



UNESP  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO TRIPTOFANO E
PERFIL DE RESPOSTA IMUNE NA PELE DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Ana Paula Prudente Jacintho

Médica Veterinária, Mestre em Patologia Veterinária

2022

UNESP  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO TRIPTOFANO E
PERFIL DE RESPOSTA IMUNE NA PELE DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Discente: Ana Paula Prudente Jacintho

**Orientadora: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira
Vasconcelos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

2022

J12a

Jacinto, Ana Paula Prudente

Avaliação dos metabólitos do triptofano e perfil de resposta imune na pele de cães com leishmaniose visceral / Ana Paula Prudente

Jacinto. -- Jaboticabal, 2022

33 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

1. Parasitologia veterinária. 2. Imunopatologia. 3. Quinureninas. 4.
Leishmania infantum. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

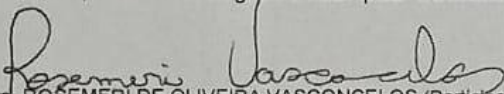
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

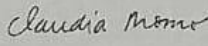
TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO TRIPTOFANO E PERFIL DE RESPOSTA IMUNE NA PELE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

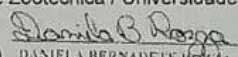
AUTORA: ANA PAULA PRUDENTE JACINTHO

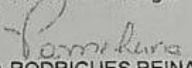
ORIENTADORA: ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

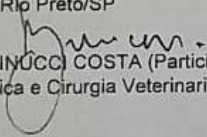
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / UNESPCâmpus de Jaboticabal


Profa. Dra. CLAUDIA MOMO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo


Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária Câmpus de AracatubaUNESP


Profa. Dra. PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA (Participação Virtual)
UNIRP / São José do Rio Preto/SP


Profa. Dra. MIRELA TINÚCCI COSTA (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA PAULA PRUDENTE JACINTHO – Nascida em 23 de fevereiro de 2022, na cidade de Santa Vitória, Minas Gerais, Brasil. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade de Franca (2003-2007). Realizou vários estágios na área de Patologia Veterinária, com experiência em diagnóstico anatomopatológico e histopatológico de animais domésticos, com ênfase em neoplasias de cães. Fez residência junto ao Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital Veterinário da FCAV - UNESP, Campus de Jaboticabal (2008-2010). Durante a residência realizou estágio na University of California, Davis (USA), em maio de 2009, interpretando alterações macro e microscópicas na área de ornitopatologia. Fez o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal da FCAV - UNESP (2012). Trabalhou no Laboratório TECSA (Tecnologia em Sanidade Animal) (2012-2014). Atuou como docente e médica veterinária no Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP) (2014 - 2017). Ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP, no curso de Doutorado, na área de concentração em Patologia Animal, em 06 de agosto de 2018, sob a orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. Durante o Doutorado foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço a vida!

Aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio e estímulo aos estudos sempre.

À minha orientadora Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por estar ao meu lado por todos esses anos de estudo e por ser um exemplo de pessoa e profissional para todos nós.

À CAPES, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa que permitiu a execução do nosso estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Capítulo 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Resposta imune a Leishmaniose Visceral.....	3
1.3 Triptofano e seus metabólitos.....	5
Referências.....	10
Capítulo 2 - Avaliação dos metabólitos do triptofano e perfil de resposta imune na pele de cães com leishmaniose visceral.....	15
Resumo.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e métodos.....	17
2.1 Análise estatística.....	21
3. Resultados.....	21
4. Discussão.....	28
5. Conclusões.....	30
Referências.....	31



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Influência do folículo piloso anágeno e do microambiente perianexal na manutenção da infecção cutânea em cães com leishmaniose visceral”**, protocolo nº 017181/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de dezembro de 2018.

Vigência do Projeto	01/03/2019 à 26/02/2021
Espécie / Linhagem	Canina
Nº de animais	30
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Centro de Controle de Zoonoses- Araçatuba

Jaboticabal, 06 de dezembro de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO TRIPTOFANO E PERFIL DE RESPOSTA IMUNE NA PELE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, cuja pele é o sítio inicial da infecção, antes da visceralização do parasita. Os efeitos imunopatológicos da resposta imune sistêmica interferem com a função dos órgãos injuriados. A enzima IDO é responsável pelo catabolismo do triptofano e esgota o L-Triptofano do microambiente local, resultando na produção de metabólitos da via quinurenina, comprometendo a função de linfócitos T e resultando em imunossupressão. Existem poucos estudos que correlacionam os metabólitos de triptofano à imunopatogenia da LV canina. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar as lesões cutâneas com a carga parasitária, a imunodeteção de subprodutos do triptofano da via da quinurenina (ácido quinurênico e ácido quinolínico), dos linfócitos Treg, das células dendríticas imaturas e maduras (CD11 e CD83 respectivamente), IL-10 e de macrófagos M1 e M2. Para isso foram utilizados fragmentos de pele (ponta de orelha e plano nasal) de 30 cães com LV (grupo infectado) e de 05 cães não infectados (grupo controle), que foram submetidas à análise imuno-histoquímica. Todas estas variáveis estavam aumentadas no grupo infectado, exceto M1 e CD83, que não diferiram estatisticamente entre os grupos, tanto na orelha quanto no plano nasal. No grupo infectado houve maior proporção de macrófagos M2, de células dendríticas imaturas, ácido quinolínico e quinurênico, IL10 e linfócitos Treg, o que indica a predominância de uma resposta imune Th2, inibição da ativação de linfócitos T e da apresentação eficiente de antígenos. Os metabólitos do triptofano no microambiente cutâneo tiveram um papel imunossupressor durante a infecção por *Leishmania infantum*, possivelmente contribuindo para a persistência da infecção na pele e com a distribuição sistêmica do parasita.

Palavras-chave: imunotolerância, *Leishmania infantum*, IDO, quinurenina.

EVALUATION OF TRYPTOPHAN METABOLITES AND IMMUNE RESPONSE PROFILE IN THE SKIN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT – Visceral Leishmaniasis (VL) is an anthroponosis caused by the protozoan *Leishmania infantum*, whose skin is the first site of infection, before the visceralization of the parasite. The immunopathological effects of the systemic immune response interfere with the function of injured organs. The IDO enzyme is responsible for tryptophan catabolism and depletes L-Tryptophan from the local microenvironment, resulting in the production of kynurenine pathway metabolites, compromising T lymphocyte function and resulting in immunosuppression. There are few studies that correlate tryptophan metabolites to the immunopathogenesis of canine VL. Therefore, the aim of this study was to compare the skin lesions with the parasite load, with the immunodetection of tryptophan by-products of the kynurenine pathway (kynurenic acid and quinolinic acid), Treg lymphocytes, immature and mature dendritic cells (CD11 and CD83 respectively), IL-10 and M1 and M2 macrophages. For this, skin fragments (ear tip and nasal plane) of 30 dogs with VL (infected group) and 05 uninfected dogs (control group) were used, which were submitted to immunohistochemical analysis. All these variables were increased in the infected group, except for M1 and CD83, which did not differ statistically between the groups, both in the ear and in the nasal plane. In the infected group, there was a higher proportion of M2 macrophages, immature dendritic cells, quinolinic and kynurenic acid, IL10 and Treg lymphocytes, which indicates the predominance of a Th2 immune response, inhibition of T lymphocyte activation and efficient antigen presentation. Tryptophan metabolites in the skin microenvironment had an immunosuppressive role during *Leishmania infantum* infection, possibly contributing to the persistence of the infection in the skin and the systemic distribution of the parasite.

Key-words: immunotolerance, *Leishmania infantum*, IDO, kynunerine.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1.1 Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, também nomeado como *Leishmania (Leishmania) infantum* (Brasil, 2017). No entanto, existem muitas controvérsias quanto as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* serem diferentes. Alguns grupos de pesquisa defendem que se tratam da mesma espécie. Por este fato, Shaw (2006) propôs o uso da nomenclatura *L. infantum chagasi*. Na América Latina, 90% dos casos descritos ocorrem no Brasil, com relatos nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e no Sul do país. Em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV resultaram em 48.455 casos (Brasil, 2017).

O cão é a principal fonte de infecção urbana para o homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Brasil, 2017). O vetor transmissor da LV é o inseto *Lutzomyia longipalpis*, conhecido como mosquito-palha (Brasil, 2017; WHO, 2018). As fêmeas desses vetores ingerem macrófagos parasitados por amastigotas da *Leishmania* spp. no momento do repasto sanguíneo em mamíferos infectados. As formas amastigotas do parasita se diferenciam nas formas infectantes promastigotas metacíclicas, no intestino do mosquito. As fêmeas, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva na pele do hospedeiro. Estas formas são fagocitadas por macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se no seu citoplasma, até o rompimento destes fagócitos, ocorrendo à liberação do parasito, que será fagocitado por novos macrófagos em um processo contínuo, ocorrendo então a disseminação sistêmica da infecção (Brasil, 2017; WHO, 2018).

Os cães soropositivos para LV são classificados como cães assintomáticos e sintomáticos e o aspecto clínico depende da imunocompetência do hospedeiro. Os sinais clínicos tornam-se evidentes dentro de um período que varia de um mês a vários anos e a sua evolução pode ocasionar o óbito. A progressão desta zoonose é crônica

e se caracteriza por manifestações clínicas e alterações laboratoriais (Santa Rosa et al., 1997, Feitosa et al., 2000, Solano-Galego et al., 2011, Brasil, 2017).

As manifestações clínicas são febre (40°C), letargia, anorexia, perda de peso, diarreia, vômito, poliúria, polidipsia, edema, hematoquezia, epistaxe, mucosas pálidas, lesões cutâneas, linfonodos periféricos aumentados, onicogribose, úlceras em cavidade oral (gengivas e bochechas), opacidade das córneas e conjuntivite purulenta, dentre outras (Santa Rosa et al., 1997, Feitosa et al., 2000, Jones et al., 2000, Brasil, 2017, Ikeda-Garcia et al., 2007, Solano-Galego et al., 2011). As anormalidades laboratoriais são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, anemia não regenerativa, trombocitopenia, proteinúria, azotemia renal e enzimas hepáticas séricas elevadas (Solano-Galego et al., 2011).

Os principais achados de necropsia são esplenomegalia, hepatomegalia e linfadenomegalia generalizada e alterações tegumentares, dentre outros (Santa Rosa et al., 1997, Jones et al., 2000, Feitosa et al., 2000). As principais lesões cutâneas são descamação, ulcerações com crostas nas orelhas, plano nasal e dorso, alopecia, hiperqueratose (Solano-Galego et al., 2004; Brasil, 2017).

Silva et al. (2016) avaliaram a pele de 13 cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. e observaram lesões ulcerativas principalmente nas regiões do cotovelo 53,84% (7/13), narina 15,38% (2/13), orelha 23,07% (3/13) e sobre a asa do ílio 7,69% (1/13). Uma elevada carga parasitária foi detectada pela técnica de imunohistoquímica em 46,15% das amostras de pele íntegra e 76,92% de pele ulcerada.

Em estudo que avaliou a pele íntegra (247 animais) e com lesões cutâneas (147 animais) de cães com LV em Belo Horizonte, o protozoário *Leishmania* spp. foi isolado de 78,7% dos cães. Destes cães, em 61,1% (151/247) foi isolado dos animais com pele íntegra e 60,5% (89/147) de cães com lesões na pele. Reforçando a hipótese de que cães assintomáticos podem ser potenciais transmissores de *Leishmania* spp. (Madeira et al., 2009).

O aspecto microscópico mais comumente encontrado na pele de cães infectados é a inflamação ao redor de folículos pilosos (principalmente do istmo), glândulas sebáceas, bem como, ao redor de vasos da derme superficial. Descreve-se a predominância de macrófagos, seguidos de plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos neste infiltrado. Cães sintomáticos apresentam grande número de formas

amastigotas na pele, mesmo quando esta, não apresenta lesões macroscópicas (Solano-Gallego et al., 2004; Reis et al., 2009, Moreira et al., 2013).

1.2 Resposta imune a Leishmaniose Visceral

Na LV, a relação hospedeiro-parasita resulta em susceptibilidade ou resistência do hospedeiro e é determinada por distintos padrões de imunidade, como a imunidade contra proteínas da saliva do vetor e contra proteínas da superfície do protozoário (Sacks e Perkins, 1985).

A eficiente apresentação de antígenos e de moléculas coestimuladoras resulta na produção de IL-12 por células dendríticas, que fagocitam os parasitas no local de inoculação e com isso, ocorre a diferenciação de linfócitos Th0 em Th1 CD4+, que produzem o IFN- γ . Esta citocina atua em macrófagos infectados por amastigotas ativando a enzima iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), que leva a produção do óxido nítrico (NO), um composto leishmanicida. O TNF- α atua sinergicamente com o IFN- γ sobre macrófagos infectados, favorecendo o aumento da ativação do iNOS, o que resulta na morte dos parasitas via NO (Bogdan et. al., 2000; Alexander e Bryson, 2005; Barbiéri, 2006).

Por outro lado, os hospedeiros que apresentam uma resposta imune predominantemente do tipo Th2, com produção de IL-4 e inibição de IL-12, são mais susceptíveis a LV. Este tipo de resposta imune predomina em hospedeiros sintomáticos (Sacks e Noben-Trauth, 2002). Reis et al. (2009) observaram em cães com severos sinais clínicos de LV e com elevada carga parasitária na pele, o predomínio de citocinas Th2.

Durante uma infecção por *Leishmania* spp., os macrófagos são ativados e sofrem uma polarização para os fenótipos M1 ou M2, em resposta aos fatores ou citocinas liberados no microambiente da injúria. Quando os macrófagos são estimulados por IFN- γ , eles se diferenciam pela via clássica em macrófagos M1, desencadeando uma resposta imune Th1. Quando os macrófagos são estimulados por IL-4, eles sofrem polarização para macrófagos M2, pela via alternativa, o que resulta em uma resposta imune do tipo Th2, e conseqüentemente, uma maior susceptibilidade do hospedeiro a infecção (Martinez et al., 2009; Tomioka et al., 2012,

Cecílio et al., 2014, Moreira et al., 2016). O imunofenótipo dos macrófagos M1 é dado pela expressão CD68 (Tidball e Villalta, 2010, Muraille et al., 2014) e nos macrófagos M2 de CD163 na membrana citoplasmática (Chan et al., 2012).

Em estudo realizado por Moreira et al. (2016), o baço, linfonodos periféricos e a pele de cães naturalmente infectados mostraram maior susceptibilidade a multiplicação de *Leishmania infantum*, devido a maior proporção de macrófagos M2 nestes tecidos. Os autores sugerem que em um ambiente com predominância de um perfil imune Th2 ocorre a influência para a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2 e permite a evasão imune e multiplicação do parasita.

Os linfócitos T CD4+ podem polarizar para linfócitos regulatórios (Treg), um fenótipo responsável por suprimir atividades potencialmente deletérias dos linfócitos T auxiliares, desempenhando um papel importante na regulação da resposta imune (Corthay, 2009). Os linfócitos Treg são importantes fontes de IL-10 no baço de cães com LV. Quando há uma porcentagem reduzida dessas células em cães infectados atribui-se a uma ativação imune persistente (Silva et al., 2014) e FoxP3 é considerado o principal marcador dos linfócitos Tregs (Figueiredo et al., 2014).

Os linfócitos T CD8+ estão envolvidos na resistência a LV canina. Reis et al. (2009) demonstraram que cães assintomáticos com LV apresentam uma maior expressão de linfócitos T citotóxicos CD8+.

As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígeno e quando ativadas produzem IL-12, que resulta na maturação de linfócitos T (Th1) produtor de IFN- γ , que por sua vez ativa macrófagos M1 e conseqüentemente permite a eliminação do parasito (Feijó et al., 2016). No baço e fígado de camundongos experimentalmente infectados verificou-se que o receptor Toll-like 9 (TLR9) contribui para o desenvolvimento da resposta imune inata na infecção por *L. Infantum*. Este mecanismo de proteção está relacionado ao recrutamento apropriado de neutrófilos ao local de infecção. Este recrutamento é diretamente coordenado por DCs mieloides e plasmocitoides, que quando ativado via TLR9, adquirem um fenótipo maduro, induzindo a liberação de mediadores quimiotáticos e recrutamento de neutrófilos ao foco de infecção e, assim, o controle da multiplicação do parasita (Sacramento et al., 2015).

1.3 Triptofano e seus metabólitos

O triptofano é um aminoácido essencial para humanos e animais e está presente em vários alimentos, como ovos, leite, carne, soja, batata, cereais, brócolis, couve-flor, berinjela, kiwi, ameixa, banana, noz, peixe, frutos do mar e tomate (Keszthelyi et al., 2009).

O homem e os animais são incapazes de sintetizar o triptofano e devem ingeri-lo na forma de proteínas, para ser hidrolisado em aminoácidos no trato digestório e conduzido ao fígado, através do sistema hepático portal (Moffett e Namboodiri, 2003). Primeiramente, o mesmo será distribuído pela corrente sanguínea para ser utilizado na síntese proteica e em outras funções celulares. Parte deste aminoácido, que não é utilizada na síntese proteica no fígado, vai participar de duas vias metabólicas: a via da quinurenina e a via da serotonina (Moffett e Namboodiri, 2003, Keszthelyi et al., 2009).

Entre 1 a 2 % do triptofano ingerido é convertido em serotonina, com importante papel na regulação de diversas funções e serve como precursora para síntese de melatonina por pinealócitos (Keszthelyi et al., 2009; Richard et al., 2009).

Cerca de 90 a 95% do triptofano ingerido é metabolizado pela via da quinurenina, resultando na produção de quinureninas, Ácido quinurênico, Ácido quinolínico, Ácido xanturênico e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺), um cofator essencial em muitas reações celulares, como na síntese de ATP e na reparação de DNA. O esgotamento de NAD⁺ pode ser fatal para as células, principalmente as que estão sob estresse fisiológico (Keszthelyi et al., 2009; Richard et al., 2009; Lugo-Huitrón et al., 2013).

Um aumento na ingestão ou na dose de triptofano pode levar a toxicidade tecidual. Altas doses de triptofano causam aumento e acúmulo de leucócitos nos tecidos. Esse fato sugere que o triptofano e seus metabólitos influenciam na imunomodulação do sistema imune (Gross et al., 1999). Estudos revelaram que altas doses de triptofano, utilizado no tratamento da insônia e depressão, levaram a desordens imunológicas, alterações histopatológicas na pele e Síndrome de Eosinofilia-Mialgia (Silver et al., 1990).

Na via da quinurenina, o triptofano é primeiramente oxidado em triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), principalmente nas células hepáticas. A expressão do TDO ocorre em vários tipos celulares e é regulada pelo cortisol e por níveis de triptofano. A outra enzima que inicializa a via da quinurenina é a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Keszthelyi et al., 2009). A IDO é uma enzima amplamente distribuída nos tecidos e células de mamíferos e converte o triptofano em N-formil-quinurenina. Esta substância é catabolizada para quinureninas e posteriormente para os metabólitos terminais, como o Ácido picolínico ou Ácido quinolínico (Figura 1) (Frumento et al., 2002).

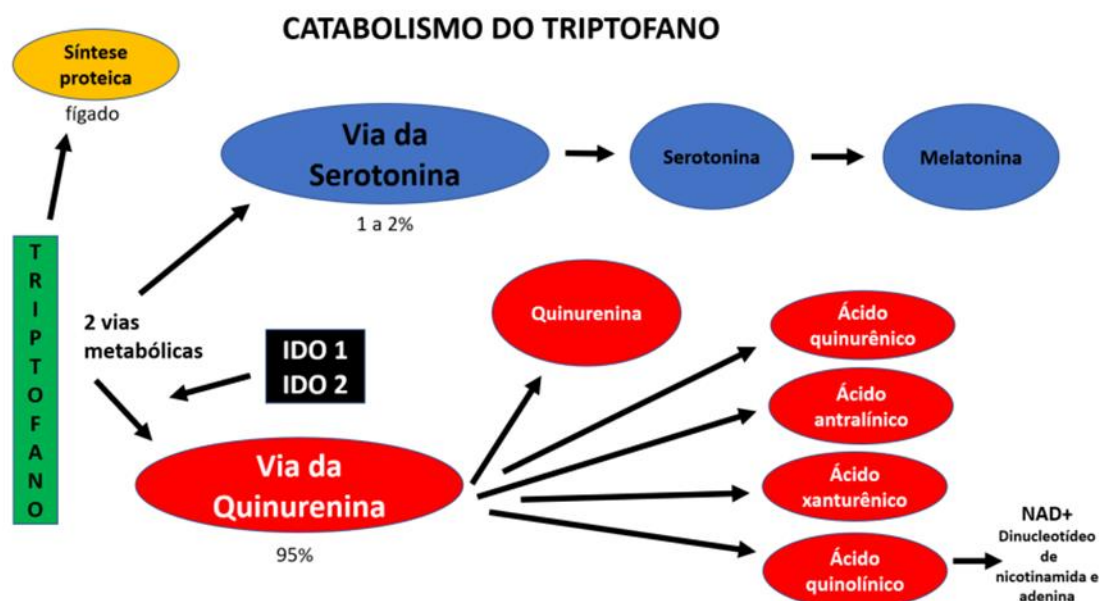


Figura 1 – Esquema do catabolismo do triptofano com produção dos metabólitos do triptofano.

A IDO-1 é uma enzima imunoregulatória capaz de modular o estado de ativação e o fenótipo das células imunes, por meio de vários mecanismos moleculares. A IDO é induzida em locais de inflamação e infecção pelo IFN-gama e é potencializada pela citocina IL-10. A IDO-1 esgota o triptofano do microambiente local, resulta na produção concomitante de metabólitos da via quinurenina, compromete a função de linfócitos T e conseqüente causa imunossupressão (Figura 2) (Frumento et al., 2002; Yeung et al., 2015). A expressão constitutiva da IDO exerce funções protetoras em condições fisiológicas, principalmente na placenta, olho, pâncreas, células apresentadoras de antígenos, neutrófilos e eosinófilos, células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas. Nas células que expressam IDO1, a

enzima é detectada principalmente nas regiões citosólica e perinuclear da célula (Yeung et al., 2015).

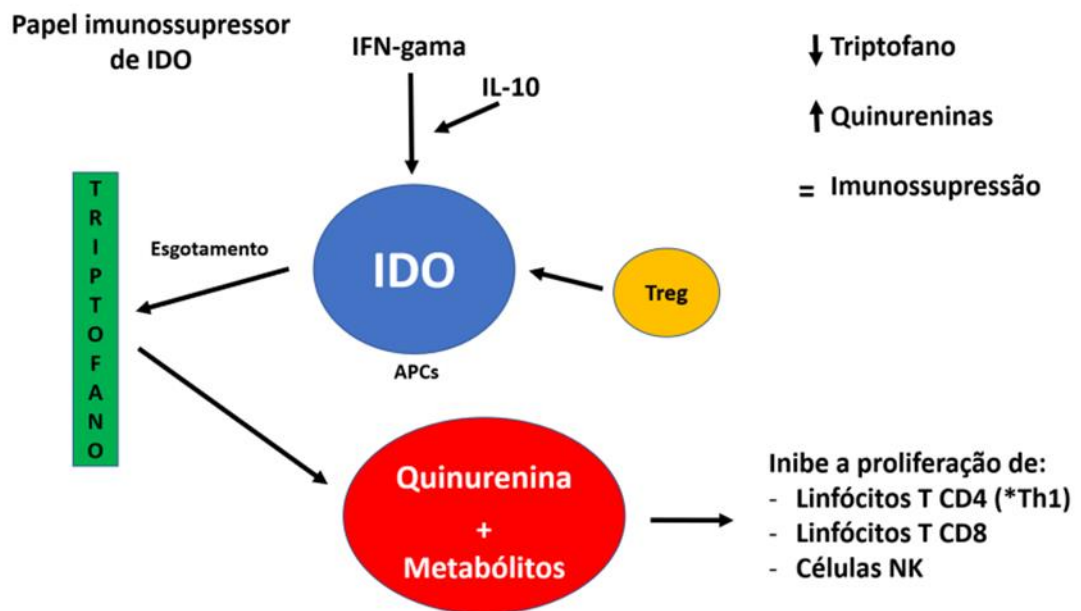


Figura 2 – A IDO é induzida em locais de inflamação e infecção pelo IFN-gama e é potencializada pela citocina IL-10. A presença dos metabólitos do triptofano comprometem a função de linfócitos T.

O Ácido quinolínico, também conhecido por Quinolinato, é uma neurotoxina endógena, que é catabolizado em NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo). O Ácido quinolínico é um agonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e tem uma alta potência *in vivo* como excitotoxina. O Ácido quinolínico pode potencializar sua própria toxicidade e a de outras excitotoxinas, como NMDA e glutamato, produzindo disfunção mitocondrial progressiva. Há evidências mostrando que o Ácido quinolínico pode aumentar a produção de radicais livres induzindo a atividade de NOS em astrócitos e neurônios, levando ao estresse oxidativo. Com base nessas evidências e considerando que o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a defesa antioxidante e as espécies reativas formadas, este fenômeno deve ser considerado como um dos muitos mecanismos pelos quais o Ácido quinolínico exerce seu efeito tóxico, uma vez que os radicais livres também podem ativar mais cascatas de sinalização que podem contribuir e maximizar seu efeito neurotóxico (Lugo-Huitrón et al., 2013).

Em processos patológicos ou em condições fisiológicas muitas células do sistema imunológico são capazes de sintetizar e / ou estocar o ácido quinolínico em concentrações micromolares ou superiores. Monócitos e macrófagos por todo o corpo e órgãos linfoides: células dendríticas no baço e linfonodos, células de Langerhans na pele, células de Kupffer no fígado, linfócitos B na polpa branca esplênica e linfócitos T no timo e com menor intensidade na microglia do cérebro. O encéfalo normal tem um dos mais baixos níveis de quinolinato quando comparado a outros tecidos do corpo (Moffett e Namboodiri, 2003).

Os monócitos foram considerados produtores robustos de ácido quinolínico quando estimulados pelo IFN- γ (Chiarugi et al., 2001). Macrófagos têm a capacidade de produzir aproximadamente 20 a 30 vezes mais ácido quinolínico do que a microglia. Após estimulação com IFN- γ , a microglia produziu 20 vezes menos o Ácido quinolínico do que os macrófagos (Guillemin et al., 2003).

Na pele, o triptofano é metabolizado em ácido quinolínico em leucócitos e queratinócitos, difunde-se no tecido conjuntivo dérmico, depois do qual entra nos plexos vascular e linfático antes de ser transportado para o fígado para conversão em dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NAD⁺) (Noakes e Mellick, 2013).

O ácido quinurênico (KYNA) é um antagonista dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e dos receptores de glutamato (receptores sinápticos e não sinápticos localizados principalmente nas membranas das células neuronais e gliais) (Schwarcz et al., 2012). O ácido quinurênico protege o sistema nervoso central em doenças neurológicas excitotóxicas, enquanto o ácido quinolínico pode atuar como uma neurotoxina (Mándi e Vécsei, 2011).

O ácido quinurênico pode atenuar a produção de TNF- α (Fator de necrose tumoral-alfa) em monócitos. Doenças neurodegenerativas e neurotóxicas mostram aumento nos níveis de TNF- α no encéfalo e a inibição da produção de TNF- α leva a um efeito neuro-protetor (Mándi e Vécsei, 2011).

Em processos inflamatórios, a enzima IDO é induzida por IFN- γ e leva a um aumento nas concentrações de ácido quinurênico, assim como outros metabólitos do triptofano. E para que a IDO apresente um papel imunossupressor, os metabólitos do triptofano devem estar elevados (Belladonna et al., 2007). Fibroblastos da pele também podem liberar o ácido quinurênico pelo estímulo de IFN- γ (Asp et al., 2011).

Caninos da raça Pastor Alemão foram divididos em dois grupos, compostos por 3 animais em cada grupo. Um grupo foi inoculado por amastigotas de *Leishmania chagasi* e o outro por *Leishmania donovani*. O triptofano foi mensurado no sangue total após 55, 69 e 79 dias, pela extração de ácido perclórico de sangue total. Este extrato foi analisado por cromatografia líquida de alta performance de fase reversa. O nível de triptofano estava diminuído nos dois grupos de cães infectados (2.66 nmol/mL de sangue total) quando comparado ao grupo controle (11.92 nmol/mL de sangue total), sugerindo que há uma competitividade parasita-hospedeiro por nutrientes essenciais e isso possa ser a base causadora da caquexia observada na leishmaniose (Keenan et al., 1984).

Fallarino et al. (2002) demonstraram *in vitro* e *in vivo*, que os metabólitos do triptofano, como o ácido antranílico e o ácido quinolínico, podem induzir apoptose de tímócitos (efeito similar ao da dexametasona) e diferenciar terminalmente linfócitos T auxiliares. Somente os clones Th1 sofreram morte celular na presença de baixas concentrações de quinurenina. Por essa seletividade por células Th1, a apoptose de células T pelo catabolismo do triptofano pode não estar apenas envolvida na manutenção da homeostase e auto-tolerância das células T, mas também pode contribuir para certos estados de doença, pelo desequilíbrio na resposta T auxiliar.

Em humanos infectados por *Leishmania infantum*, a atividade de IDO sistêmico foi muito maior quando comparada a pacientes saudáveis, determinada mensurando a proporção de quinurenina:triptofano no plasma. Baixos níveis de triptofano e altos níveis de quinurenina, confirmam a presença funcional da atividade do IDO (Gangneux et al., 2013).

In vitro, a IDO foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e células NK. Já a proliferação dos linfócitos B não foi afetada, fato que sugere que a IDO expressa por macrófagos, pela interação com linfócitos T ativados, exerce seu efeito sobre a proliferação de linfócitos T e células NK, por meio de dois mecanismos diferentes. De um lado, inicia a cascata de reações bioquímicas que levam à produção de catabólitos derivados do triptofano, que são capazes de inibir a proliferação celular. Por outro lado, há um esgotamento do triptofano, permitindo que os catabólitos exerçam seu potencial inibitório no microambiente extracelular (Frumento et al., 2002).

Bourreau et al. (2009) demonstraram grande quantidade de linfócitos Treg em pacientes com lesões cutâneas crônicas por *Leishmania guyanensis*, quando comparado aos pacientes com lesões agudas. O nível de mRNA de IFN-gama estava mais baixo nas lesões crônicas quando comparadas as agudas, sugerindo que os linfócitos Treg intralesionais são funcionalmente supressores. Além disso, foi demonstrado que o nível de expressão de mRNA de IDO e de Foxp3 foi mais elevado em lesões crônicas. A alta expressão de IDO mRNA está associada a elevados níveis de Foxp3 mRNA, reforçando a hipótese de que a IDO pode ser uma das moléculas imunossupressoras induzidas por linfócitos Treg durante a leishmaniose humana.

A susceptibilidade de diferentes órgãos e tecidos a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. ainda não está totalmente elucidada. Talvez, se considerarmos a participação dos metabólitos do triptofano na resposta imune variada em diferentes órgãos de animais infectados, seja possível compreender a complexa patogenia da LV canina. O objetivo desta pesquisa é investigar se os metabólitos do triptofano da via da quinurenina poderiam favorecer a sobrevivência do parasito e o desenvolvimento das lesões de pele em cães naturalmente infectados. A compreensão da resposta imune cutânea poderia servir de modelo para o entendimento da patogenia desta doença. Para isso, será analisada a pele de cães infectados naturalmente por *Leishmania infantum*, associando as alterações microscópicas da pele, com a carga parasitária e com a imunodeteção de subprodutos do triptofano da via da quinurenina (ácido quinurênico e ácido quinolínico), além de linfócitos Treg, células dendríticas imaturas e maduras (CD11 e CD83 respectivamente), IL-10 e macrófagos M1 e M2.

REFERÊNCIAS

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

Asp L, Johansson A, Mann A, Owe-Larsson B, Urbanska EM, Kocki T, Kegel M, Engberg G, Lundkvist GB, Karlsson H (2011) Effects of pro-inflammatory cytokines on expression of kynurenine pathway enzymes in human dermal fibroblasts. **Journal of Inflammation**. v. 8, p. 25.

Barbiéri, CL (2006) Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, p. 329-337.

Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, Gizzi S, Pallotta MT, Fioretti MC, Grohmann U (2007) Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. **Transplantation**. v. 84, p. S17–S20.

Bogdan C, Röllinghoff M, Diefenbach A (2000) The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**. v. 173, p. 17-26.

Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P (2009) Intralesional Regulatory T-Cell Suppressive Function during Human Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 1465–1474.

Brasil (2017) Ministério da Saúde (MS) / Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 189p.

Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A (2014) Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. 480, p. 1-16.

Chan MM, Adapala N, Chen C (2012) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Polarization of Macrophages in *Leishmania* Infection. **PPAR Research**, v. 2012, p. 1-14.

Chiarugi A, Calvani M, Meli E, Traggiai E, Moroni F (2001) Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages. **The Journal of Neuroimmunology**. v. 120, p.190–8.

Corthay A (2009) How do Regulatory T Cells Work? **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 70, p. 326–336.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P (2002) T cell apoptosis by tryptophan catabolism. **Cell Death and Differentiation**. v. 9, p.1069–1077.

Feijó D, Tibúrcio R, Ampuero M, Brodskyn C, Tavares N (2016) Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**. v. 2016, p. 1-9.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Perri SHV (2000) Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). *La Clinica veterinaria*. v. 28, p. 36-44.

Figueiredo MM, Deoti B, Amorim IF, Pinto AJW, Moraes A, Carvalho CS, Silva SM, Assis AC, Faria AMC, Tafuri WL (2014) Expression of Regulatory T Cells in Jejunum, Colon, and Cervical and Mesenteric Lymph Nodes of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3704-3712.

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB (2002) Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**. v. 196, n. 4, p. 459–468.

Gangneux J, Poinsignon Y, Donaghy L, Amiot L, Tarte K, Mary C, Robert-Gangneux F (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis. **Innate Immunity**, v. 19, n. 6, p. 564–568.

Gross B, Ronen N, Honigman S, Livne E (1999) Tryptophan toxicity – time and dose-response in rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 467, p. 507–16.

Guillemin, G. J., Smith, D. G., Smythe, G. A., Armati, P. J., & Brew, G. J., 2003. Expression of The Kynurenine Pathway Enzymes in Human Microglia and Macrophages. **Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism**, v. 527, p.105–112.

Ikeda-Garcia FA, Marcondes M (2007) Métodos de diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 71, p.34-42.
Jones TC, Hunt RD, King NW (2000) Patologia Veterinária. 6.ed. São Paulo, Manole, 1415p.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightnerh L, Webster HK, Johnson AJ (1984) Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, Clinical Disease and Clinical Pathology. **Veterinary Pathology**. v. 21, p. 74-79.

Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AAM (2009) Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**. v. 21, p. 1239–1249.

Lugo-Huitrón R, Muñiz PU, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. **Oxidative medicine and cellular longevity**. v. 2014, p.1-14.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AGS, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, Paula CC, Bogio A, Gomes MCA, Bessa AMS, Passos SRL (2009) Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Research in Veterinary Science**. v. 87, n. 2, p. 260-262.

Mándi Y, Vécsei L (2011) The kynurenine system and immunoregulation. **The Journal of Neural Transmission**. v. 119, n. 2, 197–209.

Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451–483.

Moffett JR, Namboodiri MA (2003) Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 247–265.

Moreira PRR, Bandarra MB, Magalhães GM, Munari DP, Prandini MM, Alessi AC, Vasconcelos RO (2013) Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 149-157.

Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, Vasconcelos RO (2016) Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 226, p. 69-73.

Muraille E, Leo O, Moser M (2014) Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? **Frontiers in Immunology - T Cell Biology**, v. 5, article 603, p. 1-12.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, p. 87-95.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM (2009) L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **International Journal of Tryptophan Research**. v 2, p. 45–60.

Sacks D, Noben-Trauth N (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**. v. 2, n. 11, p. 845-58.

Sacks DL, Perkins PV (1985) Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. May; v. 34, n.3, p. 456-9.

Sacramento L, Trevelin SC, Nascimento MS, Lima-Junior DS, Costa DL, Almeida RP, Cunha FQ, Silva JS, Carregaro V (2015) Toll-Like Receptor 9 Signaling in Dendritic Cells Regulates Neutrophil Recruitment to Inflammatory Foci following *Leishmania infantum* Infection. **Infection and Immunity**. v. 83, n. 12, p. 4604-4616.

Santa Rosa ICA, Oliveira ICS (1997) Leishmaniose visceral; breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, n. 11, p. 24-28.

Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ (2012) Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. **Nature Reviews Neurosciences**. v. 13, n. 7, p. 465-77.

Shaw JJ (2006) Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 101, p. 577-579.

Silva FMF, Santos EMS, Torres SM, Yamasak EM, Ramos RAN, Alves LC (2016). Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. **The Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, n. 1, p. 127-130.

Silva KLO, Andrade, MMC, Melo LM, Perosso J, Vasconcelos RO, Munari DP, Lima VMF (2014) CD4+FOXP3+ cells produce IL-10 in the spleens of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 202, n. 3–4, p. 313-318.

Silver RM, Heyes MP, Maize JC, Quearry B, Vionnet-Fuasset M, Sternberg EM (1990) Scleroderma, fasciitis, and eosinophilia associated with the ingestion of tryptophan. **The New England Journal of Medicine**. v. 322, p. 874–81.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Morrell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L (2004) Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* – infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 130, p. 07-12.

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites Vectors**. v. 86., p. 1-16.

Tidball JG, Villalta SA (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 5, p. 1173-87.

Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T (2012) Characteristics of Suppressor Macrophages Induced by Mycobacterial and Protozoal Infections in relation to Alternatively M2 Macrophages. **Clinical and Developmental Immunology**.

World Health Organization (WHO). Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 06 março. 2018.

Yeung AWS, Terentis AC, King NJC, Thomas SR (2015) Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. **Clinical Science**. v. 129, p.601–672.

CAPÍTULO 2 - Avaliação dos metabólitos do triptofano e perfil de resposta imune na pele de cães com leishmaniose visceral

RESUMO – A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, cuja pele é o sítio inicial da infecção, antes da visceralização do parasita. Os efeitos imunopatológicos da resposta imune sistêmica interferem com a função dos órgãos injuriados. A enzima IDO é responsável pelo catabolismo do triptofano e esgota o L-Triptofano do microambiente local, resultando na produção de metabólitos da via quinurenina, comprometendo a função de linfócitos T e resultando em imunossupressão. Existem poucos estudos que correlacionam os metabólitos de triptofano à imunopatogenia da LV canina. Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar as lesões cutâneas com a carga parasitária, a imunodeteção de subprodutos do triptofano da via da quinurenina (ácido quinurênico e ácido quinolínico), dos linfócitos Treg, das células dendríticas imaturas e maduras (CD11 e CD83 respectivamente), IL-10 e de macrófagos M1 e M2. Para isso foram utilizados fragmentos de pele (ponta de orelha e plano nasal) de 30 cães com LV (grupo infectado) e de 05 cães não infectados (grupo controle), que foram submetidas à análise imuno-histoquímica. Todas estas variáveis estavam aumentadas no grupo infectado, exceto M1 e CD83, que não diferiram estatisticamente entre os grupos, tanto na orelha quanto no plano nasal. No grupo infectado houve maior proporção de macrófagos M2, de células dendríticas imaturas, ácido quinolínico e quinurênico, IL10 e linfócitos Treg, o que indica a predominância de uma resposta imune Th2, inibição da ativação de linfócitos T e da apresentação eficiente de antígenos. Os metabólitos do triptofano no microambiente cutâneo tiveram um papel imunossupressor durante a infecção por *Leishmania infantum*, possivelmente contribuindo para a persistência da infecção na pele e com a distribuição sistêmica do parasita.

Palavras-chave: imunotolerância, *Leishmania infantum*, IDO, quinurenina.

1. Introdução

O triptofano é um aminoácido essencial para humanos e animais e está presente em diversos alimentos. O mesmo deve ser ingerido na forma de proteínas, para ser hidrolisado em aminoácido no trato digestório e conduzido ao fígado pelo sistema hepático portal. Primeiramente, ele vai ser distribuído pela corrente sanguínea para ser utilizado na síntese proteica e em outras funções celulares. Parte deste aminoácido, que não é utilizada na síntese proteica hepática, vai participar de duas vias metabólicas: a via da quinurenina e a via da serotonina (Moffett e Namboodiri, 2003, Keszthelyi et al., 2009).

Cerca de 90 a 95% do triptofano ingerido é metabolizado pela via da quinurenina, resultando na produção de quinureninas, ácido quinurênico, ácido quinolínico, ácido xanturênico e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺), um cofator essencial em muitas reações celulares, como na síntese de ATP e na reparação de DNA. O esgotamento de NAD⁺ pode ser fatal para as células, principalmente as que estão sob estresse fisiológico (Keszthelyi et al., 2009; Richard et al., 2009; Lugo-Huitrón et al., 2013).

Na via da quinurenina, o triptofano é primeiramente oxidado em triptofano 2,3-dioxigenase (TDO), em sua maioria nas células hepáticas. A expressão do TDO ocorre em diferentes células e é regulada pelo cortisol e por níveis de triptofano. A outra enzima que inicializa a via da quinurenina é a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) (Keszthelyi et al., 2009), que é amplamente distribuída nos tecidos e células de mamíferos e converte o triptofano em N-formil-quinurenina. Esta substância é catabolizada para quinureninas e posteriormente para metabólitos terminais, como o ácido picolínico ou ácido quinolínico (Frumento et al., 2002).

A IDO1 é uma enzima imunoregulatória capaz de modular o estado de ativação e o fenótipo das células imunes, por meio de vários mecanismos moleculares. Esta enzima é induzida pelo IFN-gama em locais de inflamação e infecção e potencializada pela citocina IL-10. A IDO1 esgota o triptofano do microambiente local, resulta na produção concomitante de metabólitos da via quinurenina, compromete a função de linfócitos T, o que resulta em imunossupressão (Frumento et al., 2002; Yeung et al., 2015). A liberação de IFN-gama por linfócitos T e a indução de IDO em células

dendríticas maduras ativadas resulta na degradação do triptofano pelas DCs e produção de metabólitos da via da quinurenina (Mahnke, et al., 2002). Os linfócitos Treg também induzem a produção deIDO em DCs (Mándi e Vécsei, 2011).

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum*, que tem o cão como principal reservatório urbano do protozoário, por possuir elevado número de parasitas na pele (Brasil, 2017). A pele é o sítio inicial da infecção e os cães infectados podem apresentar descamações, ulcerações com crostas nas orelhas, plano nasal e dorso, além de extensas áreas de alopecia (Solano-Gallego et al., 2004; Brasil, 2017). Microscopicamente, a inflamação cutânea é crônica e predominantemente perianexal, principalmente ao redor do istmo dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas, bem como, ao redor de vasos da derme superficial. No infiltrado inflamatório predominam macrófagos, plasmócitos, linfócitos e raros neutrófilos (Solano-Gallego et al., 2004; Reis et al., 2009, Moreira et al., 2013, Jacintho et al., 2018).

A susceptibilidade de diferentes órgãos e tecidos a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. ainda não está totalmente elucidada. A participação dos metabólitos do triptofano talvez contribua na resposta imune compartimentalizada descrita por Reis et al. (2009), em diferentes órgãos de cães infectados. Esse fato poderia contribuir para a compreensão da patogenia da LV canina.

O objetivo desta pesquisa foi investigar se os metabólitos do triptofano da via da quinurenina poderiam favorecer a sobrevivência do parasito e o desenvolvimento das lesões de pele em cães naturalmente infectados. A compreensão da resposta imune cutânea poderia servir de modelo para o entendimento da patogenia desta doença. Para isso fez-se a análise da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, associando as alterações microscópicas, com a carga parasitária cutânea e com a imunodeteção de subprodutos do triptofano da via da quinurenina (ácido quinurênico e ácido quinolínico) e de linfócitos Treg, células dendríticas imaturas e maduras (CD11 e CD83 respectivamente), IL-10 e macrófagos M1 e M2.

2. Material e métodos

Os 30 cães utilizados neste estudo eram oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (SP), município endêmico para LV (Moreira et al., 2010). Neste local, os cães são rotineiramente submetidos a eutanásia, devido ao diagnóstico positivo para Leishmaniose Visceral, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose visceral devam ser submetidos à eutanásia. **PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008**

Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal (CEUA nº. 017181/18).

Os cães naturalmente infectados (n=30) com *Leishmania infantum* foram selecionados sem predileção por idade, raça ou sexo. A eutanásia foi realizada sob anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguida da injeção intravenosa de cloreto de potássio, conforme as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

A necropsia foi realizada imediatamente após a morte destes animais. A confirmação do diagnóstico foi feita pelo teste sorológico ELISA e pela pesquisa do parasito em “imprints” dos linfonodos periféricos e da medula óssea.

O grupo controle foi composto por 5 cães provenientes de uma área não endêmica para LV (Oliveira et al., 2008), procedentes da rotina de necropsias do Serviço de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, Campus de Jaboticabal, SP. O grupo controle foi selecionado pela avaliação histológica da pele de ponta de orelha e plano nasal, para descartar possíveis lesões e/ou processos inflamatórios e quando a causa da morte não estivesse relacionada a doenças sistêmicas ou neoplásicas. Na seleção dos animais controle foi feita também a análise imuno-histoquímica da pele, para a pesquisa do parasito e apenas animais considerados negativos foram incluídos no estudo.

Para análise histopatológica foram coletados fragmentos de pele das regiões de ponta de orelha e plano nasal, fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos (0,15 Molar de pH 7,2), por no máximo 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram destinados a desidratação em soluções de concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com protocolos de rotina. Os cortes foram realizados na espessura de 5µm e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou destinados a análise imuno-histoquímica.

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para a identificação de formas amastigotas de *Leishmania* sp. na pele utilizando como anticorpo primário o soro hiperimune de cão positivo para LV (modificado de Tafuri et al., 2004), técnica também utilizada para identificar os subprodutos do triptofano da via da quinurenina (ácido quinurênico e ácido quinolínico), linfócitos Treg (FoxP3), células dendríticas imaturas e maduras (CD11 e CD83), macrófagos M1 e M2 e citocina IL-10.

Nos protocolos de imuno-histoquímica para os diferentes anticorpos foram utilizados o Complexo de polímeros ligados a peroxidase e o Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase, conforme descrito na Tabela 1. De uma maneira geral fez-se a desparafinização das lâminas em estufa (60°C), por uma hora, seguida da imersão dos cortes em xilol (20 minutos). Após, os cortes foram hidratados em soluções de concentrações decrescentes de álcool até a lavagem em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada pelo calor (Tabela 1). No bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se produto comercial (Peroxidase-Blocking Reagent, Dako, Envision Flex, SM801) / 30 minutos ou a solução de metanol e água oxigenada a 8% / 30 min, protegido da luz, à temperatura ambiente. Para o bloqueio das proteínas inespecíficas utilizou-se produto comercial Super block (Scytek, AAA125) / 1 hora ou com o Protein Block (Dako Cytomation, X0909). A incubação dos cortes era realizada em uma câmara úmida e escura. O cromógeno utilizado foi diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina, Dako, Envision Flex, DM827), por 3 minutos. Na contra-coloração utilizou-se hematoxilina de Harris, por 6 minutos. Entre cada passo foram realizadas lavagens dos cortes com solução tampão Tris-HCl (pH 7,6)/ 5 minutos e com água destilada / 5 minutos (Tabela 1).

Tabela 1. Protocolos de imuno-histoquímica utilizados nos cortes de pele de cães naturalmente infectados com Leishmaniose Visceral e nos cães do grupo controle.

<i>Anticorpos</i>	<i>Imunomarcção</i>	<i>Espécies de origem</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Diluição e tempo de incubação</i>	<i>Anticorpos secundários e substratos</i>
Soro hiperimune de cão positivo para LV	Formas amastigotas	Soro de cão positivo para LV	Câmara de pressão Pascal (Dako) ³	1:500 por 18 horas a 4°C.	Envision ⁷
Anti-Ácido quinurênico	Leucócitos e fibroblastos	Rabbit polyclonal (Biomatik, cód. CAU29985)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ³	1:100 por 18 horas a 4°C.	Envision ⁷
Anti-Ácido quinolínico	Macrófagos	Rabbit polyclonal (Biomatik, cód. CAU21540)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ³	1:100 por 18 horas a 4°C.	Envision ⁷
Anti-IL-10	Leucócitos	Rabbit polyclonal (Biorbyt, cód. Orb 100193)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ³	1:500 por 18 horas a 4°C.	Envision ⁷
Anti-FoxP3	Linfócitos T regulatórios	Mouse monoclonal (Biorbyt, cód. orb 18370)	Panela a vapor Philips Walita por 40 minutos ²	1:2500, por 2 horas Temperatura ambiente	LSAB ⁴
Anti-CD68	Macrófagos com fenótipo M1	Mouse monoclonal (Dako, cód. M0876)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:25 por 18 horas Temperatura ambiente	Envision ⁶
Anti-CD163	Macrófagos com fenótipo M2	Mouse monoclonal (Spring, cód. E18684)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:300 por 18 horas (4°C)	LSAB ⁴
Anti-CD11c	Células dendríticas imaturas	Mouse monoclonal, (Novusbio, cód. mAb-CA116A1)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ¹	1:75 por 24 horas Temperatura ambiente	Advance ⁵
Anti-CD83	Células dendríticas maduras	Mouse monoclonal, (Abcam, cód. ab49324)	Câmara de pressão Pascal (Dako) ²	1:100 por 18 horas (4°C)	Advance ⁵

1 - Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0; 2- Solução de Tris EDTA 10 mM, pH 9,0; 3 - solução Target Retrieval Solution (Dako, Envision Flex, DM828); 4 - Complexo Estreptavidina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690-1); 5- Complexo de Polímero ligado a Peroxidase (Kit Advance HRP®, Dako Cytomation, referência K406889-2); 6 - Envision Dual Link System-HRP (Dako Cytomation, código K406189-2); 7 - Complexo de Polímero ligado a Peroxidase HRP® (Kit Dako, EnVision FLEX+, Mouse (LINKER), High pH, SM802).

Os controles positivos foram realizados com os tecidos sugeridos pelo fabricante de cada anticorpo. No controle negativo da reação imuno-histoquímica utilizou-se o diluente de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Dako, Envision Flex, K800621-2) em substituição ao anticorpo primário.

A densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada pela contagem das células na pele em dez campos de grande aumento (obj. 40x,

área=0,19625 μm^2), segundo descrito por Moreira et al. (2010), em microscópio de luz (Nikon, modelo E200). A partir dos valores obtidos nestes campos, foi feita uma média do número de células imunomarcadas por animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo de cães infectados e grupo controle.

2.1 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Software R (versão 4.4.1). Todas as avaliações foram comparadas entre os grupos (Controle x infectados) utilizando o teste de Mann Whitney não pareado. Adicionalmente foi realizada uma análise de componentes principais utilizando o FactoMineR package no R.

Os valores resultantes de cada variável apresentam-se como mediana \pm faixa interquartil (IQR). Em todos os testes a significância foi considerada a 5% de probabilidade ($P < 0,05$) e tendência foi considerada quando $P > 0,05$ e $< 0,10$.

3. Resultados

Na análise histopatológica, o grupo controle não apresentava nenhuma lesão na pele. No grupo infectado, o infiltrado inflamatório cutâneo apresentou frequentemente uma distribuição multifocal a coalescente, predominante na derme superficial e ao redor de anexos cutâneos das regiões da orelha e plano nasal. Este infiltrado era composto por plasmócitos, linfócitos, mastócitos e macrófagos epitelióides e/ou parasitados. Estes últimos formavam granulomas com bordas pobremente definidas. Nas áreas onde havia inflamação observou-se graus variados de dissociação de fibras colágenas da derme, acantose e hiperqueratose da epiderme e por vezes, ulceração epidermal.

A imunomarcção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. foi observada no citoplasma de macrófagos associados ao infiltrado inflamatório dermal de cães infectados (Figura 3A e B). O grupo controle não apresentou imunomarcção do parasita.

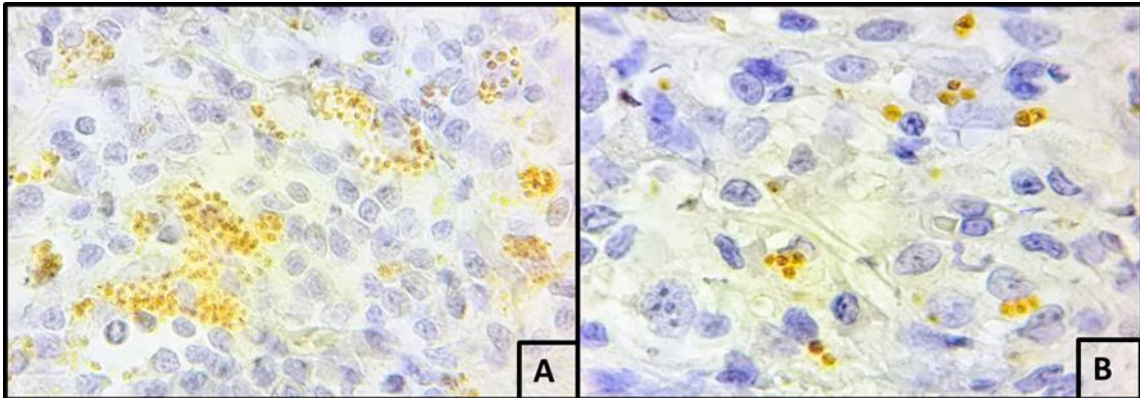


Figura 3. Fotomicrografias da carga parasitária cutânea em cães com LV. A) Notar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. na orelha. (Obj. 40x). B) Região de plano nasal mostrando vários macrófagos positivos para o parasita (Obj 100x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP).

O ácido quinurênico apresentou imunomarcção citoplasmática no infiltrado inflamatório (Figuras 4A e 4B), em fibroblastos das áreas de inflamação e no epitélio de folículos pilosos e na epiderme. A imunomarcção de ácido quinolínico foi observada principalmente no citoplasma e núcleos de macrófagos (Figuras 4C e 4D).

A detecção de IL-10 (Figura 5A) foi citoplasmática e ocorreu no infiltrado inflamatório, já os linfócitos Treg apresentaram imunomarcção nuclear no infiltrado inflamatório dermal (Figura 5B). Os anticorpos CD68 (Figura 6A) e CD163 (Figura 6B) marcaram macrófagos M1 e M2, respectivamente, associados ao infiltrado inflamatório. A marcação de CD83 foi observada na membrana de células dendríticas maduras associadas ao infiltrado inflamatório dermal (Figura 6C). O anticorpo CD11c apresentou imunomarcção citoplasmática em células dendríticas imaturas do infiltrado inflamatório dermal e ao redor dos anexos cutâneos (Figura 6D).

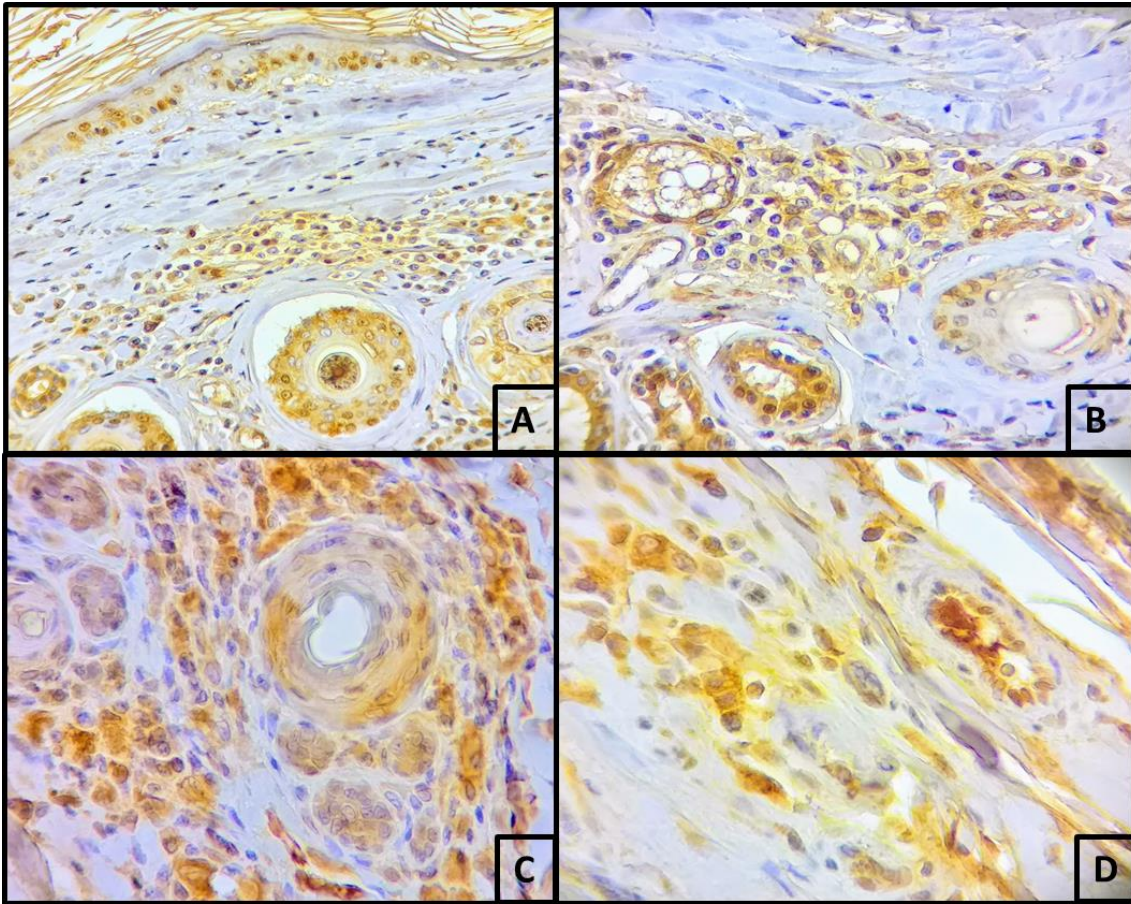


Figura 4. Fotomicrografias de pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. A) Imunomarcção do ácido quinurênico no infiltrado inflamatório da derme superficial (Obj. 20x); B) Marcação de ácido quinurênico no infiltrado inflamatório perianexal (Obj 40x). C-D) Imunomarcção de ácido quinolínico predominante em citoplasma e núcleos de macrófagos (Obj. 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase (HRP).

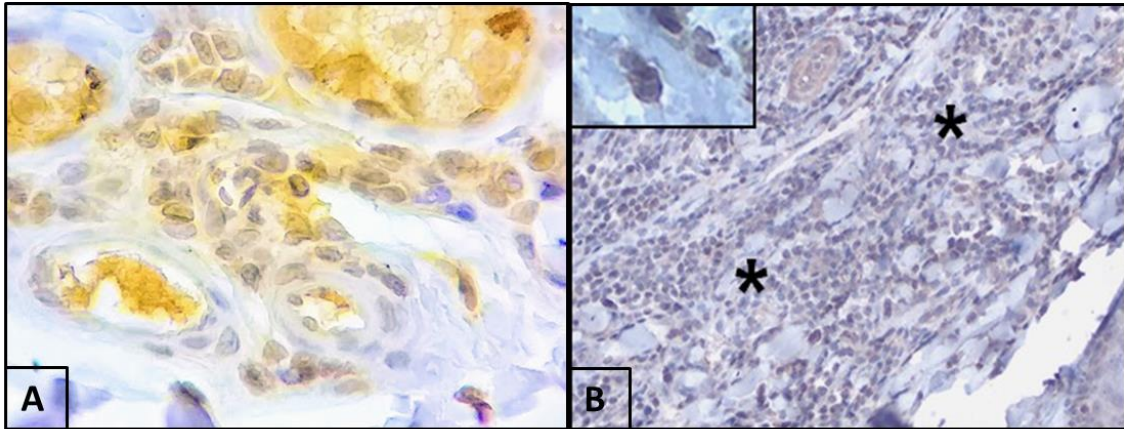


Figura 5. Fotomicrografias da pele de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum*. A) Imunomarcacão de IL-10 em infiltrado inflamatório perianexial (Obj. 40x; Complexo de polímeros ligados a peroxidase). B) Imunomarcacão nuclear de FoxP3 (*, detalhe, obj. 100x) em células do infiltrado inflamatório dermal (Obj. 40x). Complexo estreptavidina-biotina ligada a peroxidase.

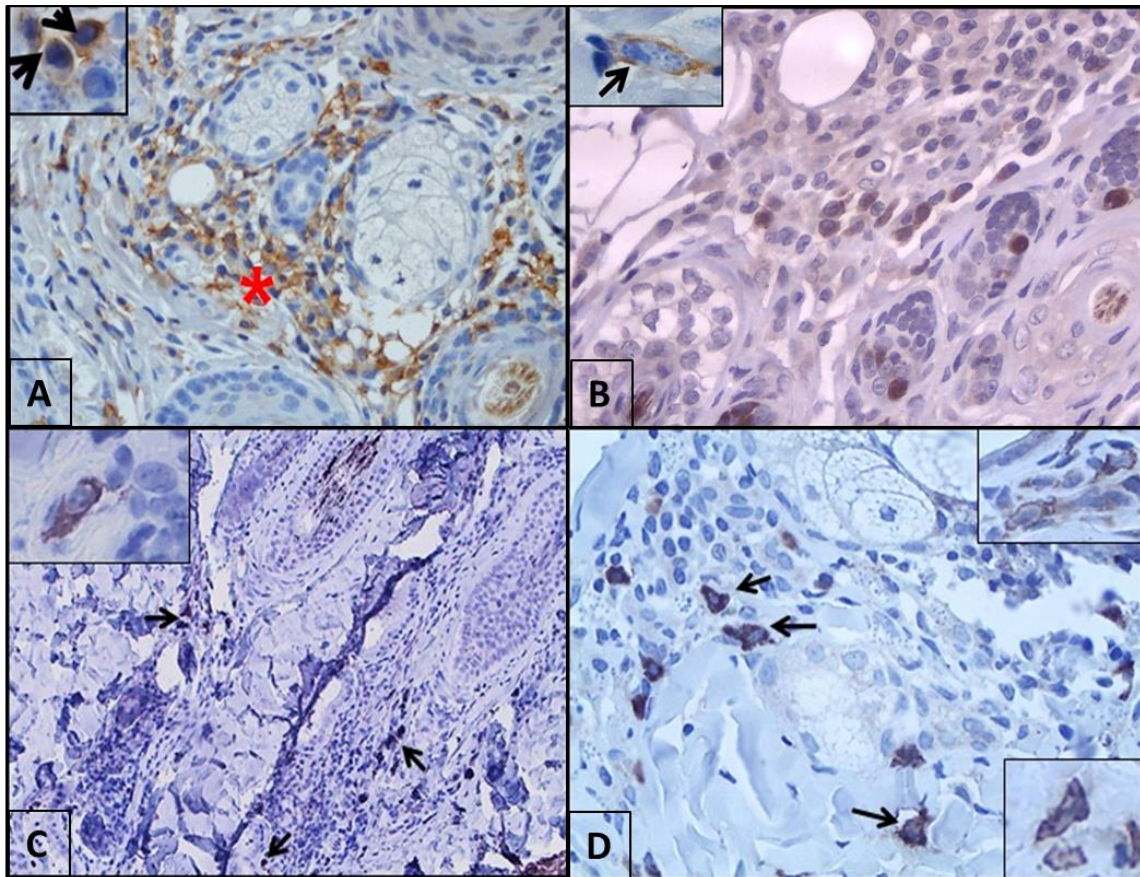


Figura 6. Fotomicrografias de pele de cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum*. A) Imunomarcção de CD68 em macrófagos M1 do infiltrado perianexal (*, detalhe com marcação de membrana, setas, Obj. 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase. B) Imunomarcção de CD163 em macrófagos M2 do infiltrado ao redor de anexos. Detalhe com imunomarcção em membrana citoplasmática de um macrófago contendo formas amastigotas intracitoplasmáticas (seta; Obj. 40x). Complexo estreptavidina-biotina ligada a peroxidase. C) Imunomarcção de CD11c em células dendríticas imaturas no infiltrado ao redor de anexos (setas/Obj. 20x). No detalhe nota-se a imunomarcção citoplasmática (Obj. 40x). D) Detecção de CD83 em células dendríticas maduras do infiltrado dermal (detalhe com marcação citoplasmática da célula, Obj. 40x). Complexo de polímeros ligados a peroxidase.

O grupo infectado apresentou maiores medianas das imunomarcações no plano nasal de ácido quinolínico, ácido quinurênico, CD11, IL10, M2 e Treg do que o grupo controle, com diferenças significativas entre grupos ($P < 0,001$; Tabela 2). Entretanto, as medianas de CD83 e M1 não diferiram significativamente entre o grupo infectado e o controle ($P > 0,10$).

Tabela 2. Mediana \pm faixa interquartil das imunomarcações dos anticorpos na pele do plano nasal de cães infectados ou do grupo controle.

Plano Nasal	Controle	Infectados	P-valor*
Ácido quinolínico	1,40 \pm 1,65	43,00 \pm 86,80	0,0002
Ácido quinurênico	1,10 \pm 1,75	45,20 \pm 174,40	0,0001
Carga parasitária	0,0 \pm 0,0	1,00 \pm 3,90	0,0031
CD11	0,70 \pm 0,35	2,20 \pm 2,40	0,0030
CD83	6,00 \pm 1,70	7,00 \pm 7,40	0,5112
IL10	0,20 \pm 0,30	34,60 \pm 161,80	0,0001
M1	3,40 \pm 1,0	2,80 \pm 9,80	0,9476
M2	1,50 \pm 1,75	6,60 \pm 17,20	0,0025
Treg	5,00 \pm 4,10	18,60 \pm 21,20	0,0090

*Valores comparados entre os grupos (Controle vs infectados) utilizando o teste de Mann Whitney não pareado.

Na análise das imunomarcações da orelha observou-se maior mediana para o ácido quinolínico, ácido quinurênico, IL10 e M2, com diferenças significativas entre os grupos infectado e controle ($P < 0,001$; Tabela 3). Já os valores de CD11, CD83, M1 e Treg não apresentaram diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,10$).

Tabela 3. Mediana \pm faixa interquartil da concentração de ácido quinolínico, ácido quinurênico, carga parasitaria, CD11, CD83, IL, M1, M2 e Treg em orelha de cães infectados ou não.

Orelha	Controle	Infectados	P-valor*
Ácido quinolínico	1,0 \pm 1,15	43,20 \pm 95,40	0,0003
Ácido quinurênico	1,30 \pm 1,90	105,00 \pm 306,80	0,0001
Carga parasitária	0,0 \pm 0,0	0,40 \pm 9,40	0,0009
CD11	1,50 \pm 2,05	2,80 \pm 2,20	0,1144
CD83	18,30 \pm 7,55	18,20 \pm 17,40	0,7261
IL10	0,15 \pm 0,55	79,40 \pm 274,20	0,0001
M1	4,90 \pm 2,05	4,20 \pm 13,20	0,8954
M2	1,20 \pm 1,45	9,20 \pm 35,00	0,0047
Treg	5,50 \pm 10,40	16,20 \pm 35,6	0,2738

* Valores comparados entre os grupos (Controle vs infectados) utilizando o teste de Mann Whitney não pareado.

plano nasal ($r= 0.28$) e orelha ($r= 0.15$), M2 avaliado na orelha ($r=0,21$), M1 avaliado no plano nasal ($r=0,09$) e na orelha ($r=-0,07$), CD83 no plano nasal ($r= 0,46$) e na orelha ($r=0,19$) e CD11 no plano nasal ($r= 0,41$) e na orelha ($r= 0,25$).

4. Discussão

No presente estudo o infiltrado inflamatório cutâneo multifocal a coalescente, na derme superficial e ao redor de anexos cutâneos foi similar aos achados relatados por Solano-Gallego et al. (2004), Giunchetti et al. (2006), Reis et al. (2009) e Jacintho et al. (2018).

Jacintho et al. (2018) avaliaram três áreas (orelha, plano nasal e abdômen) da pele de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e o infiltrado inflamatório com maior intensidade foi observado nas regiões da orelha, seguida do plano nasal, os quais foram os locais de eleição para a realização do presente estudo.

Durante a LV, os macrófagos ativados sofrem polarização para os fenótipos M1 ou M2. Se forem estimulados por IFN- γ , eles se diferenciam pela via clássica em macrófagos M1 (Th1). Quando estimulados por IL-4, a polarização é para macrófagos M2 (Th2) pela via alternativa, com consequente susceptibilidade do hospedeiro a infecção (Martinez et al., 2009; Tomioka et al., 2012, Cecílio et al., 2014, Moreira et al., 2016). No presente estudo, o grupo infectado apresentou maiores medianas das marcações em plano nasal e orelha para o fenótipo M2, com diferenças significativas entre os grupos controle e infectado ($P < 0,001$), fato que sugere a predominância de uma resposta imune Th2. Os macrófagos M1 não diferiram entre os grupos, sugerindo que houve uma pobre ativação deste subtipo de macrófago.

De acordo com Feijó et al. (2016), as células dendríticas ativadas produzem IL-12 que ativa linfócitos T (Th1) a produzir IFN- γ , que por sua vez ativa macrófagos M1 a eliminar o parasito. No plano nasal, a marcação com o anticorpo CD11 diferiu significativamente entre os grupos controle e infectados. Entretanto, o mesmo não foi observado com CD83 ($P>0,10$). Esses resultados sugerem que a apresentação antigênica foi ineficiente nos animais infectados, pois CD11 é um marcador de DCs

imaturas, que ainda não expressam MHC e CD83 (DCs maduras) não predominou nestes cães.

Donovan et al. (2012) demonstraram *in vitro*, que a IDO é induzida em células dendríticas humanas em resposta à infecção por *L. major* e *L. donovani*, indicando que este é um dos mecanismos para o estabelecimento da infecção por *Leishmania* sp. (Mahnke et al., 2002). Em humanos infectados por *Leishmania infantum*, a atividade de IDO sistêmica foi muito maior quando comparada a pacientes saudáveis. Essa atividade foi mensurada pela proporção de quinurenina : triptofano no plasma. Baixos níveis de triptofano e altos níveis de quinurenina confirmam a atividade funcional de IDO (Gangneux et al., 2013). A IDO induzida em locais de inflamação e infecção esgota o triptofano local, resultando na produção concomitante de metabólitos da via quinurenina. Esse fato leva a anergia de linfócitos T e a imunossupressão (Frumento et al., 2002; Yeung et al., 2015). O agrupamento das variáveis mostrou que o grupo infectado mostrou correlação positiva com IL10, ácido quinurênico, ácido quinolínico e carga parasitária, tanto na orelha quanto no plano nasal. Portanto, a IL-10 potencializa a indução de IDO, aumenta a metabolização do triptofano e a produção dos metabólitos da quinurenina e inibe a produção de IL-12 (imunossupressão). Possivelmente o ácido quinolínico e o ácido quinurênico influenciam na ativação dos linfócitos TCD4, linfócitos TCD8 e das células NK no microambiente cutâneo, fato que permite a sobrevivência dos parasitas na pele. Esta hipótese é reforçada pelo estudo de Moreira et al. (2018), que avaliaram cães naturalmente infectados por LV e verificaram que o grupo assintomático apresentou alta densidade de CD4 e CD8 na pele, com diferenças significativas entre o grupo sintomático e o controle.

O grupo infectado apresentou maiores medianas de Treg no plano nasal e orelha, com diferença significativa do grupo controle somente no plano nasal ($P < 0,001$). Treg também foi descrita por Bourreau et al. (2009), que demonstraram que a alta expressão de IDO mRNA está associada a elevados níveis de Foxp3 mRNA, reforçando a hipótese de que a IDO pode ser um dos elementos imunossupressores induzidos por linfócitos Treg durante a leishmaniose humana.

Alguns autores destacam a hipótese de que o ácido quinolínico pode aumentar a produção de radicais livres e induzir a atividade de NOS em astrócitos e neurônios, o que resulta em estresse oxidativo (Lugo-Huitrón et al., 2013). O grupo infectado do

presente estudo apresentou maiores medianas de imunomarcações do ácido quinolínico ($P < 0,001$) e correlação positiva tanto no plano nasal quanto na orelha. Esse fato parece não coincidir com os relatos destes autores, pois a presença de células dendríticas imaturas e a predominância de macrófagos M2 nos cães infectados sugere um ambiente imunossupressor, o qual não contribui para a ativação de macrófagos pró-inflamatórios. A avaliação do óxido nítrico na pele de cães com LV em estudos futuros seria importante para esclarecer esta hipótese.

Apesar de outros estudos demonstrarem que quanto mais triptofano disponível no tecido, maior e melhor será a resposta a antígenos, devido a inibição da produção dos seus metabólitos, pela degradação induzida por IDO, outros estudos revelaram que um aumento na concentração de triptofano pode levar a toxicidade tecidual. Altas doses de triptofano causam aumento e acúmulo de leucócitos nos tecidos (Gross et al., 1999). Ainda foi descrito que altas doses de triptofano, comumente utilizado no tratamento de insônia e depressão em humanos, levaram a desordens imunológicas, lesões cutâneas e a Síndrome da Eosinofilia-Mialgia (Silver et al., 1990). Sendo assim, estudos posteriores são necessários para avaliar os níveis ideais de triptofano para estimular uma resposta imune mais eficiente nos cães com LV. Outra possibilidade seria inibir a enzima IDO, impedindo a degradação do Triptofano e inibindo a imunomodulação feita pelos metabólitos do triptofano.

5. Conclusões

No grupo infectado houve maior proporção de macrófagos M2, de células dendríticas imaturas, ácido quinolínico e quinurênico, IL10 e de linfócitos Treg, o que indica a predominância de uma resposta imune Th2, inibição da ativação de linfócitos T, da apresentação eficiente de antígenos, entre outros.

A presença dos metabólitos do triptofano no microambiente cutâneo mostra o papel imunossupressor dos mesmos durante a infecção por *Leishmania infantum*, possivelmente contribuindo para a persistência da infecção na pele e consequente distribuição sistêmica do parasita.

REFERÊNCIAS

- Bourreau E, Ronet C, Darcissac E, Lise MC, Sainte Marie D, Clity E, Tacchini-Cottier F, Couppie P, Launois P (2009) Intralesional Regulatory T-Cell Suppressive Function during Human Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. **Infection and Immunity**, v. 77, p. 1465–1474.
- Brasil (2017) Ministério da Saúde (MS) / Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Ministério da Saúde**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 189p.
- Brasil. Decreto nº. 51.838, de 14 de março de 1963. Baixa Normas Técnicas Especiais para o Combate às Leishmanioses. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 1963. - Seção 1, p. 2865.
- Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A (2014) Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. 480, p. 1-16.
- Donovan MJ, Tripathi V, Favila MA, Geraci NS, Lange MC, Ballhorn W, Mcdowell M A (2012). Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 464–472.
- Feijó D, Tibúrcio R, Ampuero M, Brodskyn C, Tavares N (2016) Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**. v. 2016, p. 1-9.
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB (2002) Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Journal of Experimental Medicine**. v. 196, n. 4, p. 459–468.
- Gangneux J, Poinsignon Y, Donaghy L, Amiot L, Tarte K, Mary C, Robert-Gangneux F (2013) Indoleamine 2,3-dioxygenase activity as a potential biomarker of immune suppression during visceral leishmaniasis. **Innate Immunity**, v. 19, n. 6, p. 564–568.
- Gross B, Ronen N, Honigman S, Livne E (1999) Tryptophan toxicity – time and dose-response in rats. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 467, p. 507–16.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB (2006) Relationship between Canine Visceral Leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* Burden in Dermal Inflammatory Foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135(2-3), p. 100–107.
- Jacinto, A. P. P., Melo, G. D., Machado, G. F., Bertolo, P. H. L., Moreira, P. R. R., Momo, C., Souza, T. A., Vasconcelos, R. O. 2018. Expression of matrix

metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 117, p. 1819-1827.

Keszthelyi D, Troost FJ, Masclee AAM (2009) Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**. v. 21, p. 1239–1249.

Lugo-Huitrón R, Muñoz PU, Pineda B, Pedraza-Chaverrí J, Ríos C, Pérez-de la Cruz V (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. **Oxidative medicine and cellular longevity**. v. 2014, p.1-14.

Mándi Y, Vécsei L (2011) The kynurenine system and immunoregulation. **The Journal of Neural Transmission**. v. 119, n. 2, 197–209.

Martinez FO, Helming L, Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective, **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 451–483.

Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H (2002) Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. **Immunology and Cell Biology**. v. 80, p. 477–83.

Moffett JR, Namboodiri MA (2003) Tryptophan and the immune response. **Immunology and Cell Biology**, v. 81, p. 247–265.

Moreira PRR, Bandarra MB, Magalhães GM, Munari DP, Prandini MM, Alessi AC, Vasconcelos RO (2013) Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 149-157.

Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, André MR, Vasconcelos RO (2016) Polarized M2 macrophages in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**. v. 226, p. 69-73.

Moreira PRR, Fernando FS, Montassier HJ, de Oliveira Vasconcelos R (2018) Immunodetection of CD4 and CD8 T Cell in Dogs with Visceral Leishmaniasis. **Annals of Clinical Cytology and Pathology**. v. 4, p. 1-7.

Moreira PRR, Vieira LM, Andrade MMC, Barros Bandarra M, Machado GF, Munari DP, Vasconcelos RO (2010) Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 107, p. 605–613.

Oliveira TMFS, Furuta PI, Carvalho D, Machado RZ (2008). A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** v. 17, p. 7–11.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R (2009) Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 128, p. 87-95.

Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM (2009) L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **International Journal of Tryptophan Research**. v 2, p. 45–60.

Silver RM, Heyes MP, Maize JC, Quearry B, Vionnet-Fuasset M, Sternberg EM (1990) Scleroderma, fasciitis, and eosinophilia associated with the ingestion of tryptophan. **The New England Journal of Medicine**. v. 322, p. 874–81.

Solano-Gallego L, Fernández-Bellon H, Morrell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L (2004) Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum* – infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v. 130, p. 07-12.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM, Tafuri WL (2004) An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffinembedded canine tissues. **The Journal of Immunological Methods**. v. 292, p. 17–23

Tomioka H, Tatano Y, Maw WW, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T (2012) Characteristics of Suppressor Macrophages Induced by Mycobacterial and Protozoal Infections in relation to Alternatively M2 Macrophages. **Clinical and Developmental Immunology**.

Yeung AWS, Terentis AC, King NJC, Thomas SR (2015) Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in health and disease. **Clinical Science**. v. 129, p.601–672.