

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/06/2017.

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

Catálogo 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 memorian): 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 Cláudia 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 Zoonozes 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 Nicoletti, 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 Imunomarcção 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 flebotomíneo hematófago *Lutzomyia* (ALENCAR et al., 1991). Somente as fêmeas dos flebotomíneos 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 flebotomíneo (DESJEUX, 2001).

Ao efetuar o respasto sanguíneo em um vertebrado infectado, o flebotomíneo 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.