

REVISIÓN

Inmunología de la Leishmaniasis Visceral Canina

Martín A. Sanchez^{1*} & Felix J. Tapia²

La leishmaniasis visceral es una enfermedad infecciosa, causada en Latinoamérica por el parásito *Leishmania infantum/chagasi*, la cual afecta principalmente a niños menores de cuatro (4) años y en los que se registra una alta tasa de mortalidad infantil en zonas endémicas, constituyendo así un grave problema de salud pública. El perro domestico es el principal reservorio de esta enfermedad. La presente revisión abarca los aspectos inmunológicos evaluados en la última década en sangre periférica y órganos blanco del parásito, que caracterizan y definen a los caninos infectados como sintomáticos y asintomáticos. Estos constituyen elementos de importancia en el pronóstico de la enfermedad visceral, en el desarrollo de nuevas terapias, candidatos a vacunas y medidas de control de la leishmaniasis visceral canina.

Palabras claves: leishmaniasis visceral, *Leishmania*, caninos, inmunología.

INTRODUCCION

La leishmaniasis visceral representa un problema de salud pública en Venezuela y el mundo. Afecta principalmente a una población altamente vulnerable como son los niños menores de 10 años que viven en precarias condiciones socio-económicas, donde el 70% son menores de 4 años y en los que se registra una alta tasa de mortalidad infantil (Archivos Dpto. de Informática, Instituto de Biomedicina, Ministerio de Salud).

En zonas endémicas de leishmaniasis visceral la población canina constituye el principal reservorio de parásitos. En Venezuela, particularmente en el estado Nueva Esparta el diagnóstico serológico mediante ELISA utilizando el antígeno rK39 de *Leishmania chagasi* y promastigotes de *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80/DD8), demostró una alta susceptibilidad frente a *L. chagasi* en la población

canina, con un incremento en la transmisión en un periodo de 10 meses de estudio, determinado por el aumento de positividad del ELISA a ambos antígenos de un 24% al inicio del estudio hasta un 40% al final del periodo (Zerpa *et al.*, 2000).

Si bien es cierto que la infección natural en los perros reproduce en cierto modo características clínicas aparentes observadas en humanos, pudiendo clasificar estos en asintomáticos, oligosintomáticos y sintomáticos o enfermos (Fig. 1), poco se conoce acerca de la respuesta inmune en estos animales y los factores que determinan el grado de susceptibilidad.

La respuesta inmune en perros infectados con *L. infantum/chagasi* resulta en un amplio rango de respuestas tanto humoral como celular, el cual varía dependiendo de la condición clínica de del animal. Ciertos estudios apoyan una asociación entre los signos de la enfermedad visceral en perros, la progresión de la enfermedad y el establecimiento de la inmunidad mediada por células (IMC) (Abranches *et al.*, 1991; Moreno *et al.*, 1999; Pinelli *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2000). Los mecanismos involucrados en la generación de protección o susceptibilidad en perros son aun desconocidos. Si luego de la infección se establece una efectiva

¹Laboratorio de Biología Celular, Instituto de Biomedicina, UCV/MS, Apdo4043, Caracas 1010A, Venezuela

²Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina, UCV/MS, Apdo4043, Caracas 1010A, Venezuela

* Autor de correspondencia: martinsanchez1@gmail.com



Fig. 1. Leishmaniasis visceral canina: Principales criterios de clasificación para definir a los perros seropositivos como sintomáticos o asintomáticos, según la presencia y severidad de los signos descritos.

inmunidad mediada por células, ésta es capaz de controlar la infección y el animal permanece asintomático. Por el contrario, la ausencia de esta respuesta conlleva a la progresión de la enfermedad, causando signos y síntomas evidentes en los perros (Pinelli *et al.*, 1994; Moreno & Alvar, 2002). En estos casos los parásitos se diseminan en la médula ósea, hígado y bazo causando una enfermedad crónica, en la cual una respuesta inmune descontrolada del hospedador contribuye con la patología en estos órganos, haciéndola potencialmente fatal.

La ausencia de inmunidad celular específica contra el parásito ha sido demostrada en perros sintomáticos naturalmente infectados o infectados experimentalmente, con una reducida respuesta linfoproliferativa al estimular linfocitos T frente a antígenos de *Leishmania in vitro* (Moreno *et al.*, 1999). Esto correlaciona además con una depresión de la proporción de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de perros sintomáticos, en comparación con perros no infectados. (Moreno *et al.*, 1999; Pinelli *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Estudios *in vitro* e *in vivo* en células mononucleares de sangre periférica en infecciones experimentales, sugieren la asociación de una respuesta de linfocitos T tipo Th1 con resistencia a desarrollar leishmaniasis visceral canina (LVC) (Pinelli *et al.*, 1994).

Basándose en resultados donde células mononucleares de sangre periférica provenientes de animales sintomáticos responden a mitógenos y antígenos del parásito con una elevada producción de las INF- γ IL-2 y TNF- α (Pinelli *et al.*, 1994), mientras que los perros sintomáticos muestran una respuesta elevada del tipo Th2, con producción de IL-4, IL-6 e IL-10, y una elevada producción de anticuerpos (Pinelli *et al.*, 1994; Moreno & Alvar 2002). Adicionalmente en otros estudios, se determinó que los anticuerpos del isotipo IgG, IgG1 e IgG2 anti-*Leishmania* fueron considerablemente más altos en perros sintomáticos que en perros asintomáticos (Solano-Gallego *et al.*, 2000; Strauss-Ayali & Baneth 2001) y que el isotipo IgG2a asociado a una respuesta Th1 es comúnmente detectado en perros asintomáticos (Nieto *et al.*, 1999)

En contraste a estos hallazgos, un estudio similar realizado en Brazil analizando aspirados de médula ósea proveniente de perros naturalmente infectados, no demuestra una asociación clara entre las expresión de citocinas tipo Th2, la respuesta humoral y linfoproliferativa con la progresión de la enfermedad visceral, incluso a pesar de encontrar una correlación positiva entre los signos clínicos y la expresión de IL-4 así como con los niveles de IgG anti *Leishmania*, no se encontró relación con la respuesta celular u otras citocinas. Además, los niveles de IL-10 en perros con enfermedad severa resultaron similares

a los controles no infectados, por lo que se descarta un papel inmunosupresor de la IL-10 en perros naturalmente infectados (Quinnell *et al.*, 2001).

La interacción entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos) es fundamental para el establecimiento de una respuesta inmune organizada contra los patógenos en general. La exquisita regulación de la respuesta del linfocito T, incluyendo la activación y diferenciación de las subpoblaciones efectoras, es controlada por muchos factores que actúan orquestadamente y depende finalmente de la interacción del linfocito T con células presentadoras de antígenos que llevan los antígenos específicos para activar la respuesta efectora del linfocito T en los sitios donde ocurre la infección. Es evidente que patógenos intracelulares como *Leishmania*, modulan la función del macrófago y alteran esta interacción para evadir la respuesta inmune (Solbach & Laskay, 1996).

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la respuesta inmune contra *Leishmania*, ya que a parte de actuar como célula hospedadora de los parásitos, actúan como células presentadoras de antígenos y dependiendo de su capacidad para responder a las citocinas provenientes de la interacción con el linfocito T durante el curso de la enfermedad, pueden activarse y eliminar a los patógenos mediante la producción de óxido nítrico (ON) y otros compuestos intermediarios del oxígeno reactivo (Fang, 1997). Pinelli y colaboradores demostraron que la infección *in vitro* por *L. infantum* en macrófagos caninos bajoregula la expresión de la molécula coestimuladora B7 impidiendo la efectiva interacción entre el linfocito T y los macrófagos, evidenciado por la ausencia de proliferación y producción de IFN- γ específica frente a *Leishmania*, la cual es recobrada con la adición exógena de esta molécula (Pinelli *et al.*, 1999).

La producción de ON en macrófagos caninos desempeña un papel importante en la actividad anti-*Leishmania*. Los macrófagos infectados con *L. infantum* aumentan su capacidad leishmanicida y la producción de ON en presencia del parásito y LPS (Panaro *et al.*, 1998). Igualmente citocinas Th1 como IFN- γ , incrementan la producción de NO en macrófagos caninos infectados con *L. infantum*, mientras que citocinas como IL-4 se asocian a una producción disminuida de ON (Pinelli *et al.*, 1994; Quinnell *et al.*, 2001). La inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (NOS2) esta asociada con la disminución de

la actividad leishmanicida y fagocítica en macrófagos caninos (Panaro *et al.*, 1998; Pinelli *et al.*, 2000). En un estudio preliminar analizando las concentraciones de ON en perros naturalmente infectados con *L. infantum* no se encontraron diferencias significativas en el suero de animales sintomáticos y asintomáticos. Sin embargo la proporción de perros con valores elevados de nitritos en suero fue mayor en perros sintomáticos en comparación con los asintomáticos y controles no infectados (Marzal *et al.*, 2002). Adicionalmente este mismo estudio demostró una mayor proporción de células positivas para la expresión NOS2 en hígado y bazo en perros sintomáticos con respecto a los asintomáticos y controles, indicando que la producción de ON es localizada diferencialmente en los órganos específicos y no sistémica (Marzal *et al.*, 2002).

Es importante recalcar que si bien los estudios realizados a partir de muestras de sangre periférica, proveen una aproximación general al status inmunológico a nivel sistémico del animal, no necesariamente son el reflejo de lo que ocurre en los órganos blanco del parásito.

Estudios realizados por nuestro grupo analizando biopsias de hígado y bazo proponen la existencia de una inmunidad órgano-específica para LVC en perros naturalmente infectados (Díaz *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2004). En este estudio los resultados demuestran una elevada carga parasitaria y mayor proporción de células infectadas en hígado y bazo de perros sintomáticos naturalmente infectados con *L. infantum/L. chagasi* a diferencia de perros asintomáticos; Estas diferencias en la carga parasitaria además de estar asociadas con los signos clínicos, se correlacionan con cambios al nivel estructural y en la composición de células inmunocompetentes de hígado y bazo. La presencia en perros asintomáticos de granulomas bien definidos contentivos de una elevada proporción de Linfocitos T CD4+ y CD8+ efectores, así como la expresión de moléculas de adhesión y activación, asociadas a la expresión de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad (Fig. 2) sugiere el establecimiento de una inmunidad celular eficiente, que permite a estos animales permanecer infectados con una baja carga parasitaria mostrando ningún o pocos signos clínicos (Sánchez *et al.*, 2004). En contraste la ausencia de granulomas maduros en hígado y la marcada depresión de linfocitos T, moléculas de adhesión activación e integrinas en los perros sintomáticos pudieran ser determinantes

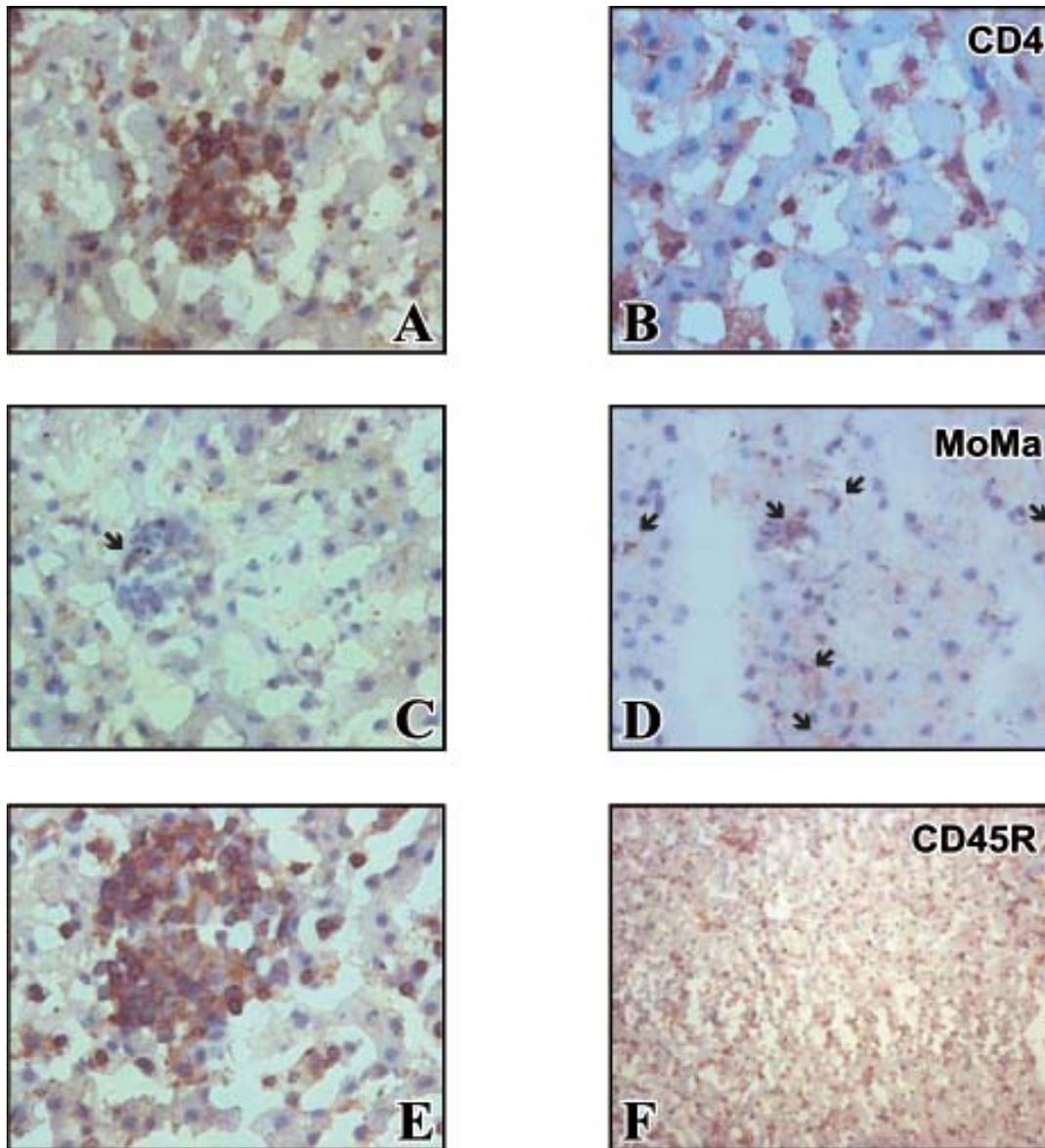


Fig. 2. Localización Immunohistoquímica de células inmunocompetentes en hígado de perros infectados naturalmente con *L. infantum/chagasi* Paneles izquierdos (A,C,E) corresponden a secciones de un perro asintomático mientras los paneles derechos (B,D,F) a un perro sintomático. Se observan linfocitos T CD4 positivos organizados en granulomas en perro asintomático (A), mientras que en el perro sintomático los linfocitos T CD4 positivos son distribuidos aleatoriamente en los sinusoides hepáticos (B). Los macrófagos residentes MoMa positivos son escasos en los perros asintomáticos (C), pero más profusos y dispersos en el tejido de los perros sintomáticos mostrando un marcaje más débil de MOMA y mayor carga parasitaria (D) Los leucocitos infiltrantes CD45 positivos son reclutados hacia los granulomas en el hígado de perros asintomáticos (E) pero no en los sintomáticos (F) donde se observan distribuidos sin organización aparente. Flechas: células MoMa+, contraste con hematoxilina, magnificación x 1000 (A-E) y x 200 (F). Tomado de: Sánchez *et al.*, 2004.

en la diseminación del parásito y eventualmente la muerte (Sánchez *et al.*, 2004). A pesar de que las diferencias en la respuesta del bazo entre perros sintomáticos y asintomáticos no son tan marcadas como la observada en hígado, también se evidenció una pérdida parcial de la arquitectura del bazo (Díaz *et al.*, 2001), coincidiendo además con una mayor proporción de macrófagos infectados y una menor proporción de linfocitos T activados CD4+ CD44+ en perros sintomáticos (Sánchez *et al.*, 2004).

La depleción de linfocitos T en los órganos linfoides, y la sobre proliferación de linfocitos B, macrófagos, células plasmáticas y eosinófilos en perros infectados con *L. infantum* conducen a la hepato-esplenomegalia, linfadenopatía generalizada e hiperglobulinemia. Los anticuerpos específicos contra *Leishmania* pueden opsonizar al parásito facilitando la fagocitosis por los macrófagos y permitiendo la replicación del parásito. Además, la proliferación incontrolada de linfocitos B, la sobreproducción de anticuerpos y la falta de regulación de linfocitos de T, resultan en la formación de complejos inmunes circulantes que pueden ser depositados en las paredes de los vasos causando vasculitis, poliartritis, uveítis, y glomerulonefritis (Strauss-Ayali, 2001). En este respecto es importante destacar que la inmunidad en LVC puede variar entre distintas razas de perros, dependiendo de su grado de susceptibilidad y/o resistencia a adquirir la enfermedad y que además mostrará características particulares en los distintos órganos blancos que deben ser consideradas al utilizar agentes terapéuticos inmunomoduladores o en el desarrollo de vacunas.

Los perros sintomáticos por lo general son sacrificados o tratados con antimoniales o anfotericina B, sin embargo los perros asintomáticos no son diagnosticados y no son tratados constituyendo un riesgo en la diseminación de la enfermedad, ya que son capaces de transmitir la infección al insecto vector (Solano-Gallego *et al.*, 2001). Los tratamientos no son ampliamente efectivos, pues a pesar de desaparecer o disminuir los síntomas clínicos, no se alcanza la inmunidad estéril y las recaídas ocurren en un 80% de los casos (Moreno & Alvar, 2002) Las drogas comúnmente utilizadas son capaces de disminuir la carga parasitaria a niveles casi indetectables, y lograr el re establecimiento de los linfocitos T CD4 a niveles normales disminuyendo así el riesgo de transmisión al vector. Sin embargo si el tratamiento es interrumpido la inmunidad celular retorna a a bajos niveles

permitiendo la replicación y diseminación del parásito y por tanto aumentando el riesgo de infectividad (Gurga *et al.*, 2002). Por otra parte los tratamientos prolongados con antimoniales pentavalentes pueden seleccionar cepas resistentes del parásito, por lo que su utilización debe ser considerada. Otras drogas como el allopurinol que inhibe la replicación del parásito bloqueando la síntesis de ARN resulta relativamente eficiente al no causar efectos secundarios en periodos prolongados, cuando se usa solo o en combinación con antimoniales sin embargo puede en un bajo porcentaje dar lugar a recaídas (Denerolle, 1999; Strauss-Ayali & Baneth, 2001). Cabe destacar que los tratamientos en caninos no deben incluir el uso de drogas aplicadas al tratamiento de la LV en humanos, ya que la ineficacia de estos tratamientos en caninos podrían dar origen al desarrollo de cepas de *Leishmania* resistentes a las drogas comúnmente empleadas en humanos. La organización mundial de la salud recomienda la vigilancia en este sentido y prohíbe el estudio de estas drogas en caninos. A pesar de estas recomendaciones en el último congreso mundial de Leishmaniasis recientemente celebrado en Palermo Italia, se presentaron estudios clínicos en perros utilizando Miltefosina (Miro *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2005) y meglumina antimonial o Glucantime (Schettini *et al.*, 2005, Romano *et al.*, 2005) con resultados muy ambiguos y poco prometedores.

Siendo el perro el principal reservorio de las especies de *Leishmania* que causan la enfermedad visceral en humanos, lo hacen un modelo ideal para el estudio y desarrollo de nuevas terapias y vacunas con el objeto de reducir los riesgos de infección en humanos y proteger a los perros de re infecciones. Distintos antígenos y protocolos de vacunación frente a *Leishmania* han sido utilizados en modelos experimentales con ratones y en algunos casos en humanos, entre ellos: parásitos muertos por calor o formalinizados, parásitos vivos atenuados, proteínas antigénicas del parásito, antígenos recombinantes y proteínas sintéticas, péptidos sintéticos, inmunógenos expresados en virus o bacterias, e incluso ADN desnudo del parásito (Handman, 2001). Sin embargo en perros se han intentado pocos esquemas de vacunación. Adicionalmente, los primeros ensayos de vacunación en perros utilizando preparados purificados de *L. infantum* (Dunan *et al.*, 1989), han demostrado que las estrategias que confieren protección en ratones no necesariamente lo hacen en perros, indicando que existen mecanismos de control inmunológico diferentes.

Una vacuna efectiva debe inducir una inmunidad mediada por células fuerte y duradera y su poder protector debe evaluarse al cabo de los años resultando en un bajo índice de infección de perros vacunados con respecto a los controles. En la actualidad aun se encuentran en experimentación vacunas cuyos resultados parciales son promisorios en el laboratorio mas no necesariamente en el campo a gran escala. Vacunación de promastigotes muertos de *L. infantum* inducen una elevada producción de IFN- γ en sangre periférica y de ON y un incremento en la fagocitosis y actividad leishmanicida de macrófagos (Panaro *et al.*, 2001). Igualmente una respuesta celular efectiva y duradera en perros fue observada en un estudio en Brasil, empleando el ligando de fucosamano donde todos los perros vacunados mostraron adquisición de inmunidad celular, y al cabo de dos años solo un pequeño porcentaje (8%) mostró algunos signos de leishmaniasis (da Silva *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que la combinación de BCG y una proteína quimérica formada por fusión genética de cinco determinantes antigénicos de cuatro proteínas de *Leishmania* es capaz de conferir protección en perros experimentalmente infectados con *L. infantum* en un 90 % de efectividad y protección clínica (Molano *et al.*, 2003), abriendo una perspectiva para el uso de esta combinación en estudios más amplios y posiblemente en protocolos de vacunación a mediana y gran escala en áreas endémicas.

Existen además muchos factores que determinan la efectividad de una vacuna, como lo son la escogencia de un adyuvante apropiado, la ruta de administración y las condiciones intrínsecas (susceptibilidad genética, microambiente) del modelo experimental. Estos factores deben ser evaluados extensivamente antes de iniciar protocolos masivos de vacunación.

IMMUNOLOGY OF CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY

Visceral leishmaniasis is an infectious disease, caused in Latin America by the parasite *Leishmania infantum/chagasi*, which mainly affects children under four (4) years of age causing a high mortality rate in endemic areas and posing a serious public health problem. Domestic dogs are the main reservoir of the disease. The present review describes the immunological aspects evaluated in the last decade in peripheral blood and target organs of the parasite,

which helps to characterize and define the infected dogs as symptomatic and asymptomatic. It provides an important viewpoint in the prognosis of the visceral disease, the development of new therapies, vaccines candidates and control measures in canine visceral leishmaniasis.

Key words: Visceral leishmaniasis, *Leishmania*, canine, immunology.

REFERENCIAS

- Abranches P., Santos-Gomes G., Rachamim N., Campino L., Schnur L.F. & Jaffé C.L. (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **13**: 537-550.
- da Silva V.O., Borja-Cabrera G.P., Correia Pontes N.N., de Souza E.P., Luz K.G., Palatnik M. *et al.* (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* **19**: 1082-1092.
- Denerolle P.B.G. (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J. Vet. Intern. Med.* **13**: 413-415.
- Diaz, N.L., Zerpa O., Sanchez M.A. & Tapia F.J. (2001). Compartmented Immunity In dogs infected with *Leishmania chagasi*. Second World Congress on Leishmaniosis, Crete-Greece. Abstract book: 103.
- Dunan S., Frommel D., Monjour L., Ogunkolade B.W., Cruz A. & Quilici M. (1989). Vaccination trial against canine visceral leishmaniasis. Phoccean Veterinary Study Group on Visceral Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **11**: 397-402.
- Fang, F.C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* **99**: 2818-2825.
- Guarga J.L., Moreno J., Lucientes J., Gracia MJ, Peribañez MA & Castillo JA. (2002). Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **88**: 13-20.
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 229-243.

- Manna L., Viola E., Pavone L., Staiano N. & Gravino A.E. (2005) Leishmanicidal activity of Miltefosine in acute renal failure of naturally infected dogs. Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Italy. Abstract Book: 165.
- Marzal U.M., Cabrera M., Díaz N., Sánchez M.A., Negrón E., Zerpa O. *et al.* (2002). Concentración de nitritos derivados del óxido nítrico en perros con infección natural por *L.infantum/L. chagasi*. *Acta cient. Ven.* **53**: 123.
- Miró G., Mateo M., Cruz I., Cañavate C., Nieto J., Montoya A. *et al.* (2005) Miltefosine: a New treatment for canine leishmaniosis, preliminary results. Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Italy. Abstract Book: 171.
- Molano I., Alonso M.G., Miron C., Redondo E., Requena J.M., Soto M. *et al.* (2003). A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet. Immun. Immunopath.* **92**: 1-13.
- Moreno, J. & Alvar J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* **18**: 399-405.
- Moreno J., Nieto J., Chamizo C., Gonzalez F., Blanco F., Barker D.C. *et al.* (1999). The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **71**: 181-195.
- Nieto C.G., García-Alonso M., Requena J.M., Miron C., Soto M., Alonso C. & Navarrete I. (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **67**: 117-130.
- Panaro M.A., Acquafredda A., Lisi S., Lofrumento D.D., Mitolo V., Sisto M. *et al.* (2001). Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **24**: 187-195.
- Panaro M.A., Lisi S., Mitolo V., Acquafredda A., Fasanella A., Carelli M.G. *et al.* (1998). Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes. *Cytobios.* **95**: 151-160.
- 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.
- Pinelli E., Rutten V.P., Bruysters M., Moore P.F. & Ruitenbergh E.J. (1999). Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect. Immun.* **67**: 237-243.
- Pinelli E., Gebhard D., Mommaas A.M., van Hoeij M., Langermans J.A., Ruitenbergh E.J. *et al.* (2000). Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.* **92**: 181-189.
- Quinnell R.J., Courtenay O., Shaw M.A., Day M.J., Garcez L.M., Dye C. *et al.* (2001). Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **183**: 1421-1424.
- Romano V., Torre C., Rodon J., Campmany J., Ramis A. & Ferrer L. (2005). Evolution of immunological and clinical parameters in dogs with leishmaniasis following conventional treatment plus a specific diet. Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Italy, Abstract Book: 200.
- Sánchez M.A., Díaz N.L., Zerpa O., Negrón E., Convit J. & Tapia F. J. (2004). Organs specific immunity in canine visceral leishmaniasis: Analysis in symptomatic and asymptomatic dogs, naturally infected with *L. chagasi*. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* **70**: 618-624.
- Schettini D.A., Costa Val A.P., Souza L.F., Demicheli F., Rocha O.G.F., Melo M.N. *et al.* (2005). Multiple dose-treatment of dogs with visceral leishmaniasis using liposome-encapsulated meglumine antimoniate. Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Italy, Abstract Book: 206.
- Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J. *et al.* (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response

- against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* **90**: 37-45.
- Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J. & Ferrer L. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 560-563.
- Solbach, W. & T. Laskay (1996). Evasion strategies of *Leishmania* parasites. pp 25-47. En: *Molecular and immune machamisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. F. J. Tapia, G. Caceres-Dittmar and M. A. Sanchez (Eds.), R.G. Landes co., Austin, USA.
- Strauss-Ayali, D., Baneth G., (2001). Canine Visceral Leishmaniasis, pp. 1-10. En: *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. L.Carmichael (Ed.) International Veterinary Information Services, New York, USA.
- Zerpa O., Ulrich M., Negron E., Rodriguez N., Centeno M., Rodriguez V. *et al.* (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita Island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**, 484-7.

Recibido el 28 de Octubre 2005
Aceptado el 02 de Noviembre 2005