

La Dra. **Olga Francino i Martí**, investigadora del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

i

la Dra. **Laura Altet Sanahujes**, investigadora del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que l'**Elisenda Sánchez i Robert** ha realitzat sota la seva direcció el treball de recerca  
ESTUDI DE LA RESISTÈNCIA I LA SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA A LA  
LEISHMANIOSI CANINA.

Aquest treball s'ha dut a terme al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la  
Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 11 de febrer de 2008

Dra. Olga Francino i Martí

Dra. Laura Altet i Sanahujes



Al llarg d'aquests anys sou moltes les persones que m'heu brindat la vostra ajuda i sou vosaltres família, amics, companys de feina, coneguts...a qui us vull donar les gràcies

Gràcies a tothom!

*Fa una nit clara i tranquil·la,  
hi ha la lluna que fa llum.  
Els convidats van arribant i  
van omplint tota la casa  
de colors i de perfums [...]*

*Ara ja no hi falta ningú,  
o potser sí, ja me n'adono que tan sols  
hi faltes tú  
També pots venir si vols.  
T'esperem, hi ha lloc per tots.  
El temps no compta ni l'espai ...*

*Qualsevol nit pot sortir el sol.*

*(Jaume Sisa, 1975)*



## ABREVIATURES

CVL	<i>Canine Visceral Leishmaniasis</i>
DLA	<i>Dog Leucocyte Antigen complex</i>
ESE	<i>Exonic Splicing Enhancer</i>
ESS	<i>Exonic Splicing Silencer</i>
Grup H	<i>Gossos (A, B, E, F), elevat n° paràsits i símptomes</i>
Grup L	<i>Gossos (C, D), baix o nul n° paràsits no símptomes</i>
GWS	<i>Genome-Wide Scan</i>
HW	<i>Equilibri Hardy-Weinberg</i>
IC	<i>Interval de Confiança</i>
Indel	<i>Inserció-Deleció</i>
ISE	<i>Intronic Splicing Enhancer</i>
ISS	<i>Intronic Splicing Silencer</i>
MHC	<i>Complex Principal d'Histocompatibilitat</i>
Nramp1	<i>Natural resistance associated macrophage protein 1</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
Pi	<i>Postinfecció</i>
Slc11a1	<i>Solute Carrier Family 11a Member 1</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Tc	<i>Limfòcits T citotòxics</i>
Th	<i>Limfòcits T col·laboradors</i>
Tn	<i>Limfòcit T CD4<sup>+</sup> naive</i>
Treg	<i>Limfòcits T reguladors</i>
VDR	<i>Vitamin D Receptor</i>



---

<b>1. Introducció</b>	
1.1. Diferents aproximacions per estudiar la base molecular de caràcters complexos: anàlisi de tot el genoma (GWS: <i>Genome-wide scan</i> ) i gens candidats	1
1.2. Anàlisi funcional dels SNPs	4
1.3. Per què la leishmaniosi?	7
1.4. Breu descripció de la leishmaniosi	10
1.5. Resposta immunitària enfront la leishmaniosi	11
1.5.1 Resposta immunitària en el gos	15
1.6. Estudis epidemiològics en el gos	16
1.7. Base genètica de la resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi	17
1.8. El gen <i>Slc11a1</i> ( <i>Nramp1</i> )	18
1.9. El gen <i>Slc11a1</i> com a candidat a la resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi	23
1.10. Altres possibles gens candidats de resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi	24
<b>2. Objectius</b>	31
<b>3. Articles i treballs</b>	
- Polymorphism of <i>Slc11a1</i> ( <i>Nramp1</i> ) gene and canine visceral leishmaniasis in a case-control study	35
- <i>Slc11a1</i> (formerly <i>Nramp1</i> ) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis	49
- Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog	77

- Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in <i>Leishmania infantum</i> experimentally infected dogs	97
<b>4. Discussió</b>	
<b>4.1. Gens candidats</b>	131
<b>4.1.1. El gen <i>Slc11a1</i> (<i>Nramp1</i>): polimorfismes associats a susceptibilitat a la leishmaniosi canina</b>	131
<b>4.1.2. Altres gens candidats per a la leishmaniosi canina</b>	139
<b>4.1.3. Caracterització genètica de la raça Podenc Eivissenc</b>	143
<b>4.2. Citocines: anàlisi de l'expressió gènica en gossos d'infecció experimental</b>	145
<b>4.2.1. Variabilitat en l'expressió de les citocines durant la preinfecció i la postinfecció</b>	146
<b>4.2.2. Perfil de l'expressió gènica anterior a la detecció del paràsit en sang</b>	147
<b>4.2.3. Perfil de l'expressió gènica posterior a la detecció del paràsit en sang</b>	152
<b>5. Conclusions</b>	157
<b>6. Resum</b>	161
<b>7. Resumen</b>	165
<b>8. Summary</b>	169
<b>9. Bibliografia</b>	173
<b>10. Annex</b>	
<b>Annex 1: Taula comparativa dels polimorfismes significatius pels gens MHC-II, <i>Slc11a1</i>, IL-6 i <i>VDR</i></b>	195



**Annex 2:** A long term experimental study of canine visceral  
leishmaniasis

197



## *Introducció*

---



Actualment es coneixen més de 400 races de gossos. Totes elles són producte de dos colls d'ampolla: el primer associat a la domesticació a partir del llop i el segon com a resultat de la intensa i constant selecció en què ha estat sotmès el gos per tal de mantenir els estàndards de raça (ex. mida, morfologia, color de la capa i comportament) (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). El manteniment dels trets fenotípics uniformes, el que col·loquialment coneixem com a estàndard racial, normalment és resultat d'un elevat grau de consanguinitat. Aquesta elevada consanguinitat té conseqüències negatives com l'augment de les malalties autosòmiques recessives o l'alteració del sistema immunitari, que es reflexa amb l'augment d'immunodeficiències, malalties autoimmunitàries o susceptibilitat a malalties infeccioses o càncer, malalties moltes d'elles equivalents a malalties humanes. De fet, en gos s'han descrit més de 300 malalties genètiques que també trobem en humans, que inclouen càncer, diabetis, al·lèrgies i epilèpsia, a més de malalties coronàries i inflamatòries (Patterson D., 2000; Sargan D., 2004; Sutter i Ostrander, 2004). Si sumem el fet que:

1. el gos comparteix les mateixes malalties que els humans;
2. viuen amb els seus amos i per tant estan exposats als mateixos factors ambientals;
3. amb la seqüenciació del genoma del gos s'ha vist que hi ha poca divergència a nivell genètic respecte l'home i que, per tant, els gens responsables de les malalties i els seus mecanismes de funcionament han de ser similars entre els gossos i els humans;

es pot considerar el gos com un model ideal per estudiar les bases moleculars de malalties comunes entre l'espècie humana i el gos, especialment de malalties complexes.

### **1.1. Diferents aproximacions per estudiar la base molecular de caràcters complexos: anàlisi de tot el genoma (GWS: *Genome-Wide Scan*) i gens candidats**

Per estudiar la base molecular d'un fenotip determinat o un caràcter d'interès, tal com la predisposició a una determinada malaltia, podem utilitzar dues aproximacions: l'anàlisi de tot el genoma (GWS: *Genome-Wide Scan*) i l'estratègia del gen candidat. En ambdós casos utilitzarem marcadors moleculars, ja siguin del tipus microsatèl·lit i/o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Els microsatèl·lits són repeticions en tàndem de 2 a 5

nucleòtids que estan àmpliament distribuïts per tot el genoma i presenten un alt nivell de polimorfisme. Els SNPs són posicions nucleotídiques en les que la substitució d'una base per una altra genera un polimorfisme. Generalment són bial·lèlics, tot i que també poden ser tri·lèlics o tetral·lèlics, però amb una freqüència menor (<http://www.hapmap.org/>).

L'anàlisi de tot el genoma (GWS: *Genome-Wide Scan*) ens permet identificar regions del genoma candidates a estar relacionades amb el caràcter d'interès. A diferència d'altres espècies, en el gos hi ha pocs treballs GWS realitzats amb microsatèl·lits a causa de la ràpida evolució de la informació genètica disponible en aquesta espècie. Fins a principis de la dècada de 1990 no es van identificar els primers marcadors genètics de DNA i fins poc després no es van construir els primers mapes de lligament (Neff *et al.*, 1999) per arribar, en poc temps, a la seqüenciació completa de tot el seu genoma l'any 2005 (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Aquesta seqüenciació ha permès identificar més de 2,5 milions de SNPs distribuïts amb una densitat mitjana aproximada d'1 SNP per cada Kb.

En el cas del gos es requereixen només 10.000 SNPs, uniformement distribuïts al llarg de tot el genoma, per realitzar un estudi GWS. Els grans blocs de desequilibri de lligament que presenta redueixen en un ordre de magnitud el nombre de SNPs necessaris per fer el genotipat de tot el seu genoma respecte l'home (Lindblad-Toh *et al.*, 2005). Tenint en compte que en l'actualitat disposem de plataformes de genotipat d'alt rendiment, com els xips/arrays de SNPs d'Affymetrix o Illumina que ens permeten genotipar de manera eficaç i ràpida milers d'aquests SNPs en un sol xip, qualsevol plantejament d'estudi GWS avui en dia passa per utilitzar tecnologia d'aquest tipus.

Un cop identificades les regions del genoma candidates a estar relacionades amb el caràcter d'interès, el següent pas consisteix en fer un refinament d'aquestes regions per tal de confirmar les associacions trobades (*Fine Mapping*) i poder arribar, en últim terme, al gen causal. Per dur-ho a terme s'utilitza un joc addicional de SNPs per a re-analitzar amb més detall la regió candidata identificada en el GWS. Aquest genotipat es pot fer sobre la mateixa població o sobre una altra població o raça per tal de corroborar els resultats inicials obtinguts.

Fins ara l'estratègia més utilitzada per a estudiar una malaltia complexa en el gos, incloent-hi les malalties infeccioses, ha estat la del gen candidat (Burgner *et al.*, 2006). Un gen es converteix en candidat quan disposem de dades genètiques o biològiques que l'impliquen amb el caràcter que volem estudiar. Així doncs podem tenir:

1. Gens candidats funcionals: quan coneixem la funció biològica del gen i sabem que està relacionada amb el caràcter d'estudi.
2. Gens candidats posicionals: quan estan localitzats en la regió que prèviament hem identificat en un estudi GWS.

En ambdós casos podem utilitzar el mapa comparatiu, és a dir, disposar de la informació d'una altra espècie més estudiada per comparar amb l'espècie que estem interrogant.

Si en el gen candidat escollit disposem de SNPs significativament associats al caràcter d'interès podem utilitzar-los per tal de comprovar que aquesta associació es manté també en la nostra població d'estudi. Si no disposem d'informació prèvia, es recomana el genotipat de 5-50 SNPs del gen a estudi (revisat per Balding, 2006).

Un cop genotipats els individus, tant per GWS com per gen candidat, hem de realitzar l'anàlisi d'associació genètica amb estudis basats en població tipus cas-control o estudis basats en famílies. Els estudis cas-control són considerats els més potents per a detectar variants de risc modest en malalties freqüents (revisat per Healy, 2006). Aquests estudis es basen en trobar diferències en les freqüències dels diferents al·lels entre individus malalts (anomenats casos, i que han estat diagnosticats per la malaltia a estudi) i els individus controls (que poden ser individus no afectats per la malaltia o individus escollits a l'atzar dins la població), assumint que aquestes diferències en les freqüències estan associades a la malaltia. Ara bé, el principal problema d'aquest tipus d'estudi rau en el disseny, ja que un mal disseny pot comportar un elevat nombre d'associacions falses positives i/o la no confirmació d'associacions reals (revisat per Healy 2006). Per aquest motiu hi ha diverses consideracions importants a tenir en compte a l'hora de dissenyar i valorar un estudi d'associació cas-control. Les principals són:

- Ser rigorós en la caracterització del fenotip per tal de minimitzar l'error en el diagnòstic de la malaltia.
- Quant més gran és el nombre de mostres que formen l'estudi més poder estadístic ens dona.

- Vigilar que la població no estigui estratificada, fet que ens donaria una falsa associació.

Els estudis basats en famílies tenen el mateix objectiu, detectar l'al·lel de risc que predisposa a patir una determinada malaltia encara que el que utilitzarem són famílies amb un extens coneixement de la seva genealogia, formades per individus afectats i no afectats per la malaltia a estudi. S'aprofita el fet que l'al·lel de risc serà transmès d'una generació a la següent per tal de dur a terme l'estudi d'associació. El mètode més conegut és el TDT (*Transmission Disequilibrium Test*) tot i que en disposem de molts altres (revisat per Healy, 2006).

## 1.2. Anàlisi funcional de SNPs

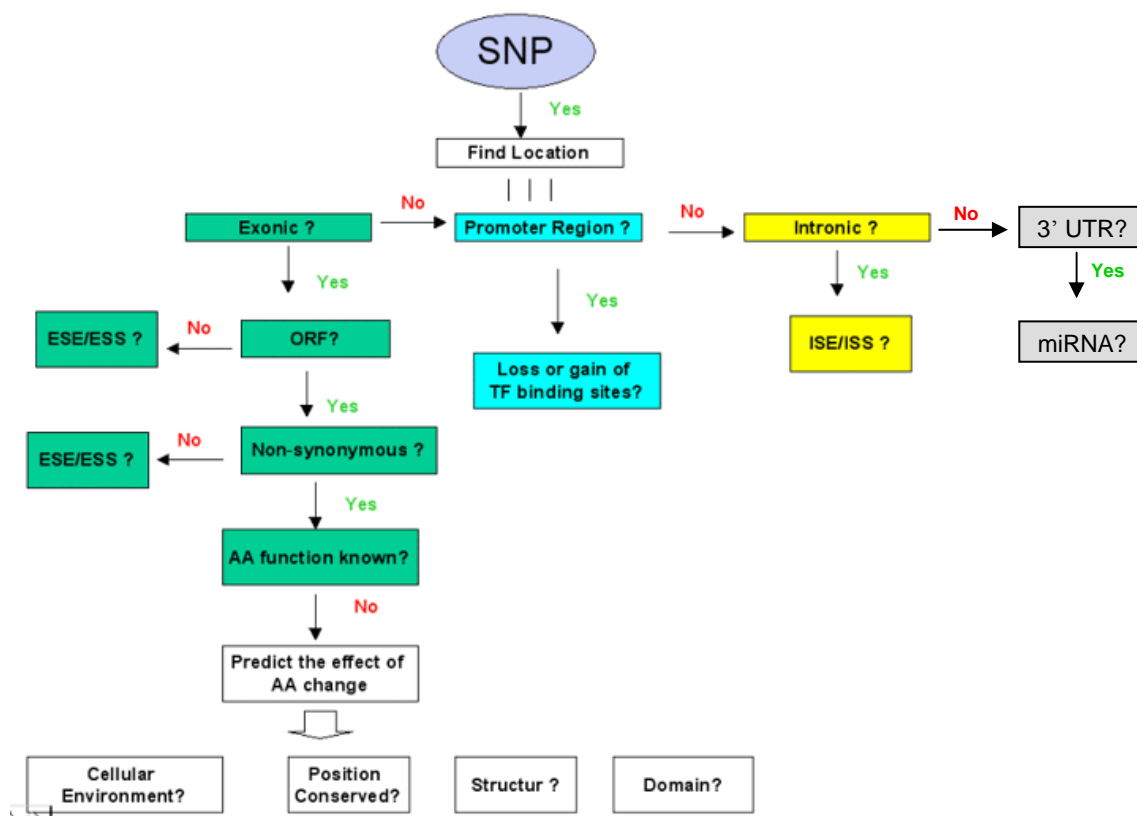
Una vegada identificats els SNPs associats a la malaltia d'estudi cal analitzar si estan actuant de marcadors d'una mutació causal en desequilibri de lligament o si tenen efecte funcional per si mateixos (són la mutació causal).

Clàssicament només es tenien en compte aquelles mutacions no sinònimes que estaven localitzades als exons, esperant en últim terme un canvi o una pèrdua de la funció de la proteïna resultant; o les mutacions de la regió promotora, les quals poden afectar un factor de transcripció i per tant l'expressió del gen (Fig. 1).

Avui en dia, però, amb la seqüenciació del genoma humà, s'ha vist que les regulacions post-transcripcionals generen gran part de la variabilitat existent i que mutacions silencioses són de gran importància en l'alteració dels gens i/o de la proteïna resultant. Ja a principis de la dècada de 1990 se sabia que les molècules que participen en el procés de maduració del pre-mRNA són dianes freqüents de mutacions puntuals en malalties genètiques i en càncer (Krawczak *et al.*, 1992). Així doncs, mutacions silencioses poden afectar elements reguladors com són els ESE/ESS (*Exonic Splicing Enhancer/Exonic Splicing Silencer*), ISE/ISS (*Intronic Splicing Enhancer/Intronic Splicing Silencer*) o llocs d'unió per molècules de miRNA (microRNA).



**Figura 1.** Presa de decisions en l'anàlisi dels SNPs (modificat de *Bioinformatics for Geneticists*, John Wiley & Sons, Ltd., England 2003). ESE (*Exonic Splicing Enhancer*); ESS (*Exonic Splicing Silencer*); ISE (*Intronic Splicing Enhancer*); ISS (*Intronic Splicing Silencer*); miRNA (microRNA).

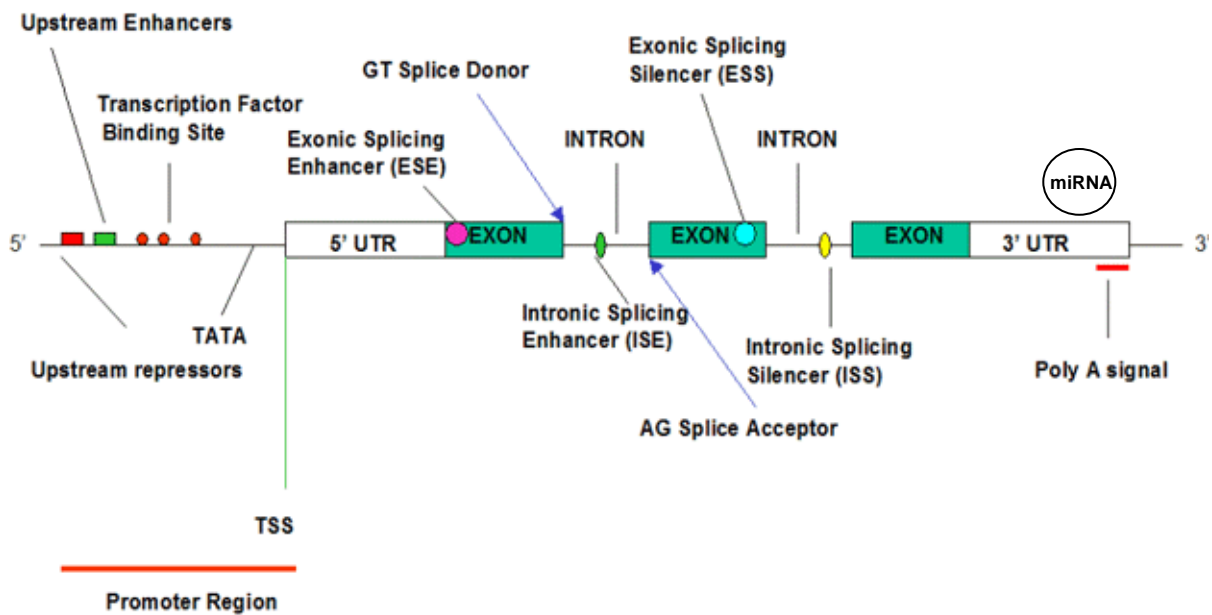


Els elements reguladors que participen en el procés de maduració del pre-mRNA normalment es troben a les proximitats de la unió exó-intró (Fig. 2). Aquests elements reguladors reben el nom de ESE/ESS o ISE/ISS en funció de si són elements potenciadors o supressors del procés de maduració del pre-mRNA i de la seva localització exònica o intrònica (revisat per Cartegni *et al.*, 2002; revisat per Tazi *et al.*, 2005). Tenim exemples de mutacions que afecten aquest lloc de regulació alterant la funció de la proteïna resultant en l'atròfia muscular espinal o el Parkinson (D'Souza *et al.*, 1999; Cartegni i Krainer, 2002).

Els miRNAs són un tipus de RNA no codificant que consta d'uns 22 nucleòtids i que actuen modulant la traducció, ja sigui com a repressors o inductors (Ambros, 2004; Place *et al.*, 2008). En els genomes dels vertebrats s'han predit més de 1000 miRNAs

únics, els quals es creu que poden modular la traducció de com a mínim el 30% dels gens, vist que un mateix miRNA pot actuar sobre diferents dianes (Berezikov *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

**Figura 2.** Estructura del gen i els seus possibles elements de regulació (modificat de <http://www.ncbi.nlm.gov/Class/NAWBIS/Modules/Variation/var1.html>).



A més, dins les mutacions silencioses també hem de tenir en compte aquelles que poden afectar el plegament de la proteïna i la seva funció. Tot i no canviar aminoàcid, el canvi de codons freqüents a codons rars en la composició de la seqüència aminoacídica, és a dir, aquells que s'utilitzen en molt baixa freqüència, pot fer canviar la taxa de traducció del mRNA i per tant, el plegament de la proteïna, alterant la seva funció (Anthony i Skach, 2002). Corroborant aquesta hipòtesi, en humana s'ha demostrat que una mutació silenciosa en el gen *Mdr1* (*Multidrug Resistance 1* gene), el qual codifica per una complexa proteïna de membrana, altera l'especificitat pel substrat (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

### 1.3. Per què la leishmaniosi?

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/es/>), les malalties infeccioses són una de les principals causes de mortalitat, majoritàriament en infants i en la població dels països anomenats del Tercer Món. Les malalties infeccioses més comuns estudiades en l'home són la infecció pel virus VIH (Virus de la Immunodeficiència Humana), les infeccions micobacterianes, la malària i la leishmaniosi, les quals tenen un impacte devastador en la salut global i en el desenvolupament econòmic (revisat per Burgner *et al.*, 2006).

La *Leishmania* és un protozou intracel·lular (ordre dels Kinetoplastida, família Trypanosomatidae) que produeix un ample espectre de malalties en els seus hostes, en funció en gran mesura de l'espècie del paràsit implicada. Es coneixen 20 espècies i subespècies de *Leishmania* causants de la malaltia en humans. Aquestes infeccions poden ser subclíniques o bé produir des de lesions cutànies fins a una infecció sistèmica generalitzada que pot causar la mort de l'individu. És una malaltia endèmica en 88 països (Fig. 3) amb una prevalença de 12 milions de persones i una població de risc de 350 milions segons la OMS. La incidència anual s'estima en 1-1,5 milions de casos per la leishmaniosi cutània i en 500.000 casos per la leishmaniosi visceral. Hem de tenir en compte factors de risc com són la malnutrició i la immunosupressió, causant de l'augment del nombre de casos de coinfecció *Leishmania*-VIH (Alvar *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 2006). Totes aquestes dades, i tenint en compte que actualment encara no existeix una vacuna efectiva contra aquesta infecció, posen de manifest que la leishmaniosi constitueix un important problema per a la salut pública.

Aquest paràsit no només causa infeccions en humans sinó que també en causa en animals salvatges i domèstics com és el cas del gos, fet que permet utilitzar el gos com a model animal per dur a terme l'estudi dels mecanismes pels quals té lloc aquesta infecció. El gos és considerat el principal reservori del paràsit (Bettini i Gradoni, 1986), tot i que els humans i els rosegadors també poden actuar com a reservoris. El vector de transmissió de la *Leishmania* és un mosquit del gènere *Phlebotomus* (Vell món: Europa, Àsia i Àfrica) o *Lutzomyia* (Nou món: continent Americà) (Killick-Kendrick, 1990).

Les principals espècies de *Leishmania* i els vectors de transmissió, així com els hostes que actuen com a reservoris i la seva distribució geogràfica, estan resumits a la Taula 1.

**Taula 1.** Diversitat del paràsit *Leishmania* i de les espècies que actuen com a vectors de transmissió, els hostes que actuen com a reservoris i la seva distribució geogràfica (Peters i Sacks, 2006).

<i>Leishmania sp</i>	Estatus clínic	Reservoris (*)	Vectors transmissió (*)	Distribució geogràfica
<i>L. donovani</i>	VL, PKDL	Humà	<i>P. argentipes</i>	Bangladesh, Nepal, Índia
			<i>P. orientalis</i>	Sudan, Etiòpia
<i>L. infantum</i>	VL	Gos	<i>P. ariasi</i>	Mediterrani oest
			<i>P. perniciosus</i>	
			<i>P. alexandri</i>	Iran, Orient Mitjà
<i>L. major</i>	CL	Rosegadors salvatges i domèstics	<i>P. duboscqi</i>	Sahara, Kenia
			<i>P. papatasi</i>	Nord-àfrica, Orient mitjà
<i>L. tropica</i>	CL, LR	Humà	<i>P. sergenti</i>	Nord-àfrica, Orient mitjà
<i>L. amazonensis</i>	CL, DCL	Reservoris salvatges	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Part Nord Sud-amèrica, Brasil
<i>L. mexicana</i>	CL, DCL	Reservoris salvatges	<i>Lu. (Lu). diabolica</i>	Sud de Texas
<i>L. braziliensis</i>	CL, MCL	Gos, cavall, reservoris salvatges	<i>Lu. carrerai</i>	Conca oest de l'Amazones
			<i>Lu. wellcomei</i>	Est Brasil
<i>L. chagasi</i>	VL, CL	Gos	<i>Lu. longipalpis</i>	Amèrica central, Brasil, Veneçuela

VL, leishmaniosi visceral; PKDL, leishmaniosi cutània post-*kala-azar*; CL, leishmaniosi cutània; LR, leishmaniosi recidivant; DCL, leishmaniosi cutània difosa; MCL, leishmaniosi mucocutània. (\*) confirmats o esperats. P, *Phlebotomus*. Lu, *Lutzomyia*.

Basat en els diferents quadres clínics que es produeixen en la leishmaniosi humana, la leishmaniosi canina es classifica com a visceral, tot i que la simptomatologia en el gos és sistèmica i molt variada. La leishmaniosi visceral canina (CVL) està causada pel paràsit *Leishmania infantum*, el qual forma part del complex *L. donovani* i és endèmica de la conca Mediterrània, l'Orient Mitjà i l'Amèrica del Sud. La prevalença de la infecció en les zones endèmiques pot arribar al 67% mentre que la incidència de la malaltia és del 10% (Solano-Gallego *et al.*, 2001a). Recentment, també s'han descrit casos en zones no endèmiques com Estats Units i Regne Unit, atribuïbles al desplaçament de gossos portadors i al canvi climàtic amb la consegüent expansió del mosquit que actua com a vector de transmissió (Enserink, 2000; Rosypal *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003; Duprey *et al.*, 2006).

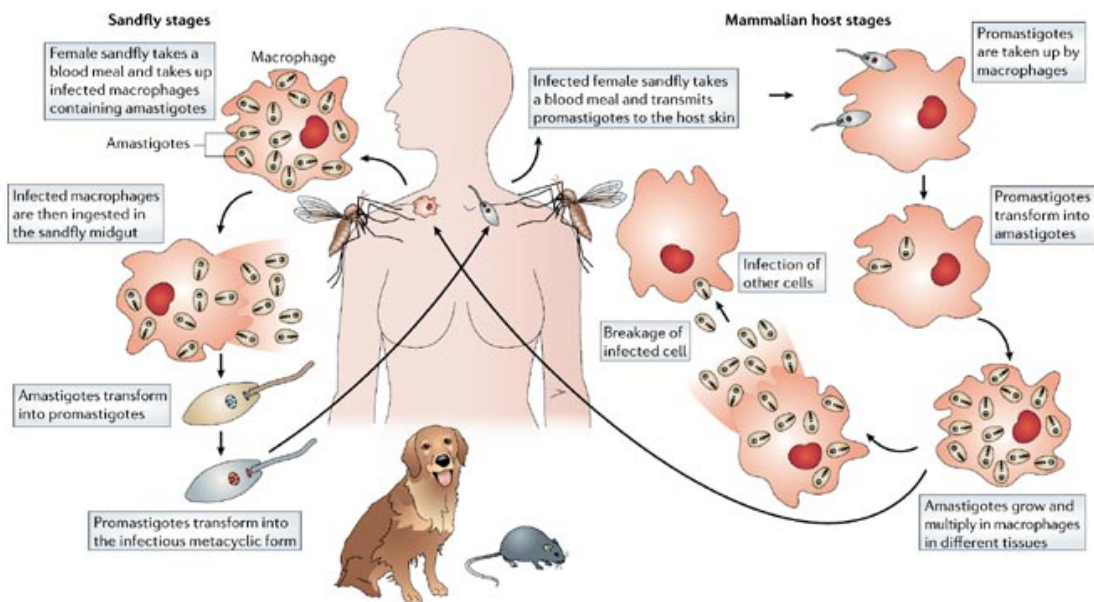
**Figura. 3** Distribució mundial de la leishmaniosi visceral humana (Font: OMS, 2005; [http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)).



### 1.4. Breu descripció de la leishmaniosi

El cicle natural d'infecció comença quan una femella *Phlebotomus* s'alimenta d'un hoste infectat amb *Leishmania* (Fig. 4). Durant la ingesta l'insecte incorpora els amastigots de *Leishmania* (forma intracel·lular no flagel·lada), que tot seguit adopten la forma flagel·lada convertint-se en promastigots. Els promastigots ataquen les parets de l'intestí de l'insecte i allà s'hi multipliquen. Quan la femella *Phlebotomus* es torna a alimentar, els promastigots són injectats a la pell de l'hoste i fagocitats principalment pels macròfags, tot i que també poden infectar cèl·lules dentrítiques i fibroblasts (Rittig i Bogdan, 2000). Una vegada fagocitats, els promastigots perden el seu flagel i es multipliquen com a amastigots. Finalment, el macròfag infectat es trenca alliberant els amastigots, els quals infecten a les cèl·lules sanes propagant la infecció. Com que els macròfags estan presents en tots els teixits corporals, això fa que els paràsits de *Leishmania* puguin generar grans danys per tot l'organisme, causant una malaltia sistèmica (Awasthi *et al.*, 2004).

**Figura 4.** Cicle d'infecció de la *Leishmania* (Lipoldova i Demant, 2006).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
 Nature Reviews | Genetics

Els símptomes clínics en la leishmaniosi canina apareixen dels 3 mesos als 7 anys després de la infecció (Slappendel i Ferrer, 1998) i poden ser molt variats, sent les lesions més freqüents: lesions cutànies (alopècia que s'estén de la pell nasal cap a la orelles), dermatitis exfoliativa, dermatitis nodular, dermatitis ulcerativa generalitzada principalment en les extremitats, pèrdua progressiva de pes, anèmia, epistaxi, hiperqueratosi, poliartritis, letargia, fallida renal, diarrea, lesions oculars i distensió abdominal (Slappendel i Ferrer, 1998).

El fet que la simptomatologia en el gos sigui molt variada dificulta en molts casos el seu diagnòstic. Hi ha diferents metodologies per diagnosticar la leishmaniosi visceral canina (revisat per Reithinger i Dujardin, 2007; Baneth i Aroch, 2008):

- Mètodes parasitològics: consisteixen en fer un examen microscòpic a partir d'una biòpsia de la lesió o d'aspirats de moll d'os, nòdul limfàtic o melsa per a la detecció directe del paràsit.
- Mètodes serològics: consisteixen en detectar anticossos anti-*Leishmania*. Hi ha una variada gama de tests serològics però els més utilitzats són els IFA (assaig d'immunofluorescència indirecte) i l'ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).
- Mètodes moleculars: consisteixen en la detecció del DNA del paràsit mitjançant la tècnica de la PCR (amplificació en cadena de la polimerasa) o bé, en la quantificació de la càrrega parasitària gràcies a la PCR en temps real.

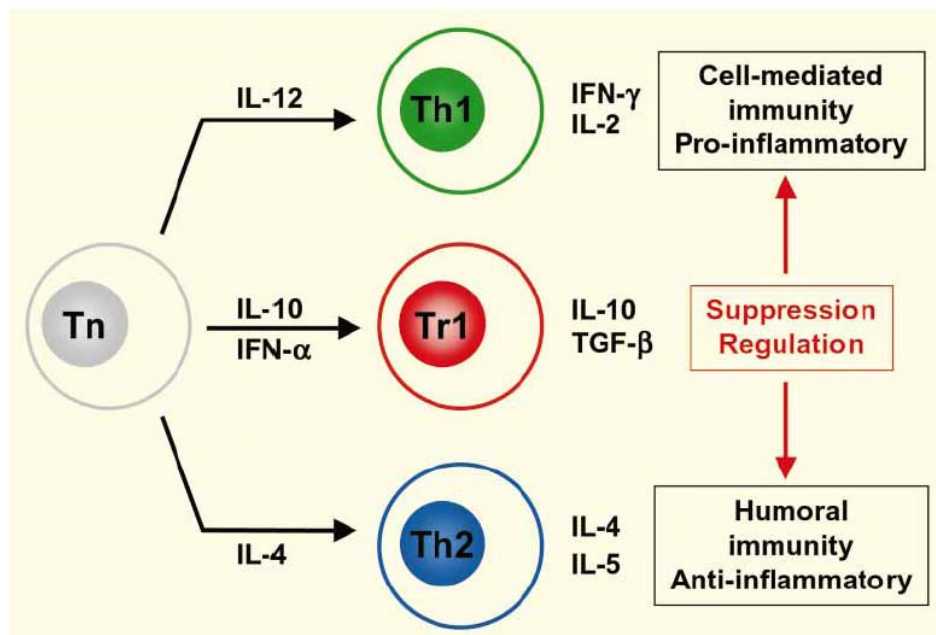
### **1.5. Resposta immunitària enfront la leishmaniosi**

El sistema immunitari és l'encarregat de protegir a l'individu de les agressions provinents del medi ambient exterior o del propi medi intern. Funcionalment, està integrat per dos grans sistemes o mecanismes de defensa: la immunitat natural/innata i la immunitat adquirida.

La primera barrera de defensa que es trobarà un paràsit intracel·lular, tal com la *Leishmania*, és la immunitat natural/innata, mecanisme de defensa inespecífic que en alguns casos el paràsit pot aconseguir evadir, replicant-se a l'interior de la cèl·lula. Arribat aquest moment, el principal mecanisme de defensa enfront un paràsit

intracel·lular és la immunitat adquirida en què els limfòcits T tenen el paper predominant. Els limfòcits T presenten heterogeneïtat funcional i per això parlem de limfòcits T col·laboradors (Th), citotòxics (Tc) i reguladors (Treg). La cèl·lula Tn (limfòcit T CD4<sup>+</sup> *naive*) és un limfòcit pluripotent que en funció de les citocines que l'envolten es pot diferenciar en: Th1, Th2 o Treg (Fig. 5).

**Figura 5.** Diferenciació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> *naive* (Roncarolo *et al.*, 2001).

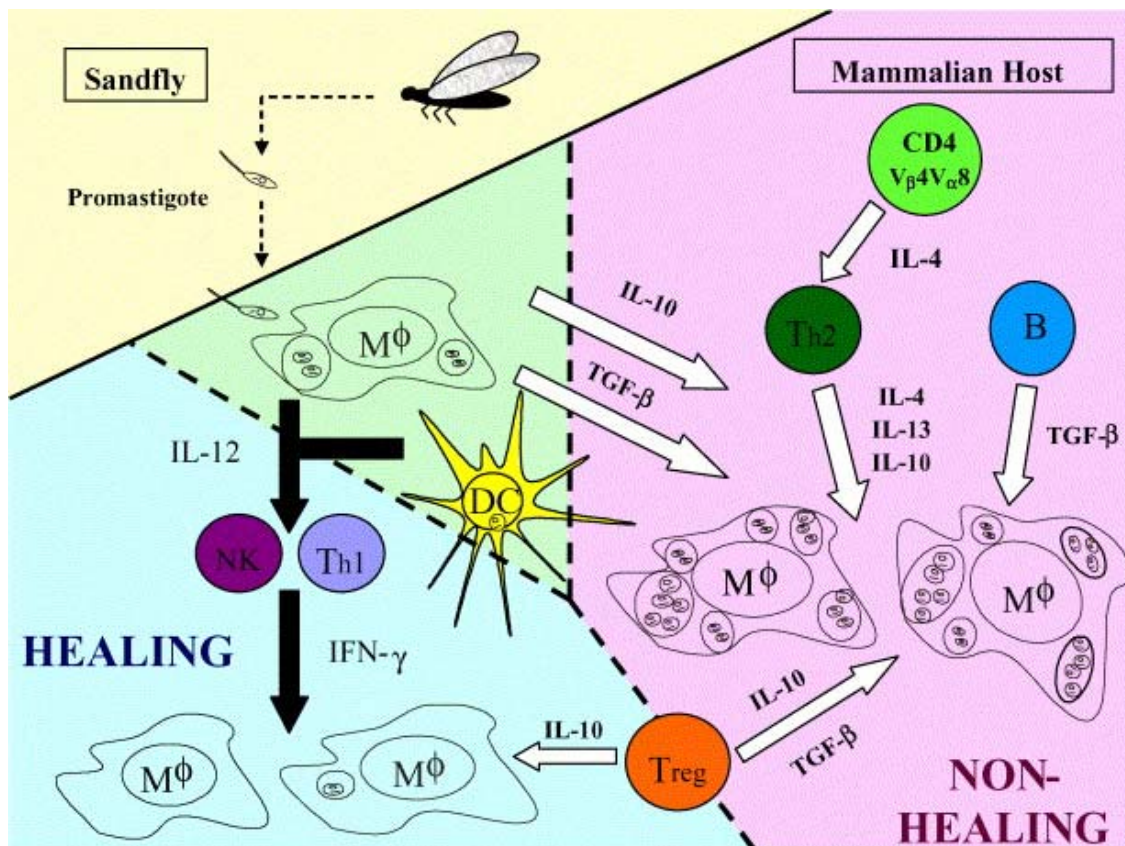


- La IL-12 és la responsable de la diferenciació de les cèl·lules Th1, les quals sintetitzen majoritàriament IFN-γ i IL-2 iniciant una resposta cel·lular amb capacitat proinflamatòria.
- La IL-4 condueix la diferenciació de les cèl·lules Th2, les quals produeixen principalment IL-4 i IL-5 iniciant una resposta humoral.
- La presència de IL-10 i IFN-γ fa que la cèl·lula Tn es diferenciï en Treg de tipus 1 (Tr1), que suprimeix la resposta immunitària via interacció cèl·lula-cèl·lula i/o mitjançant la producció de citocines supressores, IL-10 i TGF- β (Roncarolo *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2006). Mitjançant la síntesi d'aquestes dues citocines, les Tr1 poden regular tant les respostes de tipus Th1 com les Th2.



Diversos estudis realitzats en múrids han demostrat que la resposta protectora contra la infecció per *L. major* té lloc amb la participació de les cèl·lules Th1, la qual es manifesta amb una gran proliferació de limfòcits enfront als antígens de *Leishmania*. Les cèl·lules infectades produeixen IL-12, la qual d'una banda indueix l'activació de les cèl·lules NK i d'altra banda, la diferenciació de les cèl·lules Th1 i la síntesi d'IFN- $\gamma$ . L'activació del macròfag té lloc amb la participació de l'IFN- $\gamma$  i el TNF- $\alpha$ . Un cop activat el macròfag, aquest pot eliminar el paràsit a través de la producció de NO, aconseguint una resposta curativa (Liew *et al.*, 1982; Sheppard *et al.*, 1983; Scott *et al.*, 1989; Liew, 1990; Cox i Liew, 1992). En la següent figura es mostra un model de la resposta immunitària i les citocines que hi intervenen en una infecció causada per *L. major* en un mamífer com a hoste (Alexander i Bryson, 2005) (Fig. 6).

**Figura 6.** *Leishmania major*: respostes immunològiques curació vs no curació (Alexander i Bryson, 2005).



Alternativament, la progressió de la malaltia està associada a una major resposta de limfòcits Th2, els quals produeixen IL-4 i IL-13 que, juntament amb la IL-10, faciliten la replicació del paràsit en l'interior de les cèl·lules infectades i per tant, la no curació (Heinzel *et al.*, 1991; Scott, 1993).

Estudis posteriors realitzats també en ratolí han demostrat que la polarització Th1/Th2 de la resposta immunitària demostrada en *L. major* no és la regla general per a totes les infeccions causades per *Leishmania*. En ratolins infectats amb *L. infantum*, la resposta Th1 queda suprimida per la presència de IL-10 i TGF- $\beta$  (citocines secretades per les Treg) sense que tingui lloc la síntesi de citocines per part de les cèl·lules Th2 (Wilson *et al.*, 2005). Corroborant aquest treball Pinheiro i col·laboradors (2005) van veure que en infectar ratolins amb antígens de *L. amazonensis* es fomentava la susceptibilitat a la infecció a través de la síntesis tant de TGF- $\beta$  com de IL-10, neutralitzant l'efecte protector de la resposta Th1 i agreujant consegüentment la progressió de la malaltia.

Inicialment la IL-10 estava associada a la supressió de les citocines derivades de les cèl·lules Th1, desencadenant el desenvolupament de la resposta tipus Th2 (Mosmann i Moore, 1991) i consegüentment reduint l'activació del macròfag (Bogdan *et al.*, 1991). Actualment sabem que la IL-10 és una citocina supressora de la proliferació de les cèl·lules T, tant les Th1 com les Th2 (Moore *et al.*, 2001), actuant en ambdós sentits, d'una banda facilitant la no-curació de la infecció així com mantenint-la en estat latent.

El TGF- $\beta$  és una citocina amb propietats immunoreguladores amb efectes pleotròpics i que s'ha associat a desordres autoimmunitaris i amb susceptibilitat a infeccions oportunistes (Letterio *et al.*, 1998). Ja en la dècada de 1990 diversos treballs en ratolí van demostrar que el TGF- $\beta$  juga un paper clau en la progressió de la leishmaniosi (Barral-Netto *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1999).

En humans, les cèl·lules Treg també estan involucrades en el control de la infecció tant en la leishmaniosi visceral com en la seva forma cutània, indicant que la dicotomia Th1/Th2 no es compleix de manera universal (Gantt *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2005; Campanelli *et al.*, 2006).

### 1.5.1 Resposta immunitària en el gos

Els primers treballs realitzats en gos van posar de manifest que la resposta protectora contra la leishmaniosi es caracteritzava per una important resposta d'immunitat cel·lular, expressada per una limfoproliferació *in vitro* i una resposta d'hipersensibilitat retardada (DTH: *Delayed-Type Hypersensitivity*) positiva *in vivo*. En canvi, la susceptibilitat a la malaltia estava associada amb una forta resposta humoral, amb una gran producció d'anticossos anti-*Leishmania* i per l'absència d'immunitat cel·lular (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994; Martínez-Moreno *et al.*, 1995; Solano-Gallego *et al.*, 2001b). Aquests resultats han estat corroborats per estudis de tipus longitudinal, tant en gossos d'infecció natural com experimental. En gossos d'infecció natural s'ha observat que la leishmaniosi canina està associada a la presència d'anticossos IgG, els quals estan correlacionats amb els símptomes clínics (Courtenay *et al.*, 2002; Quinnell *et al.*, 2003). En un segon estudi, on el seguiment s'ha realitzat en gossos d'infecció experimental, també s'ha observat que els símptomes clínics estan correlacionats significativament amb la concentració de IgG, IgG1, IgG2, IgA i IgM mesurades *in vivo*, mentre que els nivells de paràsit en sang i la resposta immunitària de tipus cel·lular mesurada *in vitro* estan inversament correlacionades (Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007).

En relació a les citocines que intervenen en la resposta immunitària, trobem diferents estudis realitzats amb PCR que han demostrat que els gossos d'infecció natural que esdevenen malalts es caracteritzen per tenir majoritàriament una resposta Th2, en la que la IL-4 està associada tant a la severitat dels símptomes clínics com a una elevada càrrega parasitària, tant en lesions cutànies com en mostres de moll d'os (Brachelente *et al.*, 2005; Quinnell *et al.*, 2001). Un treball publicat recentment, puntualitza que en melsa aquest augment de IL-4 té lloc durant el primer mes de la infecció experimental (Strauss-Ayali *et al.*, 2007).

Els resultats descrits per la IL-10 i el TGF- $\beta$  són contradictoris. D'una banda, treballs basats en ELISA o PCR amb gossos d'infecció natural relacionen elevats nivells de IL-10 i TGF- $\beta$  amb una elevada càrrega parasitària en melsa, afavorint la progressió de la malaltia (Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007). En canvi, aquesta associació no s'ha trobat en altres treballs, on els nivells de IL-10 en moll d'os en gossos malalts era

comparable al trobat en els gossos control i pel que fa als nivells d'aquestes dues citocines en melsa es mantenen invariables durant el curs de la infecció (Quinnell *et al.*, 2001; Strauss-Ayali *et al.*, 2007).

Els gossos asimptomàtics tenen majoritàriament una resposta immunitària de tipus cel·lular i expressen preferentment citocines derivades de les cèl·lules Th1 com són la IL-2, la IL-12, la IL-18 i l'IFN- $\gamma$ , fet que els hi confereix immunitat respecte el paràsit (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Chamizo *et al.*, 2005; Strauss-Ayali *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2006). A la Taula 2 es presenta un resum del diferent perfil immunològic descrit en el gos enfront la infecció per *Leishmania*.

**Taula 2.** Resposta immunitària en el gos enfront la leishmaniosi.

Protecció	Susceptibilitat
immunitat cel·lular: limfoproliferació <i>in vitro</i> DTH +	immunitat humoral: producció d'anticossos anti- <i>Leishmania</i> IgG, IgG1, IgG2, IgA, IgM Absència d'immunitat cel·lular
Th1: IL-2, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$	Th2: IL-4
Resultats contradictoris IL-10 i TGF- $\beta$	

### 1.6. Estudis epidemiològics en el gos

Estudis epidemiològics han posat de manifest que hi ha una diferent prevalença de la leishmaniosi en funció de la raça de gos. Estudis realitzats en països on la leishmaniosi és endèmica revelen una major prevalença de la infecció en gossos de la raça boxer, pastor alemany i doberman (Abranches *et al.*, 1991; Sideris *et al.*, 1996; Ranque *et al.*, 1997). En l'estudi més extens que s'ha dut a terme fins ara, amb gairebé 34.000 gossos de 18 races diferents a Brasil, s'han trobat que només en dues races la prevalença de la malaltia era considerablement superior a la de la resta de races. Aquestes dues races són cocker i boxer amb una prevalença del 26,9% i 24,6% respectivament, malgrat que cap

d'aquestes dues races són predominants al Brasil (França-Silva *et al.*, 2003). Concretament en la nostra zona, entre els anys 1998-2002, s'ha portat a cap un estudi amb gossos pacients de l'Hospital Clínic Veterinari de la UAB (Miranda *et al.*, 2005), i s'ha posat en relleu que de la població de gossos malalts per leishmaniosi que arribaven a l'hospital les races majoritàries eren pastor alemany, rottweiler i boxer i que l'edat en què un gos es posa malalt de leishmaniosi tenia una distribució bimodal, amb un primer pic que comprèn 2-4 anys i un segon pic als 7 anys, on normalment la leishmaniosi és concomitant amb altres malalties. A més, cal destacar que només en el cas del boxer fins a un 68% dels animals van ser diagnosticats abans dels 4 anys denotant que el boxer presenta una clara predisposició genètica per aquesta malaltia.

En zones no endèmiques de leishmaniosi s'ha descrit una predisposició preferent a la malaltia en gossos de la raça nord-americana foxhound. En un centre privat de cria de gossos de Nova York es van identificar 4 casos de foxhound malalts de leishmaniosi. Per aquest motiu van decidir analitzar tots els gossos que formaven part del centre. El 41% dels foxhound estaven infectats amb *Leishmania* mentre que no es va diagnosticar cap cas en la resta dels gossos d'altres races (beagles i bassets hounds) que conviuen en les mateixes condicions i lloc que els foxhound malalts (Gaskin *et al.*, 2002). Un estudi recent ha corroborat que la leishmaniosi als Estats Units està limitada predominantment a aquesta raça (Duprey *et al.*, 2006).

Però no només s'han identificat races predisposades sinó que també s'ha descrit una raça que presenta una major resistència a la infecció per *Leishmania*. Sembla ser que el podenc eivissenc és més resistent a la leishmaniosi que la resta de races gràcies a la significativa resposta cel·lular que és capaç de generar enfront el paràsit (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

### **1.7. Base genètica de la resistència o susceptibilitat a la leishmaniosi**

A final de la dècada de 1970, utilitzant el ratolí com a model d'experimentació per a l'estudi de la leishmaniosi, es va observar que en realitzar una infecció experimental s'obtenia un creixement diferencial del paràsit en funció de la línia de ratolí utilitzada tot i que els paràmetres com la dosi d'infecció, el tipus de soca utilitzada i les

condicions ambientals estaven perfectament controlats. Quedava així establerta la certesa d'un component genètic en el control de la resposta de l'hoste (Bradley, 1977). En aquest mateix treball es definien dues fases en el curs de la malaltia controlades per diferents gens.

La primera fase estava sota el control de la immunitat natural o innata, incloïa les quatre primeres setmanes de la infecció i la multiplicació del paràsit. Realitzant diferents encreuaments i retroencreuaments entre les línies de ratolins de diferent resposta a la infecció per *Leishmania* es va determinar que aquesta resposta innata estava sota el control d'un sol gen autosòmic anomenat *Bcg/Ity/Lsh*, que va ser localitzat al cromosoma 1 del ratolí (Bradley *et al.*, 1979) i que controlava la replicació de microorganismes intracel·lulars taxonòmicament i antigènicament diferents com la *Leishmania*, els micobacteris i la *Samonella* (Plant *et al.*, 1982; Skamene *et al.*, 1982).

En la segona fase de la infecció s'observà com línies de ratolí considerades com a susceptibles per a la primera fase evolucionaven de manera diferent. Mentre que les unes es curaven de forma espontània, les altres seguien un curs fatal de la malaltia. Aquesta segona fase de resposta a la malaltia a llarg termini estava sota el control de la immunitat específica o adquirida, que pot estar influenciada per diferents gens com són el complex principal d'histocompatibilitat (MHC) de classe I i II, la IL-4, la IL-13 o l'IFN- $\gamma$  (revisat en Burgner *et al.*, 2006).

### **1.8. El gen *Slc11a1* (*Nramp1*)**

A principis de la dècada de 1990, Vidal i col·laboradors van identificar, en les proximitats del locus *Ity/Lsh/Bcg*, un gen que s'expressava únicament en macròfags (Vidal *et al.*, 1993). El van anomenar *Nramp1* (*Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*), tot i que actualment es coneix amb el nom de *Slc11a1* (*Solute Carrier Family 11a Member 1*).

L'anàlisi de la seqüència del gen *Slc11a1* va revelar que un canvi no conservatiu (Gly169 per Asp169) en el domini transmembrana 4 estava associat a la susceptibilitat a la infecció en línies consanguínies de ratolí (Malo *et al.*, 1994). La certesa d'una

associació al·lèlica entre el locus *Ity/Lsh/Bcg* i el gen *Slc11a1* s'establí amb ratolins modificats genèticament, que contenien al·lels nuls per al gen *Slc11a1* (Vidal *et al.*, 1995; 1996) i quedà confirmada definitivament mitjançant la realització d'animals transgènics (Govoni *et al.*, 1996). Tot transferint una còpia de l'al·lel *Slc11a1*<sup>Gly169</sup> a un animal *Slc11a1*<sup>Asp169</sup> aquest esdevenia resistent a la infecció per a qualsevol dels tres microorganismes intracel·lulars que controla el locus *Ity/Lsh/Bcg*.

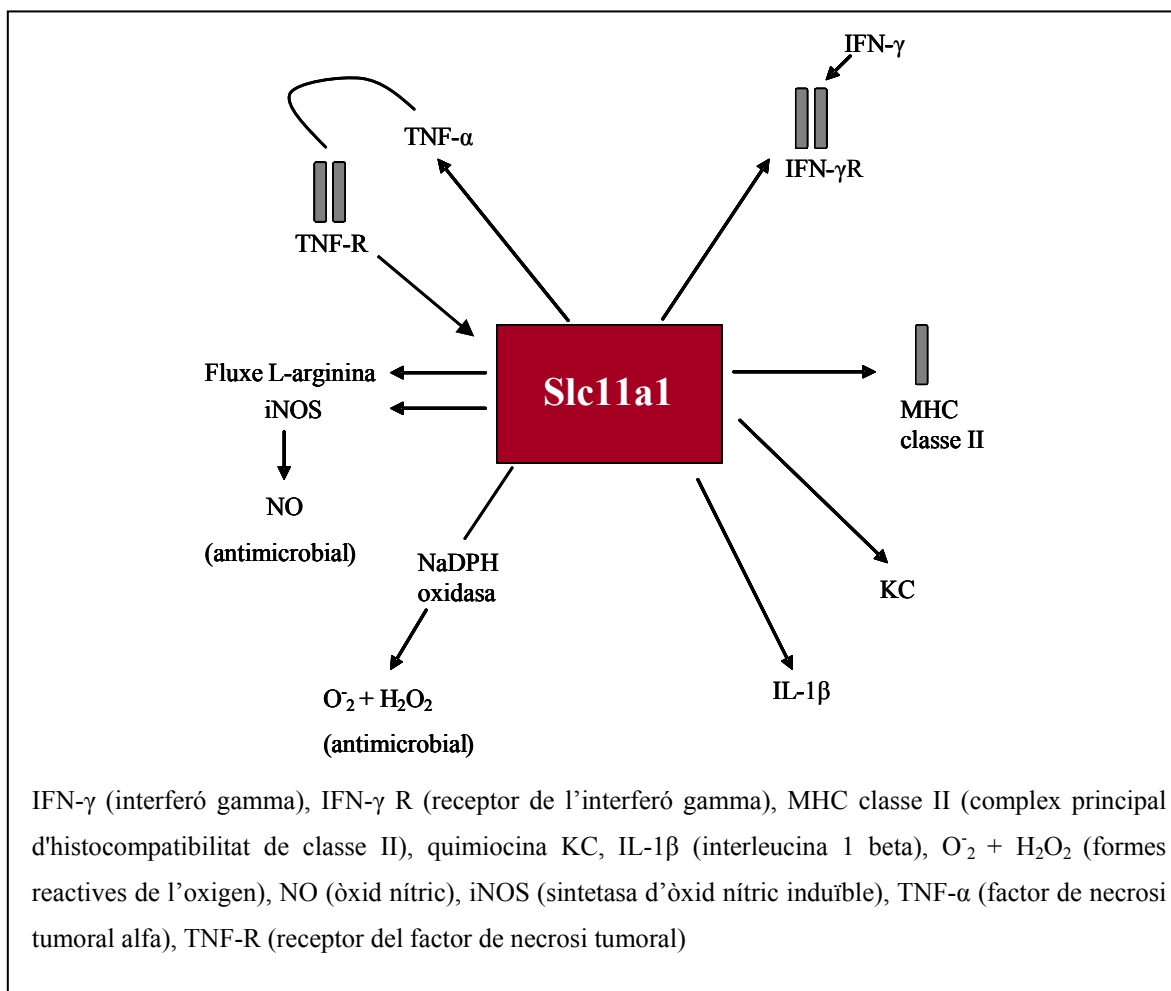
En el gos, el gen *Slc11a1* està posicionat en el cromosoma 37 i està format per 15 exons que s'estenen un total de 9 Kb (Altet *et al.*, 2002). El gen codifica per una proteïna de 547 aminoàcids que presenta una identitat de fins al 87% amb les proteïnes SLC11A1 descrites en les diferents espècies de mamífers, tot conservant els motius estructurals. El residu Gly169 està conservat en el gos.

La proteïna SLC11A1 està localitzada dins el macròfag en les membranes dels darrers endosomes i lisosomes (Atkinson *et al.*, 1997; Gruenheid *et al.*, 1997). Actua com a un transportador de membrana bombejant cations de metalls divalents ( $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ ) del citoplasma a l'interior del fagosoma i viceversa, en funció del pH que hi hagi a banda i banda de la membrana (Forbes i Gros, 2001; Goswami *et al.*, 2001; Mackenzie i Hediger, 2004).

A part de la funció principal de transport, el gen *Slc11a1* té activitat microbicides dins del macròfag a causa de la toxicitat dels radicals hidroxils generats a partir dels ions de ferro en la reacció de Fenton (Zwilling *et al.*, 1999; Blackwell *et al.*, 2003). A més, la gran quantitat de funcions cel·lulars que requereixen d'ions divalents com a cofactors podria explicar els múltiples efectes pleotròpics que s'han atribuït a aquest gen, que intervé (Fig. 7):

- En la regulació de l'activació del macròfag
- En la regulació de la producció de citocines: quimiocina KC, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$
- En la regulació de l'expressió de iNOS
- En el control del fluxe de L-arginina
- En l'alliberació de NO
- En el control de l'expressió dels gens MHC-II

**Figura 7.** Múltiples efectes pleotròpics de la proteïna SLC11A1 en la regulació de l'activació del macròfag en ratolí (modificat de Blackwell, 1996).



Totes aquestes accions, implicades en el control de la infecció de microorganismes intracel·lulars taxonòmicament tan diferents, són el motiu pel qual el gen *Slc11a1* ha estat intensament estudiat en diverses malalties infeccioses de gran impacte en la salut pública mundial com són la tuberculosi, la lepra, la meningitis, la leishmaniosi o la SIDA (Síndrome d'immunodeficiència adquirida) (Taula 3).



**Taula 3.** Treballs d'anàlisi de lligament o d'associació amb significació positiva entre el gen *SLC11A1* i malalties infeccioses (*Leishmania*, micobacteris i VIH) (modificat de Burgner et al., 2006).

<i>SLC11A1</i> ( <i>NRAMP1</i> )	Població	Fenotip	Tamany mostral	Resultats	Referència
<b>Leishmaniosi</b>					
GTn	Sudanesa	Leishmaniosi visceral	37 famílies (172 ind)	LOD = 1,32; p = 0,007	Bucheton et al., 2003
469+14G/C	Sudanesa	Leishmaniosi visceral	59 famílies (312 ind)	$\chi^2 = 9,03$ ; p = 0,0027	Mohamed et al., 2004
GTn	Sudanesa	Leishmaniosi visceral	37 famílies (172 ind)	LOD = 1,32; p = 0,007	El-Safie et al., 2006
<b>Malalties Micobacterials</b>					
regió	Brasilera	PTB	37 pedigris (287 Ind)	LOD = 0,51; p = 0,025	Shaw et al., 1997
regió	Sud Asiàtica	Lepra <i>per se</i>	20 pedigris (168 Ind)	p < 0,02	Abel et al., 1998
GTn; INT4; D543N i TGTG+/d	Gambiana	Frotis +ve PTB	Ca = 410; Co = 417	OR = 4,07	Bellamy et al., 1998
regió	Vietnamita	Mitsuda Reacció	20 pedigris (118 Ind)	ZMLB = 3,06; p = 0,001	Alcais et al., 2000
INT4	Guinea-Conakry	PTB	44 famílies (160 Ind)	$\chi^2 = 4,14$ ; p = 0,036	Cervino et al., 2000
GTn & D543N	Japonesa	PTB	Ca = 202; Co = 267	OR = 2,07	Gao et al., 2000
D2S424 distal a	Indis canadenses	PTB	1 família (81 Ind)	LOD = 3,81; p = 0,00001	Greenwood et al., 2000
3' UTR	Koreana	PTB	Ca = 192; Co = 192	OR = 1,85; p = 0,02	Ryu et al., 2000
3' UTR	Mali	LL vs. TT Tipus	Ca = 273; Co = 201	OR = 5,79; p = 0,003	Meisner et al., 2001
GTn	Gambiana	PTB	Ca = 329; Co = 324	OR = 1,40; p = 0,024	Awomoyi et al., 2002
D543N i TGTG+/del	Camboyana	PTB	Ca = 358; Co = 106	OR = 0,59; p = 0,02	Delgado et al., 2002
GTn	Caucàsica EEUU	PTB	Ca = 135; Co = 108	OR = 2,02	Ma et al., 2002
INT4	Danesa	Microscopia +ve TB	Ca = 104; Co = 176	RR = 1,9; p = 0,013	Soborg et al., 2002
D543N	Japonesa	TB	Ca = 95; Co = 90	OR = 5,16	Abe et al., 2003
TGTG+/del	Xinesa Han	PTB	Ca = 147; Co = 145	$\chi^2 = 7,79$ ; p < 0,01	Duan et al., 2003
D543N i TGTG+/del	Xinesa Han	PTB	Ca = 110; Co = 180	OR = 1,93; OR = 2,22	Liu et al., 2003
GT23	Brasilera	Mitsuda Reacció en Lepra	Ca = 90; Co = 61	OR = 8,09	Ferreira et al., 2004
CAAA+/del	Malawi	HIV -ve/+ve PTB	Ca = 239/259; Co = 762	OR = 0,65; OR = 0,70	Fitness et al., 2004
GT9 i TGTG+/del	Sud Africana	PTB	Ca = 265; Co = 224	p = 0,002 & p = 0,013	Hoal et al., 2004
D543N; TGTG+/del	Xinesa Han	PTB	Ca = 120; Co = 240	OR = 2,59; OR = 1,89	Liu et al., 2004
INT4 + D543N	Koreana	NTM Malaltia en pulmó	Ca = 41; Co = 50	OR = 10,88; p = 0,04	Koh et al., 2005
INT4 i D543N	Xinesa	Sever TB	Ca = 127; Co = 91	OR = 2,29; OR = 2,27	Zhang et al., 2005
GTn i 274C/T	Houston (EEUU)	Pediàtric TB	184 famílies nuclears	p = 0,04 & OR = 1,75; p = 0,01	Malik et al., 2005
D543N+3' UTR	Xinesa	TB	287 Ind	OR = 1,51; p = 0,016	Leung et al., 2007
2q35	Vietnamita	Mitsuda Reacció en Lepra	19 famílies (114 Ind)	p = 9x10 <sup>-4</sup>	Ranque et al., 2007
5'(CA)n	Tanzanesa	PTB	Ca=443; Co=426	OR = 1,45; p = 0,014	Soborg et al., 2007
D543N+3' UTR	Japonesa	MDR-TB	10 Ind	OR = 5,03; p = 0,02	Takahashi et al., 2008
<b>HIV i SIDA</b>					
GTn, 274C/T, 469+14G/C	Colombiana	Infecció HIV-1	Ca = 182; HC = 135	RR < 0,02	Marquet et al., 1999
823C/T	Colombiana	Infecció HIV-1	Ca = 182; HC = 135	RR = 2,29	Marquet et al., 1999

LL = Lepra Leptomatosa  
 TT = Lepra Tuberculoide  
 TB = Tuberculosis  
 PTB = Tuberculosis pulmonar  
 NTM = Micobacteri no tuberculos  
 Ind = Individu  
 RR = Risc Relatiu  
 $\chi^2$  = Chi-Quadrat  
 ZMLB = Z Score of the Maximum-Likelihood-Binomial  
 LOD = Logarime Odds



### 1.9. El gen *Slc11a1* com a candidat a la resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi

Els primers treballs del *Slc11a1* com a gen candidat de resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi en humana daten de final de la dècada de 1990 (Blackwell *et al.*, 1997; Maasho *et al.*, 1998), però hem d'esperar fins al 2003 per trobar el primer estudi on es demostra una associació significativa entre aquest gen i la susceptibilitat a la leishmaniosi visceral.

Bucheton i col·laboradors (2003) van estudiar 37 famílies pertanyents a un poblat de l'est del Sudan a on havia tingut lloc un brot de leishmaniosi entre els anys 1995 i 2000. Cada família tenia com a mínim un parell de germans afectats per la malaltia. Van interrogar amb marcadors genètics 5 regions cromosòmiques diferents que contenien els següents gens candidats: 2q35 (*Slc11a1*), 5q31-q33 (Th2 cytokine cluster), 6p21 (HLA/TNF- $\alpha$ ), 6q23 (INFGRI) i 12q15 (IFN- $\gamma$ ). L'anàlisi de lligament va revelar que només el polimorfisme 5'(CA), també anomenat 5'(GT)n, del promotor del gen *Slc11a1* estava associat significativament amb la susceptibilitat a la leishmaniosi en aquesta població (LOD score =1,08; P=0,01).

Estudis posteriors, també realitzats al Sudan, han corroborat i ampliat el nombre de polimorfismes del gen associats a la leishmaniosi. Un estudi realitzat amb 59 famílies de la tribu Masalit, població on la leishmaniosi té una elevada incidència, va permetre identificar, a més del polimorfisme del promotor, dos nous polimorfismes associats significativament a la malaltia: un localitzat a l'exó 3 del gen (274C/T) i l'altre a l'intró 4 (469+14G/C) (Mohamed *et al.*, 2004).

L'estudi més recent està format per 37 famílies pertanyents a la tribu Aringa del Sudan. L'anàlisi de lligament va corroborar que el polimorfisme 5'(GT)n descrit en el promotor del gen *Slc11a1* està significativament associat a la leishmaniosi visceral en humans (LOD score=1,32; P=0,01) (El-Safi *et al.*, 2006).

Així com en humana hi ha diversos treballs en els quals queda demostrada l'existència d'un component genètic involucrat en la resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi i diverses associacions significatives han estat identificades pel gen *Slc11a1* i la citada

malaltia, en canvi en el cas del gos existeixen pocs treballs. Altet i col·laboradors (2002) caracteritzen el gen *Slc11a1* en el gos i troben la primera evidència d'associació entre el gen *Slc11a1* i la leishmaniosi canina. A partir d'un estudi cas-control format per 33 gossos sans i 84 gossos malalts de diferents races diagnosticats de leishmaniosi van identificar un al·lel del microsatèl·lit, localitzat a l'intró 1 del gen, associat als gossos malalts. Aquest resultat indicava que en el gos el gen *Slc11a1* també juga un paper important en la resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi.

### **1.10. Altres possibles gens candidats de resistència/susceptibilitat a la leishmaniosi**

Tal com podem veure a la Taula 3, en humana són nombrosos els treballs d'associació duts a terme amb gens candidats i la leishmaniosi, entre els que cal destacar els gens del complex principal d'histocompatibilitat (MHC), el qual juga un paper fonamental en la presentació de l'antigen als limfòcits T. El MHC es divideix en classe I, II i III. Les molècules del MHC classe I s'expressen en la superfície de la majoria de cèl·lules nucleades i presenten antígens endògens als limfòcits T citotòxics (Tc). En canvi, els gens del MHC classe II codifiquen per proteïnes de membrana que s'expressen en cèl·lules presentadores d'antigen com macròfags, cèl·lules dendrítiques i limfòcits B, i presenten antígens exògens als limfòcits Th. Pel que fa a les molècules del MHC classe III, codifiquen per determinades citocines com el TNF- $\alpha$  i per les proteïnes del complement, les quals participen en diferents processos biològics relacionats amb la immunitat.

El DLA (*Dog Leucocyte Antigen complex*) classe II està format per 3 gens polimòrfics: DRB, DQA i DQB (Sarmiento *et al.*, 1990; 1992; 1993) i per un locus monomòrfic, DRA (Wagner *et al.*, 1995). El nombre d'al·lels identificats per cadascun dels gens ha anat en augment. Actualment, es coneixen 100 al·lels pel gen DLA-DRB1, 26 al·lels pels DLA-DQA1 i 60 pel DLA-DQB1, dels quals cada raça de gos presenta un rang determinat d'al·lels i haplotips (Kennedy *et al.*, 2007).

En humana, els primers estudis que posaven de manifest l'associació significativa del MHC amb la leishmaniosi daten de principis de la dècada de 1990. Malgrat que després han aparegut diversos treballs que corroboren aquesta associació en diferents

poblacions, només trobem un parell de treballs on el MHC s'hagi trobat associat a la leishmaniosi visceral, que és la que es considera l'equivalent a la del gos (Taula 4). Faghiri i col·laboradors (1995), estudiant una població formada per 52 pacients malalts i 222 controls sans, van trobar que els individus portadors de l'al·lel A25 de la regió MHC classe I tenien un major risc de contraure la malaltia. Posteriorment, Karplus i col·laboradors (2002), analitzant els gens HLA-DR i TNF, localitzats a la regió MHC classe II i III respectivament, van identificar una associació significativa entre aquests gens i la leishmaniosi visceral en una població brasilera.

En el cas del gos el primer i únic treball que hi descriu una associació DLA amb la leishmaniosi canina data del 2003. En una població de 126 gossos mestissos brasilers d'infecció natural es va identificar l'al·lel DLA-DRB1\*01502 associat a CVL, mentre que no es va trobar cap resultat significatiu ni pel DLA-DQA1 ni pel DLA-DQB1 (Quinnell *et al.*, 2003). A més, recentment s'han identificat SNPs en els gens TNF i IL-4 associats a CVL en gossos d'infecció natural del Brasil (Barnes *et al.*, 2007).

En humana, s'ha treballat amb altres gens candidats com el receptor per l'IFN- $\gamma$ , la IL-4, la IL-6 i recentment s'han identificat dues regions cromosòmiques (22q12 i 2q23-q24) associades a susceptibilitat a la leishmaniosi visceral (El-Safi *et al.*, 2006). Aquestes regions cromosòmiques contenen diversos gens que podrien modular la susceptibilitat a la leishmaniosi. La regió cromosòmica 22q12 conté el receptor de la interleucina-2 cadena beta (IL2-R $\beta$ ). Se sap que la IL-2 juga un paper crucial en la proliferació i diferenciació de les cèl·lules T. En pacients amb leishmaniosi visceral s'hi ha observat que tenen la producció de IL-2 i la resposta de cèl·lules T fortament deprimides (Carvalho *et al.*, 1981; 1985) i que durant la fase aguda de la malaltia circulen elevats nivells de receptor per a la IL-2 soluble (Barral-Netto *et al.*, 1991). D'altra banda, estudis duts a terme amb el protozou *Trypanosoma cruzi* reafirmen la hipòtesi que alguns paràsits evadeixen el sistema immunitari inhibint la transcripció del gens IL-2R, tant cadena  $\alpha$  com  $\beta$  (Majumder *et al.*, 1996).

En la regió cromosòmica 2q23-q24, s'han identificat dos gens candidats que podrien modular la susceptibilitat a la leishmaniosi. L'un és el NM1 (*N-myc interactor*) i l'altre el STAM2 (*Signal-Transducing Adapter Molecule*). Aquests dos gens codifiquen per proteïnes que participen en la ruta de transducció del senyal via IL-2.

Els últims estudis postulen altres regions cromosòmiques (1p22, 5q31 i 6q27) i altres gens com la IL-4 o la MBL (*Mannan-binding lectin gene*), associats a leishmaniosi (Alonso *et al.*, 2007; Jeronimo *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2007).

**Taula 4.** Treballs d'anàlisi de lligament o d'associació amb significació positiva entre diferents gens candidats i la leishmaniosi humana (modificat de Burgner et al., 2006).

Gen candidat	Població	Fenotip	Tamany mostral	Resultats	Referència
<b>Regió MHC-I:</b>					
Cw7	SE Asiàtica Hmong	Leishmaniosi cutània	?	p = 0,01	Barbier et al., 1987
A28; Bw22	Veneçolana	Leishmaniosi cutània localitzada	24 famílies	p = 0,0018; 0,0122	Lara et al., 1991
Bw22	Veneçolana	Leishmaniosi cutània localitzada	Ca = 26; Co = 26 RR = 12,5	p = 0,048	Lara et al., 1991
A11; B5; B7	Egípcia	Leishmaniosi cutània difusa	Ca = 27; Co = ?	N/A	el-Mogy et al., 1993
A25	Iraniana	Leishmaniosi visceral	Ca = 52; Co = 222 RR = 13,27	p = 0,004	Faghiri et al., 1995
<b>Regió MHC-II:</b>					
DQw8	Veneçolana	Leishmaniosi cutània localitzada	24 famílies	p = 0,0364	Lara et al., 1991
DQw3	Veneçolana	Leishmaniosi cutània localitzada	Ca = 26; Co = 26 RR = 4,25	p = 0,036	Lara et al., 1991
DR2	Brasilera	Leishmaniosi mucocutània	Ca = 43; Co = 111 RR = 0,07	p = 0,004	Petzl-Erler et al., 1991
DQw3	Brasilera	Leishmaniosi mucocutània	Ca = 43; Co = 111 RR = 4,2	p = 0,006	Petzl-Erler et al., 1991
DR2; DR7/DRw9	Veneçolana	Leishmaniosi cutània	Ca = 49; Co = 43	p < 0,05	Cabrera et al., 1995
DRB1*15; *16	Tunisiana	Leishmaniosi visceral	Ca = 156; Co = 154 RR = 0,54	p = 0,04 (pc > 0,05)	Meddeb-Garnaoui et al., 2001
DQB1*0201	Tunisiana	Leishmaniosi visceral	Ca = 156; Co = 154 RR = 0,46	p = 0,03 (pc > 0,05)	Meddeb-Garnaoui et al., 2001
HLA-DR	Brasilera	Leishmaniosi visceral	751 Individus	p = 0,02	Karplus et al., 2002
DRB1*0407; DPA1*0401; DPB1*0101	Mexicana	Leishmaniosi cutània localitzada	Ca = 65; Co = 100	OR = 2,92; 10,07; 5,99	Olivo-Diaz et al., 2004
DPB1*0401; DR2	Mexicana	Leishmaniosi cutània localitzada	Ca = 65; Co = 100	OR = 0,38; 0,14	Olivo-Diaz et al., 2004
<b>Regió MHC-III:</b>					
LTA	Veneçolana	Leishmaniosi mucocutània	Ca = 25; Co = 43 RR = 7,5	p < 0,001	Cabrera et al., 1995
TNF (-308)	Veneçolana	Leishmaniosi mucocutània	Ca = 25; Co = 43 RR = 3,5	p < 0,05	Cabrera et al., 1995
TNF (msat/-308 haplotype)	Brasilera	DTH +ve Asimptomàtic <i>L. chagasi</i>	59 transmissions	p = 0,0265	Karplus et al., 2002
TNF -308	Brasilera	DTH +ve Asimptomàtic <i>L. chagasi</i>	36 transmissions	p = 0,0006	Karplus et al., 2003
<b>Altres candidats:</b>					
IFNGR1 (INT 6 m/sat, allele 10 & 11)	Sudanesa	PKDL	26 famílies (54 ind afectats)	OR = 3,0 & OR = 2,18; p < 0,03	Mohamed et al., 2003
IFNGR1 (INT 6 m/sat, allele 12)	Sudanesa	PKDL	26 famílies (54 ind afectats)	OR = 0,15; p = 0,014	Mohamed et al., 2003
IL4 (IL4RP1; IL4RP2)	Sudanesa	Leishmaniosi visceral + PKDL	53 famílies (123 ind afectats)	OR = 2,5 + OR = 1,68; p < 0,003	Mohamed et al., 2003
Locus 22q12	Sudanesa	Leishmaniosi visceral	63 famílies	LOD = 3,50; p = 0,00003	El-Safi et al., 2006
Locus 2q23-q24	Sudanesa	Leishmaniosi visceral	63 famílies	LOD = 1,53; p < 0,025	El-Safi et al., 2006
IL6 (-174 G/C)	Brasilera	Leishmaniosi mucocutània	Ca = 60; Co = 60	p = 0,000015	Castellucci et al., 2006
MBL	Brasilera	Leishmaniosi visceral	Ca = 69; Co = 76	OR = 3,57; p = 0,043	Alonso et al., 2007
Locus 5q31 (IL4)	Brasilera	DTH- <i>L. chagasi</i>	102 famílies (323DTH+ 190DTH-)	OR = 3,14; p = 0,006	Jeronimo et al., 2007
Locus 5q31 (LECT2-TGFB1)	Brasilera	DTH- <i>L. chagasi</i>	102 famílies (323DTH+ 190DTH-)	OR = 3,00; p = 0,042	Jeronimo et al., 2007
Locus 1p22	Masalit	Leishmaniosi visceral	69 famílies (173 ind afectats)	LOD = 5,65; p = 0,00000017	Miller et al., 2007
Locus 6q27	Masalit	Leishmaniosi visceral	69 famílies (173 ind afectats)	LOD = 3,74; p = 0,000017	Miller et al., 2007

pc = p-Valor corregit

N/A = No disponible (només resum disponible)

MBL = mannian-binding lectin gene

OR = Odds Ratio

RR = Risc Relatiu

$\chi^2$  = Chi-Quadrat

ZMLB = Z Score of the Maximum-Likelihood-Binomial

LOD = Logaritme Odds





## *Objectius*

---



Aquest treball de recerca té com a objectiu millorar el coneixement de la base molecular de la leishmaniosi canina des de dues vessants diferents, l'estudi del polimorfisme de gens candidats i l'estudi del perfil immunològic en l'establiment de la infecció i en la posterior resolució de la malaltia.

Per tal de poder dur a terme aquesta tasca, els nostres objectius concrets han estat els següents:

- Identificació i anàlisi de polimorfismes del gen *Slc11a1* associats a leishmaniosi canina en una població cas-control
- Analitzar altres possibles gens candidats: MHC-II, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, *MIF* (*Migration-Inhibitory Factor*), *NOS* (*Nitric Oxide Synthase*), *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*) i *VDR* (*Vitamin D Receptor*), en races predisposades a la leishmaniosi
- Caracterització genètica del Podenc Eivissenc com a raça resistent a la leishmaniosi
- Desenvolupament i optimització dels diferents assajos de PCR a temps real per a les diferents citocines analitzades (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ )
- Estudi d'expressió diferencial d'aquestes citocines en el curs d'una infecció experimental



## *Articles i treballs*

---



**Títol:** Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) Gene and Canine Leishmaniasis in a Case-Control Study

**Autors:** E. Sanchez-Robert, L. Altet, A. Sanchez i O. Francino

**Estatus:** Acceptat a *Journal of Heredity*





## Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) Gene and Canine Leishmaniasis in a Case-Control Study

E. Sanchez-Robert, L. Altet, A. Sanchez, and O. Francino

From the Servei Veterinari de Genètica Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

Address correspondence to Elisenda Sanchez-Robert at the address above, or e-mail:

[Elisenda.Sanchez@uab.es](mailto:Elisenda.Sanchez@uab.es)

### ABSTRACT

The prevalence of canine leishmaniasis infection in an endemic area such as the Mediterranean basin (67%) is higher than the prevalence of the disease (10%), suggesting a role of host genetics related to the outcome of the disease. Because *Slc11a1* gene affects susceptibility and clinical outcome of autoimmune and infectious diseases, we analyzed five polymorphisms of the *Slc11a1* gene in a case-control study with 97 dogs: three new single nucleotide polymorphisms and a G-stretch in the promoter and a microsatellite in intron 1. Haplotype frequency distributions showed significant differences between case and control populations ( $P = .01$ ), most likely owing to the single nucleotide polymorphisms in the promoter region that were associated to case dogs. The most frequent haplotypes included TAG-8-141, which was present in all the breeds, in both case and control animals; and TAG-9-145, which was overrepresented in the control population and mostly found in boxer dogs. Within the boxer breed, 81% of the healthy dogs were homozygous TAG-9-145, whereas TAG-8-141 was significantly associated to case boxers ( $P = .02$ ). The special genotype distribution for the *Slc11a1* polymorphism associated with the prevalence of the illness in the boxer breed emphasizes the potential importance that breed genetic background has in canine leishmaniasis susceptibility.

Canine leishmaniasis (CL) is a severe systemic infectious canine disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. In this zoonosis, the dog is considered the main peridomestic reservoir of the parasite. Human leishmaniasis causes visceral

disease, particularly in young children and in immunosuppressed individuals, mainly adults infected with human immunodeficiency virus. The disease is usually fatal in people and dogs if left untreated (Alvar et al. 1997; Herwaldt 1999; Molina et al. 1994; Moreno and Alvar 2002; Slappendel 1988; Slappendel and Ferrer 1998).

Canine leishmaniasis is endemic in the Middle East, South America, and the Mediterranean basin, and it has recently been reported in foxhounds in the United States (Enserink 2000; Lindsay et al. 2002; see also, [http://www.leishmaniasis.info/linfantum\\_2.htm](http://www.leishmaniasis.info/linfantum_2.htm)). The prevalence of *Leishmania* infection in an endemic area such as the Mediterranean basin (67%) is higher than the prevalence of the disease (10%; Solano-Gallego et al. 2001), suggesting a role of host genetics related to the outcome of the disease. Candidate genes such as *Slc11a1* (solute carrier family 11 member a1) and major histocompatibility complex (MHC) have been analyzed in relation to CL (Altet et al. 2002; Quinnell et al. 2003).

*Slc11a1* is a proton/divalent cation antiporter that is better known by its former designation, *Nramp1* (natural resistance associated macrophage protein 1), and it is the positionally cloned *Ity/Lsh/Bcg* gene (Vidal et al. 1993). It was originally described in mice for its roles in regulating resistance and susceptibility to *Salmonella*, *Leishmania*, and *Mycobacterium*. Functional studies with murine *Slc11a1* implicate its involvement in macrophage function, including up regulation of chemokine/cytokine genes, such as tumor necrosis factor (*TNF*) and *IL-1b*, and induction of nitric oxide synthase (iNOS; Blackwell et al. 2003).

In humans, conclusive evidence has been provided for a functional GT-repeat sequence in the promoter region of *Slc11a1* gene that underlies disease susceptibility linked to infectious and autoimmune conditions (Searle and Blackwell 1999). For that reason, this gene has been intensively studied for its role in conferring susceptibility to infectious diseases such as tuberculosis, leprosy, meningococcal meningitis, visceral leishmaniasis, and HIV infection, as well as to autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, diabetes, sarcoidosis, inflammatory bowel disease (reviewed in Blackwell et al. 2001), and (more recently) Kawasaki disease (Ouchi et al. 2003).

In this study we analyzed polymorphisms in the *Slc11a1* gene in a case-control study of CL in naturally infected dogs. The polymorphisms analyzed are three new single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in the promoter region and the G-stretch and the intron 1 microsatellite (Altet et al. 2002).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The case-control study included 97 dogs from 14 different breeds: Akita inu, Alaskan malamute, boxer, bulldog, cocker spaniel, Doberman, German shepherd, German shorthaired pointer, Great Dane, pointer, rottweiler, schnauzer, Siberian husky, and Teckel (dachshund). Case animals included 40 dogs who were diagnosed with CL and died (or were euthanized) or were experiencing continuous relapse of the disease. Control animals were 57 healthy dogs from the same breeds of the case animals (to avoid breed effect) who were living in an endemic area of leishmaniasis. They were selected among dogs older than 6 years who were visiting veterinarian hospitals for regular health checks and never developed CL. We assumed that they could have been in contact with the parasite at some time.

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leucocytes by standard phenol-chloroform extraction or from bone marrow by direct lyses (Francino et al. 1997).

### Genotyping

Analysis in the promoter region for polymorphisms was accomplished by direct sequencing of a 539 bp polymerase chain reaction (PCR) product, amplified with primers sense 5'-CCTCTCAGCTAGTCTGAGCC-3' and antisense 5'-CAGCTGATCTCAGCTGTCCTC-3'. The amplification was performed using a GC-RICH PCR System (Roche) in a final volume of 25 µl. The reaction mixture contained 10 ng to 20 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM of each dNTP, 0.5 M GC-rich resolution solution, and 2 U of *Taq* and *Tgo* DNA polymerase mix. Thermal cycling profile was 35 cycles of denaturing at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, with a final incubation at 72°C for 10 min in a GeneAmp 9700 (Applied-Biosystems, Foster City, CA). PCR products were purified and sequenced with the internal primers 5'-

CCTCTCAGCTAGTCTGAGCC-3' and 5'-CAGCTGATCTCAGCTGTCCTC-3' and the Ready Reaction Cycle Sequencing Kit ABI PRISM dGTP Terminator 3.0 on an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied-Biosystems, Foster City, CA).

PCR amplification of intron 1 microsatellite was carried out in a final volume of 20 ml containing 10 ng to 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200mM of each dNTP, 0.2 mM of each primer (5'-FAM-GAGTCTGCTTGAGATTCTCTC-3' and 5'-TATCACCTCCACCCTTCAAAC-3'), and 1 U *Taq* polymerase (Invitrogen). Thermal cycle profile was as follows: 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, followed by 55°C for 30 s and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 7 min in a GeneAmp 9700 Thermal Cycler (Applied-Biosystems, Foster City, CA). Amplified fragments were analyzed by capillary electrophoresis (ABI 3730 DNA Analyzer, Applied-Biosystems, Foster City, CA), and labeled PCR products were automatically sized relative to the internal standard (CST ROX 70-500; BioVentures, Murfreesboro, TN) with the Genemapper Software 3.5 (Applied-Biosystems, Foster City, CA).

### Statistical Analysis

The reconstruction of haplotypes from our population data was performed with the PHASE 2.1 program (Stephens et al. 2001; Stephens et al. 2003). Haplotype frequencies between cases and controls were compared by using chi-square tests. The *P* value was corrected by the number of alleles observed in our population and was considered statistically significant when *P* < .05. Haplotype odds ratio (OR) and a 95% confidence interval were estimated by comparison of each haplotype versus all the others together.

## RESULTS AND DISCUSSION

To assess the possible role of the *Slc11a1* gene in determining *Leishmania* susceptibility, we analyzed the promoter region for polymorphisms and tested a microsatellite located in intron 1 in a case-control study with 97 dogs: 40 dogs diagnosed with canine leishmaniasis and 57 healthy dogs. Direct sequencing analysis revealed three new SNPs and variation in the number of Gs (from seven to nine) in the G-stretch in the promoter region, with G8 as the most frequent allele. Analysis of the intron 1 microsatellite showed five different alleles (133, 137, 139, 141, 145), with alleles 141 and 145 as the most frequent.

The three new SNPs gave rise to three new haplotypes (TAA, TGA, CGA), which were identified in four case dogs from different breeds: German shorthaired pointer, Doberman, rottweiler, and German shepherd. The SNPs are located upstream of the G-stretch, and one of them is adjacent to the one described by Altet et al. (2002) for a Rottweiler dog. As shown in Figure 1, the three SNPs affect different genomic binding sites of eukaryotic transcription factors, suggesting a possible role of differential gene expression. In humans, a Z-DNA-forming repeat and a -237 C/T polymorphism have been associated with a different ability to drive gene expression and have been correlated with infectious versus autoimmune disease susceptibility (Searle and Blackwell 1999; Zaahl et al. 2004).

The polymorphisms of the five loci analyzed together generated 14 different haplotypes in our case-control study. Haplotype frequencies distribution between case and control populations showed significant differences ( $P = .01$ ), most likely due to the SNPs of the promoter region, given that no significant differences were found either for the variation in the G-stretch or for the intron 1 microsatellite when analyzed separately. However, if we take into account the SNPs of the promoter together, significant differences in haplotype distribution are found between case and control population ( $P = .003$ ) because three mutations are present only in case animals (data not shown).

The most frequent haplotypes are TAG-8-141 and TAG-9-145 (frequencies of 0.35 and 0.32, respectively). Haplotype TAG-8-141 is present in all breeds, but TAG-9-145 is found mostly in boxer dogs, which suggests that the haplotype distribution is breed specific. The existence of a different haplotype distribution in this breed leads us to perform the statistical analysis in the case-control animals via two groups: boxer dogs (see Table 1) and dogs other than boxers.

**Figure 1.** New single nucleotide polymorphisms identified in the promoter region (539 pb) of the canine *Slc11a1* gene (indicated in boldface). Putative binding sites for transcription factors affected by the single nucleotide polymorphisms are indicated with a line above the consensus sequence: GR (glucocorticoid receptor); EGFR site (epidermal growth factor receptor site); Sp-1 (simian virus 40 protein-1). The G-stretch region is underlined.

```

cctctcagctagctctgagcccttcatgtaacagaagaacaagtttagagaaaggg 56

ctggcctggtgacaatcttaagtgagtcagtgccaggatcgggaccagaattcca 111

      GR                               EGFRsite
cgcgccagcttctYctgaggctctctctggcccagatcaTcaRtgcacgtccctgt 166

ggcactgcctgacgggtcttcccctctgaggcactcaaggggaaactgaggcttgg 221

tagccatcaggactcccattgccaggaactccagactgaagtgaagggcctgact 276

      SP-1
gcttgtgtggggcgRgtGGGGGGGcagccatgtgatctggacatgaacgcccaa 331

gtagcaggaaatgtcttgaatcagagctggcttgggagacacagaatatacggc 386

gcctggcaggaggccaaaagtgttgtgggccccaggccaggagggaacgaaagt 441

tcttgcattttgggtcaactagactcttccgccagagctggccacttctgccttg 496

gaaagtgtttcacaatgtatatgaggacagctg                               539

```

The haplotype frequencies in boxer dogs vary between controls and cases. Within the boxer breed, haplotype TAG-9-145 is the most frequent, and it is preferentially observed in the homozygous state in the control animals ( $P = .03$ ; 81% of the control boxers versus 37% of the case boxers). On the other hand, haplotype TAG-8-141 is significantly associated to case animals ( $P = .02$ ), and 50% of the boxers with CL carried this haplotype, all heterozygous TAG-8-141/TAG-9-145 ( $P = .01$ ). Boxer dogs carrying the TAG-8-141 allele are more likely to be susceptible to the disease (odds ratio = 10.33), whereas allele TAG-9-145 would be protective in homozygous state for the boxer breed. However, in dogs other than boxer, haplotype TAG-8-141 is the most frequent and is evenly distributed between case and control animals (frequencies of 0.36 and 0.47, respectively), indicating a nonstraightforward genotype-phenotype relationship.

**Table 1.** Haplotype and genotype frequencies for the *Slc11a1* gene in the boxer dogs from the case-control study.

	Control (n = 16)	Case (n = 8)	P	OR (95% CI)
Haplotype				
TAG-8-141 <sup>a</sup>	0.031	0.250	.02*	10.33 (1.05-102.10)
TAG-9-141	0.063	0.063		
TAG-9-145	0.906	0.687		
Genotype				
TAG-8-141/TAG-9-145	0.06	0.50	.01*	15 (1.29-174.39)
TAG-9-141/TAG-9-145	0.13	0.13		
TAG-9-145/TAG-9-145	0.81	0.37	.03*	

<sup>a</sup> TAG-8-141 TAG = single nucleotide polymorphisms in the promoter; 8 = number of Gs in the G-stretch region; 141 = intron 1 microsatellite.

n = number of animals; OR = odds ratio; CI = confidence interval.

\* P = .04; global significance of genotype distribution in case and control boxers.

Previous works suggests a role of host genetics in the predisposition or progression of CL, which could be different among breeds. For instance, visceral leishmaniasis was diagnosed in 41% of foxhounds from the index kennel in New York but in none of the beagles and basset hounds from the same kennel (Gaskin et al. 2002), suggesting a special predisposition of foxhounds to the infection. On the other hand Ibizan hounds, dogs living in an endemic area (Balearic Islands, Mediterranean basin), have been reported to be more resistant to *Leishmania* infection than other breeds living in the same area, owing to a predominant cellular immune response against to the infection (Solano-Gallego et al. 2000). Moreover, a recent epidemiological study has demonstrated a bimodal distribution of CL, with the first peak including dogs diagnosed at 2 years to 4 years of age and the second peak including dogs about 7 years old (and, in these latter cases, being mostly concomitant with other infections or neoplastic diseases). Dogs genetically predisposed to CL were expected to be in the first age peak, but the boxer breed was overrepresented in it (68% of the sick boxers are diagnosed for CL before 4 years of age; Miranda et al. 2005). It is important to remark here that, even

though case animals were not breed selected for our study, the boxer breed represents 20% of our case group.

In conclusion, we found a significant association between *Slc11a1* and susceptibility to CL, either for the SNPs in the promoter region in the case-control study or for the association of TAG-8-141 to case animals in the boxer breed. These results, taken together with previous work that has demonstrated an association between MHC class II and susceptibility to visceral leishmaniasis in dogs (Quinnell et al. 2003), point to genetic factors involved in the disease. Expression analysis of the different *Slc11a1* haplotypes and characterization of other candidate genes are necessary to further advance our knowledge and understanding of the immunological factors that underlie canine leishmaniasis.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Veterinary Molecular Genetic Service from the Universitat Autònoma de Barcelona.

We are thankful to the Veterinary Teaching Hospital from the Universitat Autònoma de Barcelona and all the clinical veterinarians for providing the samples used in this study. We are also thankful to the anonymous referees for their critical review. This article was presented at the 2nd International Conference on the "Advances in Canine and Feline Genomics: Comparative Genome Anatomy and Genetic Disease," Universiteit Utrecht, Utrecht, The Netherlands, October 14–16, 2004.

#### **FOOTNOTES**

Corresponding Editor: Bernard van Oost



## REFERENCES

- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C, and Sanchez A, 2002. Mapping and sequencing of the canine *NRAMP1* gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun* 70:2763–2771.[Abstract/Free Full Text]
- Alvar J, Cañavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, and Moreno J, 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10:298–319.[Abstract]
- Blackwell JM, Goswami T, Evans CAW, Sibthorpe D, Papo N, White JK, Searle S, Miller EN, Peacock CS, Mohammed H, and Ibrahim M, 2001. *SLC11a1* (formerly *NRAMP1*) gene and disease resistance. *Cell Microbiol* 3:773–784.[CrossRef][Medline]
- Blackwell JM, Searle S, Mohammed H, and White JK, 2003. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: continuation of the *Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1* gene story. *Immunol Lett* 85:197–203.[CrossRef][ISI][Medline]
- Enserink M, 2000. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290:1881–1883.[Free Full Text]
- Francino O, Amills M, and Sanchez A, 1997. Canine MHC DRB1 genotyping by PCR-RFLP analysis. *Anim Genet* 28:41–45.[CrossRef][ISI][Medline]
- Gaskin AA, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, and Breitschwerdt EB, 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J Vet Intern Med* 16:34–44.[CrossRef][Medline]
- Herwaldt BL, 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199.[CrossRef][ISI][Medline]
- Lindsay DS, Zajac AM, and Barr SC, 2002. Canine leishmaniasis in the American Foxhounds: an emerging zoonosis? *Comp Cont Ed Pract Vet* 24:304–312.

Miranda S, Roura X, Alberola J, Ferrer L, and Ramis A, 2005. Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. In: Worldleish3. Third World Congress on Leishmaniasis. Palermo-Terrassini Sicily, Italy. 10–15 April 2005. Abstract book; 171.

Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres H, Gonzalez F, Castillo JA, Lucientes J, and Alvar J, 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. Trans R Soc Trop Med Hyg 88:491–493.[CrossRef][Medline]

Moreno J and Alvar J, 2002. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol 18:399–405.[CrossRef][ISI][Medline]

Ouchi K, Suzuki Y, Shirakawa T, and Kishi F, 2003. Polymorphism of the SLC11a1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to Kawasaki disease. J Infect Dis 187:326–329.[Medline]

Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, and Ollier WE, 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. Immunogenetics 55:23–28.[ISI][Medline]

Searle S and Blackwell JM, 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human *NRAMP1* gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. J Med Genet 36:295–299.[Abstract/Free Full Text]

Slappendel RJ, 1988. Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. Vet Q 10:1–16.[Medline]

Slappendel RJ and Ferrer L, 1998. Leishmaniasis. In: Infectious diseases of a dog and cat (Greene CE, ed). Philadelphia: W. B. Saunders; 450–458.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, and Ferrer L, 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. Vet Parasitol 90:37–45.[CrossRef][ISI][Medline]

Solano-Gallego L, Monell P, Arboix M, Alberola J, and 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.[Abstract/Free Full Text]

Stephens M, Smith N, and Donnelly P, 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978–989.[CrossRef][ISI][Medline]

Stephens M and Donnelly P, 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73:1162–1169.[CrossRef][ISI][Medline]

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, and Gros P, 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell* 73:469–485.[CrossRef][ISI][Medline]

Zaahl MG, Robson KJ, Warnich L, and Kotze MJ, 2004. Expression of the *SLC11A1* (*NRAMP1*) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: opposite effect in the presence of –237C→T. *Blood Cells Mol Dis* 33:45–50.[Medline]



**Títol:** *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis

**Autors:** E. Sanchez-Robert, L. Altet, M. Utzet-Sadurni, U. Giger, A. Sanchez i O. Francino

**Estatus:** Acceptat a *Veterinary Research*



## ***Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis**

**E. Sanchez-Robert\*<sup>1</sup>, L. Altet<sup>1</sup>, M. Utzet-Sadurni<sup>2</sup>, U. Giger<sup>3</sup>, A. Sanchez<sup>1</sup> and O. Francino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Veterinary Molecular Genetics Service, Department of Animal and Food Science. Veterinary Fac. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Population Genomics Node. National Institute for Bioinformatics (INB), Barcelona, Biomedical Research Park, Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Section of Medical Genetics, School of Veterinary Medicine at the University of Pennsylvania, 3900 Spruce Street, Philadelphia, PA 19104-6010 USA

Running title: *Slc11a1* gene in Canine Leishmaniasis

Supported in part by a grant from the National Institutes of Health #RR02512.

\*Corresponding author:

Elisenda Sanchez-Robert

Servei Veterinari de Genètica Molecular. Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN

Tel: +34 93 5812087; FAX: +34 93 5812106

E-mail: Elisenda.Sanchez@uab.cat

**ABSTRACT**

Visceral leishmaniasis is the most important zoonosis in Europe and it is caused by *L. infantum*, a protozoan intracellular parasite. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic in the Mediterranean basin, Middle East, and South America, and is emerging within non endemic areas such as the United Kingdom and North America. We have analyzed 24 polymorphisms in the canine *Slc11a1* (formerly NRAMP1) gene: 19 new polymorphisms characterized by direct sequencing from 40 dogs of different breeds and 5 polymorphisms previously described. Data analysis in a case-control study including 164 dogs of 19 different breeds revealed that 2 of the 24 polymorphisms were associated with increased risk for CVL: 1 intronic SNP (A4549G in intron 6: OR=6.78, P=0.001) and 1 silent SNP in exon 8 (C4859T: OR=13.44, P=0.004). *In silico* analysis of the significant SNPs revealed that SNPs in the promoter region affect putative transcription binding sites and SNP C4859T in exon 8 disrupts a putative exonic splicing enhancer (ESE). These results corroborate that *Slc11a1* polymorphisms are associated with increased risk for CVL.

Key words: Leishmaniasis, *Slc11a1*, NRAMP1, polymorphism, dog, susceptibility, SNP, silent, synonymous



## 1. INTRODUCTION

Infection is one of the leading causes of human mortality and morbidity particularly in children and in third world countries (World Health Organization). Infections with HIV, *Mycobacteria*, Malaria, and *Leishmania* have been most commonly studied [4]. *Leishmania* is a protozoan intracellular parasite and transmitted by sandflies. The domestic dog is also susceptible to *Leishmania* infection, which results in great morbidity and mortality among dogs and is considered the main peridomestic reservoir of the parasite. The zoonosis caused by *L. infantum* is known as visceral leishmaniasis. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic in the Mediterranean basin, Middle East, and South America, and the prevalence of *Leishmania* infection can reach 67% in these areas [29]. Moreover, leishmaniasis is emerging within non endemic areas mostly because of transportation of dogs from endemic areas and climatic changes with expansion of the sandfly vector. Hence CVL has been reported in many countries in Europe including the United Kingdom [26] and in North America particularly in the English and American foxhounds [8, 10, 18, 21, 24].

Genetic factors involved in the resistance/susceptibility of the host to CVL have been suspected, and significant correlations between MHC class II and/or *Slc11a1* genes (solute carrier family 11a member 1; formerly NRAMP1) and CVL have been reported [1, 19, 23]. In a cohort of Brazilian mongrel dogs naturally exposed to *L. infantum* the MHC class II allele DLA-DRB1\*01502 increased the risk of being parasite infected compared with dogs lacking this allele [19].

The *Slc11a1* gene acts as a proton/divalent cation antiporter, which controls the replication of intracellular parasites by altering the intravacuolar environment of the microbe-containing phagosome [13]. Polymorphisms in the *Slc11a1* gene have been associated with CVL in a case-control study with 97 dogs of different breeds [23]: 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *Slc11a1* promoter region (T151C, A180G, G318A) were associated with increased risk for CVL in different breeds, and one haplotype was significantly associated with the Boxer breed, which may suggest varied predispositions to infectious disease among canine breeds. In fact, genetic epidemiologic surveys in dogs revealed higher prevalence of *Leishmania* infection (up

to 25%) in Boxers, German Shepherds, Doberman Pinschers, Cocker Spaniels and among American and English Foxhounds (held in foxpacks in North America) [8, 11, 12, 23]. Conversely, certain canine breeds may be resistant to *Leishmania* infection and CVL such as the Mediterranean Ibizan Hound, an autochthonous breed from the Balearic Island of Ibiza [28].

Similarly varied susceptibility to *Leishmania* infection has been described between ethnic human populations [9]. Different studies showed significant associations for a 5'(CA) repeat polymorphism in the human *Slc11a1* promoter and visceral leishmaniasis [3, 9]. This polymorphism in the promoter affects *Slc11a1* expression and correlates with infectious as well as autoimmune disease susceptibility [25, 35]. The association between *Slc11a1* with leishmaniasis was corroborated in a Sudanese population study, where two new polymorphisms, one located in exon 3 (274C/T) and another one located in intron 4 (469+14G/C) were found [2, 17]. Beyond the *Slc11a1* polymorphism interactions with multiple other genes and candidate regions, such as MHC, IL-4, IFNGR or loci 22q12 and 2q23-24 have been implicated [4, 9]. Studies with canine and murine disease models are necessary to further advance our knowledge of the molecular basis of *Leishmania* infection and disease predisposition or resistance. Such studies could help humans and dogs alike who are experiencing a high degree of morbidity and mortality from leishmaniasis.

Our aim was to corroborate the association of *Slc11a1* gene with CVL by fully characterising sequence variation and typing it in an extended case-control cohort. A total of 24 polymorphisms of the *Slc11a1* gene have been typed in 164 dogs from 19 different breeds: 19 new polymorphisms that have been discovered by direct sequencing of 40 dogs from 11 different breeds and 5 polymorphisms previously described [23]. Polymorphism has been also analyzed in a cohort of 58 Ibizan Hounds, a breed described as resistant to CVL [28].

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animal cohort and DNA extraction

The case-control study included 164 dogs from 19 different breeds (Table 1). All dogs were living in Spain with the exception of 12 Foxhounds from Southeastern Pennsylvania, USA. The case animals are 65 dogs that have developed clinically severe disease in which *Leishmania* is identified concomitantly by positive *Leishmania* PCR and positive anti-*Leishmania* antibody titre. Ninety-nine healthy dogs from the same breeds and geographical regions were selected to match the case animals. The control dogs have been selected among individuals older than 5 years presented to veterinary hospitals for regular health checks, which have never shown signs of CVL, but would have been exposed to *Leishmania* organisms (endemic area). We also further examined a cohort of 58 Ibizan Hound dogs, an autochthonous breed from the Balearic Island of Ibiza (Spain) which has been described as a resistant breed to leishmaniasis [28].

DNA was obtained from 0.1 ml of bone marrow aspirate or 0.5 ml of peripheral whole blood as previously described [22]. Briefly, samples were washed in TE buffer (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) to disrupt the erythrocyte membrane until the leukocyte pellet was white. Leukocytes were then lysed by incubation of the pellet in 0.1 ml of PK buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.0, 0.5% Tween-20 and 23 µg of proteinase K) at 56 °C for 5 h. Following proteinase K inactivation (90 °C for 10 min) DNA samples were diluted in milliQ water (1/10 for bone marrow aspirate and 1/5 for blood), and 2 µl were used for the PCR.

### 2.2 Amplification conditions

The canine *Slc11a1* gene was PCR amplified in 9 different fragments, encompassing the promoter region, the 5' and 3' UTR, the 15 exons, and partially the introns. PCR primers were designed with Primer Express software v 2.0 (Applied-Biosystems, Foster City, CA). The PCR conditions (two different enzymes and commercial kits) and the thermocycling profiles used are shown in Table 2. For the GC-rich PCR amplification system (Roche, Basel, Switzerland), the PCR was performed in a final volume of 25 µl containing 10-20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, primer concentration shown in Table 2, 0.5M GC rich resolution solution, and 2 U of Taq and

Tgo DNA polymerase mix. Thermal cycling profile was 95 °C for 3 min followed by 35/40 cycles at 94 °C for 45 sec, 55/56 °C for 45 sec, 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C 10 min. The PCR with EcoTaq polymerase (Ecogen, Barcelona, Spain) was carried out in a final volume of 20 µl containing 10-20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP, primer concentration shown in Table 2 and 1 U of Taq polymerase. The thermal cycling profile was 95 °C for 3 min followed by 35 cycles at 94 °C for 45 sec, 63 °C for 45 sec, 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C 10 min. All amplifications were performed in a PTC-200 MJ Research (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA).

### **2.3 SNP characterization**

Characterization of polymorphism has been accomplished by direct sequencing of 7,110 bp from the *Slc11a1* gene in 40 dogs from 11 different breeds (Table 1). The gene partial sequence comprises the promoter region, the 5' and 3' UTRs, the 15 exons and all the intron-exon boundaries. Sequence was completed for introns 1, 3, 5, 6, 7, 12 and 14, and only partially completed for the remaining introns. The PCR products were purified and sequenced with the same PCR primers using Ready Reaction Cycle Sequencing Kit ABI PRISM Big-Dye Terminator v3.1 and dGTP Terminator v3.0 for the promoter region in an ABI 3730 DNA Analyzer (Applied-Biosystems, Foster City, CA). All the SNPs were named in relation to the published canine *Slc11a1* gene sequence (9,490 bp, GenBank, Accession number AF091049) [1], in which the translational start codon is located at position 689 of the sequence.

### **2.4 Polymorphism analyses**

Polymorphism analyses previously described in the promoter region [23] were accomplished by direct sequencing of a 539 bp PCR product (PR, Table 2) after purification with Montage Seq96 Sequencing Reaction Cleanup Kit (Millipore, Billerica, MA). Intron 1 microsatellite ( $\mu$ sat1253) [23] and intron 3 indel (In2724del) (Table 2) were analyzed by capillary electrophoresis (ABI 3730 DNA Analyzer). Labeled PCR products were automatically sized relative to the internal standard CST ROX 70-500 (BioVentures, Murfreesboro, TN) with the Genemapper Software v.3.5 (Applied-Biosystems). Other exonic and intronic SNPs were identified by primer extension using SNaPShot kit in a GeneAmp 9700 Thermal Cycler and by capillary

electrophoresis using the internal standard GeneScan-Liz-120™ with the Genemapper Software v.3.7 (Applied-Biosystems).

## **2.5 Statistical analysis**

Data analyses for bi- and multiallelic polymorphisms were performed with SNPator (<http://www.snparator.org/public/principal/index.php>) and GENEPOP genetics software package, respectively [20]. The association study applied contingency tables assuming different genetic models: (i) general, (ii) recessive, (iii) codominant and (iv) dominant. Haplotypes from our population data were inferred with PHASE v 2.1 program [30, 31], and the 5 most frequent haplotypes were confirmed by trio-family based analysis in Boxer, Doberman Pinscher, German Shepherd, Rottweiler and Teckel breeds. Association analyses were performed in the extended case-control cohort (data not shown) and in a reduced, fully matched cohort (47 cases *versus* 47 controls in a 1:1 ratio), chosen at random from the available dogs, to confirm the significant associations. Statistical differences between case and control group were initially tested for significance by chi-square analysis or Fisher exact test with the Haldane correction. After producing a fully matched dataset, data were analysed by means of a matched case-control test making use of logistic regressions [16]. The risk factor in case *versus* control computing odds ratios (OR) with 95% confidence interval was evaluated. A p-value < 0.05 was regarded as statistically significant. Significance levels or patterns did not differ between analysis (Table A, supplemental data available online only at [www.vetres.org](http://www.vetres.org)), thus confirming the validity of the reported associations.

## **2.6 Identification of transcription factor binding sites and exon/intron splicing signals**

For the analysis of DNA sequences of known eukaryotic signals we used SIGNAL SCAN Genetic Sequence Analysis Software [33]. To identify putative exonic (ESE) and intronic (ISE) splicing enhancers the web-based resources called ESEfinder release 3.0 and ACESCAN2 (<http://genes.mit.edu/acescan2/index.html>) were applied, respectively [6, 27].

### 3. RESULTS

#### 3.1 *Slc11a1*: characterization of new polymorphism and genotyping of the case-control cohort

Sequencing of 7,110 bp from the whole 9,490 bp of *Slc11a1* gene in 40 dogs from 11 different breeds allowed the characterization of 19 new polymorphisms in the *Slc11a1* gene (Table 1): 2 SNPs were located in the coding region (exons 8 and 12) and represent silent mutations, 15 SNPs and a 14 bp deletion were identified in intronic regions and 1 SNP in the 3'UTR. These new polymorphisms, together with the 3 SNPs and the G-stretch in the promoter and the microsatellite in intron 1, have been analyzed in the case-control cohort of 164 dogs from 19 different breeds and the Ibizan Hound cohort of 58 dogs (Table 1).

#### 3.2 Association study with CVL

Results of genotypic association tests for the biallelic polymorphisms analyzed in the canine *Slc11a1* gene significantly associated with CVL are described in Table 3. Since Hardy-Weinberg equilibrium does not hold in our case-control cohort, only genotypic associations are presented to avoid bias in allelic associations. Genotype distribution for the polymorphisms significantly associated with CVL is shown in Table 4 for the case-control cohort and for the Ibizan Hound cohort. Allele frequencies distribution for the most representative breeds is shown in Table 5.

The significant genotypic association between promoter SNPs and CVL is corroborated in the extended cohort for two (A180G: OR=11.63, P=0.039; G318A: OR=11.63, P=0.039) of the three SNPs, although they have not been identified in new dogs. These SNPs had been identified in German Shorthair Pointer, Doberman Pinscher, Rottweiler and German Shepherd. Risk allele G in SNP A180G disrupts one potential SOX9 binding site (CATCAATGC) and risk allele A in SNP G318A interferes with 4 different potential binding sites for transcription factors: one SPI1 (CGGATG); one SP1 (GTGGGGCGGA; involved in the regulation of mRNA synthesis); one GATA2 (GGATG; which is an endothelial transcription factor); and one RREB1 (C<sub>5</sub>ATCCGC<sub>4</sub>ACACAA; which acts as RAS-responsive element-binding protein). These significant associations are lost in the reduced fully matched cohort.

Among the 19 new polymorphisms identified we discovered significant genotypic associations with CVL for 3 SNPs: C4859T in exon 8 (OR=13.44; P=0.004), A4549G in intron 6 (OR=6.78; P=0.001) and C8542T in intron 13 (P=0.018). The significance is maintained assuming different genetic models for the SNPs C4859T and A4549G but significance for the SNP C8542T is marginal and only obtained in one model (Table 3).

For the case-control population 22 haplotypes were inferred with PHASE. Significant differences in haplotype frequency between cases and controls have been observed in an overall test (P=0.01). The 5 most frequent haplotypes, confirmed by trio-family based analysis, were included in the association study (Table 6). Only one *Slc11a1* haplotype (D), which included the risk alleles for the SNPs A4549G (intron 6) and C4859T (exon 8) was significantly associated with CVL (OR=8.81; P=0.01) and was identified in Miniature and Standard Schnauzers as well as in Siberian Huskies. Six haplotypes for the Ibizan Hound cohort, inferred with PHASE since no genealogy information was available, seemed to be specific for this breed (Table 6).

#### 4. DISCUSSION

In humans, several studies have demonstrated that *Slc11a1* is associated with susceptibility to visceral leishmaniasis, and that a functional polymorphism in the promoter correlated with infectious and autoimmune disease susceptibility [2, 3, 9, 17, 25, 35]. Although associations had also been described in the dog between this gene and CVL [1, 19, 23], the current study further characterized the canine *Slc11a1* gene and attempted to determine the genetic susceptibility to *Leishmania* infection among dogs and the risk for CVL. Sequencing the canine *Slc11a1* gene, we identified 19 new polymorphisms among 40 dogs from 11 different breeds and we analyzed them in 164 dogs from 19 different breeds in a case-control study and a cohort of 58 Ibizan Hounds, a breed that has been described as resistant to CVL [28]. Data analysis revealed that 3 of the 24 polymorphisms found in the *Slc11a1* gene were associated with increased risk for CVL.

Two SNPs (A180G and G318A) in the *Slc11a1* promoter region were found to be significantly associated with increased risk for CVL in the extended case-control

population, as was previously described [23] (Table 3). These SNPs involve putative transcription binding sites that are disrupted by the risk-alleles (SOX9 for A180G; SP11, SP1, GATA2 and RREB1 for G318A). In humans, a polymorphism in the promoter of *Slc11a1* encodes a Z-DNA forming dinucleotide repeat with 4 alleles, which differ in their ability to drive gene expression, and thus some alleles have been associated with resistance/susceptibility to infectious and autoimmune diseases [25]. The fact that the 2 SNPs in the canine *Slc11a1* gene promoter disrupted putative transcription factor binding sites suggests a possible role of differential *Slc11a1* gene expression in CVL susceptibility.

Regarding the new 19 SNPs described in the exonic and intronic regions of the canine *Slc11a1* gene, we found significant association with CVL for 3 of them: A4549G (intron 6), C4859T (exon 8) and C8542T (intron 13) (Table 3). Moreover, one haplotype that was significantly associated with CVL was haplotype (D), which included the risk alleles for the SNPs A4549G and C4859T mentioned above (Table 6).

Despite affecting non-coding region, intronic SNPs could be linked to the causal mutation or have functional effects by themselves. In fact, a human family-based allelic association test revealed that intron 4 469+14G/C polymorphism in the human *Slc11a1* gene is associated with increased susceptibility to leishmaniasis, probably due to a linkage disequilibrium between this polymorphism and an additional SNP upstream in the promoter [17]. Furthermore, intronic regulatory elements, such as intronic splicing enhancers/silencers (ISE/ISS) [32], are involved in the pre-mRNA splicing and, therefore, affect the mature mRNA and consequently the protein product.

The polymorphism found in the exon 8 (C4859T) represents a synonymous mutation that changes the codon CCC (Pro) to CCT (Pro). Synonymous SNPs do not alter the coding sequence, and, therefore, they are not expected to change the function of the resulting protein. However, the protein folding could be affected due to changes in the translation rate caused by the use of a rare codon [15], and this effect is larger if the change involves the third base in a codon as is the case here [34]. Corroborating data for this hypothesis is that a silent mutation in a complex mammalian membrane transport protein alters the substrate specificity [6]. It should be noted that the SNP in exon 8



(C4859T) is not located in a predicted transmembrane segment (TMS), but the residue encoded by the triplet that contains the SNP could affect cation transport and thereby divalent metal ions uptake [7].

Moreover, there is increasing evidence that many genes causing human disease harbour exonic mutations, without altering the amino acid sequence, but affecting pre-mRNA splicing [5]. These exonic polymorphisms, identified as splicing mutations, are located close to the exon-intron boundaries and can act as enhancers or silencers elements. The inactivation of an ESE can result in a partial or complete exon skipping, and can thereby markedly affect the structure or amount of the expressed protein product [5]. The risk allele in the exon 8 (C4859T) disrupts a putative exonic splicing enhancer (ESE) that is recognized by the serine/arginine-rich (SR) protein SF2/ASF (IgM-BRCA1) [27]. Functional analyses at cDNA level would be necessary to confirm the effect of these exonic/intronic splicing regulatory elements in the canine *Slc11a1* gene. In fact, alternative splicing with a complete exon 11 skipping thereby resulting in elimination of TM8 has been described in the *Slc11a1* gene of a dog affected with relapsing CVL [1].

The Ibizan Hound breed has been reported to be resistant to CVL due to its strong cellular response to the infection [28]. In the Ibizan Hound cohort no dog has been affected with CVL, and, interestingly, 6 *Slc11a1* haplotypes appear to be specific to this breed. The high number of haplotypes found in this autochthonous breed on an island is surprising, considering the expected high rate of inbreeding. Similarly in a recent survey of 937 dogs from 80 different breeds a high number of haplotypes for the MHC class II genes were found in Ibizan Hound, albeit 2 appear to be unique in this breed [14]. The genetic resistance against CVL in the Ibizan Hound may be shared with other breeds supposed to be resistant to CVL, such as the Pharaoh dog (Ferrer L, personal communication).

In conclusion, our data show that the new polymorphisms found in intron 6 (A4549G), exon 8 (C4859T) and intron 13 (C8542T) and a certain haplotype that included the risk alleles for two of them are associated with increased risk for CVL. This genetic component is likely to be caused by the expression and function of *Slc11a1* and its interaction with multiple other genes.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Veterinary Molecular Genetic Service from the Universitat Autònoma de Barcelona and by the Spanish National Institute for Bioinformatics ([www.inab.org](http://www.inab.org)), a Platform of Genoma España. We are thankful to the Veterinary Teaching Hospital from the Universitat Autònoma de Barcelona and all the clinician veterinarians for providing the samples used in this study. We are also thankful to the anonymous referees for their critical review.

## REFERENCES

- [1] Altet L., Francino O., Solano-Gallego L., Renier C., Sánchez A., Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs, *Infect.Immun.* (2002) 70:2763-71.
- [2] Blackwell J., Mohamed H., Ibrahim M., Genetics and visceral leishmaniasis in the Sudan: seeking a link, *Trends Parasitol.* (2004) 20:268-74.
- [3] Bucheton B., Abel L., Kheir M., Mirgani A., El-Safi S., Chevillard C., Dessein A., Genetic control of visceral leishmaniasis in a Sudanese population: candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region, *Genes Immun.* (2003) 4:104-9.
- [4] Burgner D., Jamieson S., Blackwell J., Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis* (2006) 6:653-63.
- [5] Cartegni L., Chew S., Krainer A., Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing, *Nat.Rev.Genet.* (2002) 3:285-98.
- [6] Cartegni L., Wang J., Zhu Z., Zhang M., Krainer A., ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers, *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:3568-71.
- [7] Courville P., Chaloupka R., Cellier M., Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters, *Biochem.Cell Biol.* (2006) 84:960-78.
- [8] Duprey Z., Steurer F., Rooney J., Kirchhoff L., Jackson J., Rowton E., Schantz P., Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003, *Emerging Infect.Dis.* (2006) 12:440-6.
- [9] El-Safi S., Kheir M., Bucheton B., Argiro L., Abel L., Dereure J., Dedet J., Dessein A., Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis, *C R Biol* (2006) 329:863-70.
- [10] Enserink M. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* (2000) 290:1881-3.

[11] França-Silva J., da Costa R., Siqueira A., Machado-Coelho G., da Costa C., Mayrink W., Vieira E., Costa J., Genaro O., Nascimento E., Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil, *Vet.Parasitol.* (2003) 111:161-73.

[12] Gaskin A., Schantz P., Jackson J., Birkenheuer A., Tomlinson L., Gramiccia M., Levy M., Steurer F., Kollmar E., Hegarty B., Ahn A., Breitschwerdt E., Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel, *J.Vet.Intern.Med.* (2002) 16:34-44.

[13] Gruenheid S., Pinner E., Desjardins M., Gros P., Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome, *J.Exp.Med.* (1997) 185:717-30.

[14] Kennedy L., Barnes A., Short A., Brown J., Lester S., Seddon J., Fleeman L., Francino O., Brkljacic M., Knyazev S., Happ G., Ollier W., Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes, *Tissue Antigens* (2007) 69 Suppl 1:272-88.

[15] Kimchi-Sarfaty C., Oh J., Kim I., Sauna Z., Calcagno A., Ambudkar S., Gottesman M., A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science* (2007) 315:525-8.

[16] McNeil D., *Epidemiological research methods*, John Wiley and Sons, NY, 1996.

[17] Mohamed H., Ibrahim M., Miller E., White J., Cordell H., Howson J., Peacock C., Khalil E., El Hassan A., Blackwell J., SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan, *Eur.J.Hum.Genet.* (2004) 12:66-74.

[18] Owens S., Oakley D., Marryott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T., Newton A., Steurer F., Schantz P., Giger U., Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* (2001) 219:1076-83.

[19] Quinnell R., Kennedy L., Barnes A., Courtenay O., Dye C., Garcez L., Shaw M., Carter S., Thomson W., Ollier W., Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism, *Immunogenetics* (2003) 55:23-8.

- [20] Raymond M. & Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, *J.Hered.* (1995) 86:248-249.
- [21] Rosypal A., Zajac A., Lindsay D., Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States, *Vet.Clin.North Am.Small Anim.Pract.* (2003) 33:921-37, viii.
- [22] Roura X., Sánchez A., Ferrer L., Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique, *Vet.Rec.* (1999) 144:262-4.
- [23] Sanchez-Robert E., Altet L., Sanchez A., Francino O., Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study, *J.Hered.* (2005) 96:755-8.
- [24] Schantz P., Steurer F., Duprey Z., Kurpel K., Barr S., Jackson J., Breitschwerdt E., Levy M., Fox J., Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America, *J.Am.Vet.Med.Assoc.* (2005) 226:1316-22.
- [25] Searle S., Blackwell J., Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human *NRAMP1* gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility, *J.Med.Genet.* (1999) 36:295-9.
- [26] Shaw S., Lerga A., Williams S., Beugnet F., Birtles R., Day M., Kenny M., Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR, *Vet.Rec.* (2003) 152:176-7.
- [27] Smith P., Zhang C., Wang J., Chew S., Zhang M., Krainer A., An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers, *Hum.Mol.Genet.* (2006) 15:2490-508.
- [28] Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., The Ibizan hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection, *Vet.Parasitol.* (2000) 90:37-45.
- [29] Solano-Gallego L., Morell P., Arboix M., Alberola J., Ferrer L., 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.* (2001) 39:560-3.

[30] Stephens M., Donnelly P., A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data, *Am.J.Hum.Genet.* (2003) 73:1162-9.

[31] Stephens M., Smith N.,Donnelly P., A new statistical method for haplotype reconstruction from population data, *Am.J.Hum.Genet.* (2001) 68:978-89.

[32] Tazi J., Durand S.,Jeanteur P., The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy, *Trends Biochem.Sci.* (2005) 30:469-78.

[33] Wingender E., Chen X., Hehl R., Karas H., Liebich I., Matys V., Meinhardt T., Prüss M., Reuter I.,Schacherer F., TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation, *Nucleic Acids Res.* (2000) 28:316-9.

[34] Xie T., Ding D., Tao X.,Dafu D., The relationship between synonymous codon usage and protein structure, *FEBS Lett.* (1998) 434:93-6.

[35] Zaahl M., Robson K., Warnich L.,Kotze M., Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: opposite effect in the presence of -237C-->T, *Blood Cells Mol.Dis.* (2004) 33:45-50.

**Table 1.** Animals per breed included in the sequencing of the *Slc11a1* gene for the SNP characterization (SNP), in the case-control extended cohort and in a reduced, fully matched cohort (1:1 ratio), chosen at random from the available dogs, to confirm the significant associations.

<b>Breed</b>	<b>SNP</b>	<b>Extended cohort</b>		<b>Breed matched cohort</b>	
		<b>Case</b>	<b>Control</b>	<b>Case</b>	<b>Control</b>
Boxer	5	12	23	12	12
German Shepherd	1	9	20	9	9
Rottweiler	1	2	14	2	2
Foxhound	12	10	2	2	2
Siberian Husky	-	3	7	3	3
Miniature Schnauzer	3	3	1	1	1
Standard Schnauzer	-	3	3	3	3
Doberman Pinscher	1	2	6	2	2
Beagle	7	4	3	3	3
Bulldog	1	2	4	2	2
Cocker Spaniel	-	2	4	2	2
Great Dane	-	2	2	2	2
Spanish mongrel	-	5	0	-	-
Teckel	-	1	4	1	1
Pointer	-	1	3	1	1
Akita Inu	-	1	2	1	1
Alaskan Malamute	-	1	1	1	1
Basset Hound	1	1	0	-	-
German Shorthaired Pointer	1	1	0	-	-
Ibizan Hound (N=58)	7				
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>65</b>	<b>99</b>	<b>47</b>	<b>47</b>

**Table 2.** PCR conditions and thermocycling profiles used for canine *Slc11a1* sequencing and polymorphism analysis. (1) PCR forward primer; (2) PCR reverse primer; (3) FAM-labelled primers; (4) Enzymes and commercial kits: (A) GC-Rich PCR amplification system (Roche); (B) Eco-Taq polymerase (Ecogen). Region indicates the location of the fragment amplified (PR: promoter; I: intron; E: exon).

Region	Position (nt)	PCR primers (5'-3')	PCR product (bp)	Primer (µM)	Anneal	Enzyme <sup>(4)</sup>	Target	Snapshot primers (5'-3')
PR	28-566	① CCTCTCAGCTAGTCTGAGCC	539	0.2	0.2	A	T151C	Direct sequencing
		② CAGCTGATCTCAGCTGTCCCTC		55 °C		35	A180G G318A	
							Gstretch-321	
PR-I2	28-1641	③ CCTCTCAGCTAGTCTGAGCC	1588	0.3	63 °C	B	A739G	(AT) <sup>1</sup> ACTGACTCTCCCCGCCCTCC
		④ CATCCTGTCAATCCTGAAGG				35		
I1	1185-1308	⑤ GAGTCTGCTTGAGATTCTCTC	133/145	0.2	55 °C	B	µsat1253	capillar electrophoresis
		⑥ TATCACCTCCACCCTTCAAAC				25		
I2-I6	2251-4444	⑦ GACGGAATGAGTGCAGGGC	2173	0.3	63 °C	B	C2336T	(AT) <sup>6</sup> AAAGGCCACTGCTCCACG
		⑧ ATCCCCGTGGTGTAGACGAAG				35	T2588C	(AT) <sup>7</sup> ACGTTTATGCCCCATTGAACT
							G3920T	(AT) <sup>11</sup> AGGTGGCAAGCATCTGAGACA
I3-I4	2622-2948	⑨ CTGCCCTACCAGGGTCA	347	0.3	63 °C	B	In2724del	capillar electrophoresis
		⑩ AGCTGTACATGGCTGTTTGGG				35		



(Table 2)

Region	Position (nt)	PCR primers (5'-3')	PCR product (bp)	Primer (µM)	Anneal	Enzyme <sup>(4)</sup>	Cycles	Target	Snapshot primers (5'-3')
I6-E9	4461-5786	GGATGCTCCTAGCACAGATGC	1304	0.3	0.3	B	B	A4549G	(AT) <sup>9</sup> ACCGGTTAGTGGCCCAATATCTCTAG
		GGTAGAAGGCCTGCCCGAA		63 °C	63 °C	35	35	C4580T	(AT) <sup>10</sup> ACACAGTAGCAACAACAACAAAAATTGTA
								C4859T	(AT) <sup>6</sup> AGTACGTGGTGGCACGTCC
I9-E11	6738-7083	AATTCTTCCCAATCTGAGCC	411	0.3	0.3	B	B	C6828G	(AT) <sup>8</sup> AGACTGTACCCTGTACCGGGC
		AAGACGCAGCCAGCATCAC		63 °C	63 °C	35	35	C6920T	(AT) <sup>1</sup> AGCAGACGTTGAAGTGGG
								C7623T	(AT) <sup>10</sup> CCACACCACCAAGTGCCCA
I11-E13	7482-8232	CCACTAGGGTCAGAGCTACCC	711	0.4	0.4	A	A	C7626T	(AT) <sup>7</sup> AGAAGCCCTGGGGGAGG
		CGTAAGGATAGGCAGCACCCG		56 °C	56 °C	40	40	G7715A	(AT) <sup>3</sup> ACCTGCCCAACCCGTGCTC
								T7825Del	(AT) <sup>11</sup> AGACACCTGCGGTTTCTGCTT
								G7910A	(AT) <sup>13</sup> ACCACCTTGCCCTCTAAGGCTCTC
								A7931T	(AT) <sup>10</sup> CTGCCCAGTGGGGACAG
I13-3'UTR	8401-9460	TTAAGCAACGTGTGCAAGGG	1060	0.4	0.4	A	A	C8542T	(AT) <sup>4</sup> GAGGGCCGGGGGG
		GCACTCAACAGCATTCATTCC		56 °C	56 °C	40	40	G9275C	(AT) <sup>10</sup> AGCTCCAGTGAGTGAATTAATCTCCA

**Table 3.** Results of genotypic association test for the SNPs significantly associated with CVL for the breed matched cohort assuming different genetic models: (1) general, (2) recessive, (3) codominant, and (4) dominant. (\*) p-value <0.05; (\*\*) p-value <0.01. (5) Risk Genotype corresponds to the genotype positively associated with cases. +: relevant odds ratio.

SNP	Risk Genotype <sup>(5)</sup>	Odds Ratio	95% CI	p-value
A4549G	AG <sup>(1)</sup>	-	-	0.003**
	GG <sup>(2)</sup>	5.29+	1.05-26.68	0.024*
	AG <sup>(3)</sup>	5.29+	1.05-26.68	0.024*
	AG + GG <sup>(4)</sup>	6.78+	2.02 – 22.76	0.001**
C4859T	TT <sup>(1)</sup>	-	-	0.001**
	TT <sup>(2)</sup>	10.68	0.56 – 204.85	0.119
	CT <sup>(3)</sup>	8.68+	1.81 – 41.77	0.003**
	CT + TT <sup>(4)</sup>	13.44+	2.85 – 63.39	0.004**
C8542T	TT <sup>(1)</sup>	-	-	0.018*
	TT <sup>(2)</sup>	1.44	0.60 – 3.49	0.359
	CC +TT <sup>(3)</sup>	10.5+	1.27 – 86.9	0.098
	CC <sup>(4)</sup>	1.45	0.63 – 3.37	0.366

**Table 4.** Genotype and allele frequencies of the *Slc11a1* gene SNPs significantly associated with CVL for the breed matched cohort and for the Ibizan Hound cohort. N: is the number of alleles.

SNP	Genotype			Allele		N
	AA	AG	GG	A	G	
A4549G	AA	AG	GG	A	G	
Case	0.59	0.21	0.20	0.69	0.31	94
Control	0.88	0.05	0.07	0.92	0.08	94
Ibizan Hound	0.82	0.16	0.02	0.90	0.10	90
C4859T	CC	CT	TT	C	T	
Case	0.62	0.29	0.09	0.76	0.24	94
Control	0.93	0.07	-	0.97	0.03	94
Ibizan Hound	0.79	0.21	-	0.89	0.11	94
C8542T	CC	CT	TT	C	T	
Case	0.59	0.02	0.39	0.60	0.40	94
Control	0.49	0.19	0.32	0.59	0.41	94
Ibizan Hound	1.00	-	-	1.00	-	114

**Table 5.** Allele frequencies distribution for the most representative breeds of the *Slc11a1* gene SNPs significantly associated to CVL from the extended case-control cohort. (cs) case (ct) control dogs. Breeds with N<4 were omitted.

Breed			A4549G		C4859T		C8542T	
		N	A	G	C	T	C	T
Ibizan Hound		58	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Boxer	cs	12	1.00	-	1.00	-	-	1.00
	ct	23	1.00	-	1.00	-	0.14	0.86
German Sheperd	cs	9	0.90	0.10	0.92	0.08	1.00	-
	ct	20	0.95	0.05	0.97	0.03	0.85	0.15
Siberian Husky	cs	3	0.67	0.33	0.50	0.50	1.00	-
	ct	7	0.88	0.12	0.80	0.20	1.00	-
Beagle	cs	4	1.00	-	1.00	-	1.00	-
	ct	3	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Great Dane	cs	2	0.75	0.25	0.50	0.50	0.33	0.67
	ct	2	0.83	0.17	0.83	0.17	0.33	0.67
Rottweiler	cs	2	-	1.00	0.75	0.25	1.00	-
	ct	14	0.46	0.54	0.96	0.04	1.00	-
Foxhound	cs	10	0.80	0.20	0.80	0.20	1.00	-
	ct	2	1.00	-	1.00	-	1.00	-
Miniature Schnauzer	cs	3	-	1.00	0.12	0.88	0.67	0.33
	ct	1	1.00	-	1.00	-	0.65	0.35
Standard Schnauzer	cs	3	-	1.00	-	1.00	0.70	0.30
	ct	3	1.00	-	1.00	-	0.63	0.37

**(Table 5)**

Breed			A4549G		C4859T		C8542T		
			N	A	G	C	T	C	T
Doberman Pinscher	cs	2	0.75	0.25	1.00	-	0.50	0.50	
	ct	6	0.75	0.25	1.00	-	0.75	0.25	
Bulldog	cs	2	1.00	-	1.00	-	1.00	-	
	ct	4	1.00	-	1.00	-	1.00	-	
Cocker Spaniel	cs	2	1.00	-	1.00	-	0.75	0.25	
	ct	4	1.00	-	1.00	-	0.25	0.75	
Teckel	cs	1	0.50	0.50	0.50	0.50	-	1.00	
	ct	4	0.34	0.66	0.50	0.50	-	1.00	
Pointer	cs	1	-	1.00	0.50	0.50	-	1.00	
	ct	3	0.83	0.17	0.83	0.17	0.67	0.33	

**Table 6.** (A) Haplotype confirmed by trio-based family in the matched case-control population and association test with CVL for all the polymorphisms described in the *Slc11a1* gene. (\*) p-value <0.05; (\*\*) p-value <0.01. (+) Haldane correction applied. (B) Haplotype estimation for the Ibizan Hound cohort (IB). Haplotypes with a frequency of N<5 have been discarded. N: number of dogs that present certain haplotype. (1) D: deletion (14 bp), ND: No deletion; (2) D: deletion (1 bp), T: No deletion. Data in **bold** are discussed in the text.

(A)	Id	N	OR(95 CI)	P-value	T	A	G	G-strech	A	μsat	C	T	ND <sup>(1)</sup>	G	A	C	C	C	C	C	C	G	T <sup>(2)</sup>	G	A	G	C	G																			
CASE-CONTROL																																															
A	40	0.70 (0.35-1.42)	0.32	-	-	-	9	-	-	145	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
B	28	0.73 (0.33-1.64)	0.45	-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
C	25	1.35 (0.58-3.14)	0.48	-	-	-	8	G	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
D	9	8.81 (1.08-71.93)	0.01*	-	-	-	8	-	145	-	C	-	T	G <sup>+</sup>	-	T <sup>++</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
E	6	0.50 (0.09-2.80)	0.42	-	-	-	8	-	141	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
(B)																																															
IB HOUND COHORT																																															
F	36	-	-	-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
G	25	-	-	-	-	-	8	G	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H	12	-	-	-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I	11	-	-	-	-	-	8	-	141	-	-	-	T	G	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
J	10	-	-	-	-	-	8	-	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
K	6	-	-	-	-	-	8	G	145	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**SUPPLEMENTARY FILE**

**Table A.** Results of genotypic association test for the SNPs significantly associated with CVL for the extended case-control cohort assuming different genetic models: (1) general, (2) recessive, (3) codominant, and (4) dominant. (\*) p-value <0.05; (\*\*) p-value <0.01. (5) Risk Genotype corresponds to the genotype positively associated with cases. We have applied a Fisher exact test for the analysis of the SNPs of the promoter (A180G and G318A). (+) Haldane correction applied.

SNP	Risk Genotype <sup>(5)</sup>	Odds Ratio	95% CI	p-value
A180G	GG <sup>(1)</sup>	-	-	0.082
	GG <sup>(2)</sup>	3.70+	0.15-92.31+	0.451
	AG <sup>(3)</sup>	8.90	0.45-175.60	0.089
	AG+GG <sup>(4)</sup>	11.63+	0.61-220.22+	0.039*
G318A	AA	-	-	0.082
	AA	6.26+	0.30-132.75+	0.202
	AG	6.26+	0.30-132.75+	0.202
	AA+AG	11.63+	0.61-220.22+	0.039*
A4549G	GG	-	-	0.140
	GG	1.83	1.02-3.30	0.042*
	AA+GG	1.03	0.44-2.40	0.944
	AG+GG	1.57	0.76-3.26	0.262
C4859T	TT	-	-	0.006**
	TT	14.45+	0.76-273.68+	0.013*
	CT	2.18	0.93-5.08	0.067
	CT+TT	3.04	1.34-6.91	0.006**





**Títol:** Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog

**Autors:** E. Sanchez-Robert, L. Altet, A. Barnes, A. Short, B. Ollier, L.J. Kennedy, A. Sanchez i O. Francino

**Estatus:** en preparació



**DRAFT**

# **Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog**

Collaborators:

Universitat Autònoma de Barcelona

Elisenda Sanchez-Robert

Laura Altet

Armand Sanchez

Olga Francino

University of Liverpool

Annette Barnes

CIGMR, University of Manchester

Lorna J Kennedy

Andrea Short

Bill Ollier

**ABSTRACT**

Leishmaniasis is a disease of man and also wild and domestic animals and it is found in 88 countries, mainly in the tropics and subtropics. Moreover, leishmaniasis is emerging within non endemic areas mostly because of transportation of dogs from endemic areas and climatic changes with expansion of the sandfly vector. Worldwide, the economic and human welfare toll is enormous. Many studies have been undertaken in an attempt to understand the pathogenesis of this disease, especially in the dog, a major reservoir for *Leishmania*. The aim of the present study is to insight into the knowledge of the genes involved in the response to *Leishmania* infection. To address this issue we have analyzed a case-control cohort of 36 dogs for 97 SNPs of 11 candidate genes (IL-1, 2, 4, 6, 10 and 12; TNF; *MIF*; *NOS*; *Slc11a1* and *VDR*), and we have examined DLA-DRB1/DQA1/DQB1 haplotypes. The genotyping has been performed in 4 breeds of high prevalence of the disease and in a cohort of 51 Ibizan Hounds as a resistant breed. Data analysis revealed that 3 SNPs were significantly associated to CVL: 1 SNP identified in IL-6 and 2 SNPs identified in *VDR* gene. Moreover, we have identified an allele (DRB1\*01301) associated with resistance and one allele (DQB1\*02301) associated with susceptibility to CVL and we have corroborated the susceptibility allele DRB1\*01502 previously described.

## 1. INTRODUCTION

Leishmaniasis is caused by obligate intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania* and it is transmitted by sandflies. It is a disease of man and also wild and domestic animals and the dog is considered the main peridomestic reservoir of the parasite. The zoonosis caused by *L. infantum* is known as visceral leishmaniasis. Canine visceral leishmaniasis (CVL) is endemic in the Mediterranean basin, Middle East, and South America and the prevalence of *Leishmania* infection can reach 67% in these areas (Solano-Gallego et al., 2001). Moreover, leishmaniasis is emerging within non endemic areas mostly because of transportation of dogs from endemic areas and climatic changes with expansion of the sandfly vector. Hence CVL has been reported in many countries in Europe including the United Kingdom (Shaw et al., 2003) and in North America particularly in the English and American foxhounds (Enserink, 2000; Owens et al., 2001; Rosypal et al., 2003; Schantz et al., 2005; Duprey et al., 2006). Worldwide, the economic and human welfare toll is enormous. Many studies have been undertaken in an attempt to understand the pathogenesis of this disease and genetic factors involved in the resistance/susceptibility of the host to CVL have been suggested. Significant correlations with CVL have been found in MHC class II genes for susceptibility (allele DLA-DRB1\*01502; Quinnell et al. 2003) and *Slc11a1* gene (solute carrier family 11a member 1; formerly NRAMP1) (Altet et al., 2002; Sanchez-Robert et al., 2005). Moreover, SNPs in the TNF and IL-4 genes had a strong association with protective immunological phenotype in Brazilian mongrel dogs exposed to natural *L. infantum* (Barnes et al, BSAVA 2007). In human other genes have been also associated to leishmaniasis, as IL-6 and IFN-g receptor (Castellucci et al., 2006; Mohamed et al., 2004). The aim of the present study is to insight into the knowledge of the genes involved in the response to *Leishmania* infection in dog. To address this issue we have analyzed 97 SNPs of 10 candidate genes: interleukins-1, 4, 6, 10 and 12; TNF; *MIF* (*Migration-Inhibitory Factor*); *NOS* (*Nitric Oxide Synthase*); *Slc11a1* and *VDR* (*Vitamin D Receptor*) in a breed-matched case-control study of 36 dogs of 4 different breeds (Boxer, Doberman, German Shepherd and Beagle) known to be predisposed to CVL (França-Silva et al., 2003; Sanchez-Robert et al., 2005). We have also analyzed a cohort of 51 Ibizan Hounds, a breed described as resistant to CVL (Solano-Gallego et al., 2000). All dogs have been DLA-typed.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Animal cohort

The breed-matched case-control study included 36 dogs from 4 different susceptible breeds (16 Boxers, 12 German Shepherds, 4 Dobermans and 4 Beagles). The case animals were 18 dogs that have developed clinically severe disease in which *Leishmania* was identified concomitantly by positive *Leishmania* PCR and positive anti-*Leishmania* antibody titre. 18 healthy dogs from the same breeds and geographical regions were selected to match the case animals. The control dogs have been selected among individuals older than 5 years presented to veterinary hospitals for regular health checks, which have never shown signs of CVL, but would have been exposed to *Leishmania* organisms (endemic area). We have also added 4 beagle dogs experimentally infected with *L. infantum*; 2 cases that progressed toward clinical illness and achieved high parasite load and 2 control dogs that remained symptomless during the study with no parasite or very low number of parasites detected along the follow-up. Moreover, a cohort of 51 Ibizan Hounds was also examined as a resistant breed. All these dogs were previously analyzed as part of other studies for the candidate gene *Slc11a1* (Sanchez-Robert et al., submitted) and for the longitudinal analysis of cytokine gene expression (Sanchez-Robert et al., submitted).

### 2.2 Genotyping

*Candidate genes.* A panel of 97 SNPs was used to genotype 11 candidate genes (IL-1, 2, 4, 6, 10 and 12; TNF; *MIF*; *NOS*; *Slc11a1* and *VDR*). SNPs were genotyped at the Centre for Integrated Genomic Medical Research (CIGMR, University of Manchester) using the Sequenom platform (Sequenom Inc., San Diego, CA, USA).

*MHC typing.* DLA-DRB1-DQA1-DQB1 typing was performed at the CIGMR by a standard protocol of sequence based typing (SBT) (Kennedy et al. 1998). Three locus (DLA-DRB1, DQA1, DQB1) haplotypes were established using an interactive and subtractive approach as described previously (Kennedy et al. 2002a; Kennedy et al. 2002b).

### 2.3 Statistical analysis

Statistical differences between case and control group were tested for significance by the chi-square analysis or Fisher's exact test with the Haldane correction. The risk factor

in case *versus* control computing odds ratios (OR) with 95% confidence interval was evaluated. A p-value < 0.05 was regarded as statistically significant. Data analyses for biallelic polymorphisms were performed with SNPator genetic software package (<http://www.snpator.org/public/principal/index.php>). The association study applied contingency tables assuming different genetic models: (i) general, (ii) recessive, (iii) codominant and (iv) dominant.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

We have analyzed 97 SNPs in 11 candidate genes related to the immune response (IL-1, 2, 4, 6, 10 and 12; TNF, *MIF*, *NOS*, *Slc11a1* and *VDR*) and we have performed the DLA-DRB1/DQA1/DQB1 genotyping in a breed-matched case-control cohort of 36 dogs of 4 different breeds (Boxer, Doberman, German Shepherd and Beagle) known to be predisposed to CVL (França-Silva et al., 2003; Sanchez-Robert et al., 2005). Furthermore, we have analyzed a cohort of 51 Ibizan Hounds, a breed described as resistant to CVL (Solano-Gallego et al., 2000).

Data analysis revealed that 3 of the 97 SNPs found in 2 different genes were associated to CVL: SNP 20R191 identified in the 3' flanking region of the IL-6 and SNPs 13M453 and 15S439 identified in the intron 7 of the *VDR* gene. Genotype and allele frequencies for the genes with SNPs significantly associated to CVL and the results of genotypic association test for the breed matched case-control cohort are described in Table 1. Genotype distribution for each breed is shown in Table 2.

The SNPs in IL-6 and *VDR* associated to CVL affect non-coding regions and are likely to be linked to the causal mutation, although they could have functional effects by themselves. It has been described a polymorphism in intron 4 of the human *Slc11a1* gene associated with increased susceptibility to leishmaniasis, probably due to linkage disequilibrium between this polymorphism and an additional SNP upstream in the promoter (Mohamed et al., 2004). However, there is increasing evidence showing that a considerable number of disease-associated sequence variance are identified in intronic or 3' flanking regulatory regions (reviewed by Chen et al., 2006). Intronic regulatory elements, such as intronic splicing enhancers/silencers (ISE/ISS) (Tazi et al., 2005), are

involved in the pre-mRNA splicing and, therefore, affect the mature mRNA and consequently the protein product, despite affecting non-coding regions.

IL-6 acts as a proinflammatory cytokine as well as an immunosuppressive cytokine promoting Th2 cell differentiation and inhibiting Th1 cell differentiation (Van Snick, 1990; Diehl et al., 2000; Diehl et al., 2002; Diehl and Rincon, 2002). A SNP described at nucleotide position -174G/C of the human promoter region of the IL-6 gene has been associated with functional differences in levels of IL-6 (Fishman et al., 1998; Terry et al., 2000) and recently with mucosal leishmaniasis (Castellucci et al., 2006). The authors of this study suggest that low IL-6 production in carriers of the C allele may contribute to a reduced capacity to induce Th2 cell differentiation and generates an exaggerated Th1 cell response, expressing high levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and leading to adverse pathological manifestations and tissue destruction.

Vitamin D<sub>3</sub> is known to act as an important regulator of calcium and bone metabolism but it can also influence the immune response (DeLuca, 1988; DeLuca and Cantorna, 2001). Vitamin D<sub>3</sub> can act as an important immunosuppressive modulator on adaptive immune responses, suppressing T-cell proliferation and decreasing the production of the Th1 cytokines such as IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , leading to the inhibition of Th1 cell development (Lemire et al., 1985; Lemire, 1992). Less is known about the effects of Vitamin D<sub>3</sub> on innate immunity. It has been demonstrated that Vitamin D<sub>3</sub> is a potent suppressor of IFN- $\gamma$ -mediated macrophage activation and this deactivation was strictly depending on a functional *VDR* (Helming et al., 2005). The biological effects of Vitamin D<sub>3</sub> are mediated by the vitamin D receptor (*VDR*) and polymorphisms in the human *VDR* gene have been associated with susceptibility to a number of infectious diseases such as tuberculosis, leprosy, dengue fever and hepatitis B virus-induced chronic hepatitis (Bellamy et al., 1999; Roy et al., 1999; Wilkinson et al., 2000; Loke et al., 2002; Roth et al., 2004). A recent study reported that vitamin D receptor signalling contributes to susceptibility to murine infection with *Leishmania major* (Ehrchen et al., 2007).

The results of DLA typing for the case-control cohort are shown in Table 3. The results for each breed and the association analysis are presented in Table 4. We have identified susceptibility alleles for CVL, the allele DRB1\*01502 (P=0.02), previously associated



to CVL in mongrel dogs from Brazil (Quinnell et al., 2003), and the allele DQB1\*02301 (P=0.03). In this study these two alleles were found in the same haplotype in the boxer breed. The frequency of this haplotype was 6% in unaffected animals compared with 44% in cases. Moreover, we have identified an allele that could be associated to resistance in this breed (DRB1\*01301; P=0.05).

The MHC is likely to have a major role in resistance and susceptibility to infections but the mechanism by which a particular MHC class II allele determines susceptibility to leishmaniasis is unclear. MHC class II alleles determine the ability to present individual antigens to T cell receptors, through amino acid variation in the hypervariable regions (HVR), and alleles DRB1\*01502 and DQB1\*02301 may be less efficient in their ability to present a specific antigen. Conversely, it would be possible that these alleles present an exacerbatory antigen. It has been reported in murine vaccination studies that certain antigens can exacerbate rather than protect against leishmaniasis by inducing a non-protective IL-10 or IL-4 response (Roberts et al. 2005). The resistance allele DRB1\*01301 could confer an advantage in the presentation of a specific antigen, determining a protective immune response. Alternatively, they could be in linkage disequilibrium with susceptibility alleles at other MHC loci such as TNF, which has been shown to control human mucosal or canine leishmaniasis (Cabrera et al. 1995; Barnes et al, BSAVA 2007).

The haplotype DLA-DRB1\*00601/DQA1\*005011/DQB1\*00701 was identified in Ibizan hounds and only in resistant Boxer and Doberman dogs, but in none of the susceptible animals. On the other hand the alleles DRB1\*06901 and DQB1\*04801 are frequent in the Ibizan hound breed and they seem to be specific for this breed, since they have not been identified in any of the 3,600 previously characterised dogs, from over 85 different breeds (Kennedy L., personal communication). These three haplotypes may thus play a role in the observed resistance of this breed. It would be interesting to analyze the MHC for other breeds supposed to be resistant to CVL, as the Pharaoh dog (Ferrer L., personal communication), to determine if these haplotypes are breed specific or, conversely, they contribute to the resistance to CVL.

In conclusion, our data show that IL-6 and *VDR* genes are likely to be associated to CVL. Moreover, this study provides confirmatory evidence of the association of MHC-

II with CVL. To confirm the role of these candidate genes on CVL pathogenesis, it would be interesting to analyze these genes in our enlarged case-control population (Sanchez-Robert et al., submitted).

**REFERENCES**

- Altet L., Francino O., Solano-Gallego L., Renier C. and Sanchez A. 2002. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun* 70: 2763-71.
- Barnes A., Kennedy L., Ollier B., Short A., Courtenay O., Soremekun S., Garcez L., Altet L., Sanchez-Robert E., Sanchez A., Francino O. and Quinnell R. 2007. Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog. *British Small Animal Veterinary Association (BSAVA)*.
- Bellamy R., Ruwende C., Corrah T., McAdam K., Thursz M., Whittle H. and Hill A. 1999. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* 179: 721-4.
- Cabrera M., Shaw MA., Sharples C., Williams H., Castes M., Convit J. and Blackwell JM. 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 182: 1259-64.
- Castellucci L., Menezes E., Oliveira J., Magalhaes A., Guimaraes L., Lessa M., Ribeiro S., Reale J., Noronha E., Wilson M., Duggal P., Beaty T., Jeronimo S., Jamieson S., Bales A., Blackwell J., de Jesus A. and Carvalho E. 2006. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* 194: 519-27.
- Chen J., Férec C. and Cooper D. 2006. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet* 120: 1-21.
- DeLuca H. 1998. The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J* 2: 224-36.
- DeLuca H. and Cantorna M. 2001. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 15: 2579-85.

Diehl S., Anguita J., Hoffmeyer A., Zapton T., Ihle J., Fikrig E. and Rincón M. 2000. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity* 13: 805-15.

Diehl S., Chow C., Weiss L., Palmetshofer A., Twardzik T., Rounds L., Serfling E., Davis R., Anguita J. and Rincón M. 2002. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J Exp Med* 196: 39-49.

Diehl S. and Rincón M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* 39: 531-6.

Duprey Z., Steurer F., Rooney J., Kirchhoff L., Jackson J., Rowton E. and Schantz P. 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 12: 440-6.

Ehrchen J., Helming L., Varga G., Pasche B., Loser K., Gunzer M., Sunderkötter C., Sorg C., Roth J. and Lengeling A. 2007. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *FASEB J* 21: 3208-18.

Enserink M. 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science* 290: 1881-3.

Fishman D., Faulds G., Jeffery R., Mohamed-Ali V., Yudkin J., Humphries S. and Woo P. 1998. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102: 1369-76.

França-Silva J., da Costa R., Siqueira A., Machado-Coelho G., da Costa C., Mayrink W., Vieira E., Costa J., Genaro O. and Nascimento E. 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 111: 161-73.

Helming L., Böse J., Ehrchen J., Schiebe S., Frahm T., Geffers R., Probst-Kepper M., Balling R. and Lengeling A. 2005. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. *Blood* 106: 4351-8.

Kennedy L., Barnes A., Happ G., Quinnell R., Bennett D., Angles J., Day M., Carmichael N., Innes J., Isherwood D., Carter S., Thomson W. and Ollier W. 2002a. Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue antigens* 59: 194-204.

Kennedy L., Barnes A., Happ G., Quinnell R., Courtenay O., Carter S., Ollier W. and Thomson W. 2002b. Evidence for extensive DLA polymorphism in different dog populations. *Tissue antigens* 60: 43-52.

Kennedy L., Barnes A., Short A., Brown J., Lester S., Seddon J., Fleeman L., Francino O., Brkljacic M., Knyazev S., Happ G. and Ollier W. 2007. Canine DLA diversity: 1. New alleles and haplotypes. *Tissue antigens* 69 Suppl 1: 272-88.

Kennedy L., Carter S., Barnes A., Bell S., Bennett D., Ollier W. and Thomson W. 1998. Nine new dog DLA-DRB1 alleles identified by sequence-based typing. *Immunogenetics* 48: 296-301.

Lemire J. 1985. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem* 49: 26-31.

Lemire J., Adams J., Kermani-Arab V., Bakke A., Sakai R. and Jordan S. 1992. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol* 134: 3032-5.

Loke H., Bethell D., Phuong C., Day N., White N., Farrar J. and Hill A. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and Fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg* 67: 102-6.

Mohamed H., Ibrahim M., Miller E., White J., Cordell H., Howson J., Peacock C., Khalil E., El Hassan A. and Blackwell 2004. J. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in The Sudan. *Eur J Hum Genet* 12: 66-74.

Owens S., Oakley D., Marryott K., Hatchett W., Walton R., Nolan T., Newton A., Steurer F., Schantz P. and Giger U. 2001. Transmission of visceral leishmaniasis

through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc* 219: 1076-83.

Quinnell R., Kennedy L., Barnes A., Courtenay O., Dye C., Garcez L., Shaw M., Carter S., Thomson W. and Ollier W. 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 55: 23-8.

Roberts MT., Stober CB., McKenzie AN. and Blackwell JM. 2005. Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 73: 7620-8.

Rosypal A., Zajac A. and Lindsay D. 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33: 921-37, viii.

Roth D., Soto G., Arenas F., Bautista C., Ortiz J., Rodriguez R., Cabrera L. and Gilman R. 2004. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 190: 920-7.

Roy S., Frodsham A., Saha B., Hazra S., Mascie-Taylor C. and Hill A. 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* 179: 187-91.

Sanchez-Robert E., Altet L., Sanchez A. and Francino O. 2005. Polymorphism of *Slc11a1* (*Nramp1*) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered* 96: 755-8.

Schantz P., Steurer F., Duprey Z., Kurpel K., Barr S., Jackson J., Breitschwerdt E., Levy M. and Fox J. 2005. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J Am Vet Med Assoc* 226: 1316-22.

Shaw S., Lerga A., Williams S., Beugnet F., Birtles R., Day M. and Kenny M. 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet Rec* 152: 176-7.

Solano-Gallego L., Llull J., Ramos G., Riera C., Arboix M., Alberola J. and Ferrer L. 2000. The Ibizian 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. and 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: 560-3.

Tazi J., Durand S. and Jeanteur P. 2005. The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy, *Trends Biochem.Sci.* 30:469-78.

Terry C., Loukaci V. and Green F. 2000. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 275: 18138-44.

Van Snick J. 1990. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: 253-78.

Wilkinson R., Llewelyn M., Toossi Z., Patel P., Pasvol G., Lalvani A., Wright D., Latif M. and Davidson R. 2000. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among Gujarati Asians in west London: a case-control study. *Lancet* 355: 618-21.

**Table 1.** Genotype and allele frequencies for the genes with SNPs significantly associated to CVL for the breed matched case-control cohort. (N): Number of dogs. Results of genotypic association test assuming different genetic models are also indicated. (\*) p-value <0.05; (\*\*) p-value <0.01.

SNP		Genotype			Allele		N	Significance
<b>IL-6</b>	<b>20R191</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b> <sup>(1)</sup>	<b>AA</b>	<b>G</b>	<b>A</b>		
	Case	0.44	0.50	0.06	0.69	0.31	18	$P = 0.011^*$
	Control	0.67	0.11	0.22	0.72	0.28	18	OR= 8.00 (1.41-45.41)
<b>VDR</b>	<b>13M453</b>	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b> <sup>(2)</sup>	<b>C</b>	<b>A</b>		
	Case	0.07	0.13	0.80	0.13	0.87	15	$P = 0.009^{**}$
	Control	0.07	0.60	0.33	0.37	0.63	15	OR=8.00 (1.52-42.04)
	<b>15S439</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b> <sup>(2)</sup>	<b>G</b>	<b>C</b>		
	Case	0.11	0.33	0.56	0.28	0.72	18	$P = 0.006^{**}$
Control	0.12	0.76	0.12	0.50	0.50	17	OR=9.37 (1.64-53.62)	

<sup>(1)</sup> Codominant genetic model assumed

<sup>(2)</sup> Dominant genetic model assumed



**Table 2.** Genotype distribution of the SNPs significantly associated to CVL for each breed of the case-control cohort. (N): Number of dogs.

Breed		N	IL-6_20R191			VDR_13M453			VDR_15S439		
			GG	GA	AA	CC	CA	AA	GG	GC	CC
Boxer	Case	8	0.75	0.25	-	0.17	0.33	0.50	0.25	0.25	0.50
	Control	8	1.00	-	-	0.14	0.72	0.14	0.12	0.88	-
German Shepherd	Case	6	0.17	0.67	0.16	-	-	1.00	-	0.33	0.67
	Control	6	0.50	0.34	0.16	-	0.40	0.60	-	0.60	0.40
Doberman Pinscher	Case	2	0.50	0.50	-	-	-	1.00	-	-	1.00
	Control	2	-	-	1.00	-	-	1.00	-	1.00	-
Beagle	Case	2	-	1.00	-	-	-	1.00	-	1.00	-
	Control	2	0.50	-	0.50	-	1.00	-	0.50	0.50	-
Ibizan Hound		51	-	0.20	0.80	0.07	0.54	0.39	0.12	0.54	0.34

**Table 3.** DLA haplotype distribution and association analysis for the case-control cohort. (\*) p-value <0.05. (N): Number of dogs. Haplotypes in **bold** are discussed in the text.

DRB1	DQA1	DQB1	Resistant dogs N=18	%	Susceptible dogs N=18	%
00101	00101	00201	-	-	1	3
00102	00101	00201	4	11	3	8
00201	00301	00501	-	-	1	3
00201	00901	00101	1	3	1	3
00401	00201	01501	7	19	8	22
00601	00401	01303	3	8	2	5
<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>	4	<b>11</b>	-	-
00901	00101	008011	-	-	1	3
01101	00201	01302	4	11	3	8
01201	00101	00201	-	-	1	3
01201	00401	013017	1	3	1	3
<b>01301*</b>	00101	00201	4	<b>11</b>	-	-
01501	00601	00301	6	17	3	8
01501	00601	<b>02301*</b>	1	3	2	<b>5</b>
<b>01502*</b>	00601	<b>02301*</b>	1	3	7	<b>20</b>
01801	00101	00802	-	-	1	3
04001	01001	01901	-	-	1	3

**Table 4.** DLA haplotype distribution and association analysis. (N) Number of dogs. (n) Number of haplotypes. (%) indicates the percentage of the haplotype. (\*) p-value <0.05. Haplotypes in **bold** are discussed in the text.

Breed	Resistant dogs			Susceptible dogs			DRB1	DQA1	DQB1
	N	n	%	N	n	%			
Boxer	8	7	44	8	8	50	00401	00201	01501
		4	25		-	-	<b>01301*</b>	00101	00201
		3	19		-	-	<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>
		1	6		7	44	<b>01502*</b>	<b>00601</b>	<b>02301*</b>
		1	6		1	6	01201	00401	013017
German shepherd	6	6	50	6	3	25	01501	00601	00301
		4	33		3	25	01101	00201	01302
		1	8		-	-	00102	00101	00201
		1	8		2	18	01501	00601	<b>02301*</b>
		-	-		1	8	00101	00101	00201
		-	-		1	8	00201	00301	00501
		-	-		1	8	01801	00101	00802
		-	-		1	8	04001	01001	01901
Doberman	2	3	75	2	2	50	00601	00401	01303
		1	25		-	-	<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>
		-	-		1	25	00901	00101	008011
		-	-		1	25	01201	00101	00201
Beagle	2	3	75	2	3	75	00102	00101	00201
		1	25		1	25	00201	00901	00101
Ibizan Hound	51	25	24				<b>01503</b>	<b>00601</b>	<b>04801</b>
		21	21				<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>
		19	19				<b>06901</b>	<b>00101</b>	<b>00201</b>
		15	15				00802	00301	00401
		14	14				00901	00101	008011
		7	7				01801	00101	00802
		1	1				00101	00101	00201



**Títol:** Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs

**Autors:** E. Sanchez-Robert, L. Altet, J. Alberola, A. Rodriguez-Cortés, A. Ojeda, L. López-Fuertes, M. Timon, A. Sanchez i O. Francino

**Estatus:** en revisió. *Veterinary Immunology and Immunopathology*



## **Longitudinal analysis of cytokine gene expression and parasite load in PBMC in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs.**

**E. Sanchez-Robert<sup>\*1</sup>, L. Altet<sup>1</sup>, J. Alberola<sup>2</sup>, A. Rodriguez-Cortés<sup>2</sup>, A. Ojeda<sup>2</sup>, L. López-Fuertes<sup>3</sup>, M. Timon<sup>3</sup>, A. Sanchez<sup>1</sup>, O. Francino<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Veterinary Molecular Genetics Service. Dept. of Animal and Food Science. Veterinary Fac. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

<sup>2</sup>Dept. of Pharmacology Therapeutics and Toxicology. Veterinary Fac. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

<sup>3</sup> Mologen Molecular Medicines, S.L. Madrid. Spain

*Running title:* Cytokine expression in Canine Leishmaniasis

\*Corresponding author:

Elisenda Sanchez-Robert

Servei Veterinari de Genètica Molecular. Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, Barcelona, SPAIN

Tel: +34 93 5812087; FAX: +34 93 5812106

E-mail: [Elisenda.Sanchez@uab.cat](mailto:Elisenda.Sanchez@uab.cat)

## ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania infantum*, an intracellular protozoan parasite that causes a severe infectious disease. To evaluate the gene expression profile associated to CVL *in vivo*, we have measured monthly during one year follow-up the IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells in experimentally infected dogs by real-time PCR. The parasite is detected in peripheral blood samples at four months post-infection and it is concomitant with the appearance of clinical signs. Although the 6 animals were infected with the same dose of parasite and they were kept under the same conditions, they exhibited different progression of the illness. While in two dogs no parasite or very low number of parasites were detected and they did not show any clinico-pathological abnormalities at the end of the study (L dogs), for the remaining dogs high parasite loads were detected and they developed clinical leishmaniasis (H dogs). In the early phase post-infection, L dogs lacked IL-4 or IL-13 expression suggesting some down-regulation of these cytokines, whereas an early IL-4 and IL-13 expression is detected in H dogs. After the detection of the parasite in peripheral blood takes place an increase of IFN- $\gamma$  expression that is significantly different for the two groups of dogs in relation to the clinical status or the parasite load (Wilcoxon test,  $P < 0.05$ ). The expression of IFN- $\gamma$  was lower for L dogs than for H dogs, reaching median (quartile 25-quartile 75) values of 1.68 (0.67-3.33) and 7.80 (1.19-15.32), respectively. These data suggest a balance production of Th1 and Th2 cytokines in CVL, and reinforce the role that IL-4 and IL-13 play in the first stage of infection, favouring parasite survival and the spread of infection.

**Key words:** *Leishmania*, dog, cytokine, real-time PCR, gene expression, longitudinal



## INTRODUCTION

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is caused by *Leishmania infantum*, an intracellular protozoan parasite that causes severe infectious disease in dogs and in humans. The parasite replicates within the macrophages and spreads to mononuclear phagocytes to cause a systemic disease (Awasthi et al., 2004). Dogs are the principal reservoir of the parasite and play a central role in the transmission cycle to humans. CVL is endemic in the Mediterranean basin, Middle East and South America. Furthermore, some cases have also been reported in North America and UK (Enserink, 2000; Rosypal et al., 2003; Shaw et al., 2003).

Several studies in murine models have demonstrated that the generation of protective immunity against leishmaniasis is T-cell and cytokine mediated (Liew et al., 1982; Sheppard et al., 1983; Scott et al., 1989; Liew, 1990; Cox and Liew, 1992). Whereas susceptibility to *L. major* infection in mice is associated with Th2-type cells producing IL-4 and IL-13, resistance is promoted by the expansion of Th1-type cells that produce IL-12 and IFN- $\gamma$  (Heinzel et al., 1991; Scott, 1993). In *L. major* infection the Th2 response suppresses Th1 cytokine production and leads to murine disease progression (Wilson et al., 2005). However, this polarization of the immune response is not the general rule in all *Leishmania* infections in the murine models due to the role of T regulatory (Treg) cells, a subset of T cells which have an immunosuppressive function (Belkaid et al., 2002). Treg cells suppress immune responses via cell-cell interactions and/or the production of suppressor cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  (Taylor et al., 2006). This role is accomplished in the infection with *L. infantum*, where Th1 response is partially suppressed by IL-10 and TGF- $\beta$  without Th2 cytokine production (Wilson et al., 2005). Moreover, the vaccination of mice with *L. amazonensis* antigens produces the activation of down regulatory factors, as TGF- $\beta$ , that neutralize the protective effect of the Th1 response (Pinheiro et al., 2005). Treg cells involved in the control of the infection have also been described in human visceral and cutaneous leishmaniasis indicating that Th1 and Th2 type cells paradigm does not universally apply (Gantt et al., 2003; Wilson et al., 2005; Campanelli et al., 2006).

In dogs different humoral and cellular immune status in relation to susceptibility and resistance to *L. infantum* after experimental or natural infection have been demonstrated (Pinelli et al., 1994). Studies with *L. infantum* infected dogs show that cell-mediated immunity in these dogs depends on the preferential expression of the Th1 cytokines, which play an important role in the resolution of the disease (Chamizo et al., 2005; Strauss-Ayali et al., 2005). However, sick dogs have a depressed T cell-mediated response and high levels of specific antibodies (Cabral et al., 1992; Pinelli et al., 1994; Martinez-Moreno et al., 1995). Moreover, studies based on quantitative PCR demonstrated that naturally infected dogs are characterized by a Th2-biased local immune response, in which IL-4 is associated with both severe clinical signs and high parasite burden in skin lesions (Brachelente et al., 2005) and with disease severity in bone marrow of infected dogs (Quinnell et al., 2001). A recent study revealed that asymptomatic dogs remaining symptomless for a prolonged time showed a predominant Th1-like response mediated by IL-2 and IFN- $\gamma$ , while dogs that finally progressed to clinical illness had no expression of these cytokines before developing clinical symptoms (Manna et al., 2006).

The aim of the present study was to evaluate the cytokine gene expression profile associated to CVL in vivo during the establishment of the infection in freshly isolated PBMCs. Data have been collected monthly during the follow-up allowing the evaluation of the immune response lengthways the time to insight into the mechanisms of the immune response against leishmaniasis. To address this issue, we have measured the cytokines IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from experimentally infected dogs by real-time PCR during one year follow-up. The results have been analyzed in relation to clinical symptoms (CS), serological and immunological profiles and peripheral blood or tissue parasite load.

## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1 Animals.** Six clinically healthy beagle dogs (A-F) of 9-months of age previously described as a part of other study were used (Rodriguez-Cortes et al., 2007). Briefly, the six dogs did not have detectable levels of Leishmania-specific antibodies, Leishmania

DNA in blood, or specific CMI (using the leishmanin skin test (LST) and a Leishmania-specific lymphoproliferation assay (LPA)). Dogs had previously been vaccinated against canine distemper, leptospirosis, hepatitis and parvovirus and were also treated with the anthelmintic drugs praziquantel, pyrantel and febantel. These animals were kept under the same environmental and nutritional conditions during 16 months. They were housed under conditions designed to exclude any possible natural *Leishmania* infection at the experimental facilities of Isoquimen S.L. (St Feliu de Codines, Spain). Dogs were housed in indoor kennels with windows covered with deltamethrin-sprayed, double anti-mosquito-nets. Installations were disinfected once a week and nets were sprayed once a month with deltamethrin. Only authorised personnel were allowed access to the installations after disinfection and wearing protective clothing. All experiments were performed according to the Guiding Principles for the Care and Use of Animals promoted by the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) Ethical Committee.

**2.2 Experimental infection.** The six dogs were experimentally infected as previously described (Valladares et al., 1998). Briefly, dogs were infected by intravenous inoculation of  $5 \times 10^7$  promastigotes of *L. infantum* (MCAN/ES/92/BCN-83/MON-1). In order to follow up the course of the infection, parasitological, immunological and clinical examinations were performed monthly as a part of other study (Rodríguez-Cortés et al., 2007). Peripheral blood was collected monthly under the same conditions at each time point: 2 points (4 months and 1 month) before the experimental infection and 12 time points after the infection.

**2.3 RNA extraction and RT-PCR for canine cytokines.** Three ml of EDTA peripheral blood were used to isolate total RNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) in accordance with the manufacturer recommendations. To remove traces of contaminating genomic DNA, 10 µg of total RNA were treated with DNase, RNase-free (Ambion, Austin, USA). 1.5 µg of RNA-DNase free were reverse transcribed into complementary DNA using High-Capacity cDNA Archive Kit with random primers according to the manufacturer recommendations (Applied Biosystems, Foster City, USA). 4 µl of cDNA were used for carrying out the real-time PCR reaction.

**2.4 Design of TaqMan assays and real-time PCR for canine cytokines.** Real-time PCR was performed to quantify the expression of canine IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and TNF- $\alpha$ . Primers and TaqMan-MGB probes were designed using the Primer Express 2.0 software (Applied Biosystems, Foster City, USA) after the alignment of available Genbank sequences and they were mostly constructed in exon-exon gene junctions to avoid the amplification of possible traces of genomic DNA contamination. Sequences of primers and probes are shown in Table 1. Primers and probes were added at 900 nM and 250 nM respectively. Duplicates were amplified for each sample in a 20  $\mu$ l reaction mixture with the TaqMan Universal PCR Master Mix and with UNG Amperase to avoid carry-over contamination (Applied Biosystems, Foster City, USA). The thermal cycling profile was 50 °C 2 min and 95 °C 10 min followed by 45 cycles at 95 °C 15 s and 60 °C 1 min. PCR reactions were performed in a 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, USA). Each amplification run contained negative PCR controls and RNA samples without reverse transcription to check for the absence of contaminating genomic DNA. The eukaryotic 18S RNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagent (Applied Biosystems, Foster City, USA) was standardized as an internal reference of canine cDNA amplification in order to normalize the results (Bas et al., 2004; Bustin et al., 2005). Serial cDNA dilution curve was produced in triplicate to calculate the reaction efficiency for each gene (efficiency= $[10^{(-1/\text{slope})}]-1$ ) (Table 1). The relative quantification of mRNA expression for each sample was calculated by comparative delta Ct method (Livak and Schmittgen, 2001). Duplicates from the 2 points at the pre-infection stage (4 months and 1 month before the experimental infection) were averaged to produce the data given at time point zero (pre-infection time point) and were used to determine a cut-off (mean  $\pm$  1 SD) for each cytokine and each dog. This value was used as the self-reference for each dog to normalize the results (calibrator sample) and for determining the down or up-regulation of the mRNA gene expression.

**2.5 Parasite load quantification.** The parasite load was quantified by real-time PCR for each peripheral blood sample and each time point as described previously (Francino et al., 2006). Number of parasites was also determined by real-time PCR in bone marrow samples at 4, 5, 6 and 13 months pi and in liver, popliteal lymph node and spleen at necropsy (for detailed information see Rodriguez-Cortes et al., 2007). Briefly,

TaqMan-MGB probe and PCR primers were designed to target conserved DNA regions of the kinetoplast minicircle DNA from *L. infantum*. Quantitative analysis of *L. infantum* DNA amplification was accomplished by relative quantification by the  $\Delta\Delta C_t$  method (Livak and Schmittgen, 2001). The eukaryotic 18S RNA Pre-Developed TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) were used as internal reference for dog genomic DNA amplification. Seeded samples prepared with a known number of parasite spiked over a negative *Leishmania* sample were used as calibrators for each tissue analyzed to extrapolate the number of parasites per sample.

**2.6 Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using the analytical software SPSS for Windows, Rel. 12.0.1. 2003. Chicago: SPSS Inc. Non-parametric tests were used since mRNA gene expression data were not normally distributed (calculated by Kolmogorov-Smirnov test). Wilcoxon signed rank test was used for the comparison of the mRNA gene expression between high parasitaemia dogs and low parasitaemia dogs. Data were expressed as median (quartile 25 - quartile 75). A statistical correlation analysis has been performed by Spearman correlation. A P-value  $\leq 0.05$  was considered significant.

### 3. RESULTS

**3.1 Dogs description: parasite load, clinical and serological status.** After the experimental infection the parasite was detected for the first time in peripheral blood samples at 4 months post-infection (+4 months pi) in 5 dogs (B, C, D, E, F) and at +7 months pi for the other one (A) (Fig. 1). After the detection of the parasite we have observed differences for both the parasite load and the progression of the illness.

*Dogs that progressed toward clinical illness:* 4 of the dogs (A, B, E, F) progressed toward clinical illness manifesting  $\gamma$ -globulinaemia, lymphadenopathy and cutaneous lesions, such as alopecia or dermatitis. At necropsy, generalized lymphadenopathy was found in dogs A, E and F; splenomegaly in dogs B and E and hepatomegaly in dog B. The production of specific IgG and IgG2 antibodies appeared between +3 and +5 months pi (+7 months pi for dog A) increasing over time with a maximum concentration at the end of the study. Specific IgG1, IgA and IgM were also detected

(Rodriguez-Cortes et al., 2007). High parasite loads were detected for these dogs in different tissues and they were termed as high parasitaemia dogs (H dogs). The highest parasite loads in peripheral blood were found at +6 months pi for dogs B, E, F and at +10 months pi for dog A. Parasitaemia peaks ranged from 900 to 1,800 parasites per ml for dogs A, E, F and reached a maximum of 14,000 parasites per ml for dog B. High parasite loads were also detected in bone marrow at +4, +5, +6 and +12 months pi (median 55,200 parasites/ml, range 67- 4,135,690) (Table 2). The amount of parasite load at the time of necropsy in the liver, spleen and popliteal lymph node was 717 (67-1,938), 406 (83-825) and 1,047 (521-1,688) parasites/mg tissue expressed as median (range), respectively (Table 2).

*Dogs remaining symptomless during the study:* Dogs (C, D) only developed transient clinical signs, such as alopecia and lymphadenopathy, and at the end of the study they showed neither clinico-pathological abnormalities nor macroscopical lesions at necropsy. These 2 dogs produced occasionally low positive concentrations of *Leishmania*-specific IgG and IgG2, and no other specific immunoglobulin isotypes were detectable (Rodriguez-Cortes et al., 2007). No parasite or very low number of parasites was detected in peripheral blood in these dogs and they were termed as low parasitaemia dogs (L dogs). The first parasite peak was detected for both dogs at +4 months pi and parasitaemia peaks ranged from 8-20 parasites per ml (Fig. 1). No parasite was detected in bone marrow samples during the follow-up (Table 2). The amount of parasite load at the time of necropsy in the liver, spleen and popliteal lymph node was 5 (3-7), 18 (6-29) and 33 (9-56) parasites/mg tissue expressed as median (range), respectively (Table 2).

Moreover, significant correlations between the parasite load and the clinical symptoms (Spearman  $r = 0.43$ ;  $P < 0.001$ ) and with *Leishmania*-specific IgG, IgG2, IgG1, IgA and IgM concentrations (Spearman  $r = 0.45-0.58$ ; all  $P < 0.001$ ) have been described (Rodriguez-Cortes et al., 2007).

**3.2 In vivo analysis of gene expression by real-time PCR assays.** We have performed an in vivo analysis of IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  gene expression profile in 6 dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. All the

assays were sensitive enough to detect mRNA expression from PBMC obtained from three ml of peripheral blood at least at one time point without performing cell stimulation. A summary of all the data obtained in the relative mRNA quantification is presented in Table 3.

At the pre-infection stage we observed variability in the cytokine expression levels among dogs and the highest mRNA levels for each cytokine at this stage were distributed randomly among the 6 dogs (Fig. 2). Irrespective of the disease category, after the infection we have found the lowest mRNA levels for the IL-4, IL-12 and IL-13 cytokines and the highest expression levels for IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 mRNAs (Fig. 3). A maximum peak of expression appeared at +6 month pi for TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$ ; and IFN- $\gamma$  expression is maintained up-regulated throughout the following months. Expression of IL-10 was mostly maintained at basal levels with some up-regulated points fluctuating among all dogs. TNF- $\alpha$  is maintained up-regulated from +2 month pi on for 4 of the 6 dogs (C, D, E, F). Due to the variability observed and given the small sample size, it is likely that patterns seen at any individual time-point may be due to chance variation. For this reason we have only placed emphasis on consistent patterns across several time-points that differ between H dogs and L dogs that are presented in the following sections.

**3.3 Gene expression profile after the experimental infection and before the detection of the parasite.** A clear difference in the cytokine profile has been observed between H and L dogs after the experimental infection and before the parasite load was detectable in peripheral blood samples by quantitative PCR (Fig. 3). A general down-regulation was observed for all the cytokine mRNAs at +1 month pi, and it was extremely evident for the L dogs (C, D) and one of the H dogs (F), since no mRNA expression was detected for any of the examined genes. For the three remaining H dogs, TGF- $\beta$  was the only cytokine that was expressed at the same levels of the pre-infection stage or even up-regulated. The reactivation of the cytokine expression takes place at +2 months pi, with the exception of IL-4 and IL-13 in L dogs. At +3 months pi, one month before the parasite was detectable in peripheral blood, L dogs still lacked expression of IL-4 and IL-13, whereas H dogs kept these cytokines at the pre-infection level or even up-regulated.

**3.4 Gene expression profile after the detection of the parasite.** Once the parasite was detected at +4 months pi we have observed different expression profiles for each gene and each dog with no common pattern between groups, with the exception of IFN- $\gamma$  expression. From +6 months pi on, we have observed higher expression levels for IFN- $\gamma$ , especially remarkable in H dogs (Wilcoxon test,  $P < 0.02$ ), which is concomitant with the highest parasite load except for dog (A) that is the one with a delayed detection of the parasite in peripheral blood (Fig. 3). Whereas IFN- $\gamma$  expression reached peaks of 238.65-folds in H dogs, it achieved a maximum of 7.51-folds in L dogs. A significant correlation was found between the parasite load and IFN- $\gamma$  expression profile (Spearman  $r = 0.48$ ;  $P < 0.001$ ).

#### 4. DISCUSSION

The outcome of leishmaniasis depends on the ability of the host macrophages to destroy the intracellular parasite with a complex network of interactions involving cytokines and other genes. To insight into the mechanisms of the immune response against leishmaniasis, we have monthly analyzed the cytokine gene expression profile and the parasite load of 6 experimentally infected dogs during one year follow-up.

The TaqMan assays developed are sensitive enough to detect the cytokine mRNA expression from peripheral blood (PBMC) without performing cell stimulation. This finding contrasts to the results found with PBMCs in other canine study in which IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-10 transcripts were not detected before infection without exogenous stimulation (Santos-Gomes et al., 2002).

At the pre-infection stage we have observed high variability of expression for all the genes analyzed without significant differences between groups (Fig. 2). In fact, the highest mRNA levels for each cytokine were distributed randomly among the 6 dogs, which discard the possibility to use the basal level of a subset of cytokines as a prognosis of the subsequent response against infection.

Our first results reveal a down-regulation for all the genes, one month after the infection (+1 month pi) (Fig. 3), which is not associated with *Leishmania* clinical symptoms. Previous studies with *L. infantum* infected dogs and mice infected with *L. major* also demonstrated the existence of a silent initial period which is characterized by the



absence of symptoms and with low expression of cytokines in skin and PBMCs (Belkaid et al., 2000; Santos-Gomes, et al., 2002). We must also take into account that down-regulation detected in peripheral blood at +1 month pi could be explained by the recruitment of activated cells to lymphoid organs.

In this stage, L dogs have null expression for the examined genes. H dogs maintained low expression for all the cytokines with levels lower or similar to those found in the pre-infection, with the exception of dog B that presented an up-regulation of the expression for TGF- $\beta$  at this time point. Interestingly, this dog achieved the highest parasite load during the study. Although it is important to consider that regulation of TGF- $\beta$  is largely post-transcriptional and a higher expression of TGF- $\beta$  does not always imply a higher activity of this cytokine (Rodriguez et al., 2004), it is known that this cytokine inhibits macrophage activation and allows parasite replication. Infection of human macrophages with *L. chagasi* reveals that TGF- $\beta$  provides a survival advantage for the parasite upon initial inoculation into the host environment (Gantt et al., 2003). Murine and hamster studies reinforce the importance of TGF- $\beta$  in the suppression of cellular immunity and the subsequent increase in *Leishmania* susceptibility (Rodrigues et al., 1998; Wilson et al., 1998; Mookerjee et al., 2003; Gomes-Pereira et al., 2004).

From now on, we have observed two consistent patterns across several time-points that differ between L and H dogs. First, the absence of both IL-4 and IL-13 expression in L dogs in the months following infection and before the detection of the parasite in peripheral blood; second, the higher late IFN- $\gamma$  expression associated with the increase of parasite load and clinical symptoms.

In relation to the Th2-derived cytokines, IL-4 and IL-13, L dogs have null expression for these cytokines during the first 4 months pi (Fig. 3) whereas in H dogs takes place a reactivation of IL-4 and IL-13 expression before the detection of the parasite in peripheral blood. It is important to remark that H dogs that first expressed simultaneously IL-4 and IL-13 at +2 months pi reached the highest number of parasite (B) and the highest value of CS (E) respectively. These results corroborate the data found in other tissues in naturally infected dogs, in which IL-4 has been associated with both high parasite burden and severe clinical signs in skin lesions and in bone marrow (Quinnell et al., 2001; Brachelente et al., 2005). On the other hand, IL-13 displays an exacerbative role in early phases of some murine leishmanial infections (reviewed in

Wynn, 2003). Moreover, a recent work suggests that the early expression of IL-4 measured in spleen cells have a role in the persistence of parasites in the presence of high IFN- $\gamma$  expression (Strauss-Ayali et al., 2007). Conversely, the absence of IL-4 and IL-13 in the first stage of the infection in L dogs seems to play a protective role in these dogs, since no parasite or very low number of parasites was detected during all the follow-up and no clinical leishmaniasis was developed. We suggest that the suppressive effect of IL-4 and IL-13 on macrophage activation (Bogdan et al., 1994) or the concomitant expression of IL-4, IL-13 and TGF- $\beta$ , described as an alternative activation of the murine macrophage which becomes inefficient for the clearance of the parasite (Rodriguez et al., 2004), could have facilitated the parasite survival and its replication in H dogs in the early stage of the infection.

The second pattern found consists in a higher IFN- $\gamma$  expression associated with the infection which agrees with previous results reported in PBMC, bone marrow and spleen (Quinnell et al., 2001; Chamizo et al., 2005; Manna et al., 2006; Correa et al., 2007; Lage et al., 2007; Strauss-Ayali et al., 2007). We have found significant differences between H dogs and L dogs for IFN- $\gamma$  expression associated with the increase of parasitaemia and symptomatology (Wilcoxon test,  $P < 0.02$ ) from +6 months pi on. These results are corroborated by a significant correlation between the parasite load and IFN- $\gamma$  expression profile (Spearman  $r = 0.48$ ;  $P < 0.001$ ). Correlation between parasitaemia and clinical symptoms (Spearman  $r = 0.43$ ;  $P < 0.001$ ) was also significant in these animals (Rodriguez-Cortes et al., 2007). Conversely to our results, asymptomatic and polysymptomatic natural infected dogs accumulated similar levels of IFN- $\gamma$  in bone marrow (Quinnell et al., 2001) or spleen cells (Correa et al., 2007; Lage et al., 2007), and in a recent work, Strauss-Ayali and collaborators (2007) described that IFN- $\gamma$  levels during the experimental infection were inversely associated with changes observed in the median parasite load in spleen cells. In our case, IFN- $\gamma$  up-regulation is significantly higher in H dogs, which were characterized for high parasite load detected in peripheral blood, bone marrow, spleen, liver and lymph node and for the development of clinical signs.

Taking together these results our main conclusions are: (1) CVL is marked by a balance production of Th1 and Th2 cytokines, and the absence of expression of IL-4 and IL-13

in the early phase post-infection seems to avoid the parasite replication and the spread of the infection; (2) a higher late IFN- $\gamma$  expression is associated with the increase of parasite load and clinical status; (3) the high variability of expression during the pre-infection stage discards the possibility of using the basal level of a subset of cytokines as a prognosis of the outcome of the infection. Our results contribute to the knowledge of the pathogenesis of canine visceral leishmaniasis, but further studies in the early stage of infection are needed in order to clarify the host differences in the establishment of infection and in the outcome of the disease.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by the Veterinary Molecular Genetics Service from the Universitat Autònoma de Barcelona. We are thankful to Marcel Amills and Xavier Roura for their critical review of the manuscript. We are also thankful to the anonymous referees for their critical review.

## REFERENCES

- Awasthi, A., Mathur, R., Saha, B., 2004. Immune response to Leishmania infection. *Indian J. Med. Res.* 119, 238-58.
- Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S., Hammarstrom, ML., 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalisation in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 59, 566-73.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D., 2000. A natural model of Leishmania major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol.* 165, 969-77.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C., Mendez, S., Shevach, E., Sacks, D., 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature.* 420, 502-7.
- Bogdan, C., Vodovotz, Y., Nathan, C., 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* 174, 1549-55.
- Brachelente, C., Müller, N., Doherr, M., Sattler, U., Welle, M., 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet. Pathol.* 42, 166-75.
- Bustin, SA., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, MW., 2005. Quantitative real-time RT-PCR a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597-01.
- Cabral, M., O'Grady, J., Alexander, J., 1992. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 14, 531-9.
- Campanelli, A., Roselino, A., Cavassani, K., Pereira, M., Mortara, R., Brodskyn, C., Goncalves, H., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., Silva, J., 2006. CD4+CD25+ T

cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* 193, 1313-22.

Chamizo, C., Moreno, J., Alvar, J., 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 103, 67-75.

Correa, AP., Dossi, AC., de Oliveira Vasconcelos, R., Munari DP., de Lima, VM., 2007. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Parasitol.* 143, 267-74.

Cox, F., Liew, F., 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol. Today.* 13, 445-8.

Enserink, M. 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science.* 290, 1881-3.

Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214-21.

Gantt, K., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S., Nascimento, E., Goldman, T., Recker, T., Miller, M., Wilson, M., 2003. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* 170, 2613-20.

Gomes-Pereira, S., Rodrigues, O., Rolão, N., Almeida, P., Santos-Gomes, G., 2004. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 59-68.

Heinzel, F., Sadick, M., Mutha, S., Locksley, R., 1991. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7011-5.

Lage, R., Oliveira, G., Busek, S., Guerra, L., Giunchetti, R., Corrêa-Oliveira, R., Reis, A., 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 115, 135-45.

Liew, F., Hale, C., Howard, J., 1982. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J. Immunol.* 128, 1917-22.

Liew, F. 1990. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 155, 53-64.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-ddCt}$  Method. *Methods.* 25, 402-408.

Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, V., Michele, P., Caracappa, S., Gravino, A., 2006. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 271-80.

Martínez-Moreno, A., Moreno, T., Martínez-Moreno, F., Acosta, I., Hernández, S., 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 209-20.

Mookerjee, A., Sen, P., Ghose, A., 2003. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor beta antibody. *Infect. Immun.* 71, 2439-46.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., Ruitenber, J., 1994. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229-35.

Pinheiro, R., Pinto, E., Lopes, J., Guedes, H., Fentanes, R., Rossi-Bergmann, B., 2005. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect.* 7, 1317-23.

Quinnell, R., Courtenay, O., Shaw, M., Day, M., Garcez, L., Dye, C., Kaye, P., 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 183, 1421-4.

Rodrigues, V., Santana da Silva, J., Campos-Neto, A., 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 66, 1233-6.

Rodriguez, N., Chang, H., Wilson, M., 2004. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *Infect. Immun.* 72, 2111-22.

Rodriguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J., 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 37, 683-93.

Rosypal, A., Zajac, A., Lindsay, D., 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 921-37, viii.

Santos-Gomes, G., 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.

Scott, P., Pearce, E., Cheever, A., Coffman, R., Sher, A., 1989. Role of cytokines and CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* 112, 161-82.

Scott, P. 1993. IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science.* 260, 496-7.

Shaw, S., Lerga, A., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R., Day, M., Kenny, M., 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet. Rec.* 152, 176-7.

Sheppard, H., Scott, P., Dwyer, D., 1983. Recognition of *Leishmania donovani* antigens by murine T lymphocyte lines and clones. Species cross-reactivity, functional correlates of cell-mediated immunity, and antigen characterization. *J. Immunol.* 131, 1496-503.

Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Shor, S., Okano, F., Jaffe, C., 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Int. J. Parasitol.* 35, 63-73.

Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Jaffe, C., 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 38, 547-64.

Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., Akdis, C., 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology.* 117, 433-42.

Valladares, J., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Franquelo, C., Arboix, M., 1998. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 75, 33-40.

Wilson, M., Young, B., Davidson, B., Mente, K., McGowan, S., 1998. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 161, 6148-55.

Wilson, M., Jeronimo, S., Pearson, R., 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb. Pathog.* 38, 147-60.

Wynn, T. 2003. IL-13 effector functions. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 425-56.



**Table 1.** TaqMan-MGB assays designed for mRNA quantification of canine IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  cytokines. F: Forward primer, R: Reverse primer, P: TaqMan-MGB probe. GeneBank Accession number of the sequence used to design primers and probes and their exact position are shown, as well as, each PCR efficiency (E).

Target		(5'- 3')	Position (bp)	Product length (bp)	GeneBank Accession Number	E (%)
IL-4	F	GAGAAACGACTCGTGCATGGA	192-212	71	NM_001003159.1	90.1
	R	CCTTATCGCTTGTGTTCTTTGGA	262-240			
	P	TCAAGGACGTCTTCACTG	221-238			
IL-10	F	GCGACGCTGTCACCGATT	379-396	82	NM_001003077.1	93.3
	R	CTGGAGCTTACTAAATGCGCTCTT	460-437			
	P	ACCGCCTTGCTCTT	413-426			
IL-12	F	TGGATGCTATTCACAAGCTCAAGT	638-661	74	NM_001003292.1	92.0
	R	TGGTTTGATGATGTCTCTGATGAAG	708-684			
	P	TGAAAACACTACACCAGCAGC	663-681			
IL-13	F	GCGGCAGGGCAGATTTC	331-347	71	NM_001003384.1	94.4
	R	AGGTTTTTCACCAACTGGATCACT	401-378			
	P	CAGCCGAGACACCAA	357-371			
IFN- $\gamma$	F	CAAGTTCTTAAATAGCAGCACCAGTAA	411-437	77	NM_001003174.1	90.5
	R	CCTGCAGATCGTTCACAGGAA	487-467			
	P	CTTCCTTAAGCTGATTCAA	447-465			

(Table 1)

Target		(5'-3')	Position (bp)	Product length (bp)	GeneBank Accession Number	E (%)
TGF- $\beta$	F	AGACATTAACGGGTTTCAGTTCCA	759-781	74	NM_001003309.1	94.2
	R	GCAGGAAGGGTCGGTTCAT	832-814			
	P	CTGGCCACCATTCA	796-809			
TNF- $\alpha$	F	AGCCAGTAGCTCATGTTGTAGCAA	260-283	121	NM_001003244.4	90.0
	R	GGCACTATCAGCTGGTTGTCTGT	358-380			
	P	CACGTCGGCTCAGC	312-325			

**Table 2.** Parasite load in the different tissues analyzed in the study. (A) Comparison of number of parasites/ml of blood and bone marrow (BM). (B) Number of parasites/mg of tissue in liver, spleen and lymph node (LN) at necropsy.

(A)

<b>Months PI</b>		<b>+4</b>	<b>+5</b>	<b>+6</b>	<b>+12</b>
<b>H dogs</b>					
A	Blood	0	0	0	842
	BM	0	235	0	864,277
B	Blood	361	5,203	13,468	43
	BM	6,046	4,146,691	709,374	38,761
E	Blood	42	93	876	57
	BM	67	14,983	4,135,690	71,639
F	Blood	52	755	1,144	0
	BM	3,587	80,555	412,507	330,467
<b>L dogs</b>					
C	Blood	20	0	0	0
	BM	0	0	0	0
D	Blood	8	0	0	9
	BM	0	0	0	0

(B)

<b>Tissue</b>	<b>Liver</b>	<b>Spleen</b>	<b>LN</b>
<b>H dogs</b>			
A	1,938	825	1,688
B	379	502	804
E	483	215	1,176
F	67	83	521
<b>L dogs</b>			
C	7	6	57
D	3	29	9

**Table 3.** Relative quantification of mRNA expression data for the high parasitaemia dogs (A, B, E, F) and the low parasitaemia ones (C, D) calculated by comparative delta Ct method. The mean of the pre-infection points for each dog was used as the calibrator sample. The cut-off (mean ± 1 SD for each cytokine and each dog at the pre-infection stage) was established for determining the down or up-regulation of the mRNA gene expression. A-F refers to dog numbers and 1-12 refers to months post-infection.

dark grey Up-regulated expression  
 light grey Down-regulated  
 no colour Pre-infection level  
 - No expression detected  
 na Not available

<b>IL-4</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.67-1.48)	-	-	-	-	-	-	-	-	0.78	1.47	-	-
<b>B</b>	1 (0.21-4.74)	-	4.42	0.42	0.73	-	-	0.09	na	-	-	-	0.04
<b>E</b>	1 (0.28-3.60)	0.41	2.31	2.82	-	-	-	-	25.58	2.55	-	-	-
<b>F</b>	1 (0.15-6.51)	-	-	2.79	-	13.45	-	-	-	0.02	-	5.83	0.02
<b>C</b>	1 (0.18-5.49)	-	-	-	-	na	-	-	-	0.02	-	-	0.01
<b>D</b>	1 (0.14-7.11)	-	-	-	-	0.95	4.51	-	0.02	-	0.34	0.40	0.02

<b>IL-10</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.58-1.71)	0.47	1.65	0.46	-	1.28	15.30	1.72	0.13	0.23	0.19	1.50	1.14
<b>B</b>	1 (0.25-4.08)	0.28	2.64	1.00	0.92	3.29	19.31	0.11	0.20	na	0.25	1.20	1.04
<b>E</b>	1 (0.19-5.15)	0.84	0.53	0.28	1.80	-	-	1.51	33.46	0.68	5.82	1.63	1.31
<b>F</b>	1 (0.61-1.63)	-	2.96	0.70	1.47	1.13	-	0.16	9.18	0.09	0.87	1.81	0.79
<b>C</b>	1 (0.67-1.49)	-	1.55	1.54	0.77	na	13.25	1.06	1.03	0.18	0.67	3.56	0.46
<b>D</b>	1 (0.38-2.65)	-	2.30	2.06	-	0.82	1.59	1.08	1.92	0.71	0.56	0.89	1.02

**(Table 3)**

<b>IL-12</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.15-6.76)	-	0.63	0.77	0.01	-	33.99	-	0.08	0.10	0.19	1.01	1.96
<b>B</b>	1 (0.09-11.28)	0.11	1.68	0.17	0.15	-	0.53	-	0.22	na	0.14	0.24	0.36
<b>E</b>	1 (0.79-1.27)	0.44	0.35	-	90.81	-	-	-	-	0.04	1.40	-	-
<b>F</b>	1 (0.47-2.12)	-	-	0.07	na	0.64	-	-	-	0.04	0.74	0.01	4.12
<b>C</b>	1 (0.54-1.86)	-	0.40	-	1.85	na	-	-	1.62	0.17	-	-	-
<b>D</b>	1 (0.08-11.87)	-	1.52	-	-	0.13	-	-	0.04	0.07	-	0.14	0.07

<b>IL-13</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.57-1.75)	-	-	4.40	-	-	-	-	1.19	0.77	0.75	-	4.90
<b>B</b>	1 (0.29-3.46)	1.73	4.52	0.54	0.36	0.09	-	0.18	0.13	na	0.37	2.14	3.09
<b>E</b>	1 (0.21-4.75)	0.01	1.30	2.81	0.77	-	-	-	-	1.76	-	-	-
<b>F</b>	1 (0.45-2.22)	-	-	0.79	-	1.29	-	1.35	-	0.15	-	1.50	1.05
<b>C</b>	1 (0.57-1.74)	-	-	-	-	na	-	-	0.04	1.60	3.79	0.30	0.02
<b>D</b>	1 (0.30-3.35)	-	-	-	-	0.97	1.49	-	0.52	2.59	0.65	0.46	0.58

<b>IFN-γ</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (1-1)	-	0.86	1.54	0.01	0.43	32.62	0.24	1.09	0.83	1.19	7.80	14.97
<b>B</b>	1 (0.36-2.75)	1.70	9.17	0.91	3.29	1.00	238.65	1.09	2.72	na	4.03	10.67	8.98
<b>E</b>	1 (0.61-1.65)	0.52	1.05	1.17	1.85	-	-	9.46	75.92	8.09	36.21	3.11	2.80
<b>F</b>	1 (0.89-1.12)	-	-	1.75	3.79	4.72	-	6.28	53.66	6.31	41.92	15.32	9.39
<b>C</b>	1 (0.66-1.50)	-	6.09	5.84	7.15	na	5.40	2.48	7.51	1.35	2.00	6.98	1.27
<b>D</b>	1 (0.40-2.50)	-	1.29	0.79	0.04	0.73	2.64	0.28	1.24	2.34	0.50	0.72	0.23

**(Table 3)**

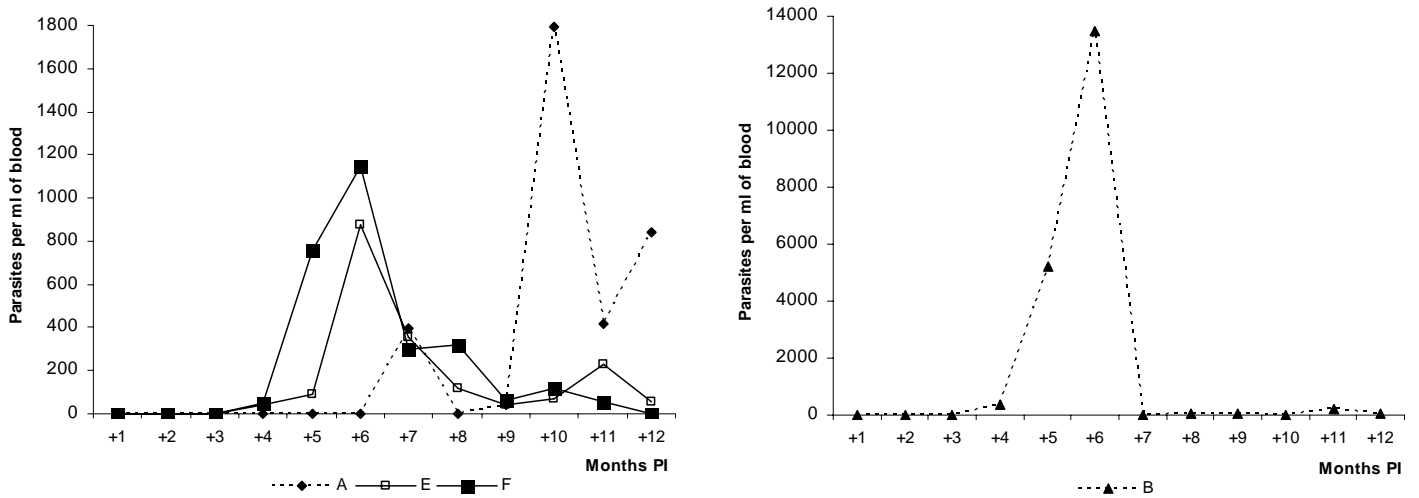
<b>TGF-β</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.67-1.49)	1.08	1.87	2.77	0.17	0.84	24.79	2.15	0.55	0.65	0.58	1.76	1.48
<b>B</b>	1 (0.45-2.21)	2.40	6.34	3.09	2.30	2.07	111.40	0.40	0.28	na	0.44	1.20	1.43
<b>E</b>	1 (0.55-1.83)	0.81	1.02	0.78	1.73	0.72	1.68	1.24	2.78	0.33	2.21	0.37	0.33
<b>F</b>	1 (0.60-1.66)	-	na	2.42	1.71	12.11	87.34	1.95	6.62	0.50	2.33	2.50	1.06
<b>C</b>	1 (0.75-1.34)	-	12.91	17.44	2.72	na	67.26	1.83	2.15	0.84	1.98	2.36	0.96
<b>D</b>	1 (0.53-1.89)	-	5.12	3.31	0.50	1.60	6.38	0.67	0.73	2.83	0.91	0.60	0.57

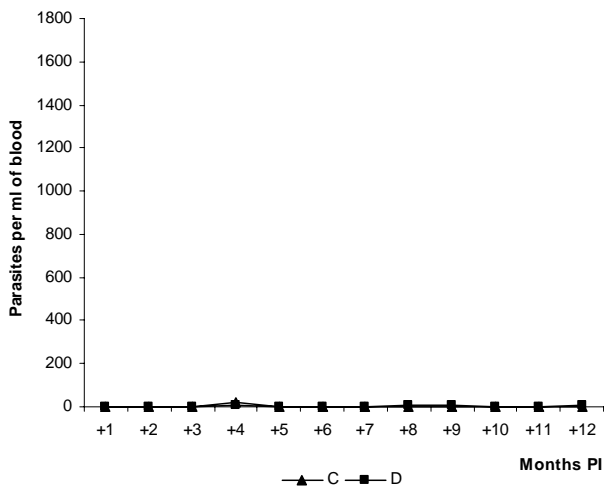
<b>TNF-α</b>	<b>pre-infection</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1 (0.24-4.12)	0.28	1.31	1.96	-	0.92	1.71	1.42	1.06	1.15	1.03	1.66	5.05
<b>B</b>	1 (0.33-3.06)	-	2.97	0.78	0.56	0.36	5.51	0.41	0.40	na	0.54	0.64	0.67
<b>E</b>	1 (0.97-1.03)	0.49	6.64	0.86	0.58	41.33	-	0.84	1.85	5.99	0.85	1.24	0.24
<b>F</b>	1 (0.62-1.62)	-	8.16	0.81	0.49	7.11	-	0.74	3.60	1.37	0.82	9.65	5.69
<b>C</b>	1 (0.86-1.17)	-	59.24	5.12	0.88	na	40.16	1.07	2.21	1.93	0.83	10.34	0.66
<b>D</b>	1 (0.82-1.21)	-	6.90	2.05	-	2.30	6.51	0.28	1.14	0.97	0.40	2.04	0.22

**Figure 1.** Quantification of *Leishmania infantum* parasites by real-time PCR during the experimental infection. (A). High parasitaemia dogs (A, B, E, F); dog (B) is shown separately with a different Y-Axis scale. (B). Low parasitaemia dogs (C, D). X-Axis shows months pi. Y-Axis shows the number of parasites per ml of peripheral blood.

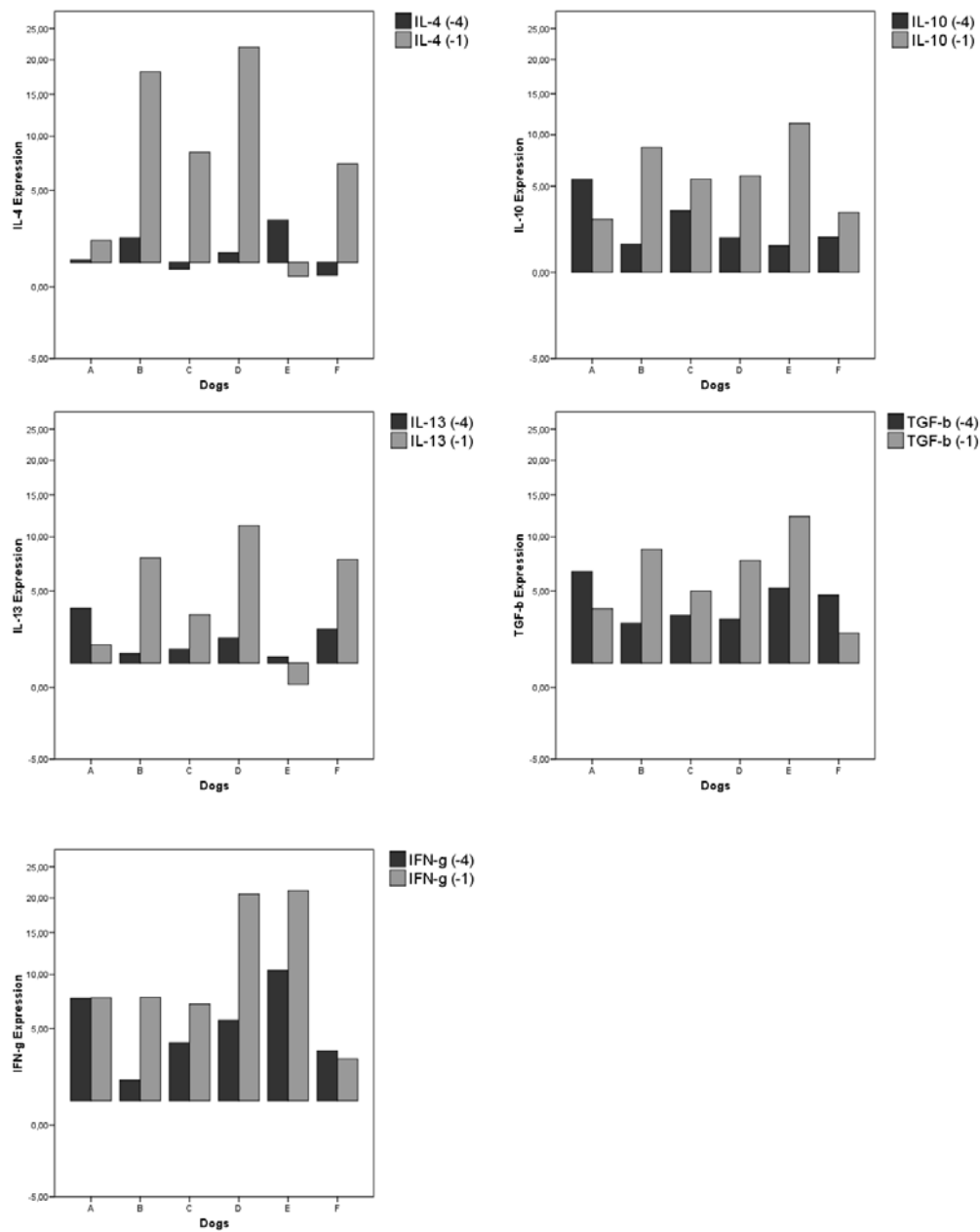
(A) High parasitaemia dogs.



(B) Low parasitaemia dogs.

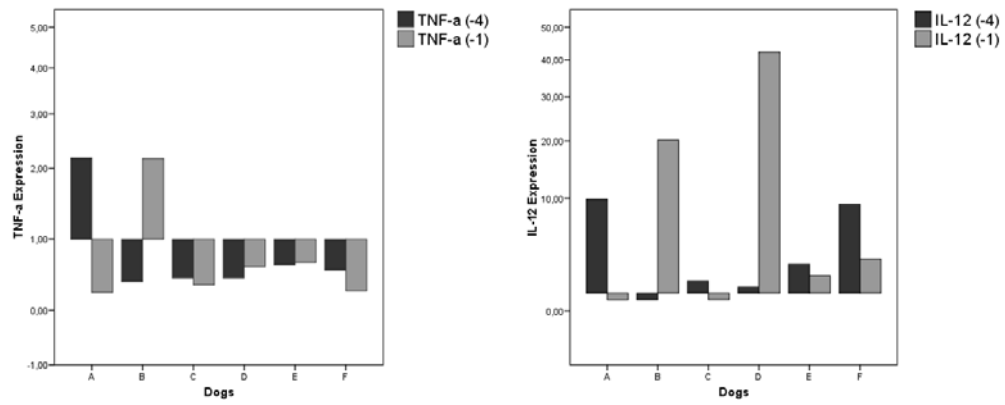


**Figure 2.** Relative quantification of mRNA expression levels for the months (-4) and (-1) from the pre-infection stage calculated by comparative delta Ct method. A non-infected beagle from the same cohort was used as the calibrator sample. X-Axis shows the dogs (A, B, C, D, E, F). Y-Axis shows the relative quantity for each cytokine (0.5 exponential scale). IL-12 and TNF- $\alpha$  are shown in a different Y-Axis scale.





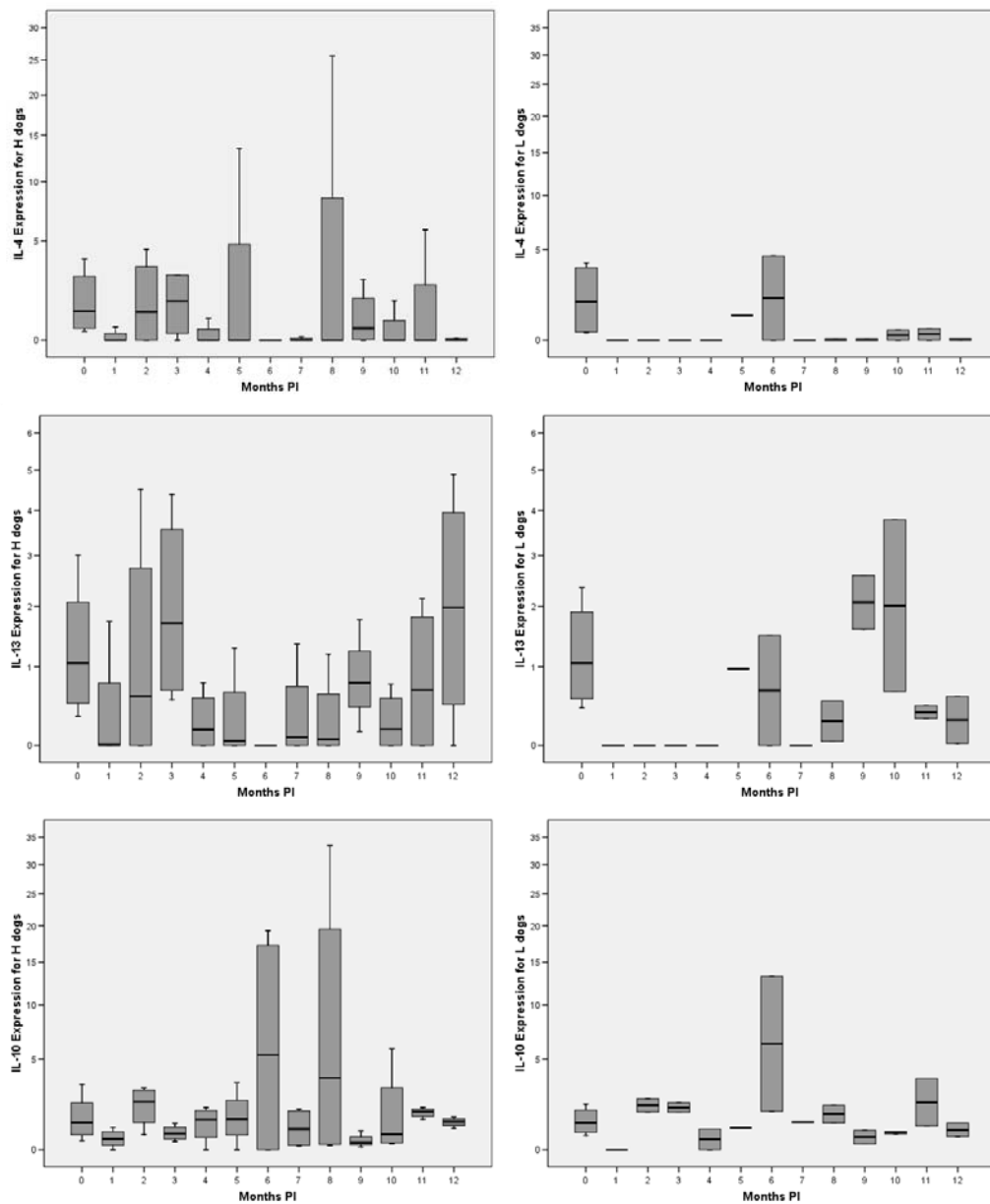
(Figure 2)



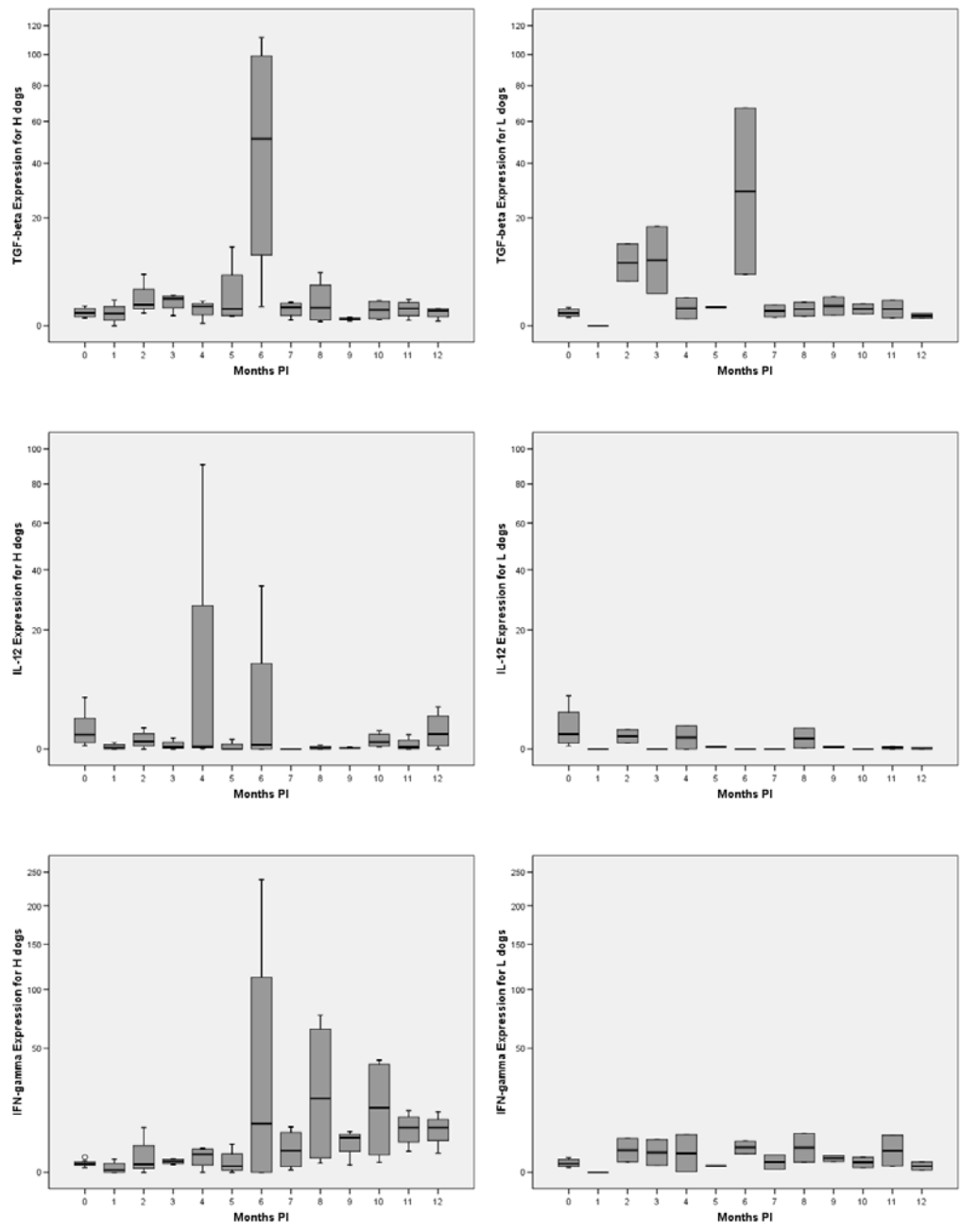
**Figure 3.** Box plot of mRNA expression for each gene for the (A) High parasitaemia dogs (A, B, E, F) and (B) Low parasitaemia ones (C, D) during the follow up. X-Axis shows months pi. Y-Axis shows the relative quantity for each cytokine (0.5 exponential scale). Box plots show the medians (horizontal lines across the box), interquartile ranges (vertical ends of the box), and whiskers (lines extending from the box to the highest and lowest values).

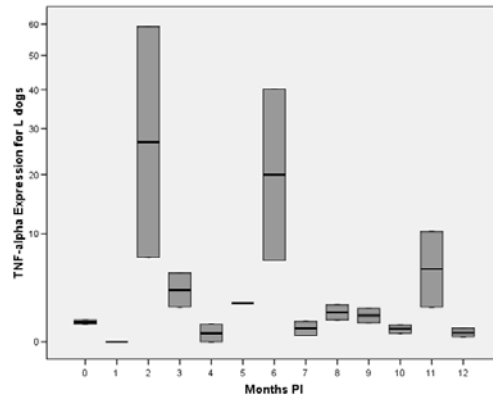
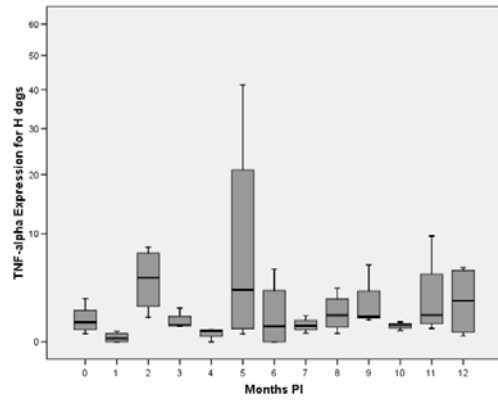
(A) High parasitaemia dogs

(B) Low parasitaemia dogs



(Figure 3)







## *Discussió*

---



Els estudis genètics realitzats fins al moment subratllen que la variació genètica existent en les poblacions contribueix, juntament amb els factors ambientals, a la susceptibilitat a malalties infeccioses. Actualment, la informació que ens ha proporcionat la seqüenciació del genoma del gos (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) i la disponibilitat de noves tecnologies, que ens permeten realitzar genotipats d'alt rendiment, fa que estiguem a l'inici d'una nova era en l'estudi genètic de malalties complexes. No obstant, en començar aquest estudi encara no es coneixia el mapa genètic del gos, fet que ens impossibilitava fer un estudi a gran escala de tot el seu genoma. És per això que ens vàrem decantar per l'estratègia dels gens candidats per tal d'investigar la base molecular de la leishmaniosi. Estudis previs evidenciaven l'existència de polimorfismes associats a susceptibilitat a la leishmaniosi pel gen *Slc11a1* (Altet *et al.*, 2002) i el gen *DRB1* del MHC classe II (MHC-II)(Quinnell *et al.*, 2003).

El gen candidat *Slc11a1* està involucrat en la primera barrera de defensa de l'organisme contra els paràsits, el que es coneix com a immunitat innata. Els gens del MHC-II participen en una segona fase, en la que té lloc la resposta immunitària adquirida juntament amb altres gens d'interès com la IL-4, la IL-6, la IL-13 i l'IFN- $\gamma$  (Burgner *et al.*, 2006; Castellucci *et al.*, 2006), gens que veurem en tercer lloc juntament amb altres citocines tant a nivell de polimorfisme genètic com a nivell d'expressió gènica per conèixer el perfil immunològic enfront la infecció per *Leishmania* en gossos que presenten diferent progressió de la malaltia. .

#### **4.1. Gens candidats**

##### **4.1.1. El gen *Slc11a1* (*Nramp1*): polimorfismes associats a susceptibilitat a la leishmaniosi canina**

Diversos treballs realitzats en humans han demostrat que el gen *Slc11a1* està associat a susceptibilitat a la leishmaniosi visceral, tant pel que fa al polimorfisme funcional descrit en el promotor, com als polimorfismes identificats en l'exó 3 (mutació silenciosa) i l'intró 4 del gen (Searle i Blackwell, 1999; Bucheton *et al.*, 2003; Blackwell *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2004; Zaahl *et al.*, 2004; El-Safi *et al.*, 2006).



Pel que fa al gos, existeix un únic treball en el que es va caracteritzar molecularment el gen. Es van identificar mutacions varies, entre les quals cal destacar una regió rica en Gs en el promotor (G-stretch) i un *splicing* alternatiu en l'exó 11, i es va suggerir el seu paper en la CVL (Altet *et al.*, 2002).

Com a conseqüència d'aquest primer treball vàrem dur a terme un primer estudi d'associació cas-control, en 57 gossos sans i 40 gossos malalts de leishmaniosi (Sanchez-Robert *et al.*, 2005), centrat en la regió promotora del gen i en els polimorfismes descrits prèviament per Altet i col·laboradors (2002). A partir d'aquest treball vàrem identificar 3 nous SNPs (T151C, A180G, G318A) en la regió promotora del gen que estaven significativament associats a CVL ( $P=0,003$ ). Aquests SNPs van generar 3 nous haplotips (TAA, TGA, CGA), identificats en 4 gossos de la població cas de les següents races: doberman, rottweiler, pastor alemany i pointer.

En examinar la distribució dels 5 loci en forma d'haplotip (T151C, A180G, G318A, Gstretch-321 i  $\mu$ sat1253) vàrem observar que els haplotips més freqüents eren el TAG-8-141 i TAG-9-145. L'haplotip TAG-8-141 es trobava present en totes les races de l'estudi, i estava equitativament distribuït entre els casos i els controls, en canvi, l'haplotip TAG-9-145 es trobava majoritàriament en la raça boxer.

En analitzar el boxer per separat de la resta de races vàrem observar que l'haplotip TAG-9-145 es trobava preferentment en els controls en forma d'homozigot ( $P = 0,03$ ; 81% control *vs.* 37% casos) mentre que l'haplotip TAG-8-141 estava significativament associat als casos ( $P = 0,02$ ) present en el 50% dels boxers amb CVL, tots heterozigots TAG-8-141/ TAG-9-145. Per tant, els gossos boxer que tenen l'haplotip TAG-8-141 tenen una probabilitat més elevada de ser susceptibles a la malaltia ( $OR = 10,33$ ), mentre que l'haplotip TAG-9-145 en homozigosi conferiria un paper protector en aquesta raça.

A partir d'aquests resultats es va considerar important aprofundir en l'estudi del gen *Slc11a1* com a gen candidat i es va decidir caracteritzar el polimorfisme del gen. Es van seqüenciar 7.110 pb d'un total de 9.490 pb que té el gen que incloïa la regió promotora, la regió 5' i 3' UTR, els 15 exons i totes les zones d'unió exó-intró. Pel que fa als introns la seqüenciació va ser completa pels introns 1, 3, 5, 6, 7, 12 i 14 i parcial per la

resta d'introns. Aquesta seqüenciació es va realitzar en 40 gossos pertanyents a 11 races diferents i ens va permetre identificar 19 nous polimorfismes: 2 SNPs sinònims localitzats en els exons 8 i 12, 14 SNPs i 2 Indel identificats en diferents introns i 1 SNP localitzat en la regió 3'UTR. Els 24 polimorfismes del gen, els 5 prèviament descrits (T151C, A180G, G318A i Gstretch-321 del promotor i el  $\mu$ sat12533 de l'intró 1) i els 19 nous SNPs caracteritzats per seqüenciació directa, es van analitzar en un total de 222 gossos: un estudi cas-control format per 164 gossos d'infecció natural de 19 races diferents (que inclou els 97 citats anteriorment) i una població de 58 podencs eivissencs, com a raça resistent a la leishmaniosi (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

L'anàlisi estadística d'associació genotípica s'ha dut a terme en la població cas-control completa (formada pels 164 gossos) i en una població reduïda que anomenarem població 1:1, perfectament aparellada per raça (47 casos vs 47 controls en una ràtio 1:1), formada per una selecció de gossos escollits a l'atzar, per tal de confirmar les associacions significatives evitant el possible efecte d'estratificació a causa de la raça. Tots els resultats de les taules estan referits a la població 1:1.

Els SNPs del promotor (T151C, A180G, G318A) perden la significació en la població 1:1 ja que no han estat identificats en cap dels nous animals genotipats. Tot i això hem de tenir en compte que només s'han identificat en animals malalts i que afecten llocs d'unió per a diferents factors de transcripció (Taula 5). L'al·lel de risc del SNP T151C interromp el lloc d'unió pels factors de transcripció TEAD i SPI1, però crea un nou lloc d'unió pel factor de transcripció TFAP2. L'al·lel de risc del SNP A180G interromp el lloc d'unió pel factor de transcripció SOX9, mentre que l'al·lel de risc pel SNP G318A ho fa pels factors de transcripció SPI1, SP1, GATA2 i RREB1. Aquesta inactivació dels llocs putatius d'unió per a diferents factors de transcripció ens suggereixen l'existència d'una possible expressió diferencial del gen en relació a la susceptibilitat a la CVL. De fet, en humana s'han descrit dos polimorfismes funcionals en el promotor del gen *Slc11a1* (una repetició 5'(GT) $n$  i un SNP -237C/T), associats a una expressió diferencial del gen i relacionats amb resistència o susceptibilitat tant a malalties infeccioses com autoimmunitàries (Searle i Blackwell, 1999; Zaahl *et al.*, 2004).

**Taula 5.** (A) Descripció dels SNPs identificats en el promotor. <sup>(-)</sup> sentit 3' a 5' de la cadena. (B) Resultats del test d'associació genotípica pels SNPs significativament associats a CVL per la població cas-control assumint els models genètics dominant <sup>(1)</sup> i general <sup>(2)</sup>. \* P-valor <0,05; \*\* P-valor <0,01. OR: Odds Ratio. IC: Interval de Confiança.

(A).

SNP	Localització	Factor de transcripció	Lloc d'unió FT	Funció
<b>T151C</b>	Promotor	TEAD	CACGTTCT <u>T</u> CTG	Activador de la transcripció
		SPI1 (-)	CAG <u>A</u> AG	Activador de la transcripció
		TFAP2 (-)	GCCTCAG <u>G</u> A	Participa en la regulació de la transcripció
<b>A180G</b>	Promotor	SOX9	CATCA <u>A</u> TGC	Regula l'expressió de gens que intervenen en la condrogènesi
<b>G318A</b>	Promotor	SPI1	CG <u>G</u> ATG	Activador de la transcripció
		SP1	GTGGGGCG <u>G</u> A	Activador de la transcripció
		GATA2	<u>G</u> GATG	Activador de la transcripció
		RREB1 (-)	(C <sub>5</sub> )AT <u>C</u> CG(C <sub>4</sub> )ACACAA	Actua com a “RAS-responsive element-binding protein”

(B).

SNP	Localització	Possibles efectes funcionals	Al·lel risc	OR	95% IC	P-valor
<b>A4549G</b>	Intró 6	ISE/ISS?	AG + GG <sup>(1)</sup>	6,78	2,02-22,76	0,001**
<b>C4859T</b>	Exó 8	Sinònim	CT + TT <sup>(1)</sup>	13,44	2,85-63,39	0,004**
		Plegament proteïna?				
		Inactiva ESE				
<b>C8542T</b>	Intró 13	ISE/ISS?	TT <sup>(2)</sup>	-	-	0,018*

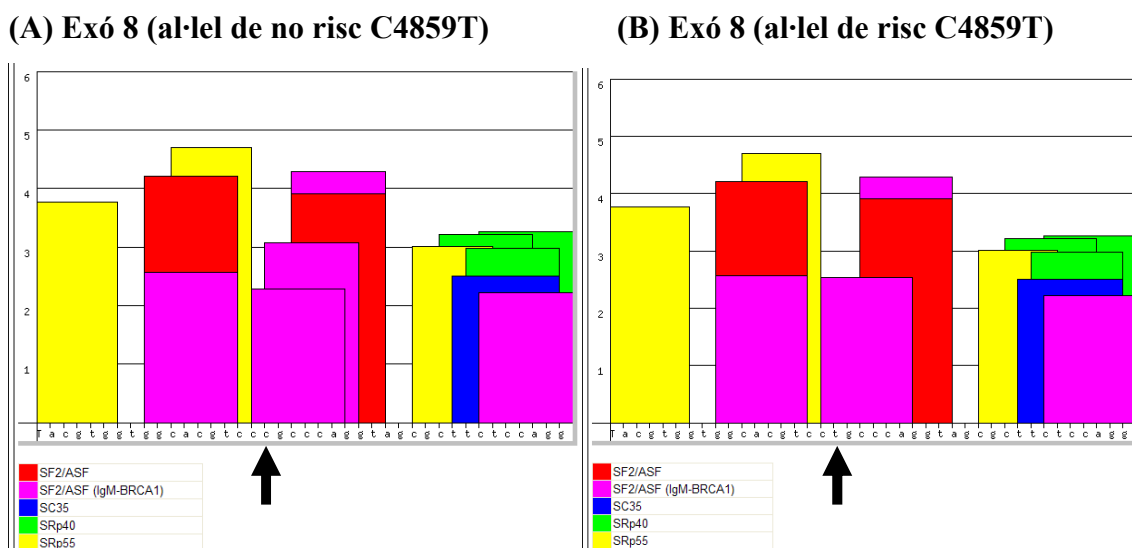
Dels 19 nous polimorfismes descrits s'ha trobat una associació genotípica significativa amb CVL per a 3 d'ells (Taula 5): A4549G localitzat a l'intró 6 (OR=6,78 P=0,001), C4859T localitzat a l'exó 8 (OR= 13,44 P=0,004) i C8542T localitzat a l'intró 13 (P=0,018).

El SNP C4859T, localitzat a l'exó 8, consisteix en una mutació sinònima que canvia el codó CCC (Pro) a CCT (Pro) i està significativament associat a CVL amb tots els models genètics assumits, tot i que la significació és major sota l'assumpció de dominància. Els SNPs sinònims no alteren aminoàcid i per tant, s'espera que no produeixin canvis en la funció de la proteïna resultant. No obstant, el plegament de la proteïna pot resultar afectat a causa dels canvis en la taxa de traducció causada per l'existència de codons rars (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). A més, aquest efecte és més gran si el canvi implica la tercera base del codó (Xie *et al.*, 1995). Corroborant aquesta hipòtesi, en humana s'ha demostrat que una mutació silenciosa en el gen *Mdr1* (*Multidrug Resistance 1* gene), el qual codifica per una complexa proteïna de membrana, altera l'especificitat pel substrat (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007). A més, el SNP C4859T, tot i no estar localitzat en un segment transmembrana, podria tenir importància a nivell funcional pel que fa al transport de cations, ja que és parcialment actiu per a la captació d'ions metàl·lics divalents (Courville *et al.*, 2006).

D'altra banda, cada vegada hi ha més indicis que en moltes malalties humanes estan implicades mutacions silencioses, però que si afecten la maduració del pre-mRNA (Cartegni *et al.*, 2002). Aquests polimorfismes es localitzen propers a les zones d'unió exó-intró i poden estar localitzats als exons o als introns, actuant tant com a elements potenciadors (ESE/ISE) o com a silenciadors (ESS/ISS) de la maduració del pre-mRNA. La inactivació d'un element ESE pot generar la pèrdua total o parcial d'un exó i, per tant, afectar notablement tant l'estructura com la quantitat de proteïna expressada (Cartegni *et al.*, 2002). L'al·lel de risc T pel SNP C4859T inactiva un putatiu element ESE que és reconegut per una proteïna SR (rica en serina/arginina)-SF2/ASF (IgM-BRCA1) (Smith *et al.*, 2006) (Fig. 9). En el gos ja s'ha descrit un *splicing* alternatiu del gen *Slc11a1*, que consisteix en una deleció completa de l'exó 11 i la conseqüent eliminació del domini transmembrana 8. Aquest fenomen va ser identificat en un gos

malalt de leishmaniosi en el qual va ser necessari fer-li un tractament addicional a causa de les contínues recaigudes (Altet *et al.*, 2002).

**Figura 9.** Representació gràfica dels ESE identificats en els primers 40 nucleòtids de l'exó 8. La fletxa indica la localització dins la seqüència de l'element ESE que es perd en presència de l'al·lel de risc pel SNP C4849T.



Els SNPs A4549G (intró 6) i C8542T (intró 13), malgrat estar localitzats en una regió no codificant del gen, podrien ser funcionals per ells mateixos si afecten a la maduració del pre-mRNA, tal com s'esmenta en el paràgraf anterior o estar lligats a la mutació casual. En humana també s'ha descrit un polimorfisme en l'intró 4 del gen *Slc11a1* associat a leishmaniosi (Mohamed *et al.*, 2004).

Caldria aconseguir mostres dels genotips adients per realitzar l'estudi d'expressió i confirmar si aquestes mutacions són funcionals per si mateixes o actuen com a marcadors de la mutació causal.

En inferir els haplotips a partir de la població cas-control hem obtingut 22 haplotips, dels quals els 5 més freqüents han estat confirmats per trios de famílies i dins d'aquest grup un d'ells, el que conté les mutacions pels SNPs A4549G i C4859T, està significativament associat a CVL (OR=8,81; P=0,01) (Taula 6).

L'haplotip TAG-8-141 prèviament associat a CVL en la raça boxer perd la significació en augmentar el nombre de mostres per aquesta raça. Hi ha diversos motius que explicarien aquesta pèrdua: (1) en passar d'analitzar 5 polimorfismes a 24, l'haplotip inicial es divideix en múltiples combinacions fent que no es mantingui la significació original; (2) en augmentar el nombre d'animals estariem guanyant més poder estadístic eliminant una associació falsament positiva; (3) en no ser tan rigorosos en la caracterització del fenotip com en el primer estudi ja que en el segon no vàrem considerar com a requisit el desenllaç fatal de la malaltia per ser inclòs en l'estudi.

Malgrat això, no podem descartar el boxer com una de les races que té una elevada predisposició a la CVL. D'una banda, hi ha diversos estudis epidemiològics realitzats a Brasil i França que han posat de manifest que la taxa de prevalença de la infecció per la raça boxer és de les més elevades juntament amb el pastor alemany (Ranque *et al.*, 1997; França-Silva *et al.*, 2003). A més, un estudi epidemiològic realitzat a Catalunya ha posat en evidència que la leishmaniosi canina té una distribució bimodal: en el primer pic, s'inclouen gossos diagnosticats als 2-4 anys d'edat i el segon pic correspon a gossos d'aproximadament 7 anys d'edat (on normalment la leishmaniosi és concomitant amb altres infeccions o malalties neoplàsiques). Els gossos genèticament predisposats a la leishmaniosi s'esperaria trobar-los en el primer pic d'edat. De fet, els gossos de la raça boxer es van trobar sobrerrepresentats en aquest primer pic ja que el 68% dels boxers malalts són diagnosticats de leishmaniosi abans dels 4 anys d'edat (Miranda *et al.*, 2005). A més, és important remarcar que tot i que els animals malalts no van ser seleccionats per raça i que la raça boxer no és de les majoritàries a Espanya (Haymann, 2007), aquesta raça, la boxer, en el nostre estudi cas-control representa aproximadament el 20% dels animals malalts.

A partir dels resultats obtinguts podem concloure que existeix una associació significativa entre els SNPs A4549G (intró 6), C4852T (intró 13) i C4859T (exó 8), així com per l'haplotip format pels al·lels de risc de dos d'ells, i la susceptibilitat a la leishmaniosi visceral canina, tot corroborant el paper del gen *Slc11a1* en la CVL.

**Table 6.** (A) Haplotype confirmed by trio-based family in the matched case-control population and association test with CVL for all the polymorphisms described in the *Stc11a1* gene. (\*) p-value <0.05; (\*\*) p-value <0.01. (+) Haldane correction applied. (B) Haplotype estimation for the Ibizan Hound cohort (IB). Haplotypes with a frequency of N<5 have been discarded. N: number of dogs that present certain haplotype. (1) D: deletion (14 bp), ND: No deletion; (2) D: deletion (1 bp), T: No deletion. Data in bold are discussed in the text.

(A)		151	180	318	321	739	1253	2336	2588	2727	3920	<b>4549</b>	4580	<b>4859</b>	6828	6920	7623	7626	7715	7825	7910	7931	8035	<b>8542</b>	9275								
CASE-CONTROL																																	
	Id	N	OR(95 CI)	P-value	T	A	G	G-stretch	A	μsat	C	T	ND <sup>(1)</sup>	G	A	C	C	C	C	C	C	C	G	T <sup>(2)</sup>	G	A	G	C	G				
A	40	0.70	(0.35-1.42)	0.32	-	-	-	9	-	145	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	-	-	-	T	C			
B	28	0.73	(0.33-1.64)	0.45	-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-			
C	25	1.35	(0.58-3.14)	0.48	-	-	-	8	G	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	T	C		
D	9	8.81	(1.08-71.93)	0.01*	-	-	-	8	-	145	-	C	-	T	G**	-	T**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
E	6	0.50	(0.09-2.80)	0.42	-	-	-	8	-	141	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
(B)																																	
IB HOUND COHORT																																	
F	36				-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	T	C	-	
G	25				-	-	-	8	G	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	
H	12				-	-	-	8	G	137	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	T	-	-
I	11				-	-	-	8	-	141	-	-	-	T	G	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	10				-	-	-	8	-	141	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-
K	6				-	-	-	8	G	145	T	C	D	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	A	T	C	-

#### 4.1.2. Altres gens candidats per a la leishmaniosi canina

Per tal de millorar el coneixement que tenim sobre la patogènesi i els factors genètics involucrats en la resistència/susceptibilitat de l'hoste enfront la leishmaniosi, vam decidir que a més de l'estudi del gen *Slc11a1* seria convenient investigar el polimorfisme d'altres gens que participen en la resposta immunitària.

Com a conseqüència d'un treball en col·laboració amb el *Centre for Integrated Genomic Medical Research* (CIGMR) (Universitat de Manchester) es va caracteritzar la regió MHC de classe II i es van genotipar 97 SNPs en 11 gens candidats relacionats amb la resposta immunitària: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, *MIF* (*Migration-Inhibitory Factor*), *NOS* (*Nitric Oxide Synthase*), *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*), *Slc11a1* i *VDR* (*Vitamin D Receptor*).

Aquest estudi es va realitzar en una població de 36 gossos de races que tenen una elevada prevalença de la malaltia (boxer, doberman, pastor alemany i beagle) i en una població de 51 podencs eivissencs com a raça resistent.

El complex principal d'histocompatibilitat (MHC) juga un paper important en la regulació de la resposta immunitària enfront les infeccions i diversos treballs han associat el MHC-II a susceptibilitat a leishmaniosi tant en ratolí com en humana (Blackwell *et al.*, 1980; Lara *et al.*, 1991; Petzl-Erler *et al.*, 1991; Cabrera *et al.*, 1995; Faghiri *et al.*, 1995; Leclercq *et al.*, 1996; Meddeb-Garnaoui *et al.*, 2001; Karplus *et al.*, 2002; Olivo-Diaz *et al.*, 2004). En examinar la relació que hi havia entre els al·lels del MHC-II i el curs de la infecció en una població de gossos mestissos brasilers d'infecció natural es va identificar l'al·lel DLA-DRB1\*01502 associat a una major càrrega parasitària i uns nivells més alts d'anticossos anti-*Leishmania* (Quinnell *et al.*, 2003).

En el nostre estudi hem identificat dos al·lels associats a susceptibilitat, l'al·lel DQB1\*02301 (P=0,03) i l'al·lel DRB1\*01502 (P= 0,02), corroborant per aquest darrer l'associació prèviament descrita per Quinnell i col·laboradors (2003). Aquests dos al·lels es troben en el mateix haplotip en la raça boxer. En aquesta raça també hem



identificat un al·lel, DRB1\*01301 (P=0,05), que només es troba en animals controls (Taula 7).

El mecanisme pel qual un determinat al·lel del MHC-II determina susceptibilitat o resistència a la leishmaniosi és encara desconegut. Sabem que les molècules de MHC-II presenten antígens exògens als limfòcits Th i que la variabilitat de cada al·lel depèn de la composició aminoacídica de la regió hipervariable (HVR) codificada per l'exó 2. Els al·lells podrien ser més o menys eficients a l'hora de presentar l'antigen o bé, aquests al·lells podrien presentar antígens exacerbants de la malaltia. Un estudi de vacunes realitzat en ratolins BALB/c infectats amb *L. major* ha posat de manifest l'existència d'antígens que afavoreixen l'agreujament de la malaltia associat a elevats nivells de citocines derivades de la resposta Th2, com la IL-4, o derivades de les cèl·lules Treg, com la IL-10 (Roberts *et al.*, 2005).

Alternativament, aquests al·lells podrien estar en desequilibri de lligament amb altres al·lells de susceptibilitat o resistència d'altres loci que formen el MHC, tals com el TNF. S'ha demostrat l'existència d'un polimorfisme en l'intró 2 del gen TNF- $\beta$  i un en el promotor del gen TNF- $\alpha$ , els quals augmenten el risc de patir leishmaniosi mucocutània en humans (Cabrera *et al.*, 1995). En el cas del gos, s'han descrit recentment SNPs amb efecte protector en els gens TNF i IL-4 associats a CVL (Barnes *et al.*, 2007).

També s'ha identificat un haplotip DLA-DRB1\*00601/DQA1\*005011/DQB1\*00701 en gossos resistents de les races boxer i doberman i en la població de podencs eivissencs, que juntament amb l'al·lel DRB1\*01301 podrien conferir resistència als gossos portadors.

A partir de l'anàlisi dels 11 gens candidats restants, hem trobat una associació significativa amb leishmaniosi per 2 d'ells: IL-6 i *VDR*. Concretament hem identificat 3 SNPs que estan significativament associats a CVL: 1 SNP, 20R191, localitzat en la regió 3' flanquejant de la IL-6 i 2 SNPs, 13M453 i 15S439, localitzats en l'intró 7 del gen *VDR*. Les freqüències genotípiques i al·lèliques i el resultat del test d'associació per aquests SNPs els trobem en la Taula 8.

**Taula 7.** Resultats de la distribució al·lèlica i l'anàlisi d'associació pel MHC-II. (N) nombre de gossos, (Freq) Freqüència de l'haplotip. (\*) P-valor  $\leq 0.05$ . En negreta estan indicats els al·lels que es discuteixen en el text en aquest apartat. En cursiva els que es discutiran en el pròxim apartat.

Raça	Resistents		Susceptibles		DRB1	DQA1	DQB1
	N	Freq	N	Freq			
Boxer	8	0,44	8	0,50	00401	00201	01501
		0,25		-	<b>01301*</b>	00101	00201
		0,19		-	<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>
		0,06		0,44	<b>01502*</b>	<b>00601</b>	<b>02301*</b>
		0,06		0,06	01201	00401	013017
Pastor Alemany	6	0,50	6	0,25	01501	00601	00301
		0,33		0,25	01101	00201	01302
		0,08		-	00102	00101	00201
		0,08		0,18	01501	00601	<b>02301*</b>
		-		0,08	00101	00101	00201
		-		0,08	00201	00301	00501
		-		0,08	01801	00101	00802
		-		0,08	04001	01001	01901
Doberman	2	0,75	2	0,50	00601	00401	01303
		0,25		-	<b>00601</b>	<b>005011</b>	<b>00701</b>
		-		0,25	00901	00101	008011
		-		0,25	01201	00101	00201
Beagle	2	0,75	2	0,75	00102	00101	00201
		0,25		0,25	00201	00901	00101
Podenc Eivissenc	51	0,24			01503	00601	<i>04801</i>
		0,21			00601	005011	00701
		0,19			<i>06901</i>	00101	00201
		0,15			00802	00301	00401
		0,14			00901	00101	008011
		0,07			01801	00101	00802
		0,01			00101	00101	00201

**Taula 8.** Freqüències genotípiques i al·lèliques i test d'associació genotípica pels SNPs significativament associats a CVL per a la població cas-control. Pel test d'associació només s'han representat els models que presenten significació estadística: <sup>(1)</sup> model codominant, <sup>(2)</sup> model dominant. \* P-valor <0,05; \*\* P-valor <0,01. N: nombre de gossos.

SNP		Genotip			Al·lel		N	Significació
<b>IL-6</b>	<b>20R191</b>	<b>GG</b>	<b>GA</b> <sup>(1)</sup>	<b>AA</b>	<b>G</b>	<b>A</b>		
	Cas	0,44	0,50	0,06	0,69	0,31	18	$P = 0,011^*$
	Control	0,67	0,11	0,22	0,72	0,28	18	OR= 8,00 (1,41-45,41)
<b>VDR</b>	<b>13M453</b>	<b>CC</b>	<b>CA</b>	<b>AA</b> <sup>(2)</sup>	<b>C</b>	<b>A</b>		
	Cas	0,07	0,13	0,80	0,13	0,87	15	$P = 0,009^{**}$
	Control	0,07	0,60	0,33	0,37	0,63	15	OR=8,00 (1,52-42,04)
	<b>15S439</b>	<b>GG</b>	<b>GC</b>	<b>CC</b> <sup>(2)</sup>	<b>G</b>	<b>C</b>		
	Cas	0,11	0,33	0,56	0,28	0,72	18	$P = 0,006^{**}$
	Control	0,12	0,76	0,12	0,50	0,50	17	OR=9,37 (1,64-53,62)

Pel gen IL-6 s'ha identificat 1 SNP localitzat a la regió 3' flanquejant del gen. Malgrat que els elements reguladors més coneguts els trobem en el promotor del gen i en la regió 5' UTR (Pickering i Willis, 2005) és també important considerar la regió 3', ja que és una regió rica en elements reguladors que poden alterar tant l'expressió com la proteïna resultant (Chen *et al.*, 2006). La IL-6 es caracteritza tant per ser una citocina proinflamatòria que contribueix a la diferenciació i/o activació dels macròfags com per la seva capacitat de promoure la diferenciació de les cèl·lules Th2 inhibint la diferenciació de les cèl·lules Th1 (Van Snick, 1990). En la literatura trobem només un treball publicat recentment en el que s'ha descrit un SNP -174G/C en el promotor del gen IL-6 associat a susceptibilitat a leishmaniosi mucocutània en humana (Castellucci *et al.*, 2006). En aquest estudi els portadors de l'al·lel de risc tenen una menor expressió del gen i això podria disminuir la capacitat de diferenciació de les cèl·lules Th2, de manera que obtindríem una resposta Th1 exagerada, expressada per elevats nivells

d'IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , que provocaria la destrucció dels teixits per la que es caracteritza aquesta malaltia.

En el gen *VDR* hem identificat 2 SNPs significativament associats a CVL, localitzats en ambdós casos a l'intró 7 del gen que com ja hem comentat anteriorment poden actuar com a marcadors o tenir transcendència funcional per si mateixos. La vitamina D<sub>3</sub> actua com un element regulador del metabolisme del calci però també pot actuar en la resposta immunitària (DeLuca, 1988; DeLuca i Cantorna, 2001). En la resposta immunitària adquirida, hi actua suprimint la proliferació de cèl·lules T, impeding el desenvolupament de la resposta Th1 (Lemire *et al.*, 1985; Lemire, 1992). Però la vitamina D<sub>3</sub> també pot actuar durant la immunitat innata com a un potent supressor dels macròfags activats i aquesta inactivació té lloc via el seu receptor (*VDR*) (Helming *et al.*, 2005). Per tant, és bàsic que el *VDR* sigui completament funcional perquè la vitamina D<sub>3</sub> pugui actuar. S'han descrit polimorfismes en el gen *VDR* humana associats a susceptibilitat a nombroses malalties infeccioses com tuberculosi, lepra, dengue i hepatitis B (Bellamy *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2000; Loke *et al.*, 2002; Roth *et al.*, 2004). Recentment, en un estudi publicat s'hi destaca que el *VDR* contribueix a la susceptibilitat a *L. major* en ratolins (Ehrcen *et al.*, 2007).

Aquests resultats corroboren el paper del MHC de classe II amb la CVL i evidencien nous gens candidats: IL-6 i *VDR*. Per tal de confirmar aquests resultats seria interessant analitzar aquests SNPs en la població cas-control ampliada que inclou més races.

#### 4.1.3. Caracterització genètica de la raça Podenc Eivissenc

El podenc eivissenc es considera una raça resistent a la leishmaniosi canina ja que fins ara no s'ha descrit cap animal malalt de leishmaniosi, tot i ser una raça autòctona d'una regió endèmica, probablement a causa de la seva significativa resposta cel·lular enfront el paràsit (Solano-Gallego *et al.*, 2000). Per aquest motiu hem trobat interessant caracteritzar aquesta raça per tots els gens candidats analitzats.

L'anàlisi del *Slc11a1* ens ha donat un total de 6 haplotips inferits, tots ells específics per aquesta raça (Taula 5). Igualment, s'han descrit 7 haplotips pel MHC-II que inclouen els

loci DRB1, DQA1 i DQB1 (Taula 7). Tot i l'elevada variabilitat, el nombre d'haplotips no s'allunya gaire de la mitjana de 5,4 haplotips per raça descrits pel MHC-II per Kennedy i col·laboradors (2007). El que és rellevant és que per aquesta raça s'han identificat dos nous al·lels, DLA-DRB1\*06901 i DLA-DQB1\*04801, que formen dos nous haplotips específics per aquesta raça, ja que no s'han identificat en cap dels 3.600 gossos de 85 races diferents analitzades (comunicació personal, L. Kennedy).

A més, hem observat diferències entre les freqüències, tant al·lèliques com genotípiques, dels 97 SNPs dels 11 gens candidats analitzats entre el podenc i la resta de races analitzades. 93 dels 97 SNPs analitzats estan en equilibri Hardy-Weinberg (HW), proporció que s'emmarca dins el rang esperat per les races canines (Short *et al.*, 2007). Cal destacar, però, que els SNPs que no estan en equilibri HW s'han identificat en el gen *Slc11a1* i en el gen *VDR* (Taula 9). Atès que els diferents processos que poden alterar l'equilibri HW haurien d'afectar tots els SNPs per igual, aquests resultats podrien suggerir que aquests gens estan sota una pressió de selecció i que podrien configurar la particular resistència a CVL d'aquesta raça.

**Taula 9.** SNPs que no estan en equilibri Hardy-Weinberg identificats en els gens *Slc11a1* i *VDR*. (N): nombre d'animals. H. Obs: heterozigositat observada. H. Esp: heterozigositat esperada. (\*\*) P-valor < 0,01.

Gen	SNP	N	H. Obs	H. Esp	P-valor
<i>Slc11a1</i>	19S390	49	0,31	0,50	0,007 **
<i>Slc11a1</i>	8Y217	47	0,28	0,50	0,003 **
<i>VDR</i>	11R248	50	0,92	0,50	0,0001 **
<i>VDR</i>	24Y377	50	0,00	0,32	0,0001 **

Caldria l'anàlisi d'altres races relacionades amb el podenc eivissenc i també suposadament resistents a la leishmaniosi canina, com el ca egipci (comunicació personal, L. Ferrer), per tal d'avaluar quins dels haplotips o polimorfismes descrits en

aquests gens candidats comparteixen; i així poder determinar si aquestes diferències són per causa de la raça o bé, contribueixen a la resistència a CVL per la que és coneguda aquesta raça.

En l'annex 1 trobem una taula, formada pels gossos que hem analitzat pels diferents gens, on s'han detallat els genotips pels polimorfismes significatius pels gens *Slc11a1*, IL-6 i *VDR*, així com els haplotips descrits pel MHC-II.

#### **4.2. Citocines: anàlisi de l'expressió gènica en gossos d'infecció experimental**

La progressió de la leishmaniosi depèn de l'habilitat dels macròfags de l'hoste a l'hora d'eliminar el paràsit intracel·lular a través d'una xarxa complexa d'interaccions en les que hi participen les citocines i altres gens com els esmentats anteriorment, el gen *Slc11a1* i els que formen el MHC.

En gossos, la resolució de la malaltia ve determinada majoritàriament per una resposta de tipus cel·lular i per l'expressió preferentment de citocines derivades de les cèl·lules Th1 (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Chamizo *et al.*, 2005; Strauss-Ayali *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2006). En canvi, els gossos que esdevenen malalts presenten uns alts nivells d'anticossos anti-*Leishmania*, amb una resposta predominant IgG (El Amin *et al.*, 1986; Courtenay *et al.*, 2002; Quinnell *et al.*, 2003; Rodríguez-Cortes *et al.*, 2007) i una disminuïda resposta cel·lular (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994; Martínez-Moreno *et al.*, 1995), a més d'una majoritària resposta de tipus Th2 (Quinnell *et al.*, 2001; Brachelente *et al.*, 2005).

Els animals inclosos en aquest estudi eren 6 beagles femella de 9 mesos d'edat, negatius d'anticossos específics anti-*Leishmania* i de DNA de *Leishmania* en sang, que corresponien al grup control d'un estudi de vacunes que es va dur a terme al Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia (UAB), a més de formar part d'un altre estudi (veure annex 2). Varen ser vacunats contra brom, leptospirosi, hepatitis i parvovirosi i es van mantenir sota unes condicions dissenyades per tal d'excloure qualsevol possible infecció natural per *Leishmania*. Els 6 gossos van ser infectats experimentalment amb la mateixa dosi de promastigots i es van mantenir sota

les mateixes condicions ambientals. Al llarg d'un any es va fer un seguiment clínic, immunològic i parasitològic i s'observà una diferent progressió de la malaltia. Un total de 4 gossos (A, B, E, F) van desenvolupar símptomes clínics característics de la malaltia, producció d'IgG1, IgA i IgM, elevats nivells d'IgG i IgG2 i elevada càrrega parasitària (grup H). Els altres 2 gossos (C, D) no van presentar cap símptoma clínic en finalitzar l'estudi; van presentar una baixa i ocasional producció de IgG i IgG2 i cap altra immunoglobulina va ser detectada i el nombre de paràsits detectats va ser baix o zero (grup L).

Atès l'homogeneïtat ambiental i genètica (els 6 gossos estaven genotipats per tots els gens candidats sense observar-se'n diferències evidents) i el diferent curs de la malaltia observat ens va semblar interessant avaluar el perfil de citocines durant l'any de seguiment per trobar diferències entre els grups.

#### **4.2.1. Variabilitat en l'expressió de les citocines durant la preinfecció i la postinfecció**

Els dissenys dels diferents assajos de PCR a temps real foren prou sensibles per poder detectar l'expressió a partir de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de cadascun dels gens, almenys en algun punt de l'anàlisi, sense necessitat d'estimulació cel·lular prèvia. En conjunt, els nivells més baixos d'expressió els trobem per les citocines IL-4, IL-12 i IL-13, mentre que els nivells més alts els trobem per IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-10.

En la preinfecció cal destacar l'elevada variabilitat en els nivells d'expressió per cada citocina i entre els diferents animals, trobant els valors màxims d'expressió de cada citocina distribuïts a l'atzar entre els diferents animals (Fig. 10). En el gos no s'han descrit valors de referència que ens puguin ajudar a definir quin és el nivell d'expressió basal que s'esperaria trobar, per tant aquests són els primers resultats amb que es compte. Aquesta elevada variabilitat sense seguir un patró específic per cadascun dels dos grups de gossos, es tradueix en què un gos sa de partida no té avantatge des del punt de vista del perfil de citocines que té respecte un altre. És a dir, el nivell basal

d'expressió de les citocines analitzades no ens serveix com a eina de prognosi del tipus de resposta immunitària que tindrà lloc enfront la infecció.

Després de la infecció dels animals, l'expressió per cadascun dels gens analitzats i per cada animal va continuar sent marcadament variable al llarg de tot el seguiment. Aquesta elevada variabilitat postinfecció (pi) també va ser detectada en un estudi realitzat en gossos d'infecció natural, en el qual es va mesurar els nivells de mRNA de IL-4, IL-13, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  a partir de biòpsies de pell (Brachelente *et al.*, 2005).

A causa de la variabilitat observada i al baix nombre d'animals que formen aquest estudi vàrem decidir centrar-nos només en aquells patrons consistents que diferien entre els dos grups de gossos.

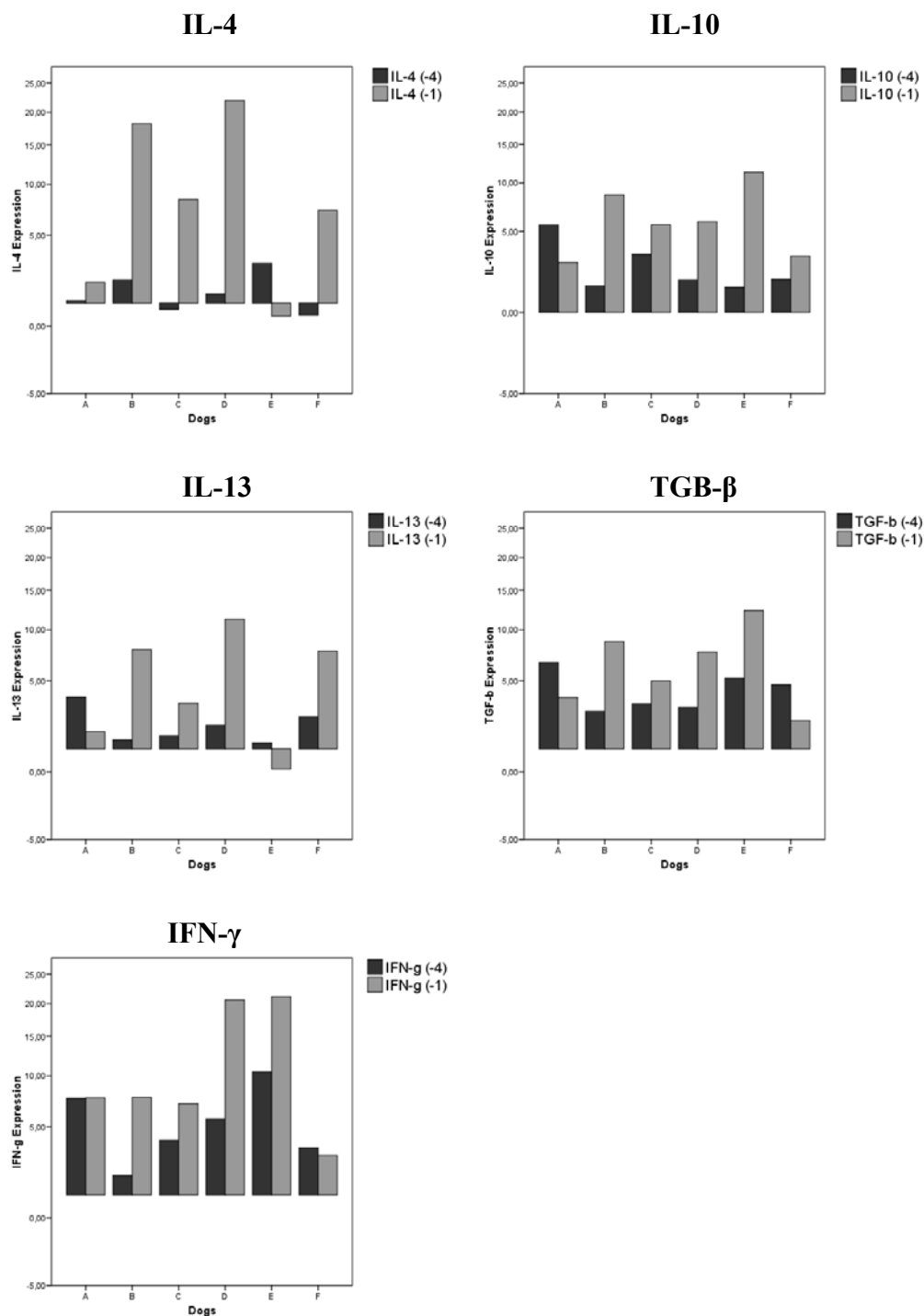
#### **4.2.2. Perfil de l'expressió gènica anterior a la detecció del paràsit en sang**

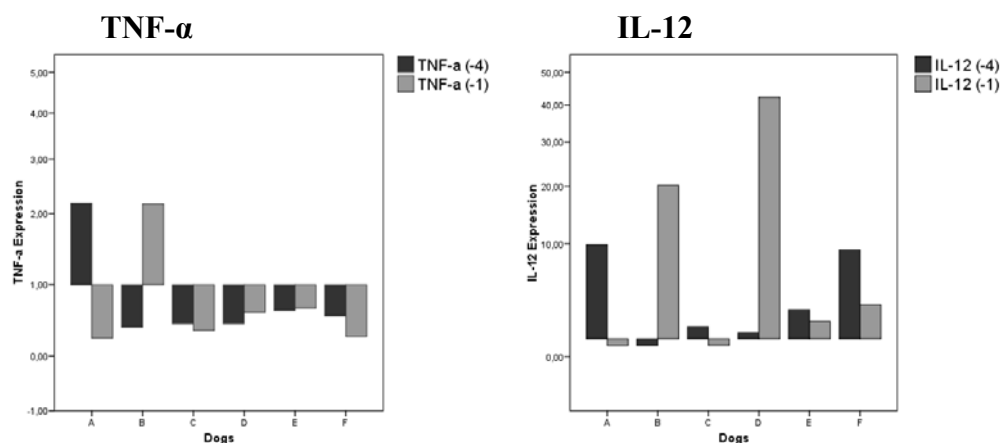
Un mes després d'haver tingut lloc la infecció observem una forta davallada generalitzada de l'expressió per tots els gens, que en la majoria dels casos es tradueix en una no detecció de l'expressió (Fig. 11). Nosaltres arbitràriament l'anomenarem immunosupressió i no està acompanyada de l'aparició de símptomes clínics. Cal tenir en compte però, que hem mesurat els nivells d'expressió de les citocines a partir de PBMC circulants i que la immunosupressió podria ser causada pel reclutament de les cèl·lules T als òrgans limfoides fent que no les detectéssim en sang.

Els primers indicis de supressió de la resposta immunitària en gos els trobem en un treball en gossos d'infecció natural al sud d'Itàlia, en el que es demostrava que al cap de 2 mesos de ser infectats tenia lloc una supressió de la resposta limfoproliferativa (De Luna *et al.*, 1999). Un estudi posterior en ratolí C57BL/6 infectat amb *L. major* evidenciava que durant les primeres 4 o 5 setmanes postinfecció, tenia lloc la multiplicació del paràsit en la pell, acompanyada per l'absència de lesions i de resposta immunitària de tipus cel·lular (Belkaid *et al.*, 2000). L'existència d'una primera fase de la infecció, en la que l'expansió i dispersió del paràsit estaven acompanyades de l'absència de símptomes clínics i d'una baixa expressió de citocines, va ser posteriorment corroborada per Santos-Gomes i col·laboradors (2002).



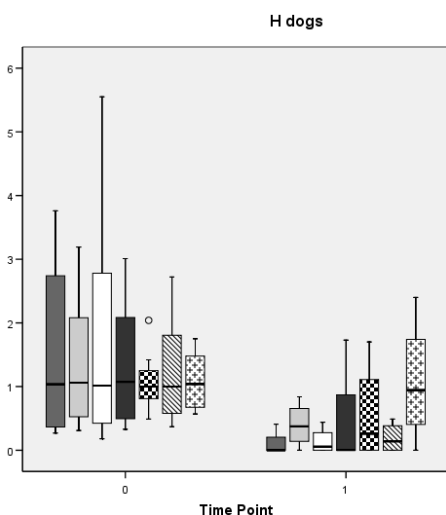
**Figura 10.** Quantificació relativa de l'expressió de mRNA en els mesos (-4) i (-1) de la preinfecció. En l'eix de les X hi trobem els 6 gossos (A, B, C, D, E, F). En l'eix de les Y està representada la quantificació relativa per cada citocina amb una escala exponencial de 0,5. Les citocines IL-12 i TNF- $\alpha$  estan representades en una escala de l'eix de les Y diferent.



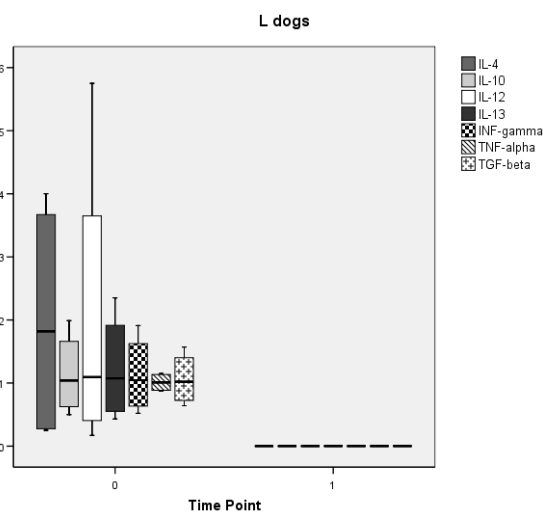


**Figura 11.** Diagrames de caixa corresponents a l'expressió de mRNA per cada citocina +1 mes pi. (a) Gossos grup H (A, B, E, F) i (b) grup L (C, D). En l'eix de les X s'hi representen els mesos pi. En l'eix de les Y està representada la quantificació relativa per cada citocina amb una escala exponencial de 0,5. El rectangle emmarca les freqüències compreses entre el percentil 25 i el percentil 75 i està dividit per una línia que representa la mediana. Ordre representació citocines en el diagrama: IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ .

**(a) gossos grup H**



**(b) gossos grup L**



Tot entrant en detall a la fase d'immunosupressió el que observem és que hi ha marcades diferències entre els dos grups de gossos.

Pel que fa al grup L, no detectem expressió per cap dels gens analitzats. En canvi, pel grup H, detectem nivells similars o inferiors als detectats durant la preinfecció, exceptuant el TGF- $\beta$  que es troba sobreexpressat en el gos B, animal que presentarà una càrrega parasitària més elevada durant l'estudi. En humana, s'ha descrit la participació del TGF- $\beta$  en la supervivència del paràsit dins el macròfag a l'inici de la infecció, tant pel que fa a la leishmaniosi cutània com la visceral (Gantt *et al.*, 2003; Campanelli *et al.*, 2006). A més, són diversos els estudis en ratolí i hámster que reforcen la importància del TGF- $\beta$  en la supressió de la immunitat cel·lular i el consegüent augment de la susceptibilitat enfront la *Leishmania* sense necessitat de la participació de les citocines derivades de la resposta Th2 (Rodrigues *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Mookerjee *et al.*, 2003; Gomes-Pereira *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2005). Però, en gos, no tenim cap treball que evidenciï el paper d'aquesta citocina en relació a la supervivència del paràsit.

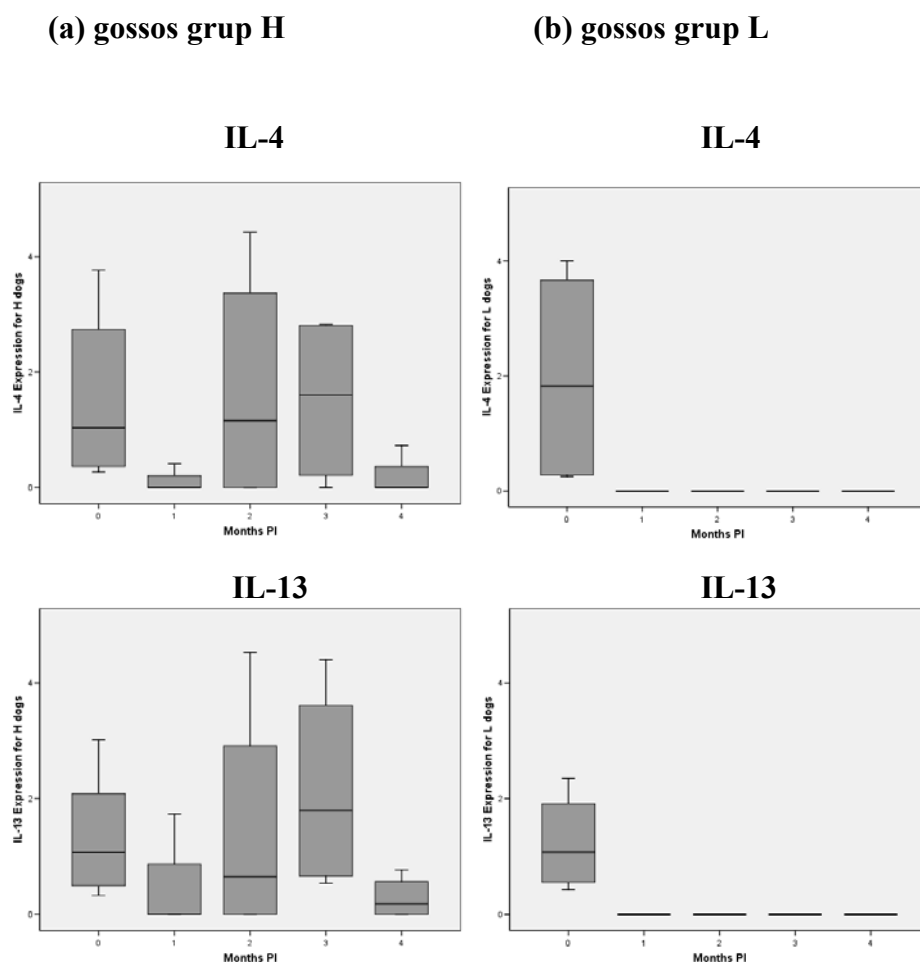
Després de la fase d'immunosupressió té lloc una reactivació generalitzada de l'expressió pels diferents gens. Ara bé, observem dos patrons clarament diferenciats per l'expressió de les citocines IL-4 i IL-13, derivades de la resposta Th2. Pels gossos del grup H té lloc una reactivació de l'expressió de les citocines IL-4 i IL-13 abans de la detecció del paràsit en sang (Fig. 12), mentre que pels gossos del grup L no detectem expressió per cap de les dues citocines durant els primers 4 mesos pi.

És important remarcar que els gossos H són els que assoliran la càrrega parasitària més elevada (gos B) i el valor més alt en l'índex clinicopatològic (gos E). Aquests resultats corroboren els trobats en estudis previs en gossos d'infecció natural on es demostra que alts nivells de IL-4 estan associats a una elevada càrrega parasitària i a una major severitat dels símptomes clínics, tant en pell com en moll d'os (Quinnell *et al.*, 2001; Brachelente *et al.*, 2005). A més a més, un estudi recent realitzat en melsa ha posat de manifest que durant el primer mes pi l'expressió de IL-4 és significativament superior en els gossos simptomàtics i que l'elevada expressió per aquesta citocina es manté durant els primers 3 mesos pi (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Aquests resultats ens suggereixen que en la primera fase de la infecció la IL-4 té un paper clau en la persistència/replicació del paràsit. D'altra banda, l'expressió de IL-13 en la fase inicial de la infecció té un paper exacerbant de la malaltia en infeccions causades per *L.*

*mexicana* i *L. major* en ratolins BALB/c salvatges i deficients en IL-4 o en el receptor de la IL-4 (revisat per Wynn, 2003).

Contràriament, l'absència de IL-4 i IL-13 en la fase inicial de la infecció en els gossos L sembla jugar un paper protector en aquests animals, ja que el nombre de paràsits detectats va ser baix o zero i en finalitzar l'estudi no van presentar cap símptoma clínic.

**Figura 12.** Diagrames de caixa corresponents a l'expressió de mRNA per les citocines IL-4 i IL-13 durant els primers 4 mesos pi. (a) Gossos grup H (A, B, E, F) i (b) grup L (C, D). En l'eix de les X s'hi representen els mesos pi. En l'eix de les Y està representada la quantificació relativa per cada citocina amb una escala exponencial de 0,5. El rectangle emmarca les freqüències compreses entre el percentil 25 i el percentil 75 i està dividit per una línia que representa la mediana.



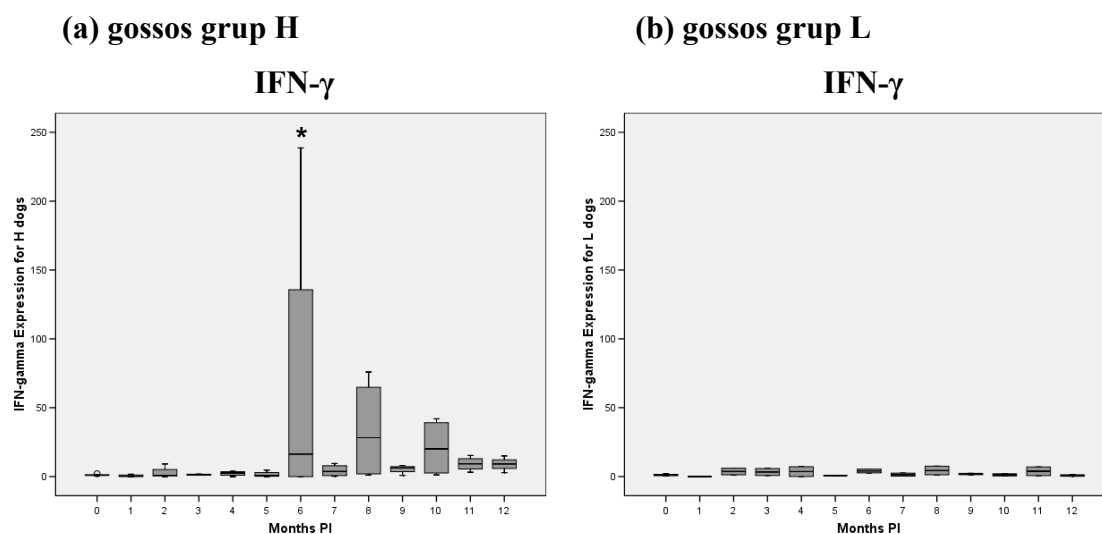
La presència en la fase inicial de la infecció de IL-4 i IL-13 en els gossos H podria facilitar la supervivència del paràsit i la seva replicació com a conseqüència de l'activació alternativa del macròfag que té lloc en presència d'aquestes dues citocines juntament amb el TGF- $\beta$ , i que es caracteritza per la ineficiència a l'hora d'eliminar el paràsit (Gordon, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004).

#### 4.2.3. Perfil de l'expressió gènica posterior a la detecció del paràsit en sang

Després de la detecció del paràsit en sang (4 mesos pi), l'únic patró consistent entre grups que observem al llarg dels diferents punts d'anàlisi és l'augment de l'expressió d'IFN- $\gamma$  com a conseqüència de la infecció, fet que havia estat demostrat en diversos treballs realitzats en PBMCs, moll d'os i melsa (Quinnell *et al.*, 2001; Chamizo *et al.*, 2005; Manna *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007; Strauss-Ayali *et al.*, 2007) (Fig. 13).

Existeixen diferències significatives entre els gossos H i els gossos L pel que fa a l'expressió d'IFN- $\gamma$  (Wilcoxon test,  $P < 0,02$ ), sent superior en els gossos H a partir del 6è mes pi i fins al final de l'estudi. Aquesta major expressió d'IFN- $\gamma$  està associada amb l'augment de la parasitemia (Spearman  $r = 0,48$ ;  $P < 0,001$ ) i de la simptomatologia, així com d'una major resposta humoral, mesurada per una elevada producció d'anticossos *Leishmania*-específic IgG i IgG2 (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007). Quinnell i col·laboradors (2001) ja van observar que la producció d'IFN- $\gamma$  estava fortament associada a la producció d'anti-*Leishmania* IgG en gossos infectats. Hi ha treballs però que malgrat trobar una correlació positiva entre la càrrega parasitària i l'expressió d'IFN- $\gamma$  mesurada en moll d'os o melsa, no troben diferències pel que fa a l'expressió d'aquesta citocina entre gossos de baix nombre de paràsits o asimptomàtics i gossos d'alt nombre de paràsits o simptomàtics (Quinnell *et al.*, 2001; Correa *et al.*, 2007; Lage *et al.*, 2007).

**Figura 13.** Diagrames de caixa corresponents a l'expressió de mRNA per l'IFN- $\gamma$  al llarg de l'estudi. (a) Gossos grup H (A, B, E, F) i (b) grup L (C, D). En l'eix de les X s'hi representen els mesos pi. En l'eix de les Y està representada la quantificació relativa d'IFN- $\gamma$  amb una escala exponencial de 0,5. (\*)  $P < 0,05$ . El rectangle emmarca les freqüències compreses entre el percentil 25 i el percentil 75 i està dividit per una línia que representa la mediana.



Els resultats obtinguts en aquest estudi proporcionen nous indicis dels mecanismes immunològics que controlen la infecció per *Leishmania* i la progressió de la malaltia en gos. Les principals conclusions són les següents: (1) La leishmaniosi canina es caracteritza per la producció de citocines Th1 i Th2. En la fase inicial de la infecció una predominant resposta Th2, amb una elevada expressió de IL-4 i IL-13 pot afavorir la replicació del paràsit i la disseminació de la infecció. (2) L'elevada expressió d'IFN- $\gamma$  durant la fase patent de la infecció està associada a l'augment de la càrrega parasitària i als símptomes clínics. (3) L'elevada variabilitat de l'expressió gènica durant la preinfecció dificulta l'establiment d'uns nivells de referència d'expressió basal per les citocines estudiades.



## *Conclusions*

---





## 5. Conclusions

1. Es confirma l'associació del gen *Slc11a1* i la susceptibilitat a leishmaniosi canina amb la identificació de 3 nous SNPs significatius localitzats a l'intró 6 (A4549G), l'exó 8 (C4859T) i l'intró 13 (C8542T).
2. Es corrobora l'associació de l'al·lel DRB1\*01502 a susceptibilitat a leishmaniosi en gossos de la raça boxer. En aquesta mateixa raça s'han identificat 2 nous al·lels (DRB1\*01301 i DQB1\*02301) associats a leishmaniosi canina.
3. S'ha trobat una associació significativa pel SNP 20R191 localitzat a la regió 3' flanquejant de la IL-6 i els SNPs 13M453 i 15S439 localitzats en l'intró 7 del gen *VDR*, suggerint el possible paper d'aquests gens en la leishmaniosi canina.
4. El Podenc Eivissenc té un perfil genètic diferent per tots els gens candidats analitzats per la leishmaniosi canina. S'han identificat nous al·lels pel MHC-II (DRB1\*06901 i DQB1\*04801) i haplotips específics pel gen *Slc11a1*.
5. La leishmaniosi canina es caracteritza per una davallada generalitzada de l'expressió gènica en la fase inicial de la infecció. A partir d'aquest moment l'expressió de IL-4 i IL-13 pot afavorir la replicació del paràsit i la disseminació de la infecció; durant la fase patent de la infecció, l'elevada expressió d'IFN- $\gamma$  està associada a l'augment de la càrrega parasitària i als símptomes clínics.
6. L'elevada variabilitat de l'expressió gènica prèvia a la infecció, elimina la possibilitat d'utilitzar el nivell basal d'expressió d'aquestes citocines com a prognosi de la leishmaniosi.



## *Resum*

---



## 6. Resum

La leishmaniosi canina és una zoonosi causada pel paràsit *Leishmania infantum*, sent el gos el principal reservori. És endèmica de la conca Mediterrània, de l'orient Mitjà i d'Amèrica del Sud arribant la prevalença de la infecció en aquestes zones al 67%. A més, és una malaltia en expansió ja que recentment s'han descrit casos als Estats Units i Regne Unit, atribuïbles al desplaçament de gossos portadors i al canvi climàtic amb la consegüent expansió del mosquit. L'interès d'aquesta malaltia es deu a la seva emergència a nivell global, tant per a la salut pública en humans, com pel benestar animal.

L'objectiu d'aquesta tesi és l'estudi de la base molecular de la resistència i la susceptibilitat a la leishmaniosi visceral canina (CVL) des de dues vessants diferents, l'estudi del polimorfisme de 12 gens candidats i el MHC de classe II i el perfil immunològic en l'establiment de la infecció i en la posterior evolució de la malaltia.

S'han caracteritzat 22 nous SNPs pel gen *Slc11a1*, que està involucrat en la primera barrera de defensa de l'organisme contra els paràsits, a part de tenir múltiples efectes pleotròpics que influencien la resposta immunitària posterior. Un estudi cas-control format per 164 gossos de 19 races, on s'han analitzat 24 polimorfismes per aquest gen, ens ha permès identificar 3 SNPs significatius: A4549G localitzat a l'intró 6, C4859T localitzat a l'exó 8 i C8542T localitzat a l'intró 13, corroborant la implicació d'aquest gen en la CVL.

Com a conseqüència d'un treball en col·laboració amb el *Centre for Integrated Genomic Medical Research* (CIGMR) (Universitat de Manchester) s'ha caracteritzat la regió MHC de classe II i s'han genotipat 97 SNPs en 11 gens candidats relacionats amb la resposta immunitària: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, *MIF* (*Migration-Inhibitory Factor*), *NOS* (*Nitric Oxide Synthase*), *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*), *Slc11a1* i *VDR* (*Vitamin D Receptor*). El polimorfisme d'aquests gens candidats s'han analitzat en una població de 36 gossos de races que tenen una elevada prevalença de la malaltia.

S'han identificat dos al·lels associats a susceptibilitat a la CVL, l'al·lel DQB1\*02301 i l'al·lel DRB1\*01502, tot corroborant per aquest darrer l'associació prèviament descrita. Aquests dos al·lels es troben en el mateix haplotip en la raça boxer, raça on també s'ha identificat un al·lel que només es troba en els animals control, DRB1\*01301. A partir de l'anàlisi dels 11 gens candidats hem identificat 3 SNPs significativament associats a CVL: 1 SNP localitzat en la regió 3' flanquejant de la IL-6 (20R191) i 2 SNPs localitzats en l'intró 7 del gen *VDR* (13M453 i 15S439) suggerint un paper rellevant d'aquests gens en la CVL.

Tots aquests gens candidats han estat genotipats en una població de podencs eivissencs, raça considerada com a resistent. Els resultats obtinguts, confirmen que aquesta raça té una base genètica pròpia que probablement configura la seva particular resistència a la malaltia. S'han identificat nous al·lels pel MHC-II (DRB1\*06901 i DQB1\*04801) i haplotips específics pel gen *Slc11a1*.

Per l'anàlisi del perfil immunològic en la infecció per *Leishmania infantum* s'ha dut a terme un estudi d'expressió de citocines (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$ ) mesurades mensualment durant un any en 6 beagles d'infecció experimental que van presentar una diferent progressió de la malaltia. Els resultats obtinguts en aquest estudi proporcionen nous indicis dels mecanismes immunològics que controlen la progressió de la leishmaniosi canina, que es caracteritza per la producció de citocines Th1 i Th2. En la fase inicial de la infecció una predominant resposta Th2 amb una elevada expressió de IL-4 i IL-13 pot afavorir la replicació del paràsit i la disseminació de la infecció. L'elevada expressió d'IFN- $\gamma$  durant la fase patent de la infecció està associada a l'augment de la càrrega parasitària i als símptomes clínics. A més, és important remarcar l'elevada variabilitat de l'expressió gènica durant la preinfecció que dificulta l'establiment d'uns nivells de referència d'expressió basal per aquestes citocines.

Els resultats d'aquesta tesi corroboren el paper dels gens *Slc11a1* i *DRB1* amb la leishmaniosi visceral canina i evidencien nous gens candidats relacionats amb la malaltia, reafirmant la base genètica de la resistència/susceptibilitat de l'hoste; a més,

aporten informació del perfil de diferents citocines en la infecció per *Leishmania infantum*.





## 7. Resumen

La leishmaniosis canina es una zoonosis causada por el protozoo *Leishmania infantum* y el perro es considerado el principal reservorio del parásito. Es una enfermedad endémica de la cuenca Mediterránea, Oriente medio y Sudamérica y la prevalencia en estas zonas llega al 67%. Además es una enfermedad en expansión ya que recientemente se han descrito casos en Estados Unidos y en Reino Unido, atribuibles al desplazamiento de animales portadores y al cambio climático con la consecuente expansión del mosquito. El interés en esta enfermedad se debe a su emergencia a nivel global, tanto para la salud humana como para el bienestar animal.

El objetivo de esta tesis es el estudio de la base molecular de la resistencia y la susceptibilidad a la leishmaniasis visceral canina (CVL) a partir de dos aproximaciones distintas, el estudio del polimorfismo en 12 genes candidatos y el MHC de clase II y el perfil inmunológico en el establecimiento de la infección y en la posterior evolución de la enfermedad.

Se han caracterizado 22 nuevos SNPs para el gen *Slc11a1*, que está involucrado en la primera barrera de defensa contra los parásitos, además de tener múltiples efectos pleiotrópicos que actúan en la posterior respuesta inmunitaria. Un estudio caso-control formado por 164 perros de 19 razas, donde se han analizado 24 polimorfismos para este gen, nos ha permitido identificar 3 SNPs significativos: A4549G localizado en el intrón 6, C4859T localizado en el exón 8 y C8542T localizado en el intrón 13, corroborando la implicación de este gen en la CVL.

Gracias a un trabajo en colaboración con el *Centre for Integrated Genomic Medical Research* (CIGMR) (Universidad de Manchester) se ha caracterizado la región del MHC de clase II y se han genotipado 97 SNPs en 11 genes candidatos relacionados con la respuesta inmune: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, *MIF* (*Migration-Inhibitory Factor*), *NOS* (*Nitric Oxide Synthase*), *TNF* (*Tumor Necrosis Factor*), *Slc11a1* y *VDR* (*Vitamin D Receptor*). El polimorfismo de estos genes se ha analizado en una población de 36 perros pertenecientes a razas que presentan una elevada prevalencia para la enfermedad.

Se han identificado dos alelos asociados a susceptibilidad a la CVL, el alelo DQB1\*02301 y el alelo DRB1\*01502, corroborándose para este último la asociación descrita previamente. Estos dos alelos forman parte del mismo haplotipo en la raza boxer, raza en la que también se ha identificado un alelo que solo se encuentra en los animales controles, DRB1\*01301. A partir del análisis de los 11 genes candidatos hemos identificado 3 SNPs significativamente asociados a CVL: 1 SNP localizado en la región 3' flanqueante de la IL-6 (20R191) y 2 SNPs localizados en el intrón 7 del gen VDR (13M453 y 15S439) sugiriendo un papel relevante de estos genes en la CVL.

Todos estos genes candidatos han sido genotipados en una población de podencos ibicencos, raza considerada resistente a la leishmaniosis. Los resultados obtenidos confirman que esta raza tiene una base genética propia que probablemente configura su particular resistencia a la enfermedad. Se han identificado nuevos alelos para el MHC-II (DRB1\*06901 y DQB1\*04801) y haplotipos específicos para el gen *Slc11a1*.

Para el análisis del perfil inmunológico en la infección por *Leishmania infantum* se ha llevado a cabo un estudio de expresión de citoquinas (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ), analizadas mensualmente durante un año, en beagles de infección experimental que presentaron diferencias en la progresión de la enfermedad. Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan nuevos indicios sobre los mecanismos inmunológicos que controlan la progresión de la leishmaniosis canina, que se caracteriza por la producción de citoquinas Th1 y Th2. En la fase inicial de la infección una predominante respuesta Th2 con una elevada expresión de IL-4 y IL-13 puede favorecer la replicación del parásito y la diseminación de la infección. La elevada expresión de IFN- $\gamma$  durante la fase patente de la infección está asociada con el aumento de la carga parasitaria y a los síntomas clínicos. Además, es importante remarcar la elevada variabilidad de la expresión génica durante la pre-infección, dificultando el establecimiento de niveles de referencia de la expresión basal de estas citoquinas.

Los resultados de esta tesis corroboran el papel de los genes *Slc11a1* y *DRB1* en la leishmaniosis visceral canina y ponen en evidencia nuevos genes candidatos relacionados con la enfermedad, reafirmando la base genética de la

resistencia/susceptibilidad en el huésped; además, aportan información del perfil de diferentes citoquinas en la infección por *Leishmania infantum*.



## 8. Summary

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a zoonosis caused by *Leishmania infantum*. The dog is considered the main peridomestic reservoir of the parasite. CVL is endemic in the Mediterranean basin, Middle East, and South America and the prevalence of *Leishmania* infection can reach 67% in these areas. Moreover, leishmaniasis is emerging within non endemic areas such as North America and the United Kingdom mostly because of the movement of dogs from endemic areas and climatic changes with expansion of the sandfly vector. Leishmaniasis is thus increasingly becoming an important concern both from human public health and animal welfare perspectives.

The aim of the present study is to insight into the molecular mechanisms of the resistance and susceptibility to CVL. Analyzing the polymorphism in 12 candidate genes and for the MHC class II region and by evaluating the immunological profile during the establishment of the infection and the progress of the disease.

We have characterized 22 new SNPs in the *Slc11a1* gene, which is involved in the first step of defense against the parasites and it is known for its multiple pleiotropic effects influencing the immune response. A total of 24 polymorphisms of the *Slc11a1* gene have been typed in 164 dogs from 19 different breeds and we have discovered significant associations with CVL for 3 SNPs: A4549G in intron 6, C4859T in exon 8 and C8542T in intron 13, corroborating the role of this gene in CVL.

In collaboration with the Centre for Integrated Genomic Medical Research (CIGMR) (University of Manchester) we have genotyped the MHC class II region and a panel of 97 SNPs from 11 candidate genes related with the immune response: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, *MIF* (Migration-Inhibitory Factor), *NOS* (Nitric Oxide Synthase), TNF (Tumor Necrosis Factor), *Slc11a1* and *VDR* (Vitamin D Receptor). Polymorphism at these genes has been analyzed in a breed-matched case-control study of 36 dogs of 4 different breeds known to be predisposed to CVL.

We have identified two susceptibility alleles for CVL, the allele DQB1\*02301 and allele DRB1\*01502, corroborating for this allele the association previously described.

These two alleles were found in the same haplotype in the boxer breed. Moreover, we have identified an allele (DRB1\*01301) only in the control animals of this breed. Data analyses for the 11 candidate genes have revealed that 3 SNPs were significantly associated to CVL: 1 SNP identified in the 3' flanking region of IL-6 (20R191) and 2 SNPs identified in intron 7 of *VDR* gene (13M453 and 15S439), suggesting the role of these candidate genes on CVL.

All these candidate genes have been genotyped in a cohort of Ibizan Hounds as a resistant breed. Data analysis confirms a specific genetic background for this breed that probably contributes to the resistance to CVL. New alleles for the MHC class II (DRB1\*06901 and DQB1\*04801) and specific haplotypes for the *Slc11a1* gen have been identified.

To evaluate the immunological profile associated to *Leishmania infantum* infection we have performed a cytokine gene expression study (IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ ) monthly during one year follow-up in six experimentally infected beagle dogs that presented different progression of the illness. Our results contribute to the knowledge of the pathogenesis of canine visceral leishmaniasis, which is marked by a balance production of Th1 and Th2 cytokines. In the first stage of infection a predominant Th2 response with an early IL-4 and IL-13 expression could favours parasite survival and the spread of the infection. A higher late IFN- $\gamma$  expression is associated with the increase of parasite load and clinical status. Moreover, the high variability of expression during the pre-infection stage difficult the establishment of reference basal levels for these cytokines.

The results of this study corroborate the role of the genes *Slc11a1* and *DRB1* in canine visceral leishmaniasis and provide new candidate genes related with the disease, further confirming the importance of host genetics in resistance/susceptibility to infectious disease. Moreover, they provide information of the cytokine profile in *Leishmania infantum* infection.

## *Bibliografia*

---





Abranches, P., Silva-Pereira, MC, Conceição-Silva, FM, Santos-Gomes, GM, & Janz, JG. 1991. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77(4): 557-61.

Alexander, J., & Bryson, K. 2005. T helper (h)1/Th2 and leishmania: Paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*, 99(1): 17-23.

Alonso, DP, Ferreira, AF, Ribolla, PE, de Miranda Santos, IK, do Socorro Pires e Cruz, M, Aécio de Carvalho, F, Abatepaulo, AR, Lamounier Costa, D., Werneck, GL, Farias, TJ, Soares, MJ, & Costa, CH. 2007. Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *J Infect Dis*, 195(8): 1212-7.

Altet, L., Francino, O., Solano-Gallego, L., Renier, C., & Sánchez, A. 2002. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun*, 70(6): 2763-71.

Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., & Moreno, J. 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: The first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 10(2): 298-319.

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350-5.

Anthony, V., & Skach, WR. 2002. Molecular mechanism of P-glycoprotein assembly into cellular membranes. *Curr Protein Pept Sci*, 3(5): 485-501.

Atkinson, PG, Blackwell, JM, & Barton, CH. 1997. Nramp1 locus encodes a 65 kDa interferon-gamma-inducible protein in murine macrophages. *Biochem J*, 325 (Pt 3): 779-86.

Awasthi, A., Mathur, RK, & Saha, B. 2004. Immune response to leishmania infection. *Indian J Med Res*, 119(6): 238-58.

Balding, DJ. 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*, 7(10): 781-91.

Baneth, G., & Aroch, I. 2008. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, 175(1): 14-5.

Barnes, A., Kennedy, L., Ollier, B., Short, A., Courtenay, O., Soremekun, S., Garcez, L., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Sanchez, A., Francino, O. & Quinnell, R. 2007. Genetics of susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog. *British Small Animal Veterinary Association (BSAVA)*.

Barral-Netto, M., Barral, A., Santos, SB, Carvalho, EM, Badaro, R., Rocha, H., Reed, SG, & Johnson, WD. 1991. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 147(1): 281-4.

Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, CE, Skeiky, YA, Ellingsworth, LR, Twardzik, DR, & Reed, SG. 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: A parasite escape mechanism. *Science*, 257(5069): 545-8.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., & Sacks, D. 2000. A natural model of leishmania major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*, 165(2): 969-77.

Bellamy, R., Ruwende, C., Corrah, T., McAdam, KP, Thursz, M., Whittle, HC, & Hill, AV. 1999. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis*, 179(3): 721-4.

Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, J, Wienholds, E., Plasterk, RH, & Cuppen, E. 2005. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*, 120(1): 21-4.

Bettini, S., & Gradoni, L. 1986. Canine leishmaniasis in the mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. , 7: 241-245.

Blackwell, JM, Freeman, J, & Bradley, D. 1980. Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature*, 3; 283(5742):72-4.

Blackwell, JM. 1996. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today*, 2(5): 205-11.

Blackwell, JM, Black, GF, Peacock, CS, Miller, EN, Sibthorpe, D., Gnananandha, D., Shaw, JJ, Silveira, F., Lins-Lainson, Z., Ramos, F., Collins, A., & Shaw, MA. 1997. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: The belem family study. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 352(1359): 1331-45.

Blackwell, JM, Goswami, T., Evans, CA, Sibthorpe, D., Papo, N., White, JK, Searle, S., Miller, EN, Peacock, CS, Mohammed, H., & Ibrahim, M. 2001. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. *Cell Microbiol*, 3(12): 773-84.

Blackwell, JM, Searle, S., Mohamed, H., & White, JK. 2003. Divalent cation transport and susceptibility to infectious and autoimmune disease: Continuation of the Ity/Lsh/Bcg/Nramp1/Slc11a1 gene story. *Immunol Lett*, 85(2): 197-203.

Blackwell, JM, Mohamed, HS, & Ibrahim, ME. 2004. Genetics and visceral leishmaniasis in the sudan: Seeking a link. *Trends Parasitol*, 20: 268-74.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., & Nathan, C. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*, 174(6): 1549-55.

Bogdan, C., Vodovotz, Y., Paik, J., Xie, QW, & Nathan, C. 1994. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol*, 55(2): 227-33.

Brachelente, C., Müller, N., Doherr, MG, Sattler, U., & Welle, M. 2005. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. *Vet Pathol*, 42(2): 166-75.

Bradley, DJ. 1977. Regulation of leishmania populations within the host. II. genetic control of acute susceptibility of mice to leishmania donovani infection. *Clin Exp Immunol*, 30(1): 130-40.

Bradley, DJ, Taylor, BA, Blackwell, J., Evans, EP, & Freeman, J. 1979. Regulation of leishmania populations within the host. III. mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. *Clin Exp Immunol*, 37(1): 7-14.

Bucheton, B., Abel, L., Kheir, MM, Mirgani, A., El-Safi, SH, Chevillard, C., & Dessein, A. 2003. Genetic control of visceral leishmaniasis in a sudanese population: Candidate gene testing indicates a linkage to the NRAMP1 region. *Genes Immun*, 4: 104-9.

Burgner, D., Jamieson, SE, & Blackwell, JM. 2006. Genetic susceptibility to infectious diseases: Big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infect Dis*, 6(1): 653-63.

Cabral, M., O'Grady, J., & Alexander, J. 1992. Demonstration of leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol*, 14(5): 531-9.

Cabrera, M., Shaw, MA, Sharples, C., Williams, H., Castes, M., Convit, J., & Blackwell, JM. 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 182(5): 1259-64.

Campanelli, AP, Roselino, AM, Cavassani, KA, Pereira, MS, Mortara, RA, Brodskyn, CI, Goncalves, HS, Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., & Silva, JS. 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*, 193(9): 1313-22.

Cartegni, L., Chew, SL, & Krainer, AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: Exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, 3(4): 285-98.

Cartegni, L., & Krainer, AR. 2002. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet*, 30(4): 377-84.

Carvalho, EM, Teixeira, RS, & Johnson, WD. 1981. Cell-mediated immunity in american visceral leishmaniasis: Reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*, 33(2): 498-500.

Carvalho, EM, Badaró, R., Reed, SG, Jones, TC, & Johnson, WD. 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*, 76(6): 2066-9.

Castellucci, L., Menezes, E., Oliveira, J., Magalhaes, A., Guimaraes, LH, Lessa, M., Ribeiro, S., Reale, J., Noronha, EF, Wilson, ME, Duggal, P., Beaty, TH, Jeronimo, S., Jamieson, SE, Bales, A., Blackwell, JM, de Jesus, AR, & Carvalho, EM. 2006. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in brazil. *J Infect Dis*, 194(4): 519-27.

Chamizo, C., Moreno, J., & Alvar, J. 2005. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 103(1-2): 67-75.

Chen, JM, Férec, C., & Cooper, DN. 2006. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: General principles and overview. *Hum Genet*, 120(1): 1-21.

Corrêa, AP, Dossi, AC, de Oliveira Vasconcelos, R, Munari, DP, & de Lima, VM. 2007. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by leishmania (leishmania) chagasi. *Vet Parasitol*, 143(3-4): 267-74.

Courtenay, O., Quinnell, RJ, Garcez, LM, Shaw, JJ, & Dye, C. 2002. Infectiousness in a cohort of brazilian dogs: Why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*, 186(9): 1314-20.

Courville, P., Chaloupka, R., & Cellier, MF. 2006. Recent progress in structure-function analyses of nramp proton-dependent metal-ion transporters. *Biochem Cell Biol*, 84(6): 960-78.

Cox, FE, & Liew, FY. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today*, 13(11): 445-8.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., & Alvar, J. 2006. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 123(3): 357-88.

DeLuca, HF. 1988. The vitamin D story: A collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J*, 2(3): 224-36.

DeLuca, HF, & Cantorna, MT. 2001. Vitamin D: Its role and uses in immunology. *FASEB J*, 15(14): 2579-85.

De Luna, R., Vuotto, ML, Ielpo, MT, Ambrosio, R., Piantedosi, D., Moscatiello, V., Ciaramella, P., Scalone, A., Gradoni, L., & Mancino, D. 1999. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by leishmania infantum. *Vet Immunol Immunopathol*, 70(1-2): 95-103.

D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, VM, Bird, TD, & Schellenberg, GD. 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10): 5598-603.

Duprey, ZH, Steurer, FJ, Rooney, JA, Kirchhoff, LV, Jackson, JE, Rowton, ED, & Schantz, PM. 2006. Canine visceral leishmaniasis, united states and canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, 12(3): 440-6.

Ehrchen, J., Helming, L., Varga, G., Pasche, B., Loser, K., Gunzer, M., Sunderkötter, C., Sorg, C., Roth, J., & Lengeling, A. 2007. Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with leishmania major. *FASEB J*, 21(12): 3208-18.

El Amin, EM, Wright, EP, & Vlug, A. 1986. Characterization of the humoral immune response in sudanese leishmaniasis: Specific antibody detected by class- and subclass-specific reagents. *Clin Exp Immunol*, 64(1): 14-9.

El-Safi, S., Kheir, MM, Bucheton, B., Argiro, L., Abel, L., Dereure, J., Dedet, JP, & Dessein, A. 2006. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. *C R Biol*, 329(1): 863-70.

Enserink, M. 2000. Infectious diseases. Has leishmaniasis become endemic in the U.S.? *Science*, 290(5498): 1881-3.

Faghiri, Z., Tabei, SZ, & Taheri, F. 1995. Study of the association of HLA class I antigens with kala-azar. *Hum Hered*, 45(5): 258-61.

Forbes, JR, & Gros, P. 2001. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, 9(8): 397-403.

França-Silva, JC, da Costa, RT, Siqueira, AM, Machado-Coelho, GL, da Costa, CA, Mayrink, W., Vieira, EP, Costa, JS, Genaro, O., & Nascimento, E. 2003. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of montes claros municipality, minas gerais state, brazil. *Vet Parasitol*, 111(2): 161-73.

Gantt, KR, Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, SM, Nascimento, ET, Goldman, TL, Recker, TJ, Miller, MA, & Wilson, ME. 2003. Activation of TGF-beta by leishmania chagasi: Importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol*, 170(5): 2613-20.

Gaskin, AA, Schantz, P., Jackson, J., Birkenheuer, A., Tomlinson, L., Gramiccia, M., Levy, M., Steurer, F., Kollmar, E., Hegarty, BC, Ahn, A., & Breitschwerdt, EB. 2002. Visceral leishmaniasis in a new york foxhound kennel. *J Vet Intern Med*, 16: 34-44.

Gomes-Pereira, S., Rodrigues, OR, Rolão, N., Almeida, PD, & Santos-Gomes, GM. 2004. Hepatic cellular immune responses in mice with "cure" and "non-cure" phenotype to leishmania infantum infection: Importance of CD8+ T cells and TGF-beta production. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 41(1): 59-68.

Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat rev Immunol*, 3: 23-35.



Goswami, T., Bhattacharjee, A., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M., & Blackwell, JM. 2001. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H<sup>+</sup>/bivalent cation antiporter. *Biochem J*, 354: 511-9.

Govoni, G., Vidal, S., Gauthier, S., Skamene, E., Malo, D., & Gros, P. 1996. The Bcg/Ity/Lsh locus: Genetic transfer of resistance to infections in C57BL/6J mice transgenic for the Nramp1 Gly169 allele. *Infect Immun*, 64(8): 2923-9.

Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M., & Gros, P. 1997. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med*, 185: 717-30.

Haymann, F. 2007. Pure breed dogs worldwide. *Veterinary Focus*, 17(2): 2-3.

Healy, DG. 2006. Case-control studies in the genomic era: A clinician's guide. *Lancet Neurol*, 5(8): 701-7.

Heinzel, FP, Sadick, MD, Mutha, SS, & Locksley, RM. 1991. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(16): 7011-5.

Helming, L., Böse, J., Ehrchen, J., Schiebe, S., Frahm, T., Geffers, R., Probst-Kepper, M., Balling, R., & Lengeling, A. 2005. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. *Blood*, 106(13): 4351-8.

Karplus, TM, Jeronimo, SM, Chang, H., Helms, BK, Burns, TL, Murray, JC, Mitchell, AA, Pugh, EW, Braz, RF, Bezerra, FL, & Wilson, ME. 2002. Association between the tumor necrosis factor locus and the clinical outcome of leishmania chagasi infection. *Infect Immun*, 70(12): 6919-25.

Kennedy, LJ, Barnes, A., Short, A., Brown, JJ, Lester, S., Seddon, J., Fleeman, L., Francino, O., Brkljacic, M., Knyazev, S., Happ, GM, & Ollier, WE. 2007. Canine DLA diversity: 1. new alleles and haplotypes. *Tissue antigens*, 69 Suppl 1: 272-88.

Killick-Kendrick, R. 1990. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: A review. *Med Vet Entomol*, 4(1): 1-24.

Kimchi-Sarfaty, C., Oh, JM, Kim, IW, Sauna, ZE, Calcagno, AM, Ambudkar, SV, & Gottesman, MM. 2007. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315(581): 525-8.

Krawczak, M., Reiss, J., & Cooper, DN. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: Causes and consequences. *Hum Genet*, 90(1): 41-54.

Jeronimo, SM, Holst, AK, Jamieson, SE, Francis, R., Martins, DR, Bezerra, FL, Ettinger, NA, Nascimento, ET, Monteiro, GR, Lacerda, HG, Miller, EN, Cordell, HJ, Duggal, P., Beaty, TH, Blackwell, JM, & Wilson, ME. 2007. Genes at human chromosome 5q31.1 regulate delayed-type hypersensitivity responses associated with leishmania chagasi infection. *Genes Immun*, 8(7): 539-51.

Lage, RS, Oliveira, GC, Busek, SU, Guerra, LL, Giunchetti, RC, Corrêa-Oliveira, R., & Reis, AB. 2007. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by leishmania chagasi. *Vet Immunol Immunopathol*, 115(1): 135-45.

Lara, ML, Layrisse, Z., Scorza, JV, Garcia, E., Stoikow, Z., Granados, J., & Bias, W. 1991. Immunogenetics of human american cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from venezuela. *Hum Immunol*, 30(2): 129-35.

Lemire, JM, Adams, JS, Kermani-Arab, V., Bakke, AC, Sakai, R., & Jordan, SC. 1985. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. *J Immunol*, 134(5): 3032-5.

Lemire, JM. 1992. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem*, 49(1): 26-31.

Letterio, JJ, & Roberts, AB. 1998. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*, 16: 137-61.

Leclercq, V., Lebastard, M., Belkaid, Y., Louis, J., & Milon, G. 1996. The outcome of the parasitic process initiated by leishmania infantum in laboratory mice: A tissue-dependent pattern controlled by the lsh and MHC loci. *J Immunol*, 157(10): 4537-45.

Lewis, BP, Burge, CB, & Bartel, DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1): 15-20.

Li, J., Hunter, CA, & Farrell, JP. 1999. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of leishmania major infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *J Immunol*, 162(2): 974-9.

Liew, FY, Hale, C., & Howard, JG. 1982. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. characterization of effector and specific suppressor T cells. *J Immunol*, 128(4): 1917-22.

Liew, FY. 1990. Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. *Curr Top Microbiol Immunol*, 155: 53-64.

Lindblad-Toh, K., Wade, CM, Mikkelsen, TS, Karlsson, EK, Jaffe, DB, Kamal, M., Clamp, M., Chang, JL, Kulbokas, EJ, Zody, MC, Mauceli, E., Xie, X., Breen, M., Wayne, RK, Ostrander, EA, Ponting, CP, Galibert, F., Smith, DR, DeJong, PJ, Kirkness, E., Alvarez, P., Biagi, T., Brockman, W., Butler, J., Chin, CW, Cook, A., Cuff, J., Daly, MJ, DeCaprio, D., Gnerre, S., Grabherr, M., Kellis, M., Kleber, M., Bardeleben, C., Goodstadt, L., Heger, A., Hitte, C., Kim, L., Koepfli, KP, Parker, HG, Pollinger, JP, Searle, SM, Sutter, NB, Thomas, R., Webber, C., Baldwin, J., Abebe, A., Abouelleil, A., Aftuck, L., Ait-Zahra, M., Aldredge, T., Allen, N., An, P., Anderson, S., Antoine, C., Arachchi, H., Aslam, A., Ayotte, L., Bachantsang, P., Barry, A., Bayul, T., Benamara, M., Berlin, A., Bessette, D., Blitshteyn, B., Bloom, T., Blye, J., Boguslavskiy, L., Bonnet, C., Boukhgalter, B., Brown, A., Cahill, P., Calixte, N., Camarata, J., Cheshatsang, Y., Chu, J., Citroen, M., Collymore, A., Cooke, P., Dawoe, T., Daza, R., Decktor, K., DeGray, S., Dhargay, N., Dooley, K., Dooley, K., Dorje, P., Dorjee, K., Dorris, L., Duffey, N., Dupes, A., Egbiremolen, O., Elong, R., Falk, J., Farina, A., Faro, S., Ferguson, D., Ferreira, P., Fisher, S., FitzGerald, M., Foley, K., Foley, C., Franke, A., Friedrich, D., Gage, D., Garber, M., Gearin, G., Giannoukos, G.,

Goode, T., Goyette, A., Graham, J., Grandbois, E., Gyaltzen, K., Hafez, N., Hagopian, D., Hagos, B., Hall, J., Healy, C., Hegarty, R., Honan, T., Horn, A., Houde, N., Hughes, L., Hunnicutt, L., Husby, M., Jester, B., Jones, C., Kamat, A., Kanga, B., Kells, C., Khazanovich, D., Kieu, AC, Kisner, P., Kumar, M., Lance, K., Landers, T., Lara, M., Lee, W., Leger, JP, Lennon, N., Leuper, L., LeVine, S., Liu, J., Liu, X., Lokyitsang, Y., Lokyitsang, T., Lui, A., Macdonald, J., Major, J., Marabella, R., Maru, K., Matthews, C., McDonough, S., Mehta, T., Meldrim, J., Melnikov, A., Meneus, L., Mihalev, A., Mihova, T., Miller, K., Mittelman, R., Mlenga, V., Mulrain, L., Munson, G., Navidi, A., Naylor, J., Nguyen, T., Nguyen, N., Nguyen, C., Nguyen, T., Nicol, R., Norbu, N., Norbu, C., Novod, N., Nyima, T., Olandt, P., O'Neill, B., O'Neill, K., Osman, S., Oyono, L., Patti, C., Perrin, D., Phunkhang, P., Pierre, F., Priest, M., Rachupka, A., Raghuraman, S., Rameau, R., Ray, V., Raymond, C., Rege, F., Rise, C., Rogers, J., Rogov, P., Sahalie, J., Settipalli, S., Sharpe, T., Shea, T., Sheehan, M., Sherpa, N., Shi, J., Shih, D., Sloan, J., Smith, C., Sparrow, T., Stalker, J., Stange-Thomann, N., Stavropoulos, S., Stone, C., Stone, S., Sykes, S., Tchuinga, P., Tenzing, P., Tesfaye, S., Thoulutsang, D., Thoulutsang, Y., Topham, K., Topping, I., Tsamla, T., Vassiliev, H., Venkataraman, V., Vo, A., Wangchuk, T., Wangdi, T., Weiand, M., Wilkinson, J., Wilson, A., Yadav, S., Yang, S., Yang, X., Young, G., Yu, Q., Zainoun, J., Zembek, L., Zimmer, A., & Lander, ES. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*, 438(7069): 803-19.

Lipoldová, M., & Demant, P. 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: Lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet*, 7(4): 294-305.

Loke, H., Bethell, D., Phuong, CX, Day, N., White, N., Farrar, J., & Hill, A. 2002. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin d receptor and fc gamma receptor IIa genes. *Am J Trop Med Hyg*, 67(1): 102-6.

Maasho, K., Sanchez, F., Schurr, E., Hailu, A., & Akuffo, H. 1998. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun*, 66(6): 2698-704.

Mackenzie, B., & Hediger, MA. 2004. SLC11 family of H<sup>+</sup>-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflugers Arch*, 447(5): 571-9.

Majumder, S., & Kierszenbaum, F. 1996. Mechanisms of trypanosoma cruzi-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor gamma (p64IL-2R) and beta (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes. *J Immunol*, 156(10): 3866-74.

Malo, D., Vogan, K., Vidal, S., Hu, J., Cellier, M., Schurr, E., Fuks, A., Bumstead, N., Morgan, K., & Gros, P. 1994. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse nramp gene predict susceptibility to infection with intracellular parasites. *Genomics*, 23(1): 51-61.

Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Manzillo, VF, Michele, PL, Caracappa, S., & Gravino, AE. 2006. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol*, 142(3): 271-80.

Martínez-Moreno, A., Moreno, T., Martínez-Moreno, FJ, Acosta, I., & Hernández, S. 1995. Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 48(3-4): 209-20.

Meddeb-Garnaoui, A., Gritli, S., Garbouj, S., Ben Fadhel, M., El Kares, R., Mansour, L., Kaabi, B., Chouchane, L., Ben Salah, A., & Dellagi, K. 2001. Association analysis of HLA-class II and class III gene polymorphisms in the susceptibility to mediterranean visceral leishmaniasis. *Hum Immunol*, 62(5): 509-17.

Miller, EN, Fadl, M., Mohamed, HS, Elzein, A., Jamieson, SE, Cordell, HJ, Peacock, CS, Fakiola, M., Raju, M., Khalil, EA, Elhassan, A., Musa, AM, Ibrahim, ME, & Blackwell, JM. 2007. Y chromosome lineage- and village-specific genes on chromosomes 1p22 and 6q27 control visceral leishmaniasis in sudan. *PLoS Genet*, 3(5): e71.

Miranda, S., Roura, X., Alberola, J., Ferrer, L., & Ramis, A. 2005. Clinically patent canine leishmaniasis shows age, breed and sex predilection. *Third World Congress on Leishmaniasis*. Italy.

Mohamed, HS, Ibrahim, ME, Miller, EN, White, JK, Cordell, HJ, Howson, JM, Peacock, CS, Khalil, EA, El Hassan, AM, & Blackwell, JM. 2004. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and susceptibility to visceral leishmaniasis in the sudan. *Eur J Hum Genet*, 12: 66-74.

Mookerjee, A., Sen, PC, & Ghose, AC. 2003. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor beta antibody. *Infect Immun*, 71(5): 2439-46.

Moore, KW, de Waal Malefyt, R, Coffman, RL, & O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 19: 683-765.

Mosmann, TR, & Moore, KW. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*, 12(3): A49-53.

Neff, MW, Broman, KW, Mellersh, CS, Ray, K., Acland, GM, Aguirre, GD, Ziegler, JS, Ostrander, EA, & Rine, J. 1999. A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *canis familiaris*. *Genetics*, 151(2): 803-20.

Olivo-Díaz, A., Debaz, H., Alaez, C., Islas, VJ, Pérez-Pérez, H., Hobart, O., & Gorodezky, C. 2004. Role of HLA class II alleles in susceptibility to and protection from localized cutaneous leishmaniasis. *Hum Immunol*, 65(3): 255-61.

Ouchi, K., Suzuki, Y., Shirakawa, T., & Kishi, F. 2003. Polymorphism of SLC11A1 (formerly NRAMP1) gene confers susceptibility to kawasaki disease. *J Infect Dis*, 187(2): 326-9.

Patterson, DF. 2000. Companion animal medicine in the age of medical genetics. *J Vet Intern Med*, 14(1): 1-9.

- Peters, N., & Sacks, D. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: Leishmania and regulatory T cells. *Immunol Rev*, 213: 159-79.
- Petzl-Erlor, ML, Belich, MP, & Queiroz-Telles, F. 1991. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Hum Immunol*, 32(4): 254-60.
- 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(1): 229-35.
- Pinheiro, RO, Pinto, EF, Lopes, JR, Guedes, HL, Fentanes, RF, & Rossi-Bergmann, B. 2005. TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with leishmania amazonensis antigens. *Microbes Infect*, 7(13): 1317-23.
- Place, RF, Li, LC, Pookot, D., Noonan, EJ, & Dahiya, R. 2008. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(5): 1608-13.
- Plant, JE, Blackwell, JM, O'Brien, AD, Bradley, DJ, & Glynn, AA. 1982. Are the lsh and ity disease resistance genes at one locus on mouse chromosome 1? *Nature*, 297(5866): 510-1.
- Quinnell, RJ, Courtenay, O., Shaw, MA, Day, MJ, Garcez, LM, Dye, C., & Kaye, PM. 2001. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 183(9): 1421-4.
- Quinnell, RJ, Kennedy, LJ, Barnes, A., Courtenay, O., Dye, C., Garcez, LM, Shaw, MA, Carter, SD, Thomson, W., & Ollier, WE. 2003. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55(1): 23-8.
- Ranque, JM, Quilici, M., & Dunan, S. 1997. Les leishmanioses de la région provençale. Considerations épidémiologiques et écologiques. , 239: 285-293.

- Reithinger, R., & Dujardin, JC. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol*, 45(1): 21-5.
- Rittig, MG, & Bogdan, C. 2000. Leishmania-host-cell interaction: Complexities and alternative views. *Parasitol Today*, 16(7): 292-7.
- Roberts, MT, Stober, CB, McKenzie, AN, & Blackwell, JM. 2005. Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine leishmania major infection. *Infect Immun*, 73(11): 7620-8.
- Rodrigues, V., Santana da Silva, J., & Campos-Neto, A. 1998. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 66(3): 1233-6.
- Rodriguez, NE, Chang, HK, & Wilson, ME. 2004. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of leishmania chagasi. *Infect Immun*, 72(4): 2111-22.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., & Alberola, J. 2007. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol*, 37(6): 683-93.
- Roncarolo, MG, Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., & Levings, MK. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, 182: 68-79.
- Rosypal, AC, Zajac, AM, & Lindsay, DS. 2003. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the united states. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33(4): 921-37, viii.
- Roth, DE, Soto, G., Arenas, F., Bautista, CT, Ortiz, J., Rodriguez, R., Cabrera, L., & Gilman, RH. 2004. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and response to treatment of pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 190(5): 920-7.
- Roy, S., Frodsham, A., Saha, B., Hazra, SK, Mascie-Taylor, CG, & Hill, AV. 1999. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis*, 179(1): 187-91.



- Sanchez-Robert, E., Altet, L., Sanchez, A., & Francino, O. 2005. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered*, 96(7): 755-8.
- Santos-Gomes, GM, 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(1-2): 21-30.
- Sargan, DR. 2004. IDID: Inherited diseases in dogs: Web-based information for canine inherited disease genetics. *Mamm Genome*, 15(6): 503-6.
- Sarmiento, UM, Sarmiento, JI, & Storb, R. 1990. Allelic variation in the DR subregion of the canine major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, 32(1): 13-9.
- Sarmiento, UM, DeRose, S., Sarmiento, JI, & Storb, R. 1992. Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: I. DQA. *Immunogenetics*, 35(6): 416-20.
- Sarmiento, UM, DeRose, S., Sarmiento, JI, & Storb, R. 1993. Allelic variation in the DQ subregion of the canine major histocompatibility complex: II. DQB. *Immunogenetics*, 37(2): 148-52.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, AW, Coffman, RL, & Sher, A. 1989. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev*, 112: 161-82.
- Scott, P. 1993. IL-12: Initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science*, 260(5107): 496-7.
- Searle, S., & Blackwell, JM. 1999. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human NRAMP1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet*, 36: 295-9.
- Shaw, SE, Lerga, AI, Williams, S., Beugnet, F., Birtles, RJ, Day, MJ, & Kenny, MJ. 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the united kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet Rec*, 152(6): 176-7.

Sheppard, HW, Scott, PA, & Dwyer, DM. 1983. Recognition of leishmania donovani antigens by murine T lymphocyte lines and clones. Species cross-reactivity, functional correlates of cell-mediated immunity, and antigen characterization. *J Immunol*, 131(3): 1496-503.

Short, AD, Kennedy, LJ, Barnes, A., Fretwell, N., Jones, C., Thomson, W., & Ollier, WE. 2007. Hardy weinberg expectations in canine breeds: Implications for genetic studies. *J Hered*, 98(5): 445-51.

Sideris, V., Karagouni, E., Papadopoulou, G., Garifallou, A., & Dotsika, E. 1996. Canine visceral leishmaniasis in the great athens area, greece. *Parasite*, 3(2): 125-30.

Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Kongshavn, PA, St Charles, C., & Taylor, BA. 1982. Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature*, 297(5866): 506-9.

Slappendel, RJ, & Ferrer, L. 1998. Leishmaniasis. In: C.E. Greene, Editor, *Infectious Diseases of a Dog and Cat*, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Smith, PJ, Zhang, C., Wang, J., Chew, SL, Zhang, MQ, & Krainer, AR. 2006. An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*, 15(16): 2490-508.

Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. 2000. The ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural leishmania infection. *Vet Parasitol*, 90(1): 37-45.

Solano-Gallego, L., Morell, P., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. 2001a. 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: 560-3.

Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, JE, Fisa, R., Castillejo, S., Alberola, J., Ferrer, L., Arboix, M., & Portús, M. 2001b. 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(4): 265-76.

Strauss-Ayali, D., Baneth, G., Shor, S., Okano, F., & Jaffe, CL. 2005. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in leishmania infantum-infected dogs. *Int J Parasitol*, 35(1): 63-73.

Strauss-Ayali, D., Baneth, G., & Jaffe, CL. 2007. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 38(4): 547-64.

Sutter, NB, & Ostrander, EA. 2004. Dog star rising: The canine genetic system. *Nat Rev Genet*, 5(12): 900-10.

Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., & Akdis, CA. 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: The role of T regulatory cells. *Immunology*, 117(4): 433-42.

Tazi, J., Durand, S., & Jeanteur, P. 2005. The spliceosome: A novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem Sci*, 30(8): 469-78.

Van Snick, J. 1990. Interleukin-6: An overview. *Annu Rev Immunol*, 8: 253-78.

Vidal, SM, Malo, D., Vogan, K., Skamene, E., & Gros, P. 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for bcg. *Cell*, 73(3): 469-85.

Vidal, S., Tremblay, ML, Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., Skamene, E., Olivier, M., Jothy, S., & Gros, P. 1995. The Ity/Lsh/Bcg locus: Natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med*, 182(3): 655-66.

Vidal, SM, Pinner, E., Lepage, P., Gauthier, S., & Gros, P. 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol*, 157(8): 3559-68.

Wagner, JL, DeRose, SA, Burnett, RC, & Storb, R. 1995. Nucleotide sequence and polymorphism analysis of canine DRA cDNA clones. *Tissue antigens*, 45(4): 284-7.

Wiley, J., & Sons, Ltd. 2003. *Bioinformatics for Geneticists*. England.

Wilkinson, RJ, Llewelyn, M., Toossi, Z., Patel, P., Pasvol, G., Lalvani, A., Wright, D., Latif, M., & Davidson, RN. 2000. Influence of vitamin D deficiency and vitamin D receptor polymorphisms on tuberculosis among gujarati asians in west london: A case-control study. *Lancet*, 355(9204): 618-21.

Wilson, ME, Young, BM, Davidson, BL, Mente, KA, & McGowan, SE. 1998. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 161(11): 6148-55.

Wilson, ME, Jeronimo, SM, & Pearson, RD. 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing leishmania species. *Microb Pathog*, 38(4): 147-60.

Wynn, TA. 2003. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*, 21: 425-56.

Xie, T., Ding, D., Tao, X., & Dafu, D. 1995. The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Lett*, 434(1): 93-6.

Zaahl, MG, Robson, KJ, Warnich, L., & Kotze, MJ. 2004. Expression of the SLC11A1 (NRAMP1) 5'-(GT)<sub>n</sub> repeat: Opposite effect in the presence of -237C-->T. *Blood Cells Mol Dis*, 33: 45-50.

Zwilling, BS, Kuhn, DE, Wikoff, L., Brown, D., & Lafuse, W. 1999. Role of iron in Nramp1-mediated inhibition of mycobacterial growth. *Infect Immun*, 67(3): 1386-92.







**Annex 1.** Taula comparativa dels polimorfismes significatius pels gens MHC classe II, *Slc11a1*, IL-6 i VDR.

	MHC-II						Slc11a1					IL-6	VDR	
	BOXER													
	DRB1	DQA1	DQB1	DRB2	DQA2	DQB2	g	µsati1	4549	4859	8542	20R191	13M453	15S439
Cas	00401	00201	01501	01502	00601	02301	89	141/145	AA	CC	TT	GA	CC	GG
Cas	00401	00201	01501	00401	00201	01501	99	145/145	AA	CC	TT	GG	-	CC
Cas	00401	00201	01501	00401	00201	01501	89	141/145	AA	CC	TT	GG	CA	GC
Cas	01502	00601	02301	01502	00601	02301	99	145/145	AA	CC	TT	GG	CA	GC
Cas	01502	00601	02301	01502	00601	02301	99	141/145	AA	CC	TT	GG	AA	CC
Cas	00401	00201	01501	01502	00601	02301	89	141/145	-	CC	TT	GA	AA	CC
Cas	00401	00201	01501	01502	00601	02301	99	145/145	AA	-	TT	GG	AA	CC
Cas	00401	00201	01501	01201	00401	013+017	89	141/145	-	CC	TT	GG	-	GG
Control	00401	00201	01501	01301	00101	00201	99	145/145	AA	CC	TT	GG	CA	GC
Control	00401	00201	01501	01301	00101	00201	99	145/145	-	CC	TT	GG	-	GC
Control	00601	00501	100701	00601	00501	100701	99	145/145	-	-	-	GG	CC	GG
Control	00401	00201	01501	00401	00201	01501	99	145/145	-	-	-	GG	CA	GC
Control	01301	00101	00201	01502	00601	02301	99	145/145	-	-	-	GG	CA	GC
Control	00401	00201	01501	00401	00201	01501	99	145/145	-	-	-	GG	CA	GC
Control	00601	00501	100701	01301	00101	00201	99	145/145	AA	CC	CT	GG	CA	GC
Control	00401	00201	01501	00401	00201	01501	99	145/145	AA	CC	TT	GG	CC	GG
Control	00401	00201	01501	01301	00101	00201	99	145/145	AA	CC	CT	GG	-	GG
Control	00401	00201	01501	00401	00201	01501	89	141/145	AA	CC	TT	GG	-	GC
Control	00401	-	01501	00401	-	01501	99	145/145	AA	CC	-	GG	CA	GC
Control	01201	00401	013+017	01502	00601	02301	99	141/145	AA	CC	CT	GG	CC	GG
Control	00401	00201	01501	00401	00201	01501	99	145/145	AA	CC	TT	GG	CC	GG
Control	01301	00101	00201	01301	00101	00201	99	145/145	AA	CC	CT	GG	AA	CC
	BEAGLE													
	DRB1	DQA1	DQB1	DRB2	DQA2	DQB2	g	µsati1	4549	4859	8542	20R191	13M453	15S439
Cas	00102	00101	00201	00102	00101	00201	88	141/145	AA	CC	CC	GG	CC	GG
Cas	00102	00101	00201	00201	00901	00101	88	137/141	AA	CC	CC	GA	AA	GC
Control	00102	00101	00201	00201	00901	00101	88	137/141	AA	CC	CC	GG	CA	GC
Control	00102	00101	00201	00102	00101	00201	88	141/141	AA	CC	CC	AA	CA	GG
Cas	00102	00101	00201	00102	00101	00201	88	137/141	AA	CC	CC	GA	AA	GC
Cas	00101	00101	00201	00102	00101	00201	88	137/141	AA	CC	CC	GA	AA	GC
	DOBERMAN													
	DRB1	DQA1	DQB1	DRB2	DQA2	DQB2	g	µsati1	4549	4859	8542	20R191	13M453	15S439
Cas	00601	00401	01303	01201	00101	00201	88	137/137	AG	CC	CC	GG	AA	CC
Cas	00601	00401	01303	00901	00101	00801	89	141/145	AA	CC	TT	GA	-	CC
Control	00601	00401	01303	00601	00401	01303	78	137/137	AG	CC	CC	AA	AA	GC
Control	00601	00501	100701	00601	00401	01303	89	137/145	AA	CC	TT	AA	-	GC
Control	00601	00401	01303	01501	00901	00101	88	137/141	AA	CC	CC	GA	AA	-
	PASTOR ALEMANY													
	DRB1	DQA1	DQB1	DRB2	DQA2	DQB2	g	µsati1	4549	4859	8542	20R191	13M453	15S439
Cas	00201	00301	00501	01501	00601	02301	88	137/145	AA	CC	CC	GG	AA	CC
Cas	01101	00201	01302	01501	00601	00301	88	137/141	AA	CC	-	GA	AA	GC
Cas	01501	00601	00301	04001	01001	01901	88	137/141	-	-	CC	GA	AA	GC
Cas	00101	00101	00201	01801	00101	00802	88	141/145	-	-	CC	GA	AA	CC
Cas	01101	00201	01302	01501	00601	00301	78	137/145	AG	CC	CC	GA	AA	CC
Cas	01101	00201	01302	01501	00601	00301	88	145/145	AA	CC	CC	AA	AA	CC
Cas	00401	00201	01501	01501	00601	02301	88	141/145	AA	CC	CC	GA	AA	CC
Control	00102	00101	00201	01101	00201	01302	78	139/141	AG	CC	CC	GG	CA	GC
Control	01501	00601	00301	01501	00601	00301	89	145/145	AA	CC	CT	AA	-	-
Control	01101	00201	01302	01501	00601	00301	88	139/141	AG	CT	CC	GA	AA	GC
Control	01101	00201	01302	01501	00601	02301	88	137/141	AA	CC	CC	GG	CA	GC
Control	01501	00601	00301	01501	00601	00301	88	139/145	AA	CC	CT	GG	AA	CC
Control	01101	00201	01302	01501	00601	00301	88	141/145	AA	CC	TT	GA	AA	CC



Estan marcats en color els genotips amb significació estadística pels gens IL-6 i VDR i els al·lels pel gens *Slc11a1* i MHC-II.

MHC-II						Slc11a1					IL-6	VDR	
PODENC EIVISSENC													
DRB1	DQA1	DQB1	DRB2	DQA2	DQB2	g	usati1	4549	4859	8542	20R191	13M453	15S439
00802	00301	00401	01801	00101	00802	-	-	-	-	-	AA	AA	CC
00802	00301	00401	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	AA	CC
00601	00501	100701	01801	00101	00802	88	137/141	AA	CC	CC	AA	CA	GC
00802	00301	00401	00901	00101	008011	88	137/137	-	-	CC	GA	CA	GC
00802	00301	00401	00901	00101	008011	88	137/141	AA	CC	CC	AA	AA	CC
06901	00101	00201	01801	00101	00802	88	141/141	GG	CT	CC	AA	-	GG
06901	00101	00201	06901	00101	00201	88	137/141	-	-	CC	AA	CA	GC
00601	00501	100701	01503	00601	003v	88	141/141	-	-	CC	AA	CA	GC
06901	00101	00201	01801	00101	00802	88	137/145	AA	CC	CC	AA	AA	CC
06901	00101	00201	01801	00101	00802	88	137/145	-	CC	CC	AA	AA	CC
00802	00301	00401	01503	00601	003v	-	-	-	-	-	AA	CA	GC
00802	00301	00401	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	CA	GC
00901	00101	008011	00901	00101	008011	88	141/141	-	-	CC	AA	AA	CC
00802	00301	00401	01801	00101	00802	88	137/137	AA	CC	CC	AA	AA	CC
00601	00501	100701	00601	00501	100701	88	141/141	-	-	CC	AA	AA	CC
06901	00101	00201	00601	00501	100701	88	-	AG	CT	CC	AA	-	GC
00601	00501	100701	01503	00601	003v	88	141/141	AG	CT	CC	GA	AA	CC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	CA	GC
01503	00601	003v	01503	00601	003v	88	-	-	CT	CC	AA	CA	GC
00101		00201	00601		00701	-	-	-	-	-	AA	AA	GC
00601	00501	100701	01503	00601	003v	88	137/141	AA	CC	CC	GA	CA	GC
06901	00101	00201	00601	00501	100701	-	-	-	-	-	AA	-	GC
00601	00501	100701	00601	00501	100701	88	137/137	AA	CC	CC	GA	-	GC
00901	00101	008011	00901	00101	008011	-	-	-	-	-	AA	AA	CC
06901	00101	00201	00802	00301	00401	88	141/141	AA	CC	CC	GA	CA	GC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	-	-	-	-	-	AA	CC	GG
00802	00301	00401	00901	00101	008011	-	-	-	-	-	GA	CA	GC
00601	00501	100701	00901	00101	008011	-	-	-	-	-	GA	AA	CC
000802	00301	00401	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	AA	CC
00601	00501	100701	01503	00601	003v	-	-	-	-	-	AA	CA	GC
00601	00501	100701	01503	00601	003v	88	137/141	AA	CC	CC	AA	CA	GC
000802	00301	00401	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	CA	GC
01503	00601	003v	01503	00601	003v	88	141/141	AA	CC	CC	GA	CA	GC
06901	00101	00201	00802	00301	00401	88	141/141	AG	CT	CC	AA	-	CC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	-	GC
00601	00501	100701	00901	00101	008011	88	137/137	-	-	CC	AA	CA	GC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	-	-	-	-	-	AA	CC	GG
00601	00501	100701	00901	00101	008011	88	137/137	AA	CC	CC	AA	-	GC
00601	00501	100701	00802	00301	00401	88	137/141	AA	CC	CC	AA	CA	GC
00802	00301	00401	01503	00601	003v	88	137/137	AA	CC	CC	AA	AA	CC
01503	00601	003v	01503	00601	003v	-	-	-	-	-	AA	CA	GG
06901	00101	00201	06901	00101	00201	88	141/141	AG	CT	CC	AA	CC	GG
06901	00101	00201	06901	00101	00201	-	-	-	-	-	AA	CA	GC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	88	141/145	AA	CC	CC	AA	-	GC
00601	00501	100701	00601	00501	100701	88	141/141	AA	CC	CC	GA	-	GG
00802	00301	00401	00901	00101	008011	88	137/141	AA	CC	CC	GA	CA	-
00601	00501	100701	00901	00101	008011	88	137/145	AA	CC	CC	AA	AA	CC
00601	00501	100701	00901	00101	008011	88	137/141	-	-	CC	AA	AA	CC
06901	00101	00201	01503	00601	003v	88	137/141	AA	CC	CC	AA	CA	GC
01503	00601	003v	01503	00601	003v	88	141/145	AG	CT	CC	AA	-	CC
00901	00101	008011	01801	00101	00802	88	137/141	AA	-	CC	AA	CA	GC

**Annex 2**