

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

**PD-1 REGULA A ATIVIDADE MICROBICIDA DE
LEUCÓCITOS ESPLÊNICOS NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Gabriela Torres Rebech

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2018

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

**PD-1 REGULA A ATIVIDADE MICROBICIDA DE
LEUCÓCITOS ESPLÊNICOS NA LEISHMANIOSE
VISCERAL CANINA**

Gabriela Torres Rebech

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

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

ARAÇATUBA – SP

2018

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

Rebech, Gabriela Torres

R289p

PD-1 regula a atividade microbicida de leucócitos esplênicos na leishmaniose visceral canina/ Gabriela Torres Rebech.

Araçatuba: [s.n], 2018.

56f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientador: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cães. 2. Anticorpo monoclonal. 3. Leishmania spp. I. T.

CDD 616.9

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PD-1 regula a atividade microbicida de leucócitos esplênicos na leishmaniose visceral
canina

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Valéria M. S. de Lima

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Gisele Fabrino Machado

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO

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

Sandra Helena Penha de Oliveira

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 06 de abril de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabriela Torres Rebech - Nascida em 07 de março de 1994, na cidade de Birigui/SP, filha de Native Araújo Torres Rebech e Celso Sebastião Rebech. Graduada em Ciências Biológicas no ano de 2015 pelo Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* – UniSalesiano Araçatuba/SP, com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Aditivos na Dieta de Codornas Poedeiras para Enriquecimento Nutricional de seus Ovos”, sob orientação da Profa. Dra. Andréa Fontes Garcia. Durante a graduação participou de eventos culturais e científicos como simpósios e congressos. Desenvolveu projeto de Iniciação Científica contemplado com bolsa CNPq pelo UniSalesiano, intitulado “Ocorrência de *Cryptosporidium spp* em crianças do ensino fundamental das escolas públicas municipais de Araçatuba/SP”, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Gustavo Ferraz Lima. No ano de 2015, realizou atividades como aluna de Iniciação Científica, no laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – UNESP, com projeto intitulado “O papel do eosinófilo no controle da carga parasitária na leishmaniose visceral canina” e, no ano de 2016, ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) – UNESP, sob orientação da Prof^a. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima. Em 14 de novembro de 2017, foi aprovada no Exame Geral de Qualificação do mestrado, com o trabalho intitulado “NO, ROS and IL-17 after PD-1 blocking in splenic leukocytes in canine visceral leishmaniasis” o qual participa desta dissertação.

EPÍGRAFE

“Aparta-te do mal, e pratica o que é bom; procura a paz, e empenha-te por alcançá-la. ”

Bíblia Sagrada: Salmos, 34:14.

“Encha a mochila de coisas boas e a mente de positividade deixe para traz o que lhe fez mal e siga em frente se equilibrando nos trilhos do trem da vida. ”

Gabriela T. Rebech

DEDICATÓRIA

*Primeiramente a **Deus**, pois em tudo se mostrou presente.*

*Aos meus pais **Native** e **Celso** e minha querida tia **Aparecida** por todo apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima, por me aceitar como orientada e me proporcionar a oportunidade de vivenciar inúmeras emoções e experiências as quais possibilitaram grande crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Luis Gustavo Ferraz Lima pelo incentivo, orientação, apoio e confiança, ao facilitar meu primeiro contato com a pós-graduação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado no início do curso.

Aos familiares pelo apoio físico, psicológico e financeiro durante toda minha jornada até aqui.

Aos colaboradores e amigos do laboratório de Imunologia Jaqueline Bragato, Gabriela Venturin, Larissa Melo, Sidnei Costa, Marilene Oliveira, Lucas Ito, Gabriel Trivellato, Bianca Stefanini, Fabiana Hernandez, Kahtlenn Silva; aos colegas de outros laboratórios Anelise Bosco, Ariana Ferreira e Fábio Taniwaki. Todos vocês ajudaram direta e indiretamente na execução dos experimentos com conselhos e opiniões, coletas e processamento das amostras, com palavras de apoio e carinho, pois, de diversas formas vocês estiveram presentes em meus dias, tornando-os especiais e motivadores.

À melhor técnica de laboratório Flavia Yamamoto por toda ajuda e suporte oferecido durante o experimento. Você é incrível.

A todos os professores da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/FMVA-UNESP, pelas disciplinas ministradas as quais agregaram grande conhecimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/FMVA e a todos os funcionários da unidade.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, por todo empenho e auxílio dedicados durante a seleção dos animais.

Aos professores Paulo Sérgio Patto dos Santos e Flávia de Rezende Eugênio pelos procedimentos cirúrgicos dos animais do grupo controle.

Aos proprietários dos cães saudáveis do grupo controle por autorizarem a inclusão dos animais no experimento.

A todos os cães envolvidos no experimento, pois estes contri para o desenvolvimento da pesquisa e avanço da ciência.

Aos componentes de minha banca de qualificação Prof^a Dr^a Cárís Nunes, Prof^a Dr^a Gisele Machado e Prof^a Dr^a Sandra Oliveira pelas dicas e correções as quais foram de grande importância para o aperfeiçoamento do trabalho e desenvoltura profissional.

Por fim, sinto-me grata, pois cada um desempenhou papel especial em meus dias. Não tenho como retribuí-los, mas muito obrigada a todos por tudo.

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS | 12 |
| 1 Informações sobre a Leishmaniose | 12 |
| 2 Resposta Imunológica na LVC | 15 |
| 2.1 Resposta Inata..... | 15 |
| 2.2 Resposta adaptativa..... | 17 |
| 3 Desenvolvimento da LVC | 21 |
| 4 O papel e o bloqueio do PD-1 na LVC | 23 |
| Referências | 26 |
| CAPÍTULO 2 - NO, ROS AND IL-17 AFTER BLOCKING PD-1 IN SPLEEN LEUKOCYTE IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS | 38 |
| 1 Introdução | 39 |
| 2 Material and methods | 40 |
| 2.1 Ethics Committee..... | 40 |
| 2.2 Animals..... | 40 |
| 2.3 Sample collection..... | 41 |
| 2.4 Obtaining spleen leukocytes..... | 42 |
| 2.5 Spleen leukocyte culturing..... | 42 |
| 2.6 Determination of PD-1 levels..... | 43 |
| 2.7 NO and Nitrite determination | 43 |
| 2.8 ROS determination..... | 44 |
| 2.9 IL-17 concentration | 45 |
| 2.10 Parasite load..... | 45 |
| 2.11 Statistical analysis | 45 |
| 3 Results | 45 |
| 3.1 PD-1 expression | 45 |
| 3.2 NO, Nitrite and ROS determination..... | 46 |
| 3.3 IL-17 in culture supernatant | 49 |
| 3.4 Parasite load after PD-1 blocking | 50 |
| 4 Discussion and Conclusion | 51 |
| Acnowledgment | 53 |
| Authors' contributions | 53 |
| References | 53 |

PD-1 REGULA A ATIVIDADE MICROBICIDA DE LEUCÓCITOS ESPLÊNICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO - A leishmaniose é uma doença imunossupressora causada por protozoários do gênero *Leishmania*, tendo os cães como reservatório doméstico. A molécula Programmed Cell Death 1 (PD-1) é altamente expressa em células leucocitárias de cães com leishmaniose visceral e promove a exaustão dos linfócitos T e a supressão da secreção de citocinas. Como o PD-1 tem função supressiva em relação à imunidade celular, avaliamos o efeito de anticorpos bloqueadores de PD-1 na produção de NO, ROS, interleucina 17 (IL-17) e na carga parasitária em cultura de leucócitos esplênicos de cães naturalmente infectados. In vitro, o bloqueio de PD-1 promoveu aumento dos níveis de NO intracelular e reduziu os de IL-17 no sobrenadante da cultura, além de reduzir a carga parasitária, mas não alterou os níveis de ROS. Concluimos que a PD-1 participa na regulação da resposta imune e que o anticorpo bloqueador é efetivo na restauração da atividade microbicida do hospedeiro. Isso pode ser investigado em estudos imunoterapêuticos no futuro.

Palavras-chave: Cães, Anticorpo monoclonal, *Leishmania spp.*

PD-1 REGULATES THE MICROBICIDE ACTIVITY OF SPLEEN LEUKOCYTES IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - Leishmaniasis is an immunosuppressive disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* for which dogs are the domestic reservoir. The programmed cell death 1 molecule (PD-1) is highly expressed in leukocyte cells of dogs with visceral leishmaniasis, and it promotes T lymphocyte exhaustion and suppression of cytokine secretion. Because PD-1 has a suppressive function regarding cell immunity, we evaluated the effect of PD-1 blocking antibodies on NO, ROS and interleukin 17 (IL-17) production and on parasite load in spleen leukocyte cultures from naturally infected dogs. In vitro, PD-1 blocking promoted increased levels of intracellular NO and reduced the levels of IL-17 in the culture supernatant, in addition to reducing the parasite load, but do not change ROS levels. We conclude that PD-1 participates in regulation of the immune response and that the blocking antibody is effective in restoring host microbicidal activity. This can be investigated in an immunotherapeutic study in the future.

Keywords: Dogs, Monoclonal antibody, *Leishmania spp.*

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Informações sobre a Leishmaniose

A Leishmaniose é uma doença endêmica em mais de 90 países com estimativa de 700 mil a um milhão de novos casos humanos e até 30 mil mortes ao ano (WHO, 2017a; WHO, 2017b). Afeta principalmente o Leste da África com altos índices de mortalidade, porém, em 2014 90% dos casos foram registrados em apenas seis países, como o Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2017c).

É causada por aproximadamente 20 espécies diferentes de protozoários do gênero *Leishmania* (*L.*) e pode se apresentar de três diferentes formas; a Leishmaniose Cutânea (LC), caracterizada pelo aparecimento de lesões e úlceras pelo corpo, com relatos de até um milhão de novos casos por ano; a Leishmaniose Muco cutânea (LM), causa destruição parcial ou total das membranas mucosas atingindo principalmente nariz, boca e garganta; a Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como kalazar, causa irregularidades do fígado e baço, apresentando febre, perda de peso entre outros sinais e sintomas, além disso, é considerada a mais letal, pois pode atingir 100% de letalidade, em um período de 2 anos, quando os pacientes humanos não são tratados (WHO, 2016a; WHO, 2017b).

O parasito causador da leishmaniose possui ciclo de vida digenético, ou seja, necessitam de dois hospedeiros para completar o ciclo, entre eles um mamífero como reservatório e um inseto como vetor (DOSTÁLOVÁ e VOLF, 2012). Apresenta diferentes formas durante seu ciclo, sendo elas a promastigota procíclica, forma flagelada não infectante, presente no tubo digestivo do inseto vetor; a forma promastigota metacíclica, forma flagelada infectante, apresentando características necessárias para garantir sua proteção contra enzimas presentes no tubo digestivo, as quais consistem na presença de oligossacarídeos e lipofosfoglicanos na superfície da membrana; e a forma amastigota sem flagelo, presente no interior da célula do mamífero hospedeiro (ALEXANDER et al., 1999; SARAIVA et al., 1995).

A transmissão do protozoário ocorre durante o repasto sanguíneo, onde a fêmea do flebotomíneo infectado regurgita as formas promastigotas metacíclicas presentes em seu tubo digestivo que, rapidamente, atingem os micro vasos presentes na pele do hospedeiro e são fagocitados, principalmente, por macrófagos (ALEXANDER et al., 1999), e outras células fagocíticas como neutrófilos e células dendríticas, que são recrutados para o local afetado. Dentro da célula fagocitária, o parasito passa para a forma amastigota, onde se multiplica por divisão binária, no vacúolo parasitóforo até ocasionar a ruptura da célula parasitada e se espalhar pelo tecido, infectando novas células e, assim, completar seu ciclo de vida (HOSEIN et al., 2016). Essa transmissão pode ser classificada como antroponótica, quando o humano é o principal reservatório e zoonótica quando outros animais são hospedeiros principais (DESJEUX, 1996).

A epidemiologia da leishmaniose nas américas é mais complexa devido à grande variedade de vetores e hospedeiros, variações no ciclo de vida e nas espécies de *Leishmania* existentes nesta região, assim, os sinais clínicos e a resposta imunológica são divergentes o que dificulta o tratamento (WHO, 2017b). O primeiro caso humano foi reportado no Paraguai em 1913 (MIGONE, 1913) e em 1934 no Brasil, foi descrito o primeiro caso de kalazar, através de uma viscerotomia do fígado *post mortem* (GÓMEZ, 1951). Entretanto, em 2009, 90% dos casos registrados nas Américas ocorreram no Brasil tendo a Bahia, Ceará, Piauí, e Maranhão como os estados mais afetados (ALBUQUERQUE et al., 2009).

No Brasil, a espécie do protozoário causador da leishmaniose visceral é a *L. infantum* (também chamada de *L. chagasi*) e é transmitida por mosquitos fêmeas da família *Phlebotominae* e gênero *Lutzomyia spp* (RANGEL e VILELA, 2008). A leishmaniose era considerada rural até 1980, entretanto, uma grande epidemia urbana ocorreu em Teresina, progredindo para Natal e São Luís e posteriormente, para outras partes do país (WERNECK, 2010).

No estado de São Paulo já foram encontradas mais de 69 espécies do inseto vetor, sendo *Lutzomyia longipalpis* (*L. Longipalpis*) a mais comum (SHIMABUKURO e GALATI, 2011). O primeiro relato da doença foi um caso

canino em 1999, no município de Araçatuba (FEITOSA et al., 2000). Desde então, diversas medidas vêm sendo utilizadas para o controle dos animais infectados, na tentativa de limitar a propagação da doença. Uma das medidas mais utilizadas atualmente, é a eutanásia dos animais infectados, entretanto, este método é contraditório pois, o tempo entre a infecção, diagnóstico e eutanásia, é longo e o animal fica exposto facilitando o contágio de outros cães; e, por não haver redução significativa de casos da doença, a eutanásia, não se apresenta como um método muito eficiente (COURTENAY et al., 2002).

Os cães domésticos (*Canis familiaris*) passaram a participar do ciclo de transmissão da doença como principais reservatórios de *L. infantum* transmitidos pelo *L. logipalpis* (ALVAR et al., 2012), graças a contribuição direta do desmatamento e da guerra civil para expansão da leishmaniose pelo mundo (WHO, 2010). Estes eventos resultaram na perda do ambiente natural e obrigou o parasito a se adaptar a novos vetores, hospedeiros e ambientes até alcançarem o ambiente doméstico (WHO, 2010). Os sinais mais frequentes de leishmaniose visceral canina (LVC) são: alopecia, dermatite, ulcera ponta de orelha, onicogribose, hiperqueratose, entre outros (MOREIRA et al., 2016).

O diagnóstico da doença é complexo, envolvendo aspectos clínicos e clinicopatológicos, os quais, geralmente não são visíveis, necessitando de exames mais específicos para a detecção do parasito, como teste sorológico, parasitológico e molecular (WHO, 2016b). Testes sorológicos se baseiam na identificação de anticorpos (Ac) específicos para o parasito da *Leishmania*, como por exemplo o teste indireto de anticorpos de fluorescência (IFAT) e o ensaio de imunoabsorção enzimática, (ELISA). O teste parasitológico permite a visualização da forma amastigota do parasito por microscopia de luz a partir da citologia de tecidos e órgãos. Já os testes moleculares permitem a identificação do DNA do parasito na amostra ou cultura da amostra coletada, através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Por possuírem alto parasitismo na pele, os cães, podem favorecer o contágio de novos vetores e, por estarem próximo aos humanos, facilitam a transmissão da doença (DEANE; DEANE, 1955). Entretanto, outros animais

como gambás (*Didelphis marsupialis*) (SANTIAGO et al., 2007), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), além de pequenos roedores e equídeos também podem ser reservatórios de *Leishmania* (WHO, 2010).

2 Resposta Imunológica na LVC

2.1 Resposta Inata

A resposta imune nata compreende mecanismos celulares e moleculares, inespecíficos ao patógeno. Esta resposta inicial é caracterizada pelo recrutamento de células apresentadoras de antígeno, ou “antigen-presenting cells” (APCs), como os monócitos/macrófagos, neutrófilos e células dendríticas que são responsáveis pelo controle do parasito (KUMAR, et al., 2009; PAPADOGIANNAKIS et al., 2015).

O primeiro contato com o parasito ocorre na pele após a inoculação das promastigotas pelo inseto vetor. Neste momento, ainda antes do contato com as células, o sistema complemento age como primeira linha de defesa do organismo e desencadeia a ativação da resposta inflamatória. Entretanto, alguns parasitos, conseguem sobreviver e são fagocitados por APCs como células dendríticas, células de Langerhan's, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos e macrófagos derivados de monócitos, locais ou recrutadas (SOUBACH e LASKAY, 2000). As APCs, principalmente macrófagos e neutrófilos, expressam em sua superfície, receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e receptores de complemento do tipo I (CD35) e do tipo III (CD11b/CD18) que reconhecem o padrão molecular associado ao patógeno (PAMPs) e facilitam a adesão ao parasito e a internalização por fagocitose (KUMAR, et al., 2009; PAPADOGIANNAKIS et al., 2015).

Os macrófagos transportam as promastigotas intracelulares até a região do linfonodo e demais órgão do corpo, para proceder com a apresentação de antígenos aos linfócitos T, por moléculas transmembranais, como o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (Major Histocompatibility Complex-class II (MHC-II)) na superfície do macrófago que irão conter o peptídeo derivado do parasita (REINER, et al., 1988; PAPADOGIANNAKIS et al., 2015). A apresentação de antígeno (Ag) resultará na ativação da resposta imune

adaptativa (HOSEIN et al., 2017; KUMAR et al., 2009). Após a fagocitose, a promastigota da *Leishmania*, se estabelece no compartimento fagossomal da célula parasitada. Conseqüentemente, o fagossomo se diferencia em vacúolo parasitóforo, devido a maturação e fusão do fagossomo com as organelas citolíticas (SOUBACH e LASKAY, 2000). O fagossomo é a estrutura utilizada pelos macrófagos para eliminar o parasito através da produção de óxido nítrico (Nitric Oxide (NO)) (PAPADOGIANNAKIS et al., 2015), sendo uma etapa dessa célula no combate à doença (HOSEIN, et al., 2017). No fagossomo ocorrerá a transformação da forma promastigota em amastigota e sua multiplicação. Entretanto, a presença de lipofosfolícano (LPG) na membrana da promastigota, impede a fusão do fagossomo ao lisossomo e a protege do pH ácido e das enzimas presentes, permitindo sua sobrevivência e ganhando mais tempo para completar seu processo de transformação (BOGDAN et al., 1998).

As células dendríticas, através da produção de interleucina 12 (IL-12), recrutam células matadoras naturais (Natural Killer (NK)) que regulam positivamente a secreção de IFN- γ (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007) que é o responsável por induzir a ativação de macrófagos e a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), uma enzima que catalisa a L-arginina resultando na produção de NO (NADERER e MCCONVILLE 2008). O NO, é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor que exerce a função de mediar reações citotóxicas de células imunes, sendo capaz de destruir patógenos e células tumorais (DUSSE et al., 2003). Os macrófagos também produzem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que tem ação autocrina, para aumentar ainda mais a produção de microbicidas e radicais livres (LIU et al., 2012).

Nos primeiros meses de infecção por *L. Infantum*, cães sintomáticos apresentam maior concentração de nitrito (NO₂⁻), um indicador da produção de NO, no sobrenadante de cultura de macrófagos derivados de mononucleares do sangue periférico, em comparação aos cães assintomáticos. Porém, após 8 meses, o nível de NO é significativamente maior no grupo assintomático. Desta forma, pode-se dizer que no início da infecção, a produção de NO pode indicar uma atividade microbicida nos animais infectados, mas não a resistência, já os

níveis mais elevados de NO observado em cães assintomáticos, pode sugerir função protetora dessa molécula a longo prazo (PANARO et al., 2008).

Outro mecanismo microbicida é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzido por neutrófilos, monócitos e macrófagos durante a fagocitose em um processo chamado de explosão respiratória (RB) (MOSSER e EDWARDS, 2008). A produção de ROS está aumentada em células mononucleares de sangue periférico de cães infectados quando comparado aos não infectados (MELO et al., 2014b), porém parece não ser suficiente para eliminar o parasita, provavelmente pela alta carga parasitária observada no baço de cães sintomáticos (REIS et al., 2009). Entretanto, o bloqueio, *in vitro*, da produção do ROS em monócitos de pacientes humanos com LC, resultou no aumento de parasitas e células parasitadas, ou seja, a inibição do ROS permite a sobrevivência do parasita, confirmando seu papel durante a resposta leishmanicida (CARNEIRO et al., 2016).

2.2 Reposta adaptativa

Após a apresentação do Ag pelo macrófago através do MHC-II, ocorre uma expansão dos linfócitos T que retornam ao local do primeiro contato com o protozoário, resultando na modulação da atividade dos macrófagos, células dendríticas e Langerhan's, presentes (PAPADOGIANNAKIS et al., 2015).

O recrutamento, ativação e a expansão dos linfócitos T para o local inicial e o desenvolvimento de uma resposta apropriada, estão relacionados ao tipo de Ag apresentado pela MHC-II da APC, mais o envolvimento de moléculas co-estimulatórias (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010) pertencentes a família B7/CD28, como a B7-1 e a B7-2, que se ligam a outros receptores como o CD40 do macrófago, CD28 e CD40L do linfócito T (ALEXANDER et al., 1999). Esta ligação induz sinais positivos responsáveis por estimular a ativação e a diferenciação celular e o aumento da produção de citocinas, por outro lado, podem se ligar ao receptor de linfócito T citotóxico associado ao Ag 4, ou "cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4" (CTLA-4) também conhecido como CD152, e induzir sinais negativos que limitam ou cessam a resposta celular (PARDOLL, 2016; WANG e CHEN, 2004).

O “Programmed Cell Death 1” (PD-1), ou CD279, membro da família B7-CD28, é outro exemplo de molécula coestimulatória que desempenha função negativa (SHARPE et al., 2007). É expresso por células T CD4⁺ e CD8⁺, células B e APCs (AGATA et al., 1996; YAMAZAKI et al., 2002) durante infecções crônicas (DULGERIAN et al., 2011; MCNAB et al., 2011). O PD-1 pode bloquear a ativação de células T (CHEMNITZ et al., 2004), a partir da associação com seus ligantes Programmed Cell Death Ligant 1 (PD-L1) também conhecido como B7-H1 (FREEMAN et al., 2000) e CD274 ou com o Programmed Cell Death Ligant 2 (PD-L2) também conhecido como B7-DC (LATCHMAN et al., 2001) e CD273, estimulando o aumento da tirosina fosfatase 1 (SHP-1), uma proteína inibidora, que desempenha papel importante na sobrevivência da *Leishmania* dentro dos macrófagos e na progressão da doença pela inibição da produção de NO (FORGET et al., 2006).

As citocinas secretadas também são responsáveis por determinar qual o tipo de linfócito T será ativado. Por exemplo, a secreção de IFN- γ ou IL-12, desencadeará a ativação de linfócitos tipo T helper 1 (Th1), enquanto a IL-4, desencadeará uma resposta tipo T helper 2 (Th2) (TRIPATHI et al., 2007). A IL-12 secretada pelas células dendríticas inicia uma resposta Th1 relacionada a citotoxicidade com a ativação de células NK, além da produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ (LIU et al., 2012; OUYANG et al., 2008) que consecutivamente, induz a produção de NO nas células fagocitárias, principalmente macrófagos (TRIPATHI et al., 2007). A produção do IFN- γ também está relacionada às células TCD4⁺ e ativação das células TCD8⁺ citotóxicas, as quais desempenham função importante na morte do parasito (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; HOSEIN et al., 2017). Linfócitos Th17 CD4⁺ secretam a interleucina 17 (IL-17), uma citocina participante do processo imunológico (FRANGOIS et al., 1996; OYUANG et al., 2008).

Recentemente, a IL-17, foi citada como participante do processo inflamatório durante a leishmaniose (NASCIMENTO et al., 2015a; QUIRINO et al., 2016) como mediadora fundamental para a infiltração de neutrófilos (QUIRINO et al., 2016) e, junto ao IFN- γ , possivelmente induz a expressão da iNOS e a produção de NO (NASCIMENTO et al., 2015b).

O bloqueio da IL-17, no baço de camundongos infectados por *L. infantum*, tornou os animais mais suscetíveis a doença (QUIRINO et al., 2016) e na LVC, cães assintomáticos apresentaram aumento da IL-17, de IFN- γ , de iNOS e NO, o que resultou no controle da carga parasitária e, possivelmente, contribuiu para a resistência do hospedeiro (NASCIMENTO et al., 2015a). Por outro lado, em um estudo recente, camundongos nocaute para produção de IL-17 apresentaram a diminuição da infiltração de neutrófilos e monócitos no baço e no fígado, juntamente com a diminuição da carga parasitária e dos sintomas, além do aumento da produção de IFN- γ no baço (TERRAZAS et al., 2016). Deste modo, o mecanismo de ação da IL-17 não é claro, tornando necessário o desenvolvimento de estudos para compreensão de sua função na leishmaniose visceral.

A resposta de células tipo Th2, está relacionada à imunidade humoral e a produção de citocinas anti-inflamatórias as quais participam na regulação da resposta imune celular. A IL-10 é uma das citocinas presentes na resposta Th2 fortemente relacionada à progressão da leishmaniose, pois durante a resposta ao parasito, esta citocina é responsável pelo controle da inflamação através da desativação de macrófagos e supressão de linfócitos Th1 e das citocinas IL-12 e IFN- γ (TRIPATHI et al., 2007), além de favorecer a sobrevivência das células B e a diferenciação de plasmácitos (NYLEN et al., 2007). Os linfócitos B compõem um conjunto de células apresentadoras de Ag responsáveis pela produção de imunoglobulinas (Ig) após o reconhecimento do Ag apresentado pelo linfócito Th2 na presença da IL-4. Este reconhecimento, induz a expressão de moléculas CD23 ou CD40L, que no linfócito B, estão envolvidas na síntese de anticorpo IgE e IgG4 (JEANNIN, et al., 1997; RODRIGUEZ-PINTO et al., 2014). Outras células Th2, também executam função imunossupressora, entre elas estão as células reguladoras (regulatory T cells (Tregs)) ou (CD4⁺ CD25⁺). As Tregs secretam IL-10 e o fator de transformação do crescimento beta (Transforming Growth Fator beta (TGF- β)) que também está associado a progressão da doença (HOSEIN et al., 2017).

O tipo de resposta observada nos cães sintomáticos, é caracterizada pelo predomínio da resposta humoral, com detecção de anticorpos anti-

Leishmania, entre 45 dias até 3 meses após a infecção por *L. infantum*, podendo estar correlacionados ao aparecimento dos sintomas durante o desenvolvimento da doença (ABRANCHES et al., 1991). Cães naturalmente infectados e sintomáticos apresentaram aumento de anticorpos IgG, IgA e IgM, quando comparados a cães assintomáticos, enquanto os cães assintomáticos apresentaram aumento da linfoproliferação e baixos níveis de anticorpos específicos em comparação aos cães sintomáticos, refletindo a ineficiência da resposta humoral à doença (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

Os cães infectados apresentam distintas reações imunológicas, desde uma resposta eficiente sendo assintomático para a doença e, possivelmente, alcançarem a cura, ou desenvolverem sintomas mais leves e serem caracterizados como oligossintomáticos, ou não desenvolverem uma resposta eficiente resultando na progressão da doença, com sintomas mais severos e consecutivamente, a morte (HOSEIN et al., 2017).

A redução de linfócitos T nos órgãos linfoides é compensada pelo aumento de linfócitos B nos cães doentes. Essa compensação pode resultar no desenvolvimento dos sinais clínicos mais comuns, como linfadenomegalia, esplenomegalia e hiperglobulinemia. A hiperglobulinemia acarreta diversos danos ao hospedeiro, devido à deposição de imunocomplexos nos tecidos e órgãos, resultando em glomerulonefrite, vasculite, uveíte, miosite e poliartrite, por exemplo, além de trombocitopenia e artrite. Essa alteração de resposta pode ser uma justificativa para o desenvolvimento dos sinais e sintomas que podem causar desde uma leve dermatite a uma insuficiência renal crônica e caquexia (KOUTINA et al., 2014).

A supressão da imunidade protetora, também, pode ser uma das causas da propagação dos sinais clínicos nos cães sintomáticos e pode ser caracterizada pelo baixo número de linfócitos T CD4 no sangue periférico, aumento de interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10 (BARBIÉRI et al., 2006; ESCH et al., 2013), o declínio de interleucinas pró-inflamatórias essenciais para a sobrevivência de células T (BALKHI et al., 2015) e de IFN- γ , essencial para a ativação de macrófagos participantes na morte de parasitas e células parasitadas (PINELLI et al., 2000). Já a proteção do hospedeiro, pode estar

relacionada a uma resposta efetiva caracteriza pelo aumento da resposta celular e produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e o TNF- α (REIS et al., 2009).

3 Desenvolvimento da LV canina

Por ser um parasito intracelular obrigatório, a forma amastigota da *Leishmania*, necessitou se adaptar com mecanismos de defesa contra as reações celulares para garantir a sua sobrevivência. Desde o momento da internalização das promastigotas pelos macrófagos, há a possibilidade do parasito modular a resposta imunológica garantindo um ambiente haptico para seu desenvolvimento. A modulação das APCs pela *Leishmania*, altera a posterior ativação dos linfócitos T desencadeando uma resposta tipo Th2 e consequentemente, afetando o processo inflamatório e tornando o hospedeiro mais susceptível (TRIPATHI et al., 2007; OLIVIER et al., 2005).

A diferença entre os tipos de resposta celular ou humoral definirá o aspecto da doença no hospedeiro e será responsável pela resistência ou suscetibilidade a infecção (PINELLI et al., 1994). Atualmente, é aceito que a resposta imune ao parasita não é idêntica em todo o sistema hospedeiro, mas sim específico do órgão (MAIA e CAMPINO, 2012), como por exemplo, a pele que é o primeiro órgão em contato com o inseto vetor, importante para avaliar o potencial de transmissão da doença por ser um local com alto parasitismo (HOSEIN et al., 2017) e onde ocorrerá a primeira resposta imune seja ela celular, tipo Th1, ou humoral, tipo Th2, ou até mesmo uma mistura desta duas respostas, como já foi observado em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. (PAPADOGIANNAKIS et al., 2015).

Na leishmaniose visceral canina o baço é um dos órgãos mais afetados durante a infecção, juntamente com a pele e a medula óssea. É o local onde a resposta ao parasita será montada e onde ocorrerá ou não, o processo de ativação celular (MAIA e CAMPINO, 2012), mas devido ao alto parasitismo ocorrente neste órgão, o baço pode apresentar desestruturações morfológicas como hipertrofia e hiperplasia da polpa branca e desestruturação folicular

(CAVALCANTI et al., 2015) além da substituição de macrófagos por linfócitos (REIS et al.,2009).

Em estudo recente, foi observado uma resposta heterogênea de citocinas pró e anti-inflamatórias entre cães com alta e baixa carga parasitária esplênica durante a LV. Os cães com alta carga parasitária esplênica apresentaram uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- γ , IL-12 e IL-6, enquanto citocinas anti-inflamatórias como IL-10 and TGF- β , apresentaram-se aumentadas em comparação aos cães com baixa carga parasitária (CAVALCANTI et al., 2015).

Durante a infecção, o balanço entre a produção de citocinas e a atividade celular torna-se necessário para promover a resistência do hospedeiro à doença (SANTOS-GOMES et al., 2002). Entretanto, este tipo de resposta é prejudicada e resulta na falha da eliminação do parasito (REIS et al.,2009). A grande quantidade de parasitos na pele, o aumento da inflamação e altos níveis de apoptose celular, estão diretamente relacionados aos sinais apresentados por cães sintomáticos e podem ser grandes aliados na progressão da doença (VERÇOSA et al., 2012).

O estágio de infecção nos cães, também pode alterar o metabolismo oxidativo e a apoptose de neutrófilos no sangue periférico. Durante o estágio moderado da infecção, a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ocasionar o esgotamento das defesas antioxidantes e resultar na apoptose de neutrófilos, favorecendo o desenvolvimento da infecção. Com a doença em estágio muito avançado, a alta taxa de apoptose de neutrófilos pode resultar na diminuição do metabolismo oxidativo, contribuindo ainda mais para a progressão da doença (ALMEIDA et al., 2013).

A apoptose celular durante a LV fragiliza o sistema imune do hospedeiro, tornando-o mais suscetível a co-infecções por *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*, por exemplo, (OLIVEIRA et al., 2008) podendo ser a possível causa da ausência ou desorganização da resposta Th1, observada em cães sintomáticos (SANCHEZ et al., 2004).

4 O papel e o bloqueio do PD-1 na LVC

Há estudos que apontam o PD-1 como indutor da morte celular, pois desde o início, em 1992, a expressão de seu gene é associado a um tipo clássico de programação da morte celular, ao ser observado durante a indução, *in vitro*, da apoptose em células do timo de camundongos (ISHIDA et al., 1992). Porém, são poucos os estudos envolvendo o PD-1 com a LVC.

Recentemente, o aumento da expressão do PD-1, foi observado em células F4/80 e linfócitos B e T do sangue periférico e do baço de cães com leishmaniose visceral (CHIKU et al., 2016), participando da supressão da função efetora das células T CD8⁺ e na secreção de citocinas das células T CD4⁺, ocasionando a disfunção imunológica e resultando na exaustão simultânea dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (ESCH et al., 2013). Também foi observado que a interação PD-1/PD-L1 pode resultar na supressão da produção da IL-17 e o bloqueio desta interação, com anticorpos monoclonais, restabelece a produção (HIRAHARA et al., 2012). Porém, a relação entre o PD-1 e a IL-17 na LV canina, ainda não foi estudada.

Sabendo-se da necessidade de interação do PD-1 com seus ligantes para efetivar a coestimulação negativa das células, alguns estudos começaram a desenvolver tratamentos imunoterapeúticos baseados na utilização de Ac monoclonais, capazes de neutralizar essa interação do PD-1 com seus ligantes, na tentativa de restabelecer a resposta imunológica do hospedeiro (RAO et al., 2017). Estes métodos são amplamente utilizados para melhorar a resposta imune às células tumorais em ratos e em humanos com a redução, visível, do tecido tumoral após o tratamento com o Ac monoclonal anti-PD-1 (PARDOLL, 2016)

Em estudo recente, nosso grupo de pesquisa observou a atividade do Ac bloqueador de PD-1 em células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com *Leishmania spp.* O bloqueio do PD-1 com Ac monoclonal, promoveu o aumento dos níveis de NO e a produção de TNF- α , além da diminuição da carga parasitária (CHIKU et al., 2016). Outro estudo avaliou o efeito do Ac bloqueador de PD-L1, B7/H1, em células mononucleares

do sangue periférico de cães sintomáticos e assintomáticos, naturalmente infectados por *L. infantum* e concluiu que o bloqueio foi capaz de reverter a exaustão e promoveu a restauração da capacidade proliferativa das células CD4⁺ e CD8⁺ (ESCH et al., 2013). A produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ também foi reparada, juntamente com a capacidade dos monócitos em produzir superóxido e ROS, por outro lado, o bloqueio resultou na redução significativa da produção de IL-10 e consecutivamente na carga parasitária, em ambos os grupos (ESCH et al., 2013). Entretanto, o efeito do Ac bloqueador de PD-1 sobre a produção de NO e ROS e carga parasitária no baço de cães naturalmente infectados, ainda não foi estudado.

OBJETIVOS

Avaliar o papel da molécula PD-1 sobre a atividade microbicida de leucócitos esplênicos de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e se a IL-17 está envolvida na resposta imune dos cães a *Leishmania* sp.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N. et al. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.13, p. 537-550, 1991.
- AGATA, Y.; KAWASAKI, A.; NISHIMURA, H. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **International Immunology**, v. 8, p. 765–772, 1996.
- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JUNIOR, G. B. S.; FREIRE, C. C. F. et al. Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. **Panamerican Journal Public Health**, v. 26, p. 330-333, 2009.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993-3002, 1999.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M. T.; ALGUERÓ, C. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, p. 275-283, 2010.
- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L.G.; BOSCO, A.M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 6-12, 2013.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-12, 2012.
- BALKHI, M. Y.; MA, Q.; AHMAD, S. et al. R. P. T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. **Cytokine**, v. 71, p. 339-347, 2015.

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

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 121-134, 1998.

CARNEIRO, P. P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M. et al. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-16, 2016.

CAVALCANTI, A. S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L. O. R. et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1-17, 2015.

CHEMNITZ, J. M.; PARRY, R. V.; NICHOLS, K. E. et al. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents t cell activation. **The Journal of Immunology**, v. 173, p.945-954, 2004.

CHIKU, V. M.; SILVA, K. L.; ALMEIDA, B. F. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, p. 879-88, 2016.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M. et al. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1314-1320, 2002.

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. **O Hospital**, v. 48, p. 79-98, 1955.

DESJEUX, P. M. D. Leishmaniasis public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 417-423, 1996.

DOSTÁLOVÁ, A e VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DULGERIAN, L. R.; GARRIDO, V. V.; STEMPIN, C. C. et al. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v. 133, p. 29-40, May 2011.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ESCH, K. J.; JUELGAARD, R.; MARTINEZ, P. A. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **The Journal of Immunology**, v. 191, p. 5542-5550, 2013.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTO, M.C. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- SP, Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 5, p.36-44, 2000.

FORGET, G.; GREGORY, D. J.; WHITCOMBE, L. A. et al. Role of host protein tyrosine phosphatase shp-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 6272-6279, 2006.

FRANGOIS, F.; DJOSSOU, O.; CHOMARAT, P. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 2593–2603, 1996.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1027-1034, 2000.

GÓMEZ, H. Leishmaniasis visceral en las américas - notas sobre el orden cronológico de su descubrimiento y su distribución. División de Salud Pública, Oficina Sanitaria Panamericana, 1951. p. 338-340.

HIRAHARA, K.; GHORESCHI, K.; YANG, X. P. et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. **Immunity**, v. 36, p. 1017-1030, 2012.

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, 144, p.95-115, 2017

ISHIDA, Y.; AGATA, Y.; SHIBAHARA, K. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal (European Molecular Biology Organization)**, v. 11, p.3887-3895, 1992.

JEANNIN, P.; DELNESTE, Y.; LECOANET-HENCHOZ, S. et al. CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, p.15613-15619, 1997.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, p. 527-538, 2014.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 388, p. 621-625, 2009.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C. R.; CHERNOVA, T. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nature Immunology**, v. 2, p. 261-268, 2001.

LIU, D.; UZONNA. E. J. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1-8, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012

MCNAB, F. W.; BERRY, M. P.; GRAHAM, C. M. et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, p. 1941-1947, 2011.

MELO, G. D.; SILVA, J. E.; GRANO, F. G. et al. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 36, p. 726-31, 2014a.

MELO, L. M.; PEROSSO, J.; ALMEIDA, B. F. et al. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK

in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 18, p. 373-378, 2014b.

MIGONE, L. E. Un caso de kala-azar á Asuncion (Paraguay). **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique.**, v. 6, p. 118-120, 1913.

MOREIRA, N. B.; ALMEIDA, A. B. P. F.; PINTO, A. Z. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: dermatological aspects and associated dermatoses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-4, 2016.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Genetics**, v. 8, p. 958-969, 2008.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v.10, p. 301-308, 2008.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon- γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, p. 1015-1026, 2015a.

NASCIMENTO, M. S. L.; ALBUQUERQUE, T. D.; NASCIMENTO, A. F. et al. Impairment of interleukin-17a expression in canine visceral leishmaniosis is correlated with reduced interferon- γ and inducible nitric oxide synthase expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 153, p. 197-205, 2015b.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 378-384, 2007.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D. et al. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania sp.*, *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect

fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia**, v. 17, p. 7-11, 2008.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 293-305, 2005.

OUYANG, W.; KOLLS, J.K.; ZHENG, Y. The biological functions of t helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v.28, p. 454-467, 2008.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO O.; CAPRARIS, D. et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection- γ . **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-7, 2008.

PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, p. 94-102, 2015.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 252-264, 2012.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN, L.; PARDOLL, D. M. et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, p.17765-17770, 2007.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: Determination of Nitric Oxide Production and Anti-leishmanial Activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 181-189, 2000.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, E.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 162, p. 229-235, 1994.

QUIRINO, G. F. S.; NASCIMENTO, M. S.; DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Interleukin-27 (IL-27) mediates susceptibility to visceral leishmaniasis by suppressing the IL-17-neutrophil response. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 2289-2298, 2016.

RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, p. 2948-2952, 2008.

RAO, M.; VALENTINI, D.; DODOO, E. et al. Anti-PD-1/PD-L1 therapy for infectious diseases: learning from the cancer paradigm. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 56, p. 221-228, 2017.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, p. 87-95, 2009.

REINER, N. E.; WINNIE N. G.; TOSCA, M. A. et al. Kinetics of γ interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 4330-4334, 1988.

RODRIGUEZ-CORTES, A.; FERNANDEZ-BELLON, H.; RAMIS, A. et al. *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 190-198, 2007.

RODRIGUEZ-PINTO, D.; SARAIVA, N.; MCMAHON-PRATT, D. CD4 T cell activation by B cells in human *Leishmania (Viannia)* infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 1-13, 2014.

SANCHEZ, M. A.; DIAZ, N. L.; ZERPA, O. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 618-624, 2004.

SANTIAGO, M. E.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R. et al. An investigation of *Leishmania spp.* in *Didelphis spp* from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v. 150, p. 283-290, 2007.

SANTOS-GOMES, G.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, p. 21-30, 2002.

SARAIVA, E. M.; PIMENTA, P. F.; BRODIN, T. N. et al. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. **Parasitology**, v. 111, p. 275-287, 1995.

SHARPE, A. H.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature Immunology**, v. 8, p. 239-245, 2007.

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. Lista de espécies de *Phlebotominae* (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica. **Biota Neotropica**, v. 11, p. 685-704, 2011.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *Leishmania* infection. **Advances in Immunology**, v. 74, p. 275-317, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, p. 1-18, 2009.

TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; KIMBLE, J. et al. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **FASEB Journal**, v. 30, p. 1135-1143, 2016.

TRIPATH, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 229-242, 2007.

VERÇOSA, B. L. A.; MELO M. N.; PEURTOA, H. L. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 189, p. 162-170, 2012.

WANG, S.; CHEN. L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. **Microbes and Infection**, v.6, p. 759-766, 2004.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, p. 644-645, 2010.

WHO Technical Report series 949, "**Control of leishmaniasis**". Geneva. II World Health Organization III, p. 2 - 3, 2010.

WHO. Global Health Observatory (GHO) data. **Leishmaniasis: situation and trends** 2017a. Disponível em:

http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/ Acesso em: 01 mar. 2018.

WHO. Leishmaniasis. 2017b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> - Acesso 01 mar. 2018.

WHO. Leishmaniasis: Epidemiology- Epidemiological situation. 2017c. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/burden/en/ - Acesso em: 10 jan. 2018.

WHO. Leishmaniasis: Diagnosis, detection and surveillance 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/> - Acesso em: 24 jan. 2018

WHO. Leishmaniasis: The Disease - Clinical forms of the disease 2016a. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/> - Acesso em: 28 fev. 2018.

YAMAZAKI, T.; AKIBA, H.; IWAI, H. et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 5538-5545, 2002.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 - PD-1 REGULATES THE SPLEEN LEUKOCYTES MICROBICIDE ACTIVITY IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS.

Summary - Leishmaniasis is an immunosuppressive disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* for which dogs are the domestic reservoir. The programmed cell death 1 molecule (PD-1) is highly expressed in leukocyte cells of dogs with visceral leishmaniasis, and it promotes T lymphocyte exhaustion and suppression of cytokine secretion. Because PD-1 has a suppressive function regarding cell immunity, we evaluated the effect of PD-1 blocking antibodies on NO, ROS and interleukin 17 (IL-17) production and on parasite load in spleen leukocyte cultures from naturally infected dogs. *In vitro*, PD-1 blocking promoted increased levels of intracellular NO and Nitrite and reduced the levels of IL-17 in the culture supernatant, in addition to reducing the parasite load, but do not change ROS levels . We conclude that PD-1 participates in regulation of the immune response and that the blocking antibody is effective in restoring host microbicidal activity. This can be investigated in an immuno-therapeutic study in the future.

Keywords: Spleen leukocytes, Cytokines, Protozoa, CD279.

1 INTRODUCTION

Visceral leishmaniasis is a neglected disease, with an estimated 50,000 to 90,000 new cases per year worldwide, and it can be lethal in 95% of human cases when untreated (1). It affects 350 million people (2), but 90% of the cases have been reported in only seven countries: Brazil, Ethiopia, India, Kenya, Somalia, Sudan and South Sudan (1). Dogs have an important role in the disease transmission cycle as the main reservoirs of *Leishmania (L.) infantum* (3) because they present high parasite loading the skin, thereby facilitating transmission to the vector (3,4).

Dogs' susceptibility to disease is associated with changes to the host's immune response, such as an increased non-effective humoral response and decreased T lymphocyte levels (5). Spleen and peripheral blood of dogs with symptomatic VL have high levels of T lymphocyte apoptosis (6), which consequently affects production of cytokines and activation of the macrophages responsible for phagocytosis of the parasite (5).

In canine visceral leishmaniasis, the spleen is one of the organs most affected during infection, along with the skin and the bone marrow (7). The spleen concentrates high parasitism and, consequently, presents significant morphological changes such as hypertrophy and hyperplasia of the red pulp, with infiltration of mononuclear and plasma cells (7). The white pulp of the spleen presents macrophage replacement by lymphocytes due to hypertrophy and hyperplasia of this region (8). The spleen is the place where the response to the parasite will be set up and where the process of cell activation will occur, if this occurs (9).

The programmed cell death 1 molecule (PD-1) is a costimulatory molecule with negative function (10) that is highly expressed during chronic infections (11). Increased expression of the PD-1 molecule has been observed in T and B lymphocytes and in F4/80 cells of peripheral blood and the spleen (12), and this can suppress the effector function of CD8⁺ and CD4⁺ T cells in the blood of dogs with VL, through decreasing proliferative capacity and secretion of cytokines (13).

In a recent study, our research group observed increased levels of NO and TNF- α and reduced parasite load after PD-1 blockade with monoclonal antibodies in peripheral blood mononuclear cells from naturally infected VL dogs (12). PD-1 blockade also promoted increased superoxide production, thus resulting in parasite load control in adherent monocytes of dogs with *L. infantum* (13). However, NO and ROS production and the parasite load in the spleen leukocytes of dogs infected with VL, after PD-1 blocking with monoclonal antibodies, has not been studied yet. Additionally, it has been observed that interleukin 17 (IL-17) is a mediator of inflammatory reactions in canine VL (14), however, there is not studies between IL-17 and parasite loading in the spleen of dogs naturally infected with *L. infantum*, after PD-1 blocking with monoclonal antibodies.

Thus, our aim here was to investigate whether PD-1 blocking alters the intracellular concentration of NO, ROS and IL-17 in culture supernatants and the parasite load of spleen leukocytes from dogs that are naturally infected with *L. infantum*.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Ethics Committee

This experiment was carried out in accordance with the ethical principles for use of animals, as specified by the Animal Experimentation Ethics Committee of Universidade Estadual Paulista (protocol FOA-00977-2016).

2.2 Animals

For the infected group, 15 adult dogs with VL, of both sexes, between 2 and 5 years old and of various breeds and weights, were selected from the Zoonosis Control Center of Araçatuba, state of São Paulo (CCZA). These dogs had been found to be seropositive for *L. infantum* antigen through testing using the indirect ELISA test as described by Lima et al., 2003 (15), and using real-time PCR as described by Ranasinghe et al., 2008 (16). All the dogs were symptomatic and presented at least three clinical signs of VL such as

onychogryphosis, lymphadenopathy, cachexia, alopecia, skin and periocular injuries. These dogs with VL showed moderate-stage disease (level II) and had been classified based on a physical examination, biochemical examination and on their levels of anti-*Leishmania* antibodies determined through the indirect ELISA, as proposed by Solano-Gallego et al., 2009 (17).

For the control group, 5 healthy dogs of different breed and weights that were seronegative for *L. infantum* through the indirect ELISA test as described by Lima et al., 2003 (15), and through real-time PCR as described by Ranasinghe et al., 2008 (16), were selected. The owners of these dogs signed an informed consent form for the procedure to be carried out. All of these animals presented a blood count and biochemical examination within the reference values for the species.

2.3 Sample collection

The dogs in the infected group were euthanized by means of intravenous barbiturate anesthesia (thiopental, Cristália Itapira, SP, Brazil) followed by infusion of potassium chloride 19,1%, in accordance with directives from the Brazilian Ministry of Health, and in line with recommendations from the Federal Council of Veterinary Medicine. After euthanasia, blood samples (10 ml) were collected by intracardiac puncture and were stored in a tube without anticoagulant to obtain serum for biochemical examination and determination of anti-*Leishmania* antibody levels using ELISA. Spleen fragments were collected and maintained at 4°C in RPMI-1640 cell culture medium (Sigma®, USA), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 0.03% L-glutamine, 100 IU/ml of penicillin and 100 mg/ml of streptomycin (complete RPMI), until processing and performing the assays.

Blood samples (3 ml) from the control group dogs were collected by jugular vein puncture and were stored in tubes with anticoagulant (EDTA) to perform a blood count and in tubes without anticoagulant to obtain serum for biochemical examination and detection of anti-*Leishmania* antibody levels using ELISA. A spleen fragment was obtained by means of surgical excision, using a

protocol described previously by Lima et al., 2012 (6), and this was kept at 4 °C in complete RPMI medium, until processing and performing the assays.

2.4 Obtaining spleen leukocytes

Total spleen leukocyte counts were obtained through maceration of a fragment of size 2cm³, which was added to 10ml of complete RPMI medium. This suspension was processed with 5 ml of red blood cell lysis buffer containing 7.46g/L of ammonium chloride (NH₄ClO₃), at 4°C for 8 minutes, and was then centrifuged at 805g for 5 minutes and washed with phosphate-buffered saline at pH 7.2 three times. After removal of cell debris by means of a 100µm filter (BD Falcon™ cell strainer, USA), the spleen leukocytes were used for culturing.

Material from 13 infected dogs was used to determine PD-1 levels by means of flow cytometry. The cells were processed immediately after their separation and the remainder was used for culturing.

2.5 Spleen leukocyte culturing

5x10⁵ spleen leukocyte cells from infected and healthy dogs were suspended in complete RPMI medium and dispensed into 24-well plates (Costar®), in duplicate, in the following order: only spleen leukocytes; spleen leukocytes and phytohemagglutinin (PHA; 1% final volume); spleen leukocytes and 20µg of protein/ml of soluble *Leishmania infantum* antigen (SLA) (MHOM/BR/00/MERO2); spleen leukocytes and 20µg of protein/ml of SLA from *Leishmania infantum* (MHOM/BR/00/MERO2) in the presence of 5mg/ml of blocking monoclonal antibody against PD-1 (anti-human CD279, eBioscience Inc, San Diego, CA, USA) (the PD-1 protein shows a high degree of homology between the canine and human species (18)); spleen leukocytes and 20µg of protein/ml of SLA (MHOM/BR/00/MERO2) in the presence of 5µg/ml of isotype; and spleen leukocytes with 10µM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). These were incubated at 37 °C, in the presence of 5% CO₂.

SLA was produced in accordance with the protocol described by Almeida et al., 2017 (19). Cultures were maintained at 37 °C in a cell culturing oven, in the presence of 5% CO₂, for 18 hours, for NO and ROS analyses by means of flow cytometry; and for 72 hours to evaluate the parasite load by optical microscopy and to collect the supernatant for IL-17 and Nitrite evaluation. The culture supernatant collected after 72 hours was stored at -80 °C for IL-17 concentration by means of capture ELISA and Nitrite by Griess method.

2.6 Determination of PD-1 levels

Spleen leukocytes from 13 infected dogs and 5 uninfected dogs were used for labeling with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies. The cells were suspended in phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin, 0.1% azide and 20% fetal bovine serum to block Fc receptors (FcRs). They were then incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies (anti-human CD279, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) for 30 minutes at 4 °C, washed twice with phosphate-buffered saline containing 2% fetal bovine serum, and then stored at 4 °C in the dark until data acquisition by means of flow cytometry (BD Accuri™ C5 Flow Cytometer, San Diego, CA, USA) and analysis using the BD Accuri™ C6 software (version 1.0.264.21), to quantify PD-1 expression. Ten thousand cells were analyzed; "cellular debris" was excluded; and PD-1 was expressed in terms of percentages (%). A control isotype (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) was used to delineate the negative populations of phycoerythrin (PE)-labeled cells.

2.7 NO and Nitrite determination

To determine the levels of intracellular NO, cultured cells were centrifuged at 805g for 5 minutes, resuspended in a minimal volume of phosphate-buffered saline and stained with DAF-2DA (2µM) (Invitrogen-Leiden Molecular Probes, Netherlands) for 30 minutes. Incubation was performed at 37°C in the presence of 5% CO₂. Fluorescence was evaluated using a flow cytometer (BD Accuri™ C5). Unlabeled samples were used as a negative

control to delimit the negative populations of the samples analyzed, and FITC fluorescence (FL1) was measured in log format and was expressed in terms of the median. Acquisition data was carried out using 40,000 closed events. Data analysis was performed using the BD Accuri™ C6 software (version 1.0.264; BD Bioscience, CA, USA).

Nitrite determination

The Nitrite (NO₂) levels were measured using the Griess method (11) in the supernatants of spleen cell culture after 72 hours. For this measurement, 50 µL of culture supernatant was added to 50µL of Griess reagent (one part 0.1% NEEDED and one part sulfanilamide 1% phosphoric acid, H₃PO₄). After 5 min of incubation at room temperature, the optical density at 540nm was obtained using a 96-well plate reader (Spectra Count, Packard Bio Science Company, Meriden, CT, USA). The concentration of nitrite was obtained after comparison with the sodium nitrite standard curve, ranging from 3 to 200µM.

2.8 ROS determination

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 10µM) was added to the culture wells 30 minutes before ROS analysis and was incubated at 37 °C in the presence of 5% CO₂, for use as a positive control. To determine the ROS levels, cultured cells were centrifuged (805g for 5 minutes), resuspended in a minimal volume of phosphate-buffered saline and stained with 10µM of H₂DCFDA (Invitrogen-Leiden Molecular Probes, Netherlands) for 30 minutes. Incubation was performed at 37°C in the presence of 5% CO₂. Fluorescence was evaluated using a flow cytometer (BD Accuri™ C5). Unlabeled samples were used as a negative control to delimit the negative populations of the samples analyzed, and FITC fluorescence (FL1) was measured in log format and expressed in terms of the median. Acquisition data was carried out using 40,000 closed events. Data analysis was performed using the BD Accuri™ C6 software (Version 1.0.264; BD Biosciences, CA, USA).

2.9 IL-17 concentration

The IL-17 levels were evaluated in the spleen leukocyte culture supernatant using the DuoSet® capture ELISA kit (R&D Systems®, Minneapolis, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The optical density at 450nm was obtained in a 96-well plate reader (Spectra Count, Packard Bio Science Company, Meriden, CT, USA).

2.10 Parasite load

For parasite load analysis using optical microscopy (Eclipse E800, Nikon, Tokyo, JP), after 72 hours, cultures were cytocentrifuged (Microprocessed Cytological Centrifuge, 2000 D, REVAN, Chientec) at 201g for 5 minutes at room temperature. From this material, thin layer were produced, and these were stained using a commercial hematological staining (Panótico Rápido 3X500ML, Laborclin), to count parasites under infected macrophages. Fifty to one hundred infected macrophages from each treatment were counted. The infection rate of each treatment was calculated by dividing the number of amastigotes by the number of infected macrophages.

2.11 Statistical analysis

PD-1 expression was analyzed by means of the Mann-Whitney nonparametric test. The NO and ROS were analyzed by means of the Dunn's multiple comparison test. The NO₂ and parasite load were analyzed by Dunnett's multiple comparison test. For IL-17, was used nonparametric Dunn's multiple comparison test when paired and when not paired, the Mann-Whitney test was used. The statistical analyses were performed and graphs were produced using the GraphPad Prism® 6 software (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Results were considered significant when $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 PD-1 expression

Initially, we sought to evaluate whether VL infection modulates the expression of PD-1 in spleen leukocytes from the dogs in the infected group

and the uninfected (control) group. The expression of PD-1 in spleen leukocytes from the dogs in the infected group was higher than that of the dogs in the control group (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

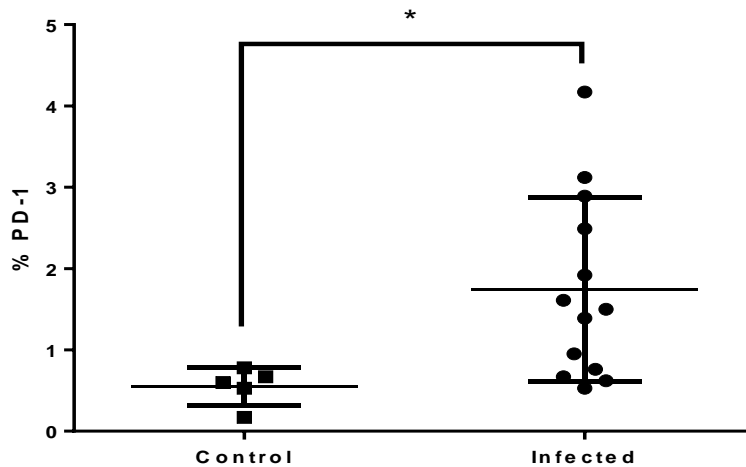
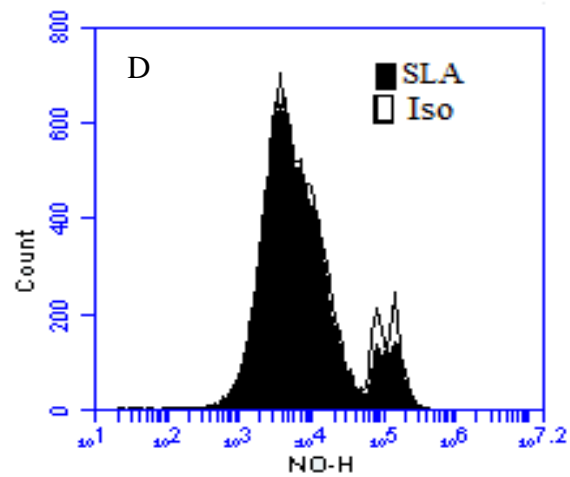
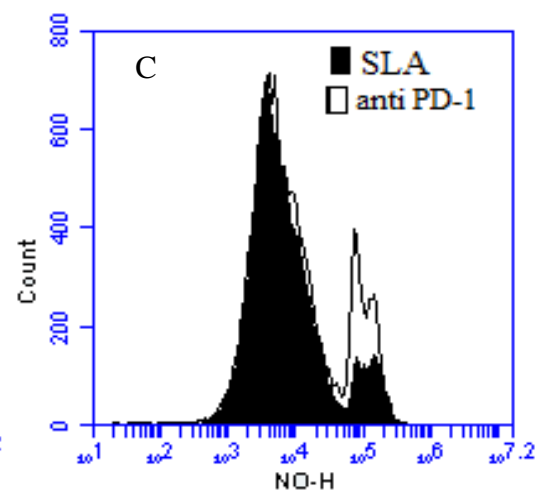
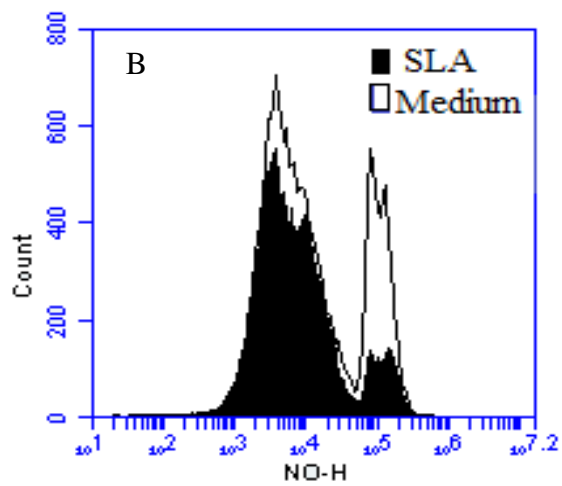
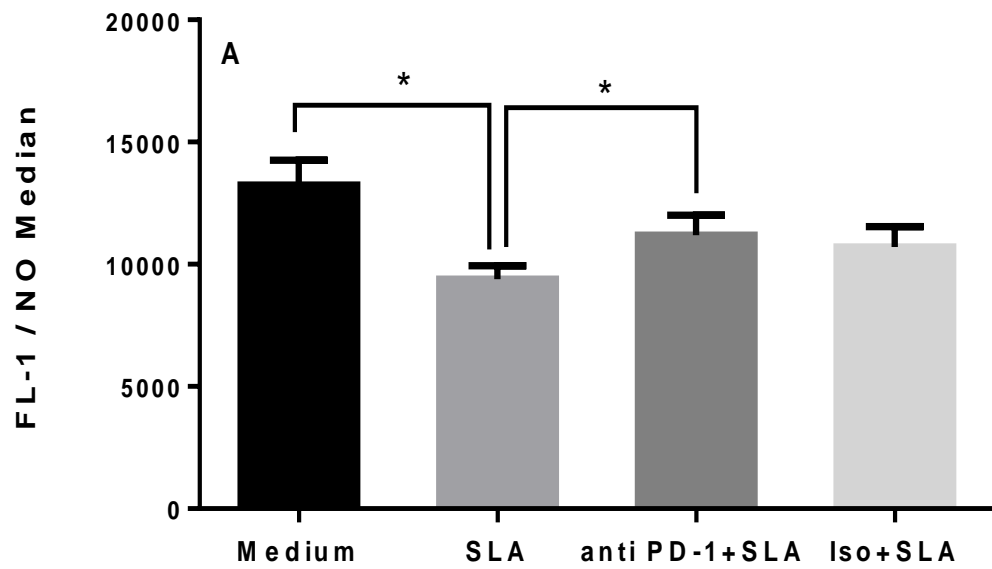


Fig. 1. PD-1 expression in spleen leukocytes from dogs in the control group ($n = 5$) and infected group ($n = 13$). The data are represented using means and standard deviations; * $p < 0.05$ from the Mann-Whitney test.

3.2 NO, Nitrite and ROS determination

According to the figure 1, PD-1 was expressed more in the spleen leukocytes of VL-infected dogs than in those of uninfected dogs. According to the literature, PD-1 expression may exert a regulatory effect on the production of NO, IFN- γ and proliferation of CD4 + T lymphocytes (12). Therefore, we performed the blockade of PD-1 with monoclonal Ab in spleen leukocytes cultured in vitro to evaluate the effect of blockade on the intracellular concentration of NO (Figure 2A, B, C e D), Nitrite (Figure 2E) and ROS (Figure 2F). Cultures of spleen leukocytes re-stimulated with SLA showed lower levels of NO (Dunn's, $p < 0.05$) and Nitrite (Dunn's, $p < 0.05$) than did cultures containing spleen leukocytes alone (medium). NO and Nitrite levels were higher in spleen leukocytes re-stimulated with SLA in the presence of PD-1 blocking monoclonal Ab (Figure 2 A and E, $p < 0.05$ Dunn's and Dunn's, respectively), but the ROS levels, did not change (Figure 2F Dunn's test, $p > 0.05$). In comparing NO and ROS concentrations between the dogs in the control and

infected groups, there was no difference regarding NO, but ROS levels were higher in cultures from the infected group (data not shown).



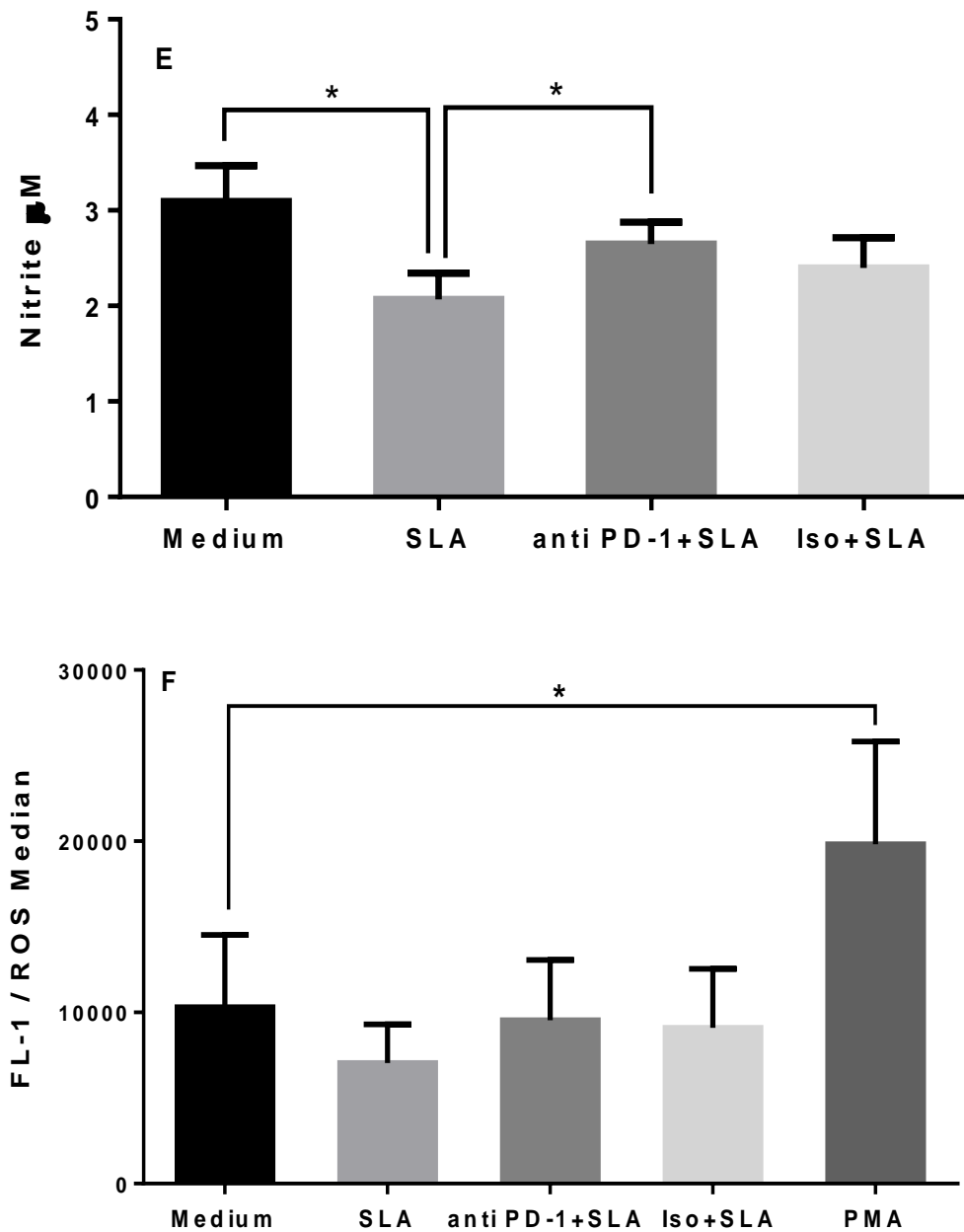


Fig. 2.: Concentrations of NO (A, B, C and D), Nitrite (E) and ROS (F) in spleen leukocytes cultures from dogs of infected group. A, B, C, D and F was obtained through flow cytometry analysis and E through Griess method. Representative histogram of NO concentration, in spleen leukocytes cultures from dogs in the infected group obtained through flow cytometry analysis (B, C and D). Cultures containing spleen leukocytes alone (Medium); spleen leukocytes re-stimulated with soluble *Leishmania spp.* antigen (SLA); spleen leukocytes re-stimulated

with SLA and treated with PD-1 blocking monoclonal antibodies (anti PD-1+SLA); spleen leukocytes re-stimulated with SLA and with isotype control (Iso+SLA); and spleen leukocytes with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Fifteen naturally infected dogs were evaluated. The graph results are presented as the mean and standard error of the mean. Dunn's test (A) and (F); Dunnet's test (E), * $p < 0.05$.

3.3 IL-17 in culture supernatant

Although no studies on the role of IL-17 after PD-1 blocking had been conducted, it was already known that PD-L1/PD-1 signaling participated in IL-17 production (20). Therefore, we investigated IL-17 in spleen leukocyte supernatant cultures from dogs in the infected and control groups, with and without PD-1 blocking monoclonal antibodies. IL-17 levels were higher in supernatant from spleen leukocytes in the infected group (INF) than in the control group (CT) (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Therefore, the SLA stimulation in the spleen leukocytes of the infected dogs decrease the IL-17 levels (Dunn's test, $p < 0.05$) and spleen leukocytes treated with PD-1 blocking antibodies promoted reductions in IL-17 levels too (Dunn's test, $p < 0.05$).

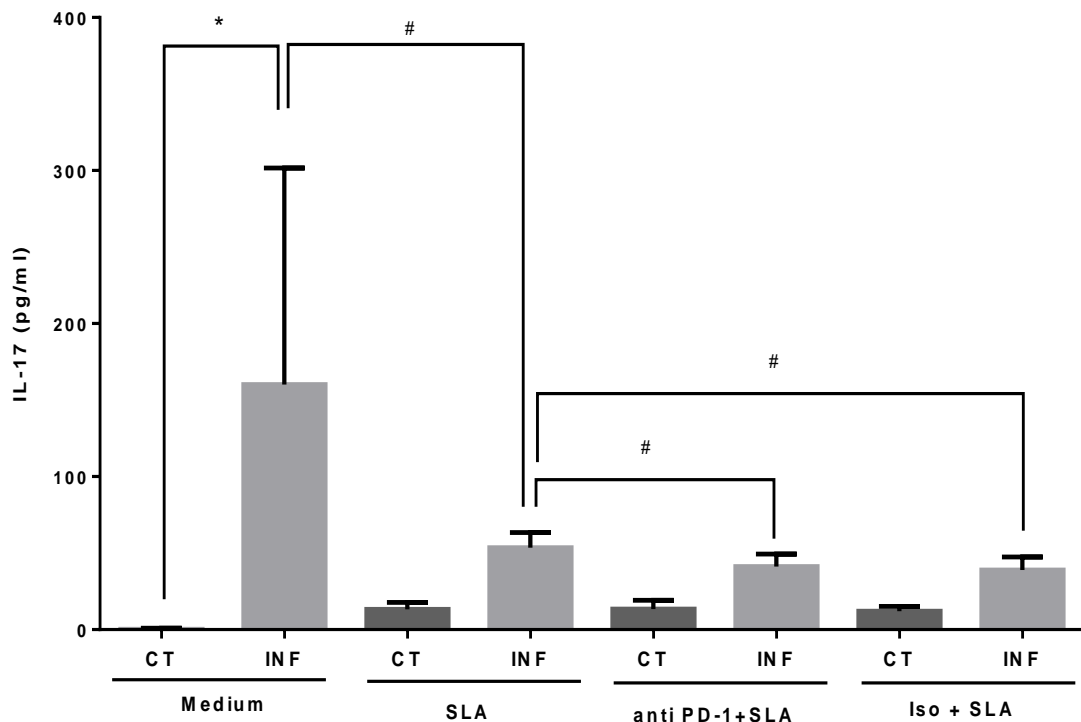


Fig. 3. IL-17 concentrations in the culture supernatant of spleen leukocytes from dogs in the control group (CT) (n = 4) and dogs in the infected group (INF) (n = 14), after 72 hours. Cultures containing spleen leukocytes alone (Medium); spleen leukocytes re-stimulated with soluble *Leishmania spp.* antigen (SLA); spleen leukocytes re-stimulated with SLA and treated with PD-1 blocking monoclonal antibodies (anti PD-1 + SLA); and spleen leukocytes re-stimulated with SLA and with isotype control (Iso + SLA). The graph presents the mean and standard error of the mean. *Mann-Whitney test $p < 0.05$; #Dunn's test $p < 0.05$.

3.4 Parasite load after PD-1 blocking

Reduction of the parasite load after PD-1 blocking had already been observed in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with VL (13). Therefore, we investigated the effect of PD-1 blocking antibodies on the parasite load of spleen leukocyte cultures from dogs in the infected group. We observed that the parasite load decreased after PD-1 blocking in the spleen leukocytes re-stimulated with SLA (Dunnet's, $p < 0.05$).

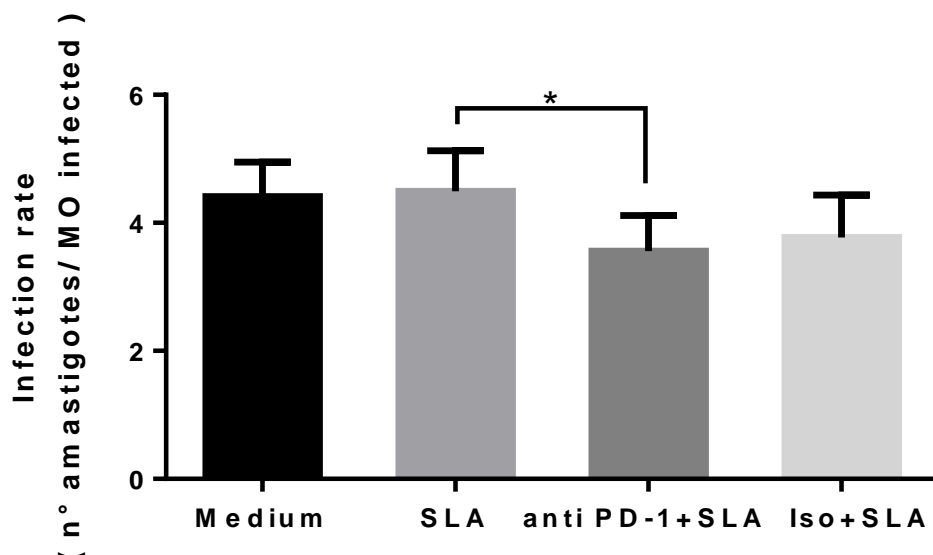


Fig. 4. Parasite load determined via light microscopy (n = 15) in spleen leukocyte cultures from dogs in the infected group, after 72 hours. Cultures containing spleen leukocytes alone (Medium); spleen leukocytes re-stimulated with soluble *Leishmania spp.* antigen (SLA); spleen leukocytes re-stimulated

with SLA and treated with PD-1 blocking monoclonal antibodies (anti PD-1+ SLA); and spleen leukocytes re-stimulated with SLA and with isotype control (Iso + SLA). The graphs show means and standard deviations. *Dunnett's test $p < 0.05$.

4 DISCUSSION AND CONCLUSION

Our results showed that PD-1 expression was higher in spleen leukocytes from dogs in the infected group. PD-1 blocking monoclonal antibodies promoted higher NO and lower IL-17 levels and parasite load, but did not change de ROS levels.

While we observed increased PD-1 expression in spleen leukocytes from dogs in the infected group, similar results were also seen in peripheral blood mononuclear cells from dogs with symptomatic VL (13) and in CD3⁺ and CD21⁺ B lymphocytes and F4/80 cells of the peripheral blood and spleen of dogs with VL (12). Together, these results confirm the role of PD-1 in the immune response of dogs with VL.

In our study, PD-1 blocking monoclonal antibodies in spleen leukocyte cultures promoted increased intracellular and extracellular NO concentration, similar to what was observed in the supernatant of peripheral blood mononuclear cells from dogs with VL after addition of blocking monoclonal antibodies against PD-1 (12). This confirms that the signal transduction pathway triggered by PD-1 is related to NO production. On the other hand, PD-1 blocking in spleen leukocytes from healthy dogs did not increase the NO concentration, possibly due to the low expression of PD-1 in this group.

The increase of ROS levels in spleen leukocytes from dogs with VL in our study, was similar to that found in peripheral blood mononuclear cells from infected dogs in comparison with uninfected dogs (21). However, we did not observe difference between spleen leukocytes re-stimulated with SLA and anti PD-1 treatments, different that was observed in peripheral blood mononuclear cells from dogs infected with *L. infantum*, after PD-L1 blocking (13), it is possibly because the different molecule observed in our study.

We also observed an increase in IL-17 concentration in the spleen leukocyte culture supernatant of the infected group. This was similar to observed in the spleen leukocyte culture supernatant from mice that had been experimentally infected by *L. infantum* (22) and in the serum from visceral leishmaniasis patients (23) it confirms that this cytokine has a role in the immune response in cases of visceral leishmaniasis.

Presence of PD-1 blocking monoclonal antibodies in spleen leukocytes re-stimulated from SLA, from dogs in the infected group, resulted in a decrease in IL-17 levels, in comparison with spleen leukocytes re-stimulated with SLA that had not been treated with PD-1 blocking monoclonal antibodies, suggesting that PD-1 participates of pathway signaling to induce IL-17 in spleen leukocytes from dogs with visceral leishmaniasis.

IL-17 reduction after PD-1 blocking suggests that PD-1 regulates the cytokines produced. In fact, increased production of TNF- α (12) and IFN- γ (13) consequent to PD-1 blocking had already been reported in peripheral blood monocyte cultures from symptomatic dogs with leishmaniasis. The reduction of IL-17 levels after restoration of immune competence suggesting IL-17 can be related to the susceptibility of dogs toward VL. In fact, was reported, previously, that IL-17 plays inhibitory function and impair the effectiveness of monocytes resulting in a growth and/or killing parasite regulation in liver of *L. donovani* infected mice (24) and IL-17 knockout mice presented lower parasite loads in the liver and spleen, thus conferring greater resistance to *L. donovani* infection than that of normal mice (25).

We observed a parasite load decrease in spleen leukocyte culture re-stimulated with SLA, after use of PD-1 blocking antibodies, compared with spleen leukocytes that were only re-stimulated with SLA. This was similar to what was observed in peripheral blood mononuclear cells from dogs infected with *L. infantum*, after blocking of PD-L1 (13) and PD-1 (12) with monoclonal antibodies. Thus, our results suggest that PD-1 exerts a regulatory effect on spleen leukocytes during the immune response in cases of canine VL.

We conclude that PD-1 regulates the spleen leukocytes microbicide activity and IL-17 in visceral canine leishmaniasis impairs the host's immune

response. Therefore, PD-1 blocking monoclonal antibodies may be a tool for disease control.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank to the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Proc. Number: 400063/2016-6) for financial support and the laboratory technique Flávia Mari Yamamoto for the assistance offered during the experiment.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS:

LVM conceived and designed the study, while VGL, ILTS, FBSC, BJP, MLM, CSF, EFR and SPSP collected and processed the samples. All authors shared in interpreting the data and reviewing the manuscript, and all of them approved the final manuscript. RGT and LVM are guarantors of the paper

REFERENCES

1. World Health Organization. Leishmaniasis. WHO 2017; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
2. World Health Organization, WHO. Leishmaniasis, Geneva. Technical Report Series Control of the Leishmaniasis. IIWorld Heal Organ IIISeries ISBN 2010;978:22–6.
3. Solano-Gallego L, Fernández-Bellón H, Morell P, et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. J Comp Pathol 2004;130:7–12.
4. Borja LS, Sousa OMF, Solcà MS, et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. Vet Parasitol 2016;229:110–117.

5. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2006;28: 329–337.
6. Lima VMF, Fattori KR, De Souza F, et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 2012;184:147–153.
7. Santos FR, Vieira PMA, Correa-Oliveira R, et al. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Parasitol Res* 2011;108:1397–1403.
8. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2009;128:87–95.
9. Maia C, Campino L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. *J Trop Med* 2012;2012:1–7.
10. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, et al. The function of Programmed Cell Death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;8:239–45.
11. Dulgerian LR, Garrido V V, Stempin CC, Cerbán FM. Programmed Death Ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology* 2011;133:29–40.
12. Chiku VM, Silva KLO, de Almeida BFM, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. *Immunobiology* 2016;221:879–888 .

13. Esch KJ, Juelsingard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed Death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. *J Immunol* 2013;191:5542–5550.
14. Nascimento MSL, Albuquerque TDR, Nascimento AFS, et al. Impairment of Interleukin-17A expression in canine visceral leishmaniasis is correlated with reduced Interferon- γ and inducible nitric oxide synthase expression. *J Comp Pathol* 2015;153:197–205.
15. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res* 2003;36:485–9.
16. Ranasinghe S, Rogers ME, Hamilton JGC, Bates PA, Maingon RDC. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102:875–82.
17. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;165:1–18.
18. Folkl A, Wen X, Kuczynski E, Clark ME, Bienzle D. Feline Programmed Death and its ligand: Characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;134:107–14.
19. Almeida BFM de, Silva KLO, Chiku VM, et al. The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with

- visceral leishmaniasis. *Immunobiology* 2017;222:693–703.
20. Hirahara K, Ghoreschi K, Yang XP, et al. Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1. *Immunity* 2012;36:1017–30.
 21. Melo LM, Perosso J, Almeida BFM, Silva KLO, Somenzari MA, Lima VMF. International immunopharmacology effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. *Int Immunopharmacol* 2014;18:373–8.
 22. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon- γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. *J Infect Dis* 2015;211:1015–26.
 23. Elshafie AI, Åhlin E, Håkansson LD, et al. Activity and turnover of eosinophil and neutrophil granulocytes are altered in visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2011;41: 463–469.
 24. Sheel M, Beattie L, Frame TCM, et al. IL-17A-producing $\delta\gamma$ T cells suppress early control of parasite growth by monocytes in the liver. *J Immunol* 2015; 195:5707-5717.
 25. Terrazas C, Varikuti S, Kimble J, Moretti E, Boyaka PN, Satoskar AR. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. *FASEB J* 2016;30:1135–43.