

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

**CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM
CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E
ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.**

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Enfermeira

Araçatuba - SP

2012

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

**CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM
CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E
ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.**

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Félix de Lima

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

Araçatuba - SP

2012

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

Si381C	Silva, Kathlenn Liezbeth Oliveira CD95 (FAS) eCD178 (FASL) induzem apoptose em células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e esplênicas em cães naturalmente infectados por <i>Leishmania</i> spp /. Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva. Araçatuba: [s.n], 2012 56 f. il.; CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012 Orientador: Prof^a Adj. Valéria Marçal Félix de Lima 1. Fas-Proteína Associada ao Domínio de Morte (FAS), 2. Fas-Proteína Ligante (FASL), 3. <i>Leishmania chagasi</i>, 4. Leishmanioses, 5. Morte Celular, 6. Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (TRAIL) CDD 616.9364
--------	---



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



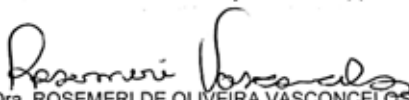
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Cd95 (FAS) e CD178 (FASL) induzem apoptose em células CD4+ e CD8+ do sangue
periférico e esplênicas em cães naturalmente infectados por Leishmania spp.

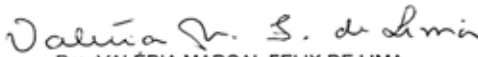
AUTORA: KATHLENN LIEZBETH DE OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADORA: Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

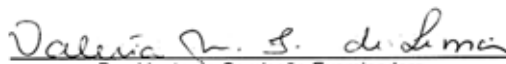
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS


Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ


Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

DATA DA REALIZAÇÃO: 6 de dezembro de 2012.


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

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 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 e estágio extracurricular no COB – Centro de Oncologia Bucal - Unidade Auxiliar da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia – Campus de Araçatuba. 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.” o qual faz parte desta dissertação.

EPÍGRAFE

Porque sempre acreditei que...

“As veredas do Senhor são todas de amor e verdade!”

Salmos 25:10

"Foi o tempo que dedicastes a tua rosa que a fez tão importante."

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

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

Ao meu esposo Pedro Luis por ser meu porto seguro e meus 3 filhos, meu filhão Gu, minha linda Priprika, meu inteligente Juju 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.

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 que mesmo em minhas ausências me entenderam, apoiaram e sem o apoio deles não haveria objetivo a ser alcançado, os amo de todo coração.

A minha mãe que todos os dias me oferece uma benção de Deus e aos meus irmãos Kaira Jeanine e Jaques Quinslei pela paciência e incentivos.

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 me incentivando a querer aprender mais, por toda 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. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos Eliane de Lucca, Flávio Correa com sua mãe Ivalnete Leal 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 Juliana Perosso, que me ajudou nas horas de muito trabalho com toda atenção e que por muitas vezes cuidou de mim, tendo se tornado uma irmãzinha.

Ao profº Elerson Gaetti Jardim por sua amizade e atenção nas horas em que precisei e pelas oportunidades de auxílio em suas pesquisas contribuindo muito para minha formação.

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.

As pós-graduandas Mariana Macedo, Larissa Melo e Letícia Sanches, mestrandas competentes e companheiras de trabalho e de viagens a trabalho.

Aos companheiros de pesquisas do Laboratório de Imuno-histoquímica, ao Guilherme Dias de Melo pelas vezes em que me auxiliou em algumas dúvidas, ao José Eduardo pela atenção oferecida a mim quando necessária, a Fernanda Grecco e ao Augusto Schweigert, pela alegre companhia.

Aos colegas do Laboratório de Ornitopatologia, Prof. Marcelo, Camila Homem, Alex Nakamura, Delvânia e Milena Sato.

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

A minha banca de qualificação, Prof^a Cáris Maroni Nunes e Prof^a Gisele Fabrino Machado pelas relevantes sugestões dadas ao meu trabalho.

Aos cães do Centro de Controle de Zoonoses que eutanasiados, vítimas da leishmaniose visceral participaram da minha pesquisa, contribuindo para um maior conhecimento a respeito dessa patologia.

Aos funcionários Ocilaine e ao Moisés e ao veterinário Saulo Avanço, do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba pela oportunidade e atenção tão pacientemente dispensadas a mim.

A minha banca de defesa de dissertação de mestrado, prof.^a e orientadora Valéria Marçal Félix de Lima, prof.^a Juliana Regina Peiró e Rosemeire de Oliveira Vasconcelos, obrigada pelas considerações que levaram a melhora do meu trabalho.

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

À FAPESP pelo apoio financeiro (processos 2011/02321-3, 2011/06214-7).

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	13
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
OBJETIVOS.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2.....	32
RESUMO.....	32
CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>LEISHMANIA</i> SPP.	35
1 – INTRODUÇÃO.....	35
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 - Aprovação do Comitê de Ética.....	38
2.2 – Triagem dos animais.....	38
2.3 - Colheita das amostras.....	39
2.4 – Obtenção de células mononucleares de sangue periférico e de leucócitos do baço.....	39
2.5 – Avaliação da apoptose em células CD4 e CD8.....	40
2.6 – Expressão de FAS, FASL e TRAIL.....	41
2.7 – Bloqueio funcional dos receptores FAS/FASL.....	41
2.8 – Análise estatística.....	42
3 – RESULTADOS.....	43
3.1 – Apoptose nas células CD4+ e CD8+ do sangue e baço de cães com leishmaniose visceral.....	43
3.2 – Expressão dos receptores FAS (CD95), FASL (CD178) e TRAIL (CD253) nas células CD4+ e CD8+.....	45
3.3 – Bloqueio dos receptores FAS e FASL.....	48
4 – DISCUSSÃO.....	50
5 – CONCLUSÃO.....	53
6 – REFERÊNCIAS.....	54

CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.

RESUMO - A Leishmaniose Visceral (LV) é uma antroponose considerada uma das mais importantes zoonoses parasitárias emergentes em expansão por todo o mundo. A transmissão de *Leishmania (L.) chagasi*, se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros, denominados flebotômíneos, conhecidos popularmente como mosquitos “palha” ou “birigui”. A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, fatal, sistêmica e infecciosa. No Brasil é causada pelo protozoário *L. chagasi*. Cães são os maiores hospedeiros e reservatórios do parasita *L. infantum* e *L. chagasi* com um papel central no ciclo da transmissão do parasita para os humanos, com um grande contingente de animais assintomáticos. A infecção em cães é clinicamente semelhante à infecção humana e a apoptose tem sido associada à redução de linfócitos T e células mononucleares de sangue periférico e à falha na imunidade, pois ocorre diminuição na secreção do IFN- γ . A desregulação da apoptose tem sido associada a várias doenças e as principais moléculas implicadas são o sistema FAS/FASL e o TRAIL, que envolvem reações imunológicas e citotoxicidade mediada pelas células T. O entendimento de tal mecanismo em cães infectados pode permitir futuras intervenções terapêuticas para reduzir a depleção dos linfócitos. Para investigar a apoptose nas células CD4+ e CD8+ e a expressão e função dos principais receptores envolvidos no processo apoptótico, FAS/FASL e TRAIL foram avaliados nas células do sangue periférico e baço de 38 cães sintomáticos com leishmaniose visceral moderada e de 25 cães saudáveis. A apoptose das células CD4+ e CD8+ do sangue e baço foi maior nos cães infectados que nos saudáveis. Nas células CD4+ do sangue e baço dos cães infectados a expressão de FAS e FASL foi menor do que a dos saudáveis, nas células CD8+ do sangue e do baço dos cães infectados a expressão de FAS aumentou enquanto de FASL diminuiu comparado ao observado nos cães saudáveis. O receptor TRAIL aumentou somente nas células CD8+ do baço dos cães infectados. A apoptose observada nas células CD4+ do sangue e do baço diminuiu na presença dos anticorpos bloqueadores para FAS e FASL. A redução da apoptose nas células CD8+ pela presença dos anticorpos bloqueadores foi somente observada no baço. Nossos dados mostram que a apoptose das células CD4+ e CD8+ é um mecanismo que está envolvido no processo infeccioso dos cães por *Leishmania* spp. com a participação das moléculas FAS e FASL e TRAIL. Os presentes resultados contribuem para o entendimento da resposta imune em cães infectados com *L. chagasi* e permitem futuras intervenções terapêuticas para reduzir a depleção dos linfócitos.

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

CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce apoptosis in cells CD4+ and CD8+ peripheral blood and spleen in dogs naturally infected by *Leishmania* spp.

SUMMARY - Visceral leishmaniasis (VL) is a anthropozoonosis considered one of the most important emerging parasitic zoonoses expanding worldwide. The transmission of *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, occurs through the bite of female insects flies, called sandflies, mosquitoes popularly known as "straw" or "birigui." Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic, fatal, systemic and infectious. In Brazil it is caused by the protozoan *L. chagasi*. Dogs are the greatest hosts and reservoirs of the parasite *L. infantum* and *L. chagasi* with a central role in the transmission cycle of the parasite to humans, with a large contingent of asymptomatic animals. The infection in dogs is clinically similar to human infection and apoptosis has been associated with reduction of T lymphocytes and peripheral blood mononuclear cells and failure to immunity, because there is a decrease in the secretion of IFN- γ . Dysregulation of apoptosis has been associated with various diseases and key molecules involved are the FAS/FASL and TRAIL, which involve immune reactions and cell-mediated cytotoxicity T. The understanding of this mechanism in infected dogs may allow future therapeutic interventions to reduce the depletion of lymphocytes. To investigate apoptosis in CD4+ and CD8+ lymphocytes and the expression and function of major receptors involved in apoptotic FAS/FASL and TRAIL were assessed in peripheral blood cells and spleen of 38 dogs symptomatic patients with visceral leishmaniasis moderate and 25 healthy dogs. Apoptosis of CD4+ and CD8+ spleen and blood was greater in dogs than in healthy infected. In the CD4+ cells from blood and spleens of infected dogs expression of FAS and FASL was lower than that of healthy cells CD8+ cells from blood and spleens of infected dogs expression of FAS increased while the FASL decreased compared to that observed in healthy dogs. The TRAIL receptor only increased CD8+ cells from spleen of infected dogs. The apoptosis observed in CD4+ cells from blood and spleen decreased in the presence of blocking antibodies to FAS and FASL. The reduction of apoptosis in CD8 + cells by the presence of blocking antibodies was only observed in the spleen. Our data show that apoptosis of CD4+ and CD8+ is a mechanism that is involved in the infectious process dogs *Leishmania* spp. with the participation of molecules FAS/FASL and TRAIL. Our results contribute to the understanding of the immune response in dogs infected with *L. chagasi* and allow future therapeutic interventions to reduce the depletion of lymphocytes.

Keywords: Protein Fas-Associated Death Domain (FAS), Fas Ligand-Protein (FASL), *Leishmania chagasi*, Leishmaniasis, Cell Death, Apoptosis-Inducing Ligand related to TNF (TRAIL)

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Leishmania (L.) spp. são protozoários patogênicos responsáveis por doenças endêmicas nos humanos em países tropicais e subtropicais. É um parasita intracelular obrigatório de células do sistema fagocitário mononuclear (ALVAR et al., 2004), transmitido para o homem e animal pelo mosquito que absorve o sangue, do gênero *Lutzomyia* no Novo mundo e pelo *Phlebotomus* no Velho mundo (DESJEUX, 2001).

Segundo Desjeux (2001), as migrações, a ação antrópica no ambiente, a urbanização dos ciclos de circulação de *Leishmania* spp., a imunossupressão e a desnutrição do hospedeiro, seriam fatores de risco que explicariam a expansão, a disseminação e o aumento da incidência de casos de leishmanioses em várias regiões do mundo.

A Leishmaniose Visceral (LV) também conhecida como *Kala-azar* (Doença negra) é uma antroponose considerada uma das mais importantes zoonoses parasitárias emergentes em expansão por todo o mundo, com mais de 186 milhões de pessoas em risco de infecção, afetando crianças e adultos jovens em 88 países e em todos os continentes. Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as seis doenças tropicais mais importantes, com uma incidência anual de 500.000 novos casos, a falta de tratamento causa a morte de 30% dos infectados e cerca de 50.000 pessoas morrem por dia anualmente vítimas da infecção pelo parasita (WHO, 2010).

Dependendo da espécie de *Leishmania* spp. e do hospedeiro, há duas formas clínicas principais: a leishmaniose cutânea, a qual, dependendo da espécie do parasita, pode desenvolver a forma cutânea difusa (*L. amazonenses*), ou a mucocutânea (*L. braziliensis*) e a visceral (*L. donovani*) (ALVAR et al., 2004).

A LV Americana teve seu início nas florestas tropicais envolvendo animais selvagens e da família *Canidae* (cães, lobos, chacais e raposas). No entanto, as mudanças no ambiente, tais como alterações climáticas, desmatamento, migração humana das áreas rurais para áreas urbanas periféricas, e as más condições de habitação e higiene, levaram ao aumento da doença a cada ano (DESJEUX et al., 2001).

A ocorrência da doença em algumas áreas depende fundamentalmente da presença do hospedeiro suscetível e igualmente do hospedeiro/reservatório (DESJEUX et al., 2001). A LV era anteriormente considerada como uma doença proveniente de zonas rurais, hoje é uma grande preocupação em áreas urbanas (TAUIL, 2006), com a sua incidência aumentando na região Sudeste do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

No distrito de Araçatuba, estado de São Paulo, a LV foi detectada em cães em 1998 e em humanos em 1999 (GALIMBERTTI et al., 1999). O município de Araçatuba contribuiu com 17% do número total de casos humanos e 28,5% das mortes em todo o estado no ano de 2007, em sete anos (1999 a 2005), cerca de 205 pessoas foram infectadas e 20 morreram. Em 2012 foram diagnosticados quatro casos de leishmaniose visceral com a ocorrência de um óbito (SÃO PAULO, 2012).

A transmissão de *Leishmania (L.) chagasi*, se dá pela picada de fêmeas de insetos dípteros, denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquitos “palha” ou “birigui” e pertencentes à família *Psychodidae*. O principal vetor do protozoário é *Lutzomyia longipalpis*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também incriminado como vetor da doença no Estado do Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, fatal, sistêmica e infecciosa (ALVAR et al., 2004), causada por protozoários do gênero *Leishmania*, família *Tripanossomatidae*. No Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania (L.) chagasi*, que é semelhante à *Leishmania (L.) infantum* encontrada em alguns países da Ásia e do Mediterrâneo (GONTIJO; MELO, 2004).

Cães são os maiores hospedeiros e reservatórios do parasita *L. infantum* e *L. chagasi* com um papel central no ciclo da transmissão do parasita para os humanos, com um grande contingente de animais assintomáticos. Os cães possuem maior quantidade de parasitos na pele do que o homem e com isso favorecem a infecção dos vetores (ALVAR et al., 2004), tornando-se ao mesmo tempo um problema de saúde pública e veterinário, por ter um prognóstico ruim e sem tratamento definitivo ainda (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Os impactos no controle da LVC com a remoção e eutanásia dos cães soropositivos têm sido discutidos por se mostrar trabalhosa, com eficácia duvidosa, e vários relatórios afirmam que não é útil para diminuir a infecção humana ou canina a longo prazo (DIETZE et al., 1997; NUNES et al., 2008).

A LVC tem como sintomas iniciais febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia (CIARAMELLA et al., 1997). Os principais sinais clínicos notados ao longo da doença são representados por caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia (CIARAMELLA et al., 1997; FERRER, 1999; LANGONI et al., 2005). Na pele são comuns úlceras crostosas na orelha, focinho e região periorbital, descamação furfurácea e alopecia multifocal (ALVAR et al., 2004; CIARAMELLA et al., 1997). Os inúmeros mecanismos envolvidos no processo da doença e a diversidade das respostas imunes exibidas pelo hospedeiro são responsáveis pela ampla gama de características clínicas apresentadas por seres humanos ou mamíferos infectados com *L. infantum* (ALVAR et al., 2004; BARBIÉRI, 2006).

A infecção em cães é clinicamente semelhante à infecção humana, (CIARAMELLA et al., 1997), embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais infectados e sintomáticos (ALVAR et al., 2004). O quadro clínico é variável e depende da resposta imune do cão e da cepa do parasita inoculado pela picada do inseto vetor. Alguns cães curam espontaneamente enquanto que outros evoluem até a morte em poucas semanas (ALVAR et al., 2004).

A confirmação do diagnóstico pode ser realizada por métodos de diagnóstico direto, tais como: citologia, isolamento e cultivo do parasita, e detecção molecular do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se amplifica o DNA do cinetoplasto do parasito, em sangue, pele, nódulos linfáticos, conjuntiva ou medula óssea de cães infectados. A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de iniciadores, número de cópias do alvo, método de extração de DNA, biópsia do material e tipos de protocolo da PCR (FRANCINO et al., 2006; GONTIJO; MELO, 2004). O método sorológico de ELISA indireto tem sido empregado por ser um teste sensível, com facilidades técnicas e econômicas, comumente empregado para diagnóstico (LIMA et al., 2003).

Os macrófagos são as principais células hospedeiras para a *Leishmania* spp. e a eliminação dos parasitos depende de uma cascata da resposta imune no controle ou progressão da infecção mediada por células do hospedeiro (GOTO; LINDOSO, 2004; LOCKSLEY; LOUIS, 1992).

Na fase ativa da LV, os parasitas se propagam amplamente nos macrófagos de órgãos, principalmente no fígado, baço, medula óssea e nódulos linfáticos. Monócitos infectados raramente são encontrados no sangue periférico. Clinicamente, LV caracteriza-se pela depressão das células T (DOS-SANTOS et al., 2008) e diminuição da resposta imune celular ao antígeno da *Leishmania* (CARVALHO et al., 1989).

Para o sucesso no estabelecimento da infecção, a *Leishmania* tem várias estratégias de sobrevivência no hospedeiro como a prevenção do estímulo das células T e da resposta imune específica que levaria à ativação de macrófagos e a destruição do parasita (ROSA et al., 2006).

Na resposta adaptativa, as células T são de fundamental importância na regulação da resposta imunológica da LV. A resistência à infecção está associada à ativação de células TCD4 Th1 específicas para *Leishmania* spp., que produzem IFN- γ ativando macrófagos (PINELLI et al., 1994). Por outro lado a ativação das células TCD4 Th2 pelo parasita resulta no aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões, em razão das ações

supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000; BARBIÉRI, 2006).

As células T CD8 também parecem estar envolvidas com a resistência à infecção (BARBIÉRI, 2006). PINELLI et al. (1994) observaram que essas células são capazes de lisar macrófagos infectados por *L. infantum* e de produzir IFN- γ , responsável por uma resposta imune do tipo 1. O IFN- γ ativa os macrófagos, estimulando o aumento da produção de reativos intermediários de oxigênio, responsáveis pela morte intracelular do parasito (PANARO et al., 2008).

A supressão de imunidade celular constitui o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A supressão da resposta das células T é observada pela ausência da resposta linfoproliferativa “*in vitro*” a antígenos de *Leishmania* spp. e a reação de hipersensibilidade do tipo retardado negativa para *Leishmania* spp. (DOS-SANTOS et al., 2008).

Em cães infectados com *L. infantum*, observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4 e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos e disseminação do parasita para vários órgãos incluindo estômago, intestino e pulmão (BOURDOISEAU et al., 1997; HERVÁS et al., 1996). Há uma correlação direta entre os níveis das células T CD4 e a resposta celular ao parasito, sendo a recuperação do animal doente após o tratamento acompanhada pelo aumento da porcentagem das células T CD4 (ALVAR et al., 2004).

Um dos processos associados à regulação da resposta imunológica na leishmaniose visceral é a apoptose (DAS et al., 1999). O fenômeno de apoptose pode influenciar ou não o seu desenvolvimento (ALEXANDER et al., 2001; DAS et al., 1999). A desregulação da apoptose tem sido associada a várias doenças e a principal molécula implicada é o sistema FAS/FASL, que envolve as reações imunológicas e a citotoxicidade mediada pelas células T (EIDSMO et al., 2002).

A apoptose é essencial para o desenvolvimento e manutenção de organismos multicelulares, permite a morte e remoção de células individuais

sem danos ao organismo, elimina células infectadas por vírus, deleta linfócitos ativados no fim da resposta imune e remove células alteradas no corpo, envolvendo neste processo a ativação de cascatas de proteases intracelulares que clivam proteínas levando a desestruturação da membrana plasmática com a formação de vesículas, condensação e fragmentação do DNA nuclear (GREEN, 2011; KRAMMER, 2000).

O início da apoptose pode ocorrer de várias formas. As vias mais conhecidas são pela ligação dos receptores específicos como o FAS (CD95) e FASL (EIDSMO et al., 2002; TASEW et al., 2010) e TRAIL (SCAFFIDI et al., 1999; TASEW et al., 2010).

FAS é um receptor de superfície celular, membro da família dos receptores de TNF e pode ser expresso na transmembrana celular ou na forma solúvel (KRAMMER, 2000), podendo induzir a apoptose nas células T ativadas, linfócitos B e nas células dendríticas (HAO et al., 2008).

A via FAS é importante na seleção das células T, deleção clonal de células periféricas, e ativação da indução da morte celular (GASTMAN, 2001). Na indução de apoptose via FAS, esse receptor sozinho não pode ativar o “sinal de morte celular” (LINCH et al., 1995). Este se liga a proteína FASL ativando assim o “domínio de morte” intracelular (FADD-Fas-associado a proteína com domínio de morte), com consequente ativação da caspase-8 (KRAMMER, 2000). Este caminho pode ser estimulado “*in vitro*” por anticorpos monoclonais para FAS (LINCH et al., 1995).

Outra molécula envolvida na apoptose é o TRAIL (Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF), que pode se ligar a dois receptores indutores de apoptose – TRAIL-R1 e TRAIL-R2, após isso os receptores TRAIL se trimerizam formando o complexo DISC (Complexo de sinalização na indução da apoptose) (FALSCHLEHNER et al., 2009), a molécula adaptadora FADD (FAS-associado ao domínio de morte) interage com o domínio de morte intracelular do complexo DISC, ativando assim a caspase 8 ou a caspase 10 e finalmente ativando a caspase-3 (CPP32/apopain/Yama) que cliva vários substratos que realizam a degradação do DNA cromossômico celular

resultando em alterações morfológicas características da apoptose (FALSCHLEHNER et al., 2009; SYTWU et al., 1996; TAN; HUNZIKER, 2003).

Além do papel da apoptose na homeostase celular, existem evidências crescentes que a apoptose também pode contribuir para a persistência e manutenção do processo patológico. O aumento de apoptose de células T, tem sido relatado em muitas infecções crônicas, incluindo aquelas causadas por *Trypanosoma cruzi* (NUNES et al., 1998), *Toxoplasma gondii* (KHAN et al., 1996), e *Leishmania donovani* (DAS et al., 1998; DAS et al., 1999). Embora a apoptose seja uma consequência normal da resposta imunológica durante a infecção ela pode contribuir para uma resposta ineficiente contra os parasitas (ALEXANDER et al., 2001).

Na infecção aguda por *Leishmania* em humanos, a apoptose tem sido associada à redução de linfócitos T e células mononucleares de sangue periférico e à falha na imunidade, pois ocorre diminuição na secreção do IFN- γ (POTESTIO et al., 2004). Nas células T CD4 de camundongos susceptíveis infectados com LV experimental houve queda na secreção de IL-2 e INF- γ durante a infecção, estando estes eventos relacionados à imunossupressão (DAS et al., 1999).

Achados “*in vitro*” também sugerem o envolvimento da apoptose no mecanismo de supressão observado na LV, a infecção de macrófagos por *L. donovani* aumentou o nível de FAS na membrana e FASL no sobrenadante de cultura, a desregulação significativa da apoptose pela via FAS e FASL que ocorre durante a LV, é um mecanismo que pode contribuir para o aumento da sensibilidade de células T específicas para *Leishmania* a apoptose (EIDSMO et al., 2002).

A apoptose pode também gerar inflamação. A inflamação é um mecanismo de defesa nas infecções parasitárias e tem um papel importante na geração de sinais clínicos presentes na doença. A ativação do macrófago vai depender do estímulo ou receptores envolvidos na fagocitose de células

necróticas ou apoptóticas que podem gerar sinais anti-inflamatórios ou pró-inflamatórios (KRYSKO et al., 2006).

FAS, TNF e TRAIL são potentes moléculas pro-inflamatórias que são capazes de desencadear a produção de várias citocinas e quimiocinas em diversos tipos celulares através do recrutamento da RIPK1 bem como sinalizar para quinases e outros complexos de receptores (ALTEMEIER et al., 2007; FARLEY et al., 2006; LEVERKUS et al., 2003).

Cães infectados com LV e sintomáticos apresentam uma reação inflamatória intensa com altos índices de apoptose celular nas lesões presentes na pele, podendo assim ter algum tipo de contribuição com a persistência da *Leishmania* no sítio inflamatório (VERÇOSA et al., 2012).

A persistência da *Leishmania* no sítio inflamatório pode estar sendo mantida pelo padrão inflamatório. Se o parasita é inicialmente fagocitado pelo macrófago ao invés de internalizado via corpos apoptóticos, a inflamação será aumentada. Então o parasita pode induzir apoptose com o objetivo de parar a inflamação e a resposta imunológica. Os corpos apoptóticos quando não fagocitados no tempo apropriado sofrem lise, perdem a integridade da membrana com consequente liberação de seus constituintes intracelulares para o meio extracelular, exibindo um perfil de células necróticas ativando mediadores inflamatórios (COHEN et al., 2002; SAVILL et al., 2002).

Prates et al. (2012) mostram em recente estudo com neutrófilos de camundongos e humanos que o FASL está envolvido desde o início da infecção, quando no local da picada do vetor da leishmaniose visceral, o *Lutzomia longipalpis*, são desencadeados eventos importantes na imunidade inata como o rápido recrutamento de neutrófilos no local onde houve o dano tecidual, a saliva do flebotomíneo induz a produção de quimiocinas pelos neutrófilos com aumento da produção de FASL e consequente fagocitose de corpos apoptóticos de neutrófilos infectados com o parasita por macrófagos recrutados para o local (AFONSO et al., 2008).

Camundongos com leishmaniose cutânea ulcerosa mostram uma resposta inflamatória com a presença de macrófagos infectados expressando

FASL e TRAIL e causam a apoptose dos queratinócitos (EIDSMO et al., 2005; TASEW et al., 2010).

A neutralização sistêmica de FASL e TRAIL reduz a ulceração na leishmaniose cutânea, sendo que FASL reduziu a infiltração dos neutrófilos na pele durante o estabelecimento da infecção, portanto sugerindo um possível papel pró-inflamatório para FASL e TRAIL e mostrando o potencial terapêutico da inibição desses receptores (TASEW et al., 2010).

Isso também foi visto em experimentos “in vitro” usando sobrenadante de cultura de queratinócitos infectados com *L. major* contendo altos níveis de FASL e TRAIL solúvel onde foram adicionados anticorpos bloqueadores para FASL e TRAIL foi observada a inibição da apoptose (RETHI; EIDSMO, 2012).

O FAS ainda pode ser responsável pela diminuição da carga parasitária pela ativação e susceptibilidade a apoptose dos macrófagos infectados com *Leishmania* em resposta a citocinas Th1, IFN- γ e TNF- α autócrina (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998).

Em cães naturalmente infectados a supressão imunológica observada pode ter relação com o mecanismo de apoptose de linfócitos T. A constante estimulação nesta infecção crônica pode desencadear a apoptose e colaborar com a falha da imunidade celular. Estudos preliminares (LIMA et al., 2012) demonstraram o aumento da taxa de apoptose nos linfócitos T, porém não foram caracterizados os mecanismos indutores de apoptose ou a principal subpopulação de células T envolvida. Assim a definição de qual população está sofrendo apoptose e os mecanismos indutores podem ser importantes para a compreensão dos fatores responsáveis pela supressão da imunidade celular. O entendimento de tal mecanismo em cães infectados pode permitir futuras intervenções terapêuticas para reduzir a depleção dos linfócitos.

OBJETIVOS

Caracterizar as principais subpopulações de células CD4⁺ ou CD8⁺ envolvidas na apoptose em cães com leishmaniose visceral e a expressão e função das moléculas indutoras FAS, FASL e TRAIL envolvidas na apoptose. Assim, o estudo desses parâmetros pode ser importante para a compreensão dos fatores responsáveis pela supressão da imunidade celular observada em cães com leishmaniose visceral.

REFERÊNCIAS

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

AFONSO, L.; BORGES, V. M.; CRUZ, H.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; DOS REIS, G. A.; DUTRA, A. N.; CLARÊNCIO, J.; DE OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. I. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **J. Leukoc. Biol.**, p. 389–396, 2008.

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

ALTEMEIER, W. A.; ZHU, X.; BEEINGTON, W. R.; HARLAN, J. M. ; LILES, W. C. FAS (CD95) induces macrophages proinflammatory chemokine production via a MyD88-dependent, caspase-independent pathway. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, p. 721-728, 2003.

ALVAR, J.; CANÃVETE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. **Canine Leishmaniasis**. Advances in Parasitology, v. 57, p. 1-88, 2004. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X). Acesso em: 7 nov. 2012.

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

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J. P.; SAINT ANDRE, I.; CHABANNE, L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, p. 335-345, 1997.

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 860-864, 1989.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v. 141, p. 539-543, 1997.

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

CONCEICAO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional FAS(APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, p. 237–245, 1998.

DAS, G.; VOHRA, H.; SAHA, B.; AGREWALA, J. N.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a suscetible host results in apoptosis of Th1-like cells: rescue of antileishmanial CMI by providing Th1-specific by stander costimulation. **Microbiol. Immunol.**, v. 42, p. 795-801, 1998.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, n. 3, p. 307-10, 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.95, p. 224-39, 2001.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1240-2, 1997.

DOS-SANTOS, W. L.; JESUS, E. E.; PARANHOS-SILVA, M.; PEREIRA, A. M.; SANTOS, J. C.; BALEEIRO, C. O.; NASCIMENTO, E. G.; MOREIRA, E. D.; OLIVEIRA, G. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, p. 251-259, 2008.

EIDSMO, L.; NYLEN, S.; KHAMESIPOUR, A.; HEDBLAD, M. A.; CHIODI, F.; AKUFFO, H. The contribution of the FAS/FASL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v.166, p. 1099–1108, 2005.

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

FALSCHLEHNER, C.; SCHAEFER, U.; WALCZAK, H. Following TRAIL's path in the immune system. **Immunology**, v. 127, p. 145-154, 2009.

FARLEY, S. M.; DOLSON, A. D.; PURDY, D. E.; SUNDHOLM, A. J.; SCHNEIDER, P.; MAGUN, B. E.; IORDANOV, M. S. FAS Ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 126, p. 2438-2451, 2006.

FERRER, L. M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**, Barcelona, 28-31 Jan., p. 6-10, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGU, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 214-221, 2006.

GALIMBERTTI, M. Z.; KATZ, G.; CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RODAS, L. A. C.; CASANOVA, C.; COSTA, I. P. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 217-8, 1999.

GASTMAN, B. R. Apoptosis and its clinical impact. **Head Neck**, v. 23, p. 409-25. 2001.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 615-623, 2004.

GREEN, D. R. **Means to an End**: apoptosis and other cell death mechanisms. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratories Press, p. 1-220, 2011.

HAO, Z.; DUNCAN, G. S.; SEAGAL, J.; SU, Y. W.; HONG, C.; HAIGHT, J.; CHEN, N. J.; ELIA, A.; WAKEHAM, A.; LI, W. Y.; LIEPA, J.; WOOD, G. A.; CASOLA, S.; RAJEWSKY, K.; ANDMAK, T. W. FAS receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. **Immunity**, v. 29, p. 615–627, 2008.

HERVÁS, J.; MÉNDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). **Vet. Rec.**, v. 139, p. 293-295. 1996.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.**, v. 8, p. 887-896, 1996.

KRAMMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, p. 12, 2000.

KRYSKO, D. V.; DENECKER, G.; FESTJENS, N. Macrophages use different Internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death Differ.**, v. 18, p. 781-795, 2006.

LANGONI, H.; LUCHEIS, S. B.; SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; PAES, A. C. American visceral leishmaniasis: a case report. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.**, v. 11, p. 361-372, 2005.

LEVERKUS, M.; SPRICK, M. R.; WACHTER, T.; DENK, A.; BRÖCKER, E. B.; WALCZAK, H.; NEUMANN, M. TRAIL-induced apoptosis and gene induction in HaCaT keratinocytes: differential contribution of TRAIL receptors 1 and 2. **J. Invest. Dermatol.**, v. 121, p. 149-155, 2003.

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

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

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

LOCKSLEY, R. M.; LOUIS, J. Immunology of leishmaniasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, p. 413-418, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde - SUS. **Leishmanioses**: Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_incidencia_de_lv_entre_1990_e_2011.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2012.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M. F.; PAULA, H. B.; PERRI, S. H. V.; ANDRADE, A. M.; DIAS, F. E. F.; BURATTINI, M. N. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 153, p. 19-23, 2008.

NUNES, M. P.; ANDRADE, R. M.; LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1313-1319, 1998.

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

<<http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/10>>. Acesso em: 21 nov. 2012.

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

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

PRATES, D. B.; ARAÚJO-SANTOS, T.; LUZ, N. F.; ANDRADE, B. B.; FRANÇA-COSTA, J.; AFONSO, L.; CLARÊNCIO, J.; MIRANDA, J. C.; BOZZA, P. T.; DOS REIS, G. A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M.; BORGES, V. M.; BARRAL, A. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 90, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0211105>>. Acesso em: 23 nov. 2012

RETHI, B.; EIDSMO, L. FASL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimm.2012.00163>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

ROSA, R.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O. R.; SANTOS-GOMES, G.M. *Leishmania infantum* released proteins specifically regulate cytokine expression and production patterns by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Acta Trop.**, v. 97, p. 309-317, 2006.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; PAIVA HOFFMANN, M.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.**, v. 12, p. 315-317, 1998.

SÃO PAULO (Estado). SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO - COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS - CVE-SP - CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA "PROF. ALEXANDRE VRANJAC". **Leishmaniose visceral americana humana**: casos autóctones e óbitos de leishmaniose visceral americana, segundo município de residência, 2010, 2012. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_lpi.htm>. Acesso em: 16 nov. 2012.

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

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

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

SYTWU, H-K.; LIBLAU, R. S.; MCDEVITT, H. O. The roles of FAS/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. **Immunity**, v. 5, p. 17-30, 1996.

TAN, K.H.; HUNZIKER, W. Compartmentalization of FAS and FAS ligand may prevent auto- or paracrine apoptosis in epithelial cells. **Exp. Cell Res.**, v. 284, p. 283–290, 2003.

TASEW, G.; NYLÉN, S.; LIEKE, T.; LEMU, B.; MELESS, H.; RUFFIN, N.; WOLDAY, D.; ASSEFFA, A.; YAGITA, H.; BRITTON, H.; BRITTON, S.; AKUFFO, H.; CHIODI, F.; EIDSMO, L. Systemic FASL and TRAIL neutralization reduce leishmaniasis induced skin ulceration. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 1-8, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000844>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 3, 2006.

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

WHO. World Health Organization. 2010. **The first WHO report on neglected tropical disease: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf> Acesso em: 20 nov. 2012.

CAPÍTULO 2

CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.

RESUMO - Cães infectados por *Leishmania chagasi* são reservatórios urbanos do parasita, agente etiológico da leishmaniose visceral e um problema de saúde pública em vários países incluindo o Brasil. Os cães apresentam supressão da imunidade celular e a apoptose dos linfócitos está envolvida neste processo. Para investigar a apoptose nas células CD4+ e CD8+ e a expressão e função dos principais receptores envolvidos no processo apoptótico, FAS (CD95) / FASL (CD178) e TRAIL (CD253) foram avaliados nas células do sangue periférico e baço de 38 cães sintomáticos com leishmaniose visceral moderada e de 25 cães saudáveis. A apoptose das células CD4+ e CD8+ do sangue e baço foi maior nos cães infectados que nos saudáveis. Nas células CD4+ do sangue e baço dos cães infectados a expressão de FAS e FASL foi menor do que a dos saudáveis, nas células CD8+ do sangue e do baço dos cães infectados a expressão de FAS aumentou enquanto de FASL diminuiu comparado ao observado nos cães saudáveis. O receptor TRAIL aumentou somente nas células CD8+ do baço dos cães infectados. A apoptose observada nas células CD4+ do sangue e do baço diminuiu na presença dos anticorpos bloqueadores para FAS e FASL. A redução da apoptose nas células CD8+ pela presença dos anticorpos bloqueadores foi somente observada no baço. Nossos dados mostram que a apoptose das células CD4+ e CD8+ é um mecanismo que está envolvido no processo infeccioso dos cães por *Leishmania* spp. com a participação das moléculas FAS e FASL e TRAIL. Os presentes resultados contribuem para o entendimento da resposta imune

em cães infectados com *L. chagasi* e permitem futuras intervenções terapêuticas para reduzir a depleção dos linfócitos.

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

CD95 (FAS) AND CD178 (FASL) INDUCE APOPTOSIS IN CD4+ AND CD8+ CELLS FROM PERIPHERAL BLOOD AND SPLEEN IN DOGS NATURALLY INFECTED BY *LEISHMANIA* SPP.

SUMMARY - Infected dogs are urban reservoirs of *Leishmania chagasi*, causative agent of visceral leishmaniasis, a public health problem in many countries including Brazil. Dogs have immune suppression and lymphocytes apoptosis is involved in this process. To investigate apoptosis in CD4+ and CD8+ lymphocytes and the expression and function of major receptors involved in apoptosis, FAS (CD95) / FASL (CD178) and TRAIL (CD253) were evaluated by flow cytometry on peripheral blood cells and spleen from 38 symptomatic dogs with moderate visceral leishmaniasis and 25 healthy dogs. Apoptosis of CD4+ cell and CD8+ cells from spleen and blood was greater in infected dogs than in healthy dogs. In CD4+ cell from blood and spleen of infected dogs FAS and FASL expression was lower than that observed in healthy dogs. In CD8+ cell from infected dogs the expression of FAS increased whereas FASL decreased when compared to healthy dogs. The TRAIL receptor increased only in the CD8+ cells from spleen from infected dogs. The apoptosis observed in CD4+ cells from blood and spleen decreased in the presence of blocking antibodies to FAS and FASL and the reduction of apoptosis in CD8+ cells by the presence of blocking antibodies was only observed in the spleen. Our data together showed that apoptosis of CD4+ and CD8+ is a mechanism that is involved in the infectious process dogs *Leishmania* spp. with the participation of molecules FAS and FASL. Our results could help to improve the current understanding of the immune response in dogs infected with *L. chagasi*, allowing future therapeutic interventions to reduce the depletion of lymphocytes.

Keywords: Cell Death, Fas-Associated Death Domain Protein (FAS), Fas Ligand Protein (FASL), *Leishmania chagasi*, Leishmaniasis, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)

CD95 (FAS) E CD178 (FASL) INDUZEM APOPTOSE EM CÉLULAS CD4+ E CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO E ESPLÊNICAS EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA* SPP.

1 – Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) também conhecida como *Kala-azar* (Doença negra) é uma antroponose considerada uma das mais importantes zoonoses parasitárias emergentes em expansão no mundo. Existem mais de 186 milhões de pessoas em risco de infecção, afetando tanto crianças como adultos jovens em 88 países de todos os continentes. Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as seis doenças tropicais mais importantes, com uma incidência anual de 500.000 novos casos, a falta de tratamento causa a morte de 30% dos infectados e cerca de 50.000 pessoas morrem por dia anualmente vítimas da infecção pelo parasita (WHO, 2012).

Os cães são os principais hospedeiros reservatórios de *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, o agente causador da leishmaniose visceral canina (LVC) (DESJEUX, 2001), por ter um prognóstico ruim e sem tratamento definitivo (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). A LV é mais prevalente no cão do que em humanos, com um grande contingente de animais assintomáticos, que apresentam maior quantidade de parasitas na pele do que o homem, favorecendo a infecção dos vetores (ASHFORD, 1996). A infecção em cães é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele nos animais sintomáticos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Em cães infectados com *Leishmania* (*L.*) *infantum* observa-se uma redução no número de linfócitos T CD4 e concomitante proliferação do parasita nos macrófagos, além da disseminação deste para vários órgãos, incluindo estômago, intestino e pulmão (BOURDOISEAU et al., 1997; HERVÁS et al.,

1996). Há uma correlação direta entre os níveis das células T CD4 e a resposta celular ao parasita, sendo a recuperação do cão doente, após o tratamento, acompanhada pelo aumento da porcentagem das células T CD4 (ALVAR et al., 2004). Um dos processos associados à regulação da resposta imunológica na LV é a apoptose dos linfócitos T, podendo influenciar ou não o seu desenvolvimento (DAS et al., 2001; ALEXANDER et al., 2001).

A apoptose é essencial para o controle homeostático do número de linfócitos, especialmente após o desenvolvimento da resposta imune a um microrganismo invasivo (SCAFFIDI et al., 1999). Contudo, alguns patógenos são capazes de manipular essa resposta, seja diretamente ou por desenvolverem estratégias para sobreviver no hospedeiro, até que tais mecanismos homeostáticos sejam ativados para reduzir número de células T efectoras (FREIRE-DE-LIMA et al., 2000).

O aumento da apoptose das células T tem sido discutido em muitas doenças crônicas infecciosas, (BADLEY et al., 1997; RETHI; EIDSMO, 2012; VERÇOSA et al., 2012), podendo contribuir para uma resposta imunológica ineficiente pois o mecanismo efector não reduz a multiplicação dos patógenos (ALEXANDER et al., 2001).

Vários mecanismos de apoptose das células T tem sido propostos. Privação de fatores de crescimento, citotoxicidade via TNF- α e interação FAS e FASL estão entre os principais mediadores (SCAFFIDI et al., 1999).

A molécula FAS é um receptor de superfície celular, membro da família dos receptores de TNF e pode ser expresso na transmembrana celular ou na forma solúvel (EIDSMO et al., 2002), sendo importante na seleção das células T, na deleção clonal de linfócitos periféricos e na ativação da indução da morte celular (GASTMAN, 2001). Na indução de apoptose a presença desse receptor sozinho não consegue ativar o “sinal de morte celular” (LINCH et al., 1995), necessitando se ligar a proteína FASL (CD178), ativando assim o “domínio de morte”-Fas-associado a proteína com domínio de morte (FADD), com

consequente ativação da caspase-8. Esta via pode ser estimulada “*in vitro*” por meio de anticorpos monoclonais para FAS (LINCH et al., 1995).

Outra molécula envolvida na apoptose é o Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF (TRAIL), que pode se ligar a dois receptores indutores de apoptose – TRAIL-R1 e TRAIL-R2. Após a ligação os receptores do TRAIL se trimerizam formando o Complexo de Sinalização na Indução da Apoptose (DISC). A molécula adaptadora FADD interage com o domínio de morte intracelular do complexo DISC, ativando assim a caspase 8 ou a caspase 10 e finalmente ativando a caspase-3 (CPP32/apopafina/Yama) que cliva vários substratos responsáveis pela degradação do DNA cromossômico celular resultando em alterações morfológicas características da apoptose (FALSCHLEHNER et al., 2009).

Estudos “*in vitro*” sugerem o envolvimento da apoptose no mecanismo de supressão observado na LV. A infecção de macrófagos humanos por *Leishmania (L.) donovani* aumenta o nível de FAS na membrana e FASL no sobrenadante de cultura. A desregulação significativa da apoptose pela via FAS e FASL que ocorre durante a LV, é um mecanismo que pode contribuir para o aumento da sensibilidade da apoptose de células T específicas para *Leishmania* spp. (EIDSMO et al., 2002).

Em humanos, na fase aguda da infecção, ocorre a redução dos linfócitos T no sangue periférico e essa falha na imunidade celular tem sido associada com a apoptose (POTESTIO et al., 2004). Em camundongos experimentalmente infectados com *Leishmania donovani* foi observado um aumento no nível de apoptose no baço e fígado comparado aos camundongos não-infectados (ALEXANDER et al., 2001).

Em cães naturalmente infectados por *Leishmania* spp. a supressão imunológica observada pode ter relação com o mecanismo de apoptose de linfócitos T. A constante estimulação nesta infecção crônica pode desencadear a apoptose e colaborar na falha da imunidade celular. Lima et al. (2012), demonstraram o aumento da taxa de apoptose nos linfócitos T do sangue periférico e baço, porém não caracterizaram as principais subpopulações de

células CD4 ou CD8 envolvidas e a expressão e função das moléculas indutoras FAS, FASL e TRAIL na apoptose, assim o estudo desses parâmetros podem ser importantes para a compreensão dos fatores responsáveis pela supressão da imunidade celular observada em cães com leishmaniose visceral.

2 - Materiais e métodos

2.1 - Aprovação do Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal (COBEA), com a aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araçatuba – Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA - em 15/04/2011, conforme o processo 00679/2011.

2.2 - Triagem dos animais

Foram selecionados para esse estudo trinta e oito cães adultos; com leishmaniose visceral canina (LVC); dezoito machos e vinte fêmeas, entre dois e cinco anos de idade, de várias raças e pesos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA); sendo todos soropositivos para o antígeno *L. chagasi* testados por ELISA indireto (LIMA et al., 2003); sintomáticos e apresentando pelo menos três sinais clínicos de LVC: onicogribose, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, lesão periocular lesões cutâneas e caquexia. Um grupo controle composto por vinte e cinco cães saudáveis, quinze machos e dez fêmeas, de várias raças e pesos, e soronegativos para *L. chagasi*, testados por ELISA indireto (LIMA et al., 2003), com hemograma normal, indicando ausência de processo infeccioso.

O exame físico e os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* determinados pelo ELISA indireto (LIMA et al., 2003) foram considerados para classificação dos cães conforme proposto por Solano-Gallego et al. (2009).

2.3 - Colheita das amostras

Os cães com leishmaniose visceral foram eutanasiados por meio de anestesia barbitúrica (Tiopental, Cristália Itapira, SP), seguida da injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1% pela mesma via, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose visceral devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Após a eutanásia, os fragmentos de baço foram coletados e mantidos em meio de cultura celular RPMI-1640 (Sigma®, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,03% de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As amostras de baço do grupo controle foram retiradas por excisão cirúrgica de acordo com Lima et al. (2012). As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia femoral ou jugular, coletadas em tubos contendo EDTA e processadas imediatamente após a coleta.

2.4 - Obtenção de células mononucleares de sangue periférico e de leucócitos do baço

O isolamento das células mononucleares de sangue periférico de cães portadores de LVC e cães saudáveis foi realizada em gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences®, AB), seguindo-se as recomendações do fabricante. As células mononucleares do sangue periférico foram lavadas três vezes em salina tamponada com fosfato, em pH 7,2, contendo 1% de albumina de soro bovino, 0,1% de azida e 20% de soro fetal bovino, em seguida foram resuspensas em RPMI-1640 (Sigma®, USA) suplementado com soro fetal

bovino inativado pelo calor, 0,03% de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Os leucócitos totais do baço foram obtidos de um fragmento de 2cm² que foi macerado e adicionado a 10 mL de meio RPMI-1640 (Sigma®, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,03% de L-glutamina, e 100 UI/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Após a retirada dos “debris” celulares a suspensão foi processada com 5 mL de tampão de lise contendo 7,46 g/L de cloreto de amônio (NH₄ClO₃) à 4°C por 10 min., centrifugado à 2000 rpm por 5 minutos e lavadas com água salina tamponada com fosfato em pH 7,2 por três vezes.

2.5 - Avaliação da apoptose em células CD4 e CD8

A marcação das células CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada pela incubação de 10⁶/mL células com os anticorpos monoclonais anti-CD4 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Serotec®, UK) ou anticorpos monoclonais anti-CD8 conjugados a FITC (Serotec®, UK) para determinação da apoptose nas células CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico e do baço. Após a imunomarcação de CD4 e CD8 nas células do sangue periférico e baço a porcentagem de apoptose foi realizada usando o kit Guava Nexin (Millipore®), composto por Anexina V, que tem alta afinidade pela fosfatidilserina intracelular que é externalizada quando a célula entra em apoptose e pelo 7-AAD, um corante vital, o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos pelo sistema Guava Easy-CyteMini, usando o software Cytosoft, conforme as instruções do manual do fabricante. Foram adquiridos 10.000 eventos. O controle positivo, o indutor de apoptose Camptotecina (Sigma®, USA) (0,15µg/mL) em DMSO (Sigma®, USA), foi adicionado às células que foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora, após isso as células foram coradas com o kit Guava Nexin (Millipore®). No controle negativo foram utilizadas células sem fluorescência para delimitar as populações negativas do experimento.

2.6 - Expressão de FAS, FASL e TRAIL

A expressão de FAS, FASL e TRAIL foi avaliada nas células dos mononucleares do sangue periférico e nos leucócitos do baço. A detecção das proteínas extracelulares foi realizada após a marcação dupla com anticorpos monoclonais: anti-CD4 canino conjugado a FITC (Serotec®, UK), associado ao anticorpo monoclonal anti-FAS humano (CD95) com ficoeritrina (PE) que reage com cão; ou ao anticorpo monoclonal anti-FASL humano (CD178) conjugado ao biotínico [(O FASL humano apresenta 85% de homologia com proteína canina conforme pesquisa de similaridade das sequências proteicas para FASL entre *Homo sapiens* e *Canis lupus familiaris* no sistema BLAST - Ferramenta de busca de alinhamento básico local do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI)] e após isso incubado com estreptavidina PE (BD Biosciences®); ou ao anticorpo monoclonal anti-TRAIL humano (CD253) conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Biosciences®) (RONG et al., 2008), o mesmo processo de marcação foi realizado para as células CD8. Para controle das ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas com os seus respectivos isotipos controles. A aquisição dos dados foi obtida pela leitura de 10.000 eventos por citometria de fluxo e os dados foram avaliados pelo software Guava (Hayward®, CA).

2.7 - Bloqueio funcional dos receptores FAS / FASL

Para avaliar se o bloqueio dos receptores FAS e FASL tinha reflexos na taxa da apoptose das células CD4⁺ e CD8⁺, realizou-se a investigação “*in vitro*” da apoptose na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores. Cerca de 5×10^6 células mononucleares de sangue periférico ou células leucocitárias do baço de 5 cães com leishmaniose visceral, foram suspensas em meio RPMI-1640 (Sigma®, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,03% de L-glutamina, e 100 UI/mL de penicilina e 100 g/mL de estreptomicina e dispensadas em placas de cultura de 24 poços

(Costar-3540 Corning®, NY) na presença de 5 uL de anticorpos bloqueadores: anticorpo monoclonal Anti-Humano CD95 (FAS) (BD Biosciences®) e anticorpo monoclonal Anti-Humano CD178 (FASL) (BD Biosciences®); as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24h em estufa. A apoptose foi avaliada nas células CD4+ e CD8+, na presença ou não de anticorpos bloqueadores conforme descrito anteriormente.

2.8 - Análise estatística

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a expressão dos receptores de apoptose FAS, FASL e TRAIL nas células CD4+ e CD8+ do sangue e baço do grupo controle com o infectado. O teste T pareado foi utilizado para comparar o nível basal de apoptose aos diferentes tratamentos com bloqueio dos receptores. Os resultados foram considerados como significativos quando $P < 0,05$. Na análise estatística utilizou-se o programa computacional GraphPad Prism 5 (GraphPad Software®, Inc. CA. USA).

3. Resultados

3.1 - Apoptose nas células CD4+ e CD8+ do sangue e baço de cães com leishmaniose visceral.

A porcentagem das células apoptóticas foi avaliada com a delimitação inicial das células CD4+ (Figura 1a), em seguida com essa população foi feita a análise das células apoptóticas (Figura 1b).

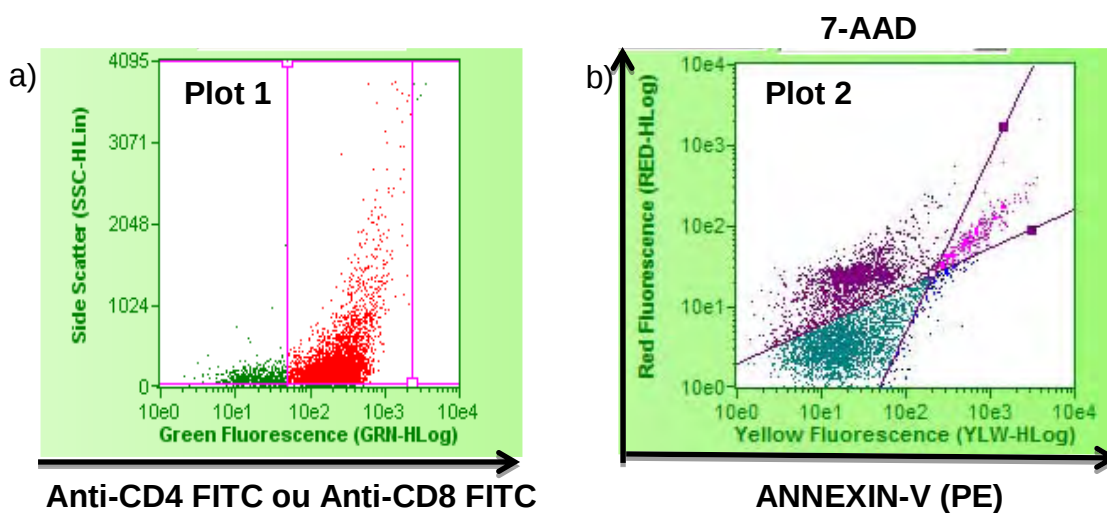


FIGURA 1– Análise por citometria de fluxo: (a) o plot 1 corresponde a delimitação feita nas células CD4+ ou CD8+ do sangue periférico de um cão infectado; (b) o plot 2 no quadrante superior direito corresponde as células triplamente coradas: células CD4+ ou CD8+, Anexina-V e 7-AAD.

A apoptose observada nas células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e do baço foi maior nos cães infectados quando comparada aos dos cães saudáveis ($P<0,05$, Figuras 2a e 2b).

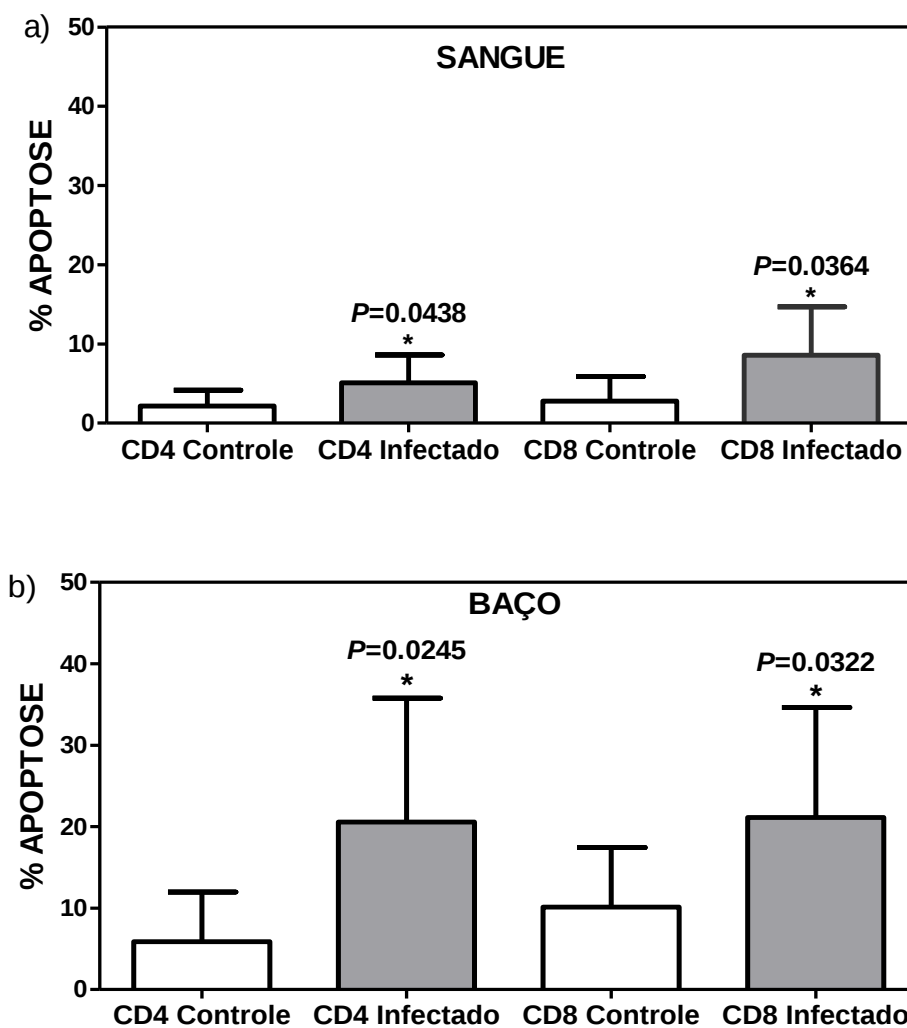


FIGURA 2 - Porcentagem de apoptose observada de células CD4+ e CD8+ provenientes do sangue periférico (2a) e do baço (2b) dos cães com leishmaniose visceral e dos cães saudáveis.

3.2 - Expressão dos receptores FAS (CD95), FASL (CD178) e TRAIL (CD253) nas células CD4+ e CD8+.

A porcentagem das células CD4+ ou CD8+ do sangue periférico e baço dos cães infectados e dos cães saudáveis expressando os receptores FAS, FASL e TRAIL foi avaliada pela delimitação das células duplo marcadas (Figuras 3a, b, c, d, e, f, g, h, i).

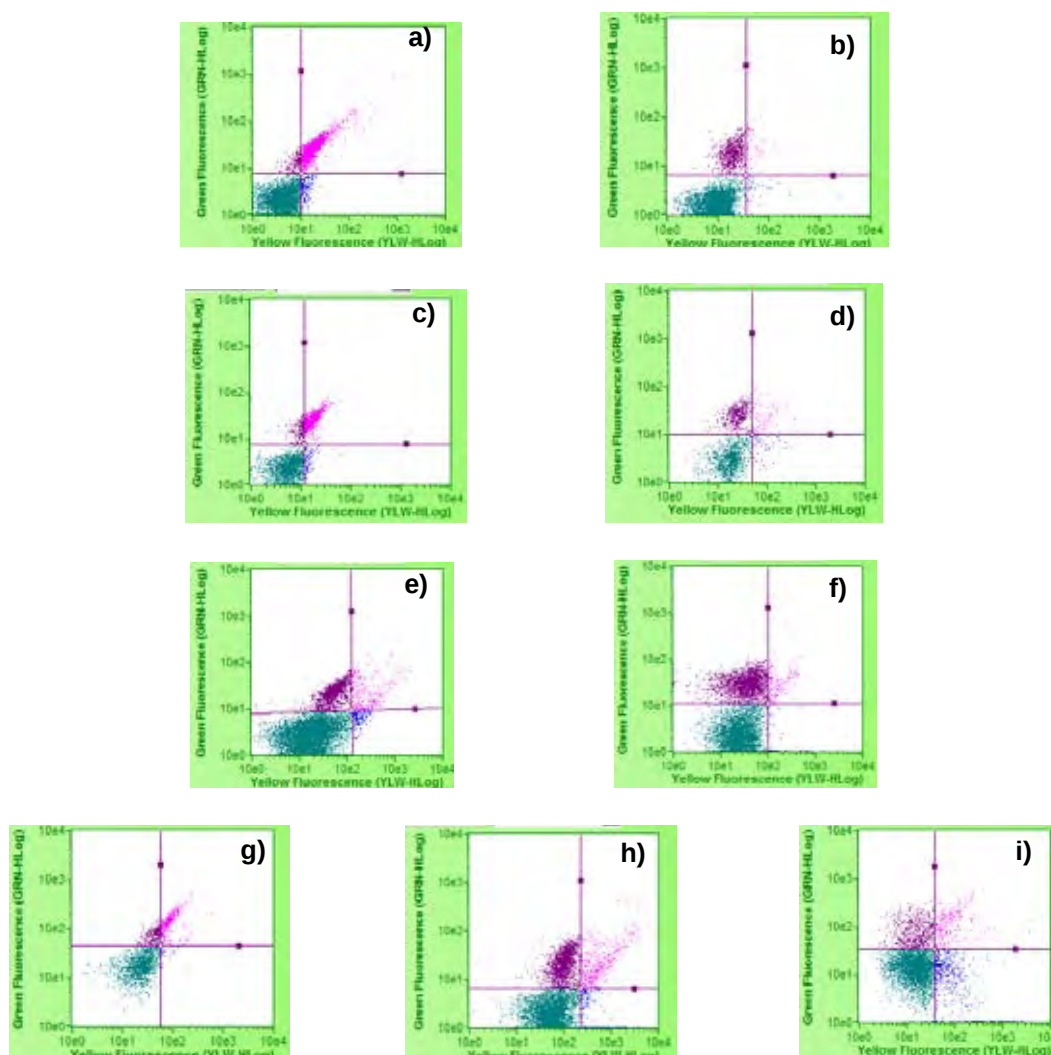


FIGURA 3 – Fluorescência representativa da citometria de fluxo feita com as amostras de sangue e baço duplamente coradas. A delimitação feita no quadrante superior direito corresponde a células do sangue marcadas respectivamente com CD4 FAS (a), CD4 FASL (b), CD8 FAS (c), CD8 FASL (d) e do baço CD4 FAS (e), CD4 FASL (f), CD8 FAS (g), CD8 FASL (h), CD8 TRAIL (i).

A expressão de FAS (Figuras 4a e 4c) e FASL (Figuras 4b e 4d) nas células CD4⁺ do sangue periférico e baço dos cães infectados foi menor comparado aos cães saudáveis (Figuras 4a, b, c, d; $P < 0,05$), enquanto a expressão do receptor TRAIL não mostrou diferença entre os grupos (dados não apresentados).

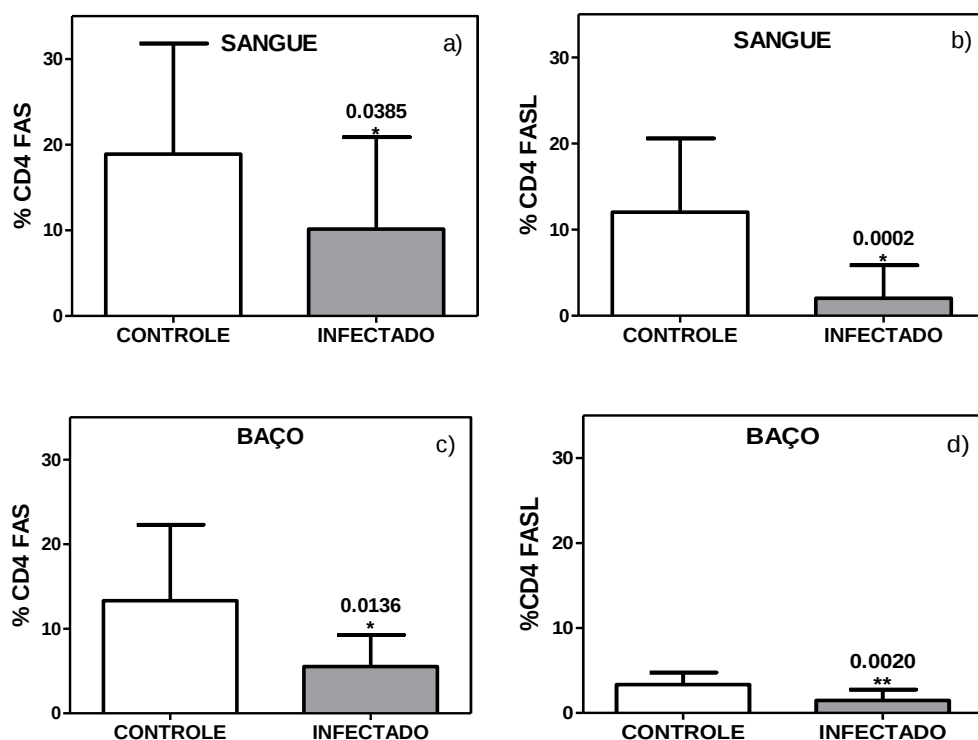


FIGURA 4 - Porcentagem de expressão de FAS e FASL de células CD4⁺ e provenientes do sangue (a e b) e do baço (c e d) de cães com leishmaniose visceral e cães saudáveis.

A expressão de FAS nas células CD8⁺ do sangue periférico e do baço dos cães infectados comparada à observada nos cães saudáveis foi maior (Figuras 5a e 5c, $P<0,05$); ao mesmo tempo observou-se uma diminuição da expressão de FASL nestas células (Figuras 5b e 5d, $P<0,05$). A expressão do receptor TRAIL foi maior nas células CD8⁺ somente do baço dos cães infectados comparada a de cães saudáveis (Figuras 5e, $P<0,05$).

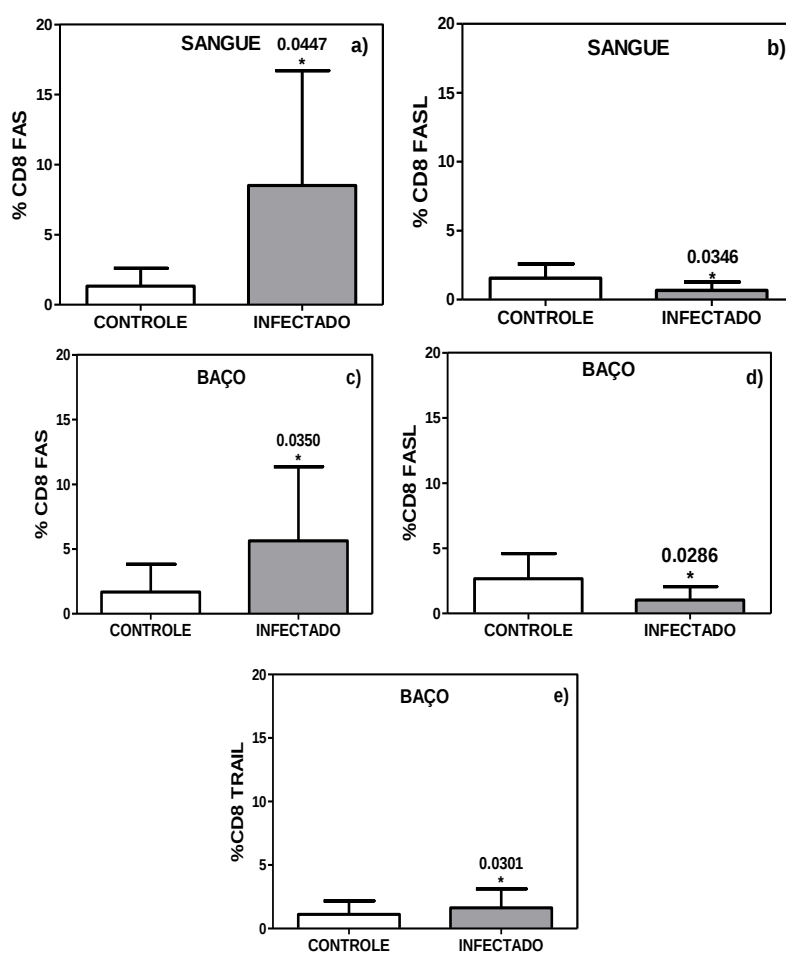


FIGURA 5 - Porcentagem de expressão de FAS e FASL de células CD8⁺ e provenientes do sangue (a e b) e do baço (c, d, e) de cães com leishmaniose visceral e cães saudáveis.

3.3 – Bloqueio dos receptores FAS e FASL.

Baseados nos resultados da expressão dos receptores FAS e FASL questionou-se se a apoptose observada nas células CD4⁺ e CD8⁺ dos cães com leishmaniose visceral tem o envolvimento desses receptores. A apoptose observada nas células CD4⁺ do sangue periférico e do baço diminuiu na presença dos anticorpos bloqueadores para FAS e FASL (Figuras 6a e 6b, $P < 0,05$), a redução da apoptose nas células CD8⁺ pela presença dos anticorpos bloqueadores foi somente observada no baço (Figuras 6b, $P < 0,05$).

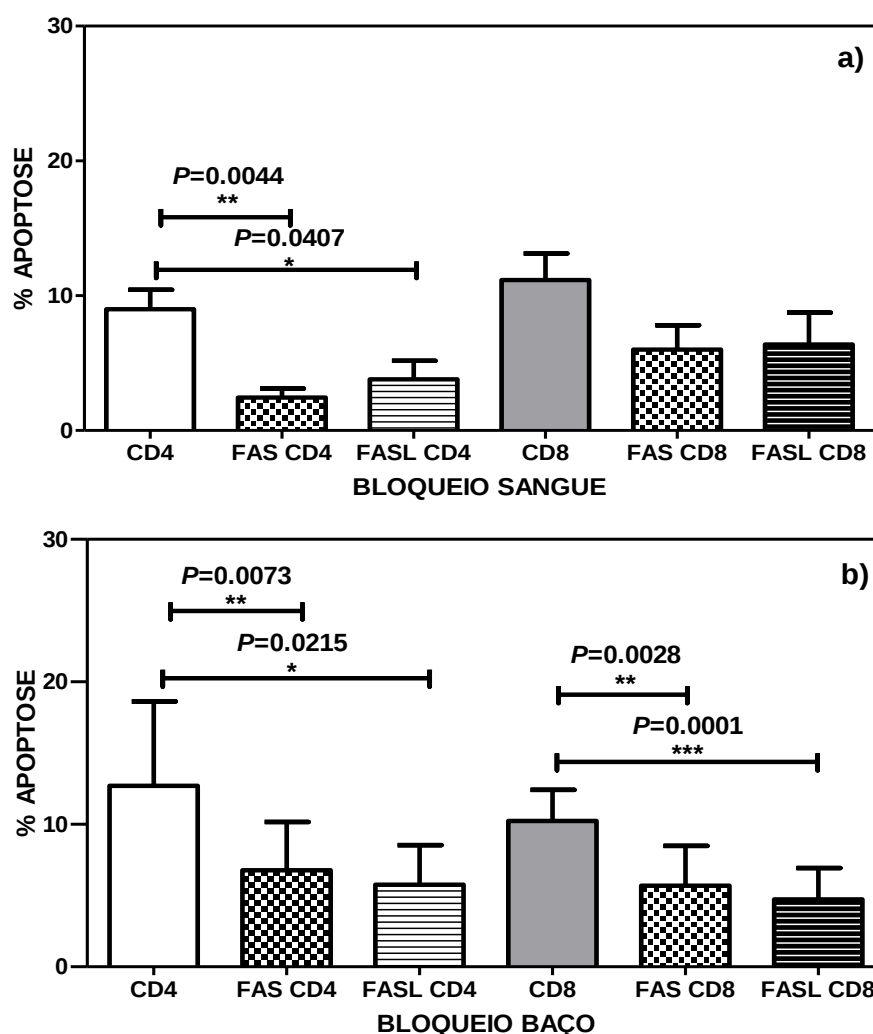


FIGURA 6 - Apoptose de células CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico (a) e baço (b) de cães com leishmaniose visceral na presença ou ausência de anticorpos bloqueadores para FAS e FASL. Os anticorpos bloqueadores para FAS e FASL mostraram redução nos níveis de apoptose das células CD4⁺ e CD8⁺ dos cães infectados.

Os valores individuais obtidos em cada experimento são mostrados nas Figuras 7a e 7b, mostrando a redução na apoptose nas células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e baço dos cães infectados na presença do bloqueio dos receptores FAS e FASL com relação à apoptose basal.

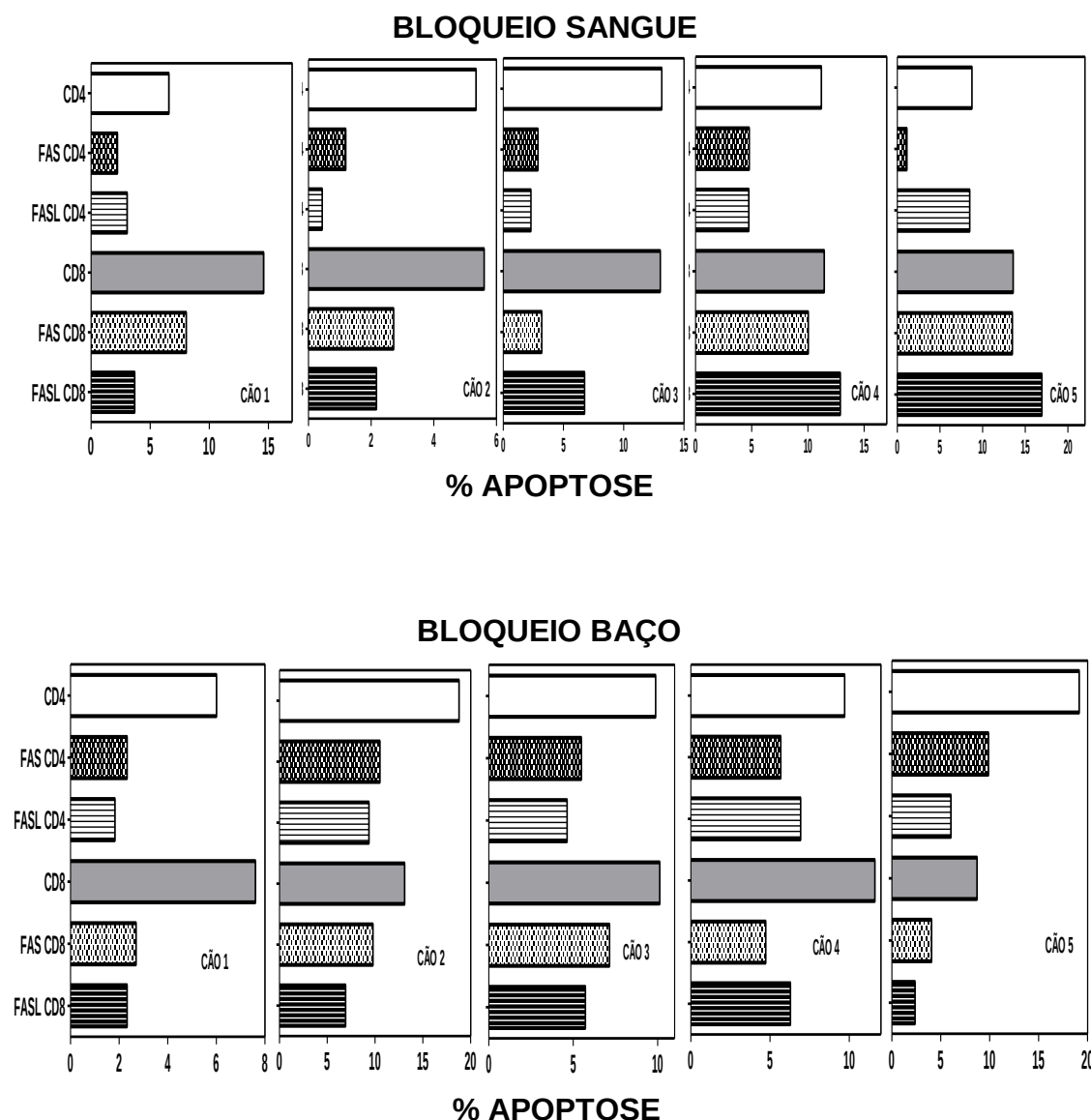


FIGURA 7 - Valores individuais de apoptose das células CD4+ e CD8+ do sangue periférico (a) e do baço (b) de cães infectados na presença ou ausência de anticorpos bloqueadores para FAS e FASL.

4 – DISCUSSÃO

A taxa de apoptose em células CD4+ e CD8+ de sangue periférico e baço de cães com LVC de área endêmica foi analisado e os valores comparados aos cães controle, para investigar o papel que esse mecanismo desempenha na patogenia da depleção dos linfócitos e no processo infeccioso da doença, bem como na resposta imune do hospedeiro. Observamos maiores taxas de apoptose nas células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e baço de cães infectados e alteração na expressão dos receptores FAS e FASL. Ao contrário, interessante notar que o receptor TRAIL só mostrou alteração nas células CD8+ do baço.

Em muitas doenças crônicas infecciosas, incluindo as causadas por *T. cruzi* (NUNES et al., 1998), *T. gondii* (KHAN et al., 1996), *L. donovani* (DAS et al., 1999), e *L. major* (CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1998), ocorre supressão da imunidade mediada por células T (ALEXANDER et al., 2001) e aumento da apoptose de linfócitos (LIMA et al., 2012), o que pode contribuir para a persistência do parasita no hospedeiro, semelhante ao que observamos no cão na fase crônica da leishmaniose visceral.

Em cães com leishmaniose visceral observa-se apoptose de células T do sangue periférico e do baço (LIMA et al., 2012). De fato, tem sido mostrado “*in vitro*” que o parasita *Leishmania* spp. e constituintes de sua membrana induzem apoptose dos linfócitos (WOLDAY et al., 1999). Portanto uma vez que a progressão da infecção está relacionada ao comprometimento da imunidade celular mediada (CARVALHO et al., 1989), a detecção de apoptose de células CD4+ ou CD8+ pode contribuir para a ineficácia da resposta imune celular durante infecção.

As altas taxas de apoptose detectadas em células CD4+ e CD8+ do sangue periférico e do baço em cães infectados confirmam resultados anteriores (LIMA et al., 2012). Em infecção experimental de camundongos Balb/c por *L. donovani*, a apoptose das células T do baço foi observada (DAS

et al., 1999). Um aumento da apoptose das células CD4+ e CD8+ também foram mostrados no baço de camundongos C56Bl/6 após a infecção com *Leishmania donovani* (ALEXANDER et al., 2001), e em pacientes com leishmaniose visceral que apresentaram aumento na apoptose das células T durante a fase ativa da doença comparado aos indivíduos saudáveis (CLARÊNCIO et al., 2008).

Para investigar os mecanismos indutores da apoptose em cães, a expressão dos receptores de membrana FAS, FASL e TRAIL foi avaliada. Observamos uma diminuição do FASL nas células CD4+ e CD8+ do baço e sangue periférico nos cães infectados, que pode ter relação com a produção de TGF- β , uma vez que cães infectados produzem TGF- β (CORRÊA et al., 2007), e estudos “*in vitro*” com hibridomas de células T mostraram que essa citocina suprime a expressão de FASL (GENESTIER et al., 1999). Assim seria interessante num próximo estudo avaliar se altas taxas de TGF- β teriam relação com a diminuição na expressão de FASL em cães infectados.

Diferente do que observamos FASL foi altamente expresso por células T CD8+ no baço de camundongos infectados com *L. Infantum* (TSAGOZIS et al., 2003), tais diferenças podem estar relacionadas a dinâmica do processo infeccioso entre essas espécies. Em camundongos, observa-se um pico de parasitemia no baço na oitava semana que declina com o desenvolvimento da resposta imunológica e aumento de produção de IFN-gama (TSAGOZIS et al., 2003), enquanto nos cães sintomáticos é observado alta carga parasitária na fase crônica da doença (MICHELLIN et al., 2011), e uma tendência ao aumento de IFN-gama (CORRÊA et al., 2007).

Em cães infectados a diminuição da expressão de FASL está envolvida no processo apoptótico, diferente do observado em camundongos nocautes para FASL infectados por *L. donovani* que não mostram diminuição nos níveis de apoptose. Nesse modelo experimental, a ausência da molécula FASL aumentou a suscetibilidade à infecção levando a formação de um granuloma ineficiente no fígado e um crescimento descontrolado de parasitas no baço

(ALEXANDER et al., 2001). Assim, em cães sintomáticos, a diminuição de FASL pode estar envolvida também com a suscetibilidade a infecção e alta carga parasitária esplênica geralmente observada (MICHELLIN et al., 2011).

Nos cães infectados as células CD4⁺ do baço e do sangue periférico mostraram uma diminuição da expressão de FAS, enquanto nas células CD8⁺ do baço e do sangue periférico foram observadas um aumento dessas moléculas, sugerindo uma regulação diferente nas duas populações celulares. O aumento de FAS nas células CD8⁺ do baço dos cães com leishmaniose visceral confirma resultados anteriores que mostraram que células não aderentes de baço de pacientes com leishmaniose visceral aumentam a expressão de FAS (EIDSMO et al., 2002). O aumento de FAS também foi observado em células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral (CLARÊNCIO et al., 2008), tais resultados sugerem o envolvimento dessa molécula na patogenia da doença.

Outra molécula que pode estar associada a apoptose observada nas células CD8⁺ do baço de cães infectados é o TRAIL, esse receptor teve sua expressão aumentada. Semelhante aos nossos achados tal molécula foi detectada em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose tegumentar (EIDSMO et al., 2007) e induziu a apoptose dos queratinócitos (TASEW et al., 2010). As células T CD8 podem utilizar esse receptor para a indução de apoptose (MARFÉ et al., 2011) ou mesmo para funções imunoreguladoras na inflamação (COLLISON et al., 2009). TRAIL também pode levar a apoptose das células CD8 de memória (JANSSEN et al., 2005), função que prejudicaria a resposta imunológica no cão cronicamente infectado.

A média da apoptose apresentada nas células CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico e do baço dos cães infectados foi maior nos experimentos em que não foram adicionados anticorpos bloqueadores dos receptores FAS e FASL, comparado aos ensaios em que havia a presença dos anticorpos bloqueadores para FAS e FASL, mostrando que esses receptores estão envolvidos no processo apoptótico responsável pela depleção dos linfócitos de cães infectados com *L. chagasi*.

5 – CONCLUSÃO

Nossos dados em conjunto mostram que a apoptose das células CD4+ e CD8+ é um mecanismo que está envolvido no processo infeccioso de cães por *Leishmania* spp. com a participação das moléculas FAS, FASL e TRAIL. Os presentes resultados podem contribuir para melhorar a compreensão atual da resposta imune em cães infectados com *L. chagasi* permitindo futuras intervenções terapêuticas para reduzir a depleção dos linfócitos.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPESP - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, processos nº 2011/06214-7 e 2011/02321-3, pelo suporte financeiro na execução desta pesquisa.

6 – Referências

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

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

ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v.14, p. 523-532, 1996.

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

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

CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BARRAL, A.; BADARÓ, R.; JOHNSON, W. D. JR. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. **J. Clin. Invest.**, v. 83, p. 860-864, 1989.

CLARÊNCIO, J.; OLIVEIRA, C. I.; FAVALI, C.; MEDINA, O.; CALDAS, A.; COSTA, C. H.; COSTA, D. L.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Could the lower frequency of CD8+ CD18+ CD45RO+ lymphocytes be biomarkers of human VL? **Int. Immunol.**, v. 21, p. 137–144, 2008.

COLLISON, A.; FOSTER, P. S.; MATTES, J. Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 36, p. 1049–1053, 2009.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; HAHNE, M.; SCHROTER, M.; LOUIS, J.; TSCHOPP, J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 237-45, 1998.

CORRÊA, A. P.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; LIMA, V. M. F. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, p. 267–274, 2007.

DAS, G.; VOHRA, H.; RAO, K.; SAHA, B.; MISHRA, G. C. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. **Scand. J. Immunol.**, v. 49, p. 307-10, 1999.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Cell Sci.**, v.114, p. 2461-9, 2001.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transac. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.95, p. 224-39, 2001.

EIDSMO, L.; FLUUR, C.; RETHI, B.; ERILSSON, Y.; RUFFIN, N.; MILITO, A.; AKUFFO, H.; CHIODI, F. FASL and TRAIL induce epidermal apoptosis and skin ulceration upon exposure to *Leishmania major*. **Am. J. Pathol.**, v. 170, p. 227-239, 2007.

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

FALSCHLEHNER, C.; SCHAEFER, U.; WALCZAK, H. Following TRAIL's path in the immune system. **Immunology**, v. 127, p. 145-154, 2009.

FREIRE-DE-LIMA, C. G.; NASCIMENTO, D. O.; SOARES, M. B.; BOZZA, P. T.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; DE MELLO, F. G.; DOS REIS, G. A.; LOPES, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**, v. 13, p. 199–203, 2000.

GASTMAN, B. R. Apoptosis and its clinical impact. **Head Neck**, v. 23, n. 5, p. 409-25, 2001.

GENESTIER, L.; KASIBHATLA, S.; BRUNNER, T.; GREEN, D. R. Transforming growth factor β 1 inhibits FAS ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 231-239, 1999.

HERVÁS, J.; MÉNDEZ, A.; CARRASCO, L.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C.; Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). **Vet. Rec.**, v. 139, p. 293-295. 1996.

JANSSEN, E. M.; DROIN, N. M.; LEMMENS, E. E.; PINKOSKI, M. J.; BENSINGER, S. J.; EHST, B. D.; GRIFFITH, T. S.; GREEN, D. R.; SCHOENBERGER, S. P. CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. **Nature**, v. 434, p. 88–93, 2005.

KHAN, I. A.; MATSUURA, T.; KASPER, L. H. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Int. Immunol.**, v. 8, p. 887-896, 1996.

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

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

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

MARFÉ, G.; TAFANI, M.; FIORITO, F.; PAGNINI, U.; IOVANE, G.; MARTINO, L. Involvement of FOXO transcription factors, TRAIL-FASL/FAS, and sirtuin proteins family in canine coronavirus type II-induced apoptosis. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-11, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027313>> Acesso em: 23 nov. 2012.

MICHELIN, A. F., PERRI, S. H. V.; LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 105, p. 1–12, 2011.

NUNES, M. P.; ANDRADE, R. M.; LOPES, M. F.; DOS REIS, G. A. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected in hosts. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1313-1319, 1998.

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

RETHI, B.; EIDSMO, L. FASL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Front. Immun.**, n. 3, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2012.00163>>. Acesso em: 23 nov 2012.

RONG, S.; CAI, J. H.; ANDREWS, J. Cloning and apoptosis-inducing activities of canine and feline TRAIL. **Mol. Cancer Ther.**, v. 7, p. 2181-2191, 2008.

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

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

TASEW, G.; NYLÉN, S.; LIEKE, T.; LEMU, B.; MELESS, H.; RUFFIN, N.; WOLDAY, D.; ASSEFFA, A.; YAGITA, H.; BRITTON, H.; BRITTON, S.; AKUFFO, H.; CHIODI, F.; EIDSMO, L. Systemic FASL and TRAIL neutralization reduce leishmaniasis induced skin ulceration. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. 1-8, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000844>>. Acesso em: 23 nov. 2012.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8⁺ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion

develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite. Immunol.**, v. 25, p. 569-579, 2003.

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

WHO, Word Health Organization. **The first WHO report on neglected tropical disease: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.** 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2012.

WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; DEMISSIE, A.; BRITTON, S. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4+ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5258-64, 1999.