

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS CD14⁺
DO SANGUE PERIFÉRICO E BAÇO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Cleber Costa de Martini

Farmacêutico

ARAÇATUBA - SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS CD14⁺
DO SANGUE PERIFÉRICO E BAÇO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Cleber Costa de Martini

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

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

**ARAÇATUBA – SP
2016**

Catalogação na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

	Martini, Cleber Costa de
M366p	Produção de óxido nítrico em células CD14⁺ do sangue periférico e baço de cães com leishmaniose visceral / Cleber Costa de Martini. Araçatuba: [s.n], 2016. 58f. il.; CD-ROM Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016 Orientadora: Profa. Adj. Valéria Marçal Felix de Lima 1. Leishmania chagasi. 2. Zoonoses. 3. Canis familiaris. 4. Macrófagos. 5. Imunidade celular. I. T. CDD 636.2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Produção de óxido nítrico em células CD14+ do sangue periférico e baço de cães com leishmaniose visceral.

AUTOR: CLEBER COSTA DE MARTINI

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Araçatuba, 10 de junho de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cleber Costa de Martini - nascido em 17 de abril de 1980, na cidade de Araçatuba/SP, graduado em Farmácia no ano de 2009 pela Universidade Paulista - UNIP – SP. Durante o curso acadêmico desenvolveu atividades tais como participação em simpósios e congressos. No ano de 2014 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluno especial e em 2015 efetuou a matrícula como aluno regular do programa de mestrado. Paralelo a estas atividades, desenvolveu projetos no Laboratório de Imunologia Celular. Em 2015 integralizou os créditos. Em 16 de março de 2016 foi aprovado no Exame Geral de Qualificação, com o trabalho intitulado “Apoptose celular, produção de óxido nítrico em células CD14⁺ do sangue periférico e baço de cães com leishmaniose visceral,” o qual faz parte desta dissertação.

EPÍGRAFE

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”
Aldo Novak

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”
Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

À Deus, pois sem Ele nada seria possível.

A minha mãe Francisca, que sempre foi minha fortaleza, minha base, sempre esteve do meu lado, me apoiando sempre em todas as minhas escolhas. Agradeço á senhora por todas as minhas conquistas.

Ao meu pai (in memoriam): Ivanildo de Martini, que ao seu modo soube me mostrar o caminho do trabalho e da honestidade. Espero que esteja orgulhoso com mais essa etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Valéria Marçal Felix de Lima pela oportunidade, dedicação, paciência, profissionalismo e principalmente por sempre me mostrar que um trabalho só é bom quando se tem dedicação e comprometimento. Muito obrigado pela oportunidade.

A minha família que é a minha força e o que eu mais amo, meu pai Ivanildo (in memorian), minha mãe Francisca meu maior exemplo de vida, a minha esposa Claudia por sempre me apoiar e estar ao meu lado, ao meu filho Heitor que está pra nascer e já me faz ter a felicidade de ser pai, sem o apoio e a presença de vocês em minha vida nenhuma conquista teria significado. Obrigado por tudo!

A Jéssica Thomé e Stéfani Karin que fizeram parte deste trabalho e colaboraram muito para este resultado final.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária Unesp de Araçatuba que tive o prazer de trabalhar, que me ajudaram muito, passando o conhecimento e indicando o melhor caminho.

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

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, por toda colaboração e pelo auxílio no manejo dos cães.

Aos meus amigos Giuliano Estevam, Ágatha Moraes, Célia Nugoli, Sandra Rillo, Ronaldo Viana, Eduardo Silva, Bruna Nicoleti, Sandra Melo pelo apoio e incentivo.

Aos colegas do laboratório de imunologia celular Breno Almeida, Kathlenn Silva, Gabriela Venturin, Vanessa Marin Chiku, Larissa Melo, Aline Leal e Flávia que estiveram sempre prontos a me ajudar, aos colegas do laboratório ornitopatologia Alex Nakamura e Vinícius, as amigas que fiz durante as matérias cursadas Dora, Walter, Luiz. Com vocês aprendi muito.

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

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS	25
CAPÍTULO 2.....	39
NITRIC OXIDE PRODUCTION IN THE SPLEEN AND PBMCS FROM DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS.....	40
1 INTRODUÇÃO	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Comitê de ética	41
2.2 Animais	41
2.3 Colheita das amostras.....	42
2.4 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico e de leucócitos do baço.....	42
2.5 Imunomarcagem para CD14 e determinação do óxido nítrico intracelular.....	43
2.6 Avaliação da porcentagem de células em apoptose	43
2.7 Extração do DNA e PCR em tempo real	44
2.8 Análise estatística	44
3 RESULTADOS.....	45
3.1 Determinação da concentração de óxido nítrico	45
3.2 CD14+ e CD14+ produtoras de NO	46
3.3 Porcentagem de células em apoptose produtoras de NO.....	47
3.4 Determinação da carga parasitária, correlação com NO e células	

CD14.....	48
4 DISCUSSÃO.....	49
AGRADECIMENTOS.....	52
REFERÊNCIAS	53

TÍTULO – PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS CD14+ DO SANGUE PERIFÉRICO E BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO: Os cães são o principal hospedeiro-reservatório para a leishmaniose visceral (LV) zoonótica, uma doença vetorial causada por *Leishmania infantum*. O óxido nítrico (NO) é a principal molécula envolvida na morte do parasita *Leishmania*, porém não foi quantificada intracelularmente nos macrófagos, e o seu papel na indução da apoptose celular desencadeada na resposta imune contra *Leishmania* não está esclarecido. Nós quantificamos a frequência de células produtoras de NO e sua concentração no sangue periférico, e em macrófagos do baço de cães sintomáticos com LV. Também avaliamos se o óxido nítrico tem correlação com a carga parasitária e a apoptose no baço. Nos cães com LV foi observado maior porcentagem de células produzindo óxido nítrico no sangue e baço do que a observada nos cães do grupo controle. A porcentagem de células CD14+ e CD14/NO do sangue e baço foi maior nos cães infectados que nos controles saudáveis. As taxas de apoptose tardia também se encontraram aumentadas no sangue e baço dos cães infectados em relação aos controles saudáveis. A porcentagem de células produtoras de NO do baço apresentou uma correlação positiva com a carga parasitária. Não foi observada uma correlação com a produção de NO e a apoptose no sangue e baço dos cães infectados, sugerindo que outros mecanismos efetores devem estar atuando na apoptose. As taxas de apoptose elevadas das células produtoras de NO do sangue periférico e no baço estão afetando a sua produção, favorecendo o aumento da carga parasitária e a evolução da infecção.

Palavras chave: *Leishmania chagasi*, zoonoses, canis familiaris, macrófagos, imunidade celular.

TITLE - NITRIC OXIDE PRODUCTION IN CD14+ CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD AND SPLEEN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY: Dogs are the main reservoir host for visceral leishmaniasis (VL) Zoonotic, a vector disease caused by *Leishmania infantum*. Nitric oxide (NO) is the main molecule involved in the death of the parasite *Leishmania*, however it was not quantified intracellularly in macrophages and their role in induction of apoptosis triggered the immune response against *Leishmania* is unclear. We quantified the frequency of cells producing NO and its levels in the peripheral blood, spleen and macrophages in symptomatic dogs with VL evaluate whether nitric oxide is correlated with the parasite load in spleen and apoptosis. In dogs with LV was higher percentage of cells observed producing nitric oxide in the blood and spleen than that observed in the control group dogs. The percentage of CD14 + and CD14/NO blood and spleen was higher in infected dogs than in healthy controls. The late apoptosis rates are also increased in the blood and spleens of infected dogs compared to healthy controls. The percentage of cells producing NO spleen showed a positive correlation with the parasite load. There is a correlation with the production of NO and apoptosis in the blood and spleens of infected dogs was observed, suggesting that other mechanisms may be acting effectors of apoptosis. The high rates of apoptosis in cells producing NO peripheral blood and spleen are affecting their production, favoring increased parasite load and development of infection.

Keywords: *Leishmania chagasi*, zoonosis, canis familiaris, macrophages, cellular immunity.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as 6 doenças tropicais mais importantes afetando principalmente os países mais pobres em desenvolvimento, muito esforço tem sido realizado para a melhora do tratamento, prevenção e diagnóstico da doença (WHO, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica grave potencialmente fatal para os seres humanos, causada por parasitas do gênero *Leishmania*. A incidência da LV é estimada em 500.000 casos com 20.000 à 30.000 mortes ao ano, se destacando como a segunda causa de morte relacionada com parasita após a malária (WHO, 2014). A idade, o estado nutricional e as características imunogenéticas do indivíduo, são os fatores que determinam a gravidade das manifestações clínicas da infecção (BRASIL, 2015).

A LV apresenta distribuição mundial sendo causada por distintas espécies de *Leishmania* no Velho e no Novo Mundo. A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Novo Mundo é feita pela picada do flebotômíneo hematófago *Lutzomyia* (ALENCAR et al., 1991). Somente as fêmeas dos flebotômíneos são hematófagas porque precisam de sangue para o desenvolvimento do ovo (WHO, 2010).

No estado de São Paulo, a doença foi notificada pela primeira vez no município de Araçatuba em 1999, onde foi confirmado o primeiro caso canino autóctone no município (FEITOSA et al., 2000). Mudanças ambientais como desmatamento e a migração de pessoas das zonas rurais para áreas urbanas fez com que ocorresse uma rápida urbanização da LV no Brasil, aumentando o risco de infecção em humanos pelo aumento da exposição ao vetor flebotômíneo (DESJEUX, 2001).

Ao efetuar o respasto sanguíneo em um vertebrado infectado, o flebotômíneo ingere amastigotas de *Leishmania* spp que sofrem divisão binária e se diferenciam em formas promastigotas que colonizam a faringe e o esôfago

do vetor, onde se diferenciarão na forma promastigosta metacíclica infectante. O flebótomo infectado, ao picar um novo hospedeiro vertebrado, inocula as formas promastigotas do parasita na corrente sanguínea que são fagocitadas por células do sistema fagocitário. Já no interior dos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária de uma maneira tão intensa que os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que serão novamente fagocitadas por novos macrófagos (BRASIL, 2003).

A infecção é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados entre hospedeiros humanos onde é chamada de leishmaniose antroponótica ou leishmaniose zoonótica quando a transmissão ocorre de animais para humanos (DESJEUX, 1996).

O parasita é transmitido de um cão infectado para outro pela picada de flebotomíneos e, possivelmente, por outros artrópodes vetores, como pulga (FERREIRA et al., 2009) e carrapatos (COUTINHO et al., 2007), e ainda transfusões de sangue (OWENS et al., 2001). Após o repasto sanguíneo nos cães os parasitas rapidamente se espalham para os linfonodos e no baço através da linfa e sangue e, eventualmente, atingem os rins e fígado. Eles podem também afetar os órgãos reprodutores, sistema digestivo e respiratório, pele e bexiga (MOLYNEUX; ASHFORD, 1983).

Na rotina laboratorial o diagnóstico da LVC pode ser realizado através de exames diretos como: parasitológico com um microscópio de luz para a visualização da forma amastigota em aspirados da medula óssea ou linfonodos, detecção do DNA parasitário por PCR no sangue, baço ou linfonodos; ou indiretos como testes sorológicos baseados na detecção do anticorpo anti-*Leishmania* como ELISA, RIFI (WHO, 2010).

O ELISA utilizando antígeno total derivado do parasita apresenta uma sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (CÂNDIDO et al., 2008). Já a técnica de PCR mostra uma sensibilidade de 92% e especificidade de a 100% (STRAUSS-AYALI et al., 2004), porém o desenhos do iniciador e a amostra

utilizada na reação são fatores críticos no sucesso da reação (FRANCINO et al., 2006; GONTIJO; MELO, 2004).

Os cães são considerados os principais reservatórios do parasita que causa a LV (GRAMICCIA; GRADONI, 2005), apresentam parasitismo intenso na pele e tem um contato próximo com os seres humanos que pode favorecer a transmissão da doença (DEANE; DEANE, 1955).

Além dos cães, o parasita também pode utilizar outros animais reservatórios como os *gambás* (*Didelphis marsupialis*) (SANTIAGO et al., 2007) e o *cachorro do mato* (*Cerdocyon thous*), roedores e equídeos também podem ser reservatórios da *Leishmania* (WHO, 2010).

No cão os sinais clínicos da LV podem surgir entre 3 meses a sete anos após a infecção, os mais observados que incluem a perda de peso, apatia, dificuldade locomotora, linfadenomegalia e esplenomegalia, isso pode ser acompanhado da redução de linfócitos T a aumento na produção de anticorpos e linfócitos B (SALZO, 2008).

Os macrófagos desempenham um papel chave na LVC, pois são as células parasitadas e responsáveis por iniciar a resposta imune. A célula T responde ao antígeno através do engajamento do receptor TCR da célula T no MHC associado ao peptídeo no macrófago. A função efetora desta interação é determinada por sinais adicionais da ligação de moléculas coestimulatórias sobre a superfície das células T e seus ligantes nas células apresentadoras de antígeno. Dependendo da natureza e magnitude desses sinais a célula irá gerar citocinas ou desenvolver funções regulatórias ou citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007).

O desenvolvimento da LVC vai depender especificamente do tipo de resposta imune estabelecido pelo hospedeiro e da proliferação do parasita na pele e órgãos viscerais. A resposta imune inata em conjunto com a resposta adaptativa desempenham função importante na proteção contra o parasita podendo controlar a infecção por *Leishmania* (MORENO; ALVAR, 2002).

O sucesso no combate a *Leishmania* dependerá da capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta celular T específica, com a ativação

de macrófagos mediados pela ativação de citocinas derivadas de células T (CARRILLO; MORENO, 2009).

Em cães o perfil de resistência a LV tem sido associada à resposta Th1, com aumento da expressão de IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α , enquanto que os animais que exibem perfil suscetível, apresentam resposta Th2, com predominância de IL-4, IL-10 e TGF- β (MENEZES-SOUZA et al., 2011). Como já demonstrado em sobrenadantes de cultura de macrófagos, a sobrevivência intracelular de parasitas *L. infantum* é reduzida com o aumento da produção de IFN- γ e TNF- α e diminuição de IL-10 (TURQUETTI et al., 2015).

Entretanto, a ativação de células T CD4+ com perfil de resposta Th2 favorece a sobrevivência do parasita com aparecimento de lesões nos cães com LV em função da ativação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 que promovem ações supressivas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000; PINELLI et al., 1994).

Altos níveis de TNF α são produzidas nas células do baço de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp, sugerindo que a presença do parasita *L. chagasi* induz uma resposta imune com forte expressão desta citocina (MICHELLIN et al., 2011). Em cães infectados com LV foi observada uma correlação negativa fraca entre a expressão de TNF α com a carga parasitária presente no baço, sugerindo o papel de proteção desta citocina durante a doença (CAVALCANTI et al., 2015). A morte do parasita também foi associado a maior produção de TNF α em sobrenadante de cultura de macrófagos de cães infectados com LV (TURQUETTI et al., 2015).

Cães infectados apresentam número reduzido de linfócitos T CD4+ e TCD8+ com forte correlação com a evolução clínica, as células T CD8 são associadas à proteção por mediar mecanismos citotóxicos que conferem auxílio contra a LVC (LEAL et al., 2014). Cães que mostram um perfil de resistência a infecção, apresentam uma resposta adaptativa associada com linfoproliferação específica ao parasita, produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α que ativam os macrófagos aumentando sua capacidade leishmanicida

através da produção de NO (CARRILLO; MORENO, 2009; ZAFRA et al., 2008;).

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor produzido a partir do substrato L-arginina através de uma reação mediada pela enzima iNOS. Está envolvido em uma série de reações no organismo como relaxamento muscular e papel protetor dos vasos sanguíneos por contribuir para a manutenção do tônus vascular, regulação da pressão sanguínea e prevenção da agregação plaquetária, assim como importante mediador citotóxico de células imunes ativadas (DUSSE et al., 2003).

O NO é produzido principalmente por células do sistema imune como células dendríticas, células NK, macrófagos, neutrófilos entre outras. Tem atividade antimicrobiana participando da morte ou redução da replicação de agentes infecciosos como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (BOGDAN, 2001). Possui ação citotóxica, atuando na destruição de parasitas, microorganismos e células tumorais (JAMES, 1995; MONCADA et al., 1991).

No sistema imunológico o NO é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune que expressam a iNOS, causando danos oxidativos severos às células alvo (BARRETO; CORRÊA, 2005).

O NO também pode reagir com ácidos nucléicos, elementos estruturais como sistemas de ferro e enxofre (Fe-S), moléculas associadas à virulência de patógenos infecciosos e componentes de replicação que são base para o seu efeito antiviral e antimicrobiano direto. E efeitos indiretos como degradação autofagossomal de bactérias, apoptose de células do hospedeiro para evitar o crescimento intracelular de bactérias como visto em macrófagos derivados de medula óssea de murinos (BOGDAN, 2015).

O controle da carga parasitária por ação do NO também pode se dar através da redução da atividade metabólica microbiana, capaz de causar prejuízo suficiente na replicação do patógeno in vivo, permitindo que a resposta imune propicie a resolução clínica da infecção (MULLER et al., 2013).

A *Leishmania* spp. é um parasita intracelular obrigatório, que vive e se replica predominantemente em macrófagos. Os macrófagos podem matar o parasita ou permitir o seu crescimento em função da ação das enzimas óxido nítrico sintase induzível 2 e arginase 1 que metabolizam o mesmo substrato, a L-arginina, competitivamente regulando as citocinas do tipo 1 e tipo 2 (MUNDER et al., 1999). A citocina de tipo 1, IFN- γ , induz ativação clássica de macrófagos e expressão de iNOS, que oxida a arginina em duas etapas levando a produção de NO, o metabólito responsável pela morte do parasita. A expressão da iNOS é regulada por citocinas como IFN- γ , cofator tetrahipterina, fatores de transcrição STAT1 e NF-kB que induz a produção de NO (BOGDAN, 2015).

Em cães o NO tem sido evidenciado como a principal molécula efetora responsável por mediar à morte intracelular de parasitas de *Leishmania*, o agente causador da leishmaniose (PINELLI et al., 2000).

Em macrófagos murinos a sobrevivência do parasita *Leishmania* dentro de macrófagos ocorre em função de sua habilidade em diminuir a produção de NO através da inibição da enzima iNOS (BALESTIERI et al., 2002). Além disso a internalização do amastigosta pela ligação da fosfatidilserina na membrana dos macrófagos, induzem estes macrófagos a secretarem as citocinas IL-10 e TGF- β que inibem a expressão de iNOS resultando na produção diminuída de NO (KIMA, 2007).

Em macrófagos caninos foi observado uma forte correlação entre a atividade anti-*Leishmania* e a produção de NO por macrófagos infectados (PINELLI et al., 2000), assim como em macrófagos humanos o NO se mostra essencial para aumentar a atividade citotóxica e microbicida contra o parasita (PANARO et al., 2001).

A medida da concentração de NO em amostras de sangue ou tecidos estudados na LVC, foram realizadas indiretamente como a quantificação da iNOS (FAILLI et al., 2002), ou a concentração de nitrato/nitrito em sobrenadante de cultura celular. A determinação de NO sempre foi considerada difícil em função de sua baixa concentração e sua meia vida curta (KIECHLE;

MALINSKI, 1993). Muitas tentativas para se determinar a concentração do NO foram realizadas como ensaios de quimiluminescência, o uso de eletrodos eletroquímicos, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica e captura de NO com a hemoglobina (CHATTON; BROILLET, 2002). Contudo, esses métodos não identificam a população analisada e não analisam eventos intracelulares (CHATTON; BROILLET, 2002). O uso de sonda para a detecção intracelular do NO, pode trazer informação mais precisa sobre os níveis reais produzidos e ainda pode ser associado a marcadores fenotípicos para a identificação da célula produtora (SARKAR et al., 2011).

Diferentes estudos tem buscado elucidar a função do NO no processo infeccioso em cães LV. Em cães com LV foi observado uma correlação negativa entre a expressão da enzima iNOS, detectada por imunohistoquímica, e a carga parasitária em amostras do linfonodo e baço (SANCHES et al., 2014). A detecção imunohistoquímica da iNOS no baço de cães sintomáticos com LV foi maior comparado ao controle (SANTOS et al., 2011). Porém esses estudos utilizaram a expressão da enzima iNOS como forma indireta para determinar o papel do NO na resposta imunológica.

O nitrito (NO_2) subproduto do NO também tem sido avaliado em cães com LV. Em cães infectados o NO_2 foi maior que nos controles, e nos cães assintomáticos o NO_2 foi maior que nos sintomáticos, sugerindo a sua participação no controle da parasitemia na LVC (SOUZA et al., 2014).

Na LVC a produção de NO_2 com redução de carga parasitária foi observada em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico com o tratamento com anticorpo bloqueador de PD-1, juntamente com o $\text{TNF-}\alpha$, sugerindo que além de citocinas ativadoras as moléculas envolvidas na coestimulação também podem participar da regulação da sua produção (CHIKU et al., 2016).

Embora o papel microbicida do NO na LVC já tenha sido demonstrado em diferentes estudos (BOGDAN, 2001; PINELLI et al., 2000; RODRIGUES et al., 2007; SARKAR et al., 2011) importante observar que cepas circulantes já demonstraram resistência ao NO (SANTOS et al., 2012).

Além da sua função microbicida o NO também pode estar envolvido na imunossupressão da LV, pois pode induzir a apoptose e em diferentes parasitoses sua produção excessiva está associada com ausência de resposta linfocitária, e também pode induzir apoptose em diferentes tipos celulares (BOGDAN, 2001).

Com o objetivo de evitar uma invasão bacteriana, o NO pode regular negativamente reações inflamatórias induzindo a apoptose de células imunes como macrófagos, neutrófilos e células T (KRONCKE et al., 1997). O NO produzido por tumor pode induzir a apoptose de linfócitos T gerando a supressão imune do hospedeiro (KRONCKE et al., 1998).

O NO tem um potencial altamente tóxico, modula a atividade biológica de proteínas por interações diretas com o centro de ferro e pode induzir a apoptose e necrose prejudicando o ciclo respiratório e síntese de DNA (MELINO et al., 1997).

O NO e o peroxinitrito afetam a função da mitocôndria a inibindo a respiração através do citocromo c oxidase e complexos I e III, respectivamente (ANKARCRONA et al., 1995; LIZASOAIN et al., 1996). A inibição da respiração da mitocôndria pode contribuir para o efeito proapoptótico do NO pela redução do potencial de membrana, abrindo poros temporários para liberação do citocromo c (BOYD; CADENAS 2002; MONCADA; ERUSALIMSKY 2002), e o citocromo c liberado ativa as caspases (KLUCK et al., 1997).

O NO pode ativar proteínas kinase e isso está relacionado à decisão da sobrevivência celular. O NO ativa todas as vias da MAPK, tais como as JANUS KINASE, p38 kinase e ERK I e II levando a sinais pro apoptóticos que levarão ao acúmulo de p53, ativação de caspases e dissolução celular (CHAE et al., 2001; CHENG et al., 2001; GHATAN et al., 2000; GU et al., 2000; KIBBE et al., 2002; KIM et al., 2002).

Em cães infectados com *Leishmania infantum*, ocorre uma redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU et al., 1997). A apoptose de linfócitos T pode estar relacionado com a supressão imunológica observada em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, pois é um dos processos associados

com a regulação da resposta imune da LV e pode influenciar o desenvolvimento da resposta imunológica (ALEXANDER et al., 2001; DAS et al., 1999). A imunossupressão associada com a infecção crônica ocorre devido a altas taxas de apoptose das células T e esse mecanismo pode contribuir para a desorganização da polpa branca do baço e diminuição dos níveis de células T no sangue periférico (LIMA et al., 2012).

A baixa resposta imune celular T observada em cães sintomáticos com alto parasitismo no baço, provavelmente ocorre em função do alto grau de apoptose de células T (SANCHEZ et al., 2004). Receptores Fas e FasL transmembrana estão envolvidos no processo infeccioso da *Leishmania* spp em cães que apresentam elevadas taxas de apoptose de células T (SILVA et al., 2013), assim como na sua forma solúvel sFas e sFasL (PEROSSO et al., 2014). Em um estudo recente, foi visto que a PD1, um coestimulador negativo, e seus ligantes induzem a apoptose de células T CD3+ no sangue e baço de cães com LV, e que o bloqueio desta proteína diminui a apoptose celular aumentando a quantidade de NO (CHIKU et al., 2016).

Os mecanismos apoptóticos de células T na LVC podem ter associação com a supressão imunológica observada nos cães infectados. Já é bem claro na literatura que em cães infectados com LV ocorre acentuada apoptose de linfócitos T CD4 e T CD8 (PEROSSO et al., 2014).

O NO metabólito responsável pela morte do parasita, está descrito na literatura como agente microbicida participando ativamente no controle da infecção (BOGDAN, 2001). No entanto, ainda nenhum estudo foi realizado para avaliar se a produção de NO tem correlação com a carga parasitária e a apoptose já documentada no baço e sangue periférico.

OBJETIVOS

Quantificar os níveis de óxido nítrico produzido por células mononucleares do sangue periférico, e macrófagos do baço em cães sintomáticos com leishmaniose visceral e avaliar se a produção de óxido nítrico tem correlação com a carga parasitária e a apoptose observadas nesses tecidos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. v. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000.

ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8ª ed, Guanabara, Koogan,. p. 706-17, 1991.

ALEXANDER, C.E.; KAYE, P.M.; ENGWERDA, C.R. CD-95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1199-1210, 2001.

ANKARCRONA, M.; DYPBUKT J M.; BONFOCO E.; ZHIVOTOVSKY B.; ORRENIUS S.; LIPTON S A.; NICOTERA P. Glutamate-induced neuronal death: a sucession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. **Neuron.**, v. 15(4), p. 961–973 1995.

BALESTIERI, F. M.; QUEIROZ, A. R.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M.; BARRAL-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. E. A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes. Infect.**, v. 4, p. 23-29, 2002.

BARRETO, R.L.; CORREA, C.R: Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim. Nova.**, v. 28, 6, p. 1046-1054, 2005.

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

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. **Trends. Immunol.**, v. 36, p. 161-178, 2015.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J. P.; SAINT ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 345-35, 1997.

BOYD, C S.; CADENAS E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. **Biol. Chem.**, v. 383: p. 411–423, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 122 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *leishmania*-HIV / Departamento de vigilância das doenças transmissíveis. 1 ed., rev. e ampl. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 67-70, 2009.

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

CHAE, H J.; SO, H S.; CHAE, S W.; PARK, J S.; KIM, M S.; OH, J M.; CHUNG, Y T.; YANG, S H.; JEONG, E T.; KIM, H M.; PARK, R K; KIM, H R. Sodium nitroprusside induces apoptosis of H9C2 cardiac muscle cells in a c-Jun N-

terminal kinase-dependent manner. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1 p. 967–978, 2001.

CHATTON, J.Y.; BROILLET, M.C. Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. **Methods. Enzymol.**, v. 359, p.134-148, 2002.

CHENG, A.; CHAN, S L.; MILHAVET, O.; WANG, S; MATTSON, M P. p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. **J. Biol. Chem.**, v. 276 p. 43320–43327, 2001.

CHIKU, V. M.; SILVA, K. L.; DE ALMEIDA, B. F.; VENTURIN, G. L.; LEAL, A. A., DE MARTINI, C. C.; DE REZENDE EUGÊNIO, F.; DOS SANTOS, P. S.; DE LIMA, V. M. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiol.**, v. 221, p. 879-888, 2016.

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

CÂNDIDO, T. C.; PERRI, S. H.; GERZOSCHKWITZ, T. E. O.; LUVIZOTTO, M. C.; DE LIMA, V. M. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 157, p. 175-181, 2008.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G.C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4⁺ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, p. 307-310, 1999.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital.**, v. 48, p. 61-76, 1955.

DE ALMEIDA LEAL, G. G.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; CARNEIRO, C. M.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A.; FRANCISCO, A. F.; CARDOSO, J. M.; MATHIAS, F. A., CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 472-482, 2014.

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 417-423, 1996.

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

DOS SANTOS, F.R.; VIEIRA, P.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Res.**, v. 108, p.1397-1403, 2011.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; MARIA, G.C. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, n. 4, p. 43-350, 2003

FAILLI, P.; NISTRI, S.; QUATTRONE, S.; MAZZETTI, L.; BIGAZZI, M.; SACCHI, T.B.; BANI, D. Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. **FASEB J.**, v.16, p. 252-254, 2002.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clín. Vet.**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

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

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. (3-4), p. 241-21, 2006.

GHATAN, S.; LARNER, S.; KINOSHITA, Y.; HETMAN, M.; PATEL, L.; XIA, Z.; YOULE, R J.; MORRISON, R S. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxideinduced apoptosis in neurons. **J. Cell. Biol.**, v. 150 p. 335–347, 2000.

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

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v. 35, p. 1169-1180, 2005.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n.4, p. 533-47, 1995.

GU, M.; LYNCH, J.; BRECHER, P. Nitric oxide increases p21(Waf1/Cip1) expression by a cGMP-dependent pathway that includes activation of extracellular signal-regulated kinase and p70(S6k). **J. Biol. Chem.**, v. 275 p. 11389–11396, 2000.

KIBBE, M R.; LI, J.; NIE, S.; CHOI, B M.; KOVESDI, I.; LIZONOVA, A.; BILLIAR, T R.; TZENG E. Potentiation of nitric oxide-induced apoptosis in p53 vascular smooth muscle cells. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 282: p. C625–634, 2002.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 100, p. 567-575, 1993.

KIM, S. J.; JU, J. W.; OH, C. D.; YOON, Y. M.; SONG, W. K.; KIM, J. H.; YOO, Y. J.; BANG, O. S.; KANG, S. S.; CHUN, J S. ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 1332–1339, 2002.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 1087-1096, 2007.

KLUCK, R. M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. **Science**. v. 275, p. 1132–1136 1997.

KRONCKE, K-D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where?. **NO. Biol. Chem.**, v. 1, n. 2, p. 107–120 1997.

KRONCKE, K-D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 113, p.147-156, 1998.

LIMA, V. M.; SANTIAGO, M. E.; SANCHES, L. A. C.; LIMA, B. D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. **J. Zoo. Wild. Med.**, v. 43, p. 943-945, 2012.

LIZASOAIN, I.; MORO, M. A.; KNOWLES, R. G.; DARLEY-USMAR, V. E.; MONCADA, S. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **Biochem. J.** v. 314, p. 877–880 1996.

MELINO, G.; BERNASSOLA, F.; KNIGHT, R. A.; CORASANITI, M. T.; NISTICÒ, G.; FINAZZI-AGRÒ, A. S-nitrosylation regulates apoptosis. **Nature.** v. 388 p. 432-433, 1997.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R. C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A.; OLIVEIRA, G. C.; REIS, A. B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasitol.**, v. 177, p. 39-49, 2011.

MOLYNEUX, D.H.; ASHFORD, R.W. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London: Taylor.; Francis, 1983.

MONCADA S.; ERUSALIMSKY J.D. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 3 p. 214–220, 2002.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends. Parasitol.**, v. 18, p. 399-405, 2002.

MÜLLER, A. J.; AESCHLIMANN, S.; OLEKHNOVITCH, R.; DACHER, M.; SPÄTH, G. F.; BOUSSO, P. Photoconvertible pathogen labeling reveals nitric oxide control of *Leishmania major* infection in vivo via dampening of parasite metabolism. **Cell. Host. Microbe.**, v. 14, p. 460-467, 2013.

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

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

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D., MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 24, p. 187-195, 2001.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN, L.; PARDOLL, D. M.; ALLISON, J. P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.**, v. 104, p. 17765-17770, 2007.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v. 92, p. 181-189, 2000.

SALZO, P.S. Aspectos dermatológicos da leishmaniose canina. *Nosso clínico*, São Paulo, v. 11, n.63, p.30-34, 2008.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA, L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, p. 303-311, 2006.

RODRIGUES, C. A. T.; BATISTA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. C. A.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, P. O. M.; OLIVEIRA, G. G. S.; FREITAS, L. A. R.; VERAS, P. S. T. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* can stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 197-205, 2007.

SANCHES, F.P.; TOMOKANE, T.Y.; DA MATTA, V.L.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta. Vet. Scand.**, v. 56, p. 57, 2014.

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

SANTIAGO, M. E.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; MUNARI, D. P.; MICHELIN, A. E. F.; LIMA, V. M. An investigation of *Leishmania spp.* in *Didelphis spp.* from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v. 150, p. 283-290, 2007.

SANTOS, P.L.; COSTA, R.V.; BRAZ, J.M.; SANTOS, L.F.V.C. ; BATISTA, A.C.; VASCONCELOS, C.R.O.; RANGEL, M.R.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DE MOURA, T.R.; LEOPOLDO, P.T.G.; ALMEIDA, R.P. *Leishmania chagasi* naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric. Oxide.**, v. 27, p. 67–71, 2012.

SARKAR, A.; SAHA, P.; MANDAL, G.; MUKHOPADHYAY, D.; ROY, S.; SINGH, S.K.; DAS, S.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, B.; KUMAR, D.; DAS, P.;

CHATTERJEE, M. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: its applicability in patients with visceral leishmaniasis. **Cytometry**, v. 79, p. 35-45, 2011.

SILVA, K. L.; MELO, L. M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B. B.; SANTOS, P. S.; EUGÊNIO, F. E. R.; LIMA, V. M. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania spp.* **Vet. Parasitol.**, v. 197, p. 470-476, 2013.

SOUZA, C. C.; BARRETO, T. D. O.; DA SILVA, S. M.; PINTO, A. W. J.; FIGUEIREDO, M. M.; ROCHA, O. G. F.; CANGUSSU, S. D.; TAFURI, W. L. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 95, p. 260-270, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 1729-1733, 2004.

TURCHETTI, A. P.; DA COSTA, L. F.; ROMÃO, E. E. L.; FUJIWARA, R. T.; DA PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 163, p. 67-76, 2015.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PÉREZ-ECIJA, R. A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, p. 353-359, 2008.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010 (WHO technical report series; no. 949).

WHO. Leishmaniasis. 2014. disponível em:
<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 02 de abril, 2016.

CAPÍTULO 2

NITRIC OXIDE PRODUCTION IN THE SPLEEN AND PBMCs FROM DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

Summary - Dogs are reservoir host for zoonotic visceral leishmaniasis (VL), a vector-borne disease caused by *Leishmania infantum*. Nitric oxide (NO) is the main molecule involved in the death of the *Leishmania* parasite; however, it has not been intracellularly quantified in macrophages, and their role in induction of apoptosis during the immune response against *Leishmania* is unclear. We quantified the frequency of cells producing NO and its levels in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC), leukocytes from spleen and macrophages in VL symptomatic dogs to evaluate whether NO levels correlated with apoptosis and parasite load in the spleen. The percentage of NO⁺ cells was higher in the blood and spleen of dogs with VL than observed in dogs in the control group. The percentage of CD14⁺ and CD14⁺/NO⁺ blood and spleen cells was higher in infected dogs than in healthy controls. Late apoptosis rates were also increased in the blood and spleen of infected dogs compared to healthy controls. There was a positive correlation between the percentage of cells producing NO in the spleen and parasite load. There was no correlation between the NO levels and apoptosis, suggesting that other mechanisms may be inducing apoptosis. The high rates of apoptosis in cells producing NO in the peripheral blood and the spleen were affecting their production, favoring increased parasite load and development of infection.

Keywords: *Leishmania chagasi*, zoonosis, canis familiaris, macrophages, cellular immunity

1 Introduction

There is a high worldwide mortality rate caused by VL with approximately 350 million people in 98 countries at risk of infection (ALVAR et al., 2012). VL or kala-azar is a zoonotic disease transmitted to mammals by parasites of the genus *Leishmania* (WHO, 2010). Transmission of *Leishmania* between vertebrate hosts in the New World is by the bite of the blood-sucking sandfly *Lutzomyia* spp. (ALENCAR et al., 1991).

In the urban environment, dogs are considered the main reservoir for the parasite that causes VL and are important in maintaining the epidemiological cycle of the disease because a) VL is more prevalent in the canine population than in humans, b) infection in humans is usually preceded by canine cases, and c) dogs have a higher amount of parasites in the skin than men, which favors the infection of vectors (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). The prevalence of leishmaniasis in dogs in endemic areas can reach 20% to 40% of the population (SLAPPENDEL; FERRER, 1990).

In dogs, VL is a systemic disease and can be fatal if left untreated as the host fails to mount an effective protective response against the parasite. Infection spreads in the body of the host via the lymphatic system or becomes blood-borne reaching organs, such as the spleen, lymph nodes, liver and bone marrow, which is rich in mononuclear phagocytes (WHO, 2010).

Dogs with VL exhibit high T-cell apoptosis rates in the peripheral blood and spleen (LIMA et al., 2012). In healthy mononuclear cell cultures infected with *Leishmania infantum* a gradual increase in apoptosis was observed in CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ T cells (PEROSSO et al., 2014). In canine VL, the low cellular immune response most likely reflects the depletion of T cells observed in dogs that had high parasitism in the spleen (SANTOS et al., 2011). Immunosuppression associated with chronic infection occurs due to high rates of apoptosis of T cells, and this mechanism could contribute to the disruption of

the white pulp of the spleen and decreased levels of T cells in the peripheral blood (LIMA et al., 2012).

In infected dogs, protective immunity has generally been associated with cellular immune responses, characterized by high proportions of CD4⁺ T cells and CD21⁺ B cells (COURA-VITAL et al, 2011; REIS et al, 2006) High expression levels of IFN- γ , TNF- α and IL-12 (MENEZES-SOUZA et al., 2011) and increased NO were associated with the microbicidal function of which has been demonstrated in vitro (PINELLI et al., 2000).

In canine VL, NO is increased in macrophage culture supernatant from asymptomatic dogs in relation to the symptomatic group (PANARO et al., 2008), suggesting that it controls the parasitic load. In addition to functioning as a microbicide, the NO may be involved in the immunopathology of the disease because in different parasitic infections its overproduction is associated with the absence of a lymphocyte response and apoptosis in different cell types (BOGDAN, 2001). NO can induce apoptosis in response to inflammatory reactions by different pathways inhibiting respiration of mitochondria to release cytochrome c that activates caspases, or by activating protein kinases, p38, MAPK, Janus kinase e ERK 1 and 2, leading to pro apoptotic signals, with accumulation of p53 and activation of caspases (BRUNE, 2003).

Although several of the apoptosis-inducing mechanisms have been studied in the canine VL (PEROSSO et al., 2014; SILVA et al., 2013), whether NO plays an important role in apoptosis and may contribute to the immunosuppression observed in canine VL has yet to be studied.

Measurement of the NO level in blood and tissue samples from canine VL has been performed indirectly as the quantification of iNOS (FAILLI et al., 2002) or the level of nitrate/nitrite in cell culture supernatants. The determination of NO has always been considered difficult due to its low concentration and its short half-life (KIECHLE; MALINSKI, 1993). Many attempts to determine the level of NO have been undertaken using chemiluminescent tests, electrochemical electrodes, electron paramagnetic resonance spectroscopy and capture of NO with hemoglobin (CHATTON; BROILLET, 2002). However, these

methods do not identify the population analyzed and do not analyze intracellular events (CHATTON; BROILLET, 2002). A probe used for detection of intracellular NO can provide more accurate information regarding the actual levels generated and can be linked to phenotypic markers for identifying the producer cells (SARKAR et al., 2011).

The objectives of this study were to quantify the level of NO produced by PBMC and leukocytes from spleen and macrophages of VL symptomatic dogs and evaluate whether NO correlates with the cell apoptosis in these tissues and spleen parasite load.

2 Materials and Methods

2.1 Ethics Committee

This study was approved by the Research Ethics Committee of Experimental Animals (COBEA) with approval of the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) UNESP - Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - Campus Aracatuba - Faculty of Veterinary Medicine - FMVA - on 15/04/2011, as the process 00679/2011.

2.2 Animals

Twenty adult dogs of various breeds and weights, between two and five years old from the Zoonosis Control Center of Araçatuba were used for this study. These dogs diagnosed with VL were seropositive for *L. infantum* antigen by ELISA assay (LIMA et al., 2003) and positive to *Leishmania* by DNA detection in spleen samples using real time-PCR. All dogs were symptomatic and had at least three clinical signs of VL: 75% had cachexia, 95% onychogryphosis, 70% lymphadenopathy, 70% skin lesions, 30% periocular alopecia, 30% alopecia and 33% other clinical signs.

The control group consisted of ten healthy dogs of various breeds and weights, all owners authorized the use of them for the experiment. The dogs were negative for anti-*L. infantum* antibodies using ELISA (LIMA et al., 2003)

and negative for *Leishmania* DNA in spleen samples using real-time PCR. All animals in the control group demonstrated blood counts within the reference values for the species, were fed with commercial feed and had unrestricted access to water.

2.3 Collection of samples

Dogs with VL were euthanized by intravenous injection of barbiturate anesthesia (thiopental, Cristália Itapira, SP) followed by 19,1% potassium chloride solution according to the 2006 São Paulo state law. After euthanasia, spleen fragments were collected and maintained in RPMI-1640 (Sigma®, USA) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco®, USA), 0,03% L-glutamine (Sigma®, USA), 100 µl/mL penicillin (Sigma®, USA) and 100 mg/mL streptomycin (Sigma®, USA). The blood samples from dogs with VL were obtained by intracardiac puncture and the control group blood samples were taken by jugular vein puncture. Samples were collected into tubes containing sodium heparin and were processed immediately after harvest.

Spleen samples from the control group were obtained by surgical excision using a protocol described by Lima et al. (2012).

2.4 Isolation of mononuclear cells from peripheral blood leukocytes and the spleen

The separation of mononuclear cells from peripheral blood was performed using Ficoll-Paque (Amersham Biosciences, Sweden) following the manufacturer's instructions. The isolated cells were washed three times in phosphate buffered saline (PBS, pH 7,2), resuspended in RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented as described above and maintained at 37°C with 5% CO₂ (Revco, Waltham, MA, USA).

Splenic leukocytes were obtained by maceration of a fragment of spleen approximately 2 cm² with the addition of 10 mL RPMI-1640 (Sigma®, USA) supplemented as previously described. After removal of cellular debris (BD

Falcon Cell strainer, San Diego, CA, USA), the cell suspension was processed with 5 mL of red blood cell lysis buffer containing 7,46 g/L ammonium chloride (NH_4ClO_3) and incubated at 4°C for 10 min, centrifuged at 2.000 rpm for 5 minutes at 20°C, washed three times with PBS (pH 7,2) and suspended in a minimum volume of RPMI-1640 (Sigma, USA) supplemented as previously described.

2.5 Immunostaining for intracellular CD14 and determination of nitric oxide level

Immunostaining for CD14^+ cells was carried out on PBMC and splenic leukocytes with the addition of a PE-conjugated anti-CD14 monoclonal antibody (mouse IgG2a, clone TÜK4, AbDSerotec Oxford, UK). To quantify NO the same cell suspension was treated with DAF-2DA (2 μM) (Sigma-Aldrich, D225, São Paulo, Brazil) and incubated for 30 minutes at 37°C and 5% CO_2 .

After labeling, samples were stored at 4°C in the dark until analysis using the flow cytometer (BD Accuri™ C5 Flow cytometer) and the acquired data were analyzed with BD Accuri™ C6 software (Version 1.0.264.21).

Cells ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from different experimental groups were assessed for fluorescence in 10.000 events counted using the flow cytometer (BD C5 Accuri flow cytometer, San Diego, CA, USA). Unlabeled samples were used as a negative control in order to delimit the negative populations in the samples. After exclusion of debris, cellular fluorescence of the triazole product (DAF-2T) was collected in the FL1 channel and the fluorescence of PE was collected in the FL2 channel. The median values of FL1 were used for the quantification of the amount of NO produced.

2.6 The percentage of apoptotic cells and apoptotic cells NO^+

The Guava Nexin Assay kit (Millipore) was used to determine the percentage of cells undergoing apoptosis following the manufacturer's instructions. Late apoptosis was determined using flow cytometry analysis with

the fluorescence of PE-conjugated annexin V and 7AA-D, collected in the FL2 and FL3 channels, respectively.

The cellular fluorescence of the triazole product (DAF-2T) was collected in the FL1 channel and the gated population was analysis to determine apoptotic cells NO⁺.

2.7 DNA extraction and real-time PCR

DNA was extracted from 0,025 g of spleen samples using a commercial kit (DNeasy Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantification of the parasite load was determined using real-time PCR. The amplification of intergenic ITS1 of the parasite rRNA gene was performed using SYBR Green. The following temperature and cycles were used: initial heating at 94°C for 2 minutes, 40 cycles at 94°C for 15 seconds, and a final extension at 60°C for 1 minute. After the amplification, dissociation curves of the amplified fragment were determined. For each reaction, a standard curve was generated with DNA from *Leishmania chagasi* promastigotes (MHOM/BR00/MER02) using dilutions of 10⁷ to 10³ parasites.

2.8 Statistical analysis

After the data were classified as non-parametric using a test for normality. The comparison of the percentage of cells producing cells NO, CD14⁺, CD14⁺/NO⁺ and cells undergoing apoptosis in the blood and spleen of the infected group to the control group was performed using the Mann-Whitney test. The results were considered to be significant when p<0,05. Correlation analysis was performed using the Spearman test. Statistical analysis was performed and graphics were generated using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, CA, USA).

3 Results

3.1 Determination of nitric oxide level

Previous studies have shown that elevated expression of iNOS in macrophages is associated with a reduced number of amastigotes in the skin, lymph nodes and liver of dogs positive for VL (ZAFRA et al., 2008), but in the spleen, iNOS expression was associated with clinical decline and high parasitism (SANTOS et al., 2011). To verify that the dogs positive for VL were producing NO and its participation in the immune response to the infection, the percentage of NO producing cells in the blood and spleen of the positive dogs and control group dogs was determined, as well as the NO level produced by these cells.

A higher percentage of mononuclear cells producing NO in the blood and splenic leukocytes was observed in dogs with VL compared to the control group ($p < 0,05$; Figure 1A and B, respectively). A higher level of NO was measured in the blood of dogs with VL compared to the controls ($p < 0,05$), but a lower level of NO was measured in the leukocytes from spleen of dogs with VL (Figure 1C and D).

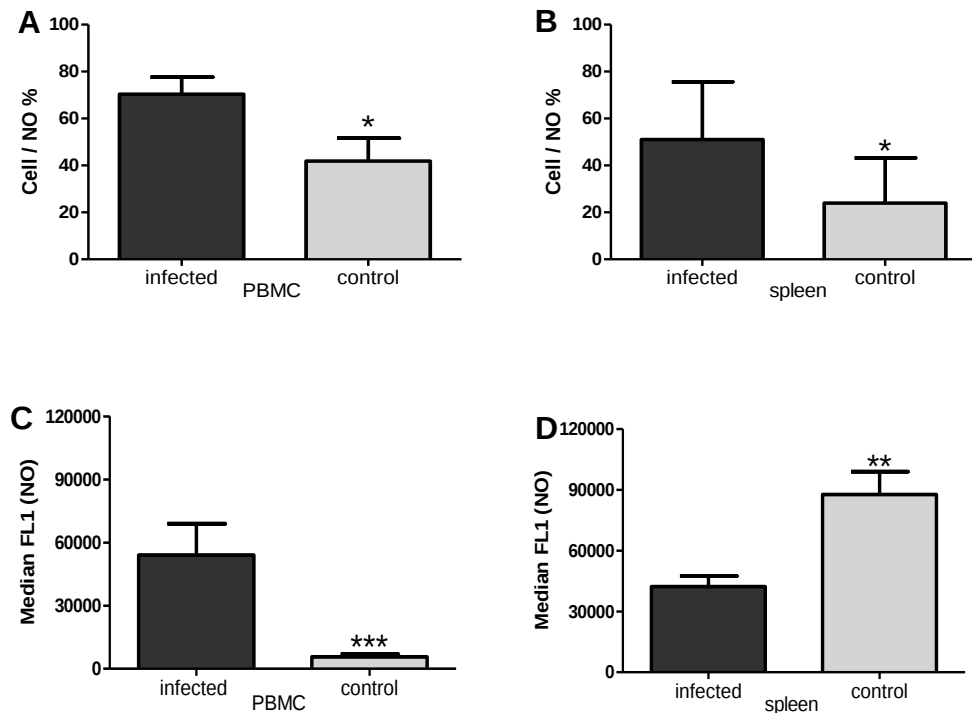


FIGURE 1 - Percentage of NO producing cells in PBMC (A) and the spleen (B) of dogs with VL (black bars) and the control group (gray bars). Amount of NO produced by PBMC the leukocytes from splenic cells of dogs positive for VL (black bars) and the control group (gray bars). The mean and standard deviation are shown (*): Data were analyzed using the Mann-Whitey test (* $p < 0,05$).

3.2 CD14⁺ and CD14⁺/NO⁺ cells

In order to characterize the cell producing NO, a probe was used for the intracellular detection of NO associated with CD14⁺ cells. The percentage of CD14⁺/NO⁺ PBMC and leukocytes from spleen of dogs with VL was higher compared to the control group ($p < 0,05$), as shown in Figures 2A and 2B, respectively. An increase in CD14⁺ cells in the blood and spleen of dogs with VL compared to controls was also observed (data not shown).

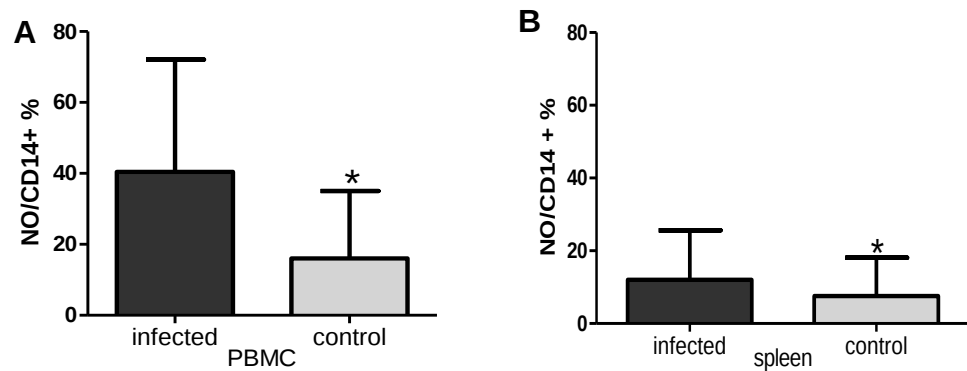


FIGURE 2- Percentage of CD14⁺ cells producing NO in PBMC (A) and leukocytes from spleen (B) of dogs positive for VL (black bars) and the control group (gray bars). The mean and standard deviation are represented (*): Data were analyzed using the Mann-Whitney test (*p<0,05).

3.3 Cellular apoptosis and apoptotic cells NO⁺

Apoptosis of PBMC and leukocytes from the spleen of dogs with VL was higher than the control group (p<0,05), as shown in Figures 3A and 3B; and apoptotic cells NO⁺ of PBMC and leukocytes from the spleen of dogs with VL was higher than the control group (p<0,05), as shown in Figures 3C and 3D.

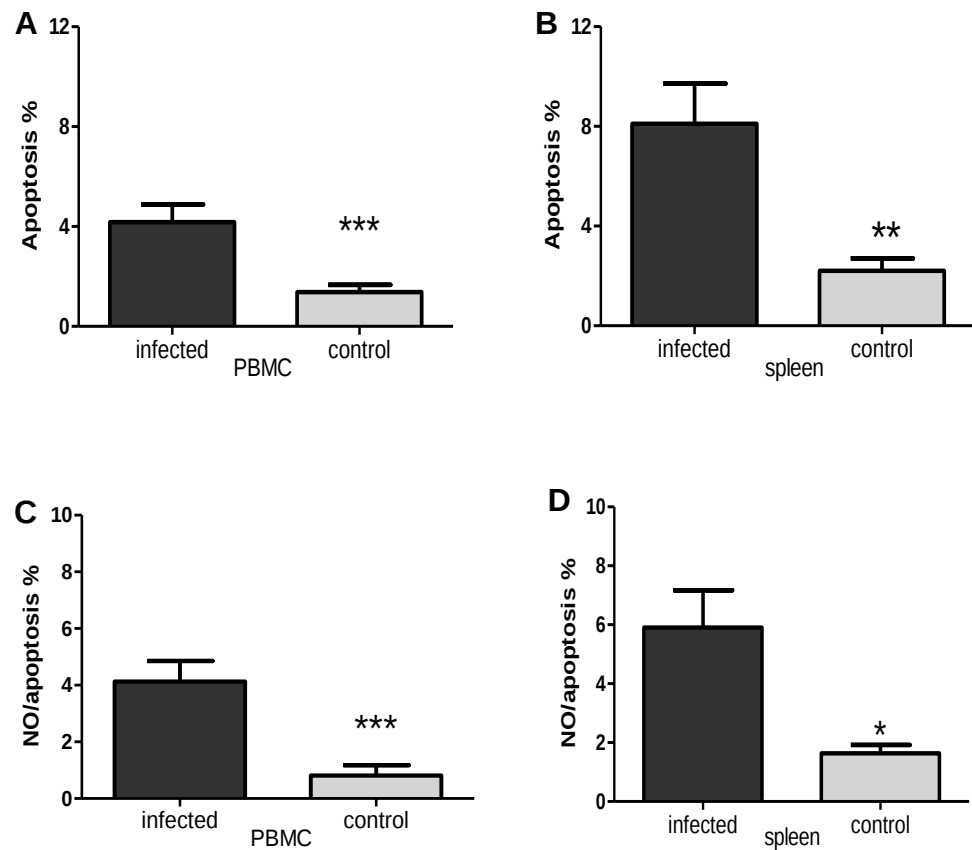
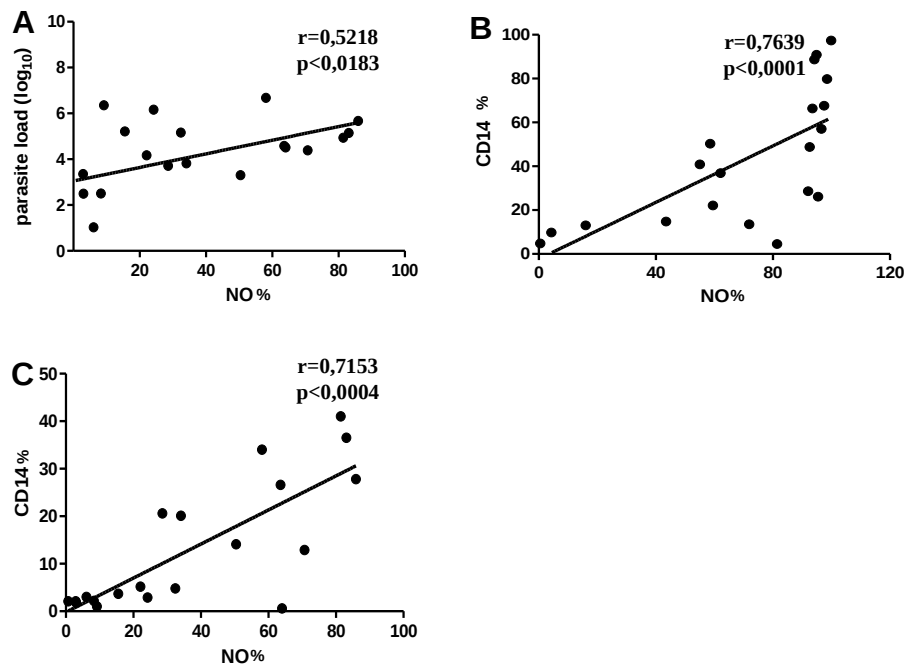


FIGURE 3 - Total percentage of PBMC undergoing apoptosis (A) and in the leukocytes from spleen (B) of dogs positive for VL (black bars) and in the control group (gray bars). Percentage of apoptotic cells producing NO from PBMC (C) and leukocytes from spleen (D) of dogs positive for VL (black bars) and the control group (gray bars). The mean and standard deviation are represented (*): Data were analyzed using the Mann-Whitney test (* $p < 0,05$).

3.4 Determination of parasite load and correlation with NO and CD14⁺ cells

In order to verify that the NO was acting as a leishmanicide, parasite burden was assessed and correlated with the production of NO. The data showed a positive correlation between the percentage of NO producing cells in the spleen with the parasite load observed in this tissue (Spearman $r = 0,5218$, $p < 0,0183$) as shown in Figure 4A. There was no correlation between NO levels and splenic parasite load.

The number of CD14⁺ cells from the peripheral blood showed a correlation with the production of NO (Spearman $r=0,7639$, $p<0,0001$), and similar results were observed in the spleen as shown in Figures 4B and 4C.



4 Discussion

Our results showed that the frequency of NO producing cells, the number of CD14⁺ cells, cells undergoing apoptosis, CD14⁺/NO⁺ cells and NO producing cells undergoing apoptosis were increased in PBMC and leukocytes from spleen of dogs naturally infected with VL. In addition, a higher levels of NO was observed in peripheral blood mononuclear cells; however, NO was observed at lower levels in the spleen of dogs with VL.

The high frequency of cells producing NO observed in the spleen of dogs with leishmaniasis confirmed previous results in which higher proportions of cells producing iNOS were observed in dogs with leishmaniasis (SANCHES et al., 2014; SANTOS et al., 2011). Conversely, the levels of NO were reduced in the spleen, suggesting that the leishmanicidal function is impaired, because a

high iNOS expression was observed in macrophages containing little or no amastigotes internalized in the liver samples, skin and lymph node of dogs with VL (ZAFRA et al., 2008). In our study, the NO levels was reduced in the spleen suggesting an increased parasite load.

This report is the first describing of the production of intracellular NO in PBMC and leukocytes from spleen of dogs with VL. Higher levels of NO in PBMC was measured from dogs with VL compared to controls. This finding is different from what has been reported in human patients with VL, where lower levels of NO were measured in monocytes from patients compared to controls (SARKAR et al., 2011). This result suggests that although the immune response in humans has similarities with the dog, there are inherent species differences.

The high levels of NO detectable in the PBMC could be related to a low parasite load in the peripheral blood, as observed in previous studies (MANNA et al., 2008; QUARESMA et al., 2009).

The percentage of cells undergoing apoptosis was higher in dogs with VL, confirming previous studies (LIMA et al., 2012; PEROSSO et al., 2014; SILVA et al., 2013). However, an association between production of NO and increased apoptosis of PBMC cells and splenic leukocytes was not observed in dogs with VL in this study, suggesting that the process of cell death is triggered by other means as previously described, sFAS, sFASL and caspase-3 are increased in splenic extracts from dogs infected with VL (PEROSSO et al., 2014), and mFAS and mFASL levels were also increased in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the blood and splenic cells of dogs with VL (SILVA et al., 2013).

The frequency of CD14⁺ cells, a phenotypic marker for canine macrophages (DANESHVAR et al., 2012), was higher in PBMC and spleen leukocytes of infected dogs confirming previous studies. An increase in CD14⁺ cells was also observed in the peripheral blood of dogs with VL (LEAL et al., 2014). Indeed, these cells are increased during the infectious processes (FINGERLE et al., 1993; NOCKHER et al., 1998).

The use of an intracellular probe for detecting NO allowed for its quantification, while previous studies used iNOS for the detection of NO in dogs

infected with VL in order to demonstrate the production of NO (SANCHES et al., 2014; SANTOS et al., 2011; ZAFRA et al., 2008). However, the detection of iNOS positive cells does not define NO levels, leading to inconclusive results. In our study, the intracellular detection of NO using a probe allowed evaluation of the frequency of cells producing NO, as well as the levels of production.

Detection of CD14⁺/NO⁺ cells was higher in PBMC and splenic leukocytes of positive dogs, suggesting that this population is the major producer of NO to promote the death of the parasite. The use of CD14 as a macrophage marker enabled the definition of the main cells producing NO. There was a positive correlation between the CD14⁺ cells and the percentage of NO producing cells observed in the PBMC and splenic leukocytes of VL positive dogs. In other studies, an increase in these cells was observed in the peripheral blood, (COURA-VITAL et al., 2011; LEAL et al., 2014; REIS et al., 2006;) colon and jejunum of dogs infected with VL (FIGUEIREDO et al., 2013).

A positive correlation was observed between the frequency of cells producing NO in the spleen and the parasite load. In fact, high expression of iNOS has been observed in the spleen of naturally infected symptomatic dogs associated with a high parasite load (SANTOS et al., 2011). It is likely that the amount produced is insufficient because we observed no correlation between NO production and splenic parasite burden. This finding suggests that other mechanisms might be involved in the death of the parasite such as the cytotoxic activity of CD8⁺ T cells that were present at elevated levels in the peripheral blood of dogs with reduced parasitic load after vaccination (AGUIAR-SOARES et al., 2014).

The lack of correlation between NO production in splenic macrophages and the parasitic load can also be related to the evasive mechanisms of *Leishmania* used to suppress the production of NO in order to maintain their survival in the host and that may be damaging the leishmanicidal activity (WILSON et al., 2005). In addition, the high percentage of cells producing NO in the spleen in the apoptotic process would undermine the control of the parasitic load.

The NO participates in the immune response in the canine VL, but high rates of apoptosis in cells producing NO in the peripheral blood and spleen affect their production, favoring increased parasite load and development of infection. The mechanism of inducing apoptosis of cells producing NO needs to be better characterized.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES for granting a masters scholarship and the Amparo Research Foundation, FAPESP (process 2013 / 06684-9) for funding the research.

REFERÊNCIAS

AGUIAR-SOARES, R.D.; ROATT, B.M.; KER, H.G.; MOREIRA, N.; MATHIAS, F.A.; CARDOSO, J.M.; GONTIJO, N.F.; BRUNA-ROMERO, O.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; REIS, A.B. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4⁺ and CD8⁺) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. **Parasit. Vectors.**, v. 7, p. 61, 2014.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**. v. 7, p. e35671, 2012.

ALENCAR, J.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara, Koogan, 8^a Ed. p. 706-17, 1991.

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

BRÜNE, B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?. **Cell. Death. Different.**, v. 10, p. 864–869, 2003.

CHATTON, J.Y.; BROILLET, M.C. Detection of nitric oxide production by fluorescent indicators. **Methods. Enzimol.**, v. 359, p.134-148, 2002.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P.M.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B. Humoral and cellular immune responses in dogs

with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Vet. J.**, v. 190, p. e43-47, 2011.

DANESHVAR, H.; SEDGHY, F.; DABIRI, S.; KAMIABI, H.; MOLAEI, M.M.; PHILLIPS, S.; BURCHMORE, R. Alteration in mononuclear cell subpopulations in dogs immunized with gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*. **Parasitol.** v.139, p.1689-1696, 2012.

DE ALMEIDA LEAL, G.G.; ROATT, B.M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; FRANCISCO, A.F.; CARDOSO, J.M.; MATHIAS, F.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 205, p. 472-482, 2014..

DOS SANTOS, F.R.; VIEIRA, P.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; REIS, A.B.; MALAQUIAS, L.C. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Res.**, v. 108, p.1397-1403, 2011.

FAILLI, P.; NISTRI, S.; QUATTRONE, S.; MAZZETTI, L.; BIGAZZI, M.; SACCHI, T.B.; BANI, D. Relaxin up-regulates inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide generation in rat coronary endothelial cells. **FASEB J.**, v.16, p. 252-254, 2002.

FIGUEIREDO, M.M.; AMORIM, I.F.; PINTO, A.J.; BARBOSA, V.S.; PINHEIRO, L.E.J.; DEOTI, B.; FARIA, A.M.; TAFURI, W.L. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC. Immunol.**, v.14, p. 22, 2013.

FINGERLE, G.; PFORTE, A.; PASSLICK, B.; BLUMENSTEIN, M.; STRÖBEL, M.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. **Blood**, v. 82, p. 3170-3176, 1993.

KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 100, p. 567-575, 1993.

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

LIMA, V.M.; SANTIAGO, M.E.; SANCHES, L.A.C.; LIMA, B.D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, **Brazil. J. Zoo. Wild. Med.**, v. 43, p. 943-945, 2012.

MANNA, L.; GRAVINO, A.E.; PICILLO, E.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1149, p. 358-360, 2008.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C.; REIS, A.B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasitol.**, v. 177, p. 39-49, 2011.

NOCKHER, W.A.; SCHERBERICH, J.E. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 2782-2790, 1998.

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

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

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v. 92, p. 181-189, 2000.

QUARESMA, P.F.; MURTA, S.M.; FERREIRA, E.E.C.; DA ROCHA-LIMA, A.C., XAVIER, A.A.; GONTIJO, C.M. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. **Acta. Trop.**, v. 111, p. 289-294, 2009.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA, L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, p. 303-311, 2006.

SANCHES, F.P.; TOMOKANE, T.Y.; DA MATTA, V.L.; MARCONDES, M.; CORBETT, C.E.; LAURENTI, M.D. Expression of inducible nitric oxide synthase

in macrophages inversely correlates with parasitism of lymphoid tissues in dogs with visceral leishmaniasis. **Acta. Vet. Scand.**, v. 56, p. 57, 2014.

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

SARKAR, A.; SAHA, P.; MANDAL, G.; MUKHOPADHYAY, D.; ROY, S.; SINGH, S.K.; DAS, S.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, B.; KUMAR, D.; DAS, P.; CHATTERJEE, M. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: its applicability in patients with visceral leishmaniasis. **Cytometry**. v. 79, p. 35-45, 2011.

SILVA, K.L.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B.B.; SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.E.R.; LIMA, V.M. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4⁺ and CD8⁺ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania spp.* **Vet. Parasitol.**, v. 197, p. 470-476, 2013.

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

ZAFRA, R.; JABER, J.R.; PÉREZ-ECIJA, R.A.; BARRAGÁN, A.; MARTÍNEZ-MORENO, A.; PÉREZ, J. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, p. 353-359, 2008.

WHO. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, Switzerland, 2010.

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf

WILSON, M.E.; JERONIMO, S.M.; PEARSON, R.D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.**, v. 38, p. 147-160, 2005.