

Inmunogenicidad de péptidos sintéticos de p36/LACK de *Leishmania donovani* en caninos con leishmaniasis visceral

Dennis A. Lugo¹
deallugo@gmail.com

Guillermo Terán-Ángel²
guillermondi@gmail.com

Maira Cabrera¹
mairacab@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-1670-0541>

¹Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

²Facultad de Medicina, Universidad de los Andes.

RESUMEN

Diversas investigaciones han documentado que en la leishmaniasis visceral canina (LVC), causada por *Leishmania infantum/chagasi*, el tratamiento con los fármacos convencionales no logra resolver la infección. Por lo tanto, es muy importante desarrollar nuevas estrategias en el tratamiento de la LVC para controlar la propagación de la enfermedad entre los perros y de los perros a los humanos. En el presente estudio, se analizó la respuesta de citocinas inducida por 5 secuencias de epítopes derivadas de p36/LACK de *L. donovani*, seleccionadas *in silico* y sintetizadas en un estudio previo. La producción de IFN- γ , IL-6 y TNF- α se determinaron por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica de caninos naturalmente infectados sintomáticos (LVC) y perros sanos, estimulados *in vitro* en ausencia o presencia de fitohemaglutinina, antígenos crudos de *L. donovani* (*Ld*) y 5 péptidos sintéticos de la proteína p36/LACK. Los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* indujeron producción de IFN- γ ($p < 0,01$). Mientras que una baja secreción de IL-6 se observó tras la estimulación con *p36L01*, *p36L02* y *p36L03*. Los péptidos no estimularon a la producción de TNF- α en los cultivos linfocitario de los perros parasitados. Los resultados generales sugieren que los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* podrían ser buenos candidatos en el desarrollo de vacunas de segunda generación y/o inmunoterapia debido a la inducción de IFN- γ de protección.

Palabras Clave: leishmaniasis visceral; caninos, citocinas; epítopes; p36/LACK; péptidos sintéticos.

IMMUNOGENICITY OF P36/LACK SYNTHETIC PEPTIDES OF *Leishmania donovani* IN CANINES WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT

Several investigations have documented that in canine visceral leishmaniasis (CVL), caused by *Leishmania infantum/chagasi*, conventional drug treatments fail to resolve the infection. Therefore, it is very important to develop new strategies of CVL treatment to control the spread of the disease between dogs and from dogs to humans. In the present study, we analyzed the cytokine response induced by 5 epitope sequences derived from *L. donovani* p36/LACK, selected *in silico* and synthesized in a previous study. The production of IFN- γ , IL-6 and TNF- α were determined by ELISA in supernatants of peripheral blood mononuclear cell cultures from symptomatic and naturally infected canines

(CVL), stimulated *in vitro* with or without PHA, *L. donovani* (Ld) crude antigens and 5 synthetic peptides of the p36/LACK protein. Peptides p36L02, p36L03 and p36L04 induced IFN- γ production ($p < 0.01$). While a low IL-6 secretion was observed after stimulation with p36L01, p36L02 and p36L03. The peptides did not stimulate the production of TNF- α in the lymphocyte cultures of the parasitized dogs. Overall results suggest that the peptides p36L02, p36L03 and p36L04 might be good candidates in the development of second-generation vaccines and/or immunotherapy due to the induction of protective IFN- γ .

Keywords: Visceral leishmaniasis; canines; cytokines; epitopes; p36/LACK; Synthetic peptides.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral (LV) es una parasitosis severa causada principalmente por *L. (L) donovani* y *L. (L) infantum* (sinónimo *L. chagasi*). Esta enfermedad puede ser letal si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Estudios previos han demostrado que en mурidos infectados con *L. (L) donovani* y caninos infectados con *L. (L) infantum*, la resistencia frente al parásito se asocia con el predominio de citocinas proinflamatorias tales como el IFN- γ , TNF- α , característico a respuestas inmunitarias de tipo CD4⁺Th1, por otro lado, se ha asociado susceptibilidad frente al parásito cuando se desarrollan respuestas de tipo CD4⁺Th2 (Kaye y Scott, 2011; Nieto *et al.*, 2011).

En Venezuela la LV, representa un problema de salud pública debido a la gran distribución que esta posee en nuestro país, donde el Estado Nueva Esparta es el foco endémico más estudiado (Lugo *et al.*, 2015; Zerpa *et al.*, 2003a). Diferentes trabajos han mostrado que los perros son uno de los principales reservorios domésticos y peridomésticos del parásito, éstos son fuente importante de infección para el vector, representando un alto potencial de riesgo para los humanos debido a la estrecha relación entre humanos y perros (Okuno *et al.*, 2002; Silva, 2008).

El tratamiento con quimioterapia para la LV canina es poco efectivo debido a la resistencia a los medicamentos, la toxicidad y el incumplimiento (Baxarias *et al.*, 2019; Maia *et al.*, 2010; Uliana *et al.*, 2018). De ahí la importancia en investigar nuevas alternativas terapéuticas tales como vacunas o inmunoterapias, siendo los métodos preventivos más confiable y rentables, para tratar de evitar o minimizar la transmisión del parásito entre caninos y humanos (Baxarias *et al.*, 2019; Ghorbani y Farhoudi,

2018; Gonçalves *et al.*, 2019; Singh y Sundar, 2014). En ese sentido, el antígeno p36/LACK es de particular interés como un candidato para vacuna debido a lo siguiente: tiene un rol predominante en la inmunopatogénesis de la infección; la secuencia aminoacídica de 36kDa LACK es altamente conservada en amastigotes y promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, es un análogo del receptor de la kinasa C preactivada (PKC), la cual tiene importantes funciones como mediador de las interacciones entre proteínas activadoras y/o señaladoras (Okuno *et al.*, 2002). Algunos estudios han mostrado que la p36/LACK induce protección contra *Leishmania*, a través de la inmunización con ADN-p36/LACK seguido de una re-inmunización con virus vaccinia-p36/LACK induciendo activación de respuesta de células T y protección contra *Leishmania*, en mурidos (Dondji *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2007) y perros (Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008). En otro estudio, la inmunización intranasal de hámsteres con LACK ADN activó el desarrollo de una respuesta inmune que le permitió a estos animales resistir un reto con *L. (L) chagasi* (De Oliveira Gomes *et al.*, 2011). Sin embargo, en caninos poco se conoce del posible rol protector de la p36/LACK y su potencial uso en el desarrollo de inmunoterapias para estos animales, por eso nos propusimos evaluar en linfocitos de perros con LVC, la respuesta de citocinas pro-inflamatorias luego de estimulación con cinco determinantes antigénicos derivados de la p36/LACK, identificados previamente por nosotros (Terán-Ángel *et al.*, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

Péptidos

Los péptidos sintéticos derivados de la proteína p36/LACK de *L. donovani* evaluados, fueron los siguientes: p36L01 (97-114 GQCQRKFLKHTKDVLA), p36L02 (129-152 VIRVWNVAGECMHEFLRDGHEDW), p36L03 (171-188 SWDNTIKVWNVNGGKCER), p36L04 (184-199 GKCERTLKGHSNYVSTV) y p36L05 (292-309 NTLYSGHKDNLIRVWSIS). Los mismos fueron

identificados previamente por nosotros (Terán-Angel *et al.*, 2007). Fueron sintetizados en fase sólida y purificados (>90%) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) por el laboratorio de Síntesis de Péptidos del Instituto de Medicina Tropical, Facultad de Medicina – UCV, Venezuela.

Población de estudio

Se estudiaron 24 perros domésticos con infección natural por *L. infantum/chagasi* provenientes de zonas endémicas de la Isla de Margarita (estado Nueva Esparta, Venezuela) y 12 caninos clínicamente sanos, del bioterio de la Escuela de Medicina José María Vargas (UCV).

Los caninos se seleccionaron acorde a la presencia de tres o más signos clínicos: pérdida de peso, opacidad corneal, onicogriposis, alopecia, úlceras cutáneas, hepatoesplenomegalia y ganglios linfáticos palpables (Alvar *et al.*, 2004). Posteriormente, el diagnóstico de Leishmaniasis visceral canina (LVC) fue confirmado en el Laboratorio de Leishmaniasis de la Corporación de Salud (CORPOSALUD) del MPPS (estado Nueva Esparta, Venezuela), mediante el método serológico con rK39, (kinesina de *L. infantum/chagasi*, epítipo inmunodominante reconocido por linfocitos B) (Badaró *et al.*, 1996; Braz *et al.*, 2002; Terán-Ángel *et al.*, 2010). Método de alta sensibilidad y especificidad utilizado de rutina en Venezuela para la confirmación del diagnóstico de LV humana y canina (Zerpa *et al.*, 2003b).

La manipulación de los animales, se llevó a cabo siguiendo los lineamientos del Código de Ética para la Vida del MPPCTI (Código de Ética para la Vida, 2010), capítulo 3 y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina UCV-MPPS. La recolección de datos y muestras biológicas de los perros fueron realizados bajo consentimiento informado de sus dueños.

Se tomaron muestras de sangre periférica por venopunción a 24 perros con LVC y 12 perros sanos incluidos en el estudio (rK39 negativos), para la obtención de suero y cultivo *in vitro* de células mononucleares.

Cultivo linfocitario *in vitro* con péptidos

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC), fueron aisladas de 20 mL de sangre venosa heparinizada de perros con LVC y perros sanos mediante la modificación de un protocolo descrito previamente (Ramayo *et al.*, 2005). Brevemente, se realizó un gradiente de densidad con Lymphoprep™ (STEMCELL™) y con sangre heparinizada, diluidas 1:1 en solución de PBS estéril pH 7,2 a 400g durante 20 min. El halo enriquecido con células mononucleares se colectó y lavó tres veces en PBS. Las células obtenidas se suspendieron en RPMI 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Gibco®). Las células fueron dispensadas por triplicado para cada condición experimental, en placas fondo plano estériles de 96 pozos (Nunc Thermo Scientific) a una concentración de 2×10^5 células/pozo y se estimularon con 20 µg/mL de p36L01, p36L02, p36L03, p36L04, p36L05, fitohemaglutinina (PHA; 1 µg/pozo), antígeno crudo de *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80/DD8) 2×10^5 parásitos/pozo o solo medio RPMI suplementado. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO₂. A los 3 días, se colectaron 100 µL/pozo de sobrenadante para la condición de estimulación con fitohemaglutinina y a los 5 días para los cultivos estimulados con *L. donovani* y los péptidos bajo estudio, se almacenó a 70°C para posterior evaluación de citocinas.

Determinación de citocinas

Las concentraciones de IFN-γ, TNF-α e IL-6 en los sueros y sobrenadantes de los cultivos linfocitarios de los perros con LVC y sanos, se determinaron mediante ELISA de captura comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN, USA). Las concentraciones de cada citocina se obtuvieron a partir de una curva patrón construida con recombinante de cada citocina suministradas por los kits (Canine TNF-α DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 µg/mL; Canine IFN-γ, DuoSet®, sensibilidad: 31,2 - 2000 µg/mL; Canine IL-6 DuoSet®, sensibilidad: 62,5 - 4000 µg/mL; R&D Systems, MN, USA). Los resultados fueron expresados en µg/mL.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos para cada parámetro evaluado fueron establecidas mediante el test de Mann-Whitney. Las comparaciones fueron consideradas significativas cuando $p < 0,05$. Para los análisis se usó el programa Prism 5 para Windows, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. 2007).

RESULTADOS

Evaluación serológica de los perros con LVC

Para estudiar la inmunogenicidad de los péptidos, se decidió previamente evaluar el estado inmunológico de los perros bajo estudio (LVC y sanos), para ello se les determinaron las concentraciones séricas de IFN- γ , TNF- α e IL-6 (Figura 1).

En los perros enfermos se evidenció una menor ($p < 0,05$) concentración de IFN- γ ($228,82 \pm 163,69$ $\mu\text{g/mL}$) y de TNF- α ($17,37 \pm 7,85$ $\mu\text{g/mL}$) respecto a lo encontrado en los perros sanos: $447,8 \pm 147,49$ $\mu\text{g/mL}$ para IFN- γ y $26,45 \pm 11,6$ $\mu\text{g/mL}$ para TNF- α (Figura 1a y 1b). En contraste, no evidenciamos diferencias significativas en la concentración sérica de IL-6, entre ambos grupos de caninos (Figura 1c).

Respuesta de citocinas en cultivos de PBMC estimulados con PHA, *L. donovani* y los péptidos sintéticos de p36/LACK

La figura 2 muestra la concentración ($\mu\text{g/mL}$) promedio + desviación estándar de IFN- γ , TNF- α e IL-6 en respuesta al mitógeno PHA, en los cultivos linfocitarios de los caninos sintomáticos y sanos. Las células de los perros sanos produjeron mayores ($p < 0,05$) concentraciones de IFN- γ y TNF- α en respuesta a la PHA ($44,4 \pm 25,7$ $\mu\text{g/mL}$; $203,8 \pm 74,5$ $\mu\text{g/mL}$; respectivamente) comparado con lo encontrado en los perros con LVC ($10,8 \pm 8,0$ $\mu\text{g/mL}$; $72,6 \pm 20,2$ $\mu\text{g/mL}$; respectivamente). Mientras que, la IL-6 detectada en los sobrenadantes de los cultivos celulares de los perros infectados ($58,6 \pm 21,6$ $\mu\text{g/mL}$) estuvo incrementada significativamente ($p < 0,05$) comparado con los perros sanos ($34,2 \pm 29,9$ $\mu\text{g/mL}$).

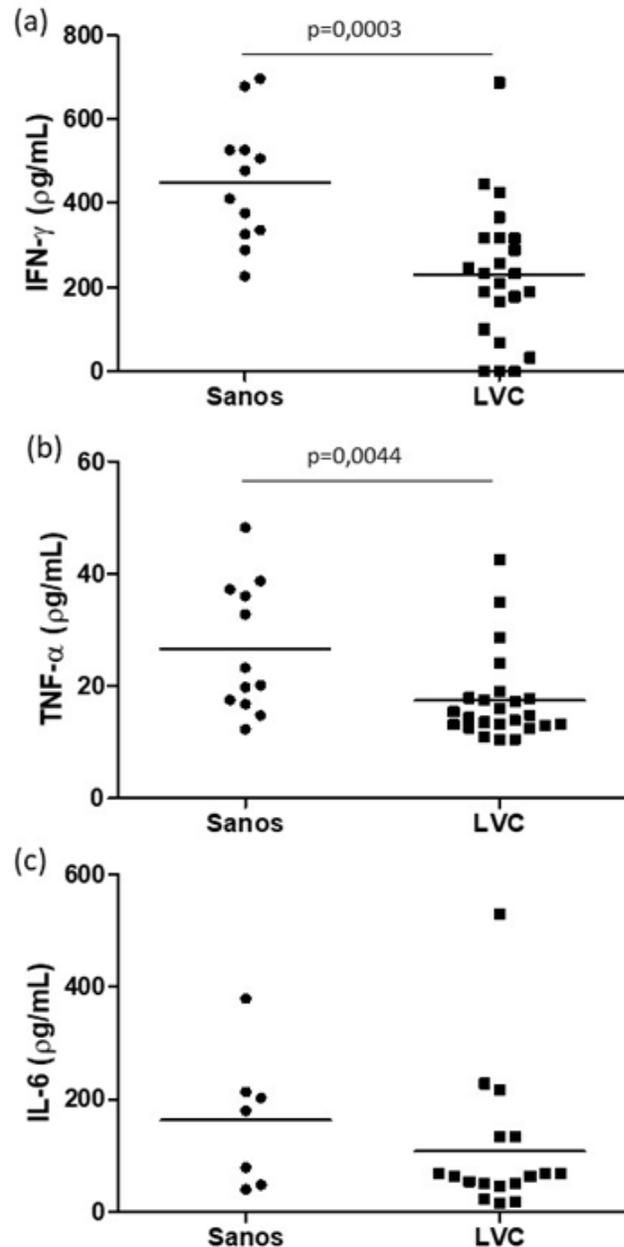


Figura 1. Concentraciones séricas de citocinas de caninos con LVC y sanos. (a) citocina Th1 IFN- γ , (b) y (c) citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6.

La respuesta de citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 luego estimulación de las PBMC de caninos sintomáticos y controles sanos con antígeno crudo de *Ld* o los péptidos epítopes de p36/LACK se representa en la figura 3. Los perros con LVC mostraron una disminución de TNF- α y un incremento IL-6 significativos luego de estimulación con *Ld* comparado con lo observado en los perros sanos.

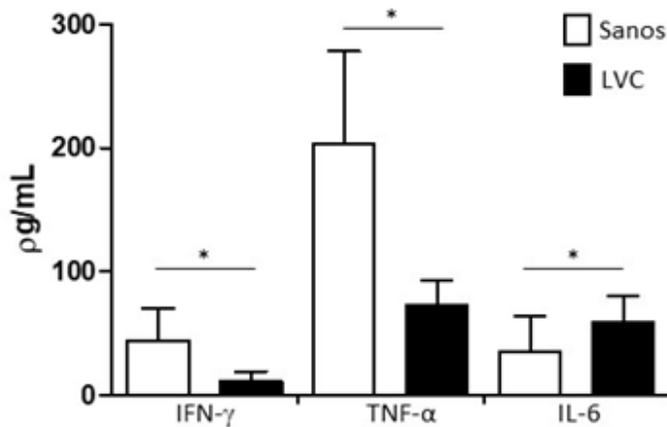


Figura 2. Producción de citocinas en cultivos de linfocitos de caninos con Leishmaniasis visceral (LVC) y perros sanos estimulados con PHA. * $p < 0,05$.

Los péptidos de p36/LACK indujeron una respuesta de citocinas en más del 20% de la población de los perros con LVC y sanos. Interesantes resultados obtuvimos con tres de ellos (*p36L02*, *p36L03* y *p36L04*), cuya respuesta de IFN- γ en los caninos infectados *p36L02* ($194,0 \pm 70,7$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), *p36L03* ($233,6 \pm 49,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) y *p36L04* ($344,8 \pm 68,3$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la obtenida en respuesta al antígeno crudo de *Ld* ($117,4 \pm 45,6$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 3a). Más aun, la respuesta de IFN- γ asociada a estas secuencias (*p36L02*, *p36L03* y *p36L04*) resultó ser mucho mayor ($p < 0,01$) en los perros infectados comparado con los sanos.

En la Figura 3b, se puede apreciar que en los perros con LVC, estos péptidos no indujeron producción de TNF- α , en contraste a lo observado previamente bajo el estímulo con *Ld* ($23,6 \pm 6,4$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Adicionalmente, respecto a la IL-6, demostramos que a diferencia de lo obtenido en los cultivos estimulados con *Ld* para perros infectados, los péptidos *p36L02*, *p36L03* y *p36L04* no indujeron una producción importante de esta citocina. Finalmente, los péptidos *p36L01* y *p36L05* no indujeron una producción significativa de las citocinas estudiadas (datos no mostrados).

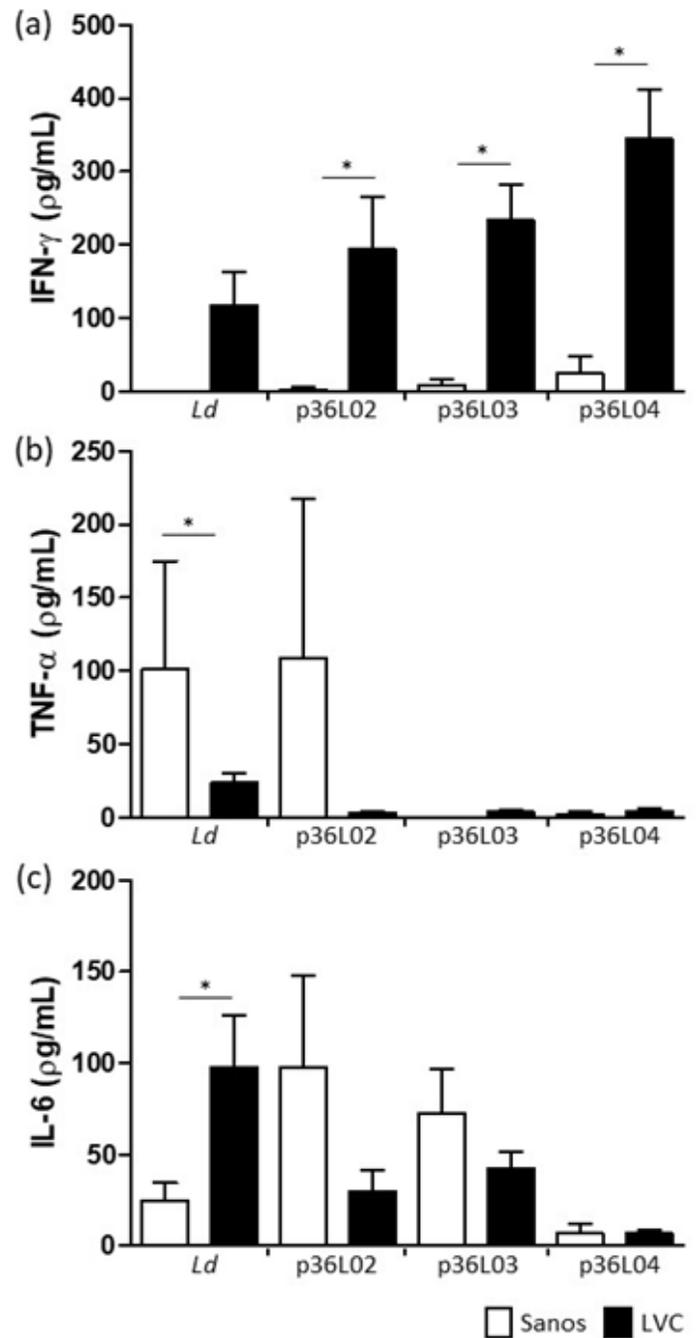


Figura 3. Producción de citocinas en cultivos de linfocitos de caninos con Leishmaniasis visceral (LVC) y perros sanos estimulados con *L. donovani* (*Ld*) y péptidos. (a) citocina Th1 IFN- γ . (b) y (c) Citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Es conocido que en leishmaniasis visceral, la principal respuesta protectora frente al parásito *Leishmania*, es inducida principalmente por la respuesta inmune de tipo CD4⁺ Th1, caracterizada

por la producción de IFN- γ y TNF- α . Este tipo de respuesta está relacionada con la regulación positiva de la actividad leishmanicida en los macrófagos (Gonçalves *et al.*, 2019; Koutinas y Koutinas, 2014), principal mecanismo efector de la muerte intracelular de los amastigotes de *Leishmania* (Barbiéri, 2006; Scott y Novais, 2016). En este sentido, el IFN- γ y el TNF- α , son predominantes en perros asintomáticos, lo que demuestra su potencial protector contra la enfermedad (Costa-Pereira *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2010).

Los perros incorporados en nuestro estudio, con diagnóstico confirmado de LVC por criterios clínicos y la seropositividad a la prueba con rK39, también presentaron pobres niveles serológicos de IFN- γ y TNF- α . Resultados similares se han reportado en otras investigaciones, en las cuales se ha evidenciado que los perros con baja respuesta de estas citocinas (IFN- γ y TNF- α) presentaban sintomatología clínica (Barbiéri, 2006; Boggiatto *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2010) con una mayor parasitemia (Martínez-Orellana *et al.*, 2017; Solano-Gallego *et al.*, 2009). Estos estudios, tampoco encontraron diferencias en las concentraciones serológicas de IL-6 en perros con LVC (Rodríguez *et al.*, 2010).

Con relación a las respuestas *in vitro*, se ha observado en caninos, que los linfocitos de animales polisintomáticos con LVC estimulados con antígenos crudos de *Leishmania spp* producen concentraciones bajas de IFN- γ , IL-18, TNF- α e IL-10, lo cual concuerda con nuestros hallazgos (Carrillo y Moreno, 2009). En estos estudios también han reportado, concentraciones significativas de IL-6 en respuesta a los estímulos específicos ya mencionados (Dayakar *et al.*, 2019). Nuestra investigación reprodujo estas observaciones: las células mononucleares de caninos con LVC mostraron una mayor producción de IL-6 en respuesta a la PHA y al antígeno crudo de *L. donovani*. Lo cual indica que la baja producción de citocinas proinflamatorias junto a los elevados niveles de IL-6 está vinculada con la progresión de la enfermedad.

Estudios con p36/LACK han demostrado que es esencial para la viabilidad del parásito y para su

establecimiento en el huésped.

La respuesta inmunológica a esta molécula ha sido estudiada y utilizada para estudios experimentales de vacunas (De Oliveira Gomes *et al.*, 2011; Dondji *et al.*, 2005; Ramiro *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2008), también se ha utilizado como herramienta para investigar mecanismos relacionados con inmunidad y se ha ensayado en varios experimentos de inmunización, proporcionando resultados heterogéneos (Alcolea *et al.*, 2019; Evans y Kedzierski, 2012).

Mediante el análisis *in silico* de p36/LACK de *L. donovani*, (99% homóloga con la de *L. infantum/chagasi* especie infectante de los caninos estudiados) hemos seleccionado 5 péptidos epítopes, en un estudio previo. Estos péptidos constituyen epítopes T ya que tienen estructura α -hélice anfipática con patrones repetitivos conocidos por unirse a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II (Terán-Ángel *et al.*, 2007).

En el presente estudio, evidenciamos que tres de los cinco péptidos, pudieron ser reconocidos por los linfocitos T de los caninos sintomáticos y activarlos. Como lo refleja la producción de IFN- γ asociada a las secuencias p36L02, p36L03 y p36L04, que resultó ser mucho mayor en los perros infectados que en los sanos. Esto sugiere que estos péptidos son epítopes inmuno-dominantes dentro de la molécula p36/LACK, involucrados en el desarrollo de una respuesta mediada por células T, que incluye la estimulación y proliferación de células productoras de citocinas como IFN- γ , que potenciaría la actividad anti-*Leishmania* mediada por radicales de oxígeno y el óxido nítrico, esenciales para la protección y/o curación de la LV (Dias *et al.*, 2018; Reed *et al.*, 2016; Singh y Sundar, 2014).

Con respecto al TNF- α , no encontramos una producción importante de esta citocina en los cultivos linfocitarios de perros con LV al estimularlos con el antígeno crudo de *Ld* y los 5 péptidos. El TNF- α junto con el IFN- γ , se asocian con respuestas Th1, por lo que esperábamos una respuesta similar a la obtenida con el IFN- γ , sin embargo, esto no fue así. Probablemente el TNF- α pudo haberse producido

tempranamente y para el momento en que se colectaron los sobrenadantes de los cultivos estimulados con *Ld* y péptidos, éste podría haberse consumido.

Ninguno de los péptidos indujo una producción evidente de IL-6, resultado alentador puesto que esta citocina se ha relacionado con la progresión de la enfermedad en humanos y caninos (Dayakar *et al.*, 2019).

Las vacunas clásicas contra la leishmaniasis han estado basadas en el uso de parásitos atenuados o subunidades del mismo, lo cual es desventajoso porque consisten en un amplio rango de determinantes antigénicos capaces de activar respuestas protectoras o respuestas inadecuadas. En contraste, el uso de péptidos en vacunas e inmunoterapias tiene varios beneficios como lo son: buena estabilidad, ausencia de toxicidad, baja complejidad y bajo costo. Por lo cual, si se acompaña de un adyuvante apropiado puede ser de utilidad en el desarrollo de una vacuna terapéutica (De Brito *et al.*, 2018).

En conclusión, estos resultados sugieren el potencial inmunogénico de estos péptidos: *p36L02*, *p36L03* y *p36L04*, los cuales pudieran ser considerados como base en el desarrollo de terapias alternativas por asociarse con una alta producción de IFN- γ por los linfocitos de los perros con LVC, que podría contribuir con su recuperación.

REFERENCIAS

- ALCOLEA PJ, ALONSO A, ESTEBAN A, PERIS P, CORTÉS A, CASTILLO JA, LARRAGA V. (2019). "IL12 p35 and p40 subunit genes administered as pPAL plasmid constructs do not improve protection of pPAL-LACK vaccine against canine leishmaniasis". *PLoS One* 14: e0212136.
- ALVAR J, CAÑAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. (2004). "Canine leishmaniasis". *Adv Parasitol* 57:1–88.
- BADARÓ R, BENSON D, EULÁLIO MC, FREIRE M, CUNHA S, NETTO EM, PEDRAL-SAMPAIO D, MADURCIRA C, BURNS JM, HOUGHTON RL, DAVID JR, REED SG. (1996). "rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis". *J Infect Dis* 173:758–761.
- BARBIÉRI CL. (2006). "Immunology of canine leishmaniasis". *Parasite Immunol* 28:329–337.
- BAXARIAS M, MARTÍNEZ-ORELLANA P, BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. (2019). "Immunotherapy in clinical canine leishmaniasis: a comparative update". *Res Vet Sci* 125:218–226.
- BOGGIATTO PM, RAMER-TAIT AE, METZ K, KRAMER EE, GIBSON-CORLEY K, MULLIN K, HOSTETTER JM, GALLUP JM, JONES DE, PETERSEN CA. (2010). "Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection". *Clin Vaccine Immunol* 17:267–273.
- BRAZ RFS, NASCIMENTO ET, MARTINS DRA, WILSON ME, PEARSON RD, REED SG, JERONIMO SMB. (2002). "The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection". *Am J Trop Med Hyg* 67:344–348.
- CARRILLO E, MORENO J. (2009). "Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis". *Vet Immunol Immunopathol* 128:67–70.
- MINISTERIO DEL PODER POPULAR PARA LA CIENCIA, TECNOLOGÍA E INDUSTRIAS INTERMEDIAS. (2010). "Código de Ética para la Vida", Caracas, Venezuela.
- COSTA-PEREIRA C, MOREIRA ML, SOARES RP, MARTELETO BH, RIBEIRO VM, FRANÇA-DIAS MH, CARDOSO LM, VIANA KF, GIUNCHETTI RC, MARTINS-FILHO OA, ARAÚJO MSS. (2015). "One-year timeline kinetics of cytokine-mediated cellular immunity in dogs vaccinated against visceral leishmaniasis". *BMC Vet Res* 11:92.
- DE BRITO RC, CARDOSO JM, REIS LES, VIEIRA J, MATHIAS FAS, ROATT BM, RODRIGO AGUIAR-SOARES RD, RUIZ JC, RESENDE D, REIS A. (2018). "Peptide vaccines for leishmaniasis". *Front Immunol* 9:1043.
- DE OLIVEIRA GOMES DC, DA SILVA COSTA SOUZA BL, DE MATOS GUEDES HL, LOPES UG, ROSSI-BERGMANN B. (2011). "Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*". *Parasitology* 138:1892–1897.
- DIAS DS, RIBEIRO PAF, MARTINS VT, LAGE DP, RAMOS FF, DIAS ALT, RODRIGUES MR, PORTELA ÁSB, COSTA LE, CALIGIORNE RB, STEINER BT, CHÁVEZ-FUMAGALLI MA, SALLES BCS, SANTOS TTO, SILVEIRA JAG, MAGALHÃES-SOARES DF, ROATT BM, MACHADO-DE-ÁVILA RA, DUARTE MC, MENEZES-SOUZA D, SILVA ES, GALDINO AS, COELHO EAF. (2018). "Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis". *Cell Immunol* 323:59–69.
- DAYAKAR A, CHANDRASEKAN S, KUCHIPUDI SV, KALANGE SK. (2019). "Cytokines: Key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: Opportunities for novel diagnostic and immunotherapy". *Front Immunol* 10/article 670.

- DONDJI B, PÉREZ-JIMENEZ E, GOLDSMITH-PESTANA K, ESTEBAN M, MCMAHON-PRATT D. (2005). "Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis". *Infect Immun* 73:5286–5289.
- EVANS KJ, KEDZIERSKI L. (2012). "Development of vaccines against visceral leishmaniasis". *J Trop Med* 2012: 892817.
- GHORBANI M, FARHOUDI R. (2018). "Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?". *Drug Des Devel Ther* 12:24-40.
- GOMES DC DE O, PINTO EF, MELO LDB, DE LIMA WP, LARRAGA V, LOPES UG, ROSSI-BERGMANN B. (2007). "Intranasal delivery of naked DNA encoding the LACK antigen leads to protective immunity against visceral leishmaniasis in mice". *Vaccine* 25:2168–2172.
- GONÇALVES AAM, LEITE JC, RESENDE LA, MARIANO RM DA S, SILVEIRA P, MELO-JÚNIOR OA DE O, RIBEIRO HS, DE OLIVEIRA DS, SOARES DF, SANTOS TAP, MARQUES AF, GALDINO AS, MARTINS-FILHO OA, DUTRA WO, DA SILVEIRA-LEMOS D, GIUNCHETTI RC. (2019). "An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy". *Front Cell Infect Microbiol* 9:427.
- KAYE P, SCOTT P. (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface". *Nat Rev Microbiol* 9:604–615.
- KOUTINAS AF, KOUTINAS CK. (2014). "Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*". *Vet Pathol* 51:527–538.
- LUGO DA, ORTEGA-MORENO ME, RODRÍGUEZ V, BELIZARIO DC, GALINDO WA, CABRERA GONZÁLEZ M, ZERPA O, SÁNCHEZ MA. (2015). "Seroprevalencia de la Leishmaniasis Visceral Canina Mediante Elisa con rK39 en Focos Endémicos de Venezuela". *Rev Fac Ciencias Vet UCV* 56:42–51.
- MAIA C, NUNES M, CRISTÓVÃO J, CAMPINO L. (2010). "Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and serological follow-up". *Acta Trop* 116:193–199.
- MARTÍNEZ-ORELLANA P, MARÍ-MARTORELL D, MONTSERRAT-SANGRÀ S, ORDEIX L, BANETH G, SOLANO-GALLEGO L. (2017). "Leishmania infantum-specific IFN- γ production in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis at diagnosis and during treatment". *Vet Parasitol* 248:39–47.
- NIETO A, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, ORDEN JA, DE LA FUENTE R, MADRID-ELENA N, CARRIÓN J. (2011). "Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model". *Vet Res* 42:39.
- OKUNO T, TAKEUCHI M, MATSUMOTO Y, OTSUKA H, MATSUMOTO Y. (2002). "Pretreatment of leishmania homologue of receptors for activated C kinase (LACK) promotes disease progression caused by *Leishmania amazonensis*". *Exp Anim* 51:335–341.
- RAMAYO L, SOBA M, MUNDO S. (2005). "Evaluación de la inmunidad celular en caninos: prueba de proliferación de linfocitos in vitro". *In Vet* 7:63–70.
- RAMIRO MJ, ZÁRATE JJ, HANKE T, RODRIGUEZ D, RODRIGUEZ JR, ESTEBAN M, LUCIENTES J, CASTILLO JA, LARRAGA V. (2003). "Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK". *Vaccine* 21:2474–2484.
- RAMOS I, ALONSO A, MARCEN JM, PERIS A, CASTILLO JA, COLMENARES M, LARRAGA V. (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response". *Vaccine* 26:333–344.
- REED SG, COLER RN, MONDAL D, KAMHAWI S, VALENZUELA JG. (2016). "Leishmania vaccine development: Exploiting the host-vector-parasite interface". *Expert Rev Vaccines* 15:81-90.
- RODRÍGUEZ OL, CABRERA M, RODRÍGUEZ V, ULRICH M, QUIJADAY JD, SÁNCHEZ MA. (2010). "Estudio preliminar de citocinas en suero de perros con Leishmaniasis visceral en una zona endémica venezolana". *Rev Fac Ciencias Vet* 51:43–50.
- SILVA R. (2008). "Factores de riesgo involucrados en la infección por *Leishmania infantum* / *L. chagasi*". *Rev Inst Nac Hig* 39:35–41.
- SCOTT P, NOVAIS FO. (2016). "Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis". *Nat Rev Immunol* 16:581–592.
- SINGH OP, SUNDAR S. (2014). "Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: Current status and future prospects". *Front Immunol* 5:296.
- SOLANO-GALLEGO L, KOUTINAS A, MIRÓ G, CARDOSO L, PENNISI MG, FERRER L, BOURDEAU P, OLIVA G, BANETH G. (2009). "Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis". *Vet Parasitol* 165:1-18.
- TERÁN-ÁNGEL G, RODRÍGUEZ V, SILVA R, ZERPA O, SCHALLIG H, ULRICH M, CABRERA M. (2010). "Herramientas no invasivas en Venezuela: Comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 y rK39 en el diagnóstico de leishmaniasis visceral". *Biomedica* 30:39–45.
- TERÁN-ANGEL G, SILVA B, CABRERA M. (2007). "Identificación de determinantes antigénicos lineales en la proteína p36/LACK de *Leishmania donovani*". XVIII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Porlamar, Nueva Esparta, Venezuela.
- ULIANA SRB, TRINCONI CT, COELHO AC. (2018). "Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges". *Parasitology* 145:464-480.
- ZERPA O, ULRICH M, BORGES R, RODRÍGUEZ V, CENTENO M, NEGRÓN E, BELIZARIO D, CONVIT J. (2003a). "Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela". *Pan Am J Public Heal* 13:239–245.

ZERPA O, ULRICH M, CONVIT J, BENÍTEZ M, BLANCO B, FELICIANGELI D, NEGRÓN E, RODRÍGUEZ N, SÁNCHEZ MA, TAPIA FJ, GARCÍA B. (2003b). "Programa control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela". Instituto de Biomedicina. Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dirección Regional de Salud del Estado Nueva Esparta, Coordinación de Zoonosis por el apoyo en la selección de los perros y a la Lic Melcenia Moreno por el transporte de las muestras a Caracas. Este trabajo recibió el financiamiento del CDCH-UCV y el FONACIT proyecto grupal N° G2005000375.