

ESTUDIO PRELIMINAR DE CITOCINAS EN SUERO DE PERROS CON LEISHMANIASIS VISCERAL EN UNA ZONA ENDÉMICA VENEZOLANA

Preliminary Study of Cytokines in Sera from Dogs with Visceral Leishmaniasis from a Venezuelan Endemic Area

Orquídea L. Rodríguez*, Maira Cabrera**, Vestalia Rodríguez***, Marian Ulrich*** †, José D. Quijada**** y Martín A. Sánchez*¹

*Laboratorio de Biología Celular, **Laboratorio de Inmunoparasitología, ***Laboratorio de Inmunología II. Instituto de Biomedicina. Universidad Central de Venezuela. Ministerio del Poder Popular para la Salud. ****Laboratorio de Leishmaniasis. Dirección Regional de Salud, estado Nueva Esparta

Correo-E: martinsanchez1@gmail.com

Recibido: 12/03/09 - Aprobado: 30/04/10

RESUMEN

Diversos estudios en modelos de ratones han demostrado que la inmunidad protectora frente a *Leishmania* es mediada por linfocitos T, células presentadoras de antígeno y citocinas. Sin embargo, pocos estudios se han realizado para evaluar citocinas en perros infectados en forma natural con *Leishmania infantum/chagasi*. El perro doméstico es el principal reservorio del parásito, en tal sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar las citocinas en suero de 33 perros con Leishmaniasis Visceral Canina (LVC), provenientes del estado Nueva Esparta, Venezuela (foco endémico). Los perros fueron clasificados en sintomáticos o asintomáticos, de acuerdo al análisis de los signos clínicos de la enfermedad, coincidentes con los títulos de anticuerpos contra las kinesinas recombinantes de *Leishmania* rK39 y rK26. Otros dos grupos incluyeron: 10 perros de la misma zona endémica como grupo control endémico (CE) y 10 perros de la zona no endémica como control sano (CS). Las concentraciones (pg/mL) de las citocinas solubles IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 se determinaron por citometría de flujo (Kit CBA Hu Th1/Th2, BD™). Los resultados mostraron concentraciones estadísticamente mayores ($p < 0,05$)

ABSTRACT

Different experimental murine models have shown that protective immunity against *Leishmania* depends upon T cells, cytokines, and antigen presenting cells. However, the role of cytokines in naturally-infected hosts like domestic dogs is controversial. Few studies have evaluated cytokines in dogs naturally-infected with *Leishmania infantum/chagasi*. Since the domestic dog is the main reservoir of the parasite, a study was conducted to determine cytokines in serum of 33 dogs with Canine Visceral Leishmaniasis from endemic areas of the State of Nueva Esparta, Venezuela. Dogs were classified as symptomatic (SD) and asymptomatic (AD), according to the expression of three or more clinical signs and levels of antibodies for rK39 and rK26. Ten non-infected, rK39 negative controls were included from an endemic area (EA) and ten dogs from a non-endemic area were used as healthy controls (HC). The following cytokines (pg/mL) were measured in serum by flow cytometry (CBA Hu Th1/Th2, BD™ kit): IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and IL-2. Results show a higher concentration ($P < 0.05$) of IFN- γ (69.93 ± 7.46), IL-4 (7.51 ± 2.68), TNF- α (3.86 ± 1.46), and IL-2 (39.85 ± 3.84) in AD

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

de IFN- γ ($69,93 \pm 7,46$), IL-4 ($7,51 \pm 2,68$), TNF- α ($3,86 \pm 1,46$) e IL-2 ($39,85 \pm 3,84$) en el grupo de perros asintomáticos, con respecto a los perros sintomáticos ($60,8 \pm 10,6$; $5,28 \pm 0,80$; $2,76 \pm 0,72$ y $36,04 \pm 3,61$, respectivamente) y los perros sanos (51 ± 14 ; $4,65 \pm 0,2$; $3,21 \pm 0,89$ y $32,65 \pm 5,86$, respectivamente). Los perros asintomáticos también presentaron mayor concentración de IL-6 ($4,9 \pm 0,55$) que los CS ($4,02 \pm 0,64$) ($p < 0,01$). Estos resultados demuestran que los perros en estado asintomático exhiben mayor proporción de citocinas de activación celular y proinflamatorias. Los resultados señalan a la medición de citocinas séricas como reflejo del estado inmunológico de los caninos en futuros estudios orientados a vacunación o terapia.

(Palabras clave: Perro, citocinas, suero sanguíneo, Leishmaniasis visceral, Células Th1, Células Th2)

when compared with SD (60.8 ± 10.6 ; 5.28 ± 0.80 ; 2.76 ± 0.72 ; and 36.04 ± 3.61 , respectively); and HC (51 ± 14 ; 4.65 ± 0.2 ; 3.21 ± 0.89 , and 32.65 ± 5.86 , respectively). The AD also showed higher levels ($P < 0.01$) of IL-6 (4.9 ± 0.55) compared with HC (4.02 ± 0.64). Results show that AD exhibit a higher proportion of cellular activation and proinflammatory cytokines. Results indicate that measuring of serum cytokines could reflect the immunological status in dogs in future clinical trials oriented to either vaccination or therapy.

(Key words: Dog, cytokines, blood serum, Leishmaniasis visceral, Th1 cells, /Th2 cells)

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) ha sido considerada por la Organización Mundial de la Salud como la tercera enfermedad más importante por su mortalidad y morbilidad en la población mundial (Desjeux, 2004). En Venezuela esta enfermedad representa un grave problema de salud pública debido a su amplia distribución en todo el país y elevada incidencia en niños; la mayor parte de la población en situación de riesgo abarca niños con edades comprendidas entre 2 y 10 años, en los cuales se registra una alta tasa de mortalidad infantil (Zerpa et al., 2000).

Los perros son los principales reservorios de las especies de *Leishmania* causantes de la LV en el Antiguo y Nuevo Mundo (Moreno y Alvar, 2002). Por otra parte, se ha demostrado que los perros infectados, incluyendo los asintomáticos, son fuentes del parásito para el vector invertebrado *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, lo cual desempeña un papel activo en la transmisión de la enfermedad en humanos (Molina et al., 1994; Courtenay et al., 2002). Estudios realizados previamente en la Isla de Margarita, estado Nueva Esparta, han revelado una alta seroprevalencia de LV en perros, con porcentajes que oscilan entre 21,45 y 28,50% (Feliciangeli et al., 2003). Esto pudiera significar un alto riesgo de transmisión por la presencia del vector y el estrecho contacto niño-perro.

Aunque es bien conocido que la inmunidad protectora contra la *Leishmania* depende de los linfocitos T, citocinas y células presentadoras de antígeno (Tapia et al., 1996; Moll y Flohe, 1997; Díaz et al., 2002; Louis et al., 2002), poco se conoce de la participación de las citocinas en hospedadores con infección natural por *L. infantum/chagasi*, como los perros. En el presente estudio, evaluamos diferentes citocinas en perros domésticos infectados de forma natural con *L. infantum/chagasi* de las zonas endémicas para la Leishmaniasis Visceral Canina (LVC) en el estado Nueva Esparta, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

La muestra experimental consistió en perros domésticos con infección natural por *L. infantum/chagasi* ($n=33$) provenientes de zonas endémicas de la Isla de Margarita (estado Nueva Esparta, Venezuela), los cuales fueron diagnosticados por métodos serológicos, en el marco de los programas de control establecidos por la Coordinación de Zoonosis de la Dirección Regional de Salud del estado Nueva Esparta. Los perros fueron clasificados como sintomáticos ($n=24$) o asintomáticos ($n=9$) de acuerdo a la expresión de tres o más signos clínicos (pérdida de peso, opacidad corneal, onicogriposis,

alopecia, úlceras cutáneas, hepatoesplenomegalia y ganglios linfáticos palpables) y los niveles de anticuerpos dirigidos a *Leishmania infantum/chagasi* (rK39 y rK26). El estudio incluyó perros no infectados, rK39/rK26 negativos provenientes de las mismas áreas endémicas utilizados como controles endémicos (CE, n=10) y de áreas no endémicas como controles sanos (CS, n=10).

Como requisito fundamental para la inclusión de perros en el estudio, se obtuvo el consentimiento informado de los dueños. A cada perro se le tomó una muestra de sangre por punción de la vena radial, la cual se centrifugó para la obtención del suero que se almacenó en alícuotas a -20 °C, luego de lo cual se realizaron las pruebas serológicas específicas y la determinación de citocinas solubles.

Ensayo inmunoenzimático

La detección de anticuerpos específicos de tipo IgG contra las kinesinas K39 y K26 de *Leishmania donovani*, se realizó mediante ELISA siguiendo el protocolo descrito en estudios previos (Zerpa *et al.*, 2000). Se emplearon placas de poliestireno (NUNC™, Rochester, NY, EUA) acopladas con 80 ng/pozo de los péptidos recombinantes K39 (rK39) y K26 (rK26) de *Leishmania donovani* para la captura de los anticuerpos presentes en el suero. El punto de corte para establecer la positividad de la prueba fue calculado como la media \pm 3 DE de las muestras pertenecientes al control negativo. Se consideró positivo todo suero cuyo valor de densidad óptica fuera mayor a 0,0690.

Citometría de flujo

La determinación de las concentraciones (pg/mL) de las citocinas solubles IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 en una muestra de suero de los perros evaluados se realizó con el estuche comercial Th1/Th2 *Cytokine Hu Kit II BD™* (CBA; BD Biosciences, San José, CA, EUA), siguiendo las instrucciones del laboratorio de origen. El ensayo consistió en hacer reaccionar 16 μ L de suero por 3 h con una mezcla de seis tipos de perlas de tamaño uniforme con diferentes intensidades de fluorescencia emitidas por un colorante rojo, que tienen unidos covalentemente anticuerpos (Acs) de captura específicos contra cada una de las seis citocinas a determinar. Las citocinas presentes en el suero de los perros unidas a sus Acs específicos fueron detectadas mediante el uso de un Ac conjugado

a ficoeritrina (PE). La intensidad de fluorescencia de la PE fue proporcional a la concentración de citocinas en la muestra y se cuantificó a partir de una curva de calibración. La fluorescencia producida se midió en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y se analizó con el software BDTM *Cytometric Bead Array* (CBA).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las citocinas fueron expresados como la media \pm DE y las diferencias de las variables entre los diferentes grupos experimentales fueron analizadas con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La prueba exacta de Fisher fue empleada para calcular las diferencias entre los grupos cuando los datos fueron representados en porcentajes. El análisis de correlación entre las citocinas se realizó por el coeficiente de correlación de Spearman. Todas las pruebas fueron realizadas con el paquete estadístico *GraphPad InStat 3.02* (Software GraphPad, San Diego, CA, EUA). Valores de $P < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las citocinas juegan un papel primordial en el inicio y evolución de las enfermedades producidas por parásitos como *Leishmania* spp. A pesar de que en modelos murinos de infección por *L. major* y *L. mexicana* existe una clara asociación entre el patrón de citocinas secretadas por linfocitos T CD4⁺ y la susceptibilidad (Th2) o resistencia (Th1) a la enfermedad (Liew *et al.*, 1982; Heinzl *et al.*, 1989; Díaz *et al.*, 2003). Los modelos experimentales de LV no muestran diferencias tan claras, sino que por el contrario revelan un patrón mixto Th1/Th2 (Sánchez *et al.*, 2009b). En el canino, como principal reservorio del parásito, todavía no se conoce totalmente cómo el curso natural de la infección por *Leishmania* afecta la secreción de citocinas.

Hasta la fecha, la caracterización de citocinas en la LVC se ha realizado en tejidos como médula ósea (Quinnell *et al.*, 2001), bazo e hígado (Sánchez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007) y en células mononucleadas de sangre periférica (Chamizo *et al.*, 2005; Sánchez-Robert *et al.*, 2008).

Los perros controles del área endémica presentaron concentraciones de citocinas más elevadas que

los controles de la zona no endémica. Resulta importante señalar que se ha demostrado una elevada seroprevalencia de otras infecciones crónicas como ehrlichiosis y toxocariasis en estos caninos (Sánchez *et al.*, 2009a), lo cual sugiere que la presencia de otras infecciones (bacterianas y parasitarias) pudiera estar influyendo en la liberación de citocinas al torrente circulatorio. No obstante, este estudio demostró que existen diferencias en las concentraciones de citocinas séricas cuando se comparan estos grupos controles con los perros afectados por LV.

Con respecto a las citocinas proinflamatorias, los perros sintomáticos presentaron menores niveles ($p < 0,05$) de TNF- α ($2,76 \pm 0,72$) que los perros asintomáticos ($3,86 \pm 1,46$) y los CE ($3,634 \pm 0,47$), en tanto que los perros asintomáticos tuvieron más IL-6 ($4,9 \pm 0,55$) que el grupo de CS ($4,02 \pm 0,64$) ($p < 0,02$). Estos resultados concuerdan con estudios realizados por otros investigadores, quienes demuestran la presencia de transcriptos de TNF- α e IL-6 en células de perros asintomáticos y perros no infectados estimuladas o no con antígenos de *Leishmania* (Chamizo *et al.*, 2005) y concentraciones de TNF- α superiores en perros asintomáticos que en aquellos sintomáticos (Pinelli *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2006; Carrillo *et al.*, 2007). A pesar de la asociación que se ha observado entre las concentraciones de IL-6, la leishmaniasis activa y la severidad de la enfermedad (de Lima *et al.*, 2007), en el presente estudio las concentraciones de IL-6 no variaron en presencia o ausencia de síntomas en los perros infectados.

La expresión de IFN- γ (citocina Th1), tanto en modelos murinos como en caninos con LV, se asocia con el control de la infección (Heinzel *et al.*, 1989; Squires *et al.*, 1989), mientras que el papel de la IL-4 (citocina Th2) en LVC activa, no ha sido definido y su relación con la susceptibilidad a la enfermedad en ratones ha sido cuestionada (Sacks y Noben-Trauth, 2002; Barbieri, 2006). Los resultados presentados revelan diferencias marcadas en las citocinas Th1 y Th2 al comparar perros asintomáticos y sintomáticos, con una expresión significativamente superior ($p \leq 0,02$) en perros asintomáticos (IFN- γ : $69,93 \pm 7,46$ vs $60,8 \pm 10,6$ e IL-4: $7,51 \pm 2,68$ vs $5,28 \pm 0,80$, respectivamente; Figura 1C-1D).

Según Strauss-Ayali *et al.* (2007), la expresión temprana de IL-4 en células esplénicas está relacionada con la persistencia del parásito, aún en presencia de una

elevada expresión de IFN- γ . En un estudio reciente, en el cual se evaluó el perfil de citocinas en LVC, usando la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para cuantificar la expresión del ARNm maduro de cada citocina en células mononucleadas de sangre periférica, se concluyó que la expresión tardía de IFN- γ está asociada con el incremento de la carga parasitaria y el estado clínico; mientras que la ausencia de IL-4 e IL-13, en la primera etapa de la infección en perros con baja carga parasitaria, puede jugar un rol protector contra la replicación del parásito (Sánchez-Robert *et al.*, 2008). En este sentido, pareciera que en los perros asintomáticos, caracterizados por una baja carga parasitaria en órganos blanco (Sánchez *et al.*, 2004), el equilibrio de estas citocinas y el momento de su expresión permiten responder frente al parásito y guiar la infección hacia un estado de latencia y cronicidad.

En otro contexto, el análisis de la relación Th1/Th2 (determinada por el índice resultante al dividir las concentraciones de IFN- γ e IL-4), reveló que el 79% de los perros sintomáticos tiene un índice superior al de los controles sanos (CS), mientras que solo 28% de los asintomáticos supera este índice ($p < 0,0001$). En concordancia con el trabajo de Sánchez-Robert *et al.* (2008), las concentraciones de IFN- γ detectadas en los caninos sintomáticos estuvieron relacionadas con la inmunopatología asociada más que con la acción protectora de esta citocina.

Con respecto a la IL-4, el 73% de los perros infectados mostró valores elevados ($p = 0,0032$). Sin embargo, resulta importante señalar que el 90% de los perros del grupo control endémico (CE) de la Isla de Margarita mostró valores de IL-4 superiores al promedio de los CS, lo cual refleja la presencia de procesos infecciosos que inducen un tipo de respuesta Th2 en los caninos de zonas endémicas para LVC. Pudiera plantearse que los perros con LV más severa, hayan adquirido la infección en momentos en los cuales prevalecía la producción de IL-4 en respuesta a otros parásitos, perdiendo así el control de la replicación de los parásitos de *Leishmania*. En este sentido, la búsqueda de factores de riesgo y de otras infecciones concomitantes asociadas a la LVC sigue siendo un punto de interés para futuras investigaciones.

Los perros CE también mostraron mayores concentraciones de la citocina reguladora IL-10 ($3,77 \pm 0,4$), en comparación con los CS ($2,87 \pm 0,82$; $p = 0,014$), asintomáticos ($3,14 \pm 0,67$; $p = 0,004$)

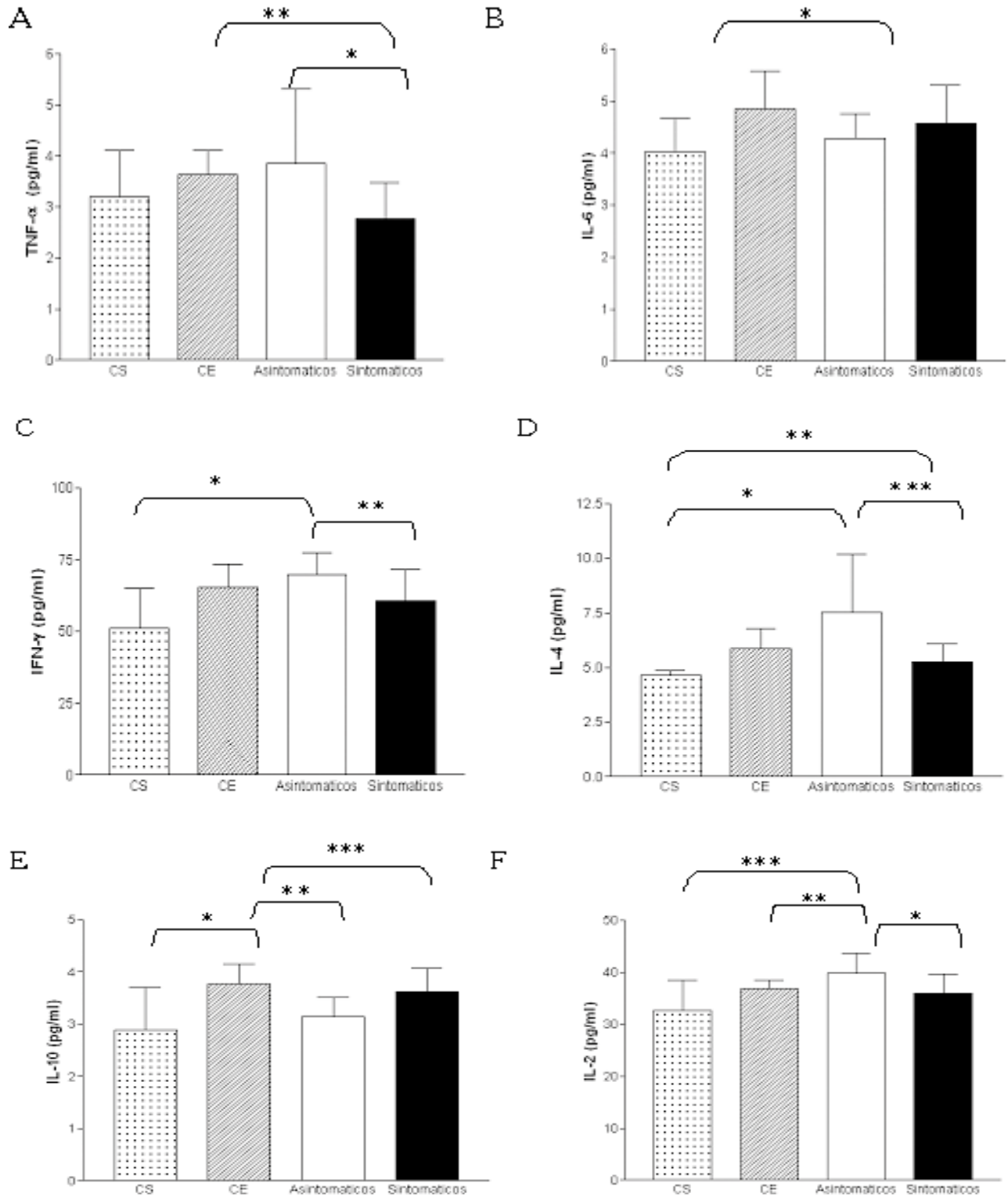


Figura 1. Concentración de citocinas en el suero de perros de zonas endémicas para LVC, estado Nueva Esparta-Venezuela. A y B: citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6. C: citocina Th1 IFN- γ . D: citocina Th2 IL-4. E: citocina reguladora IL-10. F: citocina mediadora de la proliferación linfocitaria IL-2. Determinadas por citometría de flujo usando el inmunoensayo de colección de cuentas (CBA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas de los valores de citocinas entre los grupos de perros de $p < 0,05$. Significancia estadística: A: * $p=0,038$ ** $p=0,0018$; B: * $p=0,02$; C: * $p=0,009$ ** $p=0,02$; D: * $p=0,0012$ ** $p=0,002$ *** $p=0,0036$; E: * $p=0,014$ ** $p=0,0053$ *** $p=0,0011$; F: * $p=0,02$ ** $p=0,04$ *** $p=0,02$. CS: controles sanos; CE: controles endémicos

y sintomáticos ($3,16 \pm 0,47$; $p=0,0011$) (Figura 1E). Como ocurrió con la IL-6, no se observaron diferencias de las concentraciones de IL-10 entre los perros asintomáticos y sintomáticos, lo cual sugiere que estas citocinas no tienen efecto inhibitorio sobre la expresión de IFN- γ e IL-2, ni se relacionan con la inmunosupresión y severidad en la LVC, como ha sido postulado en otros estudios (Mosmann y Moore, 1991). Además, la correlación entre las concentraciones de IFN- γ e IL-10 fue positiva ($r=0,654$; $p=0,0004$) en los perros sintomáticos, como sucede también en la LV humana, en la cual se ha conseguido la coexistencia de estas citocinas (Sundar et al., 1997; Peruhype-Magalhaes et al., 2006; Rodríguez et al., 2007).

En conclusión, estos resultados demuestran que los perros asintomáticos expresan una mayor proporción de citocinas asociadas con la activación celular (IL-2) e inducción de respuesta inflamatoria (TNF- α e IFN- γ), corroborando los resultados previos en órganos blanco, en la cual se asocia una inmunidad efectora a este grupo de caninos con respecto a los sintomáticos (Sánchez et al., 2004).

Estas claras diferencias de las citocinas solubles entre los perros sintomáticos y asintomáticos, además de indicar diferentes mecanismos asociados con la inmunopatología e inmunoregulación en la leishmaniasis visceral, pudieran ser útiles como factor predictivo del estado inmunológico de los perros, en estudios futuros orientados al desarrollo de nuevos esquemas terapéuticos y de vacunación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a la memoria de Marian I. Ulrich, resultado de sus últimos días en el laboratorio. El estudio fue sustentado con fondos del Ministerio de Ciencia y Tecnología e Industrias Intermedias de Venezuela, proyecto grupal de investigación FONACIT G2005000375 (M.A. Sánchez). Agradecemos a la Dirección Regional de Salud del estado Nueva Esparta, en especial a la Coordinación de Zoonosis por la atención prestada para la obtención de las muestras de suero y a la Lic. Melcenia Moreno, por su participación en la logística para el transporte de las muestras de suero desde la Isla de Margarita hasta Caracas para su procesamiento. Asimismo, agradecemos al Dr. Félix J. Tapia, por la crítica revisión de este manuscrito.

REFERENCIAS

- Barbieri, C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, 28:329-337.
- Carrillo, E.; Ahmed, S.; Goldsmith-Pestana, K.; Nieto, J.; Osorio, Y.; Travi, B.; Moreno, J.; McMahon-Pratt, D. 2007. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 25:1534-1543.
- Correa, A.P.; Dossi, A.C.; de Oliveira Vasconcelos, R.; Munari, D.P.; de Lima, V.M. 2007. Evaluation of transformation growth factor beta 1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Parasitol.*, 143:267-274.
- Courtenay, O.; Quinnell, R.J.; Garcez, L.M.; Shaw, J.J.; Dye, C. 2002. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J. Infect. Dis.*, 186:1314-1320.
- Chamizo, C.; Moreno, J.; Alvar, J. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 103: 67-75.
- de Lima, V.M.; Peiro, J.R.; de Oliveira Vasconcelos, R. 2007. IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 115:189-193.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27:305-318.
- Díaz, N.L.; Zerpa, O.; Ponce, L.V.; Convit, J.; Rondon, A.J.; Tapia, F.J. 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp. Dermatol.*, 11:34-41.
- Díaz, N.L.; Fernández, M.; Figueira, E.; Ramírez, R.; Monsalve, I.B.; Tapia, F.J. 2003. Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 28:288-293.
- Feliciangeli, M.D.; Mazzarri, M.B.; Blas, S.S.; Zerpa, O. 2003. Control trial of *Lutzomyia longipalpis* s.l. in the Island of Margarita, Venezuela. *Trop. Med. Int. Health.*, 8:1131-1136.
- Heinzel, F.P.; Sadick, M.D.; Holaday, B.J.; Coffman, R.L.; Locksley, R.M. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 169:59-72.
- Lage, R.S.; Oliveira, G.C.; Busek, S.U.; Guerra, L.L.; Giunchetti, R.C.; Correa-Oliveira, R.; Reis, A.B. 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells

- from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 115:135-145.
- Liew, F.Y.; Hale, C.; Howard, J.G. 1982. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J Immunol.*, 128:1917-1922.
- Louis, J.; Gummy, A.; Voigt, H.; Rocken, M.; Launois, P. 2002. Experimental cutaneous leishmaniasis: a powerful model to study in vivo the mechanisms underlying genetic differences in Th subset differentiation. *Eur. J. Dermatol.*, 12:316-318.
- Molina, R.; Amela, C.; Nieto, J.; San-Andres, M.; Gonzalez, F.; Castillo, J.A.; Lucientes, J.; Alvar, J. 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88:491-493.
- Moll, H.; Flohe, S. 1997. Dendritic cells induce immunity to cutaneous leishmaniasis in mice. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 417:541-545.
- Moreno, J.; Alvar, J. 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, 18:399-405.
- Mosmann, T.R. ; Moore, K.W. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol. Today*, 12:A49-53.
- Peruhype-Magalhaes, V.; Martins-Filho, O.A.; Prata, A.; Silva, L. de A.; Rabello, A.; Teixeira-Carvalho, A.; Figueiredo, R.M.; Guimaraes-Carvalho, S.F.; Ferrari, T.C.; Van Weyenbergh, J.; Correa-Oliveira, R. 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 146:124-132.
- Pinelli, E.; Killick-Kendrick, R.; Wagenaar, J.; Bernadina, W.; del Real, G.; Ruitenbergh, J. 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, 62:229-235.
- Quinnell, R.J.; Courtenay, O.; Shaw, M.A.; Day, M.J.; Garcez, L.M.; Dye, C.; Kaye, P.M. 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 183:1421-1424.
- Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Carvalho, M.G.; Mayrink, W.; Franca-Silva, J.C.; Giunchetti, R.C.; Genaro, O.; Correa-Oliveira, R. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, 81:68-75.
- Rodríguez O.L.; Rodríguez, V.; Cabrera M.; Sánchez M.A.; Ulrich M. 2007. Perfil de citocinas Th1/Th2 en leishmaniasis visceral humana. *Acta Científica Venezolana*, 58:460 (Abstr).
- Sacks, D.; Noben-Trauth, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.*, 2:845-858.
- Sánchez-Robert, E.; Altet, L.; Alberola, J.; Rodríguez-Cortes, A.; Ojeda, A.; López-Fuertes, L.; Timón, M.; Sánchez, A.; Francino, O. 2008. Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 125:168-175.
- Sánchez, M.A.; Diaz, N.L.; Zerpa, O.; Negron, E.; Convit, J.; Tapia, F.J. 2004. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: Analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70: 618-624.
- Sánchez, M.A.; Delgado, O.; Coraspe, V.; Rodríguez-Morales, A.J.; Moreno, M.; Toro, J.V.; Alfonso, E. 2009a. Cross reactivity analysis to antigens of different zoonotic organisms in dogs with visceral leishmaniasis from La Guardia, Nueva Esparta State, Venezuela. En: 4th World Congress on leishmaniasis. Lucknow, India. 278 p. (Abstr.).
- Sánchez, M.A.; Rodríguez, O.L.; Moreno, M.; Tovar, B.; Dorta, A.; Díaz, N.L.; Tapia, F.J. 2009b. Cytokines and cross regulatory transcription factors in a murine model of visceral leishmaniasis with a native strain of *L. infantum*. En: 4th World Congress on leishmaniasis. Lucknow, India. 113 p. (Abstr.).
- Squires, K.E.; Schreiber, R.D.; McElrath, M.J.; Rubin, B.Y.; Anderson, S.L.; Murray, H.W. 1989. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN- γ in host defense and tissue granulomatous response. *J. Immunol.*, 143:4244-4249.
- Strauss-Ayali, D.; Baneth, G.; Jaffe, C.L. 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, 38:547-564.
- Sundar, S.; Reed, S.G.; Sharma, S.; Mehrotra, A.; Murray, H.W. 1997. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 56:522-525.
- Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G.; Sánchez, M.A. 1996. Epidermal immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. En: *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis* (Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G.; Sánchez, M.A., eds.). R.G. Landes Co., Austin, pp. 140-150.

Zerpa, O.; Ulrich, M.; Negrón, E.; Rodríguez, N.; Centeno, M.; Rodríguez, V.; Barrios, R.M.; Belizario, D.; Reed, S.; Convit, J. 2000. Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94:484-487.