

LEISHMANIOSES: UMA ABORDAGEM SOBRE AS IMUNOGLOBULINAS E AS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA INFECÇÃO E NA VACINAÇÃO

[*Leishmaniosis: an approach about the immunoglobulins and cytokines involved in infection and vaccination*]

José Claudio Carneiro de Freitas^{1*}, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Estadual do Ceará

RESUMO: Objetivou-se revisar os principais trabalhos científicos, discutindo a participação das imunoglobulinas e as citocinas detectadas nas leishmanioses caninas (LCs) e na vacinação de cães saudáveis. Nas leishmanioses a resposta imune protetora é regulada por células Th1 e Th17, sendo INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 e TGF- β , as citocinas características, com consequente aumento na produção de IgG2. Por outro lado, a resposta imune mediada por Th2 e Treg, apresenta padrão de citocinas associadas a IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, as quais inibem a resposta de Th1, aumentando a produção de IgG1, IgA e IgE e o desenvolvimento sintomático de uma severa doença. O perfil de anticorpos associados à produção de IgG1 e IgG2 ainda é conflitante entre os pesquisadores. Sendo assim, a interpretação das imunoglobulinas não poderá funcionar como marcador, quer seja no diagnóstico quer seja no tratamento de animais doentes. A vacinação surgiu como nova estratégia de controle das LCs. As formulações vacinais de primeira e terceira gerações são capazes de induzir uma resposta mediada tanto por INF- γ quanto IL-4, enquanto as de segunda geração são caracterizadas pelo aumento da produção de INF- γ e NO. Nestas situações, há aumento na capacidade de resposta imune celular e na produção de anticorpos. Ressalta-se que antígenos vacinais disponíveis não são capazes de desencadear uma resposta satisfatória mediada por linfócitos T CD4⁺ de memória. Pode-se concluir que as imunoglobulinas e as citocinas podem ser utilizadas como marcadores das LCs e do efeito vacinal, contudo seu uso na clínica deve ser resguardado.

Palavras-chave: leishmanioses canina; biomarcadores; vacinas.

ABSTRACT: It was aimed to review the main scientific work, discussing the participation of immunoglobulins and cytokines detected in canine leishmaniosis (CLs) and in the vaccination of healthy dogs. In the leishmaniosis the protective immune response is regulated by Th1 and Th17 cells, being INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 and TGF- β , the cytokines features, with a consequent increase in the production of IgG2. Moreover, the immune response mediated by Th2 and Treg presents pattern associated of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and IL-10, which inhibit Th1 response, increasing the production of IgG1, IgA and IgE and development of severe symptomatic disease. The antibody profile associated with the production of IgG1 and IgG2 is still conflict among researchers. As such, the interpretation of immunoglobulins can not function as marker, either in the diagnosis whether the treatment of sick animals. Vaccination has emerged as a new control strategy of CLs. The vaccine formulations of the first and third generations are capable of inducing a response mediated both for IFN- γ as IL-4, while the second generation are characterized by the increased production of IFN- γ and NO. In these situations, there is an increase in the capacity of cellular immune response and the production of antibodies. It is highlighted that available vaccine antigens are not able to trigger a satisfactory response mediated by memory TCD4⁺ lymphocytes. It can be concluded that the immunoglobulins and cytokines can be used as markers of CLs, and the effect of vaccination, however, its clinical use must be preserved.

Keywords: canine leishmaniosis; biomarkers; vaccines.

*Autor para correspondência. Email: jose.carneiro@uece.br

INTRODUÇÃO

Muitos avanços têm sido relatados no entendimento da resposta promovida pelo sistema imunológico a infecções causadas por parasitos intracelulares. Dentre estes, *Leishmania* vem sendo nosso objeto de estudo nos últimos anos, principalmente na infecção natural em cães. As leishmanioses, tanto humana (LH) como canina (LC), são assuntos de extrema relevância na comunidade científica e representam sérios problemas de saúde pública.

As leishmanioses são um complexo de doenças crônicas causadas por protozoários da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*. Dependendo da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro mamífero a doença pode se apresentar, no Novo Mundo, como: cutânea, causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. amazonenses*, e *L. guyanensis*; doença mucocutânea, causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*; e a doença visceral, causada por *L. infantum*. Os cães domésticos estão implicados na manutenção da cadeia epidemiológica da doença, pois circulam entre as áreas domiciliares. Nesse contexto, é que as leishmanioses vêm sendo consideradas importantes zoonoses (Brasil, 2006; Brasil, 2007).

No Brasil, estudos conduzidos em São Paulo (Ikeda et al., 2003) e Belo Horizonte (Coura-Vital et al., 2011b) demonstraram que a prevalência da leishmaniose visceral (LV) varia de 20% a 40% da população canina. Entretanto, o número de casos, em áreas endêmicas, pode alcançar níveis mais elevados, como foi observado em Fortaleza (Freitas et al., 2010).

Desde a década de 50, período em que foram registrados e estudados os primeiros surtos epidêmicos humanos das leishmanioses, as estratégias de prevenção e controle utilizadas se baseiam no combate ao inseto vetor, no tratamento de casos humanos e no sacrifício de cães soropositivos (Tesh, 1995). A vacinação da população canina vem surgindo como uma medida alternativa, devido à resistência adquirida pelo parasito ao tratamento terapêutico e a toxicidade das drogas utilizadas para o tratamento, além do impacto social causado pelo sacrifício de cães soropositivos (Tesh, 1995; Fujiwara et al., 2005; Dantas-Torres, 2006; Araújo et al., 2011).

LCs são clinicamente caracterizadas por vários sinais clínicos, como: onicogribose, hepatoesplenomegalia, lesões de pele, perda

acentuada de peso, febre, dentre outros; sendo, em sua maioria, associados à produção de mediadores inflamatórios e ao acúmulo de imunoglobulinas (Ig) (Brachelente et al., 2005; Barbieri, 2006; Cardoso et al., 2007; Reis et al., 2006; Freitas et al., 2012a, b).

Por décadas, os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* vem sendo utilizados como ferramentas para o diagnóstico sorológico. Dentre as principais técnicas utilizadas podemos destacar a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA e suas variações) e a Técnica de Aglutinação Direta (DAT) (Brasil, 2006). RIFI é o método sorológico indicado pela OMS para inquéritos sorológicos, entretanto é capaz de diferenciar as formas visceral e tegumentar (Brasil, 2006). Já o teste ELISA vem sendo bastante utilizado. Bio-Manguinhos desenvolveu um ensaio imunoenzimático que apresenta sensibilidade e especificidade elevadas (72% e 87,5%, respectivamente) para o diagnóstico da forma visceral da LC (Lira et al., 2006). Testes rápidos também vêm sendo utilizados para a triagem de cães com bons resultados, destacando-se os imunocromatográficos (Maia et al., 2012).

Trabalhos realizados por diversos pesquisadores mostram que a presença de anticorpos IgG1 e IgG2 está relacionada com a progressão da doença (Solano-Gallego et al., 2001; Quinnell et al., 2003a; Reis et al., 2006; Teixeira-Neto et al., 2010; Zanini et al., 2010). Entretanto, a participação diferenciada de cada imunoglobulina, em relação ao curso clínico, durante o processo infeccioso, ainda não está claramente elucidada.

Neste sentido, buscamos alguns trabalhos relacionados à temática, inclusive realizados no Brasil, comentando a importância das classes e subclasses das imunoglobulinas e das citocinas detectadas nas formas tegumentar e visceral da LC, em animais naturalmente e experimentalmente infectados.

ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA À *Leishmania spp.*

A resposta imune a *Leishmania spp* compreende mecanismos envolvidos na imunidade inata e na imunidade adquirida.

A infecção natural se inicia quando formas promastigotas são inoculadas na pele de humanos, caninos e outros hospedeiros mamíferos, pela picada de insetos

flebotomíneos. A sobrevivência do parasito parece estar relacionada aos mecanismos de evasão, que resistem à destruição pelas células presentes ou recrutadas para o local da infecção (Gueirard et al., 2008).

Estudos demonstraram que a entrada da *Leishmania spp* dentro de macrófagos também ocorre através de neutrófilos que foram recrutados como uma resposta normal à picada do inseto. Neste sentido, o neutrófilo vem sendo apontado como um importante responsável pela progressão da infecção por *Leishmania spp*, pois a hipótese “Cavalo de Tróia” foi levantada, propondo que os neutrófilos infectados auxiliam na entrada “silenciosa” dos parasitos nos macrófagos, suas células hospedeiras definitivas (van Zandbergen et al., 2004; van Zandbergen et al., 2006; Jochim & Teixeira, 2009). A migração do neutrófilo para o foco infeccioso está associada à interleucina 8 (IL-8) liberada no local, a qual funciona como um fator quimiotático específico para neutrófilos e pertence à família das quimiocinas CXC (Yoshimura et al., 1987). Esta citocina é produzida por uma variedade de células, como monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células epiteliais em resposta a diferentes citocinas, IL-1- α , IL-1- β , IL-17 e TNF- α (Coelho et al., 2005).

Macrófagos podem agir como células hospedeiras na multiplicação do parasito e apresentadoras de antígenos, além de produtoras de citocinas (IL-1, TNF- α , IL-12) que medeiam a ativação de células T e, consequentemente, delas próprias, pela ação de INF- γ , produzidas pelas próprias células T ativadas, tornando-se efetoras na morte do parasito (Zer et al., 2001). A interação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) com Toll-Like Receptors (TLRs) 2 e 4 dos macrófagos desencadeará a ativação de fatores de transcrição (NF- κ B e NF-AT) (Trinchieri & Sher, 2007), que estão envolvidos na ativação de genes que codificam para citocinas proinflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-12, quimiocinas, e o óxido nítrico (Gazzinelli & Denkers, 2006; Santos et al., 2011), produzidas localmente e envolvidas na ativação de células endoteliais e o recrutamento de neutrófilos.

Mastócitos, células sentinelas encontradas nos tecidos, podem ser ativados por *Leishmania*, demonstrando extensiva degranulação, tanto em casos de resistência como de suscetibilidade à infecção (Maurer et al., 2006). Independente da produção de mediadores inflamatórios e citocinas, os mastócitos têm uma importante participação na imunidade inata e adquirida

(Bradding & Holgate, 1999; Romão et al., 2009), contudo, essa participação na infecção por *Leishmania spp* permanece incerta. Estudos já demonstraram que os mastócitos influenciam na suscetibilidade à forma tegumentar da doença, direta ou indiretamente, através do aumento da produção de IL-4, IL-13, IL-10 e histamina (Saha et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Romão et al., 2009). Outros trabalhos demonstram que os mastócitos participam diretamente na resposta protetora à infecção por *Leishmania major* (Maurer et al., 2006). Um dos meios se dá através da maturação das células dendríticas e subsequente ativação dos linfócitos Th1 (Dudek et al., 2011).

A diferenciação em subpopulações de células T está relacionada a três fatores: as citocinas presentes no ambiente da estimulação, o tipo de célula apresentadora de antígeno e a natureza e quantidade do antígeno (Hailu et al., 2005).

ESTUDO DAS CITOCINAS NAS FORMAS TEGUMENTAR E VISCERAL DA LEISHMANIOSE

Células infectadas por parasitos intracelulares, como nas leishmanioses, liberam IL-12, que ativam a diferenciação de linfócitos T helper (Th). As células Th compreendem duas populações T CD4+ e T CD8+. As células T CD4+ auxiliares podem se diferenciar em subpopulações de células efetoras, que produzem distintos padrões de citocinas e são denominadas de Th0, Th1, Th2, Th3, Th9, Th17 e T regulatórias (Treg). INF- γ , IL-2 e TNF- α as citocinas características de Th1, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 as citocinas de Th2, IL-10 caracteriza a resposta de Treg e IL-17, IL-21, IL-22, IL-6 e TGF- β formam o perfil da resposta de Th17 (Belkaid et al., 2002; Barbieri, 2006; Korn et al., 2009). Contudo, o papel das células Th0, Th3 e Th9 nas LCs ainda deverá ser esclarecido.

Nas leishmanioses, as subpopulações de células T são apresentadas através de um paradigma de cura-doença, pela relação Th1/Th2 (Alexander e Bryson, 2005). IL-12, oriunda de macrófagos infectados, é capaz de induzir células Th1, indicando que essa citocina tem participação no processo de resistência à infecção causada por parasitos intracelulares, com conseqüente aumento da produção de INF- γ (Santos-Gomes et al., 2002; Menezes-Souza et al., 2011). Neste contexto, Th1 estimula a resposta imune celular ativando os fagócitos, células NK e linfócitos T citotóxicos na tentativa de eliminar o parasito. INF- γ , IL-2 e TNF- α , oriundos de Th1,

estimulam os linfócitos B a secretarem IgG (Alexander & Bryson, 2005; Barbieri, 2006; Alves et al., 2009). Por outro lado, Th2 estimula a produção de anticorpos IgE e IgA e subclasses de IgG, estimulando resposta inflamatória mediada por eosinófilos, basófilos e mastócitos (Kawakami & Galli, 2002; Hailu et al., 2005; Yoshimoto et al., 2009).

O INF- γ secretado pelas células Th1 promove a diferenciação de Th1 e inibe a proliferação das células Th2, com posterior ativação de linfócitos B e produção de IgG2 (Barbieri, 2006). De outro modo, a IL-4 produzida pelas células Th2 promove a diferenciação das próprias células Th2 e, juntamente com IL-10, inibe a ativação das células Th1, aumentando a produção de IgG1, IgA e IgE (Belkaid et al., 2002). As células Th17 têm uma importante função na eliminação de patógenos durante as reações de defesa do hospedeiro, através da modulação de IL-10 e na potencialização da produção de NO, e na indução da resposta inflamatória tecidual (Korn et al., 2009; Nascimento, 2012; Katara et al., 2012). O INF- γ também pode agir sobre os linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos), ativando-o e, conseqüentemente, incrementando sua atividade citotóxica no processo inflamatório (Barbieri, 2006).

Estudos atribuem que a cura das formas tegumentar e visceral da leishmaniose depende de uma batalha constante entre o sistema imune do hospedeiro e os mecanismos de evasão do parasito, onde a resposta mediada por Th1, com expressão de INF- γ , aumenta a imunidade mediada por células resultando no controle da infecção e a resistência a co-infecção (Quinnell et al., 2003b; Brachelente et al., 2005; Barnes et al., 2006). Contudo, a resposta mediada por Th2 desenvolve uma resposta predominantemente humoral com exacerbação dos sinais clínicos da infecção, associada a uma produção de IL-4 que suprime a resposta de Th1 (Brachelente et al., 2005; Barbieri, 2006). Além disso, estudos sugerem a participação de IL-10, citocina secretada por linfócitos B e Treg, que inibe a resposta de Th1 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) e favorece a resposta de Th2, com conseqüente ativação de linfócitos B (LB) e produção exacerbada de imunoglobulinas, principalmente IgG, IgA e IgE. A produção aumentada de IgE desencadeia a ativação de células, como os mastócitos, com conseqüente liberação de histamina e mediadores inflamatórios, resultando na amplificação do processo inflamatório e o aparecimento de alterações teciduais características (Lage et al., 2007; Anderson et al., 2007; Alves et al., 2009; Menezes-souza et al., 2011).

Portanto, o perfil de citocinas caracteriza a resposta imunológica ao parasito, bem como pode ser analisado como marcador da evolução clínica da doença (Cardoso et al., 2007).

ESTUDO DAS IMUNOGLOBULINAS NAS FORMAS TEGUMENTAR E VISCERAL DA LEISHMANIOSE

Há mais de um século, Behring e Kitasato (1890) descobriram e classificaram os anticorpos como componentes séricos capazes de transferir imunidade específica a outros animais. Seus genes codificadores são ativados exclusivamente nos linfócitos B (Rajewsky, 1996) e sua ação está envolvida na resposta imunológica a parasitos, além de contribuir na patogênese de doenças auto-imunes (Manz et al., 2005).

Apesar da importância do efeito protetor da resposta imune mediada por Th1 ainda não ser bem esclarecido, sabe-se que o aparecimento dos sinais clínicos característicos das formas tegumentar e visceral da LC está associado com o desenvolvimento da imunidade humoral mediada por anticorpos (Reis et al., 2006; Zanini et al., 2010). Esse fato fica bem claro no modelo de infecção experimental em camundongos por *L. major*, onde os animais suscetíveis apresentavam, predominantemente, uma resposta imune humoral mediada por IgG1 e IgE, em contraste aos animais resistentes que possuem resposta imune predominante de IgG2 (Sakai et al., 2000). Resultados semelhantes foram obtidos por Coura-Vital et al. (2011a), estudando cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sendo observados níveis aumentados de IgG2 em animais assintomáticos e positivos pela sorologia e diagnóstico molecular. Por outro lado, em estudos realizados por Solano-Gallego et al. (2001), Almeida et al. (2005), Reis et al. (2006), Iniesta et al. (2007) e Teixeira-Neto et al. (2010), foram obtidos resultados contrários, enquanto os cães sintomáticos demonstraram níveis elevados de anticorpos IgG2 anti-*Leishmania*, os assintomáticos apresentaram títulos de IgG1 mais altos, em comparação a IgG2. Em estudo realizado com animais naturalmente infectados, ficou demonstrada a presença de títulos elevados de IgG2, IgE e IgA anti-*Leishmania* e que os níveis séricos de IgG2 anti-*Leishmania* estão correlacionados com os sinais clínicos típicos da doença. IgE não apresentou correlação com o aparecimento de sinais clínicos característicos, em cães naturalmente infectados por *L. infantum* (Freitas et al., 2012b). Esse achado difere do observado por

Reis et al. (2006). Portanto, fica demonstrada a necessidade de estudos mais aprofundados, com atenção toda especial para os animais assintomáticos, para que se chegue a um consenso da participação dessas classes de imunoglobulinas (Zanini et al., 2010).

Altos níveis de anticorpos específicos são observados em cães naturalmente infectados, com a forma visceral da doença e em outras formas severas, demonstrando também evidências de que o acúmulo de anticorpos tem correlação com a patologia (Nylén & Gautam, 2010).

Mesmo que de forma indireta, as subclasses de IgG antígeno-específica respondem como uma medida de controle natural na regulação das células Th, sendo então muito utilizadas nas pesquisas experimentais (Day, 2007). Diferentemente ocorre nos humanos infectados, onde essas ativações ainda são pouco claras e dependem da forma clínica da doença. Por exemplo, nos casos de leishmaniose cutânea localizada há a associação com o perfil de IgG1, IgG2 e IgG3, sugerindo a predominância da resposta de Th1, já no caso da leishmaniose cutânea difusa, a resposta predominante é de IgG4, IgG1 e IgG2, com resposta predominante de Th2 (Rodriguez et al., 1996).

Apesar da relação observada entre as subclasses de IgG e a regulação de Th1 e Th2 observada em murinos, poucos estudos foram desenvolvidos na infecção canina com o objetivo de determinar a associação das subclasses com o aparecimento da sintomatologia e a evolução da doença. Além disso, pouco se sabe sobre a atuação e diferenciação dessas mesmas subclasses de imunoglobulinas na avaliação das terapias anti-*Leishmania*is. Portanto, pode-se perceber que apesar dos estudos sobre, principalmente, a participação da IgG e suas subclasses na doença humana, ainda não existe consenso no que se refere a sua participação específica nas LCs (Day, 2007).

Células B e imunoglobulinas, até bem pouco tempo, eram consideradas não possuir uma importância muito grande na imunidade protetora contra as diversas espécies de *Leishmania*. E isso se deve ao fato de que os anticorpos não são efetivos na eliminação do parasito quando o mesmo se localiza no interior do vacúolo parasitóforo (Nylén & Gautam, 2010).

A resposta imune mediada por Th2, já característica da leishmaniose humana, é

representada pela diminuição da síntese de INF- γ com estimulação de células T específicas ao antígeno leishmanial, aumento da expressão de IL-4 e IL-10 e da produção de anticorpo IgE específico ao antígeno, na forma canina (Quinnell et al., 2001). Em humanos, essa produção exagerada dos títulos de anticorpos IgE pode ser controlada, após o tratamento terapêutico de rotina (Anam et al., 1999).

A associação entre os sinais clínicos da doença e a produção de IgE pode direcionar a resposta imune nos cães sintomáticos infectados por *Leishmania infantum* (Almeida et al., 2005). No mesmo estudo, foi observado que em 43% dos animais sintomáticos, que viviam em áreas endêmicas, estavam sendo produzidos altos títulos de IgE específicos para antígenos da forma promastigota, e que em 33% dos cães assintomáticos, oriundos das mesmas áreas endêmicas, também haviam a produção de altos títulos de IgE, o que poderá representar uma possível evolução clínica desses cães, estando esse anticorpo associado ao desenvolvimento de casos sintomáticos. Também foi interessante observar nessa pesquisa que a IgE obtida dos cães sadios não apresentavam os mesmos padrões imunológicos das obtidas dos cães sintomáticos.

Esse conhecimento ainda incompleto da resposta imune nas LCs dá suporte a novos estudos sobre a produção de anticorpos IgE anti-*Leishmania* em cães infectados, visto que esse anticorpo é considerado um marcador sorológico da resposta imune mediada por Th2 em diferentes infecções parasitárias, havendo uma relação de causa e efeito entre a sua produção e a resistência parasitária, entretanto esta hipótese foi desafiada, chegando a conclusão de que a IgE parasito-específica não é essencial para a proteção em diferentes infecções parasitárias (Zhao et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a resposta de IgE age somente de forma indireta com o aumento do aparecimento de lesões características de respostas inflamatórias, que são bem comuns na infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, aumento da produção de muco e aumento da contração entérica, sinais esses que são inespecíficos entre patologias parasitárias (Hammerberg, 2009).

Células Th2 também podem promover a produção de IgA nas mucosas, mesmo assim, essa reação ainda é pouco estudada no modelo de infecção por *Leishmania spp* (Peters et al., 2004; Day, 2007). Elevados níveis séricos de IgA foram determinados em cães sintomáticos e apresentavam correlação positiva com o

aparecimento de sinais clínicos característicos da forma visceral da doença canina (Reis et al., 2006). Posteriormente, em estudo semelhante, também foram detectados elevados níveis séricos de IgA em animais assintomáticos (Coura-Vital et al., 2011).

No que se refere à participação de anticorpos IgM nas LCs, pouco ainda se sabe, pois devido as suas características, os mesmos são facilmente inativados por reagentes utilizados nas principais técnicas utilizadas para avaliação sorológica, dentre elas o Teste de Aglutinação Direta (DAT) (Schallig et al., 2002). Apesar do exposto, foi relatado que o perfil de IgM apresentou-se elevado em animais infectados por *L. infantum*, contudo sem associação com o aparecimento dos sinais clínicos, mas correlacionado com a densidade parasitária no baço, pele, fígado e medula óssea (Reis et al., 2006). Dados esses que foram confirmados por Coura-Vital et al., 2011.

Desta forma, ao contrário do que foi exposto por diversos pesquisadores, Cardoso et al., 2007 observou que a avaliação dos títulos de imunoglobulinas, principalmente na relação IgG1/IgG2, poderia ser utilizado como marcador para suscetibilidade e evolução clínica da doença.

ANTÍGENOS VACINAIS: CITOCINAS E IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS

A primeira vacina contra as leishmanioses foi desenvolvida pelo Professor Saull Adler, da Universidade Hebraica de Jerusalém, que havia observado que mães da região do Líbano, expunham os seus filhos à picada de insetos flebotomíneos, pois elas intuitivamente sabiam que o desenvolvimento de uma única lesão, com auto-cura, seria capaz de protegê-los da manifestação da forma mais grave da doença no futuro.

A eutanásia de cães soropositivos é apontada como a principal estratégia de controle para a leishmaniose visceral canina, entretanto, a mesma não é bem aceita pela população humana, principalmente pelos proprietários e criadores de cães (Dantas-Torres, 2006). Além disso, outras estratégias, como o tratamento dos cães doentes, ainda não alcançaram resultados satisfatórios (Noli & Auxilia, 2005). Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina protetora contra as LCs é uma ferramenta promissora para a prevenção da doença (Dantas-Torres, 2006), contudo o papel das diferentes classes e subclasses das imunoglobulinas como

marcadores do efeito vacinal ainda não é completamente entendido. Sendo assim, buscamos abordar a produção de citocinas e imunoglobulinas, bem como a consequente ativação de células da resposta imunológica, pelas diferentes formulações vacinais.

As vacinas de 1ª geração apresentam formulações que incluem extratos brutos de parasitos *Leishmania* vivos ou mortos; as de 2ª geração apresentam antígenos purificados de *Leishmania* ou bactérias recombinantes vivas expressando antígenos *Leishmania*. Já as vacinas de 3ª geração são elaboradas com antígeno clonado em um vetor contendo um promotor eucariótico (Palatnik de Sousa, 2008).

As vacinas de 1ª geração são capazes de induzir uma resposta mista dos padrões de citocinas, com aumento nos níveis de INF- γ e IL-4. As vacinas de 2ª geração induzem uma resposta imunológica característica, com aumento nos níveis de INF- γ e NO. Vale ressaltar que as vacinas de 1ª e 2ª gerações estimulam a fagocitose e a ativação de células T CD8+ e são capazes de desencadear resposta imune protetora, quando os animais são desafiados experimentalmente com diversas espécies do parasito *Leishmania*, causadores das formas tegumentar e visceral da infecção (Mayrink et al., 2002; Araújo et al., 2011).

O uso de vacinas de 3ª geração, em camundongos experimentalmente infectados por *L. infantum*, apresentou aumento considerável de INF- γ , mas sem conferir proteção, podendo ser justificado também pelo aumento das concentrações de IL-4 (Marques da Silva et al., 2005).

Alguns autores relatam a predominância de IgG2 em cães vacinados com antígenos vacinais recombinantes (Rafati et al., 2005; Fujiwara et al., 2005) ou purificados (Santos et al., 2007) (vacinas de 2ª e 3ª gerações) e desafiados com *L. donovani* e *L. infantum*; já as investigações que associam IgG2 a sintomatologia utilizaram cães vacinados com antígenos brutos de formas promastigotas (vacinas de 1ª geração) (Fernandez-Perez et al., 2003; Rafati et al., 2005; Reis et al., 2006; Reis et al., 2010).

Mesmo com a existência de diversas formulações vacinais contra LCs, seu uso ainda gera muita desconfiança na população, haja vista que a resposta imune protetora desenvolvida ainda é discutível e não tem acarretado segurança aos proprietários e criadores de cães e aos Médicos Veterinários. Além disso, estudos recentes vêm demonstrando

que os compostos vacinais, disponíveis para utilização até o momento, são capazes de gerarem uma resposta imune protetora, com a ativação de linfócitos T CD4⁺ efetores, contudo ainda não são capazes de produzir uma resposta satisfatória de linfócitos T CD4⁺ de memória, dessa forma, não conferindo uma resposta duradoura (Tabbara et al., 2005; Marcondes et al., 2011; Kroeger et al., 2012). Esse fato pode estar diretamente relacionado à participação das proteínas salivares do inseto vetor e a ativação dos neutrófilos (Peters et al., 2008; Peters & Sacks, 2009; Collin et al., 2009).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do exposto, pode-se concluir que a interpretação do perfil das classes de IgG, IgM e IgA, em relação aos sinais clínicos, ainda não nos fornece resultados confiáveis, principalmente em relação a eficácia do tratamento de cães doentes, devido a grande variabilidade de sinais e o grande número de casos assintomáticos. Da mesma forma ocorre com relação à avaliação do efeito vacinal em cães, onde uma das razões seria a baixa especificidade dos conjugados de anticorpos usados nos estudos e o pouco conhecimento sobre a ação de cada imunoglobulina na infecção causada por *Leishmania spp.* Entretanto, a relação do aparecimento de sinais clínicos com a resposta imune mediada por Th2, com aumento da produção de IL-4, deve ser considerada, pois esta citocina contribui significativamente para uma resposta imune humoral exacerbada. Já os altos títulos de anticorpos IgE nos cães sintomáticos, suportam a associação dos mesmos com a aparecimento dos sinais clínicos característicos da infecção. Visto que a ausência de IgE nos cães assintomáticos e soropositivos para anticorpos IgG, pode ser uma demonstração de uma resposta imune mediada por Th1, com aumento da produção de INF- γ e ativação de fagócitos, com aumento na produção de NO.

Portanto, nesta revisão, podemos considerar que estudos futuros em LCs devam ser realizados, em animais experimentalmente ou naturalmente infectados, abordando o entendimento da ação das imunoglobulinas como marcadores na evolução clínica da doença e no efeito vacinal, ressaltando-se o papel das citocinas liberadas pelas diferentes subpopulações celulares.

REFERÊNCIAS

- Alexander J. & Bryson K. 2005. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Letters*. 99: 17–23.
- Almeida M.A.O., Jesus E.E.V., Sousa-Atta M.L.B., Alves L.C., Berne M.E.A. & Atta A.M. 2005. Anti*Leishmanial* antibody profile in dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 106: 151–158.
- Alves C.F., Amorim I.F.G., Moura E.P., Ribeiro R.R. Alves C.F., Michalick M.S., Kalapothakis E., Bruna-Romero O., Tafuri W.L., Teixeira M.M. & Melo M.N. 2009. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 128: 349-358.
- Anam K., Afrin F., Banerjee D., Pramanik N., Guha S.K., Goswami R.P., Saha S.K. & Ali N. 1999. Differential decline in *Leishmania* membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect Immun*. 67: 6663–6669.
- Anderson C.F., Oukka M., Kuchroo V.J. & Sacks D. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 204: 285–297.
- Araújo M.S.S., Andrade R.A., Sathler-Avelar R., Magalhães C.P., Carvalho A.T., Andrade M.C., Campolina S.S., Mello M.N., Vianna L.R., Mayrink W., Reis A.B., Malaquias L.C.C., Rocha L.M. & Martins-Filho O.A. 2011. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 141: 64–75.
- Barbiéri C.L. 2006. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 28: 329–337.
- Barnes A., Quinnell R.J., Short A.D., Kennedy L.J., Courtenay O., Soremekun S., Dye C., Garcez L.M., Reithinger R., Davies C., Shaw M.A. & Ollier W.E.R. 2006. Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog. *Proceedings of european veterinary immunology, Workshop*, Paris.

- Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M. & Sacks D.L. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420: 502–507.
- Brachelente C., Müller N., Doherr M.G., Sattler U. & Welle M. 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol*. 42: 166–175.
- Bradding P. & Holgate S.T. 1999. Immunopathology and human mast cell cytokines. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 31: 119–133.
- Brasil M.S. 2006. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. 1ª ed. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 120 p.
- Brasil M.S. 2007. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ª ed. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 180 p.
- Cardoso L., Schallig H.D.F.H., Cordeiro-da-Silva A., Cabral M., Alunda J.M. & Rodrigues M. 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 117: 35–41.
- Coelho A.L., Hogaboam C.M. & Kunkel S.L. 2005. Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine & Growth Factor Rev*. 16: 553–560.
- Collin N., Gomes R., Teixeira C., Cheng L., Laughinghouse A., Ward J.M., Elnaïem D.E., Fischer L., Valenzuela J.G. & Kamhawi S. 2009. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathogens*. 5: e1000441.
- Coura-Vital W., Marques M.J., Giunchetti R.C., Teixeira-Carvalho A., Moreira N.D., Vitoriano-Souza J., Vieira P.M., Carneiro C.M., Corrêa-Oliveira R., Martins-Filho O.A., Carneiro M. & Reis A.B. 2011a. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *Vet J*. 190: e43–e 47.
- Coura-Vital W., Marques M.J., Veloso V.M., Roatt B.M., Aguiar-Soares R.D.D.O., Reis L.E.S., Braga S.L., Morais M.H.F., Reis A.B. & Carneiro M. 2011b. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS NTD*. 5: e1291.
- Dantas-Torres F. 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol*. 141: 1–8.
- Day M.J. 2007. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol*. 147: 2–8.
- Dudeck A. & Suender C. 2011. Mast cells promote Th1 and Th17 responses by modulating dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*. 41: 1883–1893.
- Fernández-Pérez F.J., Gómez-Muñoz M.T., Méndez S. & Alunda J.M. 2003. *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop*. 86: 83–91.
- Freitas J.C.C., Nunes-Pinheiro D.C.S. & Abreu C.R.A. 2010. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania* sp infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. *Acta Sci Vet*. 38: 293–297.
- Freitas J.C.C., Nunes-Pinheiro D.C.S., Lopes-Neto B.E., Santos G.J.L., Abreu C.R.A., Braga R.R., Campos R.M. & Oliveira L.F.O. 2012a. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 45: 24–29.
- Freitas J.C.C., Lopes-Neto B.E., Abreu C.R.A., Coura-Vital W., Braga S.L., Reis A.B. & Nunes-Pinheiro D.C.S. 2012b. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*. 93: 705–709.

- Fujiwara R.T., Vale A.M., França-Silva J.C., Costa R.T., Quetz J.S., Martins-Filho O.A., Reis A.B., Oliveira R.C., Machado-Coelho G.L., Bueno L.L., Bethony J.M., Frank G., Nascimento E., Genaro O., Mayrink W., Reed S. & Campos-Neto A. 2005. Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmSTII) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 36: 827–838.
- Gazzinelli R.T. & Denkers E.Y. 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptors signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Rev Immunol.* 6: 895-906.
- Gueirard P., Laplante A., Rondeau C., Milon G. & Desjardins M. 2008. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol.* 10: 100–111.
- Hailu A., Baarle D., Knol G.J., Berhe N., Miedema F. & Kager P.A. 2005. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol.* 117: 182–191.
- Hammerberg B. 2009. Canine immunoglobulin E. *Vet Immunol Immunopathol.* 132: 7–12.
- Ikeda F.A., Luvizotto M.C.R., Gonçalves M.E., Feitosa M.M., Ciarlini P.C. & Lima V.M.F. 2003. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba, São Paulo (Brasil): um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clin Vet.* 47: 42-48.
- Iniesta L., Gállego M. & Portús M. 2007. Idiotype expression of IgG1 and IgG2 in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 119: 189–197.
- Jochim R.C. & Teixeira C. 2009. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 25: 145–147.
- Katara G.K., Ansari N.A., Singh A., Ramesh V. & Salotra P. 2012. Evidence for involvement of Th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL). *PLoS NTD.* 6: e1703.
- Kawakami T. & Galli S.J. 2002. Regulation of mast cell and basophil function and survival by IgE. *Nature Rev Immunol.* 2: 773-786.
- Korn T., Bettelli E., Oukka M. & Kuchroo V.K. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Ann Rev Immunol.* 27: 485–517.
- Kroeger D.R., Rudulier C.D., Peters N.C. & Bretscher P.A. 2012. Direct demonstration of CD4 T cell cooperation in the primary in vivo generation of CD4 effector T cells. *Int Immunol.* 24: 519–527.
- Lage R.S., Oliveira G.C., Busek S.U., Guerra L.L., Giunchetti R.C., Corrêa-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.
- Lira R. A., Paiva-Cavalcanti M., Nakazawa M., Ferreria A.G.P., Silva E.D. & Gomes Y.M. 2006. Canine visceral *Leishmaniasis*: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Vet Parasitol.* 137: 11-16.
- Maia Z., Lirio M., Mistro S., Mendes C.M.C., Mehta S.R. & Badaró R. 2012. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. *Plos NTD.* 6: e1484.
- Manz R.A., Hauser A.E., Hiepe F. & Radbruch A. 2005. Maintenance of serum antibody levels. *Ann Rev Immunol.* 23: 367-386.
- Marcondes M., Ikeda F.A., Vieira R.F.C., Day M.J., Lima V.M.F., Rossi C.N., Perri S.H.V. & Biondo A.W. 2011. Temporal IgG subclasses response in dogs following vaccination against *Leishmania* with Leishmune®. *Vet Parasitol.* 181: 153-159.
- Marques-da-Silva E. A., Coelho E.A.F., Gomes D.C.O., Vilela M.C., Masioli C.Z., Tavares C.A.P., Fernandes A.P., Afonso L.C.C. & Rezende S.A. 2005. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. *Parasitol Res.* 98: 67–74.
- Maurer M., Lopez-Kostka S., Siebenhaar F., Moelle K., Metz M. & Knop J. 2006. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J.* 20: 2460-2467.

- Mayrink W., Santos G.C., Toledo V., Guimaraes T.M., Machado-Coelho G.L., Genaro O. & da Costa C.A. 2002. Vaccination of C57BL/10 mice against cutaneous leishmaniasis using killed promastigotes of different strains and species of *Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 35: 125–132.
- Menezes-Souza D., Corrêa-Oliveira R., Guerra-Sá R., Giunchetti R.C., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A., Oliveira G.C. & Reis A.B. 2011. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet Parasitol*. 177: 39–49.
- Nascimento M.S.L. 2012. Papel de linfócitos Th17 durante a infecção experimental por *Leishmania infantum/chagasi*. *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil. 119p.
- Noli C. & Auxilia S.T. 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*. 16: 213–232.
- Nylén S. & Gautam S. 2010. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Global Infect Dis*. 2: 135-146.
- Oliveira M.P., Lima M.C.R., Calheiros A.S., Martins M.A., Antas P.R.Z. & de Luca P.M. 2005. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. *Exp Parasitol*. 109: 72–79.
- Palatnik-de-Sousa C.B. 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine*. 26: 1709–1724.
- Peters I.R., Helps C.R., Calvert E.L., Hall E.J. & Day M.J. 2004. Identification of four allelic variants of the dog IGHA gene. *Immunogenetics*. 56: 254–260.
- Peters N.C., Egen J.G., Secundino N., Debrabant A., Kimblin N., Kanhawi S., Lawyer P., Fay M.P., Germain R.N. & Sacks D. 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*. 321: 970-974.
- Peters N.C. & Sacks D.L. 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*. 11: 1290-1296.
- Quinnell R.J., Courtenay O. & Shaw M.A. 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 183: 1421–1424.
- Quinnell R.J., Courtenay O., Garcez L.M., Kaye P.M., Shaw M.A., Dye C. & Day M.J. 2003a. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 91: 161–168.
- Quinnell R.J., Kennedy L.J., Barnes A., Courtenay O., Dye C., Garcez L.M., Shaw M.A., Carter S.D., Thomson W. & Ollier W.E.R. 2003b. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*. 55: 23–28.
- Rafati S., Nakhaee A., Taheri T., Taslimi Y., Darabi H., Eravani D., Sanos S., Kaye P., Taghikhani M., Jamshidi S. & Rad M.A. 2005. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*. 23: 3716–3725.
- Rajewsky K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 381: 751–758.
- Reis A.B., Teixeira-Carvalho A., Vale A.M., Marques M.J., Giunchetti R.C., Mayrink W., Guerra L.L., Andrade R.A., Corrêa-Oliveira R. & Martins-Filho O.A. 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 112: 102–116.
- Reis A.B., Giunchetti R.C., Carrillo E., Martins-Filho O.A. & Moreno J. 2010. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 26: 341–349.
- Rodriguez V., Centeno M. & Ulrich M. 1996. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol*. 18: 341–345.
- Romão P.R.T., Costa-Santiago H., Ramos C.D.L., Oliveira C.F.E., Monteiro M.C. & Queiroz-Cunha F. 2009. Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania major*. *Parasite Immunol*. 31: 140–146.

- Saha B., Tonkal A.M.D.J., Croft S. & Roy S. 2004. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 137: 19–23.
- Sakai T., Hisaeda H., Nakano Y., Ishikawa H., Maekawa Y., Ishii K., Nitta Y., Miyazaki J. & Himeno K. 2000. Gene gun-mediated delivery of an interleukin-12 expression plasmid protects against infections with the intracellular protozoan parasites *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* in mice. *Immunol.* 99: 615–624.
- Santos F.N., Borja-Cabrera G.P., Miyashiro L.M., Grechi J., Reis A.B., Moreira M.A.B., Martins Filho O.A., Luvizotto M.C.R., Menz I., Pessôa L.M., Gonçalves P.R., Palatnik M. & Palatnik-de-Sousa C.B. 2007. Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine.* 25: 6176–6190.
- Santos F.R., Vieira P.M.A., Correa-Oliveira R., Giunchetti R.C., Carneiro C.M., Reis A.B. & Malaquias L.C.C. 2011. Qualitative and quantitative immunohistochemical evaluation of iNOS expression in the spleen of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Parasitol Res.* 108: 1397–1403.
- Santos-Gomes G.M., Rosa R., Leandro C., Cortes S., Romão P. & Silveira H. 2002. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 88: 21–30.
- Schallig H.D.F.H., Schoone G.J., Beijer E.G.M., Kroon C.C.M., Hommers M., Ozbek Y., Ozensoy S., Silva E.S., Cardoso L.M. & Silva E.D. 2002. Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol.* 109: 1–8.
- Solano-Gallego L., Riera C., Roura X., Iniesta L., Gallego M., Valladares J.E., Fisa R., Castillejo S., Alberola J., Ferrer L., Arboix M. & Portús M. 2001. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol.* 96: 265–276.
- Tabbara K.S., Peters N.C., Afrin F., Bertholet S., Belkaid Y., David L., Mendez S. & Sacks D.L. 2005. Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infect Immun.* 73: 4714–4722.
- Tesh R.B. 1995. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg.* 52: 287–292.
- Teixeira Neto R.G., Giunchetti R.C., Carneiro C.M., Vitor R.W.D.A., Coura-Vital W., Quaresma P.F., Ker H.G., Melo L.A., Gontijo C.M.F. & Reis A.B. 2010. Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 169: 248–257.
- Trinchieri G. & Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Rev Immunol.* 7: 179–190.
- van Zandbergen G., Klinger M., Müller A., Gebert A., Solbach W. & Laskay T. 2004. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521–6525.
- van Zandbergen G., Bollinger A., Wenzel A., Kamhawi S., Voll R., Klinger M., Müller A., Hölscher C., Herrmann M., Sacks D., Solbach W. & Laskay T. 2006. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Nat Acad Sci USA.* 103: 13837–13842.
- Yoshimoto T., Yasuda K., Tanaka H., Nakahira M., Imai Y., Fujimori Y. & Nakanishi K. 2009. Basophils contribute to Th2-IgE response in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nature Immunol.* 10: 706–712.
- Yoshimura T., Matsushima K., Tanaka S., Robinson E.A., Appella E. & Oppenheim J.J. 1987. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Nat Acad Sci USA.* 84: 9233–9237.
- Zanini M.S., Viana K.F., Reis A.B., Campos D.R., Mussi J.M.S., Zanini S. & Lemos E.M. 2010. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: immunoblotting analysis for the detection of IgG subclasses in the diagnosis of symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Parasitol.* 173: 143–146.

Zer R., Yaroslavski I., Rosen L. & Warburg A. 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol.* 31: 810–814.

Zhao A., Urban J.F., Anthony R.M., Sun R., Stiltz J., Rooijen N., Wynn T.A., Gause W.C. & Shea-Donohue T. 2008. Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterol.* 135: 217–225.