

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta

DISSERTAÇÃO

será

disponibilizado somente a partir

de

21/05/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Campus de Araçatuba

SIDNEI FERRO COSTA

**ESTIMULAÇÃO COMBINADA DE IL-12 E IL-15 PROMOVE A
RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES COM
LEISHMANIOSE VIA IFN- γ**

Araçatuba

2019

SIDNEI FERRO COSTA

**ESTIMULAÇÃO COMBINADA DE IL-12 E IL-15 PROMOVE A
RESPOSTA IMUNE CELULAR EM CÃES COM
LEISHMANIOSE VIA IFN- γ**

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

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

Araçatuba

2019

C837e	Costa, Sidnei Ferro Estimulação combinada de IL-12 e IL-15 promove a resposta imune celular em cães com leishmaniose via IFN-γ / Sidnei Ferro Costa. -- Araçatuba, 2019 70 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima 1. Leishmaniose. 2. Cães. 3. Imunologia. 4. Interleucina-12. 5. Interleucina-15. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados
fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: ESTIMULAÇÃO COMBINADA DE IL-12 E IL-15 PROMOVE A RESPOSTA IMUNE
CELULAR EM CÃES COM LEISHMANIOSE VIA IFN- γ

AUTOR: SIDNEI FERRO COSTA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre 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 - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 20 de maio de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e aos meus amigos, que sempre me apoiaram principalmente nos momentos difíceis, somente vocês sabem a importância e o significado desse trabalho na minha vida. Amo vocês!

A minha orientadora Valéria Marçal Felix de Lima que me propiciou essa oportunidade, sempre muito receptiva e atenciosa, me ouvindo nas horas de dúvidas, me ensinando sempre a melhor maneira de conduzir os experimentos, a escrever da melhor forma. Tenha certeza que encerro esse ciclo sendo uma pessoa muito melhor do que quando comecei. Muito obrigado por tudo!

As colegas do Laboratório de Imunologia Marilene Oliveira dos Santos Maciel, Larissa Martins Melo, Gabriela Lovizutto Venturin, Jaqueline Poletto Bragato, Gabriela Torres Rebech, sempre companheiras, inteligentes e dispostas a ajudar. Esse trabalho não é somente meu, mas nosso.

A técnica Flavia Mari Yamamoto por toda ajuda com os experimentos, sua humildade, disciplina e dedicação ao trabalho são exemplos que vou levar comigo para o resto da vida.

A minha banca de qualificação, Prof^a Flavia Lombardi Lopes e Prof^a Juliana Regina Peiró que me servem de exemplo profissional pela dedicação e comprometimento, obrigado pelas considerações dadas ao meu trabalho.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma me ajudaram e me deram apoio ao longo dessa caminhada. Obrigado!

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba pela oportunidade, por toda a infraestrutura oferecida e por ser tão bem recebido por todos.

O apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2017/10906-8 que financiou a pesquisa que deu origem ao artigo científico.

E a CAPES por financiar o discente por um período.

COSTA, S.F. et al. **Estimulação combinada de IL-12 e IL-15 promove a resposta imune celular em cães com leishmaniose via IFN- γ** . 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada nas Américas, pelo protozoário intracelular obrigatório *Leishmania infantum* e os cães domésticos são os principais reservatórios urbanos do parasita e em áreas endêmicas, o aumento da LV em humanos tem sido associado ao aumento da infecção canina. Os atuais medicamentos disponíveis para a Leishmaniose Canina (CanL) não são completamente eficientes e meses após o tratamento a maioria dos cães apresentam recidiva, indicando a necessidade de buscar formas alternativas de tratamento. Na CanL, cães desenvolvem uma resposta imune celular (Th1) ineficiente para combater o parasita e a estimulação das vias de citocinas em células de defesa com proteínas recombinantes, tem o potencial de se tornar parte de métodos imunoterapêuticos eficazes. Neste estudo, as citocinas recombinantes caninas (IL-12, IL-2, IL-15 e IL-7) e o receptor solúvel de IL-10R1 (sIL-10R1), com atividade antagonista, foram avaliadas pela primeira vez em combinações (IL-12/IL-2, IL-12/IL-15, IL-12/sIL-10R1, IL-15/IL-7) ou isoladamente (sIL-10R1) quanto à capacidade imunomodulatória em células mononucleares do sangue periférico (sigla em inglês PBMC) de cães com leishmaniose. Todas as combinações de proteínas recombinantes testadas mostraram melhorar a resposta linfoproliferativa. Além disso, as combinações de IL-12/IL-2 e IL-12/IL-15 promoveram a diminuição na expressão da proteína "Programed Cell Death 1" (PD-1) nos linfócitos. Estas mesmas combinações de citocinas e IL-12/sIL-10R1 induziram a produção de IFN- γ nas PBMCs. Além disso, a combinação de IL-12/IL-15 aumentou expressão de T-bet nos linfócitos. Esses achados estimulam o uso de IL-12 e IL-15 em futuros estudos *in vivo* com o objetivo de obter a polarização da resposta imune celular em cães com leishmaniose, o que pode contribuir para o desenvolvimento de um tratamento efetivo contra a CanL.

Palavras-chave: Leishmaniose. Cães. Imunologia. Interleucina-12. Interleucina-15

COSTA, S.F. et al. **Combined stimulation by IL-12 and IL-15 promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis via IFN- γ** . 2019. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (LV) is caused in the Americas by the obligate intracellular protozoan *Leishmania infantum* and domestic dogs are the major urban reservoirs of the parasite and in endemic areas, and increase LV in humans has been associated with increased canine infection. The current medications available for Canine Leishmaniasis (CanL) are not completely effective and months after treatment most dogs present with relapse, indicating the necessity to looking for alternative forms of treatment. In CanL, dogs develop an ineffective cellular immune response (Th1) to combat the parasite. Then, the stimulation of cytokine pathways in defense cells with recombinant proteins, has the potential to become part of effective immunotherapeutic methods. In this study, the canine recombinant cytokines (IL-12, IL-2, IL-15 and IL-7) and the soluble receptor of IL-10R1 (sIL-10R1) with antagonistic activity, were evaluated for the first time in combinations IL-12/IL-2, IL-12/IL-15, IL-12/sIL-10R1, IL-15/IL-7) or alone (sIL-10R1) for their immunomodulatory capacity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from dogs with leishmaniasis. All combinations of recombinant proteins tested were shown to improve lymphoproliferative response. Further, combinations of IL-12/IL-2 and IL-12/IL-15 promoted decrease in programmed cell death protein 1 (PD-1) expression in lymphocytes. These same combinations of cytokines and IL-12/casIL-10R1 induced IFN- γ production in PBMC. Furthermore, the combination of IL-12/IL-15 led to an increased T-bet expression. These findings encourage the use of IL-12 and IL-15 in future in vivo studies aiming to get polarization of cellular immune response in dogs with leishmaniasis, that may contribute to development of an effective treatment against CanL.

Keywords: Leishmaniasis. Dogs. Immunology. Interleukin-12. Interleukin-15.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **WHO Technical Report Series 949**. Geneva, Switzerland; 2010. p. 202. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf;jsessionid=8D39FF652FD5A79349D7621163D2F3BF?sequence=1
2. WHO. Leishmaniasis. In: **WHO World Health Organization [Internet]**. 2018 [Acesso em 1 Feb 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
3. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. 2005;366: 1561–1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
4. WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. In: **World Health Organization [Internet]**. 2015 [Acesso em 21 Jan 2019]. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/
5. Ministério da Saúde (BR). **Leishmaniose Visceral - Situação Epidemiológica - Dados [Internet]**. 2019 [cited 20 Jan 2019]. Available: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>
6. Secretária de Estado da Saúde (SP). **Leishmaniose Visceral [Internet]**. 2019 [Acesso em 26 Mar 2019]. Available: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/leishmaniose-visceral/>
7. Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizzoto MCR PS. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba–São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**. 2000;28: 36–44.

8. Cardim MFM, Guirado MM, Dibo MR, Chiaravalloti Neto F. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. **Rev Saude Publica**. 2016;50. doi:10.1590/S1518-8787.2016050005965
9. Alencar, J. E.; Dietze R. **Leishmaniose Visceral (Calazar)**. In: VERONESI, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.
10. de Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop**. 2008;107: 66–69. doi:10.1016/j.actatropica.2008.04.015
11. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors**. 2009;2: S1. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1
12. Otranto D, Dantas-Torres F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania spp.* to dogs: Caution is needed. **Vet Parasitol**. 2010;168: 173–174. doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.016
13. Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends Parasitol**. 2011;27: 155–159. doi:10.1016/j.pt.2010.12.006
14. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2009;160: 55–59. doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.079
15. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. Boelaert M, editor. **PLoS Negl Trop Dis**. 2011;5: e1019. doi:10.1371/journal.pntd.0001019
16. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al.

- Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Vet Parasitol.** 2009;165: 327–331. doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.013
17. Rosypal AC, Lindsay DS. Non-sand fly transmission of a north american isolate of *leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. **J Parasitol.** 2005;91: 1113–1115. doi:10.1645/GE-586R.1
 18. Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **J Am Vet Med Assoc.** 2001;219: 1076–83. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>
 19. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol.** 2002;18: 399–405.
 20. Teixeira-Neto RG, da Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, de Oliveira C di L, Pinheiro LC, et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasit Vectors.** 2014;7: 485. doi:10.1186/s13071-014-0485-7
 21. Costa DNCC, Bermudi PMMB, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Rev Saude Publica.** 2018;52: 92. doi:10.11606/S1518-8787.2018052000381
 22. Silva FM de F, Santos EM de S, Torres SM, Yamasak EM, Ramos RAN, Alves LC. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. **Rev Bras Parasitol Veterinária.** 2016;25: 127–130. doi:10.1590/S1984-29612016014
 23. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.** 2008;24: 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001

24. Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **Biomed Res Int.** 2018;2018: 1–12. doi:10.1155/2018/3296893
25. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol.** 2004;57: 1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X
26. Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *leishmania infantum chagasi*. **Infect Immun.** 2011;79: 108–117. doi:10.1128/IAI.00338-10
27. Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and alternative views. **Parasitol Today.** 2000;16: 292–297. doi:10.1016/S0169-4758(00)01692-6
28. Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 2015;163: 94–102. doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.011
29. Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology.** 2017;144: 95–115. doi:10.1017/S003118201600055X
30. Lasser A. The mononuclear phagocytic system: a review. **Hum Pathol.** 1983;14: 108–26. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6339357>
31. Bogdan C, Rölinghoff M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol.** 1998;28: 121–34. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504340>
32. Santana CC, Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes-De-Carvalho LC, Dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid

- tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunol.** 2008;30: 515–524. doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01051.x
33. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet Pathol.** 2014;51: 527–538. doi:10.1177/0300985814521248
 34. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors.** 2011;4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
 35. Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M, Fontbonne A. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **J Small Anim Pract.** 2012;53: 419–422. doi:10.1111/j.1748-5827.2012.01224.x
 36. Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RMSNC, Abreu-Silva AL, et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **J Infect Dev Ctries.** 2008;2: 24–33. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19736384>
 37. Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol.** 2002;88: 21–30. doi:10.1016/S0165-2427(02)00134-4
 38. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.** 2006;28: 329–337. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x
 39. Mendes-Sousa AF, Nascimento AAS, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araújo RN, et al. Different Host Complement Systems and Their Interactions with Saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* Promastigotes. Sturtevant J, editor. **PLoS One.** 2013;8: e79787. doi:10.1371/journal.pone.0079787

40. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunol Rev.** 2015;265: 156–171. doi:10.1111/imr.12291
41. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Mol Biochem Parasitol.** 2003;130: 65–74. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946842>
42. Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz AS, Gutiérrez-Kobehg L, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunol.** 2007;29: 117–126. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00924.x
43. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters? **J Parasitol Res.** 2012;2012: 1–12. doi:10.1155/2012/930257
44. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. molecular mechanisms regulating th1 immune responses. **Annu Rev Immunol.** 2003; 21:713-758. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
45. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathog.** 2012;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002536
46. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nat Immunol.** 2000; 4:311-316. doi: 10.1038/79758
47. Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore PF, Ruitenberg EJ. 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.** 1999;67: 237–243.

48. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol Rev.** 2004;201: 239–253. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x
49. Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **J Clin Invest.** 1983;72: 32–44. doi:10.1172/JCI110972
50. Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, Brandonisio O. Evaluation of Nitric Oxide Production by *Leishmania Infantum*-infected Dog Macrophages. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** 1998;20: 147–158. doi:10.3109/08923979809034814
51. Gradoni L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Vet Parasitol.** 2001;100: 87–103. doi:10.1016/S0304-4017(01)00486-1
52. Cardoso L, Schallig HDFH, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. **Vet Immunol Immunopathol.** 2007;117: 35–41. doi:10.1016/j.vetimm.2007.01.014
53. Solano-gallego L, Montserrat-sangrà S, Ordeix L, Martínez-orellana P. *Leishmania infantum* -specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasit Vectors.** 2016; 1–10. doi:10.1186/s13071-016-1598-y
54. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol.** 2009;128: 349–358. doi:10.1016/j.vetimm.2008.11.020
55. Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K,

- et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clin Vaccine Immunol.** 2010;17: 267–273. doi:10.1128/CVI.00456-09
56. Nascimento PRP do, Martins DRA, Monteiro GRG, Queiroz PV, Freire-Neto FP, Queiroz JW, et al. Association of Pro-Inflammatory Cytokines and Iron Regulatory Protein 2 (IRP2) with *Leishmania* Burden in Canine Visceral Leishmaniasis. **PLoS One.** 2013;8: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0073873
 57. Aslan H, Oliveira F, Meneses C, Castrovinci P, Gomes R, Teixeira C, et al. New insights into the transmissibility of *leishmania infantum* from dogs to sand flies: Experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. **J Infect Dis.** 2016;213: 1752–1761. doi:10.1093/infdis/jiw022
 58. O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol Rev.** 2008;223: 114–131. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00635.x
 59. Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF V., et al. Regulatory IgD hi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. **J Immunol.** 2016;196: 4100–4109. doi:10.4049/jimmunol.1502678
 60. Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. **Vet Parasitol.** 2007;147: 2–8. doi:10.1016/j.vetpar.2007.03.037
 61. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nat Immunol.** 2007;8: 239–245. doi:10.1038/ni1443
 62. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat Rev Cancer.** 2012;12: 252–264. doi:10.1038/nrc3239

63. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Christine A. PD-1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function Kevin. **J Immunol.** 2013;191: 5542–5550. doi:10.4049/jimmunol.1301810.PD-1-mediated
64. Chiku VM, Silva KLO, de Almeida BFM, Venturin GL, Leal AAC, de Martini CC, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology.** 2016;221: 879–888. doi:10.1016/j.imbio.2016.03.007
65. Oliveira Silva KL, Marin Chiku V, Luvizotto Venturin G, Correa Leal AA, de Almeida BF, De Rezende Eugenio F, et al. PD-1 and PD-L1 regulate cellular immunity in canine visceral leishmaniasis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2019;62: 76–87. doi:10.1016/j.cimid.2018.12.002
66. Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, et al. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 1996;173: 1515–8. doi:10.1093/infdis/173.6.1515
67. D'Oliveira Júnior A, Costa SRM, Bispo Barbosa A, Orge Orge M de LG, Carvalho EM. Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infection in Relatives and Neighbors of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1997;92: 15–20. doi:10.1590/S0074-02761997000100003
68. Pinelli E, Wagenaar J, Bernadina W, Pinelli E, Killick-kendrick R, Wagenaar J, et al. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **Infect Immun.** 1994;62: 229–235(7). doi:0019-9567/94/\$04.00+0
69. Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJP, Rutten VPMG, Gebhard D, Del Real G, 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.** 1995;25: 1594–1600. doi:10.1002/eji.1830250619

70. Strauss-Ayali D, Baneth G, Shor S, Okano F, Jaffe CL. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int J Parasitol**. 2005;35: 63–73. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.015
71. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nat Rev Immunol**. 2012;12: 180–190. doi:10.1038/nri3156
72. Hatakeyama M, Tsudo M, Minamoto S, Kono T, Doi T, Miyata T, et al. Interleukin-2 receptor β chain gene: Generation of three receptor forms by cloned human α and β chain cDNA's. **Science**. 1989;244: 551–556. doi:10.1126/science.2785715
73. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **J Immunol**. 1994;152: 5949–56. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207220>
74. Fehniger TA, Caligiuri M. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. **Blood**. 2001;97: 14–32. doi:10.1182/blood.V97.1.14
75. Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A. Cytokine-driven Proliferation and Differentiation of Human Naive, Central Memory, and Effector Memory CD4 . **Pathol Biol**. 2003; 51:64-66 doi:10.1084/jem.194.12.1711
76. Cieri N, Camisa B, Cocchiarella F, Forcato M, Oliveira G, Provati E, et al. IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. **Blood**. 2013;121: 573–584. doi:10.1182/blood-2012-05-431718
77. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. **J Exp Med**. 1994;180: 1395–403. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523571>

78. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in nk cell differentiation and host response to intracellular pathogens. **Annu Rev Immunol**. 1999;17: 19–49. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.19
79. Takeuchi E, Yanagawa H, Suzuki Y, Shinkawa K, Bando H, Sone S. Interleukin (IL-)15 has less activity than IL-2 to promote type 2 cytokine predominance in tumour-associated mononuclear cells from lung cancer patients. **Cytokine**. 2001;13: 119–123. doi:10.1006/cyto.2000.0808
80. Milano S, Di Bella G, D'Agostino P, Barbera C, Caruso R, La Rosa M, et al. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clin Exp Immunol**. 2002;127: 360–365. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.01749.x
81. Hsieh C, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, Garra AO, Murphy KM. Pillars Article: Development of TH1 CD4 + T Cells Through IL-12 Produced by Listeria. **J Immunol**. 2013;181: 4437–9.
82. dos Santos LR, Barrouin-Melo SM, Chang Y-F, Olsen J, McDonough SP, Quimby F, et al. Recombinant single-chain canine interleukin 12 induces interferon gamma mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**. 2004;98: 43–48. doi:10.1016/j.vetimm.2003.10.006
83. ElKassar N, Gress RE. An overview of IL-7 biology and its use in immunotherapy. **J Immunotoxicol**. 2010;7: 1–7. doi:10.3109/15476910903453296
84. Gessner A, Vieth M, Will A, Schröppel K, Rölinghoff M. Interleukin-7 enhances antimicrobial activity against *Leishmania major* in murine macrophages. **Infect Immun**. 1993;61: 4008–12. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8359927>
85. Pereira AM, De Pinheiro CGM, Dos Santos LR, Teixeira NC, Chang YF,

- Pontes-De-Carvalho LC, et al. Requirement of dual stimulation by homologous recombinant IL-2 and recombinant IL-12 for the in vitro production of interferon gamma by canine peripheral blood mononuclear cells. **BMC Res Notes**. 2014;7: 1–10. doi:10.1186/1756-0500-7-460
86. Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. **Microbes Infect**. 2000;2: 381–389. doi:10.1016/S1286-4579(00)00329-4
87. Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Vet Parasitol**. 2016;227: 98–114. doi:10.1016/j.vetpar.2016.07.011
88. dos Santos Nogueira F, Avino VC, Galvis-Ovallos F, Pereira-Chiocola VL, Moreira MAB, Romariz APPL, et al. Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasit Vectors**. 2019;12: 79. doi:10.1186/s13071-019-3323-0