

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

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

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Enfermeira

Araçatuba - SP
2016

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

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

Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

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

Araçatuba - SP
2016

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

	Silva, Kathlenn Liezbeth Oliveira
Si381c	CD279 (PD-1) e seus ligantes CD273 (PD-L1) e CD274 (PD-L2) regulam a linfoproliferação, a produção de IL-10 e do óxido nítrico na leishmaniose visceral canina / Kathlenn Liezbeth Oliveira Silva . Araçatuba: [s.n], 2016. 72 f. il.; CD-ROM Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária, 2016. Orientador: Prof. Valéria Marçal Felix de Lima 1. Leishmaniose visceral. 2. Moléculas coestimulatórias. 3. L. infantum. 4. Cão I. T. CDD: 636.0895



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: KATHLENN LIEZBETH DE OLIVEIRA DA SILVA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO

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

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

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

Profa. Dra. APARECIDA DE FÁTIMA MICHELIN

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

Araçatuba, 19 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

EPÍGRAFE

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

DEDICATÓRIA

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A professora Marion Burkhardt de Koivisto, pelo auxílio prestado.

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

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

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

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

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

“- Ka, você tem que ser como o ouro!

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

- Você já viu alguém dar valor na água?

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

- Não! Valor no sentido material!

- Ah tá!...não, não vi não...

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

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

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

Obrigada por tudo!!!

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

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

SUMÁRIO

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

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Os sinais mais frequentes de LV são linfadenopatia, 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 soropositivos, dos quais 80%, na verdade, desenvolvem a doença (NOLI, 1999). No Brasil, em áreas urbanas da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população soropositiva (QUEIROZ et al., 2009).

1.2 Resposta imune na LVC

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença de PD-1 e seus ligantes em leucócitos do baço e células mononucleares de sangue periférico e verificar se sua expressão tem correlação com a carga parasitária de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Objetivos Específicos:

1. Identificar e quantificar a expressão de PD-1 e seus ligantes por método imunohistoquímico em amostras esplênicas de cães saudáveis e controles;
2. Investigar *in vitro* se a infecção por *L. infantum* em macrófagos provenientes de cão saudável altera a expressão de PD1 e seus ligantes;
3. Bloquear *in vitro* os receptores PD1, PD-L1 e PD-L2 em cultura células mononucleares do sangue e leucócitos de baço de cinco cães naturalmente infectados e avaliar a produção das citocinas IFN- γ e IL-10;
4. Bloquear *in vitro* os receptores PD1, PD-L1 e PD-L2 em cultura e quantificar a resposta proliferativa dos linfócitos do linfonodo de cães naturalmente infectados com antígenos de *Leishmania* spp., a produção das citocinas IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-10, e a produção de óxido nítrico no sobrenadante da cultura;
5. Correlacionar os níveis de expressão de PD-1 e seus ligantes com a carga parasitária do baço de cães com LV;

REFERÊNCIAS

AARNTZEN, E. H. et al. Vaccination with mRNA-electroporated dendritic cells induces robust tumor antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells responses in stage III and IV melanoma patients. **Clin. Cancer Res.**, v. 18, n. 19, p. 5460-5470, 2012.

AKHAVAN, D. Analysis of the cost-effectiveness of the leishmaniasis component of the Project for the Control of Endemic Diseases in the Northeast (PCDEN) of Brazil. **Rev. Patol. Trop.**, v. 25, p. 203-252, 1996.

ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 706-717.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>> Acesso em: 31 maio 2016.

ANTOINE, J. C. et al. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. **Adv. Parasitol.**, v. 58, p. 1-68, 2004.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

BALLY, A. P. et al. NF- κ B regulates PD-1 expression in macrophages. **J. Immunol.**, v. 194, n. 9, p. 4545-4554, 2015.

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

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n. 3-4, p. 345-351, 1997.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection. **J. Immunol.**, v. 166, n. 5, p. 3416-3422, 2001.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 531-539, 1992.

CEERAZ, S.; NOWAK, E. C.; NOELLE, R. J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. **Trends Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 556-563, 2013.

CHAMBERS, C. A.; ALLISON, J. P. Co-stimulation in T cell responses. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, n. 3, p. 396-404, 1997.

CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879-888, 2016.

CORRÊA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 267-274, 2007.

COURA-VITAL, W. et al. 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, n. 8, p. 1-10, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi: 10.1371/journal.pntd.0001291>> Acesso em: 1 jun. 2016.

COUTINHO, M. T.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Vet. Parasitol.**, v. 147, n. 3-4, p. 320-325, 2007.

DA COSTA PINHEIRO, P. H. et al. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 6, p. 3787-3789, 2005.

DANTAS-TORRES, F. Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 219-221, 2006.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350-354, 2006.

DESJEUX, P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 190, n. 1-2, p. 77-79, 2001.

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

DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Vet. Parasitol.**, v. 189, n. 2-4, p. 137-144, 2012.

DOS-SANTOS, W. L. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, n. 3-4, p. 251-259, 2008.

D'SOUZA, M. et al. Programmed death 1 expression on HIV-specific CD4+ T cells is driven by viral replication and associated with T cell dysfunction. **J. Immunol.**, v. 1, n. 179, p. 1979-1987, 2007.

DULGERIAN, L. R. et al. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v. 133, n. 1, p. 29-40, 2011.

ESCH, K. J. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J. Immunol.**, v. 191, n. 11, p. 5542-5550, 2013.

FERREIRA, M. G. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 150-154, 2009.

FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. **Vet. Parasitol.**, v. 83, n. 2, p. 87-97, 1999.

FONSECA, S. G. et al. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 8, p. 2297-2306, 2003.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 2, p. 290-299, 2014.

GENARO, O. **Leishmaniose Visceral canina experimental**. 1993. 202 f. Tese (Doutorado em Parasitologia). Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

GOTO, H.; PRIANTI, M. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 241-246, 2009.

GREENWALD, R. J. et al. Cutting edge: inducible costimulator protein regulates both Th1 and Th2 responses to cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 168, n. 3, p. 991-995, 2002.

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

HOFMEYER, K. A.; JEON, H.; ZANG, X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2011, p. 1-9, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1155/2011/451694>> Acesso em: 1 jun. 2016.

KAYE, P. M. et al. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 11, p. 2850-2854, 1994.

KEIR, M. E.; FRANCISCO, L. M.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 309-314, 2007.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008.

LAFFERTY, K. J.; CUNNINGHAM, A. J. A new analysis of allogeneic interactions. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 53, n. 1, p. 27-42, 1975.

LATCHMAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 261-268, 2001.

LÁZÁR-MOLNÁR, E. et al. 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, n. 30, p. 10483-10488, 2008.

LIMA, V. M. F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, n. 2-4, p. 147-153, 2012.

LOKE, P.; 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, n. 9, p. 5336-5341, 2003.

MANNA, L. et al. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 142, n. 3-4, p. 271-280, 2006.

MAUËL, J.; CORRADIN, S. B.; BUCHMÜLLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Res. Immunol.**, v. 142, n. 7, p. 577-580, 1991.

MCNAB, F. W. et al. Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 7, p. 1941-1947, 2011.

MICHELIN, A. F.; PERRI, S. H.; LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 105, n. 5, p. 373-383, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portal da Saúde. Brasil. **Leishmaniose visceral.** Situação Epidemiológica. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>> Acesso em: 6 jul. 2016.

MOLYNEUX, D. H., ASHFORD, R. W. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. London: Taylor & Francis, 1983.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MURRAY, H. W. et al. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.

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

NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 170, n. 1-2, p. 131-133, 2010.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 12, p. 252–264, 2012.

PENTCHEVA-HOANG, T. et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 45, p. 17765-17770, 2007.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 1, p. 229-235, 1994.

PINELLI, E. et al. 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, n. 1, p. 237-243, 1999.

PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet. Parasitol.**, v. 92, n. 3, p. 181-189, 2000.

QUEIROZ, P. V. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Res. Vet. Sci.**, v. 86, n. 2, p. 267-273, 2009.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 183, n. 9, p. 1421-1424, 2001.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 146, n. 2, p. 303-311, 2006.

RODRIGUES, C. A. et al. IFN-gamma expression is up-regulated by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from non-exposed dogs upon *Leishmania chagasi* promastigote stimulation in vitro. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 127, n. 3-4, p. 382-388, 2009.

SADICK, M. D. et al. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 12, p. 4710-4714, 1991.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 245-266, 2006.

SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SANTIAGO, M. E. et al. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v. 150, n. 4, p. 283-290, 2007.

SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, 2002.

SCHAUT, R. G. et al. Regulatory IgDhi B cells suppress t cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 196, n. 10, p. 4100-4109, 2016.

SEMIÃO-SANTOS, S. J. et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitol. Res.**, v. 81, n. 3, p. 235-239, 1995.

SHARPE, A. H. et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat. Immunol.**, v. 8, n. 3, 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.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009.

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

STRAUSS-AYALIA, D.; BANETHA, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, p. 547–564, 2007.

TRAUTMANN, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nat. Med.**, v. 12, n. 10, p. 1198-1202, 2006.

TURCHETTI, A. P. et al. 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, n. 1-2, p. 67-76, 2015.

VIEIRA, J. B. F.; COELHO, G.E. Leishmaniose visceral ou calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 85–92, 1998.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 1, p. 253-256, 1996.

WEI, F. et al. Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 110, n. 27, p. 2480-2489, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi: 10.1073/pnas.1305394110>> Acesso em: 8 jun. 2016.

WHO. World Health Organization. 2015. Global Health Observatory (GHO) data. **Leishmaniasis.** Situation and trends. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/> Acesso em: 15 jun. 2016.

WHO. World Health Organization. **The first WHO report on neglected tropical disease working to overcome the global impact of neglected tropical disease.** 2013. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/1/9789241564090_eng.pdf Acesso em: 15 jun. 2016.

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

Kathlenn L.O. Silva,¹ Vanessa M. Chiku,¹ Gabriela L. Venturin,¹ Aline A. C. Leal,¹ Breno F. Almeida,¹ Flávia de R. Eugênio,² Paulo S. P. Santos,² Gisele F. Machado,² Valéria M. F. de Lima,²

¹ *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA e* ² *Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laboratório de Imunologia Celular, FMVA, UNESP, Brasil*

Correspondência: Dra. Valéria M. F. de Lima, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Laboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-FMVA – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, Araçatuba/SP, Brasil. Email: vmflima@fmva.unesp.br

Autor sênior: Valéria Marçal Felix de Lima

Abreviaturas: ALT - Alanina aminotransferase, APC - célula apresentadora de antígeno, ASB - Albumina sérica bovina, AST - Aspartato aminotransferase, AtgS - Antígeno solúvel, CEUA - Comissão Ética no Uso de Animais, CFSE - 5,6-diacetato de Carboxilfluoresceína succinimidil éster, CK - Creatina quinase, COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, ConA - Concanavalina-A, DAB - Diaminobenzidina, DO - Densidade óptica, FA - Fosfatase alcalina, FITC - Isotiocianato de fluoresceína, GGT – Gama glutamil transferase, L - *Leishmania*, LDH - Lactato-desidrogenase, LV - Leishmaniose visceral, LVC - LV

canina, min - minutos, ml - mililitros, NK - Natural killer, NO - Óxido nítrico, PD - Programador de morte, PE - Ficoeritrina, PHA - Fitohemaglutinina-M, RID - Registro de identificação da consulta, seg - segundos, TA - Temperatura ambiente, TCR - receptor das células T, Th - T auxiliar, TLH - Tampão de lise de hemáceas, TSF - Tampão salina fosfato.

RESUMO

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. O envolvimento do receptor PD-1, um co-estimulador negativo nas respostas adaptativas em doenças infecciosas crônicas, tem sido relatado. A relação entre a expressão de PD-1 e seus ligantes e a resposta linfoproliferativa na produção de citocinas e óxido nítrico em cães com LV foi investigada. A expressão desses receptores foi observada por imunohistoquímica no baço dos cães com LV. Em infecção *in vitro* por *L. infantum* a expressão desses receptores em linfócitos T, B e macrófagos em mononucleares do sangue periférico foi avaliada por citometria de fluxo e a determinação da carga parasitária foi feita por PCR em tempo real. A linfoproliferação em células do linfonodo com e sem estímulo de antígeno solúvel de *L. infantum*, na presença ou ausência de anticorpos bloqueadores para PD-1 e seus ligantes, foi feita por citometria de fluxo, e a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4 e do NO foi verificada por ELISA de captura. Observamos que a infecção por *L. infantum* regula a expressão de PD-1 e seus ligantes, e em linfócitos B está correlacionado com um aumento da carga parasitária. O bloqueio desses receptores restaura a linfoproliferação, aumenta a produção de NO e diminui IL-4 e IL-10. O conhecimento desse estudo pode ser útil no desenho de drogas imunoterapêuticas.

Palavras-Chave: Linfoproliferação, Leishmaniose visceral, PD-1, PD-L1, PD-L2

INTRODUÇÃO

As leishmanioses ocorrem em 88 países, dos quais 65 apresentam a forma visceral da doença (DESJEUX, 2004). O Brasil está entre os 6 países com mais casos de LV no mundo (ALVAR et al., 2012), sendo uma doença fatal que envolve descontrolado parasitismo em órgãos vitais (THAKUR et al., 2015). Os seres humanos e os canídeos são os dois principais hospedeiros reservatórios do complexo *L. donovani* (LUKES, 2007), sendo que os cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, favorecendo assim a infecção dos vetores (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997; VERÇOSA et al., 2012).

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A ausência de resposta das células T aos antígenos de *Leishmania* spp. é observada *in vivo*, pelo teste de Montenegro negativo (DOS-SANTOS et al., 2008). Em cães infectados com *L. infantum* ocorre a redução do número de linfócitos T (BOURDOISEAU, 1997), possivelmente relacionada a apoptose destas células (LIMA et al., 2012).

A redução da resposta linfoproliferativa antígeno específica também já foi observada em cães com LV (ESCH et al., 2013; PINELLI et al., 1995), sendo associada ao estabelecimento da infecção por *L. infantum*. Também macrófagos caninos infectados *in vitro* com *L. infantum*, apresentam menor proliferação de linfócitos sendo atribuída a expressão de moléculas B7 (PINELLI et al., 1999).

A eliminação de agentes patogênicos pelas células T, requer dois sinais, sendo o primeiro antígeno-específico, gerado pelo TCR por meio do reconhecimento do peptídeo apresentado pelo MHC de uma APC. O segundo sinal é independente de antígeno e é fornecido pela ligação dos membros da família B7 (HOFMEYER et al., 2011). As vias da família B7 regulam o equilíbrio entre sinais inibitórios e estimulatórios que são necessários para a defesa contra microrganismos invasores (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005; OKAZAKI et al., 2006). Nos últimos anos muitas vias inibitórias dentro da família B7-CD28 podem atenuar as respostas ou induzir a tolerância das células T

(KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007), incluindo o PD-1, PD-L1, e o PD-L2 (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013).

O PD-1 também conhecido como CD279, é expresso em vários tipos celulares como em células T, NK, células B, monócitos, células dendríticas (KEIR et al., 2008), macrófagos (BALLY et al., 2015), e células T regulatórias (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013). Tal proteína se liga à PD-L1 ou PD-L2 para desencadear suas funções biológicas (CEERAZ; NOWAK; NOELLE, 2013), como diminuir sinais estimulatórios via TCR (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007), e apoptose das células T CD3+ no baço e sangue periférico de cães com LV (CHIKU et al., 2016). Em células T CD8+ de pacientes com LV já foi observada anergia, bem como elevada expressão do RNAm de PD-1 e de IL-10 (GAUTAM et al., 2014).

O PD-L1, também conhecido como B7-H1 ou CD274, é expresso em células dendríticas, macrófagos, células T e células B (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007). Sua expressão está associada a respostas Th1 e pode ser induzida via LPS e IFN- γ (LOKE; ALLISON, 2003). Em cães com LV, após o bloqueio do PD-L1 nas células B, houve recuperação da resposta Th1 (SCHAUT et al., 2016), e proliferação das células T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico (ESCH et al., 2013).

O PD-L2, também conhecido como B7-DC ou CD273 (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007), tem sua expressão relativamente baixa (LATCHMAN et al., 2001), quando comparado ao PD-L1. Essa molécula é expressa em células dendríticas, macrófagos e células da medula óssea (KEIR et al., 2008). Durante as respostas Th2 ocorre um aumento da expressão de PD-L2 (AAMTZEN et al., 2012), e sua ligação com o PD-1 inibe a linfoproliferação das células T via TCR e diminui a produção de citocinas pelas células T CD4+ (LATCHMAN et al., 2001).

Em cães com LV, a exaustão das células T CD4+ e T CD8+ descrita no sangue periférico foi associada ao aumento da expressão de PD-1 na superfície dessas células e após o bloqueio de PD-L1 em células aderentes do sangue

periférico a proliferação foi restaurada na presença do antígeno de *Leishmania* spp. (ESCH et al., 2013).

O aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes foi também observado em linfócitos T, B e macrófagos do sangue periférico e baço de cães com LV, e esse aumento regula outras funções como a apoptose dos linfócitos T e a produção de TNF- α e do óxido nítrico (CHIKU et al., 2016).

No presente estudo, investigamos a expressão de PD-1 e seus ligantes em células do baço de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, após o bloqueio desses receptores na presença ou ausência do AtgS de *L. infantum*, a resposta linfoproliferativa do linfonodo e a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4 e do NO em sobrenadante da cultura de células do linfonodo. Observamos que a infecção por *L. infantum* regula a expressão de PD-1 e seus ligantes, e o bloqueio desses receptores restaura a linfoproliferação, aumenta a produção de NO e diminui IL-4 e IL-10.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aprovação do Comitê de Ética

Este estudo foi aprovado pelo COBEA, e CEUA da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Araçatuba – Faculdade de Medicina Veterinária – FMVA – processo nº 00530/2013.

Seleção dos cães dos grupos controle e infectado

Foram selecionados 54 cães adultos, com LV, entre dois e cinco anos de idade, sem predileção por raças, peso corporal ou idade. Os cães do grupo infectado (n=31), provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba (CCZA), positivos na citologia do linfonodo poplíteo e soropositivos para *L. infantum* por ELISA indireto (LIMA et al., 2003). Todos os cães apresentaram

sinais clínicos de LVC, entre eles: onicogrifose, linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia, caquexia, alopecia, lesão na pele e região periocular.

Para a composição do grupo controle, 23 cães clinicamente saudáveis (14 fêmeas e 9 machos com idade entre 3, 4 anos), sem predileção por raça, peso corporal ou idade. Oriundos de proprietários particulares. Foram utilizados mediante autorização em termo de consentimento livre e esclarecido para coleta das amostras do sangue periférico e, ou do fragmento do baço, no momento em que foram submetidos a castração. Os cães foram selecionados de acordo com a normalidade dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do plasma (ALT, AST, bilirrubina total, direto e indireto, creatinina, FA, GGT, cálcio, colesterol total, CK, fósforo, glucose, globulina, LDH, proteína total, triglicérides e uréia), e urinálise tipo I. Todos foram soronegativos para o antígeno de *Leishmania* spp. por ELISA indireto (LIMA et al., 2003), e clinicamente monitorados com exame sorológico por três meses antes do experimento e também negativos na análise por qPCR para o DNA do parasita *Leishmania* spp. em amostras de baço e medula óssea (PEROSSO et al., 2014).

Colheita das amostras

Os cães com LV foram eutanasiados com dose excessiva do tiopental sódico (Cristália, Itapira, SP), seguida da injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1% pela mesma via, em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de LV devem ser submetidos à eutanásia. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº. 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Após a eutanásia, um fragmento do baço (2 x 2cm) foi colhido. Desse fragmento metade foi fixada em solução de formol tamponado com fosfatos a 10%, para posterior processamento e inclusão em parafina para avaliação imunohistoquímica. O outro fragmento foi mantido a 4°C, em meio de cultura celular RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo

calor (Gibco®, USA), 0,03% de L-glutamina (Sigma®, USA), 100 UI/ml de penicilina (Sigma®, USA) e 100 mg/ml de estreptomicina (Sigma®, USA), até o seu processamento para cultura celular.

O fragmento do baço (2 x 2 cm) do grupo controle foi colhido por excisão cirúrgica segundo protocolo de Lima et al. (2012). A amostra foi processada para imunohistoquímica e a obtenção de leucócitos foi feita conforme descrito acima.

As amostras de sangue periférico dos cães de ambos os grupos foram obtidas por punção da veia femoral ou jugular, coletadas em tubos (10 ml) contendo heparina sódica (BD Vacutainer®, USA) e processadas imediatamente após a coleta.

Isolamento das células mononucleares do sangue periférico, dos leucócitos do baço, e linfonodo

As células mononucleares do sangue periférico dos grupos infectado e controle foram isoladas por gradiente de concentração com Histopaque® 1077 e 1119 (Sigma®, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após isoladas, foram processadas em tubos de 15 ml (BD Biosciences Falcon®, USA), com 10 ml do TLH contendo 7,46 g/L de NH_4ClO_3 , a 4°C por 10 min, lavados três vezes em TSF 1 x pH 7,2. Após, as células foram resuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado (Sigma®, USA) como descrito anteriormente e mantidos em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO_2 , a 37°C (Thermo Scientific®, Water-Jacket, USA).

Os leucócitos totais do baço foram obtidos após maceração, retirada dos debris celulares (BD Falcon®, Cell strainer, USA), e processamento para lise das hemácias, como descrito acima. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção das células do linfonodo nos ensaios de linfoproliferação.

Anticorpos

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada com dupla marcação celular com anticorpos monoclonais conjugados ao PE: Anti-PD-1 humano (Clone MIH4) que apresenta alto grau de homologia entre as espécies humana e canina (FOLKL et al., 2010); anti-PD-L1 humano (Clone MIH1), (BALLY et al., 2015), utilizado de acordo com Esch et al. (2013) com modificações; o anti-PD-L2 humano (Clone MIH18), (KEIR et al., 2008); apresentando homologia entre 75 a 85% com *Canis lupus familiaris* (BLAST (RID-P7WRT59M014)). O isotipo controle foi IgG1 de camundongo (BD Biosciences, USA).

Os anticorpos monoclonais conjugados ao FITC foram: Anti-CD3 canino (AbD Serotec, UK) e seu isotipo controle IgG1 de camundongo (Clone MOPC-21, AbD Serotec, UK). Ainda, o anti-CD21 humano (Clone LT21, Exbio, República Checa), que possui reatividade com a espécie canina, e seu isotipo controle IgG1 de camundongo (Clone MOPC-21, AbD Serotec®, UK). Anti-F4/80 de rato (Clone BM8, Abcam®, UK), um marcador da membrana de macrófagos diferenciados de antígenos de monócitos, altamente conservado em humanos e cães, apresentando homologia de 70 a 97% com *Canis lupus familiaris* (BLAST / RID-NE57FKGV014), e seu isotipo controle IgG2ak de rato (Abcam®, UK).

Bloqueio dos receptores

Nos ensaios para o bloqueio dos receptores foram utilizados anticorpos monoclonais purificados: o anti-PD-1 humano (Clone J116), anti-PD-L1 humano (Clone MIH5) e anti-PD-L2 humano (Clone MIH18), (eBioscience®, USA).

Imunohistoquímica

Nos ensaios imunohistoquímicos foram utilizados os seguintes anticorpos purificados: Anticorpo policlonal anti-PD-1 produzido em cabra e reagente com canino (Biorbyt, UK). Anticorpo monoclonal anti-PD-L1 humano (Clone 29E.2A3), com seu isotipo controle IgG2bk de camundongo (Clone MG2b-57), e o anti-PD-L2 humano (Clone MIH 18) com seu isotipo controle IgG1k de camundongo (Clone MG1-45), todos com diluição 1:200 (Biolegend®, USA).

Identificação e quantificação da expressão de PD-1 e seus ligantes por método imunohistoquímico em amostras esplênicas dos grupos controle e infectado

Os cortes foram desparafinados e reidratados antes da recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (2,4 g/ml - pH 6.0) em panela a vapor por 45 min a 90°C. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol e H₂O₂ a 3% por 20 min a TA. Os cortes foram lavados em TSF (3 x 5min cada). Para o bloqueio dos sítios inespecíficos utilizou-se ASB a 3% em TSF por 1 hora em TA. Em seguida foram adicionados os anticorpos primários para PD-1 ou PD-L1 ou PD-L2, incubados por 24 horas a 4°C, seguidos de lavagem com TSF (3 x 5min cada). O anticorpo secundário LSAB (Dako®, K0690) foi aplicado (100 µl / lâmina) durante 45 min em TA, lavadas em TSF (3 x 5min cada). O cromógeno DAB (Dako®, K3468 - 20 µl/ml) foi aplicado com o níquel (0,3 mg/ml) por 1 min. Foi feita a contra coloração com hematoxilina de Harris (1:2) por 3 min e montadas em Bálsamo do Canadá. A objetiva utilizada foi para a análise das imagens foi de 40x. Para avaliação das imunomarcações foi utilizado o microscópio Olympus BX61 (Japão), e câmera Olympus DP71, programa Image Pro MC (Média Cybernetics Inc.), versão 6.1.0.34C.

Citometria de fluxo

A quantificação da expressão de PD-1 e seus ligantes conjugados a PE e do CD3, CD21 e F4/80 conjugados ao FITC foi realizada de acordo com Chiku et al. (2016). Dez mil eventos foram analisados e a exclusão dos debris celulares foi feita. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo (BD Accuri® C5) e sua análise realizada utilizando o programa BD Accuri C6 software, Versão 1.0.264.21 (BD Biosciences, CA).

Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes em macrófagos do grupo controle após a infecção *in vitro* por 72 horas com *L. infantum*

As células mononucleares do sangue periférico de cães do grupo controle (n=13) foram diluídas em 1 ml de RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA). A contagem e viabilidade celular (Countess® - Invitrogen) foi feita para a obtenção de 2×10^6 em 200 μ L de RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA), pH 7,2. Utilizando placas de cultura estéreis de 24 poços (Corning, Costar®, Sigma®, USA), com lamínulas circulares de vidro de 15 mm de diâmetro estéreis e livres de lipopolissacarídeos (Perfecta Lamínulas, São Paulo, Brasil), foram plaqueados de forma que o volume não transbordasse.

Após incubação de 4 horas, a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, com a completa aderência das células, os poços foram lavados com TSF a 37°C para retirada das células não aderentes. Foi repostado 1 ml de RPMI 1640 suplementado em cada poço e as células foram cultivadas por 7 dias a 37°C a 5% de CO₂ até a diferenciação em macrófagos.

Após esse período, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/00/MERO2) em cultura, na proporção de 10 parasitas para cada macrófago e mantidos nas mesmas condições. Decorridas 4 horas de infecção, os poços foram lavados com TSF pH 7.2 a 37°C para retirada das formas promastigotas não fagocitadas. O meio de cultura foi repostado no volume total de 1 ml a 37°C. Decorridas 72 horas de incubação, após a aquisição, por raspagem das células presentes nas lamínulas, foram transferidas para tubos estéreis, e incubadas por 1 hora a 4°C com anticorpos monoclonais para PD-1 e seus ligantes conjugados a PE com seus isotipos controles e mantidas protegidas da luz até a aquisição das amostras por citometria de fluxo (BD Accuri® C5).

Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes em linfócitos T, B e macrófagos em células mononucleares do sangue periférico do grupo controle após a infecção *in vitro* por 6 dias com *L. infantum*

Para verificar se havia necessidade de contato celular entre macrófagos e outros tipos celulares para regulação da expressão de PD-1 e seus ligantes, células mononucleares do sangue periférico de cães saudáveis foram isoladas, 2×10^6 e resuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA), e inseridas em placas de cultura estéreis com 24 poços (Corning Costar, Sigma®, USA). As culturas celulares foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/00/MERO2) na proporção 10 parasitas para cada célula e mantidos em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂, a 37°C (Thermo Scientific®, Water-Jacket, USA), por 6 dias. Após esse período as células foram recuperadas da placa e transferidas para microtubos, centrifugadas a 2000 rpm por 3 min para a retirada do sobrenadante. A imunomarcagem foi feita com anticorpos monoclonais conjugados a PE para PD-1, seus ligantes e seus isotipos controles. Em seguida protegidas da luz a 4°C até a aquisição das amostras por citometria de fluxo (BD Accuri™ C5).

Bloqueio de PD-1 e seus ligantes na cultura das células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço dos cães do grupo infectado

Para avaliarmos se a expressão de PD-1 e seus ligantes e a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 sofriam alteração após o bloqueio, 5×10^6 de células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço dos cães com LV foram isoladas e ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA), como previamente descrito e inseridas em placas de cultura estéreis com 24 poços (Corning®, Costar®, Sigma®, USA), na presença ou não dos anticorpos bloqueadores para PD-1 e seus ligantes (DULGERIAN et al., 2011). As culturas celulares foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ com atmosfera umedecida a 5% por 72 horas. Após esse tempo foram inseridas em

microtubos, centrifugadas a 2500 rpm por 5 min e o sobrenadante foi retirado e estocado em freezer a -80°C para a quantificação do IFN- γ e da IL-10.

Ensaio de linfoproliferação

Para o ensaio de linfoproliferação, linfonodos poplíteos de 11 cães do grupo infectado foram removidos após a eutanásia e mantidos em meio RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA) pH 7.2 até o processamento, conforme descrito anteriormente. As células do linfonodo, (10×10^6) foram coradas com CFSE (2,5 μ M - CellTrace®, Invitrogen, UK), conforme instruções do fabricante e cultivadas em duplicatas na concentração de 2×10^6 / poço, num volume final de 300 μ l de RPMI 1640 suplementado (Sigma®, USA).

O cultivo foi feito em placas de cultura estéreis de 96 poços (Sigma®, USA), na ausência de estímulo (controle negativo), na presença dos mitógenos: ConA 5 μ g/mL (Sigma®, St. Louis, MO, EUA) e PHA 5 μ L/mL (Gibco®, NY, EUA) - (controles positivos), do AtgS de *L. infantum* 20 μ g/mL (MHOM/BR/00/MERO2) produzido conforme descrito por Scott et al. (1987), anticorpos bloqueadores para o PD-1 e seus ligantes 5 μ g/mL (eBioscience®), na presença ou ausência do AtgS de *L. infantum* 20 μ g/mL (MHOM/BR/00/MERO2) e um poço sem o CFSE.

As células foram mantidas em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂, a 37°C (Thermo Scientific®, Water-Jacket, USA), por 6 dias. Após esse tempo, as células foram recuperadas da placa, inseridas em microtubos, que foram centrifugados a 2000 rpm por 3 min para a retirada do sobrenadante e mantidas a 4°C, protegidas da luz, até a leitura por citometria de fluxo (BD Accuri C5™).

A análise foi realizada em programa computacional (BD Accuri C6 Software, v. 1.0.264.21, EUA), sendo selecionada a população de células com tamanho e complexidade compatíveis com a população de linfócitos. A porcentagem de células que apresentaram redução da fluorescência verde (FL1)

em relação ao controle negativo foram consideradas como células em proliferação.

Sobrenadante da cultura para ensaio das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 e do NO

O ensaio de linfoproliferação foi realizado em duplicatas sem a marcação das células com o CFSE em uma placa de cultura, estéril, com 96 poços (Sigma®, USA) sob as mesmas condições e com as mesmas concentrações dos anticorpos bloqueadores para obtenção do sobrenadante da cultura celular. Após 6 dias de em estufa com atmosfera umidificada, com 5% de CO₂, a 37°C (Thermo Scientific®, Water-Jacket, USA), as células foram recuperadas da placa, centrifugadas a 2000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi separado em alíquotas de 100 μ l e armazenados a -80°C para dosagem das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e do NO.

Ensaio para detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10

O ensaio para detecção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 foi realizado utilizando kits de ELISA de captura (DuoSet canino R&D Systems, Minneapolis, USA), conforme as instruções do fabricante. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Spectra Count, Packard Bio Science Company, USA), no filtro de 450nm.

Dosagem de Nitrito

A dosagem de nitrito foi realizada pelo método de Griess (DULGERIAN et al., 2011), nos sobrenadantes das culturas dos mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço. Os sobrenadantes foram coletados e centrifugados por 10 min a 2000 rpm para retirada de células em suspensão.

Para a análise quantitativa realizou-se uma curva padrão no momento do experimento de 1,5 a 200 μ moles de Nitrito de sódio (Labsynth, SP, Brasil).

Extração de DNA e qPCR em tempo real

A extração do DNA e a quantificação da carga parasitária do baço dos cães dos grupos controle e infectado foram obtidos conforme descrito por Perosso et al. (2014). O ciclo de temperaturas no PCR em tempo real (CFX96®, C1000 Thermal Cycler, Bio Rad) foi utilizado conforme instruções do fabricante.

Para cada reação foi realizada uma curva padrão com DNA proveniente de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR00/MER02) com diluição de 10^8 a 10^0 parasitas.

Análise Estatística

Para os ensaios imunohistoquímicos comparando os grupos infectado e controle, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Após o bloqueio do PD-1 e seus ligantes: Nos ensaios com infecção *in vitro* por *L. infantum* para avaliação das citocinas IFN- γ e IL-10 no sobrenadante da cultura das células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço e nos ensaios de linfoproliferação e detecção da concentração do NO e das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 no sobrenadante da cultura das células do linfonodo o teste de Wilcoxon foi utilizado. A correlação não paramétrica de Spearman foi feita entre a carga parasitária do baço dos cães do grupo infectado e a expressão de PD-1 e seus ligantes. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prisma 6.0 e os valores foram considerados significantes quando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Seleção dos cães para estudo: grupo controle e infectado

Os sinais clínicos mais frequentes dos cães do grupo infectado foram linfadenomegalia, onicogrifose, alopecia, seborréia, caquexia e lesões de pele como em orelha, (Figura 1). Todos os cães infectados foram positivos por método parasitológico direto e reagentes na sorologia por ELISA indireto para o antígeno total de *L. infantum*.

1 - Frequência e localização dos sinais encontrados no grupo infectado

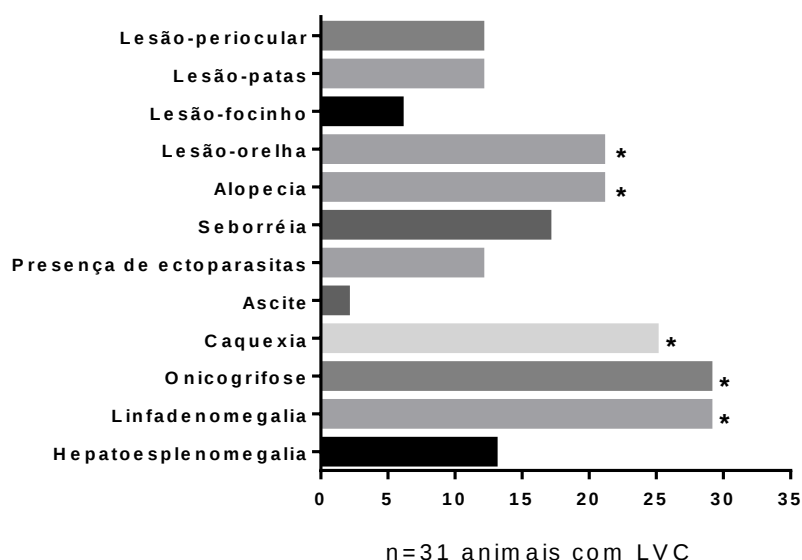


FIGURA 1 - Frequência e localização dos principais sinais clínicos observados nos cães do grupo infectado utilizados para avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes.

As densidades ópticas (DO) da sorologia por ELISA dos cães dos grupos controle (n=23) e infectados (n=31) são apresentadas na (Figura 2). As DOs do grupo controle ficaram abaixo do ponto de corte previamente determinado em estudo anterior (LIMA et al., 2003).

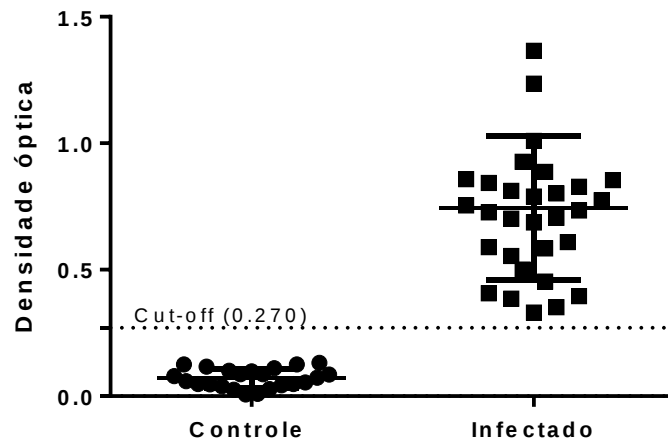


FIGURA 2 - Densidade óptica da sorologia por ELISA indireto segundo critérios de Lima et al. (2003), para diagnóstico da LVC dos cães dos grupos controle e infectado.

Comparação da expressão de PD-1 e seus ligantes por método imunohistoquímico em amostras esplênicas dos cães do grupo infectado e controle

Em recente trabalho publicado do nosso grupo de pesquisa, Chiku et al. (2016) mostraram por citometria de fluxo, aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes em sangue periférico e leucócitos do baço dos cães do grupo infectado. Empregando método imunohistoquímico foi verificado que nas células do baço havia alteração na expressão desses receptores comparando os cães do grupo infectado com cães do grupo controle (Figura 3a, b, c, d, e, f).

As análises dos cortes histológicos do baço submetidos ao ensaio imunohistoquímico mostraram maior porcentagem de células PD-1+, PD-L1+ ($P < 0.05$), e PD-L2+ ($P < 0.001$) no fragmento do baço do grupo infectado quando comparada ao grupo controle (Figura 3g).

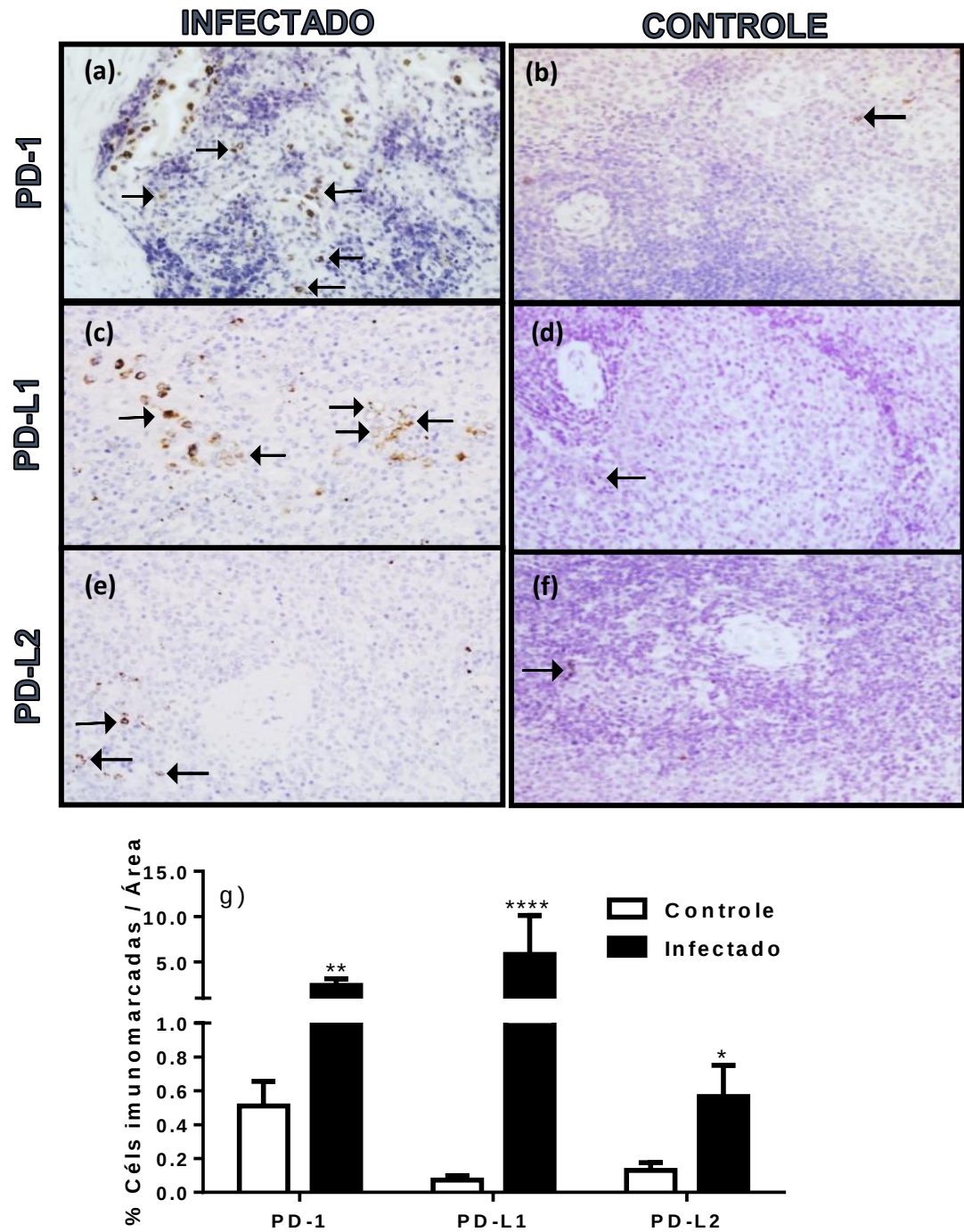


FIGURA 3 - Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica de PD-1 e seus ligantes em corte histológico do baço dos cães dos grupos controle e infectado. (a) PD-1+, (c) PD-L1+ e (e) PD-L2+ do grupo infectado. (b) PD-1+, (d) PD-L1+, e (f) PD-L2+ do grupo controle. As setas indicam células imunomarcadas. (g) Porcentagens de células imunomarcadas para PD-1 e seus ligantes. Dado gráfico apresentado pela média $\pm$ erro padrão da média. Ampliação: Obj. 40x, * $P < 0.05$.

Avaliação da expressão de PD-1 e seus ligantes após a infecção *in vitro* por *L. infantum* em células mononucleares de sangue periférico dos cães do grupo controle

Para confirmar que a infecção por *L. infantum* aumentava a expressão de PD-1 e seus ligantes, os receptores foram avaliados *in vitro* em macrófagos, após a infecção com *L. infantum*, porém nenhuma diferença foi observada (dado não mostrado). Devido à natureza da sinalização desencadeada por PD-1 ser dependente de seus ligantes, a sua expressão foi avaliada também em cultura de células mononucleares totais infectadas *in vitro* por *L. infantum*. A expressão de PD-1 ($P < 0.05$), PD-L1 e PD-L2 ($P < 0.01$) foi maior na infecção por *L. infantum* (Figura 4).

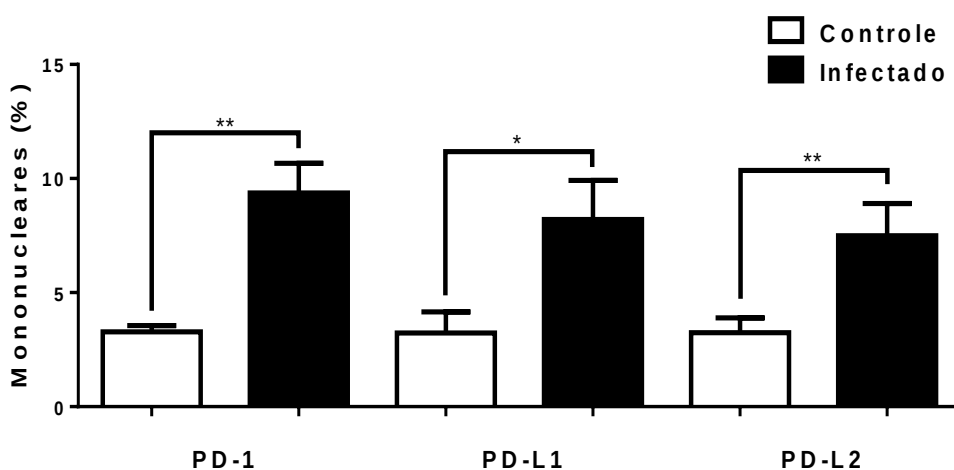


FIGURA 4 - Expressão de PD-1 e seus ligantes em mononucleares do sangue periférico com e sem infecção, *in vitro* com *L. infantum* por 6 dias. Dado gráfico apresentado em média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

A expressão de PD-1 e seus ligantes na superfície dos linfócitos T aumentaram após a infecção por *L. infantum* (Figura 5a, 5b e 5c.), a expressão de PD-L1 aumentou nos linfócitos B após a infecção (Figura 5d) e a expressão

de PD-1 e PD-L2 aumentou ($P < 0.05$) nos macrófagos após a infecção (Figura 5e, f).

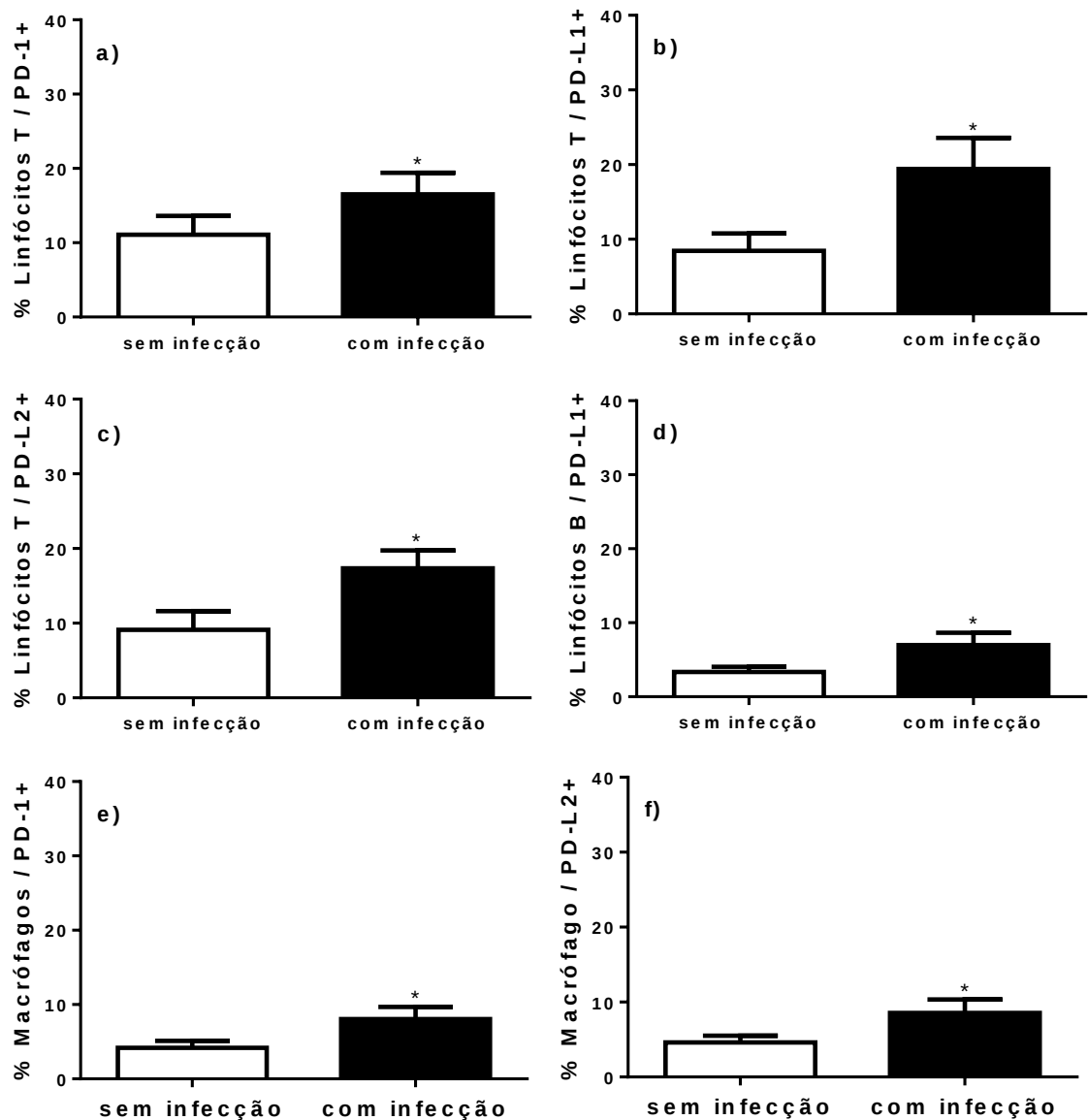


FIGURA 5 - Expressão de PD-1, PD-L1, PD-L2 em linfócitos T, B e macrófagos em células mononucleares do sangue periférico dos cães do grupo controle (n=8), infectadas *in vitro* por *L. infantum*. Células sem infecção (barras em branco), células infectadas (barras em preto), (a, b e c) em linfócitos T, (c, d) linfócitos B, (e, f) macrófagos. Resultados não significativos não tiveram figuras inseridas. Dados gráficos apresentados com média $\pm$ erro padrão da média; * $P < 0.05$.

Dosagem das citocinas IFN- γ e IL-10 em sobrenadante da cultura de células mononucleares do sangue periférico e leucócitos do baço de cães do grupo infectado, após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes

Procurou-se investigar se o receptor PD-1 e seus ligantes tem efeito regulatório em outras funções celulares, como na produção das citocinas IFN- γ e IL-10 em sobrenadante de cultura, devido ao seu papel regulador na resposta imunológica em cães com LV, uma vez que já foi observado que o bloqueio do PD-1 em células mononucleares de sangue periférico de cães com LV aumenta a produção de TNF- α e de NO no sobrenadante de cultura celular (CHIKU et al., 2016).

A IL-10 aumentou sua concentração ($P < 0.05$) no sobrenadante da cultura das células mononucleares do sangue periférico, na presença de anticorpo monoclonal bloqueador de PD-L2 (Figura 6a). Contudo no sobrenadante da cultura de leucócitos do baço o anticorpo bloqueador para o PD-1 diminuiu a concentração de IL-10 ($P < 0.05$), em comparação as culturas não tratadas (Figura 6b).

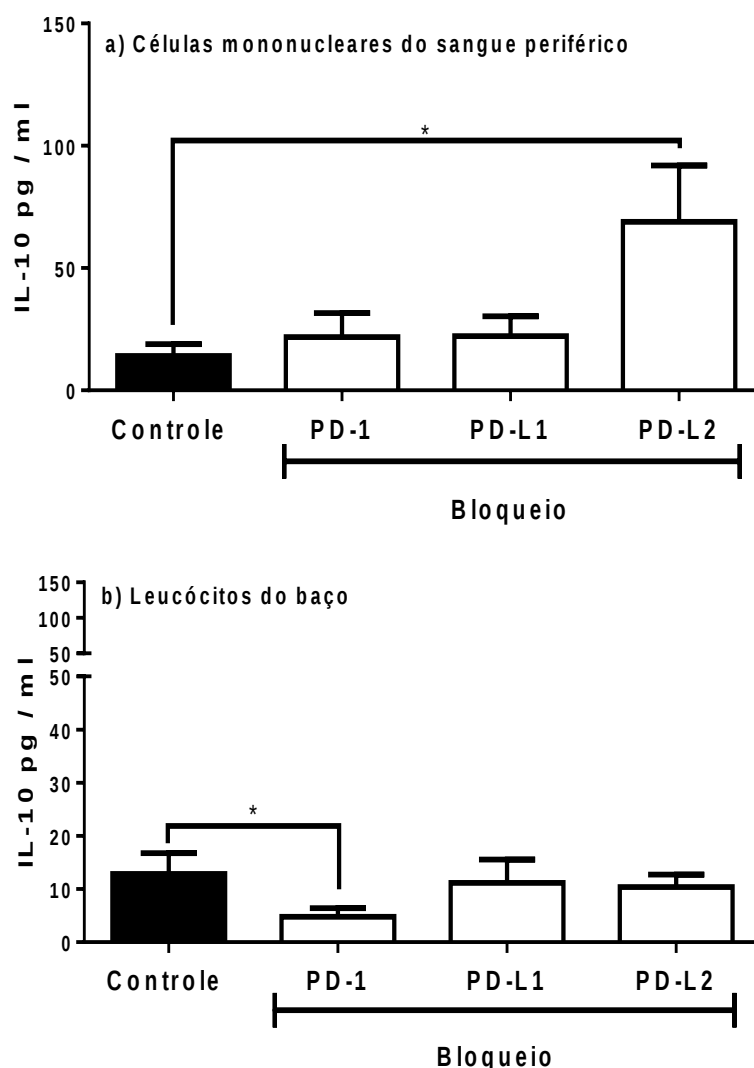


FIGURA 6 - Concentração de IL-10 no sobrenadante de cultura de (a) células mononucleares do sangue e (b) leucócitos do baço, dos cães do grupo infectado (n=15), após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes por 72 horas. Dados gráficos apresentados com média $\pm$ erro padrão da média; * $P < 0.05$.

Após 72 horas do bloqueio do PD-1 e seus ligantes, não foi encontrada diferença significativa na concentração de IFN- γ no sobrenadante da cultura dos leucócitos do baço e mononucleares do sangue periférico dos cães do grupo infectado (dados não mostrados).

Resposta proliferativa dos linfócitos ao AtgS de *L. infantum*, no linfonodo dos cães do grupo infectado após o bloqueio dos receptores PD-1 e seus ligantes e avaliação da produção do NO e das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4 no sobrenadante da cultura

O bloqueio do PD-1 e seus ligantes foi utilizado na cultura de linfócitos do linfonodo dos cães do grupo infectado, para avaliação da regulação da resposta proliferativa. Observamos que o anticorpo monoclonal bloqueador do PD-L1 aumentou a resposta linfoproliferativa antígeno específica ($P < 0.05$). Os anticorpos monoclonais bloqueadores para PD-1, PD-L1 aumentaram ($P < 0.05$) a proliferação não específica (Figura 7).

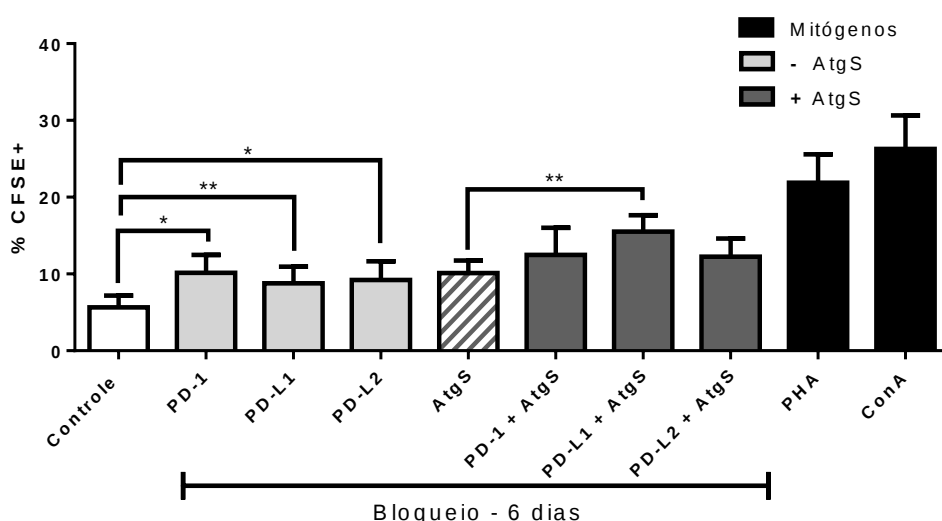


FIGURA 7 - Resposta linfoproliferativa de cultura de células do linfonodo de cães do grupo infectado por *Leishmania* spp. após o bloqueio dos receptores PD-1, PD-L1, PD-L2 com anticorpos monoclonais bloqueadores, na ausência ou presença de AtgS de *L. infantum*. Dados gráficos apresentados com média $\pm$ erro padrão da média; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

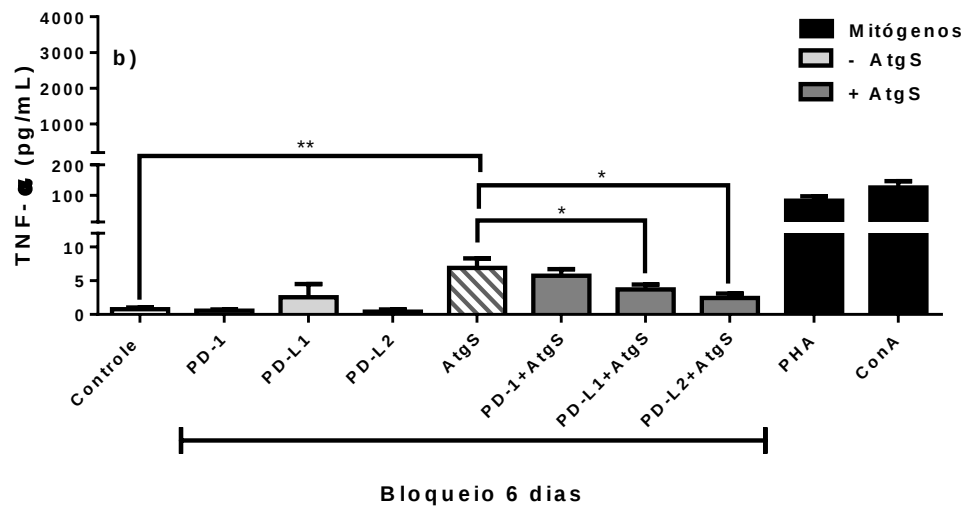
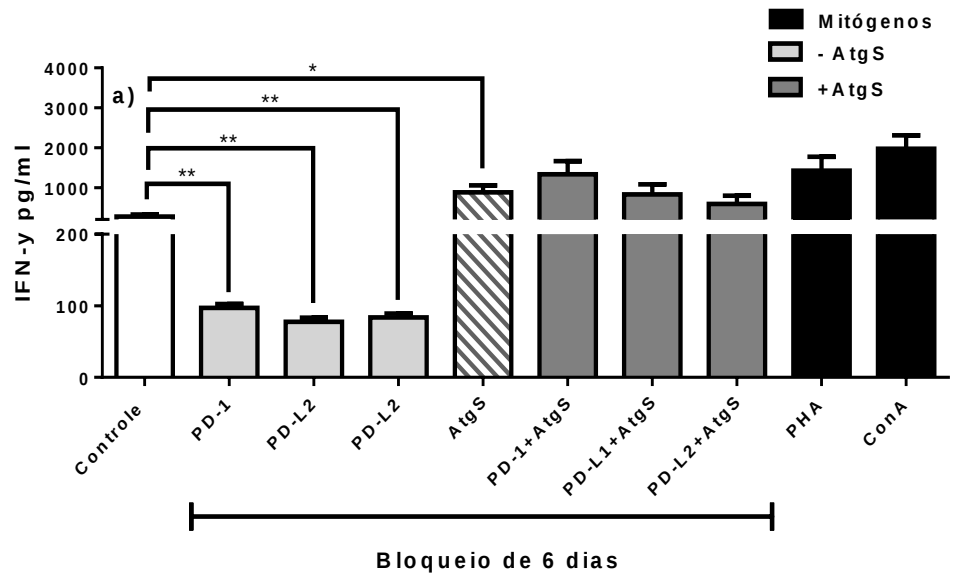
Os limites da curva de detecção do IFN- γ ficaram entre 7.81-2000 pg/ml. A produção de IFN- γ no sobrenadante da cultura das células do linfonodo dos

cães do grupo infectado submetidas ao ensaio de proliferação, foram menores ($P < 0.01$), quando bloqueamos os receptores PD-1 e seus ligantes na ausência do AtgS (Figura 8a). Contudo na presença do AtgS não foi observada diferença significativa. Na presença dos mitógenos houve alta produção de IFN- γ .

Os limites da curva de detecção do TNF- α ficaram entre 1.95 -1000 pg/ml. A produção de TNF- α no sobrenadante da cultura das células do linfonodo dos cães do grupo infectado submetidas ao ensaio de linfoproliferação, diminuiu ($P < 0.05$) na presença do AtgS quando bloqueamos o PD-L2 (Figura 8b).

Os limites da curva de detecção da IL-10 ficaram entre 7.81-2000 pg/ml. A produção de IL-10 no sobrenadante da cultura das células do linfonodo dos cães do grupo infectado submetidas ao ensaio de linfoproliferação, foram maiores quando bloqueamos o PD-1 ($P < 0.01$), PD-L1 ($P < 0.001$), e PD-L2 ($P < 0.01$), na ausência do AtgS, e diminuiu ($P < 0.05$), na presença do AtgS o bloqueio do PD-1 e do PD-L2 (Figura 8c).

Os limites da curva de detecção da IL-4 ficaram entre 5.85 - 6000 pg/ml. A produção de IL-4 no sobrenadante da cultura das células do linfonodo dos cães do grupo infectado submetidas ao ensaio de linfoproliferação, aumentou quando bloqueamos o PD-1, PD-L1 ($P < 0.001$), e PD-L2 ($P < 0.01$), na ausência do AtgS, e na presença do AtgS diminuiu ($P < 0.05$), com o bloqueio do PD-1 e do PD-L1 (Figura 8d).



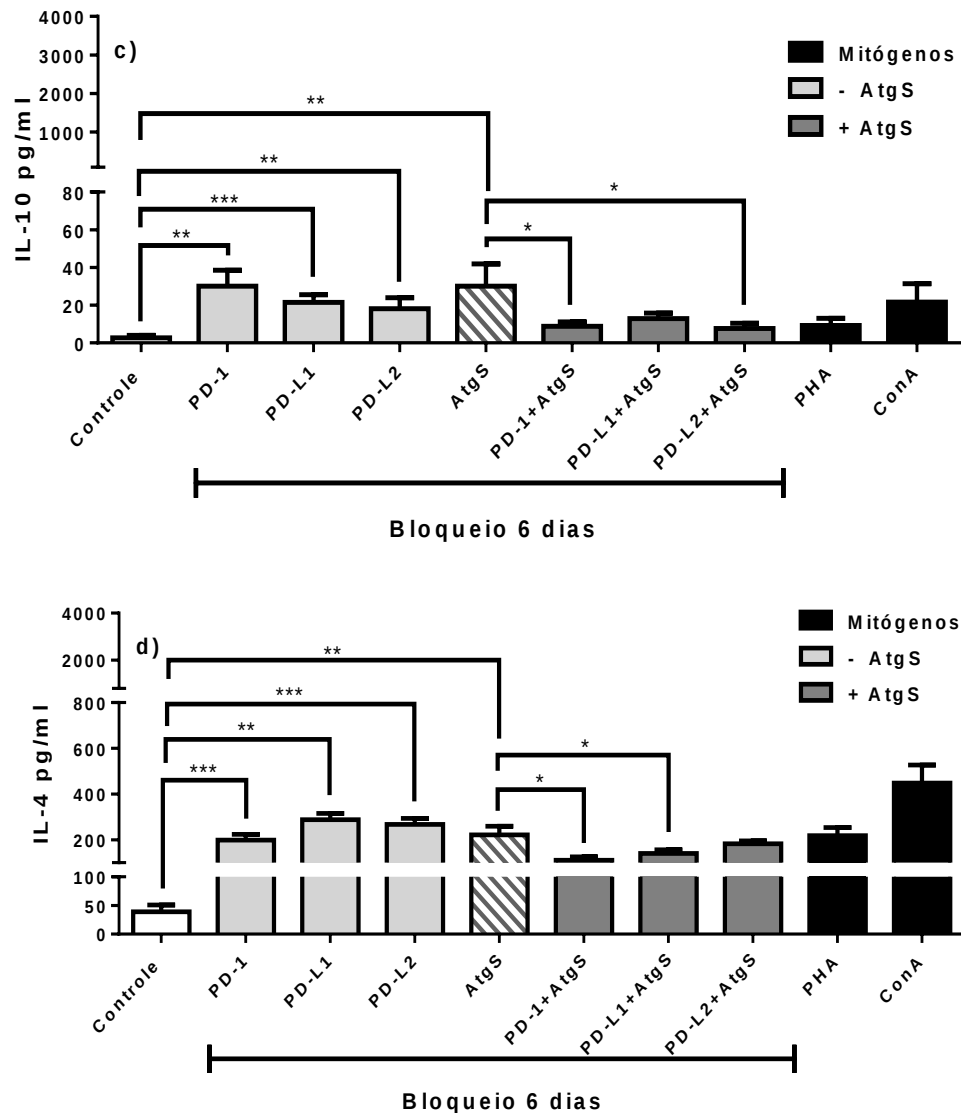


FIGURA 8 - Produção das citocinas (a) IFN- γ , (b) TNF- α , (c) IL-10 e (d) IL-4 no sobrenadante da cultura do ensaio de linfoproliferação das células do linfonodo dos cães saudáveis (n=11) cultivadas por 6 dias após o bloqueio do PD-1 e seus ligantes com e sem AtgS de *L. infantum*. (-AtgS= sem AtgS, +AtgS= com AtgS). Dados gráficos representados pela média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

A produção do óxido nítrico aumentou no sobrenadante da cultura da linfoproliferação do linfonodo dos cães do grupo infectado em resposta ao

anticorpo monoclonal bloqueador de PD-1 ($P < 0.01$), PD-L1 ($P < 0.05$), e PD-L2 ($P < 0.01$), tanto na resposta antígeno específica quanto na resposta não antígeno específica (Figura 9).

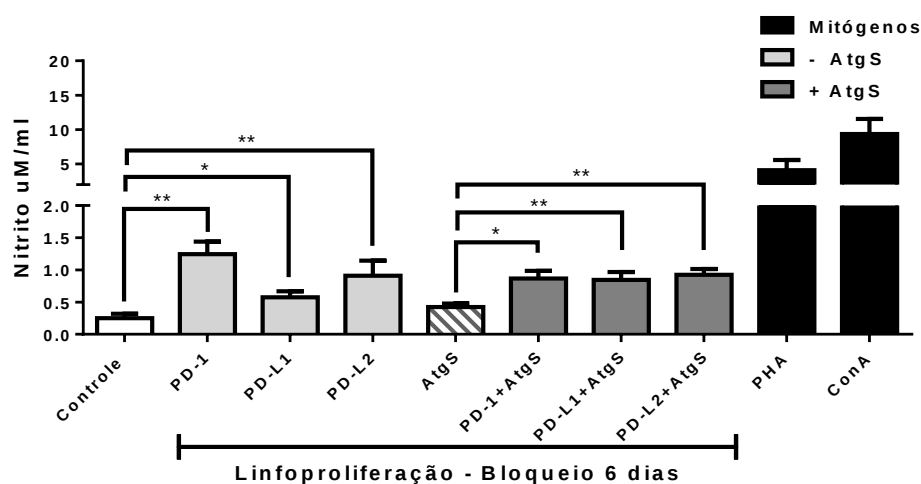


FIGURA 9 - Concentração de óxido nítrico no sobrenadante da cultura de células do linfonodo dos cães do grupo infectado (n=11) coradas com CFSE e cultivadas por seis dias sem tratamento algum (controle), na presença dos mitógenos PHA e ConA e de AtgS de *L. infantum*. Os gráficos são representados por média $\pm$ erro padrão da média. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Correlação entre a expressão de PD-1 e seus ligantes com a carga parasitária

A carga parasitária do baço mostrou correlação positiva significativa ($r=0.5$, $P < 0.05$), com análise da expressão de PD-1 e PD-L1 (Figura 10a e Figura 10b) em linfócitos B do baço. Não foi observada correlação entre a carga parasitária e a expressão de PD-1, PD-L2 e PD-L1 em macrófagos e linfócitos T do baço.

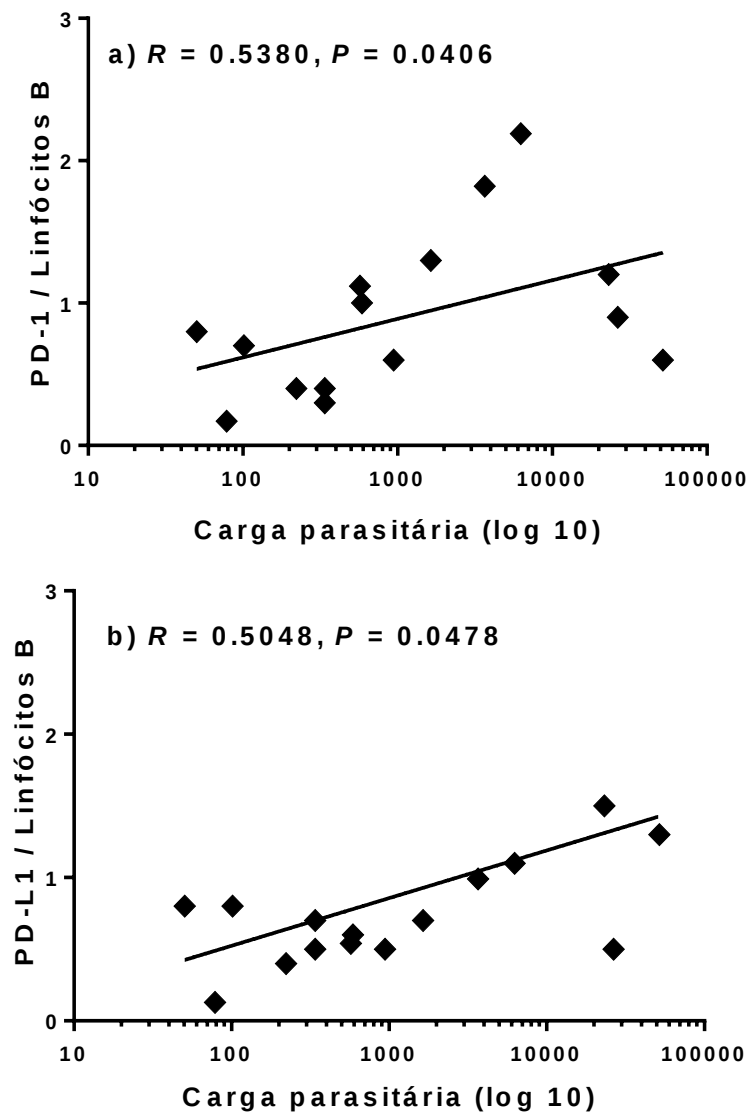


FIGURA 10 - Correlação positiva entra a carga parasitária esplênica dos cães do grupo infectado por *Leishmania* spp. e a expressão de PD-1 (a), PD-L1(b) em células CD21+.

DISCUSSÃO

Neste estudo, mostramos o aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes em células do baço de cães do grupo infectado com LV comparados ao grupo controle. A infecção *in vitro* por *L. infantum* em mononucleares do sangue periférico de cães saudáveis também mostrou aumento da expressão de PD-1 e

seus ligantes. Nos leucócitos do baço dos cães do grupo infectado, o bloqueio de PD-1 diminuiu a produção da IL-10. Em cultura de células do linfonodo dos cães do grupo infectado, o bloqueio de PD-L1 foi capaz de restaurar a resposta linfoproliferativa antígeno dependente.

A expressão dos receptores PD-1+, PD-L1+, PD-L2+ foi investigada em células do baço por imunohistoquímica. Observamos um aumento da expressão das células PD-1+ e seus ligantes no baço dos cães do grupo infectado comparado ao grupo controle. O aumento da expressão de PD-1 já foi observado em células do sangue periférico de cães infectados com LV e o aumento de sua expressão também foi observado (ESCH et al., 2013). Concordando com nossos resultados, Chiku et al. (2016) averiguaram por citometria de fluxo o aumento da expressão de PD-1 e seus ligantes nas células do sangue periférico e nos leucócitos do baço dos cães com LV.

A expressão de PD-1 e seus ligantes aumentou em células mononucleares totais de cães saudáveis após a infecção *in vitro* por *L. infantum*, porém é importante ressaltar que quando macrófagos foram diferenciados *in vitro* a partir de monócitos sanguíneos e infectados, a expressão de PD-1 e seus ligantes não mostrou aumento, sugerindo que fatores solúveis derivados das células T ou a interação de receptores e seus ligantes poderiam contribuir para a regulação da expressão dessas moléculas, além disso, a sinalização bidirecional (KUIPERS et al., 2006), pode ser importante na regulação da expressão de PD-1 e seus ligantes.

O aumento de PD-1 e seus ligantes foi observado em linfócitos T, o PD-L1 aumentou nos linfócitos B e PD-1 e PD-L2 aumentaram em macrófagos após a infecção *in vitro*, confirmando que o parasita é capaz de regular a expressão desses receptores na superfície de vários tipos celulares, como previamente observado em cães naturalmente infectados (CHIKU et al., 2016).

A produção da IL-10 foi observada no sobrenadante da cultura de células esplênicas e mononucleares do sangue periférico, dos cães do grupo infectado, confirmando seu papel regulador na LVC. Sua produção já foi observada em diferentes órgãos alvos da doença (CORRÊA et al., 2007; MICHELIN; PERRI;

LIMA, 2011). O anticorpo bloqueador de PD-1 diminuiu a concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura de células esplênicas, sugerindo que a secreção dessa citocina tenha relação com a sinalização desencadeada por PD-1 e seus ligantes.

Desse modo, a IL-10 no sobrenadante dessas células esplênicas observada pode estar associada a polarização de macrófagos para o perfil M1 já que, o uso do anticorpo bloqueador de PD-1 também foi capaz de aumentar a produção de nitrito nos cães com LV (CHIKU et al., 2016). Portanto, estudos futuros serão importantes para esclarecer a interação entre essas moléculas.

A capacidade linfoproliferativa antígeno específica aumentou após o bloqueio de PD-L1 nos cães com LV, embora tenha sido observado uma tendência ao aumento da proliferação com o uso do bloqueio do PD-1 e PD-L2. O PD-1 já foi previamente associado à falha de resposta proliferativa na LVC e o bloqueio desse receptor foi capaz de restaurar a proliferação (ESCH et al., 2013), semelhante ao que foi observado como o PD-L1 em nosso estudo.

A baixa proliferação observada com o bloqueio do PD-1, é sugestiva de que talvez a concentração desse anticorpo bloqueador utilizada não tenha sido suficiente para restaurar a resposta linfoproliferativa, já que sua expressão nos cães com LV foi alta nas células mononucleares do sangue periférico e baço. Concordando com nosso resultado, a proliferação das células T na infecção por *T. cruzi* após o bloqueio do PD-L2 também não foi restaurada (DULGERIAN et al., 2011). A proliferação não específica também foi maior com o bloqueio de PD-1 e seus ligantes, semelhante ao observado em outros estudos (KEIR; FRANCISCO; SHARPE, 2007).

Foi observado um aumento significativo na produção do IFN- γ no sobrenadante de cultura de células do linfonodo na presença do AtgS. A expressão dessa citocina tem sido associada a uma resposta protetora na LVC, uma vez que já foi observada um aumento de expressão dessa citocina em cães assintomáticos com relação a cães sintomáticos (ALVES et al., 2009).

Após o uso do anticorpo bloqueador para PD-1 e seus ligantes, observamos uma diminuição na produção dessa citocina no sobrenadante de

células do linfonodo, esse resultado é diferente do anteriormente publicado por Esch et al. (2013), pois no sobrenadante da cultura de células aderentes do sangue periférico, com infecção *in vitro* por *L. infantum* e após o bloqueio do PD-L1, houve um aumento na produção do IFN- γ .

Não foi observado um aumento significativo na produção do IFN- γ antígeno específica no sobrenadante de cultura de linfonodo, após o bloqueio de PD-1 e seus ligantes, porém foi observado uma tendência ao aumento. Em células aderentes do sangue periférico de cães com LV, tratadas com anticorpo bloqueador para o PD-L1 foi observada um aumento na produção de IFN- γ pelas células CD4+, mas não CD8+ (ESCH et al., 2013). Em nosso estudo avaliamos o sobrenadante de cultura total estando aí incluídas as células CD4+ e CD8+, podendo por esse motivo não ter sido encontrado diferença significativa. Outra explicação seria devido à exaustão das células na produção dessa citocina devido ao estímulo prolongado *in vivo* na tentativa de conter a infecção por *L. infantum*.

Foi observado um aumento significativo na produção de TNF- α no sobrenadante de cultura de linfonodo, na presença de antígeno solúvel e dos anticorpos bloqueadores para PD-1 e seus ligantes, na resposta não antígeno específica. Na LVC a produção do TNF- α tem sido associado com um mecanismo efetor envolvendo a resposta Th1 com ativação de macrófagos para a morte do parasito intracelular e resistência à doença em cães assintomáticos (BARBIÉRI et al., 2006).

Na resposta antígeno-específica com o bloqueio de PD-L2, a concentração de TNF- α diminuiu, embora tenha sido observada melhora da resposta linfoproliferativa. Diferente dos nossos resultados o bloqueio de PD-1 e seus ligantes aumentaram a produção de TNF- α em cultura de células esplênicas de cães com LV após 72 horas (CHIKU et al., 2016), é possível que o tempo da cultura tenha influência no resultado obtido, já que o sobrenadante foi avaliado para a presença de TNF- α após 6 dias.

A produção da IL-10 aumentou em resposta ao estímulo pelo AtgS no sobrenadante das células do linfonodo dos cães com LV. A IL-10 tem sido

indicada como supressora da resposta imune na LV (BARRAL et al., 1993; BACELLAR et al., 2000), e em cães com LV foi observado aumento da sua produção nas células do linfonodo de cães sintomáticos e diminuição em assintomáticos (ALVES et al., 2009). Os níveis de IL-10 diminuíram após estimulação antígeno específica com o bloqueio de PD-1 e PD-L2 confirmando que o receptor PD-1 regula a produção de IL-10 na resposta imune a LVC (ESCH et al., 2013).

A produção da IL-4 aumentou no sobrenadante de cultura no ensaio de linfoproliferação do linfonodo dos cães com LV em resposta ao AtgS de *L. infantum*, sugerindo o seu envolvimento na regulação da resposta imunológica, diferente do observado previamente, onde o RNAm para a IL-4 não mostrou diferença em resposta a infecção nas células do linfonodo dos cães com LV (ALVES et al., 2009). Também na resposta linfoproliferativa dos mononucleares do sangue periférico após estímulo com recombinante de *L. (L.) chagasi*, cães com LV, oligosintomáticos e assintomáticos apresentaram baixos níveis de IL-4, com produção de NO, ao contrário do que aconteceu com os cães sintomáticos (DA COSTA PINHEIRO et al., 2005), semelhante ao observado em nosso estudo nos cães do grupo infectado.

A IL-4 diminuiu no sobrenadante de cultura da linfoproliferação antígeno-específica dos cães do grupo infectado, após o bloqueio de PD-1 e PD-L1, sugerindo uma redução da resposta Th2. A diminuição na concentração da IL-4 pode ser importante para a proliferação do parasito no macrófago, pois é possível que o bloqueio de PD-1 e PD-L1 tenham mudado o perfil dos macrófagos, já que um aumento de NO também foi observado com o uso desses anticorpos no sobrenadantes dessas culturas.

Em nosso estudo observamos no sobrenadante das células do linfonodo um aumento da produção do NO nos cães com LV, na presença dos anticorpos bloqueadores para PD-1 e seus ligantes na resposta não antígeno específica e antígeno específica semelhante a esses achados o aumento de NO já foi observado anteriormente em células mononucleares de sangue periférico após o bloqueio desses receptores (CHIKU et al., 2016),

A correlação positiva observada entre a carga parasitária esplênica e a expressão de PD-1 e PD-L1 em linfócitos B, sugere que essa população celular possa ter um papel relevante na regulação da resposta imunológica na LVC. Essas células são responsáveis pela intensa produção de anticorpos que não é protetora. A hiperglobulinemia, associada a ineficiente resposta celular com a persistência do antígeno, favorece a formação de imunocomplexos, que se depositam em vários tecidos e órgãos resultando em glomerulonefrite, vasculite, uveíte, miosite e poliartrite características da doença (KOUTINAS et al., 2014).

O aumento do PD-L1 em linfócitos B já foi observado em cães com LV, onde, após seu bloqueio, a resposta Th1 foi restaurada (SCHAUT et al., 2016). A expressão de PD-1 e seus ligantes na célula B parece estar associada com a seleção e sobrevivência das células plasmáticas no centro germinal do baço de camundongos (GOOD-JACOBSON et al., 2010). Na LVC, a alta expressão de PD-1 e seus ligantes em linfócitos B e desse modo, pode estar perpetuando a produção de anticorpos não protetores e desse modo favorecendo o aumento da carga parasitária esplênica.

Conclui-se que o *L. infantum* pode modular a expressão de PD-1 e seus ligantes em células de cães com LV para suprimir a resposta linfoproliferativa, alterando a produção de citocinas em favor da sua persistência e sobrevivência em macrófagos. Mediante tal fato, tais receptores podem ser alvos para o desenvolvimento de drogas imunoterapêuticas e anticorpos monoclonais, podendo atuar como estimuladores da resposta imunológica em cães com VL.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

A presente pesquisa recebeu o suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e da Fundação de

Ampara a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP - 2013/04209-1 e 2013/06684-9.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 4, p. 349-358, 2009.
- BACELLAR, O. et al. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 12, n. 8, p. 1228-1231, 2000.
- BALLY, A. P. et al. NF-κB regulates PD-1 expression in macrophages. **J. Immunol.**, v. 194, n. 9, p. 4545-4554, 2015.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006.
- BARRAL, A. et al. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 90, n. 8, p. 3442-3446, 1993.
- BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n. 3-4, p. 345-351, 1997.
- CEERAZ, S.; NOWAK, E. C.; NOELLE, R. J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. **Trends Immunol.**, v. 34, n. 11, p. 556-563, 2013.

CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879-888, 2016.

CORRÊA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Parasitol.**, v. 143, n. 3-4, p. 267-274, 2007.

DA COSTA PINHEIRO, P. H. et al. Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 6, p. 3787-3789, 2005.

MICHELIN, A. F.; PERRI, S. H.; LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 105, n. 5, p. 373-383, 2011.

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

DOS-SANTOS, W. L. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 123, n. 3-4, p. 251-259, 2008.

DULGERIAN, L. R. et al. Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. **Immunology**, v. 133, n. 1, p. 29-40, 2011.

ESCH, K. J. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **J. Immunol.**, v. 191, n. 11, p. 5542-5550, 2013.

FOLKL, A. et al. Feline programmed death and its ligand: characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 134, n. 1-2, p. 107-14, 2010.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 209, n. 2, p. 290-299, 2014.

GOOD-JACOBSON, K. L. et al. PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 6, p. 535-542, 2010.

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

HOFMEYER, K. A.; JEON, H.; ZANG, X. The PD-1/PD-L1 (B7-H1) pathway in chronic infection-induced cytotoxic T lymphocyte exhaustion. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2011, p. 1-9, 2011. Disponível em: <[http://dx.doi: 10.1155/2011/451694](http://dx.doi.org/10.1155/2011/451694)> Acesso em: 1 jun. 2016.

KEIR, M. E.; FRANCISCO, L. M.; SHARPE, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 19, n. 3, p. 309-314, 2007.

KEIR, M. E. et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 677-704, 2008.

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.**, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014.

KUIPERS, H. et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 36, n. 9, p. 2472-2482, 2006.

LATCHMAN, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 261-268, 2001.

LIMA, V. M. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V. M. F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, n. 2-4, p. 147-153, 2012.

LOKE, P.; 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, n. 9, p. 5336-5341, 2003.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.

OKAZAKI, T.; HONJO, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. **Trends Immunol.**, v. 27, n. 4, p. 195-201, 2006.

PEROSSO, J. et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 205, n. 3-4, p. 417-423, 2014.

PINELLI, E. et al. 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, n. 1, p. 237-243, 1999.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

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

SCHAUT, R. G. et al. Regulatory IgDhi B cells suppress t cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 196, n. 10, p. 4100-4109, 2016.

SCOTT, P. et al. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. I. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **J. Immunol.**, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.

THAKUR, A.; KAUR, H.; KAUR, S. Evaluation of the immunogenicity and protective efficacy of killed *Leishmania donovani* antigen along with different adjuvants against experimental visceral leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 204, n. 4, p. 539-550, 2015.

VERÇOSA, B. L. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet. Parasitol.**, v. 189, n. 2-4, p. 162-170, 2012.