

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 19/08/2017.

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

**CD279 (PD-1) E SEUS LIGANTES CD273 (PD-L1) E CD274
(PD-L2) REGULAM A LINFOPROLIFERAÇÃO, A PRODUÇÃO DE
IL-10 E DO ÓXIDO NÍTRICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Enfermeira

Araçatuba - SP
2016

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

**CD279 (PD-1) E SEUS LIGANTES CD273 (PD-L1) E CD274
(PD-L2) REGULAM A LINFOPROLIFERAÇÃO, A PRODUÇÃO DE
IL-10 E DO ÓXIDO NÍTRICO NA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

Tese 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 Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba - SP
2016

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

Silva, Kathlenn Liezbeth Oliveira

Si381c CD279 (PD-1) e seus ligantes CD273 (PD-L1) e CD274 (PD-L2) regulam a linfoproliferação, a produção de IL-10 e do óxido nítrico na leishmaniose visceral canina / Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva . Araçatuba: [s.n], 2016.
72 f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016.

Orientador: Prof. Valéria Marçal Felix de Lima

1. Leishmaniose visceral. 2. Moléculas coestimulatórias. 3. L. infantum. 4. Cão I. T.

CDD: 636.0895

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CD279 (PD-1) e seus ligantes CD273 (PD-L1) e CD274 (PD-L2) regulam a linfoproliferação, a produção de IL-10 e do óxido nítrico na leishmaniose visceral canina

AUTORA: KATHLENN LIEZBETH DE OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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



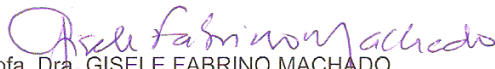
Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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



Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde 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. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP



Profa. Dra. APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN

Curso de Biomedicina / Universidade Paulista – Câmpus de Araçatuba/UNIP

Araçatuba, 19 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KATHLENN LIEZBETH OLIVEIRA SILVA – nascida em 09 de setembro de 1969, na cidade de Corumbá/MS, iniciou e concluiu o curso de Enfermagem no UNISALESIANO - Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium em Araçatuba – SP (2009). Durante o período acadêmico desenvolveu atividades tais como estágios extracurriculares e curriculares. Em 2008 iniciou sua Iniciação Científica no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia - Campus de Araçatuba, desenvolvendo projetos que resultaram em trabalhos científicos até 2010. Realizou estágio extracurricular no COB – Centro de Oncologia Bucal - Unidade Auxiliar da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia – Campus de Araçatuba de 2008 a 2010. Em 2011 ingressou no curso de mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, desenvolvendo projetos no Laboratório de Imunologia Celular. No ano de 2012 integralizou os créditos e terminou seu projeto de pesquisa. No dia 26 de outubro de 2012 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado “CD95 (FAS) e CD178 (FASL) induzem apoptose em células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e esplênicas em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp.” Em março de 2013 ingressou no curso de Doutorado em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – UNESP, com o projeto: “PD-1 e atividade arginase na leishmaniose visceral canina”, sendo bolsista e com financiamento de sua pesquisa aprovado pela FAPESP.

EPÍGRAFE

*“Jamais quero pensar no final da minha vida ...e se...e se...
prefiro pensar...eu tentei!”*

DEDICATÓRIA

A Deus, por ter me abençoado com saúde, paz e coragem para executar esse trabalho.

Ao meu esposo, meus 3 filhos, e ao meu cãozinho companheiro Bu que são o orgulho e a razão da minha vida!!!

Aos meus avós (in memoriam) Onofre Moacyr Bueno da Silva e Maria do Carmo Araújo da Silva que tanto cuidaram de mim e foram meus modelos de honestidade e amor...espero que estejam me vendo orgulhosos dessa conquista.

A prof^a. Dra. Valéria Lima, que com sua orientação, amizade e companhia tornou possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por seus planos serem maiores e melhores que os meus e a quem dedico todos os dias do meu trabalho, pois com sua mão generosa e amorosa sempre segurou a minha com firmeza, me levando a perseverar no objetivo a que me propus.

A minha família, meu esposo Pedro Luis, meus filhos queridos Hugo Romero, Priscila Caren e Pedro Junior e a minha mãe que todos os dias me oferece uma benção de Deus, e que mesmo em minhas ausências me entenderam, os amo de todo coração.

Aos meus amigos Eliane de Lucca, Flávio Correa e Marcelle Marie Buzzo, por terem me ouvido e aconselhado tão amorosamente e pacientemente em minhas horas de dúvidas e de fraqueza, sem eles muito mais difícil teria sido toda a minha jornada.

A Técnica do Laboratório de Imunologia Flávia Yamamoto, que me ajudou nas horas de muito trabalho com toda atenção e delicadeza.

A prof^a. Silvia Perri pelos esclarecimentos de dúvidas nos testes estatísticos com muita paciência.

A Diretora Técnica de Serviço da Biblioteca, Isabel de Matos, pelas correções e explicações das regras para a composição deste trabalho.

Aos pós-graduandos Aline Leal, Gabriela Venturin, Cleber Mancini, Vanessa Chiku e Breno Fernando, companheiros de trabalho.

Ao companheiro de pesquisa do Laboratório de Imunohistoquímica, Augusto Schweigert, pelas vezes em que me auxiliou nas dúvidas e me ensinou essa técnica tão interessante. Obrigada e sinto muito não ter me despedido de você...mas você sabe disso...

Aos colegas do Laboratório de Ornitopatologia, prof. Marcelo, Alex Nakamura, companheiros de trocas de idéias e ensinamentos.

A professora Marion Burkhardt de Koivisto, pelo auxílio prestado.

Aos cães do Centro de Controle de Zoonoses que eutanasiados, vítimas da leishmaniose visceral, participaram da minha pesquisa, contribuindo para o

conhecimento a respeito dessa patologia. Espero um dia retribuir de alguma nova forma.

A minha banca de qualificação professoras: Juliana Regina Peiró e Gisele Fabrino Machado e a de defesa de tese de doutorado, professoras: Flávia Lopes, Gisele Machado, Rosemeri Vasconcelos e Aparecida Michelin, obrigada pela presença e pelas considerações para a melhora do meu trabalho.

A professora Valéria Marçal Félix de Lima com carinho, por toda sua dedicação e proteção a mim oferecida, sua empolgação pelo meu trabalho, por todas as vezes que reconheceu meu esforço, por sua atenção e acolhimento de idéias por mim sugeridas, pelas muitas vezes que rimos juntas, pelo companheirismo nas viagens e auxílio nas horas de necessidade. Eu tenho certeza de que ao longo da nossa vida temos vários “pais”; que nos guiam, ensinam e mostram caminhos; e com certeza a professora é um desses “pais” para mim.

....e me lembro de conversas bobas mas de grande significado!

“- Ka, você tem que ser como o ouro!

- Como o ouro? Por que? (eu..)

- Você já viu alguém dar valor na água?

- Na água? Sim, ela está acabando...blá blá blá...

- Não! Valor no sentido material!

- Ah tá!...não, não vi não...

- Então Ka! As pessoas valorizam mais o ouro...porque não encontram sempre disponível!”

....e ainda tem o... *“ Põe casaco! Tira casaco!”*

...e quem me disse...Profª Valéria Marçal Felix de Lima

Obrigada por tudo!!!

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal desta faculdade pela oportunidade, por toda a infraestrutura oferecida e por ser tão bem recebida por todos.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro (processos 2013/04209-1 e 06684-9).

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.1 Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral.....	14
1.2 Resposta imune na LVC.....	17
Objetivo Geral - Objetivos específicos.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 2	34
CD279 (PD-1) e seus ligantes, CD274 (PD-L1) e CD273 (PD-L2) regulam a linfoproliferação, a produção de IL-10 e do óxido nítrico na leishmaniose visceral canina	36
Abreviaturas.....	36
RESUMO.....	37
Introdução.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
Aprovação do Comitê de Ética.....	40
Seleção dos cães dos grupos controle e infectado.....	40
Colheita das amostras.....	41
Isolamento dos mononucleares do sangue periférico, leucócitos do baço e células do linfonodo.....	42
Anticorpos	43
Identificação e quantificação da expressão de PD-1 e seus ligantes por método imunohistoquímico em amostras esplênicas dos grupos controle e infectado.....	43
Citometria de fluxo.....	44
Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes em macrófagos do grupo controle após a infecção <i>in vitro</i> por 72 horas com <i>L. infantum</i>	45
Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes em linfócitos T, B e macrófagos em células mononucleares do sangue periférico do grupo controle após a infecção <i>in vitro</i> por 6 dias com <i>L. infantum</i>	46

Bloqueio de PD-1 e seus ligantes na cultura das células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço dos cães do grupo infectado.....	46
Ensaio de linfoproliferação	47
Sobrenadante da cultura para ensaio das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e do NO.....	48
Ensaio para detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10.....	48
Dosagem de Nitrito	48
Extração de DNA e qPCR em tempo real	49
Análise Estatística.....	49
RESULTADOS.....	50
Seleção dos cães para estudo: grupo controle e infectado.....	50
Comparação da expressão de PD-1 e seus ligantes por método imunohistoquímico em amostras esplênicas dos cães do grupo infectado e controle.....	51
Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes após a infecção <i>in vitro</i> por <i>L. infantum</i> em células mononucleares de sangue periférico dos cães do grupo controle.....	53
Dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10 no sobrenadante da cultura das células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço de cães do grupo infectado, após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes.....	55
Resposta proliferativa dos linfócitos ao AtgS de <i>L. infantum</i> , no linfonodo dos cães do grupo infectado após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes e avaliação da produção do NO e das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 no sobrenadante da cultura.....	57
Correlação entre a expressão de PD-1 e seus ligantes com a carga parasitária.....	61
DISCUSSÃO.....	62
Conflito de interesse.....	67
Agradecimentos.....	67
REFERÊNCIAS.....	68

CD279 (PD-1) e seus ligantes, CD274 (PD-L1) e CD273 (PD-L2) regulam a linfoproliferação, a produção de IL-10 e do óxido nítrico na leishmaniose visceral canina

RESUMO - PD-1 ligado a PD-L1 ou PD-L2, desencadeia sinais incapacitantes às células T, podendo estar envolvidos na supressão das respostas imunes na LVC. Investigamos a expressão de PD-1 e seus ligantes no baço na LVC, e sua correlação com a carga parasitária. Para confirmar o seu papel regulador na leishmaniose, estes receptores foram avaliados após infecção *in vitro* por *L. infantum*. Em cães infectados, foi avaliado o bloqueio destes receptores na produção de citocinas e seus efeitos no sobrenadante da cultura, de linfoproliferação com antígeno solúvel (AtgS) de *L. infantum*. Foram selecionados 23 cães saudáveis e 54 com LV. PD-1 e seus ligantes foram determinados por imunohistoquímica em tecidos esplênicos. A carga parasitária de cães infectados foi avaliada por PCR em tempo real. As citocinas nos sobrenadantes de cultura foram determinados por ELISA de captura e o NO por Griess. A Linfoproliferação das células do linfonodo e expressão de PD-1 e seus ligantes após infecção *in vitro* por *L. infantum* foram avaliadas por citometria de fluxo. Observou-se que a infecção por *L. infantum*, aumenta a expressão de PD-1 e seus ligantes. Uma correlação positiva foi observada entre a expressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos B e o aumento da carga parasitária. O bloqueio destes receptores restaura a proliferação de linfócitos, aumenta a produção de NO e diminui a IL-4 e IL-10. *L. infantum* modula a expressão de PD-1 e seus ligantes na LVC, suprime a linfoproliferação, alterando a produção de citocinas, podendo facilitar a persistência dos parasitas nos macrófagos, e podem ser direcionados para o desenvolvimento de drogas que estimulem a resposta imune na LVC.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral, moléculas coestimulatórias, *L. infantum*, cão.

CD279 (PD-1) and its ligands, CD274 (PD-L1) and CD273 (PD-L2) regulate lymphoproliferation, IL-10 and nitric oxide production in canine visceral leishmaniasis

SUMMARY - PD-1 when bound to PD-L1 or PD-L2, triggers signals disabling T cells, and they may be involved in the suppression of cellular immune responses in CVL. We investigated the expression of PD-1 and its ligands in spleen in CVL, and its correlation with parasite burden in this tissue, to confirm its regulatory role in leishmaniasis. These receptors were evaluated after *in vitro* infection by *L. infantum*. In infected dogs, we evaluated the blocking of these receptors in the production of cytokines in the effects of supernatant of cultured cells, and antigen specific lymphoproliferation. We selected 23 healthy dogs and 54 with VL. PD-1 and its ligands were determined by immunohistochemistry in splenic tissues. Parasitic load of infected dogs was evaluated by RT-PCR. Cytokines in culture supernatants were determined by capture ELISA and NO by Griess. Lymphoproliferation lymph nodes and expression of PD-1 and its ligand after *in vitro* infection by *L. infantum* was evaluated by flow cytometry. We observed that *L. infantum* infection increases expression of PD-1 and its ligands. A positive correlation was observed between the expression of PD-1 and PD-L1 B lymphocytes and an increase in parasite load. Blockade these receptors restores lymphocyte proliferation, increases the production of NO and decreases IL-4 and IL-10. In conclusion, *L. infantum* modulates expression of PD-1 and its ligands in CVL, suppressing lymphoproliferative response and altering cytokine production, which in turn can facilitate parasitic persistence in the macrophages. PD-1 and its ligands can be targeted for the development of drugs stimulating the immune response in CVL.

Keywords: Visceral leishmaniasis, costimulatory molecules, *L. infantum*, dog.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae*. Durante o seu ciclo biológico, a *Leishmania* apresenta-se sob a forma amastigota, sem flagelo externo, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado. A forma promastigota, com flagelo externo ocorre no tubo digestivo do inseto vetor. A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Novo Mundo é feita pela picada do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* (ALENCAR; DIETZE, 1991).

As leishmanioses ocorrem em 88 países, dos quais 65 apresentam a forma visceral (DESJEUX, 2004). Mais de 90% dos casos de leishmaniose ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. A doença afeta principalmente as pessoas com menos condições financeiras da África, Ásia e América Latina, estando associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, imunossupressão do indivíduo infectado e falta de recursos.

Uma análise recente mostra que mais de 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses com uma estimativa de cerca de 300.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) por ano (WHO, 2015), e aproximadamente 20.000 pessoas morrem vítimas dessa infecção anualmente (WHO, 2013). Nota-se que há uma disseminação dessa doença por vários países.

Como em outros países da América do Sul, a migração para as áreas urbanas no Brasil contribuiu para a expansão da LV (DESJEUX, 2004). No Brasil, sua expansão ocorreu principalmente no Nordeste (DANTAS-TORRES, 2006), com uma incidência de 92% do total de casos, no Sudeste com 4% (GONTIJO;

MELO, 2004; SANTIAGO et al., 2007). A doença é endêmica no Brasil e 90% dos casos humanos, ocorrem em áreas rurais ou suburbanas, estando em franca expansão no estado de São Paulo. Além da alta incidência e ampla distribuição, a expansão em novas áreas também carrega a ameaça de que as formas graves e letais da doença possam surgir quando associadas à desnutrição (GONTIJO; MELO, 2004) e na co-infecção com o vírus HIV/AIDS (ASHFORD, 2000). Entre 2003 - 2007 houveram 3.481 casos de LV em humanos por ano, em 2010 foram 3.716, com uma incidência anual estimada de 4.200 a 6.300 casos (ALVAR et al., 2012), em 2014, os óbitos chegaram a 239 pessoas, sendo 12 no estado de São Paulo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As espécies de *Leishmania* que induzem a doença visceral pertencem ao subgênero *Leishmania* e incluem *Leishmania (L.) donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* ou *L. infantum*, nas Américas. Dependendo da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro, a infecção pode determinar diferentes formas clínicas da doença no homem, atingindo a pele e/ou mucosa como na leishmaniose tegumentar ou afetando órgãos internos que são ricos em células do SFM, como o baço, o fígado e a medula óssea (ALVAR et al., 2004).

A LV tem sido associada ao aumento no número de casos da doença em humanos (COURA-VITAL et al., 2011; NUNES et al., 2010), sendo os cães considerados os principais reservatórios domésticos de *L. chagasi* (MORENO; ALVAR, 2002). Os cães são importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da doença porque: a) LV é mais prevalente na população canina que na humana; b) a infecção no homem normalmente é precedida por casos caninos; c) cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). A prevalência da leishmaniose em cães de áreas endêmicas pode atingir de 20 a 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990). Cerca de 20.000 cães soropositivos são eliminados a cada ano no Brasil (VIEIRA; COELHO, 1998), mais de 150.000 cães soropositivos foram eutanasiados e inseticidas foram aplicados em mais de um milhão de casas entre 1994 a 1996 no Brasil (AKHAVAN, 1996).

A LV canina (LVC) atinge órgãos como baço, linfonodos, fígado e medula óssea, que possuem macrófagos em sua constituição. Uma outra característica particular da doença é a ineficácia do tratamento do animal infectado (SOLANO-GALLEGO, 2009). Além disso, alguns animais comportam-se como portadores assintomáticos da doença, cuja evolução de caráter crônico impossibilita a correta identificação dos doentes (DESJEUX, 2001).

O parasita é transmitido de um cão infectado para outro, pela picada de flebotomíneos e, possivelmente por outros artrópodes vetores, como pulgas (FERREIRA et al., 2009), carrapatos (COUTINHO; LINARDI, 2007), e as transfusões de sangue também têm sido descritas (OWENS et al., 2001). Após o repasto sanguíneo dos flebotomíneos nos cães, os parasitas rapidamente se espalham para os linfonodos e baço, via linfa e sangue e, eventualmente, atingem os rins e fígado. Ainda podem também infectar os órgãos reprodutores, sistema digestivo e respiratório, pele e bexiga (MOLYNEUX; ASHFORD, 1983).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita pode causar lesões e sinais clínicos que são característicos da LVC, embora alguns cães infectados possam ser assintomáticos (ALVAR et al., 2004), em alguns animais o desenvolvimento da doença pode ser latente e outros podem evoluir para a cura espontânea (FISA et al., 1999; GENARO, 1993).

Os sinais mais frequentes de LV são linfadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, perda de peso, caquexia e anormalidades locomotoras (SEMIÃO-SANTOS et al., 1995). A forma assintomática representa 20 a 40% da população de cães soropositivos, dos quais 80%, na verdade, desenvolvem a doença (NOLI, 1999). No Brasil, em áreas urbanas da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população soropositiva (QUEIROZ et al., 2009).

1.2 Resposta imune na LVC

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A ausência de resposta das células T aos antígenos de *Leishmania* spp. é observada *in vivo*, com o teste de Montenegro negativo (DOS-SANTOS et al., 2008).

Em cães infectados com *L. infantum*, ocorre uma redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU et al., 1997), e a desorganização da polpa branca do baço tem sido descrita (SANTANA et al., 2008). A imunossupressão associada com a infecção crônica ocorre devido a altas taxas de apoptose das células T e esse mecanismo pode contribuir para a diminuição dessas células no sangue periférico (LIMA et al., 2012). A imunidade protetora, tem sido associada com resposta imunológica celular, manifestada por uma resposta linfoproliferativa positiva a antígenos do parasita *Leishmania* spp. (CABRAL; O'GRADY; ALEXANDER, 1992), e produção de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α , as quais são necessárias para ativação de macrófagos (SADICK et al., 1991).

Os macrófagos têm papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp., pois são células parasitadas que, uma vez ativadas pela presença do TNF- α e do IFN- γ ativam os macrófagos a produzir o óxido nítrico (NO) que é considerado um dos principais mecanismos para a eliminação dos parasitas intracelulares (MAUËL; CORRADIN; BUCHMÜLLER ROUILLER, 1991; PINELLI et al., 2000; SADICK et al., 1991).

O hospedeiro canino quando parasitado por *L. infantum* pode apresentar resposta imune inata ou adquirida podendo ser de duas formas: mediada por células T (imunidade protetora) ou resposta imune humoral (não-protetora) com depressão da imunidade celular e manifestação da doença (BARBIÉRI, 2006; CABRAL; O'GRADY; ALEXANDER, 1992; REIS et al., 2006).

Na LVC, o parasito aumenta a expressão de MHCII em macrófagos infectados por *L. infantum* (KAYE et al., 1994), e *L. donovani* (ANTOINE et al., 2004), na presença dos linfócitos, e observa-se uma diminuição na produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012), com diminuição na função das células

apresentadoras de antígeno (APCs) (KAYE et al., 1994), podendo essa expressão ser coordenada pelas moléculas co-estimulatórias negativas resultando em perda da função das células T (PINELLI et al., 1999).

A imunidade protetora contra o parasito *Leishmania* spp. acontece com produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T CD4+ (Th1) (STRAUSS-AYALI; BANETHA; JAFFET, 2007). Dois sinais são necessários para a ativação das células T (LAFFERTY; CUNNINGHAM, 1975), o primeiro é antígeno-específico, gerado pelo receptor de células T (TCR) por meio do reconhecimento do peptídeo apresentado pelo MHC de uma APC. O segundo sinal é independente de antígeno e fornecido pela ligação dos membros da família B7 (HOFMEYER; JEON; ZANG, 2011), quando sinais co-estimulatórios são gerados por essas moléculas (CHAMBERS; ALLISON, 1997), resultam assim na ativação das células T, e na proliferação a diferenciação com produção de citocinas como a IL-12, IFN- γ e TNF- α (SPERLING; BLUESTONE, 1996).

Dependendo da natureza e magnitude desses sinais, a célula irá gerar citocinas e desenvolver funções regulatórias ou citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007). Desse modo, o resultado da infecção depende do balanço entre a habilidade do hospedeiro em induzir mecanismos leishmanicidas e estratégias do parasita para suprimir ou se evadir da resposta imune do hospedeiro (BUATES; MATLASHEWSKI, 2001).

As moléculas co-estimulatórias pertencem a família B7-CD28, as quais transmitem sinais ativadores (CD28) ou inibidores (CTLA-4) para as células T (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). Em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. ocorre falha no processo de apresentação de antígenos. A análise da expressão das moléculas coestimulatórias indicam diminuição na expressão de B7 que reduz a proliferação das células T (PINELLI et al., 1999). Recentemente foi comprovado que o parasita e seus antígenos inibem a expressão de co-estimuladores e diminuem a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012).

O PD-1, também conhecido como CD279, é uma molécula co-estimulatória com função negativa, composto por 288 aminoácidos, sendo uma

proteína de transmembrana composta de uma parte intracelular e outra extracelular. A molécula PD-1 (programmed cell death 1), é um membro da família B7-CD28, e é expresso por células imunológicas (SHARPE et al., 2007). Sua expressão ocorre em vários tipos celulares como linfócitos T, células NK, linfócitos B, monócitos, células dendríticas (KEIR et al. 2008), macrófagos (BALLY et al., 2015), e células T regulatórias (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013).

Quando PD-1 está associado a seu ligante PD-L1 ou PD-L2, uma sequência inibitória contendo tirosina na cauda de PD-1 recruta fosfatases que induzem a desativação das células T ou a indução de apoptose, ou mesmo outras respostas que são importantes para manter o balanço entre o desenvolvimento da imunidade, tolerância e imunopatologias (PARDOLL, 2012).

Para desencadear suas funções biológicas (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013), como diminuir sinais estimulatórios via TCR (KEIR et al., 2008), produção de citocinas e diminuição da proliferação celular, com significativo efeito na produção de IFN- γ e TNF- α , PD-1 se liga à PD-L1 ou PD-L2 (KEIR et al., 2008).

Os sinais inibitórios via PD-1 ocorrem a partir do estímulo emitido pelo TCR quando se liga a uma APC. A ligação de PD-1 com PD-L1 ou PD-L2 diminui o sinal emitido na parte intracitoplasmática da célula T. Como resultado, há uma diminuição na produção do IFN- γ , que pode ativar macrófago e da IL-2, uma citocina que pode estimular a proliferação celular (KEIR et al., 2008).

Na LVC já foi observada o aumento da expressão de PD-1 em células T CD4⁺ de cães infectados com *L. infantum* e sintomáticos, que quando submetidos ao estímulo antígeno específico para avaliação da proliferação celular, mostraram uma redução dessa resposta comparada a animais assintomáticos (ESCH et al., 2013). Em linfócitos T, B e macrófagos já foi demonstrado um aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes e a presença dessas moléculas foi associada a apoptose dos linfócitos T em células esplênicas e mononucleares do sangue periférico de cães com LV (CHIKU et al., 2016).

PD-1 é super expresso durante infecções crônicas (DULGERIAN et al., 2011; MCNAB et al., 2011). A expressão de PD-L1 é mais ampla que PD-L2 e é induzida fortemente por IFN- γ , enquanto o PD-L2 tem expressão mais restrita a células dendríticas e macrófagos e é induzida pela IL-4 e IL-13 (KEIR et al., 2008).

O PD-L1, também conhecido como B7-H1 ou CD274, é expresso em células dendríticas, macrófagos, células T e células B (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007). Sua expressão está associada a respostas Th1 e pode ser induzida via LPS e IFN- γ e estudos com sua expressão sugerem que PD-L1 pode ter papel preferencial em regular a resposta Th1 (LOKE; ALLISON, 2003).

O PD-L2, também conhecido como B7-DC ou CD273 (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007), tem sua expressão relativamente baixa (LATCHMAN et al., 2001), comparado ao PD-L1. Essa molécula é expressa em células dendríticas, macrófagos e células da medula óssea (KEIR et al., 2008). Durante a resposta Th2 ocorre um aumento da expressão de PD-L2 (AARNTZEN et al., 2012), e estudos demonstram que a expressão de PD-L2 pode regular essa resposta (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008; LOKE; ALLISON, 2003). A ligação de PD-L2 com o PD-1 inibe a proliferação via TCR e diminui a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ (LATCHMAN et al., 2001). Portanto a função de PD-L1 e PD-L2 pode depender do tecido e das citocinas do microambiente.

Em cães com LV após o bloqueio do PD-L1 nas células B, houve recuperação da resposta Th1 (SCHAUT et al., 2016), e proliferação das células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico (ESCH et al., 2013). Em células T CD8⁺ de pacientes com LV já foi observada uma anergia, bem como elevada expressão do mRNA de PD-1 e de IL-10 (GAUTAM et al., 2014), podendo suprimir a função efetora das células T CD8⁺, a secreção de citocinas e levar a uma disfunção imunológica (DAY et al., 2006; D'SOUZA et al., 2007; TRAUTMANN et al., 2006).

A IL-10 parece ser regulada pelos receptores PDs, em macrófagos infectados com *T. cruzi* e tratados com anticorpo bloqueador anti-PD-L2 foi

observado uma redução na produção de NO, e um aumento na produção de IL-10, associado a diminuição nos níveis de IFN- γ , criando um meio favorável para a proliferação desse parasita e quando anticorpos anti-PD-L1 e anti-PD-1 são adicionados a proliferação das células T é restaurada (DULGERIAN et al., 2011).

Na LVC a resistência ao parasito tem sido associada com a ativação de células Th1 e produção de citocinas como a produção do IFN- γ e do TNF- α (PINELLI et al., 1994), que estimulam a produzirem, pela via da arginina, o óxido nítrico (VOULDOUKIS et al., 1996). O óxido nítrico é um potente indutor de morte do parasita intracelular utilizado pelos macrófagos, que em sinergia com outras moléculas leva a produção de espécies reativas de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio, que podem então matar ou inibir a proliferação do parasita intracelular em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. (ANTOINE et al., 2004).

O IFN- γ em cães experimentalmente infectados com *L. infantum*, onde foi avaliada a progressão da doença, foi observado durante um curto período de tempo a produção do mRNA para IFN- γ , indicando seu envolvimento no atraso do estabelecimento da doença nesses animais (SANTOS-GOMES et al., 2002). Ainda em cães experimentalmente infectados, com inoculação intradérmica de promastigotas, desenvolveram uma infecção assintomática e as células mononucleares do sangue periférico, estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel de *Leishmania* spp. expressaram citocinas Th1, como IFN- γ (RODRIGUES et al., 2009).

O TNF- α atua em sinergia com o IFN- γ para a síntese de óxido nítrico (FONSECA et al., 2003). Sendo que a produção do TNF- α pode ser regulada pela sinalização via PD-1 (WEI et al., 2013). Células esplênicas e mononucleares do sangue periférico de cães com LV, após o bloqueio de PD-1 e seus ligantes, apresentaram aumento na produção do TNF- α (CHIKU et al., 2016). Tal aumento pode estar relacionado com a atividade microbicida, já que a sobrevivência de *L. infantum* em macrófagos caninos está associada ao aumento da produção desta citocina (PINELLI et al., 2000; TURCHETTI et al., 2015).

A IL-4, uma citocina de perfil Th2, leva a uma ativação alternativa do macrófago. Em cães sintomáticos naturalmente infectados, altos níveis dessa citocina foram observados no baço (MICHELIN; PERRI; LIMA, 2011), e em células mononucleares do sangue periférico de cães com *L. infantum* após seis meses de infecção (MANNA et al., 2006). A IL-4 também foi detectada na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, principalmente nos casos mais severos da doença (QUINNELL et al., 2001). Células mononucleares do sangue periférico de cães com LV oligosintomáticos e assintomáticos, submetidos ao estímulo de uma proteína recombinante de *L. chagasi*, apresentaram baixos níveis de produção dessa citocina, ao contrário dos cães sintomáticos (DA COSTA PINHEIRO et al., 2005).

A IL-10, outra citocina ligada as respostas Th2, é uma das principais citocinas supressoras presentes na LVC (CORRÊA et al., 2007). Estando associada a extrema susceptibilidade a doença (SAHA et al., 2006), uma correlação positiva entre a IL-10 e a carga parasitária já foi estabelecida (MICHELIN; PERRI; LIMA, 2011), podendo essa citocina inibir também a proliferação das células T (AWASTHI et al., 2004; GOTO; PRIANTI, 2009). Através da regulação negativa da atividade microbicida e de citocinas como TNF- α e IL-12 (MURRAY et al., 2002).

Diversos estudos demonstram que PD-1 e seus ligantes, PD-L1 e PD-L2, tem funções que se sobrepõe a supressão da função efetora das células T (GREENWALD et al., 2002), contudo na leishmaniose visceral canina o papel de tais moléculas ainda não foi estabelecido.