

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**FUNÇÃO DE PD-1 NA APOPTOSE DE LINFÓCITOS T
NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Vanessa Marim Chiku

Bióloga

ARAÇATUBA - SP
2015

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

**FUNÇÃO DE PD-1 NA APOPTOSE DE LINFÓCITOS T
NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Vanessa Marim Chiku

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

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

ARAÇATUBA – SP
2015

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

C435f Chiku, Vanessa Marim.
Função de PD-1 na apoptose de linfócitos T na leishmaniose visceral canina / Vanessa Marim Chiku. - Araçatuba, 2015
63 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Orientadora: Profa. Adjunto: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Leishmaniose 2. Cães 3. Anticorpos monoclonais
4. Leishmania infantum .I. T.

CDD 616.9364



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Função de PD-1 na apoptose de linfócitos T na Leishmaniose visceral canina

AUTORA: VANESSA MARIM CHIKU

ORIENTADORA: Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Alexandra Ivo de Medeiros
Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS

Cáris Maroni Nunes
Dra. CÁRIS MARONI NUNES

Valéria Marçal Felix de Lima
Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

DATA DA REALIZAÇÃO: 4 de dezembro de 2015.

Valéria Marçal Felix de Lima
Presidente da Comissão Examinadora
Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Vanessa Marim Chiku - nascida em 14 de maio de 1987, na cidade de Pereira Barreto/SP, graduada em Ciências Biológicas no ano de 2011 pela Universidade Estadual Paulista - UNESP – SP. Durante as atividades acadêmicas desenvolveu atividades tais como estágios extracurriculares, além de participar de simpósios. No ano de 2013 ingressou no programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) - UNESP, como aluna regular do programa de mestrado. Paralelo a estas atividades, desenvolveu projetos no Laboratório de Imunologia Celular. Em 2014 integralizou os créditos. Em 01 de outubro de 2015 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado “Função de PD-1 na apoptose de linfócitos T na leishmaniose visceral canina” o qual faz parte desta dissertação.

EPIGRAFE

***“Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não
fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança. ”
Albert Einstein***

***“As pessoas prudentes guardam sua sabedoria, enquanto os tolos
anunciam sua própria ignorância. ”
Proverbios 12:23***

DEDICATÓRIA

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

A todos os meus familiares, em especial meus pais, minha mãe Leontina, meu pai Mario e ao meu marido Adans que são a fortaleza da minha vida.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e orientadora pelo apoio, incentivo e amizade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Valéria Marçal Felix de Lima pelo companheirismo, amizade, paciência, dedicação, por me mostrar o caminho da aprendizagem. Muito obrigada pela oportunidade.

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

À minha banca de defesa de dissertação de mestrado, Profa. e orientadora Dra. Valéria Marçal Félix de Lima, Profa. Dra. Cárís Maroni Nunes e a Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros por aceitar o convite e pelas sugestões que contribuíram para melhorar o meu trabalho.

Aos doutorandos Kathlenn Silva e Breno Almeida por dividir comigo os conhecimentos adquiridos. As minhas amigas Gabriela Venturin, Aline Leal, Juliana Perosso, Flavia Yamamoto e Larissa Melo por todo companheirismo.

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

A direção da faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, a chefia do DCCRA e a todos os funcionários da unidade.

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

A minha família, meu pai Mario, minha mãe Leontina, minha avó Luiza, pelo carinho, torcida e apoio.

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

A FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa (processo no.2013/06684-9) e pela concessão da bolsa de mestrado (processo no. 2013/19399-0) e a CAPES.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1..... | 13 |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 13 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| REFERÊNCIAS | 23 |
| CAPÍTULO 2..... | 35 |
| FUNÇÃO DE PD-1 NA APOPTOSE DE LINFOCITOS T NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA | 36 |
| 1 Introdução..... | 38 |
| 2 Material e Métodos | 41 |
| 2.1 Aprovação do comitê de ética | 41 |
| 2.2 Animais | 41 |
| 2.3 Colheita das amostras..... | 42 |
| 2.4 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico e obtenção das células do baço..... | 42 |
| 2.5 Anticorpos | 43 |
| 2.6 Citometria de fluxo | 43 |
| 2.7 Cultura de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães infectados com bloqueio de PD-1, PD-L1, PD-L2..... | 44 |
| 2.8 Ensaio das citocinas TNF- α e IL-4 | 44 |
| 2.9 Dosagem de nitrito | 45 |
| 2.10 Quantificação da carga parasitária..... | 45 |
| 2.11 Análise estatística | 46 |
| 3 Resultados..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Avaliação da expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 em amostras de células mononucleares de sangue periférico e do baço de cães com LV e cães saudáveis..... | 46 |
| 3.2 Quantificação da apoptose em linfócitos T CD3+ provenientes de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães com LV na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1, PD-L1 e PD-L2 | 50 |
| 3.3 Determinação da concentração de óxido nítrico e citocinas TNF- α e IL-4 no sobrenadante de cultura das células mononucleares do sangue periférico e do baço em cães com LV após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes | 51 |
| 3.4 Carga parasitária em cultura de células mononucleares de sangue periférico em cães com LV na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores de PD-1 e seus ligantes..... | 54 |
| 4 Discussão | 54 |
| Agradecimentos | 59 |
| Referências..... | 59 |

FUNÇÃO DE PD-1 NA APOPTOSE DE LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO- Cães infectados com *Leishmania infantum*, apresentam uma redução do número de linfócitos T. PD-1(programmed cell death 1) um novo membro da família B7-CD28, é expresso por células do sistema imune e sua ligação a PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273) induz à desativação dos linfócitos T ou à apoptose. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de PD-1 e seus ligantes bem como sua função na indução de apoptose de linfócitos T, secreção de TNF- α e IL-4, óxido nítrico e na carga parasitária em cães com leishmaniose visceral. Observamos que na leishmaniose visceral canina PD-1 e seus ligantes participam na indução da apoptose celular de linfócitos T, estão regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-4, além da carga parasitária. Esse estudo ajuda a esclarecer o mecanismo da resposta imunológica e drogas imunoterapêuticas como anticorpos monoclonais bloqueadores que podem influenciar na LVC.

Palavras chave: Cães, anticorpos monoclonais, *Leishmania infantum*.

PD-1 FUNCTION IN APOPTOSIS OF T LYMPHOCYTES IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY- Dogs infected with *Leishmania infantum* showed a reduction in the number of lymphocytes T. PD-1 (*Programmed cell death 1*) a new member of the B7-CD28 family, it is expressed by cells of the immune system and its binding to PD-L1 (CD274) or PD-L2 (CD273) induces deactivation of T cells or apoptosis. This study aimed to evaluate the PD-1 expression and its ligands as well as their role in T lymphocyte induction of apoptosis, TNF- α and IL-4 secretion, nitric oxide production and parasite load in dogs with visceral leishmaniasis. We observed that in canine visceral leishmaniasis PD-1 and its ligands involved in induction of apoptosis of T lymphocytes, are regulating the nitric oxide production, TNF- α , IL-4, as well as the parasitic load. This study helps to clarify the mechanism of immune response and immunotherapeutic drugs such as blocking monoclonal antibodies that can influence the LVC.

Keywords: Dogs, monoclonal antibodies, *Leishmania infantum*.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem Kinetoplastida e família *Trypanosomatidae*. Durante o seu ciclo biológico, a *Leishmania* spp. apresenta-se sob a forma amastigota, sem flagelo externo, no interior de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado e sob a forma promastigota, com flagelo externo, no tubo digestivo do inseto vetor. Os agentes transmissores da leishmaniose visceral são insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, a principal espécie envolvida é a *Lutzomyia longipalpis* (DESJEUX, 2004).

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

As leishmanioses ocorrem em 88 países, dos quais 65 apresentam a forma visceral. Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as seis doenças tropicais mais importantes, a falta de tratamento causa a morte de 30% dos infectados e cerca de 50.000 pessoas morrem anualmente vítimas da infecção pelo parasito (WHO, 2010). A maioria dos casos (90%) de leishmaniose visceral (LV) em humanos ocorre em áreas rurais ou suburbanas de cinco países, incluindo o Brasil. No Brasil, como em outros países da América do Sul, a migração para as áreas urbanas contribuiu para a expansão da LV (DESJEUX, 2004), disseminando-se principalmente no Nordeste (DANTAS-TORRES, 2006) e áreas do Sudeste do país (SANTIAGO et al., 2007). O primeiro relato da ocorrência de leishmaniose visceral canina no

Estado de São Paulo ocorreu em 1998 na cidade de Araçatuba. Os dados do Ministério da Saúde mostram que na região Sudeste o número de casos quase dobrou de 2000 para 2011 (foram 314 a 592, respectivamente) e o mais alarmante é que o número de mortes foi quase seis vezes maior, saltando de 9 para 52 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Além da alta incidência e ampla distribuição, a expansão em novas áreas também carrega a ameaça de que as formas graves e letais da doença possam surgir quando associadas à desnutrição (GONTIJO; MELO, 2004) e co-infecção com HIV/AIDS (ASHFORD, 2000).

Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *L. chagasi* (MORENO; ALVAR, 2002). Nos cães, o parasito também é transmitido principalmente pela picada de flebotomíneos, mas há a possibilidade de transmissão por outros artrópodes como pulgas e carrapatos (FERREIRA et al., 2009; COUTINHO et al., 2007) e por transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001).

Os cães são importantes na manutenção do ciclo epidemiológico da LV devido a alguns fatores: a) leishmaniose visceral é mais prevalente na população canina que na humana; b) a infecção no homem normalmente é precedida por casos caninos; c) cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

A prevalência da leishmaniose em cães de áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990) e o intenso parasitismo cutâneo nos reservatórios facilita a infecção dos vetores (VERÇOSA et al., 2012). Outra característica particular da doença é a ineficácia do tratamento de cães infectados com cura clínica sem cura parasitológica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Além disso, alguns animais comportam-se como portadores assintomáticos da doença, cuja evolução de caráter crônico impossibilita a correta identificação dos doentes (DESJEUX, 2004).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita pode causar lesões e sinais que são característicos de leishmaniose visceral canina (LVC), embora alguns cães infectados possam ser oligossintomáticos ou assintomáticos (ALVAR, 2004) e outros possam evoluir para a cura espontânea (FISA et al., 1999). Os sinais mais frequentes de LVC são linfadenomegalia, onicogrifose, lesões cutâneas, perda de peso, caquexia e anormalidades locomotoras (SEMIÃO SANTOS et al., 1995). A forma assintomática representa 20 a 40% da população de cães soro-positivos, dos quais 80%, na verdade, desenvolvem a doença (NOLI, 1999). No Brasil, em áreas urbanas da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população canina soro-positiva (QUEIROZ et al., 2009).

Cães infectados apresentam aumento da quantidade de anticorpos circulantes, principalmente da classe IgG (PINELLI et al., 1994). Assim, visando o diagnóstico rápido para a doença, muitos testes sorológicos indiretos foram desenvolvidos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), a reação imunoenzimática (ELISA) e os dispositivos imunocromatográficos (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). O método sorológico de ELISA indireto tem sido comumente empregado para o diagnóstico da LVC por ser um teste sensível, pouco invasivo e por apresentar facilidades técnicas e econômicas (LIMA et al., 2003).

A detecção molecular do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido proposta como um método de diagnóstico seguro (SOLANO GALLEGGO et al., 2009) em sangue, pele, linfonodos, conjuntiva ou medula óssea de cães infectados. A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diferentes fatores, incluindo tipos de oligonucleotídeos iniciadores, número de cópias do alvo no DNA, método de extração de DNA, forma de biópsia e do tipo de material biológico analisado, bem como dos tipos de protocolo da PCR (FRANCINO et al., 2006; GONTIJO; MELO, 2004).

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da LVC. A ausência de resposta dos linfócitos T aos

antígenos de *Leishmania* spp. é observada *in vivo*, com um teste de Montenegro negativo (DOS SANTOS et al., 2008).

Nos cães, os linfócitos T são de fundamental importância na regulação da resposta imunológica ao parasito. A resistência à infecção está associada à ativação de linfócitos T CD4⁺ e uma resposta do tipo Th1 específica para *Leishmania* spp., induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, TNF α e IFN- γ que ativa os macrófagos, induzindo-os a fazer fagocitose e destruir o parasito (PINELLI et al., 1994). A ativação das células T CD4⁺ e o desencadeamento de uma resposta do tipo Th2 promove a liberação de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10...) que resulta no aumento da sobrevivência do parasito e no aparecimento das lesões nos cães infectados, principalmente devido às ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2000, PINELLI et al., 1994).

No baço de cães com LV, tem uma resposta mista do tipo Th1 (que leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ) e Th2 (produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10) tem sido verificada. Porém, a predominância de IL-10 pode estar contribuindo para inibição da produção de INF- γ e estar determinando o progresso da doença e dos sintomas aparentes nos cães com LV (CORRÊA et al., 2007). Assim como no extrato do baço de cães infectados foi observado um aumento dos níveis de TNF- α , IL-4 e IL-10, atribuindo a estas citocinas um importante papel na patogênese da LVC (MICHELIN et al., 2011).

Um dos processos associados à regulação da resposta imunológica na leishmaniose visceral é a apoptose. Cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam aumento da apoptose em linfócitos T, o que está diretamente relacionado à carga parasitária e tem influência na intensidade da resposta inflamatória e nas manifestações clínicas (VERÇOSA et al., 2012). De fato, *in vivo* cães com LV apresentaram maiores taxas de apoptose de linfócitos T no sangue periférico e no baço do que os cães saudáveis (LIMA et al., 2012). Além disso, alguns receptores envolvidos no processo apoptótico das células T já foram descritos em cães sintomáticos com leishmaniose como

Fas/FasL transmembrana (SILVA et al., 2013) e Fas/FasL solúvel (PEROSSO et al., 2014).

A doença crônica nos cães leva a altas taxas de apoptose dos linfócitos T no baço e no sangue periférico, esse mecanismo poderia contribuir para a desorganização da polpa branca do baço e diminuição dos níveis de linfócitos T no sangue periférico, prejudicando a resposta imune celular (LIMA et al., 2012). A proteção imunológica contra a infecção tem sido associada à resposta imunológica celular, manifestada por resposta linfoproliferativa positiva a antígenos de *Leishmania* spp. (CABRAL et al., 1992) e produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α , as quais são necessárias para ativação de macrófagos e morte de parasitos intracelulares (SADICK et al., 1991).

Os macrófagos têm papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp., pois são células parasitadas e, além disso, desencadeiam a resposta adaptativa podendo permitir ou não o crescimento do parasito (OSORIO et al., 2012). O óxido nítrico é uma importante molécula efetora, diretamente envolvida na atividade microbicida e citotóxica dos macrófagos humanos (PANARO et al., 2001) e camundongos (MAUËL et al., 1991). Sua produção já foi observada em sobrenadante de macrófagos caninos infectados *in vitro* com promastigotas de *L.infantum* (PANARO et al., 1998) e pode estar envolvido na proteção contra a infecção natural por *Leishmania* spp. (PANARO et al., 2008).

Linfócitos T respondem ao antígeno pelo engajamento do seu receptor TCR associado ao MHC no macrófago ligado ao peptídeo antigênico do parasito. A função efetora desta interação é determinada por sinais adicionais da ligação de moléculas co-estimulatórias. Dependendo da natureza e magnitude desses sinais, a célula produzirá citocinas ou desenvolverá funções regulatórias, citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007).

As moléculas co-estimulatórias pertencem a família B7-CD28, as quais transmitem sinais ativadores (CD28) ou inibidores (CTLA-4) para os linfócitos T (GREENWALD et al., 2005). Em macrófagos caninos infectados por

Leishmania spp. ocorre falha no processo de apresentação de antígenos, a análise da expressão das moléculas co-estimulatórias indica diminuição na expressão de B7 que reduz a proliferação dos linfócitos T (PINELLI et al., 1999) e diminui a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012).

Foi relatado que TNF- α aumenta a produção de óxido nítrico em macrófagos caninos (PINELLI, et al., 2000). O papel protetor de TNF- α foi observado no baço de cães com LV, em que fraca correlação negativa foi observada entre a expressão dessa citocina e carga parasitária esplênica (CAVALCANTI et al., 2015). Estudos sobre a resposta imunológica em cães experimentalmente infectados com *L. infantum* têm mostrado que a imunidade de proteção está associada com a produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α em células mononucleares de sangue periférico (MORENO; ALVAR, 2002).

Em outros modelos, como em camundongos infectados com *L. major*, a falta de TNF- α resultou na forma visceral da doença e morte rápida desses animais, por isso esta citocina se faz necessária para o controle da LV (WILHELM et al., 2001). TNF- α em sinergia com IFN- γ pode mediar a morte de *Leishmania major* através da indução de óxido nítrico (LIEW et al., 1990). A inibição da produção TNF- α por meio de anticorpos específicos neutralizou o efeito de IFN- γ . E foi evidente que o TNF- α é necessário para a transcrição da forma induzível da enzima óxido nítrico sintase (DRAPIER et al., 1989).

O papel da IL-4 na imunidade protetora na leishmaniose visceral é discutível. Embora em cães assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* uma relação positiva entre a detecção de IL-4 em linfonodos, sangue e pele tenha sido sugerida, o papel de IL-4 na LV permanece controverso, já que esta citocina permaneceu elevada ao longo do tempo no estudo (MANNA et al., 2006). Quinnel et al (2001) observou uma baixa produção de IL-4 em biopsias de medula óssea apenas em alguns cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, mas não em todos. A predominante expressão do gene de IL-4 no sangue de cães assintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania infantum* podem favorecer a replicação do parasito, ao passo que o equilíbrio entre a expressão de genes de citocinas

Th1 e Th2 podem ser importantes na redução da replicação do parasito retardando a difusão de *Leishmania* para outros órgãos (BARBOSA et al., 2011).

Contudo, IL-4 tem sido detectada em modelos de camundongos com LV. Camundongos knockout para IL-4 indicaram um papel essencial para essa citocina tanto na resistência natural quanto para quimioterapia bem-sucedida contra a LV (ALEXANDER et al., 2000). Em camundongos vacinados para LV o aumento da produção de IL-4 foi relacionado à produção de óxido nítrico em células do baço e na diminuição da progressão da doença (BASU et al., 2005).

Uma nova molécula co-estimulatória com função negativa, a molécula PD-1 (*programmed cell death 1*) também chamada CD279 ou B7-H1, foi descrita como membro da família B7-CD28 e é expressa pelas células do sistema imunológico (SHARPE et al., 2007). PD-1 é similar ao CTLA-4 que se liga a B7-1 e B7-2 e desenvolve papel crucial na homeostase de linfócitos T (SPERLING, et al., 1996; THOMPSON et al., 1997). Quando o PD-1 está associado a seus ligantes PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273), uma sequência inibitória contendo tirosina fosfatase 2 (SHP-2) na cauda de PD1 recruta fosfatases para desfosforilização das tirosinas na região citoplasmática (OKAZAKI et al., 2002), processo que pode induzir a desativação das células T ou à indução de apoptose (PARDOLL, 2012).

A expressão de PD-L1 é mais predominante que de PD-L2 e é induzida por IFN- γ , enquanto o PD-L2 tem expressão mais restrita à células dendríticas e macrófagos e é induzido por IL-4 e IL-13. Estudos com expressão na proteína de membrana sugerem que PD-L1 pode ter papel preferencial em regular a resposta Th1, enquanto PD-L2 parece regular a resposta Th2 (LOKE et al., 2003; LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008). Dessa forma, as funções de PD-L1 e PD-L2 dependem do tecido e das citocinas do microambiente (DULGERIAN et al., 2011).

Células tumorais humanas induzem a expressão de PD-1 em linfócitos T específicos suprimindo assim, o seu efeito ou função levando à exaustão de linfócitos T e resistência imunológica no microambiente tumoral (KEIR et al.,

2008; DONG et al., 2002). A expressão de PD-L1 em células tumorais humanas está associada com o comportamento tumoral agressivo, prognóstico desfavorável e elevado risco de morte (ZANG et al., 2007). Em modelo de camundongo com mieloma, o uso do anticorpo bloqueador PD-L1 inibiu o crescimento de células neoplásicas (IWAI et al., 2002). E o bloqueio de PD-1 inibiu a metástase em camundongos com melanoma (IWAI et al., 2005).

A molécula PD-1 também apresenta alta expressão durante infecções crônicas (MCNAB et al., 2011), podendo suprimir a função efetora dos linfócitos T CD8⁺ (DAY et al., 2006; TRAUTMANN et al., 2006), a secreção de citocinas TNF- α das células CD4⁺ (ZHANG et al., 2010; D'SOUZA et al., 2007) e levar a uma disfunção imunológica (D'SOUZA et al., 2007).

Alguns achados sugerem que a via PD-1/PDL1 tem papel importante na interação hospedeiro e patógeno que envolve a resistência a infecção. Esses patógenos incluem vírus (MULHBAUER et al., 2006), bactérias (YAO et al., 2009), fungos (LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008), protozoários (DULGERIAN et al., 2011; ESCH et al., 2013) e helmintos intestinais (SMITH et al., 2004).

Em camundongos sem infecção, estudos *in vitro* demonstram que a ligação de PD-1 a seus ligantes inibe a transdução de sinal de TCR para proliferação de linfócitos T e produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4, e IL-2 (FREEMAN et al., 2000; LATCHMAN et al., 2001).

Em macrófagos de camundongos infectados com *T. cruzi* tratados com anticorpo bloqueador anti-PD-L2 também houve aumento nos níveis de IFN- γ , IL-10 e óxido nítrico (DULGERIAN et al., 2011). Em camundongos com infecção crônica pelo vírus da coriomeningite linfocítica, os linfócitos T se tornaram funcionalmente superiores após o tratamento de anticorpo monoclonal bloqueador de PD-L1, produzindo mais IFN- γ e TNF- α (BARBER et al., 2006). Em linfócitos de pacientes com hepatite crônica viral, a diminuição da expressão de PD-1 estava associada ao aumento da produção de TNF- α (ZHANG et al., 2015).

Levando-se em consideração que a supressão imunológica observada em cães com LV pode estar relacionada com o mecanismo de apoptose dos

linfócitos T, poucos estudos têm avaliado os mecanismos da apoptose de linfócitos T na LVC. A estimulação antigênica constante desta infecção crônica poderia desencadear a apoptose e contribuir para o insucesso da imunidade celular. Já foi observado que cães sintomáticos com LV há aumento da expressão de PD-1 em células do sangue periférico e que o bloqueio da via PD-1/PD-L1 pode restaurar a proliferação de células CD4⁺ e CD8⁺ e diminuir a carga parasitária (ESCH et al., 2013).

O papel das moléculas PD-1 e seus ligantes ainda não foi adequadamente caracterizado na LVC. A investigação destes parâmetros pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na apoptose de linfócitos T e na supressão da imunidade celular em cães com LV.

OBJETIVOS

Investigar se o bloqueio *in vitro* da molécula PD-1 e seus ligantes modula a atividade apoptótica de linfócitos T, a produção de óxido nítrico, das citocinas TNF- α , IL-4 e a carga parasitária em células mononucleares de sangue periférico e baço de cães com LV.

REFERÊNCIAS

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

ALEXANDER, J.; CARTER, K.C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v.30, p.2935-2943, 2000.

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

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.1269–1281, 2000.

BARBER, D.L.; WHERRY, E.J.; MASOPUST, D.; ZHU, B., ALLISON, J.P.; SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J.; AHMED, R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, v.439, p.682-687, 2006.

BARBOSA, M.A.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; DE BRITO, T.V.; DA FONSECA, I.P.; ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J. Comp. Pathol.**, v.145, p.336-344, 2011.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J.M.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.174, p.7171, 2005.

CABRAL, M.; GRADY, J. O.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v.14, p.531-539, 1992.

CAVALCANTI, A.S.; RIBEIRO-ALVES, M.; PEREIRA, L.E.O.; MESTRE, G.L.; FERREIRA, A.B.; MORGADO, F.N.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E.; MORAES, M.O.; PORROZZI, R. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **PLoS One.**, v.10, p.e0123009, 2015.

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

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.**, v.147, p.320-325, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med.trop. São Paulo**, v.48, p.219-221, 2006.

DAY, C.L.; KAUFMANN, D. E.; KIEPIELA, P.; BROWN, J.A.; MOODLEY, E. S.; REDDY, S.; MACKAY, E. W.; MILLER, J. D.; LESLIE, A. J.; DEPIERRES, C.; MNCUBE, Z.; DURAISWAMY, J.; ZHU, B.; EICHBAUM, Q.; ALTFELD, M.; WHERRY, E. J.; COOVADIA, H. M.; GOULDER, P. J.; KLENERMAN, P.; AHMED, R.; FREEMAN, G. J.; WALKER, B. D. PD-1 expression on HIV specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v.21, p.350-354, 2006.

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

DIAZ, S.; DA FONSECA, I. P.; RODRIGUES, A.; MARTINS, C.; CARTAXEIRO, C.; SILVA, M. J.; DE BRITO, T. V.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SANTOSGOMES, G. M. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol.**, v.26; p.137-144, 2012.

DONG, H.; STROME, S.E.; SALOMAO, D.R.; TAMURA, H.; HIRANO, F.; FLIES, D.B.; ROCHE, P.C.; LU, J.; ZHU, G.; TAMADA, K.; LENNON, V.A.; CELIS, E.; CHEN, L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat. Med.**, v.8, p.793-800, 2002.

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 *leishmania* skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.123, p.251-259, 2008.

DRAPIER, J. C.; WIETZERBIN, J; HIBBS, J. B. Interferon-g and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **Eur. J. Immuno.**, v.18, p.1587–1592, 1989.

D'SOUZA, M.; FONTENOT, A. P.; MACK, D. G.; LOZUPONE, C.; DILLON, S.; MEDITZ, A.; WILSON, C. C.; CONNICK, E.; PALMER, B. E. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. **J. Immunol.**, v.179, p.1979-1987, 2007.

DULGERIAN, L. R.; GARRIDO, V. V.; STEMPIN, C. C.; CERBÁN, F. M. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies

Trypanossoma cruzi survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v.133, p.29–40, 2011.

ESCH, K.J.; JUELSGAARD, R.; MARTINEZ, P.A.; JONES, D.E.; PETERSEN, C.A. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J. Immunol.**, v.191, p.5542-5550, 2013.

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

FISA, R.; GÁLLEGO, M.; CASTILLEJO, S.; AISA, M. J.; SERRA, T.; RIERA, C.; CARRIÓ, J.; GÁLLEGO, J.; PORTÚS, M. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v.83, p. 87-97, 1999.

FRANCINO, O.; ALTET, E.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, 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.

FREEMAN, G.J.; LONG, A.J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L.J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M.C.; HORTON, H.F.; FOUSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M.R.; CARRENO, B.M.; COLLINS, M.; WOOD, C.R.; HONJO, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J. Exp. Med.**, v.192, p.1027-1034, 2000.

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.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annu. Rev. Immunol.**, v.23, p.515–548, 2005.

IWAI, Y.; TERAWAKI, S.; HONJO, T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. **Int. Immunol.**, v.17, p.133-144, 2005.

IWAI, Y.; ISHIDA, M.; TANAKA, Y.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; MINATO, N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 99, p.12293-12297, 2002.

KEIR, M.E.; BUTTE, M.J.; FREEMAN, G.J.; SHARPE, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v.26, p.677-704, 2008.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C.R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D.; BORDE, M.; CHERNOVA, I.; IWAI, Y.; LONG, A.J.; BROWN, J.A.; NUNES, R.; GREENFIELD, E.A.; BOURQUE, K.; BOUSSIOTIS, V.A.; CARTER, L.L.; CARRENO, B.M.; MALENKOVICH, N.; NISHIMURA, H.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol.**, v.2 , p.261-268, 2001.

LÁZÁR-MOLNÁR, E.; YAN, Q.; CAO, E.; RAMAGOPAL, U.; NATHENSON, S. G.; ALMO, S. C. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v.105, p.10483-10488, 2008.

LIEW, F.Y., LI, Y., MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J. Immunol.**, v.145, p.4306-4310, 1990.

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

LIMA, V. M. ; 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.

LOKE, P'N.; ALLISON, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.100, p.5336–5341, 2003.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; FOGLIA MANZILLO, V.; PAVONE, L.M.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.142, p.271-280, 2006.

MAUËL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J. Leukoc. Biol.**, v.49, p.73-82; 1991.

MCNAB, F. W.; BERRY, M. P. R.; GRAHAM, C. M.; BLOCH, S. A. A.; WILKINSON, J.; KON, O.M.; BANCHEREAU, J.; CHAUSSABEL, D.; O'GARRA, A. Programmed death ligand 1 is over- expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. **Eur. J. Immunol.**, v.41, p.1941-1947, 2011.

MICHELIN, F. A.; PERRI, S.H.V.; LIMA, V.M.F. Evaluation of TNF-alpha, IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.105, p.373-383, 2011.

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 out 2015.

MORENO, J.; ALVAR J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends. Parasitol.**, v.18, p.399–405, 2002.

MÜHLBAUER, M.; FLECK, M.; SCHÜTZ, C.; WEISS, T.; FROH, M.; BLANK, C.; SCHÖLMERICH, J.; HELLERBRAND, C. PDL1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and - gamma and mediates T cell apoptosis. **J. Hepatol.**, v.45, p.520-528, 2006.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v.2, p.16-24, 1999.

OKAZAKI, T.; MAEDA, A.; NISHIMURA, H.; KUROSAKI, T.; HONJO, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13866-13871; 2002.

OSORIO, E.Y.; ZHAO, W.; ESPITIA, C.; SALDARRIAGA, O.; HAWEL, L.; BYUS, C.V.; TRAVI, B.L.; MELBY, P.C. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PLoS Pathog.**, v.8, p.e1002417, 2012.

OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT K.; HATCHETT, W.; WALTON R.; NOLAN, T.J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.219, p.1076–1083, 2001.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; DE 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.10, 2008.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. **Clin. Exp. Med.**, v.1, p.137-143, 2001.

PANARO, M.A.; LISI, S.; MITOLO, V.; ACQUAFREDDA, A.; FASANELLA, A.; CARELLI, M.G.; BRANDONISIO, O. Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. **Cytobios**, v.95, p.151-160; 1998.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v.22, p.252-264, 2012.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN L.; PARDOLL, D.M.; LLISON, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p.17765-70, 2007.

PEROSSO, J.; SILVA, K.L.; FERREIRA, S.; AVANÇO, S.V.; DOS SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.E.R.; DE ALMEIDA, B.F.; DE LIMA, V.M. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.205, p.417-420, 2014.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v.67, p. 237-43, 1999.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v.62, p.229-335, 1994.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v.92, p.181; 2000.

QUEIROZ, P. V. S.; MONTEIRO, G. R. G.; MACEDO, V. P.S.; ROCHA, M. A. C.; BATISTA, L. M. M.; QUEIROZ, J. W.; JERÔNIMO, S. M. B.; XIMENES, M. F. F. M. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Res. Vet. Sci.**, v.86, p.267-273, 2009.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.1421-1424, 2001.

SADICK, M. D.; STREET N.; MOSMANN, T. R.; LOCKSLEY, R. M. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v.59, p.4710-4714, 1991.

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

SANTIAGO, M. E. B.; VASCONCELOS, R. O.; FATTORI, K. R.; PRADO, M. D.; MICHELIN A. F.; LIMA, V. M. F. An investigation of *Leishmania* spp. In *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil), **Vet. Parasitol.**, v.150, p.283-290, 2007.

SEMIÃO-SANTOS, S. J.; EL HARITH, A.; FERREIRA, E.; PIRES, C. A.; SOUSA, C.; GUSMÃO, R. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol. Res.**, v.81, p.235-239, 1995.

SILVA, K.L.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B.B.; SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.E.R.; LIMA, V.M. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v.197, p. 470-476, 2013.

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

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**, Philadelphia: W.B. Saunders, 1990, p.450-458.

SMITH, P.; WALSH, C.M.; MANGAN, N.E.; FALLON, R.E.; SAYERS, J.R.; MCKENZIE, A.N.; FALLON, P.G. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. **J. Immunol.**, v.173, p.1240-1248, 2004.

SPERLING, A.I.; BLUESTONE, J.A. The complexities of T-cell costimulation: CD28 and beyond. **Immunol. Rev.**, v.153, p.155–182, 1996.

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

THOMPSON, C.B.; ALLISON, J.P. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. **Immunity**, v.7, p.445–450, 1997.

TRAUTMANN, L.; JANBAZIAN, L.; CHOMONT, N.; SAID, E. A.; GIMMIG, S.; BESSETTE, B.; BOULASSEL, M. R.; DELWART, E.; SEPULVEDA, H.; BALDERAS, R. S.; ROUTY, J. P.; HADDAD, E. K.; SEKALY, R. P. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nat. Med.**, v.12, p.1198-1202, 2006.

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

WILHELM, P.; RITTER, U.; LABBOW, S.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C.; KÖRNER, H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **J. Immunol.**, v.166, p.4012-4019, 2001.

WHO, World 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: 15 Agosto 2015.

YAO, S.; WANG, S.; ZHU, Y.; LUO, L.; ZHU, G.; FLIES, S.; XU, H.; RUFF, W.; BROADWATER, M.; CHOI, IH.; TAMADA, K.; CHEN, L. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. **Blood**, v.113, p.5811-5818, 2009.

ZANG, X.; ALLISON, J.P. The B7 family and cancer therapy: costimulation and coinhibition. **Clin. Cancer Res.**, v.13, p.5271-5279, 2007.

ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; LOU, J.; LI, J.; BO, L.; ZHU, K.; WAN, X.; DENG, X.; CAI, Z.; PDL1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. **Crit. Care**, v.14, p. 220, 2010.

ZHANG, G.; LI, N.; LI, Z.; ZHU, Q.; LI, F.; YANG, C.; HAN, Q.; LV, Y.; ZHOU, Z.; LIU, Z. MicroRNA-4717 differentially interacts with its polymorphic target in the PD1 3' untranslated region: A mechanism for regulating PD-1 expression and function in HBV-associated liver diseases. **Oncotarget**, v.6, p.18933-18944, 2015.

CAPÍTULO 2

FUNÇÃO DE PD-1 NA APOPTOSE DE LINFÓCITOS T NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO - Cães infectados com *Leishmania infantum* apresentam uma redução do número de linfócitos T. PD-1 (*programmed cell death 1*) um novo membro da família B7-CD28, é expresso por células do sistema imune e sua ligação a PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273) induz à desativação dos linfócitos T ou à apoptose. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de PD-1 e seus ligantes, bem como sua função na indução da apoptose de linfócitos T, secreção de TNF- α e IL-4, produção de óxido nítrico e relação com a carga parasitária em cães com leishmaniose visceral (LV). Nossos resultados mostraram que a expressão de PD-1 e seus ligantes foi maior em linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺ nas células mononucleares de sangue periférico e no baço de cães com LV. Nos monócitos de sangue periférico somente os ligantes de PD-1 apresentaram maior expressão, porém nos macrófagos do baço uma maior expressão de PD-1 e ligantes foi observada. A detecção da apoptose em linfócitos T do sangue periférico e baço foi maior em cães com LV comparado aos saudáveis. Os anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1 e seus ligantes na cultura de células mononucleares do sangue periférico e do baço diminuíram a apoptose de linfócitos T CD3⁺. A concentração de óxido nítrico, TNF- α e IL-4 aumentaram no sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1. A concentração de TNF- α aumentou no sobrenadante da cultura de baço em todos os tratamentos com anticorpos bloqueadores de PD-1 e seus ligantes, porém, a quantidade de IL-4 aumentou somente na presença do bloqueador PD-1. O tratamento com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 em mononucleares do sangue periférico de cães com LV reduziu a carga parasitária. Concluimos que na leishmaniose visceral canina PD-1 e seus ligantes participam na indução da apoptose celular de linfócitos T, estão regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-4, além da carga parasitária.

Palavras-chave: Cães, anticorpos monoclonais, *Leishmania infantum*.

1 Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é considerada uma das mais importantes zoonoses parasitárias 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, a falta de tratamento causa a morte de 30% dos infectados e cerca de 50.000 pessoas morrem anualmente vítimas da infecção pelo parasito (WHO, 2010). No Brasil, foi reportado entre 2003-2007 aumento da incidência anual estimada de 4.200 para 6.300 casos de LV enquanto no mundo houve um aumento na estimativa anual de incidência de 202.200 para 389.100 casos de LV (ALVAR et al., 2012).

Casos de leishmaniose visceral canina (LVC) têm sido associados ao aumento de casos em humanos (COURA-VITAL et al., 2011; NUNES et al., 2010) e o intenso parasitismo cutâneo nos reservatórios caninos facilita a infecção dos vetores (VERÇOSA et al., 2012).

No cão, a supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença. A ausência de resposta dos linfócitos T aos antígenos de *Leishmania* spp. é observada *in vivo* com um teste de Montenegro negativo (DOS-SANTOS et al., 2008). Os cães infectados com *Leishmania infantum* apresentam uma redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU et al., 1997) e desorganização da polpa branca do baço (SANTANA et al., 2008).

A doença crônica nos cães leva à altas taxas de apoptose dos linfócitos T no baço e no sangue periférico, esse mecanismo pode contribuir para a desorganização da polpa branca do baço e diminuição dos níveis de linfócitos T no sangue periférico (LIMA et al., 2012). Na LVC, a imunidade protetora tem geralmente sido associada com resposta imunológica celular manifestada por resposta linfoproliferativa positiva a antígenos de *Leishmania* spp. (CABRAL et al., 1992).

Os macrófagos têm papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp., pois além de serem as células parasitadas, também são responsáveis pela resposta adaptativa. Sinais co-estimulatórios têm sido descritos como importantes reguladores da resposta adaptativa, gerando funções citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007). As moléculas co-estimulatórias pertencem a família B7-CD28, as quais transmitem sinais ativadores (CD28) ou inibidores (CTLA-4) para os linfócitos T (GREENWALD et al., 2005). Em macrófagos caninos infectados por *Leishmania* spp. ocorre falha no processo de apresentação de antígenos e a análise da expressão das moléculas co-estimulatórias indica diminuição na expressão de B7, o que reduz a proliferação dos linfócitos T (PINELLI et al., 1999) e diminui a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012).

Foi descrita uma nova molécula co-estimulatória com função negativa, a molécula PD-1 (*programmed cell death 1*), ou (CD279) um novo membro da família B7-CD28 e é expressa por células do sistema imune (SHARPE et al., 2007). Quando PD-1 está associado a seus ligantes PD-L1 (CD274) ou PD-L2 (CD273), uma sequência inibitória contendo tirosina na cauda de PD-1 recruta fosfatases que induzem a desativação dos linfócitos T ou a indução de apoptose, ou mesmo outras respostas que são importantes para manter o balanço entre o desenvolvimento de imunidade, tolerância e imunopatologias (PARDOLL, 2012).

A molécula PD-1 é altamente expressa em infecções crônicas (MCNAB et al., 2011), o que pode suprimir a função efetora dos linfócitos T CD8⁺ (DAY et al., 2006; TRAUTMANN et al., 2006), a secreção de citocinas TNF- α das células CD4⁺ (ZHANG et al., 2010; D'SOUZA et al., 2007) e levar a uma disfunção imunológica (D'SOUZA et al., 2007). Citocinas como IFN- γ e TNF- α , são produzidas em grandes quantidades em resposta à infecção de *T. cruzi* e desempenham um papel na produção de óxido nítrico e morte do parasito (SILVA, et al., 1995). A expressão de PD-L1 em macrófagos de camundongos sem infecção pode controlar a produção de óxido nítrico (YAMAZAKI et al., 2005).

A expressão de PD-L1 é mais ampla que a de PD-L2 e é induzida por IFN- γ , enquanto o PD-L2 tem expressão mais restrita à células dendríticas e macrófagos e é induzido por IL-4 e IL-13. Estudos com expressão sugerem que PD-L1 pode ter papel preferencial em regular a resposta Th1, enquanto PD-L2 pode regular a resposta Th2 (LOKE et al., 2003, LÁZÁR-MOLNÁR et al., 2008). Desta forma, a função de PD-L1 e PD-L2 pode depender do tecido e das citocinas do microambiente (DULGERIAN et al., 2011). Em cães há somente um estudo que avaliou a expressão de PD-1 em células CD4⁺ e CD8⁺ na LV (ESCH et al., 2013).

Em modelo experimental de sepse em camundongos o uso de anticorpos bloqueadores de PD-L1 diminuiu a apoptose de linfócitos T no baço, indicando que o bloqueio de PD-L1 pode inibir a apoptose de linfócitos T (ZHANG et al., 2010). Em humanos, a apoptose de linfócitos T antígeno específica foi associada ao aumento da expressão de PD-L1 nas células tumorais (DONG et al., 2002). A expressão de PD-L1 na superfície de hepatócitos humanos foi apontada como um mediador de apoptose de linfócitos T (MULHBAUER et al., 2006).

Na LVC, o bloqueio de PD-1/PD-L1 em células aderentes restaurou a proliferação celular de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico (ESCH et al., 2013). Porém, não se investigou a participação dos receptores PD-1 e seus ligantes na apoptose celular e mediadores inflamatórios. Assim avaliou-se em cães sintomáticos com LV a função de PD-1 e seus ligantes pode regular a apoptose de linfócitos T, produção de óxido nítrico, das citocinas TNF- α e IL-4, bem como influenciar a carga parasitária. Nosso estudo esclarece aspectos da apoptose de linfócitos T e da fisiopatogenia da doença em cães sintomáticos para LV que podem ser úteis em estratégias preventivas e terapêuticas para diminuição da incidência de leishmanioses em cães.

2 Material 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 Animais

Foram selecionados 20 cães adultos naturalmente acometidos por leishmaniose visceral (LV) entre dois e cinco anos de idade, de várias raças e pesos. Os cães foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba e eram soropositivos para o antígeno *L. infantum* segundo metodologia de ELISA indireto (LIMA et al., 2003). Todos os cães eram sintomáticos e apresentavam pelo menos três dos seguintes sinais clínicos da LV: onicogrifose, linfadenomegalia, hepato e esplenomegalia, caquexia, alopecia geral, lesões cutâneas e periocular. Os cães com LV apresentaram doença no estágio moderado (grau II) de acordo com as alterações bioquímicas e foram classificados com base em um exame físico e nos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, determinado por ELISA indireto (LIMA et al., 2003), como proposto por (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Para composição do grupo controle foram selecionados 10 animais clinicamente saudáveis (6 fêmeas e 4 machos com idade média de 3,4 anos), sem alterações hematológicas, bioquímica plasmática (albumina, alanina aminotransferase-ALT, aspartato aminotransferase-AST, bilirrubina total, direta e indireta, cálcio, colesterol total, creatina quinase-CK, creatinina, fosfatase alcalina-FA, fósforo, gama glutamil transferase-GGT, glicose, globulinas, lactato desidrogenase-LDH, proteína total, triglicerídeos e ureia) e na urinálise tipo I. Todos apresentaram densidade óptica (DO) compatível com animais não reagentes na sorologia por ELISA indireto para diagnóstico da LVC (LIMA et

al., 2003). Esses animais foram acompanhados clinicamente e tiveram a DO do exame sorológico monitorada por pelo menos três meses antes do experimento. A amplificação de fragmento de DNA de *Leishmania* spp. não foi detectado em amostras de baço e medula óssea por q-PCR (PEROSSO et al., 2014).

2.3 Colheita das amostras

Os cães com LV foram submetidos à eutanásia com anestesia intravenosa de barbitúricos (Tiopental, Cristália Itapira, SP) seguida por infusão de cloreto de potássio 19,1% de acordo com a lei estadual (São Paulo, 2006). Após a eutanásia, fragmentos do baço foram coletados e mantidos em meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Waltham, MA, EUA) inativado pelo calor, 0,03% L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 100 UI/ml de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 100 mg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As amostras de baço do grupo controle foram obtidas por excisão cirúrgica utilizando protocolo descrito por (LIMA et al., 2012).

As amostras de sangue (10 mL) foram obtidas por punção da veia jugular e acondicionadas em tubos contendo heparina sódica (BD, San Diego, CA, EUA) sendo processadas imediatamente após a colheita.

2.4 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico e obtenção das células do baço

As células mononucleares do sangue periférico de cães saudáveis e cães com LV, foram isoladas por gradiente de Histopaque®1077 e 1119 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida, as células isoladas foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2 e ressuspensas em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado como anteriormente descrito e mantidas a 37°C com 5% CO₂ (Revco, Waltham, MA, EUA).

As células totais do baço foram obtidos de um fragmento de 2cm² que foi macerado e adicionado a 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado como descrito anteriormente. Após a retirada dos “debris” celulares (BD Falcon Cell strainer, San Diego, CA, EUA) a suspensão foi processada com 5 mL de tampão de lise contendo 7,46 g/L de cloreto de amônio (NH₄ClO₃) a 4°C por 10 min., centrifugado a 2.000 rpm por 5 minutos e lavadas com solução salina tamponada com fosfato em pH 7,2 por três vezes.

Para a citometria de fluxo as células foram processadas imediatamente após sua separação; já para as culturas celulares elas foram incubadas a 37°C em câmara de CO₂ a 5% por 72 horas.

2.5 Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpos monoclonais conjugados a FITC: anti-CD3⁺ canino (5µL/mL; Serotec, Kidlington, OX, UK), anti-CD21⁺ canino (15µL/mL; Exbio, CzechRepublic) e anti-F4/80⁺(5µL/mL; Abcam, CA, UK) (DIAZ, et al., 2012) e isotipos controles (0,05µL/mL; BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e anticorpos monoclonais conjugados a PE: Anti-Humano CD279 (PD-1), a proteína PD1 apresenta alta grau de homologia entre as espécies canina e humana (FOLKL et al., 2010), anti-humano CD274 (PD-L1), anti-humano CD273 (PD-L2),(15µL/mL; BD Biosciences, San Diego, CA, EUA),e isotipos controles. Anticorpos monoclonais bloqueadores anti-humano CD279 (PD-1), anti-humano CD273 (B7-DC) e anti-camundongo CD274 (B7-H1), (5µL/mL; eBioscience,San Diego, CA, EUA).

2.6 Citometria de fluxo

Para a marcação com fluorocromos, as células foram suspensas em PBS contendo albumina sérica bovina 1 %, azida 0,1% e soro fetal bovino 20% para o bloqueio dos receptores Fc (FcR). As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais por 30 minutos à 4°C, foram lavadas duas vezes com PBS contendo 2% de soro fetal bovino, mantidas a 4°C no escuro até aquisição em citômetro de fluxo (BD Accuri C5 Flow Cytometer, San Diego, CA, EUA) e

análise em software específico (BD Accuri C6 software. Version 1.0.264.21) para quantificação das expressões de PD-1, PD-L1, PD-L2, CD3⁺, CD21⁺ e F4/80⁺. Foram adquiridos 10.000 eventos com exclusão dos “debris” celulares. Isotipos controles (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) foram utilizados para delimitar as populações negativas das células duplamente coradas com PE/FITC.

2.7 Cultura de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães infectados com bloqueio de PD-1, PD-L1, PD-L2

Cerca de 5×10^6 células mononucleares de sangue periférico e do baço de cães com LV foram suspensas em 1 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado como anteriormente descrito, foram cultivadas em placas de 24 poços (Costar) na presença de 5 µg/mL de anticorpos bloqueadores de PD-1, PD-L1 e PD-L2 (DULGERIAN et al., 2011) e isotipos controles. As culturas foram incubadas a 37°C em câmara de CO₂ a 5% por 72 horas. As células foram utilizadas para avaliação da apoptose dos linfócitos TCD3⁺, e os sobrenadantes das culturas foram centrifugados a 2.500 rpm e conservados a – 80°C para a dosagem de citocinas TNF-α e IL-4, e - 20°C para avaliação do óxido nítrico. A porcentagem de apoptose de linfócitos T CD3⁺ foi determinada com reagente comercial Guava Nexin kit (Millipore, Darmstadt, Germany), seguindo-se as instruções do fabricante. A análise da citometria foi realizada como anteriormente descrita. Foram consideradas células em apoptose final positivas para o corante 7-AAD e Anexina-V-PE.

2.8 Ensaio de citocinas TNF-α e IL-4

Os níveis de TNF-α e IL-4 foram determinados nos sobrenadantes das culturas de células mononucleares do sangue periférico e do baço após centrifugação 2.000 rpm por 5 minutos por meio do teste ELISA de captura (R&D System, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A

densidade óptica foi obtida em leitor de placa de 96 poços (Spectra Count, Packard Bio Science Company, Meriden, CT, EUA) em 450 nm.

2.9 Dosagem de Nitrito

A dosagem de óxido nítrico foi realizada pelo método de Griess (DULGERIAN et al., 2011) nos sobrenadantes das culturas de células do sangue e baço. Para isso, 100 µL de sobrenadante de cultura foram adicionados a 100 µL do reagente de Griess (uma parte de NEED 0,1% e uma parte de sulfanilamida 1% em ácido fosfórico- H_3PO_4). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica foi obtida em leitor de placa de 96 poços (Spectra Count, Packard Bio Science Company, Meriden, CT, EUA) em 540 nm. A concentração de óxido nítrico foi obtida após comparação à curva padrão de nitrito de sódio, variando de 200 a 3 µM.

2.10 Quantificação da carga parasitária

Células mononucleares do sangue periférico (5×10^6) de cães com LV foram suspensas em meio RPMI 1640 (Gibco, Waltham, MA, EUA) suplementado conforme descrito anteriormente. As células foram cultivadas em placas de cultura estéreis de 24 poços (Costar) contendo lamínulas circulares de vidro de 15 mm de diâmetro estéreis e livres de lipopolissacarídeos (Perfecta Lamínulas, São Paulo, SP, Brasil) na presença ou não de 5 µg/mL de anticorpos monoclonais bloqueadores de PD-1, PD-L1 e PD-L2. Após 5 dias de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , as lamínulas foram raspadas e as células citocentrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com corante hematológico comercial (Instant-Prov, Newprov, Pinhais, PR, Brasil) para contagem de parasitos no interior de macrófagos. Pelo menos 100 células foram contadas em microscopia de luz para determinação da taxa de infecção dos macrófagos (Eclipse E800, Nikon, Tokyo, JP), diferenciando células parasitadas de não parasitadas, enquanto a

carga parasitária foi determinada após divisão do número de amastigotas pelo número de macrófagos infectados.

2.11 Análise estatística

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado para comparar expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 em linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD21⁺ e células F4/80⁺ de células mononucleares do sangue periférico e do baço na apoptose para linfócitos T CD3⁺ em cães com LV e cães saudáveis. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para comparar os níveis de apoptose de linfócitos TCD3⁺, a dosagem das citocinas TNF- α , IL-4 e do óxido nítrico. O teste T paramétrico foi utilizado para a análise da carga parasitaria em células mononucleares do sangue periférico de cães com LV. A análise estatística e os gráficos foram elaborados utilizando o programa computacional GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc. CA. EUA), considerando-se significativa a diferença entre as médias quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 Avaliação da expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 em amostras de células mononucleares de sangue periférico e do baço de cães com LV e cães saudáveis

Nossa hipótese foi avaliar se a infecção crônica por *Leishmania* spp. em cães altera a expressão de PD-1 e seus ligantes em linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD21⁺ e monócitos/macrófagos F4/80⁺ de células mononucleares do sangue periférico e do baço. Foi observado aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes PD-L1/PD-L2 ($p < 0,05$) em linfócitos T CD3⁺ (Figura 1A), linfócitos B CD21⁺ (Figura 1B) em células mononucleares do sangue periférico de cães com LV, nos monócitos F4/80⁺ apenas os ligantes PD-L1 e PD-L2 apresentaram aumento significativo de expressão (Figura 1C). Linfócitos T

CD3⁺, linfócitos B CD21⁺ e macrófagos F4/80⁺ do baço, apresentaram maior expressão de PD-1 e ligantes nos cães com LV ($p < 0,05$) (Figura 1D, 1E e 1F respectivamente).

Figura representativa da detecção da dupla marcação de linfócitos T CD3⁺/PD-1, CD3⁺/PD-L1, CD3⁺/PD-L2 em células mononucleares do sangue periférico (Figura 2A, 2B e 2C) e do baço (Figura 2D, 2E e 2F).

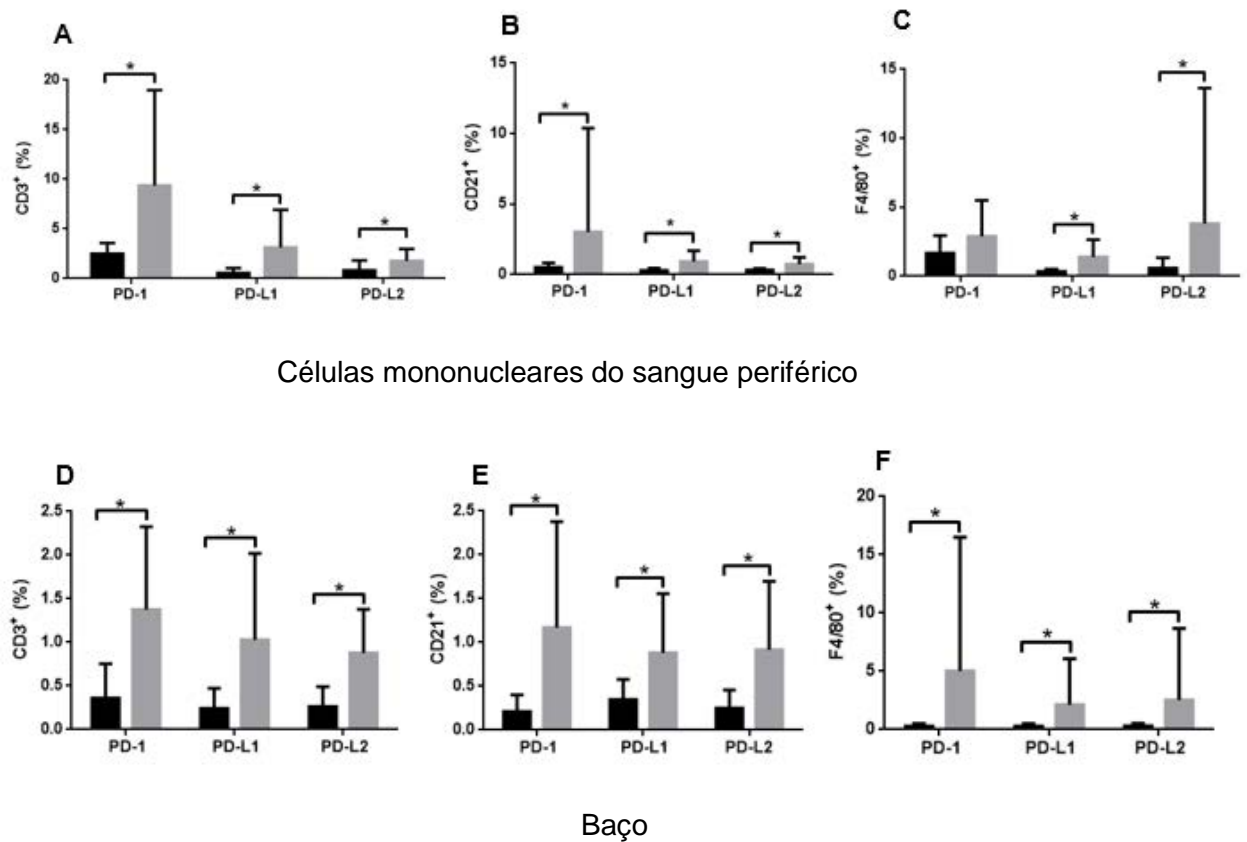


FIGURA 1 - Expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 em linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD21⁺ e monócitos/macrófagos F4/80⁺ de células mononucleares do sangue periférico e do baço em cães com LV (barras cinzas) e cães saudáveis (barras pretas). (A) linfócitos T CD3⁺, (B) linfócitos B CD21⁺ e (C) monócitos F4/80⁺ sanguíneos. (D) Linfócitos T CD3⁺, (E) linfócitos B CD21⁺ e (F) macrófagos F4/80⁺ esplênicos. Todos os experimentos incluem 26 cães, 10 cães saudáveis e 16 cães com LV. Dados gráficos apresentados com média e desvio-padrão; * $p < 0,05$ teste Mann Whitney (A-F).

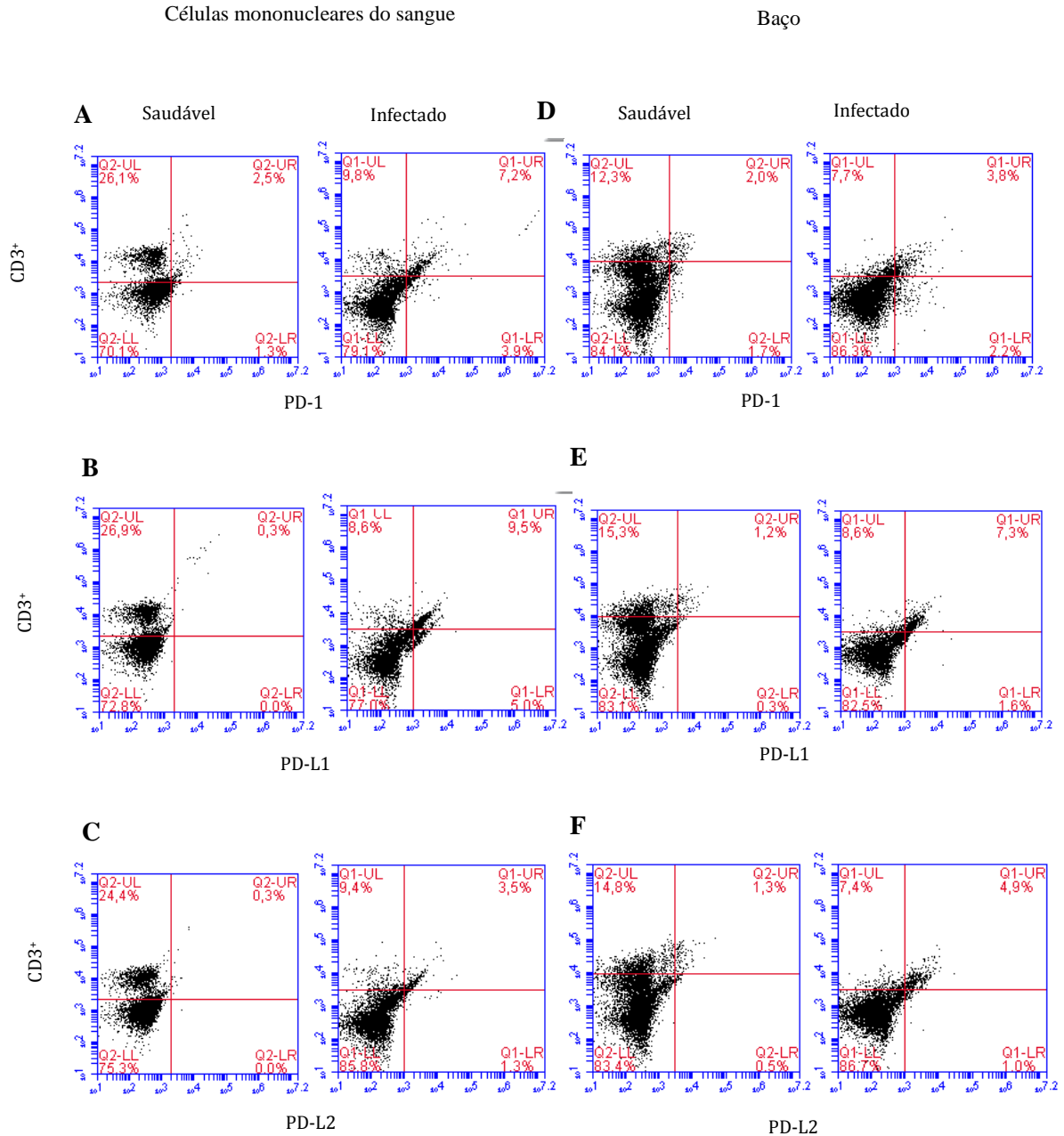


FIGURA 2 - Figura representativa da dupla marcação de linfócitos T CD3⁺ com PD-1, PD-L1 e PD-L2. (A) Linfócitos CD3⁺ com expressão de PD-1, (B) PD-L1 e (C) PD-L2 nas células mononucleares do sangue periférico. (D) Linfócitos CD3⁺ expressando PD-1, (E) PD-L1 e (F) PD-L2 em células do baço. Cães saudáveis (n=10) (à esquerda) e cães com LV (n=16) (à direita).

A expressão de PD-1 e seus ligantes foi comparada nas células estudadas nos cães com LV e observamos que os linfócitos T CD3⁺ apresentaram a maior expressão celular de PD-1 e seus ligantes do que monócitos F4/80⁺ e linfócitos B CD21⁺ nas células mononucleares do sangue periférico, exceto PD-L2 em F4/80⁺ (Tabela 1), no baço, linfócitos T CD3⁺ tem maior expressão celular sobre PD-1 apenas em relação a linfócitos B CD21⁺ (Tabela 2).

Tabela 1. Expressão de PD-1 e seus ligantes (média e desvio padrão) em células mononucleares CD3⁺, F4/80⁺ e CD21⁺ provenientes do sangue periférico de cães com LV

| Expressão | CD3⁺ (%) | F4/80⁺ (%) | CD21⁺ (%) |
|------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| PD-1 | 9,36±9,60a | 2,89 ±2,60b | 3,02 ±7,37b |
| PD-L1 | 3,11 ±3,82a | 1,39 ±1,25b | 0,93 ±0,75b |
| PD-L2 | 1,79 ±1,20a | 1,35 ±1,06a | 0,73± 0,49b |

a,b Letras iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística, teste de Wilcoxon (p<0,05)

Tabela 2 Expressão de PD-1 e seus ligantes (média e desvio padrão) em células do baço CD3⁺, F4/80⁺ e CD21⁺ provenientes de cães com LV

| Expressão | CD3⁺ (%) | F4/80⁺ (%) | CD21⁺ (%) |
|------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| PD-1 | 1,37 ±0,94a | 1,53 ±2,06a | 0,90 ±0,56b |
| PD-L1 | 1,02 ±0,99a | 0,88±0,88a | 0,73 ±0,35a |
| PD-L2 | 0,87 ±0,50a | 0,98 ± 0,96a | 0,91 ±0,77a |

a,b Letras iguais na mesma linha indicam ausência de diferença estatística, teste de Wilcoxon (p<0,05)

3.2 Quantificação da apoptose em linfócitos T CD3⁺ provenientes de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães com LV na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1, PD-L1 e PD-L2

Devido ao aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes PD-L1/PD-L2 por causa da infecção por *Leishmania* spp. em cães, procuramos investigar sua função na apoptose celular tardia. Altas taxas de apoptose de linfócitos T CD3⁺ do baço e do sangue periférico de cães infectados já foram descritas (LIMA, et al., 2012). Assim avaliamos se a apoptose de linfócitos T CD3⁺ observada nos cães infectados tinham o envolvimento dos receptores PD-1 e seus ligantes. Foi confirmado que os linfócitos T CD3⁺ de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães com LV apresentaram maior apoptose em relação a cães saudáveis ($p < 0,05$) (Figura 3A ,3B). O uso de anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1 e seus ligantes na cultura de células mononucleares do sangue periférico e baço diminuiu a taxa de apoptose de linfócitos T CD3⁺ ($p < 0,05$) (Figura 3C e 3D).

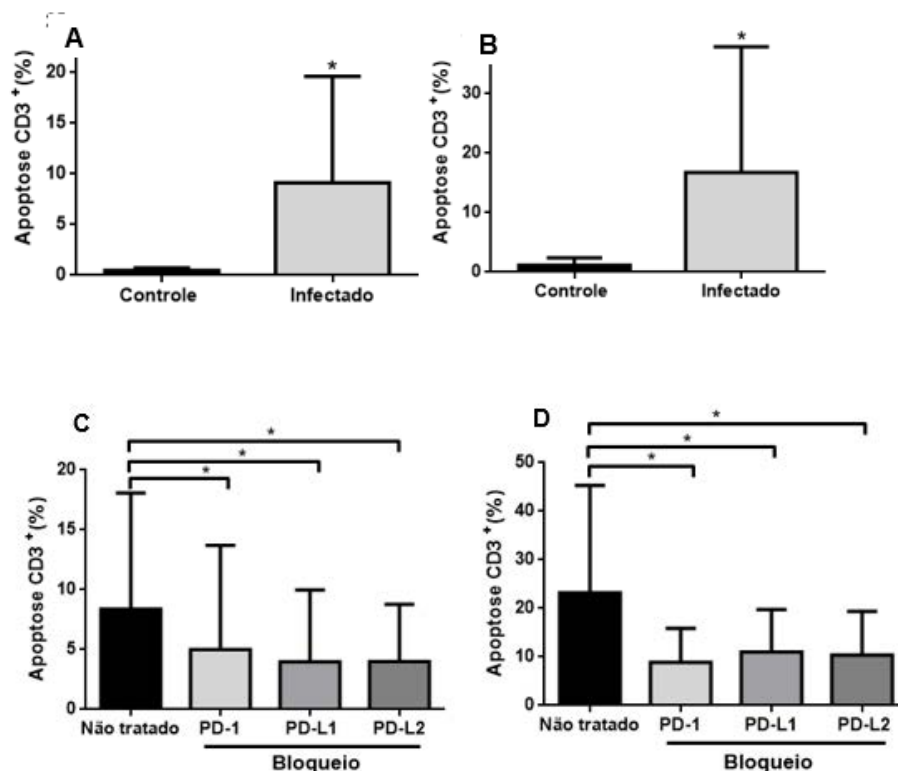


FIGURA 3 - Apoptose de linfócitos T CD3⁺ em cultura de células mononucleares do sangue periférico e do baço de cães com LV. Controle (barras em preto), cães naturalmente infectados (barras em cinza). (A) Células mononucleares do sangue periférico e (B) do baço em relação ao grupo controle. Bloqueio de PD-1 e seus ligantes versus grupo não tratado em (C) células mononucleares do sangue periférico e (D) do baço. Todos os experimentos incluem 20 cães com LV. Dados gráficos apresentados com média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ testes de Mann Whitney (A-B), teste de Wilcoxon (C-D).

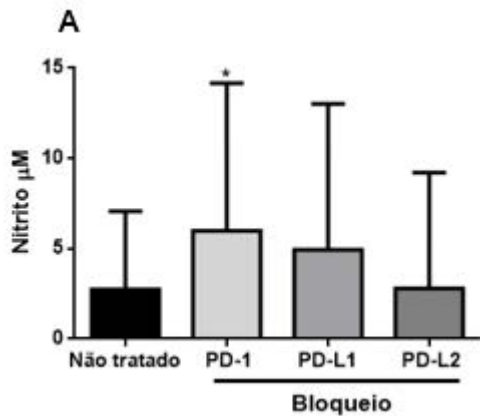
3.3 Determinação da concentração de óxido nítrico e citocinas TNF- α e IL-4 no sobrenadante de cultura das células mononucleares do sangue periférico e do baço em cães com LV após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes

Procurou-se investigar se PD-1 e seus ligantes tem efeito regulatório em outras funções celulares como a produção de óxido nítrico e citocinas TNF- α e IL-4 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico e do baço.

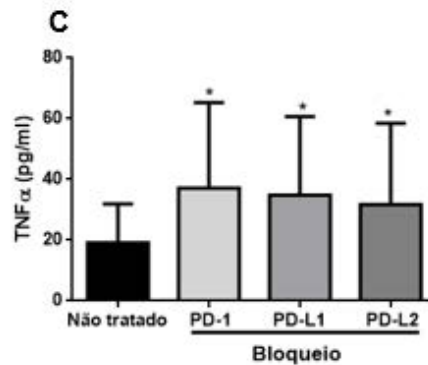
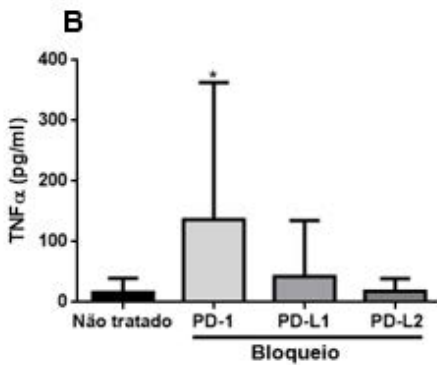
As concentrações de óxido nítrico (Figura 4A), TNF- α (Figura 4B) e IL-4 (Figura 4D) aumentaram no sobrenadante de culturas de células

mononucleares do sangue periférico tratadas com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 em comparação as culturas não tratadas ($p < 0,05$).

No baço, houve aumento da concentração de TNF- α com os tratamentos de anticorpos bloqueadores de PD-1 e seus ligantes ($p < 0,05$) (Figura 4C). Já o aumento de IL-4 foi evidente somente após bloqueio de PD-1 (Figura 4E).

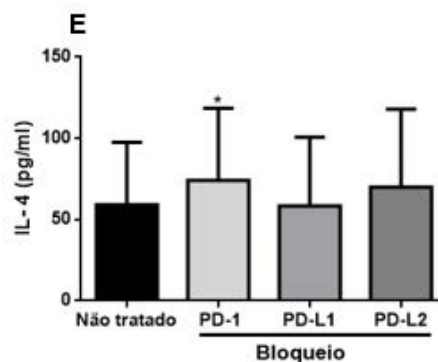
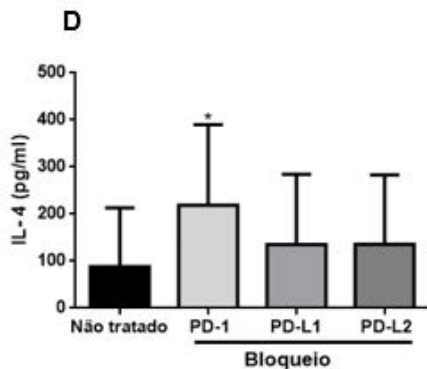


Células mononucleares do sangue periférico



Células mononucleares do sangue periférico

Baço



Células mononucleares do sangue periférico

Baço

FIGURA 4- Efeito do bloqueio de PD-1 e seus ligantes sobre a produção de óxido nítrico e citocinas TNF- α e IL-4. Em células mononucleares do sangue periférico (A) óxido nítrico; (B) TNF- α e (C) no baço. (D) IL-4 no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico, (E) do baço. Todos os experimentos incluem 15 cães com LV. Dados gráficos apresentados com média \pm desvio padrão; * $p < 0,05$ testes de Wilcoxon (A-E).

3.4 Carga parasitária em cultura de células mononucleares de sangue periférico em cães com LV na presença de anticorpos monoclonais bloqueadores de PD-1 e seus ligantes

Procurou-se investigar se PD-1 e seus ligantes podem modular a carga parasitária de cães com LV em células mononucleares do sangue periférico após o tratamento com anticorpos monoclonais bloqueadores. O tratamento com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 reduziu a carga parasitária em relação ao não tratado ($p < 0,05$) (Figura 5).

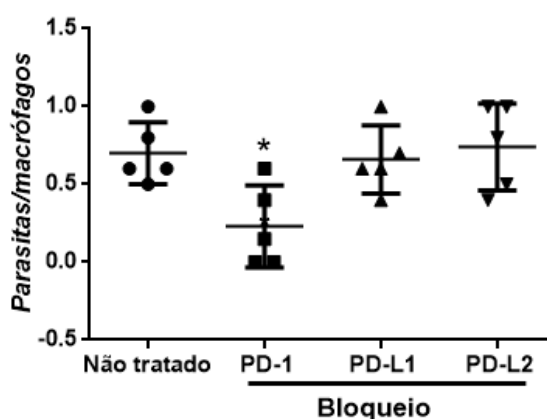


FIGURA 5- PD-1 tem influência na carga parasitaria de cães com LV. Carga parasitária em cultura de células mononucleares do sangue periférico após o bloqueio dos receptores PD-1, PD-L1 e PD-L2 com anticorpos monoclonais bloqueadores. Todos os experimentos incluem um $n=5$ cães com LV, lâminas coradas com corante hematológico comercial. * $p < 0,05$ teste t pareado.

4 Discussão

Nossos resultados demonstraram o aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes nos linfócitos T CD3⁺, células F4/80⁺ e linfócitos B CD21⁺ no baço e sangue periférico de cães com LV. Essas moléculas têm relação com a indução da apoptose de linfócitos T CD3⁺, já que o bloqueio de PD-1 e seus ligantes no cultivo celular de baço e células mononucleares do sangue

periférico foi capaz de modular apoptose de linfócitos T CD3⁺, a produção das citocinas TNF- α e IL-4 e do óxido nítrico além de reduzir a carga parasitária.

Nós observamos que a expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 em linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺ foi maior no sangue periférico e no baço de cães com LV comparados aos cães saudáveis. Nos monócitos F4/80⁺ apenas os receptores PD-L1 e PD-L2 mostraram aumento significativo no sangue periférico, porém PD-1 e seus ligantes apresentaram aumento da expressão em macrófagos esplênicos.

A alta expressão de PD-1 nos linfócitos T observada em nosso estudo no sangue periférico e no baço é semelhante ao observado por (ESCH et al., 2013), onde linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ do sangue periférico de cães com LV sintomáticos e assintomáticos apresentaram aumento da expressão de PD-1. Nos cães com LV, linfócitos T CD3⁺ em sangue periférico apresentam maior expressão de PD-1 e seus ligantes em comparação a monócitos F4/80⁺ e linfócitos B CD21⁺, porém, no baço somente PD-1 em linfócito T CD3⁺ aumentou sua expressão comparado a linfócitos B CD21⁺.

Este é o primeiro relato de expressão de PD-1, PD-L1 e PD-L2 em linfócitos T CD3⁺, linfócitos B CD21⁺ e células F4/80⁺ em cães saudáveis e cães com LV. Embora não exista relatos em cães, em outras doenças crônicas em modelos experimentais a expressão dessas moléculas também já foi caracterizada como em HIV (D'SOUZA et al., 2007) e tuberculose (MCNAB et al., 2011).

Concordando com resultados previamente descritos (LIMA et al., 2012; PEROSSO et al., 2014; SILVA et al., 2013), foi observado em nosso estudo um aumento da apoptose nos linfócitos T CD3⁺ do sangue periférico e no baço em cães com LV. Isto sugere que a apoptose possa estar colaborando com a baixa resposta linfoproliferativa; como já relatado por (ESCH, et al., 2013). O que colaboraria para a falha da imunidade, surgimento de co-infecções e desenvolvimento de neoplasias que são observadas em cães cronicamente infectados por *Leishmania* spp. (FOGLIA et al., 2008; OLIVEIRA, et al., 2008).

O uso de anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1 e seus ligantes em cultura de células mononucleares do sangue periférico e baço levou a diminuição da apoptose em linfócitos T CD3⁺, sugerindo que tais receptores participam do processo apoptótico. A inibição de apoptose dos linfócitos T não é total, já que ela ainda é detectada, sugerindo que outras vias indutoras de morte celular ainda estão atuantes. De fato, já foram descritos outros receptores, como Fas/FasLtransmembrana (SILVA et al., 2013) Fas/FasL solúvel (PEROSSO et al., 2014) estão envolvidos na apoptose dos linfócitos T (CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺) em cães com LV.

A inibição na apoptose de linfócitos TCD3⁺ em cães com LV com anticorpos bloqueadores de PD-1 e seus ligantes *in vitro* sugere que o uso terapêutico de anticorpos monoclonais nos cães com LV aumentaria os linfócitos T no sangue periférico e no baço e restabeleceria a sua função imunológica.

Em nossos experimentos os bloqueadores foram colocados na cultura bloqueando os receptores PD-1 e seus ligantes presentes em macrófagos e linfócitos T, inibindo a apoptose por essa via. Como ambos PD-1 e PD-L1 são expressos em linfócitos T, linfócitos B e macrófagos, existe possibilidade para interações bidirecionais entre PD-1 e PD-L1 (SHARPE et al., 2007). Diferente de nossos resultados (ESCH et al., 2013) utilizaram anticorpos bloqueadores somente nas células aderentes e verificaram que o receptor PD-1 pode não estar envolvido na apoptose celular de cães com LV, essa diferença se deve ao desenho experimental que ele utilizou. Nossos dados sugerem que o receptor PD-1 e seus ligantes participam da via de indução da apoptose de linfócitos T CD3⁺.

Foi demonstrado um aumento da quantidade de óxido nítrico na presença do anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 nas culturas de células mononucleares do sangue periférico de cães com LV. Em macrófagos caninos a produção de óxido nítrico é correlacionada com a indução da atividade anti-*Leishmania* (PINELLI et al., 2000). Semelhante ao nosso estudo em outros modelos como, em macrófagos de camundongos infectado com *T. cruzi*

também foi visto que o bloqueio de PD-1 e PD-L1 aumentou a expressão de iNOS e produção de óxido nítrico (DULGERIAN et al., 2011). Nossos resultados indicam que PD-1 interfere na produção de óxido nítrico em células mononucleares de sangue periférico em cães com LV, uma vez que bloqueado este receptor ocorreu aumento da produção de óxido nítrico.

O TNF- α apresentou maior concentração nas culturas de células mononucleares do sangue periférico tratadas com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 em comparação as culturas não tratadas. No sobrenadante da cultura de baço em todos os tratamentos realizados houve aumento da concentração de TNF- α . Possivelmente os anticorpos bloqueadores inibiram a interação de PD-1 e seus ligantes. Pois, o engajamento de PD-1 por PD-L1 ou PD-L2 inibe a transdução de sinal desencadeada por TCR/CD3, a proliferação de linfócitos T e produção de citocinas (FREEMAN, et al., 2000; LATCHMAN, et al., 2001).

O aumento da concentração de TNF- α observado após o bloqueio de PD-1 e seus ligantes pode estar relacionado ao aumento da atividade microbicida. Uma vez que a resistência dos macrófagos caninos à sobrevivência intracelular de *L. infantum* está associada principalmente a elevada produção desta citocina (TURCHETTI et al., 2015). Foi relato também que TNF- α aumenta a produção de óxido nítrico em macrófagos caninos (PINELLI, et al., 2000). Embora não existam relatos em cães, em modelo de sepse em camundongos, o bloqueio de PD-L1 também elevou os níveis de TNF- α e houve redução da carga de bactérias no sangue e líquido peritoneal (ZHANG et al., 2010). De fato, o TNF- α tem sua expressão regulada pela sinalização via PD-1 (WEI, et al., 2013). A produção de TNF- α observada em nossos resultados pode estar influenciando na produção de óxido nítrico e na redução da carga parasitária.

Em nosso estudo houve aumento da IL-4 somente na presença do bloqueador de PD-1, tanto nas culturas de células mononucleares do sangue periférico como do baço. O papel da IL-4 na polarização da resposta imunológica para Th2 em cães com LV é controverso. Cães experimentalmente

infectados por *L. infantum* com baixa carga parasitária em células mononucleares do sangue periférico não expressam a IL-4, mas sua expressão inicia com o aparecimento dos sinais clínicos da LV (SANCHEZ-ROBERT et al., 2008). Porém, diferenças entre níveis de IL-4 podem ser observadas entre cães sintomáticos e assintomáticos (LEAL et al., 2014). A produção de IL-4 em nosso estudo parece ter papel protetor, pois ela foi associada a redução da carga parasitária, com aumento da produção de óxido nítrico e TNF- α .

O efeito protetor da IL-4 já foi previamente observado na LV experimental. A elevada produção de IL-4 e concomitante produção de óxido nítrico foram associadas a proteção em hamster após vacinação para LV (BASU et al., 2005). Camundongos knockout para IL-4 foram mais susceptíveis à infecção de *L. donovani*, sugerindo também uma habilidade protetiva de IL-4 contra LV (SATOSKAR et al., 1995). Em camundongos a expressão de IL-4 foi essencial é necessária para diferenciação de resposta Th1 e manutenção de produção de IFN- γ (KAMOGAWA et al., 1993). A expressão de IL-4 em modelo de camundongos não é facilmente regulada pelo efeito inibitório da via PD-1 (LATCHMAN et al., 2001). Porém, em cães com LV observamos que o bloqueio de PD-1 melhorou a produção de IL-4.

O tratamento com anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 em células mononucleares do sangue periférico de cães com LV diminuiu a carga parasitária, semelhante ao observado por (ESCH et al., 2013). Em camundongos infectados com *Leishmania donovani* e tratados com bloqueador PD-L1 também ocorreu a redução da multiplicação parasitária no baço (JOSHI et al., 2009). Nossos resultados sugerem que o receptor PD-1 pode modular a carga parasitária de cães com LV.

Concluimos que PD-1 e seus ligantes participam da indução da apoptose celular de linfócitos T, estão regulando a produção de óxido nítrico, TNF- α , IL-4 além de reduzirem a carga parasitária. Portanto, nossos resultados têm implicações para o melhor conhecimento de mecanismos que modulam a apoptose e drogas imunoterapêuticas como anticorpos monoclonais bloqueadores que podem influenciar na LVC.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio financeiro desta pesquisa (processo no.2013/06684-9) e pela concessão da bolsa de mestrado (processo no. 2013/19399-0) e a CAPES.

REFERÊNCIAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; TEAM, W.L.C. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.**, v.7, p.e35671, 2012.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J.M.; NASKAR, K.; DE, T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.174, p.7160-7171, 2005.

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

CABRAL, M.; GRADY, J. O.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v.14, p.531-539, 1992.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; VELOSO, V.M.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; REIS, L.E.; BRAGA, S.L.; MORAIS, M.H.; REIS, A.B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.5, p.e1291, 2011.

DAY, C.L.; KAUFMANN, D. E.; KIEPIELA, P.; BROWN, J.A.; MOODLEY, E. S.; REDDY, S.; MACKEY, E. W.; MILLER, J. D.; LESLIE, A. J.; DEPIERRES, C.; MNCUBE, Z.; DURAISWAMY, J.; ZHU, B.; EICHBAUM, Q.; ALTFELD, M.; WHERRY, E. J.; COOVADIA, H. M.; GOULDER, P. J.; KLENERMAN, P.; AHMED, R.; FREEMAN, G. J.; WALKER, B. D. PD-1 expression on HIV specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v.21, p.350-354, 2006.

DIAZ, S.; DA FONSECA, I. P.; RODRIGUES, A.; MARTINS, C.; CARTAXEIRO, C.; SILVA, M. J.; DE BRITO, T. V.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SANTOSGOMES, G. M. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol.**, v.26; p.137-144, 2012.

D'SOUZA, M.; FONTENOT, A. P.; MACK, D. G.; LOZUPONE, C.; DILLON, S.; MEDITZ, A.; WILSON, C. C.; CONNICK, E.; PALMER, B. E. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. **J. Immunol.**, v.179, p.1979-1987, 2007.

DONG, H.; STROME, S.E.; SALOMAO, D.R.; TAMURA, H.; HIRANO, F.; FLIES, D.B.; ROCHE, P.C.; LU, J.; ZHU, G.; TAMADA, K.; LENNON, V.A.; CELIS, E.; CHEN, L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat. Med.**, v.8, p.793-800, 2002.

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 *leishmania* skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.123, p.251-259, 2008.

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

ESCH, K.J.; JUELGAARD, R.; MARTINEZ, P.A.; JONES, D.E.; PETERSEN, C.A. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J. Immunol.**, v.191, p.5542-5550, 2013.

FOGLIA MANZILLO, V.; PAGANO, A.; GUGLIELMINO, R.; GRADONI, L.; RESTUCCI, B.; OLIVA, G. Extranodal gamma delta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. **Vet. Clin. Pathol.**, v.37, p.298–301, 2008.

FOLKL, A.; WEN, X.; KUCZYNSKI, E.; CLARK, M.E.; BIENZLE, D. Feline programmed death and its ligand: characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.134, p.107-114, 2010.

FREEMAN, G.J.; LONG, A.J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K.; CHERNOVA, T.; NISHIMURA, H.; FITZ, L.J.; MALENKOVICH, N.; OKAZAKI, T.; BYRNE, M.C.; HORTON, H.F.; FOUSER, L.; CARTER, L.; LING, V.; BOWMAN, M.R.; CARRENO, B.M.; COLLINS, M.; WOOD, C.R.; HONJO, T. Engagement of the

PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J. Exp. Med.**, v.192, p.1027-1034, 2000.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annu. Rev. Immunol.**, v.23, p. 515–548, 2005.

JOSHI, T.; RODRIGUEZ, S.; PEROVIC, V.; COCKBURN, I.A.; STÄGER, S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **PLoS Pathog.**, v.5, p.e1000431, 2009.

KAMOGAWA, Y.; MINASI, L.A.; CARDING, S.R.; BOTTOMLY, K.; FLAVELL, R.A. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. **Cell**, v.75, p.985-995, 1993.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C.R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D.; BORDE, M.; CHERNOVA, I.; IWAI, Y.; LONG, A.J.; BROWN, J.A.; NUNES, R.; GREENFIELD, E.A.; BOURQUE, K.; BOUSSIOTIS, V.A.; CARTER, L.L.; CARRENO, B.M.; MALENKOVICH, N.; NISHIMURA, H.; OKAZAKI, T.; HONJO, T.; SHARPE, A.H.; FREEMAN, G.J. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol.**, v.2 , p.261-268, 2001.

LÁZÁR-MOLNÁR, E.; YAN, Q.; CAO, E.; RAMAGOPAL, U.; NATHENSON, S. G.; ALMO, S. C. Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**, v.105, p.10483-10488, 2008.

LEAL, G.G.A.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; CARVALHO, A.T.; FILHO, O.A.M.; FRANCISCO, A.F.; CARDOSO, J.M.; MATHIAS, F.A.S.; OLIVEIRA, R.C.; CAENEIRO, M.; VITAL, W.C.; REIS, A.B. Immunological profile of resistance and susceptibility

innaturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Vet. Parasitol.**, v.205, p. 472–482, 2014.

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

LIMA, V. M.; 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.

LOKE, P'N.; ALLISON, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.100, p.5336–5341, 2003.

MCNAB, F. W.; BERRY, M. P. R.; GRAHAM, C. M.; BLOCH, S. A. A.; WILKINSON, J.; KON, O.M.; BANCHEREAU, J.; CHAUSSABEL, D.; O'GARRA, A. Programmed death ligand 1 is over- expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. **Eur. J. Immunol.**, v.41, p.1941-1947, 2011.

MÜHLBAUER, M.; FLECK, M.; SCHÜTZ, C.; WEISS, T.; FROH, M.; BLANK, C.; SCHÖLMERICH, J.; HELLERBRAND, C. PDL1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and - gamma and mediates T cell apoptosis. **J. Hepatol.**, v.45, p.520-528, 2006.

NUNES, C.M.; PIRES, M.M.; DA SILVA, K.M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, v.170, p. 131-133, 2010.

OLIVEIRA, T.M.; FURUTA, P.I.; DE CARVALHO, D.; MACHADO, R.Z. 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. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v.17, p.7-11, 2008.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v.22, p.252-264, 2012.

PENTCHEVA-HOANG, T.; CHEN L.; PARDOLL, D.M.; LLISON, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p.17765-70, 2007.

PEROSSO, J.; SILVA, K.L.; FERREIRA, S.; AVANÇO, S.V.; DOS SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.E.R.; DE ALMEIDA, B.F.; DE LIMA, V.M. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v.205, p.417-420, 2014.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v.67, p. 237-43, 1999.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v.92, p.181; 2000.

SANCHEZ-ROBERT, E.; ALTET, L.; ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTE, L.; TIMON, M.; SANCHEZ, A.; FRANCINO, O. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.125, p.168-175, 2008.

SANTANA, C.C.; VASSALLO, J.; DE FREITAS, L.A.; OLIVEIRA, G.G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; DOS-SANTOS, W.L. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.**, v.30, p.515-524, 2008.

SATOSKAR, A., BLUETHMANN, H., ALEXANDER, J. Disruption of the murine interleukin-4 gene inhibits disease progression during *Leishmania mexicana* infection but does not increase control of *Leishmania donovani* infection. **Infect.Immun.**, v.63, p. 4894–4899, 1995.

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

SILVA, K.L.; MELO, L.M.; PEROSSO, J.; OLIVEIRA, B.B.; SANTOS, P.S.; EUGÊNIO, F.E.R.; LIMA, V.M. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v.197, p.470-476, 2013.

SILVA, J.S.; VESPA, G.N.; CARDOSO, M.A.; ALIBERTI, J.C.; CUNHA, F.Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**, v.63, p.4862–7, 1995.

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

TURCHETTI, A.P., COSTA, L.F., ROMÃO, E.L., FUJIWARA, R.T., PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet.Immunol.immunopathol.**, v.163, p.67-70, 2015..

TRAUTMANN, L.; JANBAZIAN, L.; CHOMONT, N.; SAID, E. A.; GIMMIG, S.; BESSETTE, B.; BOULASSEL, M. R.; DELWART, E.; SEPULVEDA, H.; BALDERAS, R. S.; ROUTY, J. P.; HADDAD, E. K.; SEKALY, R. P. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nat. Med.**, v.12, p.1198-1202, 2006.

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

WEI, F.; ZHONG, S.; MA, Z.; KONG, H.; MEDVEC, A.; AHMED, R.; FREEMAN, G.J.; KROGSGAARD, M.; RILEY, J.L. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.110, p.2480-2489, 2013.

WHO, World 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: 15 Agosto 2015.

YAMAZAKI, T.; AKIBA, H., Y.; OKUMURA, K.; AZUMA, M.; YAGITA, H. Blockade of B7.H1 on macrophages suppress CD4⁺ T cell proliferation by augmenting IFN γ -induced nitric oxide production. **J. Immunol.**, p.1586-1591, 2005.

ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; LOU, J.; LI, J.; BO, L.; ZHU, K.; WAN, X.; DENG, X.; CAI, Z. PDL1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction. **Crit. Care**, v.14, p. R220, 2010.