A CAPES por me conceder bolsa de mestrado e a FAPESP pelo financiamento do projeto e por me conceder bolsa de doutorado (2016/24388-6).

VENTURIN, G.L. **Efeito regulador da PGE₂ na produção de TNF- α e IL-17 na atividade microbicida na leishmaniose canina.** 2019. 60 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A leishmaniose canina (CanL) é causada pelo parasito intracelular *Leishmania infantum*. Devido ao alto parasitismo na pele o cão é considerado o principal reservatório urbano da *L. Infantum*. A prostaglandina-E₂ (PGE₂) possui propriedades reguladoras potentes do sistema imunológico e pode se ligar aos receptores EP1, EP2 e EP4 que geram ativação celular ou EP3 que gera inibição de resposta celular. Na CanL o papel regulador da PGE₂ ainda não foi estudado, por isso, os parâmetros foram avaliados em cultura de leucócitos esplênicos de cães com CanL. Avaliando o nível de PGE₂, seus receptores, e seu efeito modulador sobre a PGE₂ na atividade da arginase, NO₂, citocinas IL-10, IL-17 e TNF- α e carga. Para isso utilizamos seus agonistas, antagonista e inibidor. Nossos resultados mostraram que a expressão do receptor EP2 diminuiu nos leucócitos esplênicos dos cães com CanL quando comparado aos cães saudáveis. Observamos que o NO₂ diminuiu quando tratados com os agonistas dos receptores de PGE₂ (EP1/EP2/EP3), antagonista dos receptores de PGE₂ (AH-6809) e inibidor de COX-2 (NS-398). A concentração das citocinas TNF- α e a IL-17 diminuíram quando tratadas com agonista do receptor de PGE₂ (EP2), e quando estimuladas com a PGE₂. A carga parasitária diminuiu na cultura de leucócitos esplênicos de cães com CanL estimulados com PGE₂. Concluímos que a infecção por *Leishmania* modula os receptores de PGE₂ em cães, e que a ligação da PGE₂ aos receptores pode ativar a capacidade microbicida das células.

Palavras – Chave: Prostaglandina. Receptores de prostaglandina. *Leishmania*. Cães.

VENTURIN, G.L. **PGE₂ regulatory effect on TNF- α and IL-17 production on microbicidal activity in canine leishmaniasis.** 2019. 60 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis (CanL) is caused by the intracellular parasite *Leishmania infantum*. Prostaglandin E₂ (PGE₂) exerts potent regulatory effects on the immune system in *Leishmania* infection, but in CanL has not yet been studied. In this study, PGE₂ and PGE₂ receptor levels and the regulatory effect of PGE₂ on arginase activity; NO₂; the IL-10, IL-17 and TNF- α and parasite load in the presence of agonists, antagonists and inhibitors were evaluated in cultures of splenic leukocytes obtained from dogs with CanL. Our results showed that splenic leukocytes from dogs with CanL had lower EP2 receptor levels than splenic leukocytes from healthy animals. We observed that NO₂ levels decreased when the cells were treated with PGE₂ receptor agonist (EP1/EP2/EP3), a PGE₂ receptor antagonist (AH-6809) or a COX-2 inhibitor (NS-398) and that TNF- α and IL-17 cytokine levels decreased when the cells were treated with a PGE₂ receptor agonist (EP2) or stimulated with PGE₂. The parasite load in splenic leukocyte cell cultures from dogs with CanL decreased after stimulation of the cells with PGE₂. We conclude that the infection of dogs by *Leishmania* modulates PGE₂ receptors and speculate that the binding of PGE₂ to its receptors may activate the microbicidal capacity of cells.

Keywords: Prostaglandin. Receptors Prostaglandin E. *Leishmania*. Dogs.

Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Sci Rep**. 2016;6(1):1–7.

41. Maia C, Nunes M, Cristóvão J, et al. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up. **Acta Trop**. 2010;116(3):193–199.
42. Das P, De T, Chakraborti T. Leishmania donovani secretory serine protease alters macrophage inflammatory response via COX-2 mediated PGE-2 production. **Indian J Biochem Biophys**. 2014;51(6):542–551.

APÊNDICE - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. Alencar, JE, Dietze R. **Leishmaniose Visceral (Calazar)**. In: Veronesi, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 1991;8:706–717.
2. Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**. 2007;37(10):1097–1106.
3. WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis: magnitude of the problem** [Internet]. 2014 [cited 2019 Mar 21]. Available from: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/
4. Lima WG, Michalick MSM, Melo MN, et al. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop**. 2004;92(1):43–53.
5. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. 2004;27(5):305–318.
6. Ministério da Saude. **Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes**. Brasil Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2017 - Dados [Internet]. 2019 [cited 15 July 2019]. Available: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/LV-Coef-Incidencia.pdf>

7. Abranches AP, Silva-Pereira MC, Conceição-Silva FM. Canine Leishmaniasis : Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. **J. Parasitol** 1991;77(4):557–561.
8. Slappendel, RJ, Ferrer L. Leishmaniasis. In: Greene, CE. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia: W. B. Saunders.1990:450–458.
9. Coutinho MTZ, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet Parasitol**. 2007;147(3–4):320–325.
10. Ferreira MGPA, Fattori KR, Souza F, et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet Parasitol**. 2009;165(1–2):150–154.
11. Owens SD, Oakley DA, Marryott K, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J Am Vet Med Assoc**. 2001;219(8):1076–1083.
12. Mancianti F, Meciani N. Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis. **Am J Vet Res**. 1988 49(8):1409–1411.
13. Fisa R, Gállego M, Castillejo S, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain). **Vet Parasitol**. 1999;83(2):87–97.
14. Noli C. **Canine Leishmaniasis**. Waltham Focus. 1999;9(2):16–24.
15. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**. 2009;165(1–2):1–18.
16. dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, et al. Associations among

- immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet Immunol Immunopathol.** 2008;123(3–4):251–259.
17. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol.** 1997;56(3–4):345–351.
 18. Santana CC, Vassallo J, de Freitas LAR, et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.** 2008;30(10):515–524.
 19. Lima VMF, Fattori KR, de Souza F, et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet Parasitol.** 2012;184(2–4):515–524.
 20. Cabral M, Grady J, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.** 1992;14(5):531–539.
 21. Turchetti AP, Costa LF, Romão EL, et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 2015;163(1–2):67–76.
 22. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, Pereira L, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One.** 2015;10(4):1–17.
 23. Osorio EY, Rodriguez LD, Bonilla DL, et al. Congenital transmission of experimental leishmaniasis in a hamster model. **Am J Trop Med Hyg.** 2012;86(5):812–820.
 24. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. **Crit Rev**

- Immunol.** 2012;32(6):463–488.
25. Abebe T, Takele Y, Weldegebreal T, et al. Arginase Activity - A Marker of Disease Status in Patients with Visceral Leishmaniasis in Ethiopia. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013;7:e2134.
 26. Takele Y, Abebe T, Weldegebreal T, et al. Arginase Activity in the Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis and HIV Infection. **PLoS Negl Trop Dis.** 2013;7:e 1977
 27. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The Inhibition of Arginase by N ω - Hydroxy-L-Arginine Controls the Growth of Leishmania Inside Macrophages. **J Exp Med.** 200;193(6):777–784.
 28. Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, et al. Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** 2016;226:69–73.
 29. Venturin GL, Chiku VM, Silva KLO, et al. M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 2016;38(11):698–704.
 30. Panaro MA, Brandonisio O, Sisto M, et al. Nitric oxide production by Leishmania -infected macrophages and modulation by prostaglandin E 2. **Clin Exp Med.** 2001;1(3):137–143.
 31. Mauël J, Ransijn A, Corradin SB, et al. Effect of PGE2 and of agents that raise cAMP levels on macrophage activation induced by IFN-gamma and TNF-alpha. **J Leukoc Biol.** 1995;58(2):217–224.
 32. Panaro MA, Lisi S, Fasanella A, et al. Evaluation of Nitric Oxide Production by *Leishmania Infantum*-infected Dog Macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** 1998;20(1):147–158.
 33. Panaro MA, Brandonisio O, de Caprariis D, et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in

- asymptomatic infection? **Parasit Vectors**. 2008;1(1):10.
34. Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. **Immunol Today**. 1991;12(10):349–352.
 35. Armstrong RA. Investigation of the inhibitory effects of PGE₂ and selective EP agonists on chemotaxis of human neutrophils. **Br J Pharmacol**. 1995;116(7):2903–2908.
 36. Cheon H, Rho YH, Choi SJ, et al. Prostaglandin E₂ augments IL-10 signaling and function. **J Immunol**. 2006;177(2):1092–1100.
 37. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E₂. **J Immunol**. 2012;188(1):21–28.
 38. Ricciotti E, Fitzgerald GA. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2011;31(5):986–1000.
 39. Penke LR, Sudan R, Sathishkumar S, et al. Prostaglandin E₂ receptors have differential effects on Leishmania major infection. **Parasite Immunol**. 2013;35(1):51–54.
 40. Saha A, Biswas A, Srivastav S, et al. Prostaglandin E₂ Negatively Regulates the Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines and IL-17 in Visceral Leishmaniasis. **J Immunol**. 2014;193(5):2330–2339.
 41. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. **J Infect Dis**. 2015;211(6):1015–1026.
 42. Quirino GFS, Nascimento MSL, Davoli-ferreira M, et al. Interleukin-27 (IL-27) Mediates Susceptibility to Visceral Leishmaniasis by Suppressing the IL-17 – **Neutrophil Response**. 2016;84(8):2289–2298.

43. Elshafie AI, Åhlin E, Håkansson LD, et al. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. **Int J Parasitol.** 2011;41(3):463–469.
44. Gradoni L. Canine Leishmania vaccines: Still a long way to go. **Vet Parasitol** 2015;208(1–2):94–100.
45. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Immunol Immunopathol.** 2009;128(4):349–358.
46. DE F Michelin A, Perri SHV, De Lima VMF. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of L. (L.) chagasi naturally infected dogs. **Ann Trop Med Parasitol.** 2011;105(5):373–383.
47. Pinelli E, Killick-kendrick R, Wagenaar J, et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with Leishmania infantum. **Infect. Immun.** 1994;62(1):229–235.
48. Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, et al. Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. **J Immunol.** 2001;166(6):4012–4019.
49. Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, et al. Infection of a canine macrophage cell line with Leishmania infantum: Determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol.** 2000;92(3):181–189.
50. Bacellar O, D'Oliveira A, Jerônimo S, et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine.** 2000;12(8):1228–1231.
51. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, et al. Expression of Interleukin-10 in Intestinal Lymphocytes Detected by an Interleukin-10 Reporter Knockin tiger Mouse. **Immunity.** 2006;25(6):941–952.