

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE sFAS E sFASL NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Juliana Perosso Borges

Bióloga

ARAÇATUBA - SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE sFAS E sFASL NA
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Juliana Perosso Borges

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

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

ARAÇATUBA - SP
2014

|



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Alteração da expressão de sFAS e sFASL na leishmaniose visceral canina.

AUTORA: JULIANA PEROSSO BORGES

ORIENTADORA: Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. GISELE FABRINO MACHADO


Dr. HELIO JOSE MONTASSIER


Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

DATA DA REALIZAÇÃO: 7 de outubro de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA PEROSSO BORGES - nascida em 18 de junho de 1984, na cidade de Penápolis/SP, graduada em Ciências Biológicas no ano de 2005 pela Fundação Educacional de Penápolis - FUNEPE – SP. Durante as atividades acadêmicas desenvolveu atividades tais como estágios extracurriculares, curriculares e simpósios, em 2006 iniciou sua carreira como professora na rede estadual de ensino do estado de São Paulo, no ano de 2010 ingressou na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) como assistente de suporte acadêmico, no ano de 2012 ingressou como aluna especial do programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, e posteriormente como aluna regular do programa de mestrado. Paralelo a estas atividades, desenvolveu projetos no Laboratório de Imunologia Celular. Em 2013 integralizou os créditos e em 2014 entrou na rede municipal de ensino na cidade de Penápolis como professora de nível fundamental I e concluiu seu projeto de pesquisa. Em 23 de abril de 2014 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado “Alteração da expressão de sFAS e sFASL durante a leishmaniose visceral canina” o qual faz parte desta dissertação.

“O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos.”
Oliver Wendell Holmes

“Não sei por quantas lutas irei passar... Mas sei que nunca passarei sozinho.”
Isaias 43:2

A Deus, por ter me concedido a vida e me abençoado em todos os momentos, com saúde, paz, fé e determinação para desenvolver esse trabalho.

A todos os meus familiares, em especial meu pai Darci, minha mãe Ivanice, minhas irmãs Fabiana e Franciele e ao meu marido Alex que são a fortaleza da minha vida.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e orientadora pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem vocês nada disso seria possível!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Valeria Marçal Felix de Lima pelo companheirismo, amizade, paciência, dedicação, por me mostrar o caminho da ciência. Muito obrigada pela oportunidade.

A minha banca de qualificação Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra. Gisele Fabrino Marques e Profa. Dra. Caris Nunes pelas relevantes considerações sobre o meu trabalho.

A minha banca de defesa de dissertação de mestrado, Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra Gisele Fabrino Machado e ao Prof. Dr. Hélio José Montassier por aceitar o convite e pelas sugestões que levaram a melhora do meu trabalho.

Aos meus grandes amigos Kathlenn Silva e Breno Almeida por dividir comigo os conhecimentos adquiridos e me ajudar na coleta do material. As minhas amigas Larissa Melo, Leticia Sanches, Mariana Macedo Vanessa Chiku, Gabriela Venturoli e Aline Leal por todo companheirismo, sinceridade e lealdade em todos os momentos.

As ICs Bruna Brito, Jaqueline Poletto, Laís Tubone, Vanessa Oliveira, Marcos Somenzari, Stéfhany Fernandes, Ricardo e Raphaela do Nascimento que auxiliaram nas pesquisas e garantiram horas de trabalho com muitas risadas.

Aos queridos amigos do Laboratório de Ornitopatologia, Camila Homem, Alex Nakamura, Delvânia, Milena Sato, Tacinha, Delvânia e Maisa.

Ao casal Alex Nakamura e Jussara pela amizade e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Aos companheiros de pesquisas do Laboratório LAPAP Guilherme Dias de Melo, José Eduardo, Fernanda Grecco e ao Augusto Schweigert, pela alegre e divertida companhia.

Ao médico veterinário Saulo Avanço, do Centro de Controle de Zoonozes de Araçatuba pelo auxílio no manejo dos cães.

A bibliotecária, Ana Claudia Martins Grieger Manzatti, pelas correções e explicações das regras para a composição deste trabalho.

A direção da faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, a chefia do DCCRA e a todos os funcionários da unidade pelo apoio e incentivo oferecido em especial a Sonia, Iole, Neu, Silvia, Claudete, Elza, Michele, Martha, Margareth, Cledio, Esau, Lorinaldo, Magna, Alexandre, Cilene, Tiago e Jucilene. Foi maravilhoso trabalhar com vocês!

Aos professores Dra. Marion Burkhardt de Koivisto, Dra. Juliana Regina Peiró, Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles, Dra. Gisele Fabrino Machado e Dra. Mary Marcondes, pela gentileza como sempre me trataram nestes três anos de convivência. Foi um prazer trabalhar com vocês!

Aos cães do Centro de Controle de Zoonoses que infelizmente foram vítimas da leishmaniose visceral e da negligência humana, seus olhares valiam por mais de mil palavras, estes contribuíram para um melhor entendimento desta patologia.

A Deus por me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu “anjo da guarda”, que sempre me protegeu em todos os momentos, me livrando dos perigos das estradas que percorri. “Vou enviar um anjo adiante de ti para te proteger no caminho e para te conduzir ao lugar que te preparei” (Êxodo 23, 20).

A minha preciosa família, meu pai Darci, minha mãe Ivanice, minhas irmãs Fabiana, Franciele, meus cunhados Gustavo e Diogo, meu lindo sobrinho Alan, meus avós, meus tios e primos pelo carinho, torcida e apoio.

Ao meu marido Alex que entendeu os momentos difíceis enfrentados e minhas ausências neste período e compreendeu a importância desse trabalho na minha vida.

As minhas companheiras de viagens Fernanda, Dona Maria e Bruna que sempre tornaram o caminho para casa mais curto e divertido.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio financeiro (processo no. 2011/06214-7).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
OBJETIVOS	22
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2	32
ALTERATION OF SFAS AND SFAS LIGAND EXPRESSION DURING CANINE VISCERAL LEISHMANIOSIS	33
1. Introduction	34
2. Material and Methods	35
2.1. Ethics committee approval	35
2.2. Animal screening	36
2.3. Sample collection	36
2.4. Isolation of mononuclear cells from the peripheral blood	37
2.5. Evaluation of CD3+ CD4+ and CD8+ cell apoptosis	37
2.6. Spleen Extracts and ELISA assay	38
2.7. DNA extraction and real time PCR	38
2.8. Statistical analysis	39
3. Results	39
3.1. <i>L. infantum</i> infection in mononuclear cell from the blood of healthy dogs increased apoptosis in CD3+ CD4+ and CD8+ cells	39
3.2. Levels of sFAS, sFASL and Caspase-3 from the spleens of dogs infected with VL	41
3.3. Evaluation of parasite load in spleen samples of dogs with VL and correlation with sFAS and sFASL	43
4. Discussion	44

Acknowledgments.....47

References.....47

TÍTULO – ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO DE sFAS E sFASL DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.

RESUMO: A leishmaniose visceral (LV) é causada por parasitas intracelulares do gênero *Leishmania* que afeta humanos e várias espécies de animais. Os cães são um dos principais reservatórios urbanos da *Leishmania Infantum* e desempenham um papel central no ciclo de transmissão para os seres humanos utilizando flebotomíneos. A apoptose de linfócitos está envolvida na regulação da resposta imune da LV, podendo contribuir para uma resposta imune ineficaz porque o mecanismo efetor não reduz a multiplicação do patógeno. Um importante regulador da apoptose é a proteína FAS (Cluster de diferenciação 95 CD95) e proteína ligante FAS–FASL (Cluster de diferenciação 178-CD178), sistema envolvido na baixa regulação de reações imunes mediadas por células T citotóxicas. A proteína FAS é um membro de receptor da superfamília fator de necrose tumoral (TNF) que pode ser expresso na forma transmembrana ou solúvel. Os níveis das proteínas solúvel FAS (sFAS), solúvel FASL (sFASL), e caspase 3 ativa, essa última relacionada a cascata apoptótica, foram determinados por ensaio de ELISA de captura nos extratos do baço de 19 cães sintomáticos apresentando LV moderada e em 6 cães saudáveis. A carga parasitária esplênica foi determinada por PCR em tempo real com amplificação do segmento intergênico espaçador transcrito interno 1 (ITS1) do gene de rRNA do parasita. Foi realizada a correlação entre os níveis de sFAS e sFAS-L com a carga parasitária esplênica. Os cães com leishmaniose apresentaram menores níveis de sFAS ($p<0,05$) e elevados níveis de sFASL e caspase 3 ativa ($p<0,05$) no baço que os cães saudáveis. Além disso, foi observada correlação negativa entre a carga parasitária e os níveis de sFASL nos cães infectados. Conclui-se que o aumento do sFASL pode estar relacionado com o mecanismo envolvido na eliminação do parasita.

Palavras chave: FAS-Proteína Associada ao Domínio de Morte (FAS), FAS-Proteína Ligante (FASL), *Leishmania infantum*, Leishmanioses, Morte Celular, Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (TRAIL).

TITLE- ALTERATION OF sFAS AND sFAS LIGAND EXPRESSION DURING CANINE VISCERAL LEISHMANIOSIS

ABSTRACT: Visceral Leishmaniosis (VL) is caused by intracellular parasites of the genus *Leishmania* that affect humans and several animal species. Dogs are one of the main urban reservoirs of *Leishmania infantum* and play a central role in the transmission cycle to humans via sandflies. CD3⁺ cells apoptosis is involved in the immune response in VL. Dysregulation of apoptosis has been implicated in various disease states. An important regulator of apoptosis is the FAS-FAS-associated death domain protein (cluster of differentiation 95-CD95) and FASL-FAS ligand protein (cluster of differentiation 178-CD178) system involved in the down-regulation of immune reactions and in T cell-mediated cytotoxicity. FAS is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor super family, which can be expressed in transmembrane or soluble forms. The soluble levels of FAS (sFAS), FASL (sFASL) and active Caspase-3, this last related to apoptotic cascade, were investigated in the spleen of 19 symptomatic dogs presenting moderate VL and 6 healthy dogs, determined by ELISA assay. The splenic parasite load was determined by real-time PCR monitoring of amplification of the intergenicinternal transcribed spacer (ITS1) gene of parasite rRNA. sFAS levels were lower ($p < 0.05$) sFASL and active Caspase-3 levels were higher ($p < 0.05$) in dogs with VL compared with controls. Negative correlation was observed between parasite burden and sFASL levels. The increase in sFASL could be related to the mechanism involved in the elimination of the parasite.

Keywords: Cell death, FAS-associated death domain protein, FAS ligand protein, *Leishmania infantum*, Leishmaniosis, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As Leishmanioses são causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (ROSS, 1903). É uma doença endêmica, que ocorre em mais de 100 países, principalmente os de climas subtropicais a tropicais (ASHFORD et al., 1992).

No mundo, a cada ano, estima-se que 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea e visceral são registrados segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde estima que quase 3 mil pessoas são diagnosticadas com leishmaniose anualmente, entre os anos 2000 e 2011, 2.700 pessoas morreram vítimas da leishmaniose visceral. Os maiores índices de mortalidade foram registrados no Pará, no Tocantins, Maranhão, Piauí, Ceará, São Paulo, Bahia e em Minas Gerais (GONÇALVES, 2013).

A Leishmaniose visceral (LV) é causada por duas espécies do complexo donovani: *Leishmania (L.) donovani* ou *Leishmania (L.) infantum* (ALVAR et al., 2004) sinônimo de *Leishmania (L.) chagasi* (MAURICIO et al., 2000).

Os agentes transmissores da LV são insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (DESJEUX, 2004). Nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida com a transmissão da leishmaniose visceral é a *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON; SHAW, 1987).

O vetor se infecta ingerindo formas amastigotas do parasita durante o repasto sanguíneo, estas formas da *Leishmania* spp. estão presentes nas células do sistema monocítico fagocitário da pele do hospedeiro infectado. No tubo digestivo do inseto, estes se transformam em promastigotas que se multiplicam no interior do mosquito, de forma que a fêmea do flebotomíneo infectado inocula essas formas infectantes, contaminando o novo hospedeiro; estas, então, são fagocitadas por macrófagos, retornando à forma amastigota, onde se multiplicam, causando rompimento da célula. Ocorrendo assim

disseminação para tecidos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (LAINSON et al., 1987).

Outros artrópodes têm sido descritos como vetores, como o carrapato e a pulga (COUTINHO et al., 2005; FERREIRA et al., 2009). Em cães, a transfusão sanguínea também tem sido apontada como uma via de transmissão do parasita (OWENS et al., 2001).

Os cães apresentam parasitismo intenso na pele e tem um contato próximo com os seres humanos o que pode favorecer a transmissão da doença quando há a presença do vetor (DEANE; DEANE, 1955). Portanto, uma das melhores maneiras de controlar a incidência da doença em humanos é detectar os cães infectados (ASHFORD et al., 1998). Os cães são importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da doença, uma vez que a LV é mais prevalente na população canina que na humana e que a infecção humana normalmente é precedida pela infecção canina (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

Cães infectados apresentam aumento da quantidade de anticorpos circulantes, principalmente da classe IgG (PINELLI et al., 1994). Assim visando o diagnóstico rápido para a doença, muitos testes sorológicos indiretos foram desenvolvidos como a imunofluorescência indireta (RIFI), a reação imunoenzimática (ELISA) e os dispositivos imunocromatográficos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

No ELISA a sensibilidade e a especificidade dependem do antígeno utilizado (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) e do estado clínico do cão (CANDIDO et al., 2008; CARVALHO et al., 2002; METTLER et al., 2005). Candido et al. (2008) compararam o antígeno purificado fucose manose ligante (FML) e o antígeno total bruto (ATB) produzido a partir de promastigotas de *Leishmania*, em cães sintomáticos e oligossintomáticos respectivamente, os testes com o ATB obteve boa sensibilidade (86,7% a 90%) e boa especificidade (93,1% a 100%), com o antígeno FML também foi obtido resultados satisfatórios de sensibilidade (86,6 a 90%) e especificidade (96,6% a 93,3%). O antígeno recombinante A2 utilizado em cães sintomáticos obteve

sensibilidade de 86% e a ocorrência do registro de reação cruzada com o antígeno A2 para o diagnóstico dos parasitas causadores das doenças rickettsiose, ehrlichiose e tripanossomíase americana foi insignificante (CARVALHO et al., 2002).

O método sorológico de ELISA indireto tem sido comumente empregado para o diagnóstico da LV canina por ser um teste sensível, pouco invasivo por apresentar facilidades técnicas e econômicas (LIMA et al., 2003).

Métodos diretos de detecção do parasita também são utilizados como a citologia, onde são observados as formas amastigotas do parasita, em esfregaços de aspirado de linfonodo, medula óssea, baço, fígado, pele e sangue corados com reagentes específicos (LAURENTI, 2009). Destas amostras clínicas pode-se optar por isolar e cultivar o parasita, podendo ser feita em meios artificiais ou inoculação em hamster. Entretanto o cultivo é pouco viável para diagnóstico de rotina, podendo ser um método importante para determinar a espécie do parasita em conjunto com outras técnicas (GOMES et al., 2008).

Parasitas *Leishmania* spp. também podem ser vistos em seções de biópsia histopatológica da pele ou de outros órgãos infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

A detecção molecular do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido proposto como um método de diagnóstico seguro (SOLANO GALLEGO et al., 2009) em sangue, pele, nódulos linfáticos, conjuntiva ou medula óssea de cães infectados. A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de iniciadores, número de cópias do alvo, método de extração de DNA, biópsia do material e tipos de protocolo da PCR (FRANCINO et al., 2006; GONTIJO; MELO, 2004). Vários sistemas baseados em PCR têm sido desenvolvidos para *Leishmania* spp., e muitas sequências alvo já foram identificadas, como também um grande número de iniciadores, desenhados (SCHALLING; OSKAM, 2002). A região ITS1 (espaçador interno transcrito) está situada entre a pequena e grande unidade do gene do rRNA, sendo uma região não codificante e apresenta cerca

de 200 cópias no genoma de *Leishmania*, a região apresenta variação suficiente para permitir a diferenciação das espécies de *Leishmania* e a reação em cadeia da polimerase para essa região não amplifica o DNA de *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Tychothyra terrestre* e *Microsporium audouini* (EL TAI et al., 2000).

Os cães com LV apresentam variação nos sinais clínicos da leishmaniose, sendo os mais frequentes: onicogribose, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia, caquexia, alopecia periocular e lesões cutâneas (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Porém alguns cães podem permanecer aparentemente saudáveis, sendo classificados como assintomáticos. Estes cães representam de 20 a 40% da população de soropositivo para a doença, dos quais 80% posteriormente desenvolvem a forma clínica da doença (NOLI, 1999).

Nos cães, as células T são de fundamental importância na regulação da resposta imunológica ao parasita. A resistência à infecção está associada à ativação de células T CD4+ e uma resposta do tipo Th1 específicas para *Leishmania* spp., do qual produz IFN- γ que ativa os macrófagos (PINELLI et al., 1994). As células T CD8+ também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção (BARBIERI, 2006). A ativação das células T CD4+ e uma resposta do tipo Th2 resulta no aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões, em razão das ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000; PINELLI et al., 1994).

No baço de cães com LV, uma resposta mista do tipo Th1 e Th2 tem sido verificada, envolvendo INF- γ e predominância de IL-10 (CORRÊA et al., 2007). Michelin et al. (2011) observaram no extrato do baço de cães infectados um aumento do nível de TNF- α , IL-4 e IL-10, atribuindo a estas citocinas um importante papel na patogênese da LV.

Um dos processos associados à regulação da resposta imunológica na leishmaniose visceral é a apoptose. Camundongos susceptíveis infectados com *L. donovani* apresentaram aumento da apoptose de células do baço T CD4+ e também foi observado diminuição da produção das citocinas do tipo Th1 (DAS et al., 1999). O aumento da apoptose nas células T também foi relatada no

figado e no baço de camundongos infectados com *L. donovani* (ALEXANDER et al., 2001).

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, envolve uma série de alterações morfológicas no citoplasma e núcleo da célula, levando à inativação e fragmentação da célula, de forma que os fragmentos celulares resultantes do processo são fagocitados por macrófagos. A morte por apoptose é altamente regulada e depende da participação de um grupo de proteínas da família de cisteína-proteases denominadas caspases, muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas (caspases 1, 4, 5, 11 e 12) e pró-apoptóticas (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10) (GRIVICICH et al., 2007).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via intrínseca é muitas vezes ativada em resposta a sinais resultantes de danos no DNA, perda de fatores de sobrevivência celular, ou outros tipos de estresse celular grave. As proteínas pró-apoptóticas são liberadas das mitocôndrias para ativar caspases e desencadear a apoptose (SCHLEICH; LAVRIK et al., 2013).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores TNF. Esta ligação é capaz de ativar a caspase 8, que irá ativar a caspase 3, desencadeando o processo de apoptose (SCHLEICH; LAVRIK et al., 2013).

Um importante regulador da apoptose pela via extrínseca é o sistema FAS (Grupamento de diferenciação 95-CD95) e FAS ligante – (FASL) (Grupamento de diferenciação 178-CD178), ambos estão envolvidos na baixa regulação de reações imunológicas e na citotoxicidade mediada por células T (RUBERTI et al., 1996). A via FAS também é importante na seleção das células T e deleção clonal de células periféricas (GASTMAN, 2001). Na indução de apoptose via FAS, esse receptor sozinho não pode ativar o “sinal de morte celular” (LINCH et al., 1995), este se liga a proteína FASL ativando assim o “domínio de morte” intracelular (FADD-Fas-associado a proteína com domínio de morte), com conseqüente ativação das caspases (KRAMMER, 2000). Essa

via pode ser estimulado “in vitro” por anticorpos monoclonais para FAS (LINCH et al., 1995).

Camundongos deficientes de FAS ou FASL apresentaram síndrome linfoproliferativa, evidenciando o papel destes receptores no controle da homeostase do sistema imunológico (MAHMOOD; SHUKLA, 2010).

FAS e FASL podem ser expressos nas formas transmembrana ou solúvel (RUBERTI et al., 1996). A forma solúvel do FAS (sFAS) é produzida por “*splicing*” alternativo do RNA mensageiro. O papel do sFAS ainda não é totalmente compreendido, mas imagina-se que este seja capaz de inibir a apoptose mediada por mFAS (FAS associado à membrana) por meio da neutralização do seu ligante mFASL (FASL associado à membrana) (RUBERTI et al., 1996).

O FASL solúvel (sFASL) é produzido pela clivagem mediada por enzimas do tipo metaloproteínases (MMP) à partir do mFASL (CURTIN; COTTER, 2003). A ligação do sFASL com mFAS expresso em células-alvo desencadeia uma cascata de sinalização pró-apoptótica, levando à ativação de caspases e morte celular (ORLINICK et al., 1999).

Quando os corpos apoptóticos não são prontamente fagocitados eles podem sofrer lise e perder a integridade da membrana liberando os seus constituintes intracelulares para o meio extracelular, exibindo um perfil de células necróticas ativando mediadores inflamatórios (COHEN et al., 2002; SAVILL et al., 2002).

A ativação do macrófago vai depender do estímulo ou receptores envolvidos na fagocitose de células necróticas ou apoptóticas que podem gerar sinais anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios (KRYSKO et al., 2006).

A apoptose é essencial para o controle homeostático do número de linfócitos, especialmente após o desenvolvimento da resposta imune a um microrganismo invasivo (SCAFFIDI et al., 1999). Contudo, alguns patógenos são capazes de manipular essa resposta, seja diretamente ou por desenvolverem estratégias para sobreviver no hospedeiro, até que tais

mecanismos homeostáticos sejam ativados para reduzir número de células T efectoras (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

A apoptose *in vivo* de células mononucleares e células da epiderme tem sido reportada em doenças infecciosas crônicas, como AIDS (BADLEY et al., 1997), leishmaniose visceral humana e canina (RETHI;EIDSMO, 2012; VERÇOSA et al., 2012) e doença de chagas (LOPES; DOS REIS, 2000), onde tem sido demonstrado que esse processo não é eficaz na eliminação do parasita e tem contribuído para a susceptibilidade do hospedeiro.

Pacientes humanos com LV aguda apresentaram taxas mais elevadas de apoptose nas células T comparado a pacientes curados, também foi observada uma diminuição na produção de IFN γ , sugerindo que este processo pode estar envolvido na falha da imunidade celular (POTESTIO et al., 2004). De fato, tem sido demonstrado *in vitro* que o parasita *Leishmania* spp. e os seus constituintes da membrana pode induzir a apoptose de linfócitos (WOLDAY et al., 1999).

Prates et al. (2011) em experimentos com humanos e camundongos concluíram que as proteínas salivares do vetor pode desencadear a apoptose de neutrófilos mediada por mFasL, mostrando a importância deste receptor logo no início da infecção.

In vivo, pacientes com LV ou com ou sem co-infecção com AIDS apresentaram maiores concentrações plasmáticas de sFAS e sFASL do que indivíduos saudáveis, sugerindo o envolvimento dessas moléculas às alterações patológicas da LV. À medida que a doença e a carga parasitária foram controlados, os níveis plasmáticos de ambos os marcadores apoptóticos retornaram à valores similares dos indivíduos saudáveis, sugerindo que a indução da apoptose é efeito do sFASL quando ligado a matriz extracelular (EIDSMO et al., 2002). *In vitro* foi observado que os níveis de mFAS e sFASL no sobrenadante de cultura de macrófagos humanos infectados por *L. donovani* estavam aumentados, sugerindo que esses receptores podem estar relacionados a apoptose de células T (EIDSMO et al., 2002). Em camundongos susceptíveis a leishmaniose visceral, foi demonstrado aumento da apoptose

dos linfócitos T no baço, especificamente 40% das células TCD4+, em adição diminuiu a produção das citocinas IL-2 e IFN- γ , deixando a mantendo a secreção de IL-4 inalteradas, facilitando a multiplicação do parasita no hospedeiro. Os resultados sugerem que a apoptose é um dos processos associados com a regulação da resposta imune da LV e pode influenciar o desenvolvimento da resposta imunológica (DAS et al., 1999).

Alexander et al. (2001) observaram aumento da apoptose no baço e no fígado de camundongos infectados por *L. donovani*. Camundongos susceptíveis apresentaram apoptose do centro germinativo nos linfonodos (ABREU-SILVA et al., 2004).

Em cães com LV a apoptose também tem sido estudada. Na imunidade inata em cães com LV observou-se apoptose de neutrófilos em todos os estágios da doença (ALMEIDA et al., 2013).

Moreira et al. (2013) observaram que cães com LV sintomáticos apresentam maior carga parasitaria e maior número de células em apoptose na pele sugerindo que o parasita pode estar utilizando da apoptose como um mecanismo de evasão da resposta imunológica. Verçosa et al. (2012) demonstraram que a apoptose está diretamente relacionada à carga parasitária, a intensidade da resposta inflamatória e as manifestações clínicas em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Poucos estudos têm sido realizados sobre a apoptose de linfócitos T na LV canina. A supressão imunológica observada em cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. pode estar relacionado com o mecanismo de apoptose dos linfócitos T. A estimulação constante desta infecção crônica pode desencadear a apoptose e contribuir para o insucesso da imunidade celular.

In vivo cães com LV apresentaram maiores taxas de apoptose de células T no sangue periférico e no baço do que os cães saudáveis (LIMA et al., 2012). Silva et al. (2013) também observaram a participação das moléculas da via extrínseca mFAS, mFASL e TRAIL na apoptose das células CD4+ e CD8+ durante o processo infeccioso de cães com LV.

Alem da função de sFASL na apoptose, esta molécula tem outras funções, podendo ser uma das principais responsáveis por inflamação em algumas doenças (BLANCO-COLIO et al., 2008; CARDINAL et al., 2010). Tem sido sugerido a utilização do sFASL como um marcador da inflamação (MUSIAŁ; ZWOLINSKA, 2012), em estudos *in vitro* esta molécula apresenta atividade quimiotática em leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) de camundongos e humanos (OTTONELLO et al., 1999; SEINO et al., 1998;). Em cães com LV o papel inflamatório do sFASL não foi caracterizado.

O papel das moléculas sFAS e sFASL ainda não foi adequadamente caracterizado na LV canina. A investigação destes parâmetros pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos da resposta imune a infecção e a supressão da imunidade celular observada em cães com LV.

OBJETIVOS

Investigar se a infecção por *L. infantum* induz a apoptose das principais subpopulações de células CD3+, CD4+ e CD8+ sanguíneas de cães saudáveis e se os receptores sFAS e sFASL presentes no baço de cão infectado estão envolvidos com o controle da carga parasitária.

REFERÊNCIAS

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

ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M. N.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S. F.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Vet. Parasitol.**, v. 121, n. 3-4, p. 179-187, 2004.

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, n. 4, p. 1199-1210, 2001.

ALMEIDA, B. F.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M.; PREVE, P. P.; BOSCO, A. M.; LIMA, V. M.; CIARLINI, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Vet. J.**, v. 198, n.3, p. 599-605, 2013.

ALVAR, J.; CANĂVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ASHFORD, R. W.; DESJEUX, P.; DERAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol.Today**, v. 8, n. 3, p. 104-105, 1992.

ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59,n.1, p. 53-57, 1998.

BADLEY, A. D.; DOCKRELL, D.; SIMPSON, M.; SCHUT, R.; LYNCH, D. H.; LEIBSON, P.; PAYA, C. V. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T

lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FASL and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.**, v. 185, n.1, p. 55-64, 1997.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, n.7, p. 329-337, 2006.

BLANCO-COLIO, L.M.; MARTIN-VENTURA, J.L.; TUNON, J.; GARCIA-CAMARERO, T.; BERRAZUETA, J.R.; EGIDO, J. Soluble FAS ligand plasma levels are associated with forearm reactive hyperemia in subjects with coronary artery disease: a novel biomarker of endothelial function? **Atherosclerosis**, v. 201, n.2, p. 407-412, 2008.

CANDIDO, T. C.; PERRI, S. H.; GERZOSCHKWITZ TDE, T. 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,n.3/4, p.175-181, 2008.

CARDINAL, H.L.; BROPHY, J.M.; BOGATY, P.; JOSEPH, L.; HÉBERT, M.J.; BOYER, L.; MADORE, F. Usefulness of soluble fas levels for improving diagnostic accuracy and prognosis for acute coronary syndromes. **Am. J. Cardiol.**, v. 105, n.6, p. 797-803, 2010.

CARVALHO, F. A. A.; CHAREST, H.; TAVARES, C. A. P.; MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E. P.; RABELLO, A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

COHEN, P. L.; CARICCHIO, R.; ABRAHAM, V. Delayed apoptotic cell clearance and lúpus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. **J. Exp. Med.**, v. 196, n.1, p. 135-140, 2002.

CORRÊA, A. P.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n.3/4, p. 267-274, 2007

COUTINHO, M.T.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

CURTIN, J. F.; COTTER, T. G. Live and let die: regulatory mechanisms in FAS-mediated apoptosis. **Cell. Signal.**, v. 15, n. 11, p. 983-992, 2003.

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, n.3, 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.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n.5, p. 305-318, 2004.

EIDSMO, L.; WOLDAY, D.; BERHE, N.; SABRI, F.; SATTI, I.; EL HASSAN, A. M.; SUNDAR, S.; CHIODI, F.; AKUFFO, H. Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 130, n. 2, p. 307-313, 2002.

EL TAI, N.O.; OSMAN, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-

strand conformation polymorphisms and sequencing. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n.5, p. 575-579, 2000.

FERREIRA, M. G. P. A.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; LIMA, V. R. M. A. F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGU, 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. 137, n.3/4, p. 214-221, 2006.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOS REIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 403, n.6766, p. 199-203, 2000.

GASTMAN, B. R. Apoptosis and its clinical impact. **Head Neck**, v. 23, n. 5, p. 409-425, 2001.

GOMES, Y. M.; PAIVA CAVALCANTI, M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G. C.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **Vet. J.**, v. 175, n. 1, p. 45-52, 2008.

GONÇALVES C. **Brasil registra 3 mil novos casos de leishmaniose por ano**. Disponível em: <<http://www.ebc.com.br/noticias/saude/2013/05/brasil-registra-3-mil-novos-casos-de-leishmaniose-por-ano>>. Acesso em: 6 maio 2014.

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.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, p. 335-343, 2007.

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, n.6805, p.789-795, 2000.

KRYSKO, D. V.; DENECKER, G.; FESTJENS, N.; GABRIELS, S.; PARTHOENS, E.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Macrophages use different Internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death Differ.**, v.13, n.12, p.2011-2022, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (eds). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p.1-20.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n.3, p. 517, 1987.

LAURENTI, M.D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bol. Epidemiol. Paul.**; v.6, p.13-23, 2009.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V. M.; FATTORI, K. R.; SOUZA, F.; EUGENIO, F. R.; SANTOS, P. S.; ROZZA, D. B.; MACHADO, G. F. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, n. 2/4, p. 147-153, 2012.

LINCH, D. H.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. FAS and FASL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunol. Today**, v. 16, n. 12, p. 569-574, 1995.

LOPES, M.F.; DOS REIS, G.A. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. **Apoptosis**, v. 5, n.3, p.221-224, 2000.

MAHMOOD, Z.; SHUKLA, Y. Death receptors: Targets for cancer therapy. **Exp. Cell Res.**, v. 316, n. 6, p. 887-899, 2010.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 11, p. 5515-5519, 2005.

MICHELIN, F. A.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-alpha, 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, n.5, p.373-383, 2011.

MOREIRA, P.R.R; DE BARROS BANDARRA, M; MAGALHÃES, G.R.M; MUNARI, D.S.P; Machado, G.F; PRANDINI, M.M; ALESSI, A.C; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v 192, n.1/3, p.149-157, 2013.

MUSIAŁ, K.; ZWOLIŃSKA, D. The sFAS/sFASL ratio as a novel marker of inflammation in children with chronic kidney disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 414, p. 7-11, 2012.

NOLI, C. Leishmaniosis canine. **Waltham Focus**, v.9, n.2, p.16-24, 1999.

ORLINICK, J. R.; VAISHNAW, A. K.; ELKON, K. B. Structure and function of Fas/Fas ligand. **Int. Rev. Immunol.**, v.18, n.4, p. 293-308, 1999.

OTTONELLO, L.; TORTOLINA, G.; AMELOTI, M.; DALLEGRI, F. Soluble FAS ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v.162, n.6, p. 3601-3606, 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, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

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, n.1, p.229-335, 1994.

POTESTIO, M.; D'AGOSTINO, P.; ROMANO, G. C.; MILANO, S.; FERLAZZO, V.; AQUINO, A.; DI BELLA, G.; CARUSO, R.; GAMBINO, G.; VITALE, G.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. CD4⁺ CCR5⁺ and CD4⁺ CCR3⁺ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 113, n.2, p. 260-268, 2004.

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BOZZA, P. T.; DOS REIS, G. A.; BRODSKY, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, V. M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 90, n.3, p. 575-582, 2011.

RETHI, B.; EIDSMO, L. FasL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 163, 2012.

ROSS, R. Further notes on Leishmans bodies. **Br. Med. J.**, v.2, n. 2239, 1903.

RUBERTI, G.; CASCINO, I.; PAPOFF, G.; ERAMO, A. Fas splicing variants and their effect on apoptosis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 406, p. 125-134, 1996.

SANTA ROSA I.C.A.; OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clin. Vet.**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n.12, p. 965-975, 2002.

SCAFFIDI, C.; KIRCHHOFF, S.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Apoptosis signaling in lymphocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 11, n.3, p. 277-285, 1999.

SCHALLING, H. D. F. H., OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, n.8, p. 641-651, 2002.

SCHLEICH, K.; LAVRIK, I. N. Mathematical modeling of apoptosis. **Cell Commun. Signal**, v. 11, n. 1, p.44, 2013.

SEINO, K.; IWABUCHI, K.; KAYAGAKI, N.; MIYATA, R.; NAGAOKA, I.; MATSUZAWA, A.; FUKAO, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Chemotactic activity of soluble FAS ligand against phagocytes. **J. Immunol.**, v. 161, n.9, p. 4484-4488, 1998.

SILVA, K. L. O.; MELO, L. M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B. B.; SANTOS, P. S. R. P. D.; EUGÊNIO, F. V. D. R.; LIMA, V. M. F. 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, n. 3/4, p. 470-476, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRA, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the

diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1/2, p. 1-18, 2009.

VERÇOSA, B. R. L. A. J.; MELO, M. N.; PUERTO, H. L. D.; MENDONÇA, I. L.; VASCONCELOS, A. C. S. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v. 189, n. 2/4, p. 162-170, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 14 out. 2014.

WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; DEMISSIE, A.; BRITTON, S. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. **Infect. Immun.**, v. 67, n.10, p. 5258-5264, 1999.

CAPITULO 2

ALTERATION OF sFAS AND sFAS LIGAND EXPRESSION DURING CANINE VISCERAL LEISHMANIOSIS

ABSTRACT: Visceral Leishmaniosis (VL) is caused by intracellular parasites of the genus *Leishmania* that affect humans and several animal species. Dogs are one of the main urban reservoirs of *Leishmania infantum* and play a central role in the transmission cycle to humans via sandflies. CD3+ cells apoptosis is involved in the immune response in VL. Dysregulation of apoptosis has been implicated in various disease states. An important regulator of apoptosis is the FAS-FAS-associated death domain protein (cluster of differentiation 95-CD95) and FASL-FAS ligand protein (cluster of differentiation 178-CD178) system involved in the down-regulation of immune reactions and in T cell-mediated cytotoxicity. FAS is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor super family, which can be expressed in transmembrane or soluble forms. The soluble levels of FAS (sFAS), FASL (sFASL) and active Caspase-3, this last related to apoptotic cascade, were investigated in the spleen of 19 symptomatic dogs presenting moderate VL and 6 healthy dogs, determined by ELISA assay. The splenic parasite load was determined by real-time PCR monitoring of amplification of the intergenicinternal transcribed spacer (ITS1) gene of parasite rRNA. sFAS levels were lower ($p < 0.05$) sFASL and active Caspase-3 levels were higher ($p < 0.05$) in dogs with VL compared with controls. Negative correlation was observed between parasite burden and sFASL levels. The increase in sFASL could be related to the mechanism involved in the elimination of the parasite.

Keywords: Cell death, FAS-associated death domain protein, FAS ligand protein, *Leishmania infantum*, Leishmaniosis, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)

1. Introduction

Leishmaniosis occur in more than 100 countries, from warm temperate through subtropical to tropical climates (ASHFORD et al., 1992). Visceral Leishmaniosis (VL) is a severe chronic disease that is potentially fatal to humans, caused by different species of the genus *Leishmania* (DESJEUX, 2004). Brazil is currently facing the expansion and urbanization of VL. The transmission cycle, which previously occurred in sylvatic and rural areas, is also currently developing in urban centers, creating favorable conditions for the emergence and reemergence of diseases (DESJEUX, 2004). In association with these factors, environmental and climate changes are occurring, the vector is adapting to human-modified environments and disease that compromise the immune system, such as human immunodeficiency virus (HIV), are rising, contributing to the reemergence of VL (GONTIJO; MELO, 2004).

Dogs present intense skin parasitism and have close contact with humans facilitating transmission of *Leishmania* sp. (DEANE; DEANE, 1955). In endemic areas, up to 85% of infected dogs may be asymptomatic, thus representing a huge risk to the spread of disease, since they are the main domestic reservoir of *Leishmania (L.) infantum* (MICHALSKY et al., 2007), synonymous with *Leishmania chagasi* (MAURICIO et al., 2000).

The increase in apoptosis of T cells in many chronic infectious diseases has been widely discussed (BADLEY et al., 1997; RETHI; EIDSMO, 2012; VERÇOSA et al., 2012). Dogs infected with *L. infantum* show a reduced number of CD4+ T lymphocytes (BOURDOISEAU et al., 1997). The apoptosis of T lymphocytes is one of the processes associated with immune-response regulation in VL and can influence immune response development (ALEXANDER et al., 2001; DAS et al., 1999).

An important regulator of apoptosis is the FAS-associated death domain protein (cluster of differentiation 95-CD95) and FASL-FAS ligand protein (cluster of differentiation 178-CD178) system. FAS is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor super family, which can be expressed in

transmembrane or soluble forms (CASCINO et al., 1996). Forms of soluble FAS (sFAS) are produced upon alternative splicing of the full-length mRNA. The role of sFAS is not understood fully, but is thought to inhibit apoptosis mediated by mFAS (membrane-associated FAS) through neutralizing its ligand, mFASL (membrane-associated FASL)

Few studies have been performed on apoptosis during VL. *In vitro* studies suggest that apoptosis is involved in the suppression mechanism observed in VL. The infection of human macrophages by *Leishmania donovani* increases the level of mFAS in the cell and the level of sFASL in culture supernatant. The significant deregulation of apoptosis via FAS and FASL during VL is a mechanism that could contribute to the increased apoptosis sensitivity of T cells specific to *Leishmania* spp. (EIDSMO et al., 2002). *In vivo*, patients with acute VL show higher apoptosis rates in T cells and this process could be involved in the failure of cellular immunity (POTESTIO et al., 2004).

The immune suppression observed in dogs naturally infected with *Leishmania* spp. may be related to the mechanism of T lymphocyte apoptosis. The constant stimulation of this chronic infection may trigger apoptosis and contribute to the failure of cellular immunity. Lima et al. (2012) reported an increased rate of apoptosis in T lymphocytes from the spleen and peripheral blood, while Silva et al. (2013) showed that mFAS and mFASL were involved in T cell apoptosis. However, the molecules sFAS and sFASL have not yet been characterized. Investigating these parameters may contribute to understanding the factors responsible for the suppression of cellular immunity observed in dogs with VL.

2. Materials and methods

2.1. Ethics committee approval

The study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimental Research (Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal,

COBEA) and the Committee of Ethics in Animal Use (Comitê de Ética no Uso Animal, CEUA) of the School of Veterinary Science (Faculdade de Medicina Veterinária, FMVA) at the Araçatuba Campus of São Paulo State University (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP) on April 15, 2011 (process number 00679/2011).

2.2. Animal screening

For this study, 19 adult dogs with VL were selected. The infected dogs were between two and five years-old and consisted of dogs of various breeds and weights. They were obtained from the Zoonoses Control Center of Araçatuba (Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, CCZA) and were all seropositive for the *L. infantum* antigen, as determined by indirect ELISA (LIMA et al., 2003). All of the dogs were symptomatic and exhibited at least three of the following clinical signs of VL: onychogryphosis, lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, periocular lesions, cutaneous lesions and cachexia. The control group consisted of six healthy dogs of several breeds and weights that were seronegative for *L. infantum*, as determined by indirect ELISA (LIMA et al., 2003) and real-timePCR. These control animals presented normal blood counts, indicating the absence of infection.

The infected dogs showed moderate disease and were sorted based on a physical examination and their levels of anti-*Leishmania* antibodies, determined by indirect ELISA (LIMA et al., 2003), as proposed by Solano-Gallego et al. (2009).

2.3. Sample collection

The dogs with VL were euthanized through an intravenous injection of barbiturate anesthesia (Thiopental, Cristália Itapira, São Paulo State) followed by 19.1% potassium chloride according to Brazilian law. Following euthanasia,

spleen fragments were collected and maintained in RPMI-1640 medium (Sigma[®], USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco[®], USA), 0.03% L-glutamine (Sigma[®], USA), 100 IU/mL penicillin (Sigma[®], USA), and 100 mg/mL streptomycin (Sigma[®], USA). The spleen samples from the control group were obtained by surgical excision using the protocol described by Lima et al. (2012).

Blood samples were obtained from the healthy dogs by femoral or jugular vein puncture, collected in tubes containing sodium heparin (BD[®], USA), and processed immediately after collection.

2.4. Isolation of mononuclear cells from the peripheral blood

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy dogs were isolated on Histopaque gradient[®] 1077 and 1119 (Sigma[®], USA) following the manufacturer's recommendations. The PBMCs were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. The cells were then resuspended in RPMI-1640 (Sigma[®], USA) supplemented as described above and maintained at 37°C, with 5% CO₂ (Revco[®], USA). The cells were cultured and infected with *L. infantum* promastigotes (5:1, 10:1, 20:1, parasites: cell). Apoptosis in CD3+, CD4+ and CD8+ cells was determined after 16 h.

2.5. Evaluation of CD3+, CD4+ and CD8+ cell apoptosis

To evaluate apoptosis, the CD3+, CD4+ and CD8+ cells from the peripheral blood were labeled by incubating 10⁵ cells/mL with Anti-canine CD3 monoclonal antibodies conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC; Serotec[®], UK) or FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibodies (Serotec[®], UK) or FITC-conjugated anti-CD4 monoclonal antibodies (Serotec[®], UK) were added and incubated for 30 min. Isotype control (Serotec[®], UK) antibody was added in a separate tube to control for nonspecific labeling. After

immunolabeling, the percentage of apoptosis was determined using the Guava Nexin kit (Millipore®). This kit comprises Annexin V (yellow fluorescence), which has a high affinity for the intracellular phosphatidylserine that is released when a cell initiates apoptosis and, 7-AAD (red fluorescence), which is a vital dye. The procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The data were obtained using the Guava EasyCyte Mini system with the CytoSoft software program, as detailed in the manufacturer's instructions. Ten thousand events were acquired per sample in acquisition to analysis mode.

Isotype control (Serotec®, UK) were used as a negative control to delimit the negative populations in the experiment, and the percentage of gated cells in the upper right quadrant represented cells in the late stages of apoptosis that were doubly labeled with 7-AAD and Annexin-V.

2.6. Spleen extracts and ELISA assay

Extracts from spleen were used for quantitative analysis of sFAS, sFASL and active Caspase-3, by capture-ELISA. To achieve this, 300 mg of spleen and 500 µl of RPMI-1640 media (Sigma®, USA), pH 7.2, were used. The samples were refrigerated and grounded in a tissue homogenizer (Ultra Turrax® T 8, Germany) for about 5 min. The resulting homogenate was centrifuged at 10 000g for 15 min at 4°C (Eppendorf® 5810 R, Germany) and the supernatant was immediately stored at -80°C (Revco®, USA). Concentrations of sFAS, sFASL and active Caspase-3 were assayed in duplicate in spleen extracts by capture ELISA (Factor Related Apoptosis FAS and Factor Related Apoptosis FASL, Life Science®, China; Human active Caspase-3, Invitrogen® USA).

2.7. DNA extraction and real time PCR

The DNA was extracted from spleen samples (0.025 g) using a commercial kit (Qiagen® Easy-DNA, USA) following the manufacturer's recommendations. DNA was maintained at -20°C until use.

Quantification of parasite load was performed using real-time PCR with primers that amplify the intergenic region of intergenic internal transcribed spacer (ITS1) rRNA gene (5'AGCTGGATCATTTTCCGATG 3', 5'TATGTGAGCCGTTATCCACGC 3'). The PCR reaction was performed in a total volume of 25 μ l containing 10 pmol of each primer, DNA (10-100 ng), and 12 μ l of mix Quanti FAST Syber Green (Qiagen[®], USA).

The PCR reaction was performed using the CFX96[®] real-time PCR system (Bio-Rad[®], USA) as follows: initial denaturation of 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 30 s. The melting curve protocol was 95°C for 15 s, 60°C for 15 s followed by 20 min until it reached 95°C for 15 s. The standard curve for quantification was performed on serial dilutions at nine different concentrations of culture promastigotes of *L.infantum*.

2.8. Statistical analysis

The Wilcoxon rank test was used to compare the level of apoptosis in infected and non infected cell culture due to the nature of the nonparametric data. The unpaired t-test was used to compare the level of sFAS, sFASL and active Caspase-3 from spleen samples of the control and infected groups. The Spearman correlation analysis was performed between the value sFAS and sFASL and the value corresponding to the spleen parasite load.

Differences of the means with $p < 0.05$ were considered statistically significant. The GraphPad Prism 5 software program (GraphPad Software[®], Inc., CA, USA) was used for the statistical analysis.

3. Results

3.1. *L. infantum* infection in mononuclear cells from the blood of healthy dogs increased apoptosis in CD3+, CD4+ and CD8+ cells

To confirm that *L. infantum* infection induces T cell apoptosis, PBMCs from healthy dogs were infected with increasing doses of *L. infantum* promastigotes and the levels of apoptosis were measured in CD3+, CD4+ and CD8+ cells. The infected cultures showed a gradual increase in apoptosis associated with parasite load in CD3+, CD4+ and CD8+ cells compared with non infected cells ($p < 0.05$, paired Wilcoxon test; Figure 1A). A typical figure from flow cytometry analysis was shown (Figure 1B).

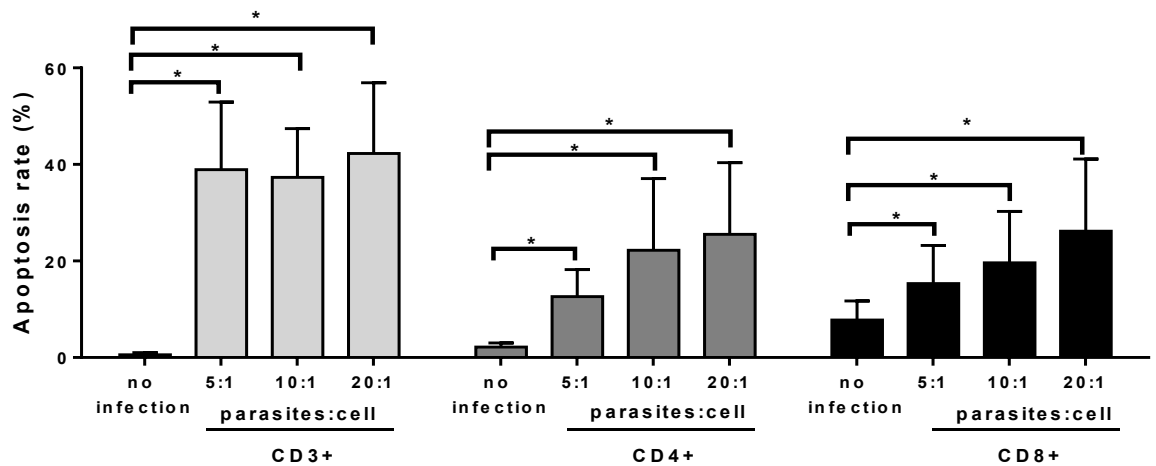


FIGURE 1A - Percentage of apoptotic CD3+, CD4+ and CD8+ cells from PBMC of healthy dogs following *L. infantum* infection. Mean and standard deviation are shown (*): statistically significant differences, Wilcoxon test ($p < 0.05$).

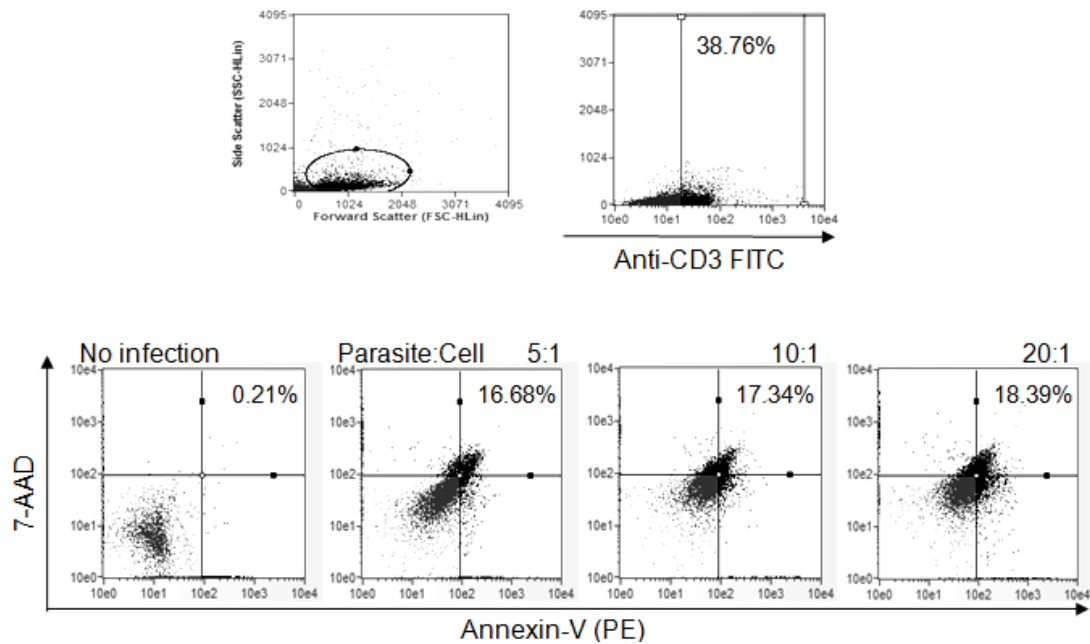


FIGURE 1B - Flow cytometry analysis: Gating scheme of forward vs side scatter to observe exclusion or inclusion of proper events, which is especially critical to live/dead staining. Fluorescence plot for gated PBMC from healthy dogs (Anti-CD3 monoclonal antibody FITC). Percentage inside upper right quadrants correspond to PBMC CD3⁺ cells; stained for Annexin V-PE and 7-AAD fluorescence (double stained), indicating late stage of apoptotic cells. Apoptosis in the presence of *L. infantum*: PBMC (5:1, 10:1, 20:1). Similar dot plot figures were observed using anti-CD4 monoclonal antibodies FITC or FITC-conjugated anti-CD8 monoclonal antibodies.

3.2. Levels of sFAS, sFASL and active Caspase-3 from the spleens of dogs infected with VL

sFAS, sFASL and active Caspase-3 were measured spleen from infected with VL due to be a target organ of infection (LIMA et al., 2012), by the capture ELISA. sFAS levels were lower sFAS levels were lower ($p < 0.05$) and sFASL

and active Caspase-3 levels were higher ($p < 0.05$) in spleen of dogs infected with VL compared with controls (Figures 2A, 2B, 2C).

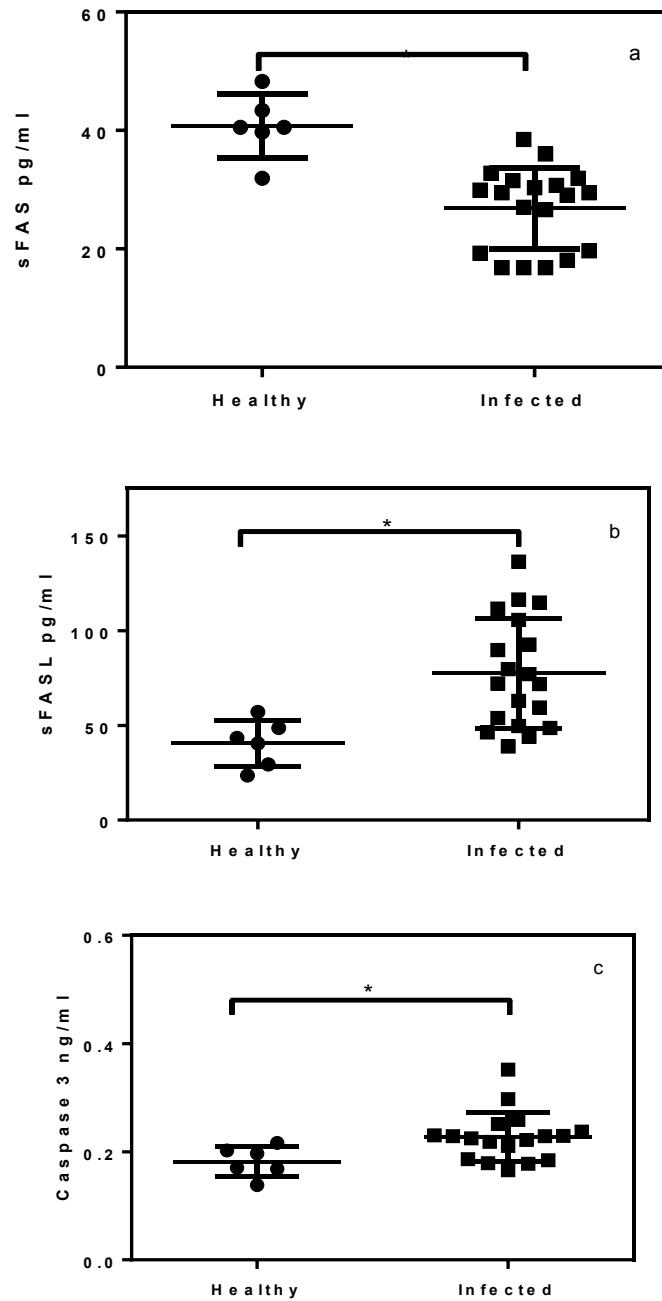


FIGURE 2 - Levels of sFAS (a) and sFASL (b) and active Caspase-3 (c) by capture ELISA in the spleen of dogs with VL and healthy dogs. Mean and standard deviation are shown: statistically significant differences, unpaired t test ($p < 0.05$).

3.3. Evaluation of parasite load in spleen samples of dogs with VL and correlation with sFAS and sFASL

To assess whether the levels of sFAS and sFASL interfere in the control of parasitic load the correlation analysis were performed between sFAS and sFASL with parasitic load.

The values of the linear cycle (Threshold cycle-Ct), obtained from 10 to 100 ng of DNA from each sample, were analyzed with reference to the standard curve obtained for parasite load. The curve for quantifying parasite load determined $r^2=0.98$ and the reaction showed a slope of -3.286. The parasite load showed variation in spleen samples from infected dogs. A weak negative correlation was observed between parasite load in the spleen and sFASL levels ($p<0.05$, $r = -0.52$; Figure. 3). The correlation between sFAS levels and parasite load showed no significant results (data not shown).

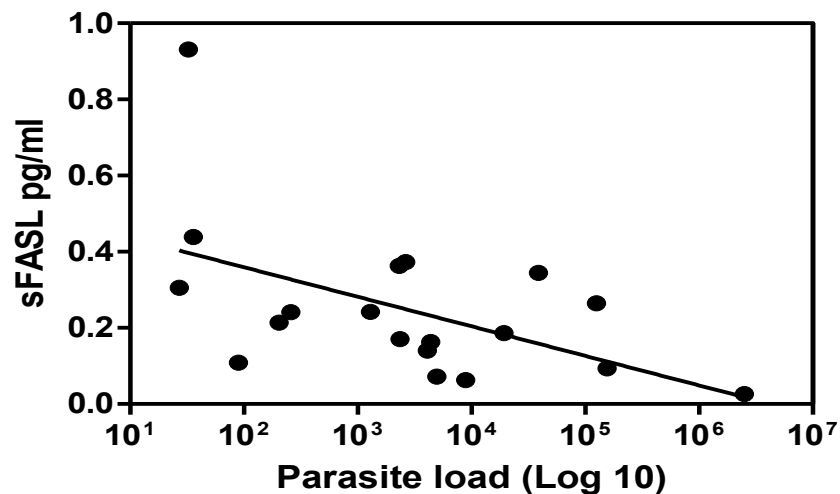


FIGURE 3 - Negative correlation between sFASL and parasite load in the spleen of dogs with VL ($p<0.05$, $r = -0.52$, Spearman correlation).

4. Discussion

We observed increased rates of apoptosis in CD3+, CD4+ and CD8+ cells from peripheral blood in the presence of *L. infantum* infection and changes in the concentration of sFAS, sFASL and active Caspase-3 in extracts of spleen from infected compared to healthy dogs that suggest the involvement these molecules in the apoptotic mechanism previously observed in spleen tissue of infected dogs (Lima et al., 2012). A negative correlation between sFASL molecules and the parasitic load was also observed, which implies the involvement of this molecule in soluble form in the effector mechanisms responsible for the elimination of the parasite.

In vitro infection of mononuclear cells from healthy dogs with *L. infantum* resulted in increased rates of apoptosis, confirming the preliminary results of an increase in apoptosis in CD4+ and CD8+ cells observed in the naturally infected dogs (SILVA et al., 2013), indeed, it has been shown *in vitro* that the parasite *Leishmania* spp. and its membrane constituents can induce apoptosis in PBMC (WOLDAY et al., 1999).

To investigate the mechanisms of apoptosis induction in dogs, sFAS and sFASL were measured in spleen tissue. A decrease in sFAS in the infected group was observed. An *in vitro* study suggested that the soluble isoform inhibits apoptosis induced by agonist antibodies (CASCINO et al., 1996); in fact, higher rates of apoptosis were observed in the infected group compared with healthy controls (SILVA et al., 2013).

In contrast, there was an increase in the levels of sFASL and active Caspase-3 in the infected group. sFASL is secreted when T lymphocytes are activated (TANAKA et al., 1995) and it has a cytotoxic function as an inducer of apoptosis by binding to the mFAS (MATUTE-BELLO et al. 1999). In addition to this, active Caspase-3 is also involved in the apoptosis pathway (SHI, 2002), and an increase in apoptosis has been reported in VL (LIMA et al., 2012; SILVA et al., 2013). These data suggest the involvement of sFASL in the apoptotic process.

Silva et al. (2013) observed a decrease in mFASL in CD4⁺ and CD8⁺ cells in the spleen of dogs with LV. In contrast, an increase in sFASL was observed in extracts of spleen from infected dogs, which suggests the action of MMPs. In fact, in the serum of dogs with VL, increased levels of MMP-2 and MMP-9 were detected (MELO et al., 2012). Further research is required to determine which MMP are involved in the production of sFASL in CVL.

The high levels of sFASL determined in the spleen of infected dogs is similar to that observed in patients with acute VL, who show high levels of sFASL in the serum (EIDSMO et al., 2002). The infected group did show higher levels of sFASL compared with the uninfected group, but we observed a negative correlation between parasite burden and sFASL molecules in the spleen, suggesting that in canine VL the increase in sFASL is related to the reduction of parasite burden.

The weak negative correlation between spleen parasite load and the high level of sFASL suggests that sFASL stimulates inflammatory mechanisms in the spleen that reduce the parasitic load. In fact, an increase of TNF- α was observed in extracts of spleen from dogs with VL, which correlated with decreased parasite load in the spleen (MICHELIN et al., 2011). Recent investigation has suggested that sFASL activity is not restricted to programmed cell death. On the contrary, it may mainly account for inflammation in various diseases (BLANCO-COLIO et al., 2008; CARDINAL et al., 2010). sFASL has been used as a marker of inflammation (MUSIAL; ZWOLINSKA, 2012), and human sFASL exhibited chemotactic activity toward murine and human polymorphonuclear leukocytes (neutrophils) *in vitro* (OTTONELLO et al., 1999; SEINO et al., 1998). The inflammatory role of sFASL not yet been characterized in dogs with VL. Further studies need to be performed to clarify how sFASL induces a decrease in parasite load.

Besides the function of sFASL in apoptosis, this molecule has other known functions. Macrophages infected by the parasite *Leishmania (L.) major* and incubated with a mixture of recombinant FASL and IFN- γ (interferon gamma) resulted in a considerable reduction in *L. major* parasite numbers,

correlating with stimulation of NO production by these cells. Treatment with either substance alone failed to affect the parasite (CHAKOUR et al., 2003), suggesting that sFASL affects macrophage function, a fact that seems to be associated with the weak negative correlation observed between sFASL and splenic parasite load.

The high levels of active Caspase-3 and sFASL in the spleen of dogs with VL suggest that apoptosis occurs in spleen tissue, as observed in previous studies (LIMA et al., 2012; SILVA et al., 2013). sFASL can stimulate apoptosis and inflammatory mechanisms in the spleen that decrease parasitic load. Indeed, when the apoptotic bodies are not promptly phagocytosed, they can rapidly lose membrane integrity and release their intracellular constituents into the extracellular environment, behaving like necrotic cells, activating inflammatory mechanisms (SAVILL et al., 2002), leading to a reduction in parasite load. It also has been observed that apoptosis can stimulate a proinflammatory response in splenic macrophages by ingestion of intact apoptotic cells (LORIMORE et al., 2001).

Similar to our findings, in human HIV infection, high levels of sFASL were observed in the serum, associated with decreased numbers of CD4+ T cells. It has also been suggested that sFASL can be used as a factor in disease progression (HOSAKA et al., 2000). In this study, all the VL positive dogs evaluated presented clinical signs of disease. Future studies involving asymptomatic dogs may clarify whether this molecule can be used as a factor associated with the progression of canine VL.

Our results show that *L. infantum* induces apoptosis of CD3+ CD4+ and CD8+ cells from PBMC and sFAS, and sFASL from spleen extracts participate in the regulation of the immune response to the infection. These findings should contribute to the current understanding of the immune response in VL.

Acknowledgments

The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP) for its financial support of this research (process no. 2011/06214-7).

References

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, n.4, p. 1199-1210, 2001.

ASHFORD, R.W.; DESJEUX, P.; DE RAADT, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of Leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 8, n.3, p. 104-105, 1992.

BADLEY, A.D.; DOCKRELL, D.; SIMPSON, M.; SCHUT, R.; LYNCH, D.H.; LEIBSON, P.; PAYA, C.V. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FASL and tumor necrosis factor. **J. Exp. Med.**, v. 185, n.1, p. 55-64, 1997.

BLANCO-COLIO, L.M.; MARTIN-VENTURA, J.L.; TUNON, J.; GARCIA-CAMARERO, T.; BERRAZUETA, J.R.; EGIDO, J. Soluble FAS ligand plasma levels are associated with forearm reactive hyperemia in subjects with coronary artery disease: a novel biomarker of endothelial function? **Atherosclerosis**, v. 201, n.2, p. 407-412, 2008.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRÉ, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n.3/4, p. 345-351, 1997.

CARDINAL, H.L.; BROPHY, J.M.; BOGATY, P.; JOSEPH, L.; HÉBERT, M.J.; BOYER, L.; MADORE, F. Usefulness of soluble fas levels for improving

diagnostic accuracy and prognosis for acute coronary syndromes. **Am. J. Cardiol.**, v. 105, n.6, p. 797-803 2010.

CASCINO, I.; PAPOFF, G.; ERAMO, A.; RUBERTI, G. Soluble FAS/Apo-1 splicing variants and apoptosis. **Front. Biosci.**, v. 1, p.12-18, 1996.

CHAKOUR, R.; GULER, R.; BUGNON, M.; ALLENBACH, C.; GARCIA, I., MAUËL, J.; LOUIS, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Both the FAS ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infect. Immun.**, v. 71, n.9, p. 5287-5295, 2003.

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, n.3, p. 307-310, 1999.

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

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, n.5, p. 305-318, 2004.

EIDSMO, L.; WOLDAY, D.; BERHE, N.; SABRI, F.; SATTI, I.; EL HASSAN, A.M.; SUNDAR, S.; CHIODI, F.; AKUFFO, H. Alteration of FAS and FAS ligand expression during human visceral leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.130, n.2, p. 307-313, 2002.

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.

HOSAKA, N.; OYAIZU, N.; THAN, S.; PAHWA, S. Correlation of loss of CD4 T cells with plasma levels of both soluble form FAS (CD95) and FAS Ligand (FASL) in HIV-Infected Infants. **Clin. Immunol.**, v. 95, n.1, p. 20-25, 2000.

LIMA, V.M.F.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; EUGÊNIO, F.R.; SANTOS, P.S.P.; ROZZA, D.B.; MACHADO, G.F. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, n.2/4, p. 147-153, 2012.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M.; Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n.4, p. 485-489, 2003.

LORIMORE, S. A.; COATES, P. J.; SCOBIE, G. E.; MILNE, G.; WRIGHT, E. G. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? **Oncogene**, v.20, n.48, p. 7085-7095, 2001.

MATUTE-BELLO, G.; LILES, W.C.; STEINBERG, K.P.; KIENER, P.A.; MONGOVIN, S.; CHI, E.Y.; JONAS, M.; MARTIN, T.R. Soluble FAS ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). **J. Immunol.**, v.163, n.4, p. 2217-2225, 1999.

MAURICIO, I.L., STOTHARD, J.R., MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Parasitol. Today**, v.16, n.5, p.188-189, 2000.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; MACHADO, G.F. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 148, n.3/4, p. 260-266, 2012.

MICHALSKY, E.M.; ROCHA, M.F.; DA ROCHA LIMA, A.C.; FRANÇA-SILVA, J.C.; PIRES, M.Q.; OLIVEIRA, F.S.; PACHECO, R.S.; DOS SANTOS, S.L.;

BARATA, R.A.; ROMANHA, A.J.; FORTES-DIAS, C.L.; DIAS, E.S. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sandflies. **Vet. Parasitol.**, v. 147, n.1/2, p. 67-76, 2007.

MICHELIN, F. A.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-alpha, 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, n.5, p. 373-383, 2011.

MUSIAŁ, K.; ZWOLIŃSKA, D. The sFAS/sFASL ratio as a novel marker of inflammation in children with chronic kidney disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 414, p. 7-11, 2012.

OTTONELLO, L.; TORTOLINA, G.; AMELOTTI, M.; DALLEGRI, F. Soluble FAS ligand is chemotactic for human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v.162, n.6, p. 3601-3606, 1999.

POTESTIO, M.; D'AGOSTINO, P.; ROMANO, G.C.; MILANO, S.; FERLAZZO, V.; AQUINO, A.; DIBELLA, G.; CARUSO, R.; GAMBINO, G.; VITALE, G.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. CD4+ CCR5+ and CD4+ CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**, v.113, n.2, p.260-268, 2004.

RETHI, B.; EIDSMO, L. FASL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Front. Immunol.**, v. 3, p.163, 2012.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n.12, p. 965-975, 2002.

SEINO, K.; IWABUCHI, K.; KAYAGAKI, N.; MIYATA, R.; NAGAOKA, I.; MATSUZAWA, A.; FUKAO, K.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Chemotactic

activity of soluble FAS ligand against phagocytes. **J. Immunol.**, v. 161, n.9, p. 4484-4488, 1998.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. **Mol.Cell.**, v. 9, n.3, p. 459-470, 2002.

SILVA, K.L.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B.B.; SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.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, n.3/4, p. 470-476, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.165, n.1/2, p.1-18, 2009.

TANAKA, M.; SUDA, T.; TAKAHASHI, T.; NAGATA, S. Expression of the functional soluble form of human FAS ligand in activated lymphocytes. **EMBO. J.**, v. 14, n.6, p. 1129-1135, 1995.

VERÇOSA, B.L.; MELO, M.N.; PUERTO, H.L.; MENDONÇA, I.L.; VASCONCELOS, A.C. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v.189, n.2/4, p. 162-170, 2012.

WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; DEMISSIE, A.; BRITTON, S. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. **Infect. Immun.**, v. 67, n.10, p.5258-5264, 1999.