

**PATRÓN DE CITOCINAS EN HÍGADO Y BAZO DE PERROS  
CON LEISHMANIASIS VISCERAL NATURAL**

***Cytokines Pattern in Liver and Spleen of Dogs with Natural Visceral Leishmaniasis***

Erika Aguilar\*, Nilka L. Díaz\*, Martín A. Sánchez\* y Félix J. Tapia\*<sup>1</sup>

\*Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010, Venezuela

**Correo-E: felix.tapia@gmail.com**

Recibido: 16/06/09 - Aprobado: 11/12/09

RESUMEN

En el presente estudio se caracterizó el patrón de citocinas del bazo e hígado de perros infectados en forma natural por *Leishmania infantum (chagasi)* provenientes del estado Nueva Esparta, Venezuela. Los perros fueron clasificados como sintomáticos y asintomáticos considerando tres signos principales de esta patología como hepatoesplenomegalia, caquexia y onicogriphosis. Muestras de hígado y bazo fueron tomadas para evaluar carga parasitaria y la expresión de citocinas y quimiocinas por inmunohistoquímica. En los perros sintomáticos se observó una mayor carga parasitaria tanto en el hígado como en bazo. En el bazo se observó una densidad de células positivas para interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interlucinas (IL-12, IL-10, IL-4, IL-8) y Proteína 1 quimioatrayente de monocito (MCP-1), similar en perros asintomáticos y sintomáticos. Mientras que en el hígado la evaluación de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 IL-8 y MCP-1, mostró una tendencia al aumento en el grupo de perros sintomáticos, con incremento significativo de las células IL-4+ en los perros sintomáticos, con respecto a los asintomáticos. La densidad de células IL-4+ en el hígado se correlacionó positivamente con la hepatomegalia. Al cuantificar las concentraciones séricas de la quimiocina Proteína 1 alfa inflamatoria de macrófago (MIP-1 $\alpha$ ) se observó una alta producción en los perros asintomáticos. Estos resultados confirman la

ABSTRACT

In the present study, we characterized the cytokine pattern in the spleen and liver of naturally infected dogs with *Leishmania infantum (chagasi)* from the Nueva Esparta state of Venezuela. The dogs were classified as symptomatic and asymptomatic considering three main signs of this disease: hepatosplenomegalia, cachexia and onichogriphosis. Tissue samples from liver and spleen were taken to evaluate parasite load, cytokines and chemokines expression by immunohistochemistry. In symptomatic dogs, a higher parasitic load was observed in the liver and spleen as compared to asymptomatic dogs. In the spleen, the density of gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), interleukins (IL-12, IL-10, IL-4, IL-8) and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), it was similar between asymptomatic and symptomatic dogs. Whereas, in the liver IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 IL-8 and MCP-1 showed a tendency to increase in symptomatic dogs, with a significant increment of IL-4+ cells. In the liver, the density of IL-4+ cells was positively correlated with hepatomegaly. In addition, higher concentrations of Macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 $\alpha$ ) were observed in the serum of asymptomatic than in symptomatic dogs. These results corroborate the existence of an organ-specific immune response against *L. infantum (chagasi)*, with a T helper 2 (Th2) immune response in the liver of symptomatic

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

existencia de una respuesta órgano-específica frente a *L. infantum* (*chagasi*), del tipo T cooperador 2 (Th2) en el hígado de los perros sintomáticos, caracterizada por un marcado predominio de IL-4 sobre IFN- $\gamma$  e IL-12. La elevada producción de IL-4 fue directamente relacionada con la hepatomegalia.

**(Palabras clave:** Leishmaniasis, hígado, bazo, citocinas, inmunología)

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis representa una infección parasitaria causada por diferentes parásitos del género *Leishmania*, que afectan al hombre y a otros mamíferos, presentándose bajo distintas formas clínicas (cutánea, mucocutánea y visceral). La Leishmaniasis visceral (LV) o Kala azar, es producida por *Leishmania donovani* en el viejo mundo y por *Leishmania infantum* (*chagasi*) en el nuevo mundo y puede ser fatal, si no es diagnosticada y tratada a tiempo (Travi, 2000). El perro es tanto una víctima, como un importante reservorio de esta parasitosis y por esta razón el manejo de la leishmaniasis visceral canina tiene las connotaciones clínicas y las epidemiológicas.

Es bien conocido que la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador forma parte importante de la patogénesis de la leishmaniasis. Al contrario de lo observado en el modelo murino, en el modelo canino no se presenta una clara dicotomía en la respuesta inmunitaria de los T cooperadores de los tipos 1 y 2 (Th1/Th2), asociada a la inmunidad protectora o progresión de la enfermedad, respectivamente (Gallego, 2004).

En el modelo canino se ha demostrado que se producen cambios en subpoblaciones de linfocitos T con una disminución de los linfocitos T CD4+ y un incremento en la respuesta proliferativa específica frente a *Leishmania*, así como elevadas tasas de anticuerpos (Bourdoiseau et al., 1997, Moreno et al., 1999). En células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de perros infectados experimentalmente, se demostró una asociación entre una respuesta Th1 y la resistencia a la LV canina (Pinelli et al., 1994). Sin embargo, en perros con leishmaniasis natural, la presencia de citocinas Th1 en médula ósea, no está asociada con la respuesta proliferativa durante la enfermedad, de la misma forma que si

dogs, with prevalence of IL-4 over IFN- $\gamma$  and IL-12. The high production of IL-4 is directly related with hepatomegalia.

**(Key words:** Leishmaniasis, liver, spleen, cytokines, immunology)

están las citocinas Th2 (Quinnell et al., 2001). Recientemente, se demostró la capacidad que tienen las células mononucleares de perros infectados de producir interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) en presencia de interleucina 12 (IL-12) *in vitro* (Strauss-Ayali et al., 2005).

En presencia de un agente patógeno, las quimiocinas pueden activar linfocitos T y macrófagos, y reclutar las células efectoras apropiadas al sitio de inflamación (Campbell et al., 2003). El papel de algunas quimiocinas en leishmaniasis visceral ha sido recientemente investigado en modelos muridos, en donde se ha demostrado la capacidad de la Proteína 1 quimioatrayente de monocito (MCP-1) y la Proteína 1 alfa inflamatoria de macrófago (MIP-1 $\alpha$ ), de inducir respuestas Th1 (Dey et al., 2007). Sin embargo, existe poca información de la participación de quimiocinas en la leishmaniasis visceral canina. En este sentido, Strauss-Ayali et al. (2007) demostraron un aumento significativo del Interferon-gamma inducible protein 10 (IP10) y la Quimiocina regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales (RANTES, por sus siglas en inglés), no así de MCP-1 y MIP1 en bazo de perros infectados experimentalmente con *L. donovani*.

El análisis de perros sintomáticos y asintomáticos con leishmaniasis natural causada *L. infantum* (*chagasi*), realizado por nuestro grupo en Venezuela, demostró que existe una respuesta inmunitaria órgano-específica. Este estudio demostró una importante respuesta granulomatosa en el hígado de perros asintomáticos, en comparación con los sintomáticos, con una respuesta inflamatoria similar en el bazo de ambos grupos de animales (Sánchez et al., 2004). A pesar de estos resultados, aun se desconocen muchos aspectos de la respuesta inmunitaria durante la LV canina, como el patrón de citocinas en los órganos afectados.

En el presente estudio, se realizó la caracterización *in situ* de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10, IL-4) y quimiocinas (IL-8, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ ) en hígado y bazo de perros infectados en forma natural con *Leishmania infantum* (*chagasi*) provenientes del estado Nueva Esparta, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

En el presente estudio se tomaron muestras de bazo e hígado de perros domésticos (n=19) con leishmaniasis visceral natural causada por *Leishmania infantum* (*chagasi*) (Zerpa *et al.*, 2001) procedentes de áreas endémicas de la Isla de Margarita, estado Nueva Esparta, Venezuela. El diagnóstico serológico de leishmaniasis visceral se realizó mediante un ELISA para la detección del antígeno recombinante rK39. Los perros seropositivos fueron clasificados como asintomáticos (n=9) y sintomáticos (n=10) considerando tres signos principales de esta enfermedad como hepatoesplenomegalia, caquexia y onicogrifosis. La hepatomegalia fue medida por índice de órgano (peso del hígado/peso del animal x100). Debido a que el Programa de Prevención y Control de Leishmaniasis Visceral de Venezuela indica la eliminación de los animales infectados, previo consentimiento de los dueños, los perros infectados se sedaron utilizando Xilacina® vía intramuscular a una dosis de 2 mg/kg para su traslado desde su residencia a un consultorio veterinario, donde se practicó la eutanasia utilizando una sobredosis de Pentobarbital vía endovenosa (250 mg/kg). Luego, se tomaron muestras de 5 x 5 mm de bazo e hígado luego del estudio macroscópico de estos órganos. Estas muestras fueron criopreservadas y almacenadas en nitrógeno líquido para el posterior estudio inmunohistológico.

El mantenimiento y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a las normativas establecidas por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, y por la Junta de Revisión de Proyectos del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACIT), Ministerio de de Ciencia y Tecnología.

### Anticuerpos

Para la identificación de citocinas en los tejidos se utilizaron anticuerpos monoclonales anti IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10, IL-4, IL-8 y MCP-1 a una concentración de 20

$\mu\text{g/mL}$ , todos provenientes de R&D Systems, EEUU. Como anticuerpos secundarios se utilizaron: IgG de caballo anti ratón biotinado, IgG de conejo anti rata biotinado y IgG de caballo anti cabra biotinado a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ , provenientes de Vector Lab. Inc., EEUU.

### Determinación de la carga parasitaria

En cortes congelados de 5 $\mu\text{m}$  de espesor en un criostato (Shandon, EEUU) a -30°C de bazo e hígado se realizó tinción con Giemsa 1:10, se cubrieron con el medio de montaje DPX (Distyre-tricresyl phosphate-xylene), para la identificación de los parásitos. La carga parasitaria fue expresada en términos de números de amastigotes por 1000 células (LDU: Leishman Donovan Units).

### Análisis Inmunohistoquímico

A partir de las muestras de hígado y bazo preservadas en nitrógeno líquido, se obtuvieron cortes congelados de 5 $\mu\text{m}$  de espesor en un criostato (Shandon, EEUU) a -30°C, los cuales se dejaron secar toda una noche y se fijaron con acetona durante 10 min antes de la inmunotinción. La inmunotinción comenzó con una hidratación de los cortes en PBS y el bloqueo con suero normal de caballo (NHS) 5% en PBS. Luego de quitar el exceso, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario durante 90 min. Luego de la incubación durante 30 min con el anticuerpo secundario biotinado policlonal de caballo, conejo u otro animal (50 $\mu\text{g/mL}$ ) (Vector Lab. Inc., EEUU), el cual reconoce los anticuerpos primarios. Seguido de la incubación con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector Lab. Inc., EEUU), fueron lavados durante 5 minutos con PBS, los cuales se realizaron entre cada una de las incubaciones. Los cortes se incubaron durante 3 min con el sustrato para peroxidasa NovaRED (Vector Lab. Inc., EEUU). Finalmente, los cortes se lavaron con agua corriente y se contrastaron con hematoxilina (Shandon, EEUU). Los controles de la técnica consistieron en la omisión del anticuerpo primario. El estudio inmunohistológico de hígado y bazo no incluyó controles con perros sanos por razones éticas que impiden el sacrificio de animales domésticos.

### Cuantificación de células

Una vez realizada la inmunohistoquímica se procedió al conteo de las células positivas utilizando un microscopio

óptico (Leica DMLS, Alemania) equipado con una cámara de video conectada a un monitor calibrado para determinar células/mm<sup>2</sup>. Se consideró como positiva toda aquella célula que mostró un núcleo visible y cuya superficie celular adquirió una coloración rojo pardo. Se realizó el conteo en 20 campos, en cada corte, para cada una de las moléculas a identificar.

### ELISA

Para la detección de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  en el suero de animales seropositivos para rK39 se utilizó un kit de ELISA tipo sándwich (DuoSet R&D System, EEUU). Se obtuvieron 40 sueros de perros, de los cuales 30 fueron seropositivos, a su vez éstos se clasificaron en sintomáticos y asintomáticos de acuerdo con el registro clínico. Los 10 sueros restantes corresponden a los controles seronegativos del área endémica. El ensayo comenzó con la incubación con el anticuerpo de captura anti-MIP-1 $\alpha$ , a una concentración de 0,4 $\mu$ g/mL, durante toda la noche a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo fue removido y se bloqueó la placa con BSA 1% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se procedió a agregar las muestras problema y el estándar (MIP-1 $\alpha$  recombinante en concentraciones crecientes), incubándolos durante 2 h a temperatura ambiente. Luego se incubó con el anticuerpo de detección (anti-MIP-1 $\alpha$  biotinado, 200ng/mL) por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se sumó el sistema amplificador de la reacción (conjugado de Estreptavidina-Peroxidasa de rábano) por 20 min a temperatura ambiente y seguidamente se incubó con el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tetrametilbenzidina). Entre cada incubación se realizaron tres lavados con buffer PBS 0,05% Tween-20. Finalmente se detuvo la reacción con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2N y se determinó la densidad óptica en un lector para ELISA (BIORAD, EEUU) a 450nm. Se realizó una curva estándar partiendo de una concentración máxima de 500pg/mL y realizando diluciones seriadas 1:2.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

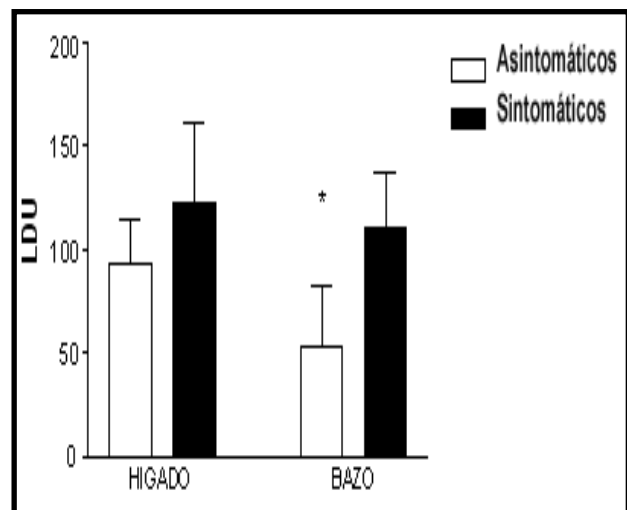
Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  error estándar de la media en las siguientes unidades: LDU, células/mm<sup>2</sup>, pg/mL correspondientes a las variables carga parasitaria, densidad de células y concentración sérica, respectivamente. Se realizaron comparaciones entre las medias de los grupos de

perros sintomáticos y asintomáticos, mediante el test no paramétrico *Mann Whitney*. También, se realizó correlación entre variables mediante el método no paramétrico *Spearman*. Una  $p=0,05$  fue considerada como significativa para todos los casos. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa GraphPad INSTAT- 3 versión de software 3.02 (GraphPad Software, San Diego, EEUU).

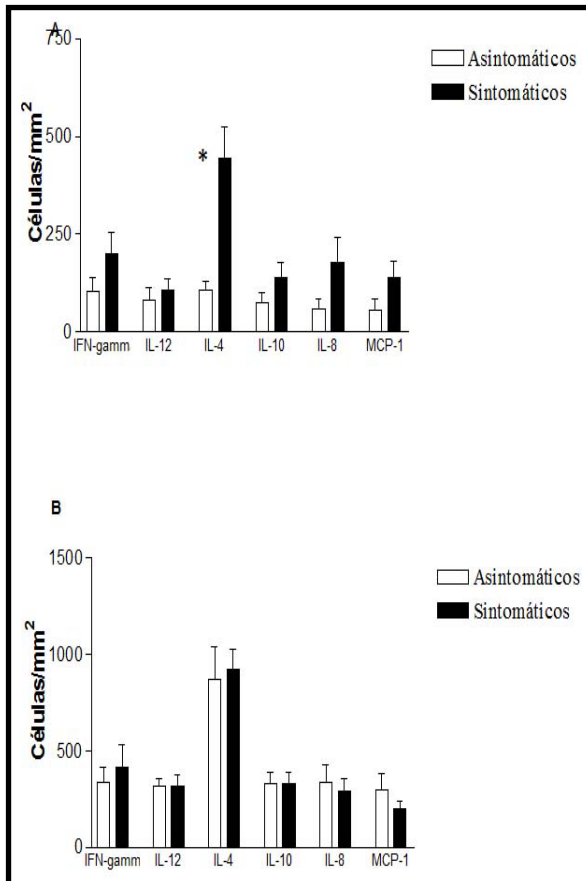
### RESULTADOS

Los resultados de la carga parasitaria en el hígado, mostraron que en este órgano existe una mayor carga parasitaria en los perros sintomáticos ( $83,28 \pm 20,54$  LDU) en comparación con los perros asintomáticos ( $49,50 \pm 21,54$  LDU) con diferencia significativa ( $p=0,04$ ) entre los grupos estudiados (Figura 1). Resultados similares se observaron en la carga parasitaria del bazo en cuyo órgano se observó mayor densidad de parásitos en los perros sintomáticos ( $110,00 \pm 27,61$  LDU) en comparación con los perros asintomáticos ( $51,85 \pm 29,95$  LDU) con diferencia significativa ( $p=0,0367$ ) entre los grupos estudiados (Figura 1).

Al evaluar las citocinas en el hígado y bazo de ambos grupos de perros infectados, se observó una respuesta diferente en cada órgano (Figura 2). En el hígado se observó una tendencia de mayor producción de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10, IL-8 y MCP-1 en el grupo de perros sintomáticos al compararlo con los



**Figura 1.** Carga parasitaria expresada como LDU (Leishman Donovan Units), números de amastigotes por 1000 células, en hígado y bazo de perros infectados con *L. infantum* (chagasi). \*  $p < 0,05$



**Figura 2.** Expresión de citocinas en hígado (A) y bazo (B) de perros infectados con *L. infantum* (*chagasi*). \* $p < 0,05$  entre asintomático y sintomáticos

perros asintomáticos. La expresión de IL-4 mostró un importante incremento en los perros sintomáticos (446 células/mm<sup>2</sup>) con respecto al grupo de perros asintomáticos (108 células/mm<sup>2</sup>) ( $p = 0,0007$ ), con evidente predominio sobre IFN- $\gamma$  e IL-12. Al correlacionar la densidad de células IL-4+ con los valores del índice del órgano (IO), por el cual se determinó la hepatomegalia, se obtuvo una correlación positiva y significativa ( $r = 0,679$ ,  $p = 0,0014$ ).

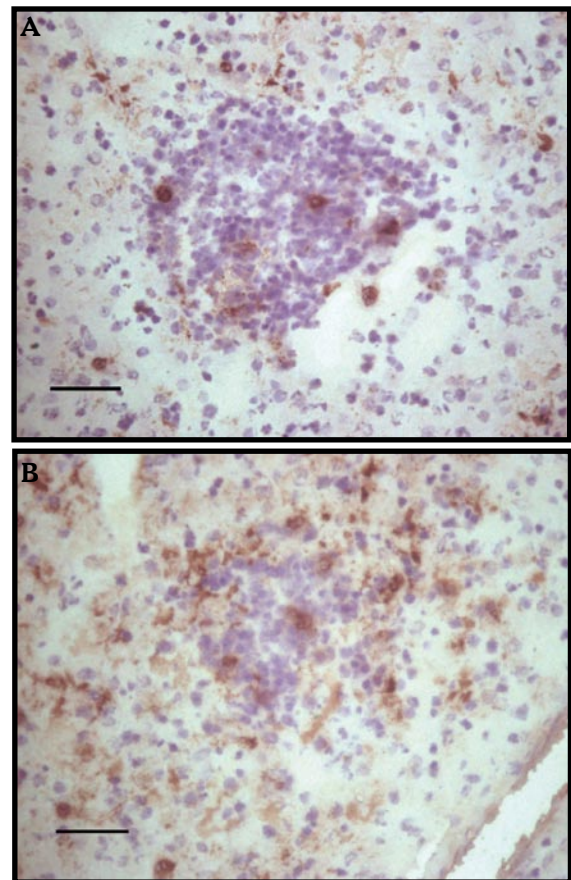
Por otro lado, al analizar la expresión de estas citocinas en el bazo, no se observaron diferencias significativas entre los perros sintomáticos y asintomáticos, aunque llamó la atención la elevada producción de IL-4 en ambos grupos de animales infectados (Figura 3).

Al determinar las concentraciones MIP-1 $\alpha$  en el suero de animales infectados se observó una alta producción de esta quimiocina en los perros asintomáticos ( $35 \pm 6$  pg/mL) en comparación con los sintomáticos ( $20 \pm 3$  pg/mL) y controles no infectados ( $21 \pm 2$  pg/mL), considerándose estadísticamente significativa ( $p = 0,0090$  y  $p = 0,0071$  respectivamente).

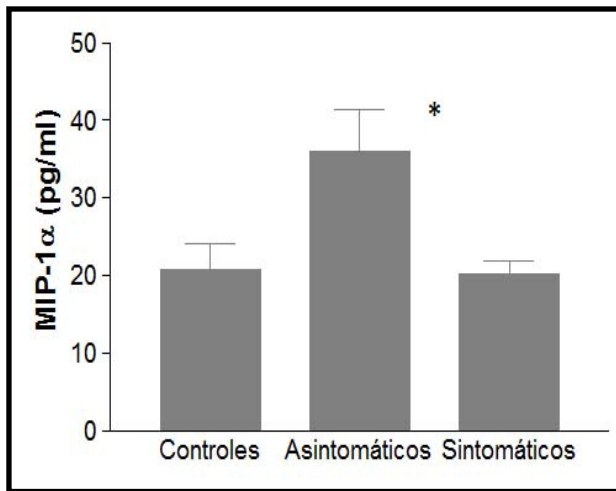
Sin embargo, al comparar los controles con los perros sintomáticos no se observó diferencia significativa (Figura 4). Adicionalmente, se realizó el análisis de correlación entre las concentraciones séricas de MIP-1 $\alpha$  con la hepatomegalia, la carga parasitaria en hígado y la expresión de IL-4 en hígado, sin observar correlación significativa entre esta quimiocina y los diferentes parámetros considerados para evaluar la respuesta inmunitaria en los órganos blancos.

## DISCUSIÓN

La replicación de *Leishmania* en el interior de los macrófagos es resultado de la evasión de este parásito a los diferentes mecanismos de defensa del sistema inmunitario de los hospedadores mamíferos (Alvar, 1997). La alta carga parasitaria en los órganos afectados del grupo de perros sintomáticos sugieren un mayor control de la replicación de los parásitos en el grupo de asintomáticos, además la



**Figura 3.** Inmunoreactividad de linfocitos productores de Interleucina-4 en hígado de perros infectados con *L. infantum* (*chagasi*). A. Asintomático, B. Sintomático. Avdina-biotina inmunoperoxidasa. Regla escala 20  $\mu$ m



**Figura 4.** Concentraciones séricas de MIP-1 $\alpha$  de perros infectados con *L. infantum (chagasi)*. \* $p < 0,05$

elevada producción de IL-4 induce la activación de linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2) e inhibe la producción de IFN- $\gamma$ , lo que lleva a la inactivación de los macrófagos y multiplicación del parásito (Powrie y Coffman, 1993; Barbieri, 2006), resultando en la progresión de la enfermedad y la presencia de los signos y síntomas asociados a esta parasitosis. Por esto, se considera que la alta carga parasitaria en los perros sintomáticos es debida al tipo de respuesta (Th2) que se establece en este grupo de animales.

En la leishmaniasis visceral canina la ausencia de síntomas se encuentra estrechamente asociada con una alta respuesta Th1 (Pinelli et al., 1994) en el cual el microambiente que predomina es la alta producción de IL-12, capaz de inducir la producción de IFN- $\gamma$ , la diferenciación de linfocitos Th1 y aumento de la actividad de linfocitos T citotóxicas CD8+ (De la Roa, 2001; Barbieri, 2006). En el presente estudio observamos la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en el hígado de perros asintomáticos, pero en concentraciones similares de IL-4 e IL-10, mostrando una respuesta mixta. Mientras que los perros sintomáticos mostraron una respuesta Th2 en el hígado con predominio de IL-4. Además, una mayor producción de las quimiocinas IL-8 y MCP-1 en el hígado de perros sintomáticos, indicando un estado inflamatorio que favorece el reclutamiento de macrófagos, que en un ambiente Th2 favorecen la infección.

En los perros infectados con *Leishmania infantum (chagasi)* existe una respuesta inmunitaria órgano-específica caracterizada por una respuesta celular

organizada en hígado, con presencia de granulomas con abundantes linfocitos y macrófagos parasitados (Sánchez et al., 2004). En el presente estudio, al evaluar un conjunto de citocinas y quimiocinas en el bazo no se observaron diferencias entre los grupos de animales, mientras que el hígado mostró un predominio de IL-4 en perros sintomáticos y una respuesta mixta Th1/Th2 en perros asintomáticos, sugiriendo que el hígado puede ser más importante en la respuesta inmunitaria frente a *L. infantum (chagasi)*, los cuales se ha demostrado una respuesta inmunitaria celular eficiente en perros asintomáticos e incapaz de controlar el crecimiento del parásito en perros sintomáticos (Sánchez et al., 2004).

La moderada carga parasitaria en perros asintomáticos, acompañada de una respuesta inmunitaria celular mixta en hígado y la elevada producción de IL-4 en el bazo, sugieren que los perros asintomáticos podrían evolucionar hacia la condición de sintomático.

Una respuesta inmunitaria sistémica durante leishmaniasis visceral canina se pudo reflejar en las concentraciones séricas de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  que se observaron elevadas en los perros asintomáticos con respecto a los perros sintomáticos y a los controles sanos no infectados. MIP-1 $\alpha$  es una quimiocina inflamatoria que interviene en el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas y linfocitos T (Texeira et al., 2006). El MIP-1 $\alpha$  es capaz de inducir la producción de óxido nítrico y actividad leishmanicida en macrófagos infectados con *L. infantum (chagasi)* (Brandonisio et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado la capacidad de MIP-1 $\alpha$  de inducir diferenciación de Th1 y suprimir Th2 en ratones BALB/c infectados con *L. donovani*, como consecuencia de la alta producción de IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y óxido nítrico sintasa (iNOS), y la inhibición de IL-10 en hígado y bazo (Dey et al., 2007). En el presente estudio, los resultados sugieren que MIP-1 $\alpha$  juega un papel importante en el control de la infección con *L. infantum (chagasi)* en perros asintomáticos. Por su parte, las bajas concentraciones de MIP-1 $\alpha$  permitirían el desarrollo de una respuesta Th2 que favorece el crecimiento del parásito.

La compleja respuesta inmunitaria desarrollada por los perros infectados por *L. infantum (chagasi)* puede significar la diferencia entre el desarrollo ó no de signos clínicos. Estos resultados muestran una relación directa entre la hepatomegalia con

los valores de IL-4 en el hígado, indicando que la respuesta Th2 favorece la persistencia del parásito y la enfermedad.

#### AGRADECIMIENTOS

A las biólogas Yisis López y Melcenia Moreno, la Coordinación de Zoonosis del Estado Nueva Esparta y la Sección de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, por su apoyo en la recolección y tratamiento de las muestras. Parte del estudio fue financiado por FONACIT Proyecto G-2005000375 y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela.

#### REFERENCIAS

- Alvar, J. 1997. Las Leishmaniasis: de la biología al control. Junta de Castilla y León, Heraldo de Zamora Artes graficas, Madrid, España.
- Barbiéri, C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite. Immunol.*, 28:329-337.
- Bourdoiseau, G.; Bonnefont, C.; Magnol, J.P.; Saint-André, I.; Chabanne, L. 1997. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 56:345-351.
- Brandonisio, O.; Panaro, M.A.; Fumarola, I.; Sisto, M.; Leogrande, D.; Acquafredda, A.; Spinelli, R.; Mitolo, V. 2002. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin. Exp. Med.*, 2:125-129.
- Campbell, D.J.; Kim, C.H.; Butcher, E.C. 2003. Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol. Rev.*, 195:58-71.
- De la Roa, R. 2001. Interleucina-12 vs enfermedades infecciosas. *Rev. Cub. Med.*, 40:118-121.
- Dey, R.; Majumder, N.; Bhattacharyya Majumdar, S.; Bhattacharjee, S.; Banerjee, S.; Roy, S.; Majumdar, S. 2007. Induction of host protective Th1 immune response by chemokines in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.*, 66:671-83.
- Gallego, M. 2004. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniasis. *Rev. Sci.Tech.Off Int. Epiz.*, 23:661-676.
- Moreno, J.; Nieto, J.; Chamizo, C.; Gonzalez, F.; Blanco, F.; Barker, D.C.; Alva, J. 1999. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 71:181-195.
- 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.
- Powrie, F., Coffman, R.L. 1993. Inhibition of cell-mediated immunity by IL-4 and IL-10. *Res. Immunol.*, 144:639-43.
- 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.
- Sánchez, M.A.; Díaz, 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.
- Strauss-Ayali, D.; Baneth, G.; Shor, S.; Okano, F.; Jaffe, C.L. 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int. J. Parasitol.*, 35:63-73.
- Strauss-Ayali, D.; Baneth, G.; Jaffe, C.L. 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, 38:547-564.
- Teixeira, M.J.; Teixeira, C.R.; Andrade, B.B.; Barral-Netto, M.; Barral, A. 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, 22:32-40.
- Travi, B.L. 2000. Leishmaniasis visceral canina. *Rev. MV Cordoba*, 5:29-32.
- Zerpa O.; Pratlong F.; Ulrich, M.; Convit, J.; 2001. Isolation of *Leishmania infantum*, zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96:901-902.