



**ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE CANINA**

**Coimbra, junho 2022**

**Regina Araújo Ratola**

Aluna do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

**Constituição do Júri**

***Presidente do Júri:***

Professor Doutor Pedro Carvalho

***Arguente:***

Professora Doutora Anabela Almeida

***Orientador:***

Professor Doutor Hugo Vilhena

**Orientador Interno**

Professor Doutor Hugo Vilhena

**Coorientador Interno**

Professora Doutora Liliana

Montezinho

**Orientador (es) Externo (s)**

Dr. Luís Almeida

Hospital Veterinário de Braga

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em  
Medicina Veterinária da EUVG

## **Agradecimentos**

Antes de mais, é com muito orgulho que escrevo estas palavras, porque com muito esforço, empenho e dedicação, consigo chegar à reta final deste curso, alcançando assim um objetivo muito importante na minha vida.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao professor Hugo Vilhena e à professora Liliana Montezinho por me terem auxiliado na reta final de curso e na escolha deste tema. Agradeço ainda pela excelente orientação desta dissertação e também por estarem sempre dispostos para me ajudar.

Agradeço à Escola Universitária Vasco da Gama por todo o apoio demonstrado ao longo destes anos.

Agradeço ao Hospital Veterinário de Braga pela excelente experiência que me proporcionou. Deixo ainda um agradecimento especial a todos os membros desta equipa que sempre me apoiaram e ajudaram a ultrapassar todas as minhas dificuldades.

Ao meu orientador externo, Dr. Luís Almeida, por toda a ajuda demonstrada durante todo o período de estágio, por todos os ensinamentos que me transmitiu e pelas oportunidades que me concedeu na realização de várias tarefas ao longo destes meses.

Obrigada, André Lima, meu noivo, o amor da minha vida, a minha alma gémea, que perante todas as adversidades do curso e da vida continua sempre ao meu lado. Obrigada por me apoiares incondicionalmente, por estares comigo nos bons e maus momentos. Obrigada por teres aparado as minhas lágrimas quando nem tudo corria como esperava e confiares em mim mesmo quando eu não confiava. Ensinaste-me que tudo na vida acontece por um motivo. A melhor parte deste curso foi, sem dúvida, ter-te conhecido. És das pessoas mais importantes da minha vida e tenho a certeza de que temos muito para viver os dois. Amo-te muito meu amor! Obrigada também aos teus pais por todo o apoio e preocupação demonstrada.

Obrigada aos meus pais, Pedro e Fátima, que sempre se esforçaram para me dar o melhor e para que não me faltasse nada, tanto a mim como aos meus irmãos. Por me ensinarem que a vida não é fácil, mas se lutarmos pelo que queremos chegamos lá. Obrigada por todo o esforço que fizeram para me pagar este curso. Sei que sofreram comigo nesta luta conjunta. Desculpem se nem sempre ouvi os vossos conselhos, mas eu sempre soube que queriam o melhor para mim. Obrigada, Pai por estares sempre ao meu lado, por me mostrares que só se consegue alguma coisa na vida com muito esforço e trabalho como tu sempre o fizeste e que depois de tantas horas de trabalho ainda é possível fazer o que mais gostamos. Obrigada, Mãe por estares sempre ao meu lado, por todas as vezes que me tiveste de levar a Coimbra, por todas as horas

de espera no carro enquanto eu estava em exames, por todas as palavras motivacionais que nunca me deixaram desistir. Obrigada por serem os melhores pais do mundo!

Obrigada aos meus irmãos, Zé e Pedro Paulo, por me terem apoiado nesta luta. Por me fazerem acreditar que ia tudo correr bem mesmo quando o exame não corria como esperava. Por todas as vezes que não me apetecia estudar mais e me motivavam a continuar. Obrigada por serem as pessoas que são e de quem tanto me orgulho.

Obrigada às minhas cadelas, Nala e Simba, que foram a principal razão de ter ingressado neste curso.

Obrigada ao meu Avô António por desejar tanto quanto eu, que terminasse este curso e fosse Médica Veterinária. Obrigada pelos teus conselhos e por me teres dito uma frase que guardo para a vida, “Quem perde a esperança de vencer, está vencido!”.

Obrigada aos meus Avós maternos, Alice e Arnaldo, por lutarem comigo, por toda a preocupação e por toda a felicidade demonstrada ao saber que tinha concluído mais uma cadeira.

Obrigada à minha amiga Ândria, a pessoa de todas as horas, à minha companheira de estudo e de vida. Obrigada por me teres ajudado a tornar-me uma pessoa melhor. Obrigada por seres das pessoas que mais me orgulho na vida. Obrigada pela tua amizade, por estares sempre ao meu lado e por todas as vezes que aparaste as minhas lágrimas. Espero estar sempre ao teu lado para acompanhar todas as tuas conquistas tanto a nível pessoal, como profissional e que continuemos esta amizade lado a lado até ao resto das nossas vidas. Sem ti, este curso não faria o mesmo sentido. Obrigada, minha querida amiga!

Sem todos vocês, não seria possível atingir esta meta. Um muito obrigado a todos!

## Índice

Agradecimentos .....	ii
Índice de figuras .....	v
Índice de tabelas .....	vi
Lista de abreviaturas .....	vii
Imunologia da Leishmaniose Canina .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	3
1 Introdução .....	4
2 Leishmaniose Canina.....	5
3 Imunologia da Leishmaniose Canina.....	8
3.1 Imunidade inata.....	8
3.1.1 Neutrófilos .....	10
3.1.2 Macrófagos.....	11
3.1.3 Monócitos .....	12
3.1.4 Células dendríticas.....	13
3.1.5 Células Natural Killer.....	13
3.1.6 Mastócitos e eosinófilos .....	13
3.2 Imunidade adquirida.....	13
3.2.1 Imunidade celular mediada por linfócitos T .....	14
3.2.2 Imunidade humoral mediada por linfócitos B.....	17
3.3 Resposta imunitária associada à vacinação.....	18
3.4 Resposta imunitária associada aos órgãos envolventes.....	20
4 Conclusão .....	23
5 Referências bibliográficas .....	24

## Índice de figuras

Figura 1 – Ciclo biológico da *Leishmania infantum*.

Figura 2 - Animais resistentes à infeção.

Figura 3 - Suscetibilidade à infeção.

Figura 4 - Células precursoras Th1 e Th2.

Figura 5 - A evolução da doença após inoculação das formas parasitárias.

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Funções das diferentes células envolvidas na imunidade inata.

Tabela 2 - Funções das diferentes células envolvidas na imunidade adquirida.

## Lista de abreviaturas

Ag – Antígeno

APCs - Células apresentadoras de antígenos

CS – Moléculas co-estimuladores

DCs – Do inglês “Dendritic cells” traduzido como células dendríticas

ELISA – Do inglês “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” traduzido como Ensaio imunoenzimático

Fenótipo M1 - Via clássica do macrófago

Fenótipo M2 - Via alternativa do macrófago

IFN- $\gamma$  – Interferão-gama

IgA - Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgG1 – Imunoglobulina G, subclasse 1

IgG2 - Imunoglobulina G, subclasse 2

IgM - Imunoglobulina M

IL – Interleucina

iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida

*L. infantum* – *Leishmania infantum*

LBMPL - Vacina composta por antígenos de *Leishmania braziliensis* associada ao adjuvante monofosforil lipídeo A

LCan – Leishmaniose Canina

MAC – Macrófagos infetados

MPL - Do inglês “Monophosphoryl Lipid A” traduzido como monofosforil lipídeo A

NETs – Do inglês “Neutrophil extracellular traps” traduzido como redes extracelulares dos neutrófilos

NKs – Do inglês “Natural Killer Cells” traduzido como Células Natural Killer

NO - Óxido nítrico



PAMP – Do inglês “Pathogen-associated molecular pattern” traduzido como Padrões Moleculares Associados a agentes patogênicos

PCR – Do inglês “Polymerase chain reaction” traduzido como Reação em cadeia de polimerase

PMN – Do inglês “Polymorphonuclear neutrophil” traduzido como Neutrófilos polimorfonucleares

ROS - Do inglês “Reactive oxygen specie” traduzido como espécies reativas de oxigênio

RRPs – Do inglês “Pattern recognition receptor” traduzido como Receptores de reconhecimento de padrões

SMF - Sistema Mononuclear Fagocitário

T CD4+ - Do inglês “Cluster of differentiation cells T helper” traduzido como células T de ajuda

T CD8+ - Do inglês “Cluster of differentiation cells T cytotoxic” traduzido como Células T citotóxicas

TGF- $\beta$  – Do inglês “Transforming growth factor beta” traduzido como fator de crescimento transformador beta

Th1 – Do inglês “Type-1 T-helper ” traduzido como linfócitos T de ajuda do tipo 1

Th2 – Do inglês “Type-2 T-helper ” traduzido como linfócitos T de ajuda do tipo 2

TLRs – Do inglês “Toll-like receptors” traduzido como Receptores *toll-like*

TLR-4 - Do inglês “Toll-like receptor 4” traduzido como Receptor *toll-like 4*

TNF- $\alpha$  – Do inglês “tumor necrosis factor alpha” traduzido como Fator de necrose tumoral alfa

## **Imunologia da Leishmaniose Canina**

Regina Ratola<sup>a</sup>, Liliana Montezinho<sup>a</sup>, Luís Almeida<sup>b</sup>, Hugo Vilhena<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciência Veterinária | Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal ([reginaratola1@gmail.com](mailto:reginaratola1@gmail.com), [lilianamontezinho@gmail.com](mailto:lilianamontezinho@gmail.com), [hcrvilhena@gmail.com](mailto:hcrvilhena@gmail.com)).

<sup>b</sup> Hospital Veterinário de Braga, Rua de Abraão 63, 4705-076 Braga, Portugal ([hvetbraga@gmail.com](mailto:hvetbraga@gmail.com))

<sup>c</sup> Onevet Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Av. José R. Sousa Fernandes 197, 3020-210 Coimbra, Portugal ([hvuc@onevetgroup.pt](mailto:hvuc@onevetgroup.pt))

<sup>d</sup> Centro de Ciência Animal e Veterinária (CECAV), Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), Quinta de Prados, 5000-801 Vila Real, Portugal

## Resumo

A Leishmaniose Canina é uma doença parasitária com grande importância devido à sua distribuição mundial e carácter zoonótico. Esta doença é causada por um parasita do género *Leishmania* e transmitida por flebótomos infetados. A forma como esta doença se manifesta no animal depende de vários fatores, no entanto está intimamente relacionada com os mecanismos de defesa do seu sistema imunológico. O sistema imunológico divide-se em mecanismos inatos e adquiridos, em que participam diferentes tipos de células. Na imunidade inata, apesar de todas as células envolvidas exercerem funções importantes, os macrófagos desempenham um papel fulcral, tendo em conta que é nestas células que ocorre a transformação de formas promastigotas da *Leishmania spp.* em amastigotas. Já a imunidade adquirida divide-se em imunidade mediada por células e imunidade humoral, mas são as células CD4+ que determinam a resistência ou suscetibilidade do animal à infeção. Esta doença tem uma prevalência elevada na população canina em várias zonas de todo o mundo, sendo fundamental a implementação de medidas de prevenção. A forma como o sistema imunológico tenta combater o agente invasor é importante para evitar a progressão da doença, a deposição de imunocomplexos e as manifestações clínicas em diferentes órgãos. Apesar dos mecanismos do sistema imunológico ainda não serem totalmente conhecidos, esta dissertação bibliográfica pretende reunir informações referentes a este tema.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose; Zoonose; *Leishmania infantum*; Canídeos; Infeção; Imunidade; Vacinação; Imunocomplexos.

## **Abstract**

Canine Leishmaniasis is a parasitic disease of great importance due to its worldwide distribution and zoonotic character. This disease is caused by a parasite of the genus *Leishmania* and transmitted by infected sandflies. The way this disease manifests itself in the animal depends on several factors, but it is closely related to the defense mechanisms of its immune system. The immune system is divided into innate and acquired mechanisms, in which different types of cells participate. In innate immunity, although all the cells involved have important functions, macrophages play a key role, considering that it is in these cells that the transformation of promastigotes of *Leishmania* spp. into amastigotes occurs. Acquired immunity is divided into cell-mediated immunity and humoral immunity, but it is the CD4+ cells that determine the animal's resistance or susceptibility to infection. This disease has a high prevalence in the canine population in several areas around the world, and the implementation of preventive measures is essential. The way the immune system tries to fight the invading agent is important to avoid the progression of the disease, the deposition of immunocomplexes and the clinical manifestations in different organs. Although the mechanisms of the immune system are not yet fully known, this bibliographic dissertation intends to gather information regarding this subject.

KEY-WORDS: Leishmaniasis; Zoonosis; *Leishmania infantum*; canids; Infection; Immunity; Vaccination; Immune complexes

## 1 Introdução

A Leishmaniose Canina (LCan) é uma doença que pode ser causada por diferentes espécies de *Leishmania* no entanto, o principal agente etiológico é da espécie *Leishmania infantum* (*L. infantum*) (Ribeiro et al., 2018). Esta parasitose é considerada endêmica em 70 países e atinge milhões de cães na Bacia do Mediterrâneo, Ásia e América (Maia & Campino, 2018; M. A. Pereira et al., 2019a). A LCan é uma das doenças parasitárias mais importantes na Europa, sendo Portugal, Espanha, França e Itália considerados países endêmicos (Vaselek, 2021). O principal hospedeiro vertebrado desta doença é o cão e em algumas áreas, nomeadamente zonas rurais da China, do médio Oriente e norte de África, os cães infetados são abatidos como medida de controlo da Leishmaniose humana. No entanto, ao longo dos últimos anos, essa medida de controlo tem vindo a ser descontinuada e substituída por outras medidas, tais como o uso de inseticidas tópicos e vacinação dos animais (Dantas-Torres et al., 2019). Esta parasitose também apresenta uma grande importância devido ao seu carácter zoonótico, potencialmente fatal tanto para os cães como para os humanos (Moreno, 2019), sendo considerada uma doença emergente (Apostolopoulos et al., 2018; Ribeiro et al., 2018) e, por este motivo, é um exemplo de extrema importância no conceito “One Health” (Cacheiro-Llaguno et al., 2020; Cacheiro-Llaguno et al., 2021; Dantas-Torres et al., 2019; Maia & Campino, 2018). A infeção do cão resulta da interação do protozoário, com os mecanismos de defesa e a genética do hospedeiro (Maia & Campino, 2018). O sistema imunológico do hospedeiro é fundamental para evitar a infeção do animal no entanto, ainda são necessários mais estudos para compreender todo o mecanismo envolvente (Bourdoiseau et al., 2009). Esta revisão bibliográfica tem o objetivo de reunir informações recentes de forma a compreender os mecanismos envolvidos na imunologia desta doença.

## 2 Leishmaniose Canina

A LCan é uma doença causada por um protozoário do género *Leishmania*, através da picada de um flebótomo fêmea infetado (Maia & Campino, 2018; Otranto & Dantas-Torres, 2013; Serafim et al., 2020). Esta doença apresenta como hospedeiros vertebrados os cães domésticos e selvagens, sendo que na Bacia do Mediterrâneo, Países Asiáticos e Médio Oriente é causada pela espécie *Leishmania infantum*, e na América Latina é causada pela espécie *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) (Gharbi et al., 2015; Maia & Campino, 2018; Ribeiro et al., 2018; Toepp & Petersen, 2020). Agentes do género *Leishmania* são protozoários que pertencem ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Mastigophora, Ordem Kinetoplastida, Sub-ordem Trypanosomatina e Família Trypanosomatidae, sendo que este género se divide em dois subgéneros: *Leishmania* e *Viannia* (Kaszak et al., 2015; Rombolà et al., 2021). O flebótomo responsável por esta transmissão é do género *Phlebotomus*, no velho mundo e do género *Lutzomyia*, no novo mundo (Otranto & Dantas-Torres, 2013; Ribeiro et al., 2018). Estes vetores biológicos encontram-se principalmente nas zonas quentes da América, sul da Europa, Ásia, Austrália e África (Gharbi et al., 2015). Os fatores de risco são a idade, uma vez que afeta sobretudo animais a partir dos dois anos de idade; género, afetando mais os machos; a tipologia do pelo, pois afeta animais com pelo curto; e acesso ao exterior, afetando animais que se encontram no exterior ou com acesso ao exterior pois estão mais expostos à picada do flebótomo (Gharbi et al., 2015; Rombolà et al., 2021). Este protozoário apresenta duas formas parasitárias, a forma promastigota e a amastigota que são flageladas e não flageladas, respetivamente (Kaszak et al., 2015). O ciclo biológico da *Leishmania spp.* divide-se em duas fases: uma em que a forma promastigota extracelular de *Leishmania spp.* se encontra no intestino do vetor biológico (flebótomo) e uma fase em que a forma amastigota intracelular obrigatória se localiza nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Figura 1) (Forestier, 2013; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017).

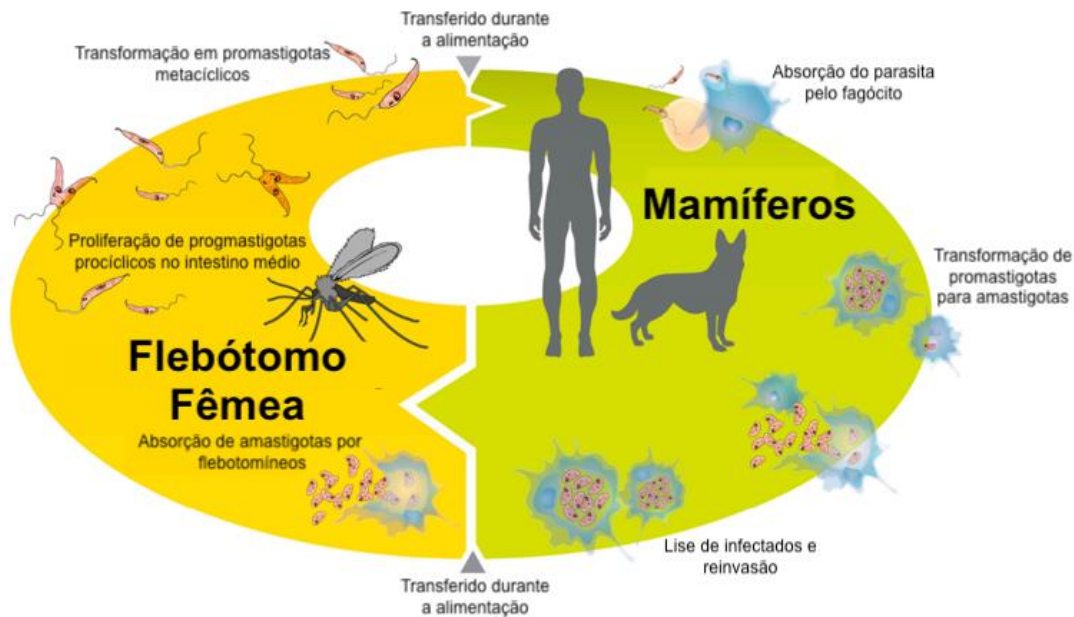


Figura 1 – Ciclo biológico do parasita *Leishmania spp.* O flebótomo fêmea pica o hospedeiro vertebrado e inocula as formas promastigotas metacíclicas. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas no local da inoculação por macrófagos onde ocorre a transformação destas em formas amastigotas. A replicação destas formas parasitárias pode levar à rutura dos macrófagos e, posteriormente, infeção de outras células. Quando outro flebótomo fêmea pica este hospedeiro para se alimentar, ingere juntamente com o sangue formas amastigotas, que se transformam em promastigotas no intestino do flebótomo. Adaptado de Veras & de Menezes, 2016.

Dependendo da resposta imunológica desenvolvida, do parasita e do vetor envolvido, a Leishmaniose pode ter diferentes manifestações clínicas (Kaszak et al., 2015; Koutinas & Koutinas, 2014). A forma como esta doença se manifesta é complexa. Animais naturalmente infetados podem variar de assintomáticos a apresentarem manifestações graves da doença. No entanto, o número de animais infetados assintomáticos é maior do que os que manifestam a doença (Moreno, 2019). Existem ainda animais sintomáticos que têm a capacidade de auto-cura, seja a nível clínico ou parasitológico e animais que são considerados resistentes que apenas manifestam sinais clínicos quando a imunidade celular é comprometida (Koutinas & Koutinas, 2014). Inicialmente ocorre uma reação inflamatória em resposta ao parasita e, conseqüentemente, podem ocorrer lesões na pele, olhos, mucosas, ossos ou órgãos internos, como os rins, fígado ou intestino (Kaszak et al., 2015). O primeiro sinal clínico de LCan é o aparecimento de uma lesão ulcerativa no local da inoculação, que após alguns dias regride. Conseqüentemente, ocorre um período de ausência de sinais ou manifestações clínicas pouco específicas, que se agravam ao longo do tempo. Os sinais clínicos desta doença são diversos e inespecíficos como: linfadenomegalia, que por vezes pode ser o único sinal manifestado; esplenomegalia associada ou não a hepatomegalia; alterações dermatológicas tal como a

hiperqueratose na cabeça, nariz e almofadas plantares; manifestações oftalmológicas, como a uveíte anterior e a queratoconjuntivite; outros sinais como claudicação, problemas vasculares, epistaxis, poliúria, polidipsia, vômitos e diarreia também se podem manifestar (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Gharbi et al., 2015). Esta doença pode levar ao aparecimento de doença renal, que é considerada a principal causa de mortalidade desta (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Gharbi et al., 2015). A complexidade do diagnóstico deve-se não só à inúmera variedade de manifestações clínicas, mas também ao facto dos testes serológicos não serem totalmente eficazes na distinção de animais naturalmente infetados e vacinados (Solano-Gallego et al., 2017; Velez et al., 2020). Os métodos de diagnósticos para a deteção de infeção por *Leishmania* spp. são: métodos parasitológicos que consistem na observação do parasita; métodos moleculares como o teste de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou PCR em tempo real e métodos serológicos que se dividem em quantitativos e qualitativos (Solano-Gallego et al., 2017). Os métodos serológicos mais usados na deteção desta doença são imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Rombolà et al., 2021). A eficácia do tratamento depende do estadio clínico do animal e dos fármacos utilizados (Ribeiro et al., 2018), sendo que os fármacos disponíveis apresentam algum grau de toxicidade e são dispendiosos (Roatt et al., 2014). Existem diversos protocolos de tratamentos para a LCan através de fármacos leishmanistáticos e leishmanicidas (Gharbi et al., 2015), no entanto raramente se alcança a cura parasitológica e depois da realização do tratamento podem mesmo ocorrer recidivas (Ribeiro et al., 2018). Os fármacos mais usados no tratamento desta doença são os antimoniais pentavalentes, miltefosina e o alopurinol (Miró et al., 2017). Os protocolos disponíveis podem promover a cura clínica, melhorar a qualidade de vida do animal, reduzir a carga parasitária e carga infecciosa para os vetores biológicos (Ribeiro et al., 2018). Esta doença causa imunossupressão e, por isso, a associação de fármacos a imunostimuladores é importante para aumentar a imunidade do animal (Carvalho et al., 2022). A utilização de corticosteroides no tratamento deve ser ponderada caso se verifique a deposição de imunocomplexos nas articulações ou nos rins (Gharbi et al., 2015). Para definir o tratamento mais apropriado ao animal e obter um prognóstico é necessário determinar o estadio clínico do animal (Ribeiro et al., 2018). O sistema de classificação usado para o estadiamento clínico do animal é do grupo LeishVet (Solano-Gallego et al., 2016). O grupo LeishVet é constituído por Veterinários e tem como objetivo auxiliar os clínicos no manejo desta doença (Solano-Gallego et al., 2011). Este sistema de classificação apresenta quatro estadios baseado nos sinais clínicos que o animal apresenta, nos achados clinicopatológicos e títulos serológicos, sendo que para cada estadio é recomendado um tratamento e determinado um prognóstico (Solano-Gallego et al., 2016). Os quatro estadios são: I (doença leve), II (doença moderada), III (doença severa) e IV (doença muito severa) (Ribeiro et al., 2018).

Ao longo dos tempos, têm sido estudados em paralelo com as vacinas, outros fármacos ou novas estratégias de tratamentos tais como a imunoterapia (Roatt et al., 2014). A imunoterapia não combate o agente patogénico, mas reforça a resposta imunológica. A domperidona (Leishguard®) atua como antagonista do recetor D2 da dopamina (Baxarias et al., 2019) e é um



fármaco imunomodulador que estimula os mecanismos de defesa inatos através da ativação de células fagocitárias, sendo utilizado como um método preventivo da doença (Ribeiro et al., 2018).

### **3 Imunologia da Leishmaniose Canina**

O sistema imunológico do hospedeiro é preponderante no mecanismo de defesa da LCan, sendo constituído por diferentes células chave que vão atuar frente ao agente invasor, pelo que a eliminação do parasita depende de uma boa resposta por parte das células envolventes (Ikeogu et al., 2020). Quando o flebótomo infetado pica o hospedeiro vertebrado, inocula as formas promastigotas e o sistema imunológico é a primeira barreira de defesa do organismo (Papadogiannakis & Koutinas, 2015). A resposta imunológica pode ser dividida em imunidade inata e adquirida (Hosein et al., 2017; Ikeogu et al., 2020). Esta resposta tem um papel determinante na forma como o organismo combate a infeção e previne a progressão da doença no entanto, existem diversos fatores que impedem uma resposta imune ideal (Kaszak et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). A capacidade do sistema imunitário do animal para eliminar o parasita irá determinar o desenvolvimento ou não da doença (Wardini et al., 2019).

#### **3.1 Imunidade inata**

A resposta imunitária é iniciada no local de inoculação do parasita envolvendo neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas (DCs), células natural Killer (NKs), mastócitos e eosinófilos. Estas células envolvidas na imunidade inata determinam a resistência ou suscetibilidade à infeção (Ikeogu et al., 2020). Os mecanismos de imunidade inata dos cães infetados por *Leishmania spp.* ainda são desconhecidos pois não se sabe se esta imunidade contribui para o controlo da infeção ou leva à progressão da doença (Pereira et al., 2017).

Tabela 1 – Funções das diferentes células envolvidas na imunidade inata (Abbas et al., 2015; Tizard, 2014; Costa-Da-silva et al., 2022).

<b>Células envolvidas na Imunidade Inata</b>		<b>Funções</b>
<b>Neutrófilos</b>		Os neutrófilos são as células mais abundantes na corrente sanguínea e a primeira linha de defesa no combate aos agentes invasores. São células com tempo de semi-vida curta e, por isso, apenas sobrevivem algumas horas (Tizard, 2014; Costa-Da-silva et al., 2022).
<b>Macrófagos</b>		Os macrófagos são considerados as células sentinelas mais importantes. Para além da sua função fagocitária, estas células são ativadas e respondem através da síntese de citocinas. Estas células desempenham uma função bastante importante na imunidade pois são a ponte de ligação entre a imunidade inata e a adquirida, uma vez que, sendo células com tempo de semi-vida mais longa têm a função de apresentar os antígenos aos linfócitos T e, por isso, são células apresentadoras de antígenos (APCs) (Tizard, 2014; Costa-Da-silva et al., 2022).
<b>Monócitos</b>		Os monócitos que circulam na corrente sanguínea são os precursores dos macrófagos e células dendríticas. A principal função é a migração destes monócitos para tecidos específicos onde se diferenciam (Abbas et al., 2015; Costa-Da-silva et al., 2022).
<b>Células dendríticas (DCs)</b>		As principais funções das células dendríticas são a participação na imunidade inata uma vez que são consideradas células sentinelas, o processamento dos antígenos exógenos e a regulação da imunidade adaptativa. Estas células são consideradas APCs (Tizard, 2014; Costa-Da-silva et al., 2022).
<b>Células Natural Killer (NKs)</b>		A designação “natural killer” surge do facto da principal função destas células ser eliminar células infetadas e ativar macrófagos através da produção de interferão-gama (IFN- $\gamma$ ) (Abbas et al., 2015; Costa-Da-silva et al., 2022).
<b>Mastócitos e eosinófilos</b>		Os mastócitos maduros encontram-se nos tecidos e funcionam como células sentinelas que reconhecem o agente invasor e produzem citocinas e outros mediadores inflamatórios como resposta à presença deste agente. Os eosinófilos estão presentes em tecidos específicos, porém quando existem sinais inflamatórios, estas células são recrutadas para o local (Abbas et al., 2015; Costa-Da-silva et al., 2022).

### 3.1.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são células polimorfonucleares (PMNs) que constituem a primeira linha de defesa contra infecções e, quando o flebótomo infetado por *Leishmania spp.* pica o hospedeiro vertebrado e inocula as formas promastigostas, estas células são recrutadas e migram através da corrente sanguínea para o local (Toepp & Petersen, 2020). O mecanismo pelo qual os neutrófilos são atraídos e migram para o local de inoculação não é totalmente conhecido (M. Pereira et al., 2017) mas existem diversos fatores quimiotáticos derivados do parasita, hospedeiro e flebótomo que podem originar esta migração (Papadogiannakis & Koutinas, 2015; M. Pereira et al., 2017). Segundo Kupani et al. (2021), a Interleucina 17 (IL-17) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) estão envolvidas no recrutamento e migração de neutrófilos. As formas promastigotas da *Leishmania spp.* modulam o recrutamento de leucócitos para o local, promovendo a sua entrada nestas células, com o objetivo de evitar a destruição do parasita por componentes imunes inatos solúveis, tais como componentes do complemento, possibilitando assim a sobrevivência do parasita (M. Pereira et al., 2017). Os neutrófilos quando chegam ao local de inoculação expressam vários recetores de reconhecimento de padrões (RRPs), tais como receptores *toll-like* (TLRs) que reconhecem a *Leishmania spp.* como um agente invasor e estabelecem uma ligação a esta, através de padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP) que são glicoproteínas que se encontram na sua superfície tais como lipofosfoglicanos (LPGs), glicoinositolfosfolípidos (GIPLs), glicoproteína 63 (gp63) e proteofosfoglicanos (PPG) (Kupani et al., 2021). Quando o neutrófilo fagocita o parasita *Leishmania spp.* e este fica contido dentro de vacúolos parasitóforos, esta célula secreta Interleucina oito (IL-8) que promove a migração de um maior número de neutrófilos para o local (da Silva et al., 2018). Estas células também promovem um processo oxidativo onde ocorre a libertação de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , as quais desencadeiam o recrutamento de macrófagos para o local e, conseqüente ativação destes e promovem a apoptose dos neutrófilos (Toepp & Petersen, 2020). Os neutrófilos infetados que sofreram apoptose, expressam na sua superfície recetores fosfatidilserina (PS) que é um sinal para os macrófagos reconhecerem esta célula como apoptótica. O mecanismo pelo qual a célula expressa este recetor é denominado de mimetismo apoptótico (Kupani et al., 2021). Os neutrófilos funcionam como transportadores do parasita, de forma silenciosa, para macrófagos, isto é, os parasitas que se encontram dentro de vacúolos parasitóforos, induzem a apoptose precoce dos neutrófilos infetados e, conseqüentemente, são fagocitados por macrófagos sendo que, nesse momento, o parasita encontra no macrófago um ambiente favorável para a sua multiplicação, um fenómeno conhecido como “cavalo de tróia” (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017; Ikeogu et al., 2020; Oikonomidis et al., 2019; Toepp & Petersen, 2020). Os PMNs apresentam um alto potencial microbicida, não só devido à presença de grânulos que contêm moléculas antimicrobianas e enzimas no seu interior, mas também através da síntese de espécies reativas de oxigénio (ROS). Apesar destes mecanismos, existem formas promastigotas fagocitadas que conseguem sobreviver (Pereira et al., 2017). De acordo com o estudo reportado por Pereira e colaboradores (2017), os PMNs reduzem significativamente a carga parasitária através de mecanismos de defesa intra e extracelulares no

entanto, segundo o estudo de Silva e colaboradores (2018), consta que apesar do parasita ser suscetível aos neutrófilos, algumas formas parasitárias da *Leishmania spp.*, conseguem escapar ao mecanismo microbicida dos neutrófilos, através da entrada rápida das formas promastigotas nos macrófagos, iniciando assim a proliferação no sistema mononuclear fagocitário (SMF). Os neutrófilos têm diversos mecanismos através dos quais tentam eliminar o parasita, tais como a fagocitose, NETs, ROS (Wardini et al., 2019) e exocitose enzimática (Pereira et al., 2017). A *Leishmania spp.* é considerada um indutor de NETs dos neutrófilos (Wardini et al., 2019) que são redes fibrosas extracelulares constituída por cromatina e proteínas granulares e citoplasmáticas, com a finalidade de dificultar a disseminação do parasita e facilitar a fagocitose. Este mecanismo, para além de ter um efeito microbicida, também modula o sistema imunológico do hospedeiro promovendo assim a resposta pró-inflamatória (Pereira et al., 2017). A IL-8 estimula a produção de NETs (Wardini et al., 2019). No estudo de Wardini et al. (2019), é descrito que as NETs provocam a morte de algumas formas promastigotas da *Leishmania spp.* no entanto, segundo os estudos de Ikeogu et al. (2020) e Pereira et al. (2017), este mecanismo é apenas eficaz contra algumas espécies de *Leishmania*, mas ineficaz contra a *L. infantum*. No interior da célula, são ativados os mecanismos efetores oxidativos, que servem para destruir os parasitas intracelulares, e não oxidativos, que têm como função tentar eliminar os parasitas que permanecem no ambiente extracelular (Ikeogu et al., 2020; Kupani et al., 2021). Os mecanismos efetores oxidativos produzem espécies reativas como óxido nítrico (NO) e os mecanismos não oxidativos secretam enzimas líticas tal como a elastase (Pereira et al., 2017), que aumenta a produção de citocinas e estimulam os macrófagos na produção de superóxidos (Teufel et al., 2021). Segundo Kupani et al. (2021), a *Leishmania spp.* é conhecida pela produção de um inibidor de serinopeptidases (ISP) que é constituído por um grupo de enzimas que inibe a ação de serinopeptidases derivadas do hospedeiro tais como a elastase de neutrófilos. Segundo o estudo (Pereira et al., 2017), as formas promastigotas da *Leishmania spp.* não se transformam em amastigotas dentro dos neutrófilos provavelmente devido a inexistência de condições ótimas no interior da célula para ocorrer o processo de transformação ou ao tempo insuficiente que o parasita permanece nesta célula. Por fim, os neutrófilos podem estabelecer uma ligação entre a imunidade inata e adquirida, através da apresentação de antígenos às células T e produção de anticorpos pelas células B (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017). Segundo Kupani et al. (2021), este mecanismo geralmente acontece pela secreção de citocinas e quimiocinas, que segundo Gonçalves-de-Albuquerque et al. (2017), os principais responsáveis por este mecanismo são as citocinas Interleucina dois (IL-2), Interleucina 10 (IL-10), TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

### **3.1.2 Macrófagos**

Os macrófagos desempenham uma função importante no ciclo deste parasita pois é nestas células que ocorre a transformação das formas promastigotas em amastigotas (Shapira & Zinoviev, 2011). Enquanto os neutrófilos são as primeiras células a migrar e fagocitar o parasita, os macrófagos são as células hospedeiras definitivas, onde a *Leishmania spp.* é capaz de promover a sua sobrevivência (Toepp & Petersen, 2020). Estas células também atuam como

APCs uma vez que transportam a *L. infantum* para os linfonodos regionais (Papadogiannakis & Koutinas, 2015). O papel desempenhado pelos macrófagos depende da via de ativação que é utilizada, ou seja, estas células podem promover a infecção proporcionando um ambiente favorável à sua replicação, através do fenótipo M2 (via alternativa do macrófago) ou promover a eliminação do parasita intracelular através do fenótipo M1 (via clássica do macrófago) (Sandoval Pacheco et al., 2021). Como foi referido anteriormente, o fenómeno denominado “cavalo de tróia” é bastante importante pois é através deste mecanismo que a *Leishmania spp.* consegue garantir a sua sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos, uma vez que não existe contacto do parasita com os recetores dos macrófagos e, por isso, não são ativados os mecanismos efetores responsáveis pela destruição do parasita, que conduz ao desenvolvimento de um fenótipo M2 do macrófago (Pereira et al., 2019; Sandoval Pacheco et al., 2021). Os macrófagos apresentam na sua superfície vários TLR, incluindo TLR-4, que se ligam aos PAMP do agente invasor (Toepp & Petersen, 2020), conseqüentemente, ocorre a fagocitose e o parasita permanece dentro de um vacúolo parasitóforo, sendo que este mecanismo diminui a viabilidade do parasita (Pereira et al., 2019). O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida pelas células T-helper tipo 1 (Th1), células T citotóxicas (T CD8+) e NKs, que medeia a ativação da via clássica dos macrófagos, ou seja, fenótipo M1 (Barbosa et al., 2011; Ikeogu et al., 2020; Sandoval Pacheco et al., 2021; Sanz et al., 2022). Esta ativação origina a síntese de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) que é responsável pela conversão de L-arginina em NO, sendo esta uma molécula efetora, que pode contribuir para a morte das formas amastigotas intracelulares. Em contrapartida, o protozoário *Leishmania spp.* inibe a produção de NO através da conversão de L-arginina em ornitina, que contribui para a sobrevivência do parasita no macrófago (Ikeogu et al., 2020). A Interleucina 12 (IL-12) é considerada uma citocina essencial na indução das células Th1 que promove a eliminação do parasita em macrófagos infetados (Barbosa et al., 2011; Toepp & Petersen, 2020), contudo a *Leishmania spp.* inibe a produção de IL-12 assegurando a sobrevivência dentro dos macrófagos (Ikeogu et al., 2020). O protozoário produz IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) que são citocinas inibitórias dos macrófagos, ou seja, favorecem a sobrevivência e proliferação do parasita (Rodrigues et al., 2017). Segundo o artigo Parody et al. (2019), quando os mecanismos de defesa não são eficazes contra o parasita, ocorre a multiplicação de formas amastigotas dentro dos macrófagos, levando à rutura da célula e disseminação destas no espaço extracelular, originando a síntese de anticorpos pelas células B.

### 3.1.3 Monócitos

Os monócitos são precursores de macrófagos que são recrutados para a derme por meio de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-8), proteínas do complemento (C5a e produtos de degradação de C5) e quimiocinas que são citocinas quimiotáticas (como MIP-1 $\beta$  e CCL3) (Ikeogu et al., 2020; Teufel et al., 2021), onde permanecem algumas horas após a inoculação das formas promastigotas do parasita (Pereira et al., 2019). Segundo Pereira et al. (2019), verificou-se que as formas promastigotas da *Leishmania spp.* ligam-se aos monócitos através da extremidade do flagelo.

### 3.1.4 Células dendríticas

As DCs, também consideradas APCs, podem ser infectadas por *Leishmania spp.* e estão envolvidas não só na imunidade inata frente ao agente invasor, mas também na diferenciação de células T-helper (T CD4+) em células Th1 efectoras, através da produção de IL-12 (Ikeogu et al., 2020). Estas células apresentam PAMP que reconhecem e se ligam aos RRPs que se encontram na membrana de superfície do protozoário *Leishmania spp.*. Subsequentemente, estas células migram até aos órgãos linfóides secundários, onde apresentam o antígeno (Ag) às células T. Para além disso, estas células expressam moléculas co-estimuladoras (CS) (CD40, CD80 e CD86) que são importantes na apresentação do Ag (Ikeogu et al., 2020; Tibúrcio et al., 2019). A transformação das formas promastigotas do parasita em amastigotas também pode ocorrer nestas células (Ikeogu et al., 2020).

### 3.1.5 Células Natural Killer

As células NK são células grandes granulares, que têm extrema importância na resposta imune precoce. Quando ocorre a interação destas células com as formas promastigotas do parasita, há produção de IFN- $\gamma$  que, conseqüentemente, ativa os macrófagos e promove a atividade leishmanicida. Esta interação resulta numa atividade citotóxica que leva à lise da célula e morte das formas parasitárias (Teufel et al., 2021).

### 3.1.6 Mastócitos e Eosinófilos

Os mastócitos e eosinófilos são células granulocíticas que são igualmente importantes no controlo da infeção por *Leishmania spp.* As funções que estas células desempenham na presença de *Leishmania spp.* ainda não são totalmente conhecidas (Cardoso et al., 2017). Os mastócitos, por se encontrarem em grande número no local de infeção, podem estar implicados na remodelação dos tecidos de cães infetados. Para além disso, estas células podem regular a resposta imune das células T, através de produção de fatores quimiotáticos, expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade Classe II (MHC II) e podem recrutar neutrófilos, macrófagos e células dendríticas para o local, tentando proporcionar um ambiente hostil para a sobrevivência do parasita. Já os eosinófilos, quando ativados na presença de IFN- $\gamma$ , estimulam a produção de mediadores inflamatórios e expressam recetores de membrana tais como, TLRs 4, 7 e 8 que podem ser relevantes na ligação e posterior eliminação do parasita, uma vez que estas células desempenham uma função microbicida contra a *Leishmania spp.* (Costa et al., 2018; da Silva et al., 2018).

## 3.2 Imunidade adquirida

Apesar da resposta imune inata ter bastante importância, uma vez que as células envolvidas chegam rapidamente ao local, a resposta imune adquirida é fulcral na resolução da

infecção por *Leishmania spp.* (Dayakar et al., 2019). Algumas formas promastigotas podem escapar aos mecanismos de defesa da resposta imune inata e, nestes casos, sobreviver (Pereira et al., 2017). A imunidade adquirida mediada por linfócitos B e T, divide-se em imunidade humoral e celular respetivamente; é considerada específica e apresenta memória imunológica (Ikeogu et al., 2020), sendo que diversas citocinas apresentam uma função importante (Hosein et al., 2017).

Tabela 2 – Funções das diferentes células envolvidas na imunidade adquirida (Abbas et al., 2015; Tizard, 2014)

Células envolvidas na imunidade adquirida		Funções
Linfócitos T	Células T CD4 +	Estas células têm como principais funções, a ativação de macrófagos, estimular a diferenciação de células B e a estimulação de uma resposta inflamatória (Tizard, 2014).
	Células T CD8 +	A principal função é a eliminação das células infetadas com agentes invasores intracelulares (Tizard, 2014).
Linfócitos B		Estas células têm como função a produção de anticorpos (Abbas et al., 2015; Tizard, 2014)

### 3.2.1 Imunidade celular mediada por linfócitos T

A imunidade mediada por células apresenta um papel fundamental na proteção contra o agente invasor (Ikeogu et al., 2020). Segundo Papadogiannakis & Koutinas (2015), a imunidade celular desempenha a função de estabelecer a resistência ou a suscetibilidade à doença, e a gravidade está relacionada com a imunossupressão das células T (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014).

#### 3.2.1.1 Células T CD4 +

As Células T CD4+ são bastante importantes, uma vez que estabelecem uma ligação entre a imunidade inata e adquirida (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017) e podem diferenciar-se em três subpopulações de células efetoras: Th1, Th2 e Th17, que produzem diferente grupos de citocinas; enquanto que as células Th1 produzem INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 (Barbiéri, 2006) e IL-12 (Barbosa et al., 2011), as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 (Barbiéri, 2006) e as células Th17 produzem IL-17 (Teufel et al., 2021; Toepp & Petersen, 2020), IL-17F, IL-21 e IL-22 (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017). Os animais assintomáticos ou clinicamente resistentes, desenvolvem uma resposta imune celular Th1 (Cacheiro-Ilaguno et al., 2021). A célula Th1 tem como função o combate de microrganismos intracelulares através da defesa mediada por fagócitos (Ikeogu et al., 2020). A ativação das células Th1 depende dos seguintes fatores: a genética do hospedeiro, a natureza dos antígenos da *Leishmania spp.* e as

citocinas presentes. A IL-12 é considerada a principal citocina indutora das células Th1 (Barbiéri, 2006) e, juntamente com a INF- $\gamma$  produzida pelas células T CD4+, contribuem para a resistência à infecção (Ikeogu et al., 2020). Segundo Reis et al. (2010), a INF- $\gamma$  promove a ativação dos macrófagos e, em cooperação com TNF- $\alpha$  estimulam a atividade leishmanicida dos macrófagos. No entanto, segundo Teufel et al. (2021), as citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , para além de ativarem e estimularem a atividade leishmanicida dos macrófagos, estão também envolvidas na ativação das células dendríticas. As células Th1 produzem também IL-2 que é responsável pela proliferação de outras células T (Toepp & Petersen, 2020) e regulação negativa das células Th2 (Figura 2) (Papadogiannakis & Koutinas, 2015). Assim, em animais resistentes prevalece uma resposta mediada por células com níveis baixos de anticorpos específicos, níveis parasitários baixos e sem manifestações de sinais clínicos (Maia & Campino, 2018).

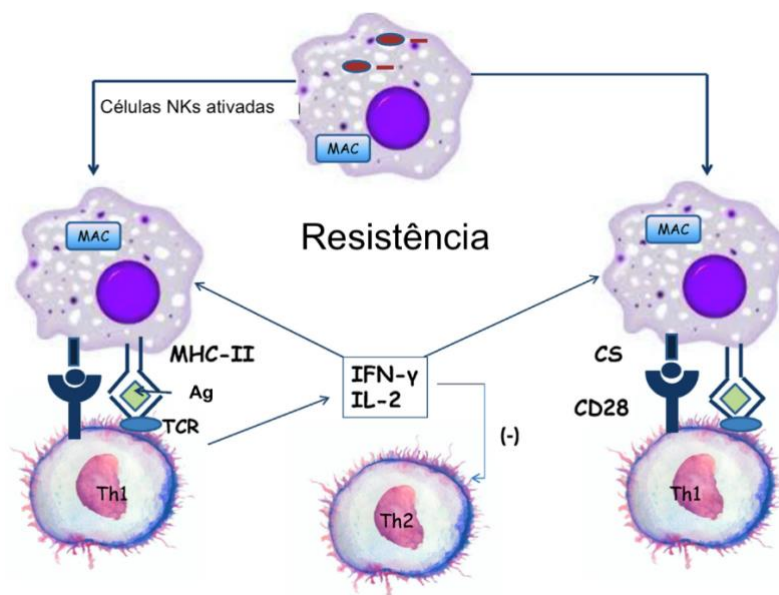


Figura 2 – Animais resistentes à infecção. Os macrófagos infectados (MAC) expressam moléculas co-estimuladoras (CS) que se ligam ao CD28 da célula Th1, e o antígeno (Ag) de *Leishmania spp.* reconhecido pelo MCH II se liga ao TCR e ativa a célula Th1. Quando esta célula Th1 é ativada, ocorre a produção de INF- $\gamma$  e IL-2 que promove uma regulação negativa sob as células Th2. Adaptado de Papadogiannakis & Koutinas, 2015.

Os animais sintomáticos ou suscetíveis à infecção são aqueles que desenvolvem uma resposta imune celular Th2 (Cacheiro-Illaguno et al., 2021). As células Th2, quando ativadas, são responsáveis pela suscetibilidade à doença, ou seja, promove a sobrevivência do parasita e a exacerbação das lesões através da inativação dos macrófagos, juntamente com a supressão da via iNOS que tem uma extrema importância na eliminação do parasita intracelular. Estas células Th2 vão ativar uma resposta humoral, caracterizada por produção de anticorpos que não são imunoprotetores e IL-4 que regula negativamente a resposta imune Th1 (Figura 3) (Barbiéri, 2006; Cacheiro-Illaguno et al., 2021; Papadogiannakis & Koutinas, 2015; Teufel et al., 2021).



Assim, animais suscetíveis apresentam uma resposta predominante humoral, uma inibição da resposta mediada por células e apresentam sinais clínicos (Maia & Campino, 2018).

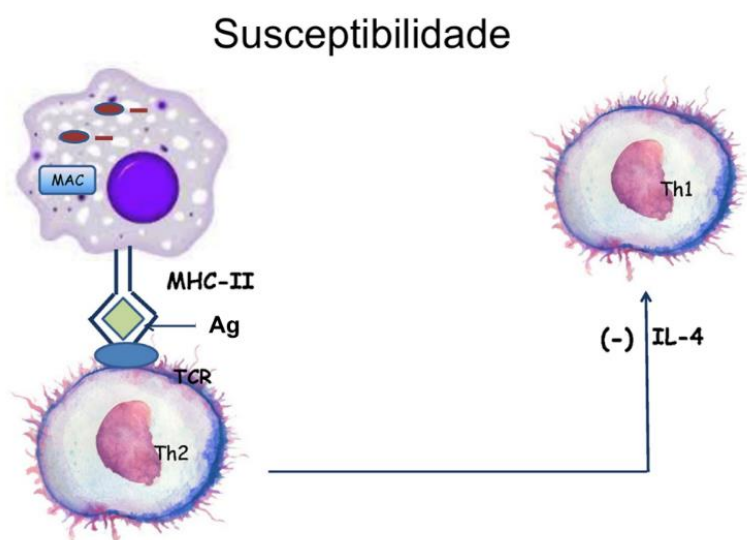


Figura 3 – Suscetibilidade à infecção. Os macrófagos infetados (MAC) apresentam antígenos (Ag) de *Leishmania spp.* reconhecido pelo MCH II que se ligam ao TCR, ativando a célula Th2. Quando esta célula é ativada, ocorre a produção de IL-4 que regula negativamente as células Th1. Adaptado de Papadogiannakis & Koutinas, 2015.

Apesar de ainda não serem totalmente conhecidas as funções das células Th17, estudos indicam que estas podem estar relacionadas com fatores inflamatórios durante a infecção por *Leishmania spp.* A célula Th17 produz IL-17 que recrutam neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (Teufel et al., 2021; Toepp & Petersen, 2020) e ativa a produção de NO pelos macrófagos (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017). Apesar das células T CD8+ e neutrófilos também produzirem esta citocina, a célula Th17 é a principal produtora. Para além disso, esta citocina coopera com a Interleucina IL-17F, IL-21 e IL-22, que são produzidas pelas células Th17, provocando inflamação tecidual (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017). O perfil misto Th1 e Th2 ainda não está completamente esclarecido devido à existência de estudos com resultados controversos (Rodríguez-Cortés et al., 2016). Existem vários estudos (Hosein et al., 2017; Reis et al., 2010), onde está descrito que pode ocorrer uma resposta imune mista de Th1 e Th2 associada a animais assintomáticos, apresentando níveis aumentados de IL-2, IL-10 e INF- $\gamma$ . No entanto, segundo Rodríguez-Cortés et al. (2016), a doença ativa está relacionada com uma imunossupressão específica, o desenvolvimento de uma resposta humoral evidente e um perfil misto Th1 e Th2. Nos cães assintomáticos verifica-se a presença de infiltrados inflamatórios na derme e uma resposta imune mista nos tecidos cutâneos (Reis et al., 2010). Segundo Barbiéri (2006), verifica-se a predominância de IL-2 e INF- $\gamma$  em cães assintomáticos.

Para o desenvolvimento de uma resposta celular imune bem-sucedida, ou seja, para que ocorra a eliminação do parasita sem provocar lesões tecidulares, é necessário inicialmente, haver uma

ligação das APC à célula T CD4+, este reconhecimento promove a secreção de citocinas que levam a diferenciação das células T CD4+ em Th1 e posterior ativação das mesmas. As células Th1 produzem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que ativam os macrófagos. Por fim, ocorre a ativação das células Th2 que secretam IL-10 e inibem a produção de NO pelos macrófagos (Figura 4) (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2017).

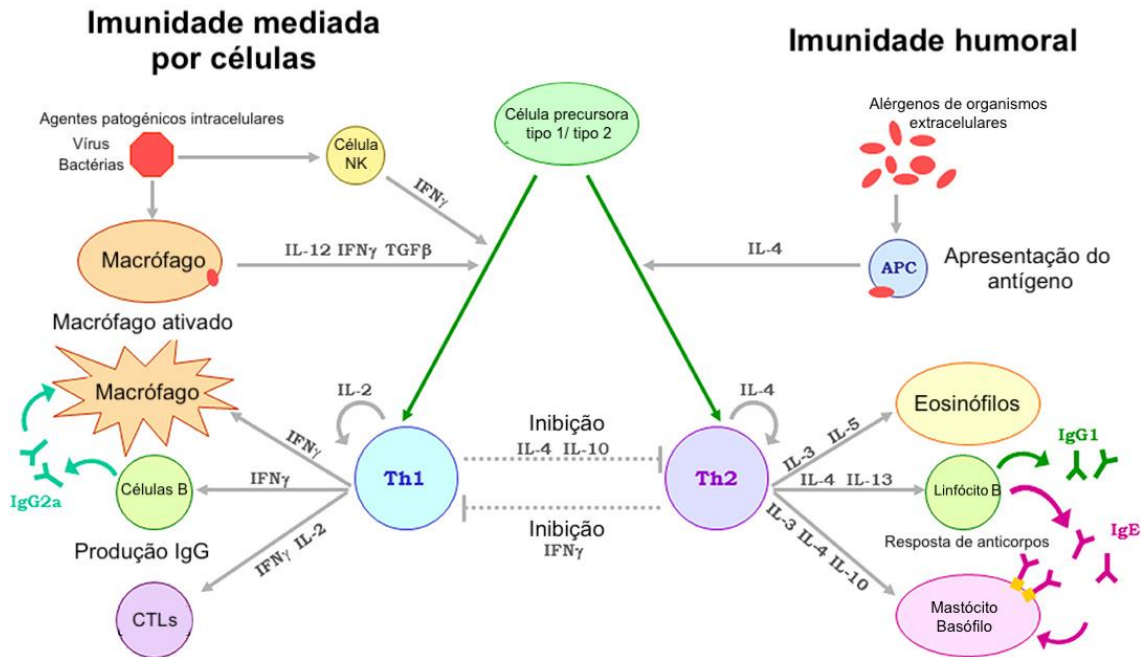


Figura 4 – Células precursoras Th1 e Th2. Células T CD4+ ativadas podem diferenciar-se em célula que favorece a resposta mediada por células (Th1) ou células que promovem uma resposta humoral (Th2). APC - Célula apresentadora de antígeno; Th1 – Linfócitos T de ajuda do tipo 1; Th2 - Linfócitos T de ajuda do tipo 2; IL – Interleucina; IgG – Imunoglobulina; NK - Células Natural Killer; CTLs – Células T citotóxicas. Adaptado de Moreno, 2019.

### 3.2.1.2 Células T CD8 +

Segundo Sanz et al. (2022), estas células também denominados linfócitos T citotóxicos, foram detetados em cães assintomáticos infetados por *Leishmania spp.*. As células T CD8+ são responsáveis pela eliminação de macrófagos infetados por *Leishmania spp.* (Koutinas & Koutinas, 2014; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

### 3.2.2 Imunidade humoral mediada por linfócitos B

A imunidade humoral não origina uma resposta protetora, uma vez que a *Leishmania spp.* se encontra dentro de vacúolos parasitóforos no interior de macrófagos e, por este motivo, a acessibilidade por parte dos anticorpos é bastante limitada (Ikeogu et al., 2020). A função principal das células B é a produção de anticorpos, no entanto estas também desempenham funções reguladoras e agem como APC que ativam células T de ajuda (Sanz et al., 2022; Toepp

& Petersen, 2020). Na fase inicial da doença, são produzidos anticorpos específicos do parasita *Leishmania spp.*, porém no decorrer da infecção subclínica, esta produção continua, mas em níveis mais baixos permitindo a proliferação do protozoário. Quando o animal se encontra numa fase clínica da doença, ocorre um aumento dos níveis de imunoglobulina G (IgG) não específicos (Toepp & Petersen, 2020). Todavia, segundo Foroughi-Parvar & Hatam (2014), a progressão da doença clínica está relacionada com imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina M (IgM). No entanto, segundo Mhadhbi et al. (2021), todos os animais infetados com *Leishmania spp.* produzem níveis altos de imunoglobulina G subclasse 2 (IgG2) específicos, enquanto a presença de altos níveis de imunoglobulina G subclasse 1 (IgG1) está relacionada com a gravidade da doença. Em contrapartida, Reis et al. (2009) demonstrou que cães que não apresentam sinais clínicos e, com níveis parasitários baixos, apresentaram um aumento de IgG1, enquanto animais sintomáticos e, com níveis parasitários altos, apresentam um aumento de imunoglobulinas IgA, IgE, IgG, IgG2 e IgM.

### **3.3 Resposta imunitária associada à vacinação**

A vacinação é um dos métodos utilizados para a prevenção da LCan, no entanto este método apenas foi testado e licenciado no Brasil e na Europa, pelo que ainda é necessário um estudo mais aprofundado para a obtenção de uma vacina eficaz a nível mundial (Velez & Gállego, 2020). As vacinas atualmente aprovadas na Europa são a CaniLeish® e a LetiFend® (Solano-Gallego et al., 2017). Apesar de não existir um método de prevenção totalmente eficaz, recomenda-se a associação de coleiras antiparasitárias ou produtos semelhantes à vacinação dos animais contra a LCan, uma vez que as vacinas atualmente disponíveis apresentam uma baixa eficácia protetora que varia de 68% a 71% (Ribeiro et al., 2018; Velez & Gállego, 2020). A CaniLeish® é uma vacina de segunda geração e foi licenciada na Europa em 2011. Esta é composta por proteínas secretadas - excretadas de *L. infantum* (LiESAp) e uma fração purificada de *Quillaja saponária* (QA-21) (Giunchetti et al., 2019; Moreno, 2019), tendo sido considerada altamente imunogénica em cães (Gradoni, 2015). O protocolo vacinal consiste inicialmente em três doses vacinais, uma primeira dose em animais com idade superior a 6 meses; a segunda dose é realizada três semanas depois da primeira; e a terceira, três semanas depois da segunda. Após estas três doses vacinais, o animal apenas necessita de reforços anuais através de uma dose única (Velez & Gállego, 2020). Após a primeira dose, os níveis de anticorpos começam a subir até atingirem um pico duas semanas após a terceira dose (Solano-Gallego et al., 2017). Esta vacina induz uma resposta mediada por células do tipo Th1 de longa duração (Lemesre et al., 2007) e uma resposta imune humoral IgG2 específica para LiESAp (Bourdoiseau et al., 2009). Antes da administração da vacina CaniLeish®, é recomendado pelo fabricante a realização de um teste serológico rápido, que deteta anticorpos circulantes contra *L. infantum*, uma vez que apenas os cães seronegativos devem ser vacinados. Um dos testes serológicos rápidos usados é o Speed Leish K1® que tem uma sensibilidade baixa, ou seja, animais infetados podem apresentar um resultado negativo e serem vacinados (Solano-Gallego et al., 2017), mas são fáceis de interpretar, usar e não requerem equipamentos sofisticados. A desvantagem destes é

que apenas fornecem um resultado qualitativo e, muitas vezes, é necessário a realização de testes serológicos quantitativos como o teste de imunofluorescência (IFAT) e ELISA para a confirmação, o que aumenta o custo do diagnóstico (Solano-Gallego et al., 2014). A vacina CaniLeish® pode apresentar um efeito profilático e imunoterapêutico (Bourdoiseau et al., 2009). Segundo Lemesre et al. (2007), esta vacina é segura, pois não foram observadas reações adversas em cães após a última dose vacinal, e promove uma forte ativação do sistema imunitário dos cães. Para além disso, verificou-se um efeito imunoterapêutico, ou seja, animais infetados com *L. infantum*, submetidos a esta vacina, apresentaram uma diminuição das manifestações clínicas. Uma das limitações desta vacina é o facto de induzir a produção de anticorpos, que promovem uma reação cruzada com Ag de ELISA, que é um método de diagnóstico serológico para a deteção da infeção por *L. infantum*, não sendo possível a diferenciação de animais vacinados e infetados, isto é, os animais vacinados podem originar falsos positivos ao teste de ELISA. Esta limitação entra em desacordo com o conceito DIVA “Differentiating Infected from Vaccinated Animals” de vacinologia veterinária, onde consta que a produção das vacinas deve permitir a diferenciação sorológica de animais vacinados e infetados (Velez et al., 2020).

A LetiFend® é uma vacina recombinante e foi licenciada na Europa em 2016 (Velez & Gállego, 2020). Esta é constituída por uma proteína quimérica recombinante (proteína Q) que é formada por cinco fragmentos antigénicos de quatro proteínas de *L. infantum* (LIP0, LIP2b e proteínas ribossomais LIP2a e a histona H2A) sem a necessidade de adição de um adjuvante (Moreno, 2019). O protocolo de vacinação inicia-se aos seis meses com uma dose única e com reforços anuais (Velez & Gállego, 2020). No estudo de Cacheiro-Llaguno et al. (2020), verifica-se que esta vacina, para além de induzir um aumento precoce de IgG2 contra a Proteína Q, parece ainda aumentar a quantidade de proteínas do sistema complemento e a quantidade de serpinas, originando níveis baixos de imunocomplexos circulantes que poderão estar relacionados com a diminuição da carga parasitária. No entanto, o mecanismo de ação da vacina LetiFend® ainda não está completamente clarificado.

Ao longo dos últimos anos, têm sido estudadas outras estratégias de tratamento para a LCan, principalmente através do uso de vacinas terapêuticas, que têm vindo a ser consideradas uma estratégia promissora no tratamento desta doença (Roatt et al., 2017). A imunoterapia consiste na utilização de substâncias biológicas que modulam a resposta imune de forma a promover uma resposta terapêutica (Roatt et al., 2014). Segundo um estudo realizado, cães infetados por *L. infantum* que apresentavam sinais clínicos, foram submetidos a imunoterapia através de uma vacina heteróloga composta por Ag de *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*) e adjuvante MPL (vacina LBMPL). Neste estudo observou-se uma redução dos sinais clínicos e da carga parasitária, sendo que os parâmetros bioquímicos (ureia, bilirrubina, ALP e AST) e hematológicos (eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e plaquetas) normalizaram, encontrando-se dentro dos valores de referência. Para além disso, observou-se um aumento das NKs, monócitos, uma diminuição de linfócitos B e um aumento de células T CD3+, sobretudo da subpopulação de células T CD8+. Verificou-se também uma resposta imune linfoproliferativa contra o Ag de

*Leishmania* e observou-se um aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que são citocinas inflamatórias e níveis baixos de citocinas IL-10 e IL-4 (Roatt et al., 2017).

### 3.4 Resposta imunitária associada aos órgãos envoltentes

A LCan é uma doença que apresenta uma diversidade de manifestações clínicas, que estão na maioria das vezes, intimamente relacionadas com uma resposta humoral exuberante (Cacheiro-llaguno et al., 2021) que leva à deposição de imunocomplexos em diferentes tecidos (Cacheiro-Llaguno et al., 2020) e/ou produção de autoanticorpos que pode originar, por exemplo polimiosite (Koutinas & Koutinas, 2014). Quando as células T não exercem uma resposta eficaz na eliminação do parasita, manifestam-se sinais clínicos da doença, elevados níveis de anticorpos específicos para *Leishmania spp.* e também cargas parasitárias elevadas na medula óssea, pele, fígado, baço e linfonodos (Reis et al., 2010).

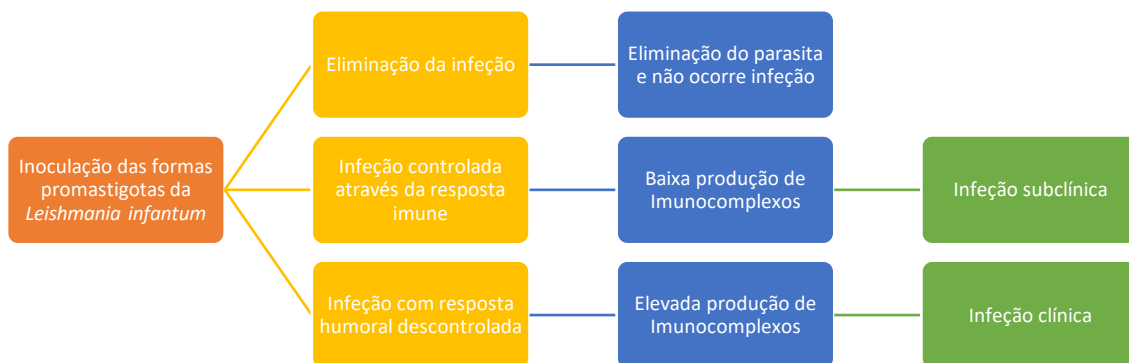


Figura 5 – A evolução da Leishmaniose Canina após inoculação das formas parasitárias (Cacheiro-llaguno et al., 2021)

Tal como referido anteriormente, a resposta imunológica que se desenvolve nos diferentes órgãos ou tecidos dos cães infetados por *L. infantum* pode ser uma resposta Th1, Th2 ou mista, que se relaciona com a existência ou não de sinais clínicos e com a carga parasitária presente nestes órgãos (Hosein et al., 2017).

Nos cães infetados por *L. infantum* nos quais ocorre a síntese de elevados níveis de anticorpos específicos de *Leishmania spp.* e, devido a presença prolongada de Ag parasitários, formam-se imunocomplexos, que se não forem eliminados por fagocitose na corrente sanguínea, podem depositar-se em tecidos ou órgãos específicos levando ao aparecimento de sinais clínicos tais como vasculites, dermatites, uveítes, glomerulonefrites e doença renal (Cacheiro-Llaguno et al.,

2020; Cacheiro-Illaguno et al., 2021; Cortese et al., 2013; Gizzarelli et al., 2020). Estes imunocomplexos são formados por imunoglobulinas, IgM e IgG, Ag do parasita e componentes do sistema complemento (Cacheiro-Illaguno et al., 2020; Cacheiro-Illaguno et al., 2021; Parody et al., 2019). Segundo estes estudos (Cacheiro-Illaguno et al., 2020; Cacheiro-Illaguno et al., 2021; Parody et al., 2019), existe uma correlação entre os níveis de imunocomplexos e o estadiamento da doença em animais infectados com *Leishmania spp.*, ou seja, animais infetados que manifestam uma resposta humoral baixa ou ausente, não apresentam lesões. Assim, a formação de complexos imunes está relacionada com a ineficácia na resolução da infecção (Cacheiro-Illaguno et al., 2020). As manifestações renais resultantes desta doença podem ser a única manifestação clínica (Koutinas & Koutinas, 2014; Ribeiro et al., 2018), originando proteinúria, síndrome nefrótica ou até mesmo doença renal terminal (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014). A insuficiência renal crônica (IRC) é a principal causa de mortalidade associada à LCan e, ultimamente, tem sido incluída como um parâmetro no estadiamento clínico da doença (Cacheiro-Illaguno et al., 2021; Giunchetti et al., 2019).

#### Gânglios linfáticos:

Os gânglios linfáticos são os primeiros tecidos linfóides a serem afetados. As principais alterações imunofenóticas encontradas nos linfonodos são um aumento dos linfócitos T, principalmente T CD8+ e diminuição dos linfócitos B (Moreira et al., 2010). Segundo Costa et al., (2018), os eosinófilos são recrutados para os linfonodos de cães infetados e, quando ocorre este recrutamento, origina diminuição da carga parasitária neste tecido. A IL-5 é uma citocina bastante importante na ativação dos eosinófilos (Costa et al., 2018). Os gânglios linfáticos dos animais assintomáticos apresentam diminuída carga parasitária e expressam citocinas pró-inflamatórias, sendo que as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  podem ter um papel relevante no combate ao agente invasor. Por outro lado, os linfonodos dos animais sintomáticos expressam citocinas anti-inflamatórias, sendo que a IL-10 e TGF- $\beta$  podem estar associadas à progressão da doença (Maia & Campino, 2012).

#### Baço:

O baço é um dos órgãos alvo de *Leishmania spp.*, uma vez que pode apresentar inúmeras células parasitadas do SMF, resultando em hiperplasia e hipertrofia da polpa vermelha do baço, devido essencialmente à presença de infiltrados de plasmócitos. Uma desorganização esplênica da polpa branca também pode ocorrer devido ao comprometimento dos linfócitos nas arteríolas centrais. Esta desorganização na arquitetura esplênica pode contribuir para a imunossupressão e, conseqüentemente, infecções secundárias que pode levar à morte dos animais infetados (Gharbi et al., 2015; Giunchetti et al., 2019). Este órgão também pode apresentar granulomas na cápsula e polpa vermelha que são formados principalmente por macrófagos infetados, escassos linfócitos e plasmócitos. A característica macroscópica mais relevante neste órgão é a esplenomegalia, devido à densidade parasitária e também aos infiltrados inflamatórios crônicos

(Moreira et al., 2016). Neste órgão, os animais assintomáticos apresentam níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17 e iNOS em comparação com animais sintomáticos (Nascimento et al., 2015).

#### Fígado:

O fígado é o principal órgão a produzir citocinas como IL-4, IL-10 e TNF- $\alpha$  durante a infecção (Maia & Campino, 2018) e a cronicidade da doença depende deste órgão (Nascimento et al., 2015). Em cães naturalmente infetados, verificou-se a presença de granulomas intralobulares formados principalmente por macrófagos, infetados ou não, linfócitos e escassos neutrófilos (Moreira et al., 2016). Numa fase final da doença, o fígado apresenta-se aumentado e calcificado (Gharbi et al., 2015). Segundo Nascimento et al. (2015), a carga parasitária hepática é maior nos animais sintomáticos, do que nos animais assintomáticos e nos animais infetados sintomáticos verificou-se uma regulação negativa de IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS em comparação com os animais não infetados. Segundo Moreira et al. (2016), as formas amastigotas apresentam-se em maior quantidade nos granulomas multifocais e em menor quantidade nas células de Kupffer.

#### Medula óssea:

A progressão da doença tem sido relacionada com alterações que ocorrem na medula óssea, na presença do protozoário *Leishmania spp.* Estas alterações incluem: inflamação granulomatosa da medula, hipoplasia eritroide e megacariocítica, um aumento dos linfócitos e plasmócitos (Hosein et al., 2017; Maia & Campino, 2012). Na medula óssea dos cães infetados pode observar-se um aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , que pode estar relacionado com o aumento de macrófagos que, conseqüentemente, produzem estas citocinas (Hosein et al., 2017).

#### **4 Conclusão**

A Leishmaniose Canina é considerada uma doença endêmica em vários países e bastante importante no mundo. Atualmente, existe cada vez mais uma preocupação crescente na descoberta de vacinas com maior eficácia. Esta revisão bibliográfica focou-se na doença, no sistema imunológico, na vacinação e nas alterações possíveis que esta doença pode causar nos órgãos envolventes. A imunologia é bastante importante na compreensão da doença e do impacto que esta pode ter nos diferentes sistemas envolvidos, no entanto ainda são necessários mais estudos para clarificar todos os mecanismos do sistema imunológico no combate a esta doença. O perfil misto de Th1 e Th2 é bastante relevante na compreensão da suscetibilidade ou resistência à infecção, no entanto existem informações contraditórias e, por esse motivo, é necessários realizar mais estudos científicos. As células que participam tanto na imunidade inata como adquirida têm um papel fundamental, porém as funções que algumas destas células desempenham não estão totalmente conhecidas e, por isso, ainda é necessário investigar mais sobre este tema.

Em suma, esta doença afeta milhares de cães em todo o mundo e, por esse motivo, existe uma preocupação tão grande na descoberta de novas formas de tratamento, métodos mais eficazes para diagnosticar a doença e no conhecimento mais aprofundado sobre todos os mecanismos referidos ao longo desta dissertação.



## 5 Referências bibliográficas

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). *Cellular and Molecular Immunology* (8<sup>o</sup> edition).
- Apostolopoulos, N., Mitropoulou, A., Thom, N., & Moritz, A. (2018). Update on therapy and prevention of canine leishmaniasis. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 46(5), 1–7. <https://doi.org/10.15654/TPK-180089>
- Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), 329–337. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3024.2006.00840.X>
- Barbosa, M. A. G., Alexandre-Pires, G., Soares-Clemente, M., Marques, C., Rodrigues, O. R., de Brito, T. V., da Fonseca, I. P., Alves, L. C., & Santos-Gomes, G. M. (2011). Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. *Journal of Comparative Pathology*, 145(4), 336–344. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2011.03.001>
- Baxarias, M., Martínez-Orellana, P., Baneth, G., & Solano-Gallego, L. (2019). Immunotherapy in clinical canine leishmaniasis: a comparative update. *Research in Veterinary Science*, 125, 218–226. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2019.06.009>
- Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Gonçalves, R. B., Vézilier, F., Petit-Didier, E., Papierok, G., & Lemesre, J. L. (2009). Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAP-MDP vaccinated protected dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 71–78. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.10.309>
- Cacheiro-Llaguno, C., Parody, N., Escutia, M. R., & Carnés, J. (2021). Role of Circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New Players in Vaccine Development. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040712>
- Cacheiro-Llaguno, C., Parody, N., Renshaw-Calderón, A., Osuna, C., Alonso, C., & Carnés, J. (2020). Vaccination with LetiFend® reduces circulating immune complexes in dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vaccine*, 38(4), 890–896. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2019.10.078>
- Cardoso, J. M. de O., Ker, H. G., Aguiar-Soares, R. D. de O., Moreira, N. das D., Mathias, F. A. S., Reis, L. E. S., Roatt, B. M., Vieira, P. M. de A., Coura-Vital, W., Carneiro, C. M., & Reis, A. B. (2017). Association between mast cells, tissue remodeling and parasite burden in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 243, 260–266. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.05.028>
- Carvalho, L. M., Gusmão, M. R., Costa, A. F. P., de Brito, R. C. F., Aguiar-Soares, R. D. D. O., Cardoso, J. M. D. O., Reis, A. B., Carneiro, C. M., & Roatt, B. M. (2022). Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: combinatorial action of Miltefosine plus LBSapMPL vaccine improves adaptive Th1 immune response with control of splenic parasitism in experimental hamster model. *Parasitology*, 149(3), 371–379. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001906>
- Cortese, L., Annunziatella, M., Palatucci, A. T., Rubino, V., Piantedosi, D., di Loria, A., Ruggiero, G., Ciaramella, P., & Terrazzano, G. (2013). Regulatory T cells, Cytotoxic T lymphocytes and a T(H)1 cytokine profile in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 942–949. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2013.08.005>
- Costa, S. F., Trivellato, G. F., Rebeck, G. T., Oliveira dos Santos Maciel, M., Melo, L. M., Luvizotto, M. C. R., & de Lima, V. M. F. (2018). Eosinophilic inflammation in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 40(8). <https://doi.org/10.1111/PIM.12567>

- Costa-Da-silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-  
lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-lima, C. G. (2022).  
Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical Medicine and Infectious  
Disease*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/TROPICALMED7040054>
- da Silva, D. T., Alves, M. L., Spada, J. C. P., da Silveira, R. de C. V., Oliveira, T. M. F. de S., &  
Starke-Buzetti, W. A. (2018). Neutrophils, eosinophils, and mast cells in the intestinal wall  
of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Revista Brasileira de Parasitologia  
Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio  
Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 27(4), 430–438. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180085>
- Dantas-Torres, F., Miró, G., Baneth, G., Bourdeau, P., Breitschwerdt, E., Capelli, G., Cardoso,  
L., Day, M. J., Dobler, G., Ferrer, L., Irwin, P., Jongejan, F., Kempf, V. A. J., Kohn, B.,  
Lappin, M., Little, S., Madder, M., Maggi, R., Maia, C., ... Otranto, D. (2019). Canine  
Leishmaniasis Control in the Context of One Health. *Emerging Infectious Diseases*,  
25(12), E1–E4. <https://doi.org/10.3201/EID2512.190164>
- Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. v., & Kalangi, S. K. (2019). Cytokines: Key  
Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis:  
Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*,  
10(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00670>
- Forestier, C. L. (2013). Imaging host-*Leishmania* interactions: significance in visceral  
leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 35(9–10), 256–266.  
<https://doi.org/10.1111/PIM.12044>
- Foroughi-Parvar, F., & Hatam, G. (2014). Vaccines for canine leishmaniasis. *Advances in  
Preventive Medicine*, 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/569193>
- Gharbi, M., Mhadhbi, M., Rejeb, A., Jaouadi, K., Rouatbi, M., & Darghouth, M. A. (2015).  
Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Revue Scientifique et Technique  
(International Office of Epizootics)*, 34(2), 613–626.  
<https://doi.org/10.20506/RST.34.2.2384>
- Giunchetti, R. C., Silveira, P., Resende, L. A., Leite, J. C., Melo-Júnior, O. A. de O., Rodrigues-  
Alves, M. L., Costa, L. M., Lair, D. F., Chaves, V. R., Soares, I. dos S., de Mendonça, L.  
Z., Lanna, M. F., Ribeiro, H. S., Maia-Gonçalves, A. A., Santos, T. A. P., Roatt, B. M.,  
Aguiar-Soares, R. D. O., Vitoriano-Souza, J., das Dores Moreira, N., ... Reis, A. B. (2019).  
Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary  
Parasitology*, 271, 87–97. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2019.05.006>
- Gizzarelli, M., Fiorentino, E., ben Fayala, N. E. H., Montagnaro, S., Torras, R., Gradoni, L.,  
Oliva, G., & Foglia Manzillo, V. (2020). Assessment of Circulating Immune Complexes  
During Natural and Experimental Canine Leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*,  
7. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00273>
- Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., de Goes, T.  
C., de Moraes, R. C. S., Oliveira, C. N. da C., de Lorena, V. M. B., & de Paiva-Cavalcanti,  
M. (2017). The Equivocal Role of Th17 Cells and Neutrophils on Immunopathogenesis of  
Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 8(OCT).  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01437>
- Gradoni, L. (2015). Canine *Leishmania* vaccines: still a long way to go. *Veterinary Parasitology*,  
208(1–2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.01.003>
- Hosein, S., Blake, D. P., & Solano-Gallego, L. (2017). Insights on adaptive and innate immunity  
in canine leishmaniosis. *Parasitology*, 144(1), 95–115.  
<https://doi.org/10.1017/S003118201600055X>

- Ikeogu, N. M., Akaluka, G. N., Edechi, C. A., Salako, E. S., Onyilagha, C., Barazandeh, A. F., & Uzonna, J. E. (2020). Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. *Microorganisms*, 8(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8081201>
- Kaszak, I., Planellas, M., & Dworecka-Kaszak, B. (2015). Canine leishmaniosis - an emerging disease. *Annals of Parasitology*, 61(2), 69–76. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26342500/>
- Koutinas, A. F., & Koutinas, C. K. (2014). Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, 51(2), 527–538. <https://doi.org/10.1177/0300985814521248>
- Kupani, M., Pandey, R. K., & Mehrotra, S. (2021). Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), 2255–2267. <https://doi.org/10.1002/JCP.30029>
- Lemesre, J. L., Holzmüller, P., Gonçalves, R. B., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleyra, M., & Papierok, G. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAP-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, 25(21), 4223–4234. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2007.02.083>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Maia, C., & Campino, L. (2012). Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/541571>
- Maia, C., & Campino, L. (2018). Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00302>
- Mhadhbi, M., Chaabouni, A., Bouabid, C., & Sassi, A. (2021). Relationships between specific antibody responses and clinical signs of dogs living in Tunisian endemic areas of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, 218. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.105906>
- Miró, G., Petersen, C., Cardoso, L., Bourdeau, P., Baneth, G., Solano-Gallego, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., & Oliva, G. (2017). Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis. *Trends in Parasitology*, 33(9), 718–730. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2017.05.005>
- Moreira, P. R. R., Franciscato, D. A., Rossit, S. M., Munari, D. P., & Vasconcelos, R. de O. (2016). Influence of apoptosis on liver and spleen resistance in dogs with visceral leishmaniosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 25(3), 341–347. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016054>
- Moreira, P. R. R., Vieira, L. M., de Andrade, M. M. E. C., de Barros Bandarra, M., MacHado, G. F., Munari, D. P., & de Oliveira Vasconcelos, R. (2010). Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, 107(3), 605–613. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-1902-2>
- Moreno, J. (2019). Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN). <https://doi.org/10.3389/FVETS.2019.00168>
- Nascimento, M. S. L., Albuquerque, T. D. R., Nascimento, A. F. S., Caldas, I. S., Do-Valle-Matta, M. A., Souto, J. T., Talvani, A., Bahia, M. T., Galvão, L. M. C., Câmara, A. C. J., &

- Guedes, P. M. M. (2015). Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon- $\gamma$  and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *Journal of Comparative Pathology*, 153(4), 197–205. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2015.10.174>
- Oikonomidis, I. L., Tsouloufi, T. K., Mylonakis, M. E., Psalla, D., Soubasis, N., Rallis, T., & Kritsepi-Konstantinou, M. (2019). Circulating and bone marrow myeloid cells containing *Leishmania* amastigotes in a case of advanced canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 31(5), 726–731. <https://doi.org/10.1177/1040638719862599>
- Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2013). The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends in Parasitology*, 29(7), 339–345. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2013.05.003>
- Papadogiannakis, E. I., & Koutinas, A. F. (2015). Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163(3–4), 94–102. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2014.11.011>
- Parody, N., Cacheiro-Llaguno, C., Osuna, C., Renshaw-Calderón, A., Alonso, C., & Carnés, J. (2019). Circulating immune complexes levels correlate with the progression of canine leishmaniasis in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 274. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2019.108921>
- Pereira, M. A., Alexandre-Pires, G., Câmara, M., Santos, M., Martins, C., Rodrigues, A., Adriana, J., Passero, L. F. D., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2019a). Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. *Parasite Immunology*, 41(4). <https://doi.org/10.1111/PIM.12617>
- Pereira, M. A., Alexandre-Pires, G., Câmara, M., Santos, M., Martins, C., Rodrigues, A., Adriana, J., Passero, L. F. D., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2019b). Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. *Parasite Immunology*, 41(4). <https://doi.org/10.1111/PIM.12617>
- Pereira, M., Valério-Bolas, A., Santos-Mateus, D., Alexandre-Pires, G., Santos, M., Rodrigues, A., Rocha, H., Santos, A., Martins, C., Tomas, A., Passero, F., da Fonseca, I. P., & Santos-Gomes, G. (2017). Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 248, 10–20. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.10.008>
- Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Martins-Filho, O. A., & Moreno, J. (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 26(7), 341–349. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2010.04.005>
- Reis, A. B., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., Mayrink, W., Tafuri, W. L., & Corrêa-Oliveira, R. (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 87–95. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2008.10.307>
- Ribeiro, R. R., Michalick, M. S. M., da Silva, M. E., dos Santos, C. C. P., Frézard, F. J. G., & da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>
- Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Coura-Vital, W., Ker, H. G., Moreira, N. das D., Vitoriano-Souza, J., Giunchetti, R. C., Carneiro, C. M., & Reis, A. B. (2014). Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. *Frontiers in Immunology*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00272>

- Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. de O., Reis, L. E. S., Cardoso, J. M. de O., Mathias, F. A. S., de Brito, R. C. F., da Silva, S. M., Gontijo, N. D. F., Ferreira, S. de A., Valenzuela, J. G., Corrêa-Oliveira, R., Giunchetti, R. C., & Reis, A. B. (2017). A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00217>
- Rodrigues, A., Santos-Mateus, D., Alexandre-Pires, G., Valério-Bolas, A., Rafael-Fernandes, M., Pereira, M. A., Ligeiro, D., de Jesus, J., Alves-Azevedo, R., Lopes-Ventura, S., Santos, M., Tomás, A. M., Pereira da Fonseca, I., & Santos-Gomes, G. (2017). Leishmania infantum exerts immunomodulation in canine Kupffer cells reverted by meglumine antimoniate. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 55, 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2017.09.004>
- Rodrigues, V., Cordeiro-Da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1412-X>
- Rodríguez-Cortés, A., Carrillo, E., Martorell, S., Todolí, F., Ojeda, A., Martínez-Flórez, A., Urniza, A., Moreno, J., & Alberola, J. (2016). Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. *PloS One*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155224>
- Rombolà, P., Barlozzari, G., Carvelli, A., Scarpulla, M., Iacoponi, F., & Macrì, G. (2021). Seroprevalence and risk factors associated with exposure to Leishmania infantum in dogs, in an endemic Mediterranean region. *PloS One*, 16(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0244923>
- Sandoval Pacheco, C. M., Araujo Flores, G. v., Gonzalez, K., de Castro Gomes, C. M., Passero, L. F. D., Tomokane, T. Y., Sosa-Ochoa, W., Zúniga, C., Calzada, J., Saldaña, A., Corbett, C. E. P., Silveira, F. T., & Laurenti, M. D. (2021). Macrophage Polarization in the Skin Lesion Caused by Neotropical Species of Leishmania sp. *Journal of Immunology Research*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5596876>
- Sanz, C. R., Miró, G., Sevane, N., Reyes-Palomares, A., & Dunner, S. (2022). Modulation of Host Immune Response during Leishmania infantum Natural Infection: A Whole-Transcriptome Analysis of the Popliteal Lymph Nodes in Dogs. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.794627>
- Serafim, T. D., Iniguez, E., & Oliveira, F. (2020). Leishmania infantum. *Trends in Parasitology*, 36(1), 80–81. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2019.10.006>
- Shapira, M., & Zinoviev, A. (2011). Leishmania parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. *Cell Host & Microbe*, 9(4), 257–259. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2011.04.004>
- Solano-Gallego, L., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Petersen, C., Bourdeau, P., Oliva, G., Miró, G., Ferrer, L., & Baneth, G. (2017). Diagnostic Challenges in the Era of Canine Leishmania infantum Vaccines. *Trends in Parasitology*, 33(9), 706–717. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2017.06.004>
- Solano-Gallego, L., Mirá, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>
- Solano-Gallego, L., Montserrat-Sangrà, S., Ordeix, L., & Martínez-Orellana, P. (2016). Leishmania infantum-specific production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1598-Y>

- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and Leishmania 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>
- Teufel, L. U., Joosten, L. A. B., & dos Santos, J. C. (2021). Immunotherapeutic Potential of Interleukin-32 and Trained Immunity for Leishmaniasis Treatment. *Trends in Parasitology*, *37*(2), 130–141. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2020.09.014>
- Tibúrcio, R., Nunes, S., Nunes, I., Ampuero, M. R., Silva, I. B., Lima, R., Tavares, N. M., & Brodskyn, C. (2019). Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. *Frontiers in Immunology*, *10*(FEB). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00227>
- Tizard, I. (2014). *Veterinary Immunology* (9<sup>o</sup> edition).
- Toepp, A. J., & Petersen, C. A. (2020). The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Research in Veterinary Science*, *130*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.02.004>
- Vaselek, S. (2021). Canine leishmaniasis in Balkan - A review of occurrence and epidemiology. *Acta Tropica*, *224*. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2021.106110>
- Velez, R., Domenech, E., Cairó, J., & Gállego, M. (2020). The impact of canine leishmaniosis vaccination with Canileish® in Leishmania infantum infection seroprevalence studies. *Acta Tropica*, *202*. <https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2019.105259>
- Velez, R., & Gállego, M. (2020). Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, *25*(5), 540–557. <https://doi.org/10.1111/TMI.13382>
- Veras, P. S. T., & de Menezes, J. P. B. (2016). Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS17081270>
- Wardini, A. B., Pinto-da-Silva, L. H., Nadaes, N. R., Nascimento, M. T., Roatt, B. M., Reis, A. B., Viana, K. F., Giunchetti, R. C., & Saraiva, E. M. (2019). Neutrophil properties in healthy and Leishmania infantum-naturally infected dogs. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-42687-9>