

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora,

o texto completo desta

TESE

será

disponibilizado somente a partir

de

15/02/2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

FABIANA MACIEL DE OLIVEIRA HERNANDEZ

**Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida
em leucócitos esplênicos caninos**

Araçatuba – SP

2020

FABIANA MACIEL DE OLIVEIRA HERNANDEZ

**Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida
em leucócitos esplênicos caninos**

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 Doutor em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Profa. Ass. Valéria Marçal Félix de Lima

Araçatuba – SP

2020

H557v Hernandez, Fabiana Maciel de Oliveira
Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida em leucócitos esplênicos caninos / Fabiana Maciel de Oliveira Hernandez. -- Araçatuba, 2020
75 f. : il., tabs.

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

1. Retinol. 2. All trans ácido retinóico. 3. Vitamina D3. 4. Zinco. 5. Leishmaniose. 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: Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida em leucócitos esplênicos caninos

AUTORA: FABIANA MACIEL DE OLIVIERA HERNANDEZ

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:

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

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDÃO JÚNIOR
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina do Câmpus de Ribeirão Preto/USP

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI
Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UNISALESIANO - Araçatuba

Araçatuba, 14 de fevereiro de 2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida em leucócitos esplênicos caninos

AUTORA: FABIANA MACIEL DE OLIVIERA HERNANDEZ

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:

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

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. ALCEU AFONSO JORDÃO JÚNIOR
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina do Câmpus de Ribeirão Preto/USP

Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI
Curso de Ciências Biológicas / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO - Araçatuba

Araçatuba, 14 de fevereiro de 2020.

*Aos meus pais **Vanda** e **Geraldo***

*Ao meu marido **Miguel***

*Á minha filha **Luísa***

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre presente em minha vida. “Sou em Ti, És em mim, minha alma diz meu Deus como És lindo (...)”.

À minha orientadora Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pela oportunidade, confiança e disponibilidade em compartilhar sua experiência na pesquisa e docência. Um exemplo de pessoa que preza pelo trabalho responsável e com a máxima excelência, exemplo esse que levarei para a minha vida profissional e pessoal.

Ao meu marido Miguel, que desde o começo me incentivou, mesmo sabendo que não seria fácil para ninguém. Nos momentos mais difíceis trouxe conforto e nunca duvidou de que eu seria capaz de concluir meu trabalho.

À minha filha Luísa, que mesmo antes de ser concebida já sabia que o páreo seria duro, e mesmo assim veio ao mundo pelo meu ventre, para me dar a força e incentivo de que precisava nesse projeto e nessa vida.

Aos meus pais e irmãs, que investiram e acreditaram em mim, e que renunciaram a muitas coisas para me oferecer a melhor educação possível.

A todos os colegas discentes, docentes e funcionários da pós-graduação com quem tive oportunidade de trabalhar junto, pela amizade e parceria ao longo desses quatro anos.

Em especial aos amigos do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba por toda a cumplicidade, parceria e companheirismo. A ajuda de vocês foi indispensável para esse trabalho.

À Técnica de Laboratório Flávia Mari Yamamoto, uma pessoa muito especial e sempre solícita em ajudar a todos.

Aos professores Paulo Sérgio Patto e Flávia de Rezende Eugênio e ao colega Carlos Eduardo de Siqueira responsáveis pelas cirurgias do grupo controle.

À minha banca de qualificação Profa. e Orientadora Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, Profa. Dra. Gisele Fabrino Marques e Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes pelas contribuições ao meu trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba pela oportunidade de estudo e pesquisa num programa de excelência em pleno crescimento.

Ao UniSALESIANO Araçatuba, em especial ao Reitor Padre Luigi Favero e Pró Reitor Acadêmico André Ornellas, e à coordenadora do curso de Nutrição Ariadine Pires, por me permitir exercer a profissão de docente, na qual eu procuro me dedicar com amor e excelência.

Aos meus colegas do UniSALESIANO Araçatuba, em especial às docentes Daniela Navarro e Bruna Grigoletto, pelo apoio, parceria e amizade tão essenciais em nosso convívio diário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento.

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão.”

Thomas Wolfe

HERNANDEZ, F.M.O. **Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida em leucócitos esplênicos caninos.** 2020. 75 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença parasitária endêmica no Brasil, que representa 90% dos casos humanos nas Américas, com aumento da letalidade expressivo a cada ano. A supressão da imunidade celular, com predomínio da imunidade humoral ineficaz no combate ao parasito representa a maioria dos casos de leishmaniose em cães. As limitações quanto ao tratamento convencional, muitas vezes ineficaz no combate ao parasita, instiga a busca por novas alternativas, como o uso coadjuvante de nutrientes imunomoduladores, tais como vitamina A e D, e zinco. O objetivo desse estudo foi avaliar os níveis séricos de vitamina A (retinol), vitamina D (25-hidroxi vitamina D3 ou 25(OH)VD₃) e zinco (Zn) em cães com leishmaniose (CanL), e o efeito da suplementação *in vitro* nas suas formas ativas *all trans* ácido retinoico (ATRA), 1,25-dihidroxi vitamina D3 (1,25(OH)₂VD₃) e sulfato de zinco heptahidratado (SZn) em leucócitos esplênicos de CanL na resposta imune a doença. Baixo nível sérico de retinol e Zn, e alto de 25(OH)VD₃ foi observado na CanL. A suplementação *in vitro* com ATRA, 1,25(OH)₂VD₃ e SZn em leucócitos esplênicos de CanL na presença de antígeno solúvel de *Leishmania* spp. (SLA) aumentou óxido nítrico e espécie reativa de oxigênio. Observamos que o interferon-gama diminuiu no sobrenadante de cultura celular após a estimulação dos leucócitos esplênicos com 1,25(OH)₂VD₃ e SZn. Por outro lado, o fator de necrose tumoral-alfa aumentou no sobrenadante de cultura celular após a estimulação dos leucócitos esplênicos com ATRA e SZn, e a interleucina-10 diminuiu no sobrenadante de cultura celular na estimulação dos leucócitos esplênicos com ATRA, 1,25(OH)₂VD₃ e SZn, e carga parasitária diminuiu na cultura celular na estimulação dos leucócitos esplênicos com SZn. Concluimos que a leishmaniose em cães está associada a deficiência de retinol e Zn, e sugerimos que a ATRA, 1,25(OH)₂VD₃ e SZn estão envolvidos com a regulação imunológica associada a resposta efetora leishmanicida, com um grande potencial de investigação em modelos *in vivo*, especialmente quanto ao Zn.

Palavras-chave: Retinol. *All trans* ácido retinóico. Vitamina D3. Zinco. Leishmaniose.

HERNANDEZ, F.M.O. **Vitaminas A e D, e Zinco regulam a atividade leishmanicida em leucócitos esplênicos caninos.** 2020. 75 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a parasitic disease endemic in Brazil, which represents 90% of cases in the Americas, with an expressive increase in lethality each year. Suppression of cellular immunity, with a predominance of humoral immunity without combating the parasite represents the majority of cases of leishmaniasis in dogs such as vitamin A and D, and zinc. The objective of the present study was to determine the serum levels of vitamin A (retinol), the levels of vitamin D (25-hydroxy vitamin D3 (25(OH)VD₃)), and zinc (Zn) levels in dogs with leishmaniasis (CanL), as well as the effect of *in vitro* supplementation with the active forms of all trans retinoic acid (ATRA), 1,25-dihydroxy vitamin D3 (1,25(OH)₂VD₃) and zinc sulfate heptahydrate (SZn) on spleen leukocytes of CanL dogs regarding the immune response to the disease. We detected low serum levels of retinol and Zn, and high levels of 25(OH)VD₃ in CanL dogs. *In vitro* supplementation with all-trans retinoic acid (ATRA), 1,25(OH)₂VD₃ and SZn of CanL spleen leukocytes dogs in the presence of the soluble antigen of *Leishmania* spp. (SLA) increased the levels of nitric oxide and reactive oxygen species. We also observed that interferon-gamma was reduced in the supernatant of spleen leukocytes stimulated *in vitro* with 1,25(OH)₂VD₃ and SZn, while tumor necrosis factor-alpha was increased after stimulation with ATRA and SZn. Interleukin-10 was reduced after stimulation with ATRA, 1,25(OH)₂VD₃ and SZn, and parasite load was reduced after stimulation with SZn. We conclude that canine leishmaniasis is associated with retinol and Zn deficiency and we suggest that ATRA, 1,25(OH)₂VD₃ and SZn are involved in the immunological regulation of the leishmanicidal effector response, providing a high potential for investigation in *in vivo* models, especially regarding Zn.

Keywords: Retinol. *All trans* retinoic acid. Vitamin D3. Zinc. Leishmaniosis.

APÊNDICE – Referências da Introdução Geral

- [1] World Health Organization, No Title, Leishmaniasis. (2019).
https://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/
(accessed November 26, 2019).
- [2] B. Ministério, S. De Vigilância, D. De Vigilância, Leishmaniose Visceral, 2014.
- [3] R. Lainson, The American leishmaniasis: Some observations on their ecology and epidemiology, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77 (1983) 569–596.
[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90185-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90185-2).
- [4] G. Baneth, S.E. Shaw, Chemotherapy of canine leishmaniosis, *Vet Parasitol.* 106 (2002) 315–324. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00115-2).
- [5] L. Solano-Gallego, A. Koutinas, G. Miró, L. Cardoso, M.G. Pennisi, L. Ferrer, P. Bourdeau, G. Oliva, G. Baneth, Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis, *Vet Parasitol.* 165 (2009) 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>.
- [6] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018, Sinan/SVS/MS. (2018) 1.
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Coef-Incidencia.pdf>.
- [7] D.L. Visceral, E.D.S. Paulo, I. Solteira, P. Barreto, S. Antonio, D.O. Aracangua, L. Paulista, P. Alves, Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo, 2014 a 2019*., (2019) 1.
http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/leish/lv1419_lpi.pdf.

- [8] V. Marc, D. Lima, K. Reinaldo, F. De Souza, F. Rezende, P. Sérgio, D. Bernadete, G. Fabrino, Veterinary Parasitology Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs, 184 (2012) 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.024>.
- [9] P.M.A. Gorak, C.R. Engwerda, P.M. Kaye, Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection, Eur J Immunol. 28 (1998) 687–695. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199802\)28:02<687::AID-IMMU687>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<687::AID-IMMU687>3.0.CO;2-N).
- [10] F. Khadem, J.E. Uzonna, Immunity to visceral leishmaniasis: Implications for immunotherapy, Future Microbiol. 9 (2014) 901–915. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.43>.
- [11] L. Sacchi, L.E. Calvi, L.H. Kramer, E. Ferroglio, G. Grandi, E. Clementi, S. Corona, The Intradermal Leishmanin Reaction Induces Antigen-specific Maturation of Canine Dendritic Cells with Up-regulation of MHCII Synthesis and Expression, J Comp Pathol. 135 (2006) 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.02.009>.
- [12] I. Vouldoukis, J.C. Drapier, A.K. Nüssler, Y. Tselentis, O.A. Da Silva, M. Gentilini, D.M. Mossalayi, L. Monjour, B. Dugas, Canine visceral leishmaniasis: Successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway, Antimicrob Agents Chemother. 40 (1996) 253–256. <https://doi.org/10.1128/aac.40.1.253>.
- [13] E. Pinelli, D. Gebhard, A.M. Mommaas, M. Van Hoeij, J.A.M. Langermans, E.J. Ruitenbergh, V.P.M.G. Rutten, Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: Determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity, Vet Parasitol. 92 (2000) 181–189. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00312-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00312-5).
- [14] B.F.M. Almeida, L.G. Narciso, L.M. Melo, P.P. Preve, A.M. Bosco, V.M.F. Lima, P.C. Ciarlini, Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative

- metabolism and viability of neutrophils in dogs, *Vet J.* 198 (2013) 599–605.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.024>.
- [15] E. Pinelli, R. Killick-Kendrick, J. Wagenaar, W. Bernadina, G. Del Real, J. Ruitenbergh, Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*, *Infect Immun.* 62 (1994) 229–235.
- [16] A.M.P. a W.L.C. dos-Santos a,* , E.E. Jesus a, M. Paranhos-Silva b, E.D.M. a J.C. Santos a, C.O. Baleeiro a, E.G. Nascimento c, L.C.P.-C. a G.G.S. Oliveira a, Associations among immunological , parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis : Emaciation , spleen parasitism , specific antibodies and leishmanin skin test reaction, 123 (2008) 251–259.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.004>.
- [17] J. Alexander, K. Bryson, T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: Paradox rather than paradigm, *Immunol Lett.* 99 (2005) 17–23.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.01.009>.
- [18] G.M. Santos-Gomes, R. Rosa, C. Leandro, S. Cortes, P. Romão, H. Silveira, Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*, *Vet Immunol Immunopathol.* 88 (2002) 21–30.
[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00134-4).
- [19] B.L.L. Maciel, J.G. Valverde, J.F. Rodrigues-Neto, F. Freire-Neto, T.S.L. Keesen, S.M.B. Jeronimo, Dual Immune modulatory effect of vitamin a in human visceral leishmaniasis, *PLoS One.* 9 (2014).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107564>.
- [20] P. Katona, J. Katona-Apte, The Interaction between Nutrition and Infection, *Clin Infect Dis.* 46 (2008) 1582–1588. <https://doi.org/10.1086/587658>.
- [21] F.M. OLIVEIRA, No TitlePERFIL SÉRICO DE ESTRESSE OXIDATIVO, ANTIOXIDANTES E MICRONUTRIENTES EM PACIENTES COM HANSENÍASE, Universidade Estadual Paulista, 2015.

- [22] D. Mafra, S.M.F. Cozzolino, Importância do zinco na nutrição humana, *Rev Nutr.* 17 (2004) 79–87.
- [23] E. Villamor, W.W. Fawzi, The Lilliputian auction. To which all little masters and misses are invited by Charly Chatter. : Walk in young gentlemen and ladies, a going, a going, a going! : The world's an auction, where by young and old, both goods and characters are bought and sold, 18 (1802) 31, [1] p.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.446>.
- [24] J.R. Mora, M. Iwata, U.H. Von Andrian, Vitamin effects on the immune system: Vitamins A and D take centre stage, *Nat Rev Immunol.* 8 (2008) 685–698.
<https://doi.org/10.1038/nri2378>.
- [25] R. Sarni, F. Souza, R. Cocco, M. Mallozi, D. Solé, Micronutrientes e sistema imunológico, *Inst Adolfo Lutz.* 69 (2010) 119–125.
<https://doi.org/10.1590/S1517-86921999000300010>.
- [26] C.D.L. Marques, A.T. Dantas, T.S. Fragoso, Â.L.B.P. Duarte, A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes, *Rev Bras Reumatol.* 50 (2010) 67–80. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000100007>.
- [27] A. Lichtenstein, M. Ferreira-Júnior, M.M. Sales, F.B. De Aguiar, L.A.M. Fonseca, N.M. Sumita, A.J.S. Duarte, Vitamin D: Non-skeletal actions and rational use, *Rev Assoc Med Bras.* 59 (2013) 495–506.
<https://doi.org/10.1016/j.ramb.2013.05.002>.
- [28] J. Ehrchen, L. Helming, G. Varga, B. Pasche, K. Loser, M. Gunzer, C. Sunderkötter, C. Sorg, J. Roth, A. Lengeling, Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*, *FASEB J.* 21 (2007) 3208–3218. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7261com>.
- [29] E. Ramos-martínez, M.I. Villaseñor-cardoso, M.R. López-vancell, F.J. García-vázquez, Experimental Parasitology Effect of 1, 25 (OH) 2D3 on BALB / c mice

- infected with *Leishmania mexicana*, 134 (2013) 413–421.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.05.009>.
- [30] J.P. Whitcomb, M. Deagostino, M. Ballentine, J. Fu, M. Tenniswood, J. Welsh, M. Cantorna, M.A. McDowell, The role of vitamin D and vitamin D receptor in immunity to *Leishmania major* infection, *J Parasitol Res.* 2012 (2012).
<https://doi.org/10.1155/2012/134645>.
- [31] A.S. Prasad, Zinc: Role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 12 (2009) 646–652.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283312956>.
- [32] A.H. Shankar, A.S. Prasad, Zinc and immune function : the biological basis of altered, *Am J Clin Nutr.* 68 (1998) 447–63.
- [33] P. Paradies, G. Lubas, F. Iarussi, E. Pezzuto, M. Sasanelli, Comparison of Standard Protocols for the Treatment of Canine Leishmaniasis in an Endemic Area with and Without Zinc Oral Supplementation, 3 (2017).