

Estrategias de evasión y agresión que utilizan las leishmanias para sobrevivir y dañar al hospedador

Santiago Hernández Rodríguez

Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España.
Catedrático Emérito de la Universidad de Córdoba.

Las leishmaniosis son padecimientos comunes al hombre y a los animales que se conocen desde antiguo cuyas dolencias fueron recogidas en fuentes escritas tales como el papiro de Ebers (1500 aC) o el Antiguo Testamento. Algunas denominaciones ancestrales de la enfermedad humana de uso común hoy día, tales como “botón de Alepo”, “botón de oriente” o “rosa de Jericó” se relacionan con los lugares o asentamientos humanos habitados desde hace más de 7000 años donde dichas afecciones eran habituales.

En la actualidad la leishmaniosis humana constituye un complejo patológico constituido por procesos cutáneos (LC), mucocutáneos y viscerales (LV) causados por distintas especies del género *Leishmania* afectando a un total de 14 millones de personas distribuidas entre 88 países con una afectación aproximada de 2 millones de casos nuevos anuales: un millón y medio para las leishmaniosis cutáneas y medio millón para la forma visceral. La leishmaniosis canina se presenta bajo formas cutáneas, viscerales y viscerocutáneas. En la cuenca mediterránea la leishmaniosis humana y animal está producida por una única especie *Leishmania infantum* con prevalencias variables según las zonas.

2. BIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Las leishmanias son protozoos tripanosomátidos que muestran dos tipos morfológicos distintos a lo largo de su ciclo biológico, como formas extracelulares flageladas (promastigotas) situadas en la luz del tracto digestivo del vector (flebotominos) o como formas no flageladas (amastigotas) inmóviles, localizadas en el interior de las células del sistema mononuclear fagocítico de los hospedadores vertebrados.

El **promastigote** vive en la luz intestinal del aparato digestivo del mosquito soportando las condiciones hidrolíticas adversas del medio gracias a la presencia de **glucoconjugados de superficie** que los hace resistentes al proceso de digestión, al mismo tiempo que facilita su adherencia a las células intestinales evitando de esta manera la eliminación con los alimentos. Las formas infectantes para el hospedador definitivo son los denominados **promastigotes metacíclicos** que se desarrollan como una población diferenciada en la última fase del ciclo intravectorial, son más pequeños y están dotados de un flagelo muy largo que los hace extremadamente móviles. Se sitúan en las piezas bucales y en la proboscis de los insectos. El tiempo requerido para completar el ciclo en el mosquito es variable, dependiendo de la especie de *Leishmania*, del vector y de las condiciones ambientales, aunque por lo general oscila entre 6-14 días.

La leishmaniosis aparece en **nichos ecológicos** que permiten la coexistencia de poblaciones de parásitos, insectos vectores y hospedadores vertebrados. *Leishmania infantum* es la única especie identificada y tipificada hasta la fecha en la Península Ibérica, es la causante de una zoonosis que en ambientes urbanos afecta preferentemente a humanos, perros y gatos mientras que en los entornos silvestres los hospedadores más comunes son el zorro, la rata, el gato, el lobo o la gineta.

3. RELACIONES PARÁSITO-HOSPEDADOR

La relación que se establece entre *Leishmania* y perro es muy compleja y está condicionada por serie de factores entre los que destacan en primer lugar la especie y vinculado a ella la cepa o variedad, la cual viene determinada por la naturaleza de los constituyentes moleculares que conforman un zimodema, es decir un conjunto de individuos que ostentan un mismo perfil isoenzimático. *L. infantum* es la única especie identificada y tipificada hasta la fecha en la Península Ibérica siendo el zimodema MON-1 el aislado con mayor frecuencia en los hospedadores domésticos y en los reservorios silvestres. Es responsable en el hombre de afecciones cutáneas o botonosas en el 20% de los casos y del 90% de las formas viscerales. En segundo lugar cabe mencionar la constitución genética en relación con la capacidad que tenga el hospedador para desarrollar una respuesta inmunitaria más o menos efectiva que conduzca o no a la instauración de un proceso patológico. La resistencia genética en el perro se ha vinculado recientemente con el polimorfismo de un gen (NRAMP1) que codifica la proteína del macrófago (MΦ) encargada de regular la actividad del transporte de iones metálicos que intervienen en la producción de óxido nítrico, producto vinculado a la resistencia natural. La resistencia observada en el Podenco Ibicenco de las Islas Baleares, zona endémica cuyas prevalencias son superiores al 30%, podría estar asociada a este fenómeno. De igual manera se ha comprobado que líneas de ratones como la C57BL/6 son también resistentes a la infección.

3.1. COMIENZO DE LA INFECCIÓN

Se produce en el momento en que los promastigotes metacíclicos son inoculados por regurgitación del contenido digestivo junto a la saliva del insecto en los espacios extracelulares del tejido subcutáneo del hospedador. En ese momento se exponen a la acción lítica u opsonizante del **sistema del complemento**. Al comienzo de la infección no es posible la activación del sistema por la vía clásica ya que todavía no hay anticuerpos específicos porque no ha habido tiempo para su formación, aunque sí pueden ser atacados por el complemento activado bien por la vía alternativa espontánea o bien por la vía de la lectina unida a la manosa (MBL). Los complejos MBL formados tienen capacidad para unirse a una proteasa del tipo serina (MASP) que promueven la formación de la convertasa C3. Ésta se hidroliza espontáneamente escindiéndose en las subunidades C3a y C3b. C3a es un mediador de la inflamación, una anafilotoxina, mientras que C3b es una opsonina que actúa como iniciadora de una nueva vía de activación del complemento orientada a la destrucción del parásito mediante la formación del **complejo de ataque a la membrana** (MAC). La fase final de activación y fijación de complemento consiste en la formación de la convertasa de C5 a partir de C3b, dicha convertasa se desdobra en

C5a (con actividad semejante a la fracción C3a) y en C5b, esta última se asocia rápida y secuencialmente con C6, C7, C8 y con varias moléculas de C9 ensamblándose entre sí para formar los denominados poros, estructuras parecidas a un tubo hueco que atraviesa la membrana y que funcionan como canales hidrofílicos a cuyo través se permite el libre intercambio de sodio y agua entre el interior y el exterior del organismo ocasionando consecuentemente su lisis osmótica.

3.2. MECANISMOS DE EVASIÓN-AGRESIÓN

3.2.1. RESPECTO A LA INMUNIDAD NATURAL

Los promastigotes metacíclicos en el momento de ser inoculados por el vector tienen la capacidad de **evadir la lisis mediada por el complemento** debido a la existencia en su superficie de **lipofosfoglucanos (LPG)** y de una **glucoproteína** denominada **gp63**. El primero de dichos componentes inhibe la unión de las subunidades C5b hasta C9 y por tanto evita la lisis mediada por el complemento; mientras que la leismaniolisina *gp63* es una metaloproteasa que convierte la subunidad C3b del complemento en la forma inactiva C3bi, la cual inhabilita la formación de la convertasa de C5 y por tanto la lisis mediada por el complemento. Sin embargo C3bi posee función opsonina al poderse fijar al parásito y así ser fagocitado por los receptores del complemento del MΦ.

En este momento los flagelados inoculados junto con las sustancias anticoagulantes y vasodilatadoras liberadas por el insecto en el momento de la picadura hace que los tejidos dañados y las células inmunitarias comiencen a liberar señales químicas (IL-1, TNF- α) que incitan a las células endoteliales de los capilares a expresar de manera rápida moléculas de adhesión receptoras como son las selectinas y adhesinas que ligan con los de las mucinas e integrinas presentes en la superficie de los fagocitos circulantes, para que de esta manera se adhieran al endotelio y se dé inicio a los procesos de diapédesis y emigración desde los vasos sanguíneos a los territorios de la infección. Al mismo tiempo en los leucocitos residentes se estimula la producción de una quimiocina o citocina quimiotáctica (CXCL1) que potencia la emigración de fagocitos y granulocitos hacia el lugar de la infección. El acoplamiento de la quimiocina a receptores asociados a la proteína G localizados en la superficie de los leucocitos activa una fosfolipasa C (PLC) que interviene en eventos de señalización intracelular relacionados con la quimiotaxis, la degranulación y la eficacia de las moléculas de adhesión celular (mucinas e integrinas) que mucho tienen que ver con la organización del infiltrado inflamatorio localizado.

Las primeras células en llegar al punto de inoculación son los neutrófilos que fagocitan eficientemente a las leismanias aunque no pueden destruirlas como lo hacen los macrófagos, ni tampoco las leismanias son capaces de reproducirse en su interior. Esto hace que los neutrófilos funcionen como auténticos reservorios de parásitos ya que se encuentran protegidos del entorno adverso que supone el medio extracelular que los rodea.

A efectos de defensa, una vez superada la fase de la lisis por el complemento, la responsabilidad principal del siguiente paso recae casi exclusivamente en la

fagocitosis la cual es llevada a cabo por las células del sistema mononuclear fagocítico en cuyo proceso se ven involucrados numerosos **receptores del MΦ** como son:

- Receptores tipo colectinas que fijan restos de manosa presentes en las moléculas glucosiladas de la superficie de las leishmanias.
- Receptores CR1 que fijan componentes del complemento C3b y C4b.
- Receptores CR3 integrina que ligan los componentes C3bi y moléculas de adhesión intracelular y extracelular.
- Y receptores para la proteína C-reativa o proteínas de fase aguda con función opsonina.

Así pues los **promastigotes metacíclicos** que no se han destruido por la acción del MAC **pueden entonces ser fagocitados** bien de manera **directa** por medio de los receptores del MΦ que ligan los complejos glucosilados de superficie que contienen manosa como son los LPGs, *gp63* y los **glucosilfosfatidilinositol (GPIs)** que son moléculas de secuencia conservada asociadas a proteínas de membrana, o bien de manera **indirecta** por medio de una molécula interpuesta como son los componentes del complemento C3b, C3bi y la proteína C-reativa con función opsonina.

Los promastigotes metacíclicos fagocitados por los MΦs son alojados inmediatamente en el interior de una vacuola parasitófora (VP) delimitada por una unidad de membrana que los separa del resto del citoplasma. En este momento se inicia en el MΦ una serie de cambios que afectan principalmente a su fisiología. Del retículo endoplásmico rugoso se originan vesículas lisosómicas de transferencia y endosomas que se fusionan por coalescencia con las membranas de la VP para poner en íntimo contacto el contenido de los lisosomas (hidrolasas) con los promastigotes transformándose ahora en un fagolisosoma. Las vesículas de transferencia portan en su membrana restos derivados de la membrana plasmática del MΦ consecuente al proceso de endocitosis tales como una macrosialina (glucoproteína de superficie llamada LAMP) presente en la membrana de los lisosomas con capacidad para captar lipoproteínas de baja densidad, así como una guanosinatrifosfatasa (GTP-asa), hidrolasa denominada rab-7, que interviene en el transporte y ensamblaje vesicular, en la síntesis proteica, en la biogénesis de las membranas de los lisosomas y en su fusión con las membranas de la VP.

Las vesículas lisosómicas contienen en su interior varios tipos de catepsinas, enzimas equivalentes a las cisteína-proteasas del parásito, que catalizan en medio ácido la hidrólisis de las proteínas externas de las leishmanias degradándolas a polipéptidos. También están presentes en el fagolisosoma los **proteo-fosfo-glucanos (PPGs)** que son los únicos productos metabólicos de naturaleza antigénica eliminados por el parásito.

En un principio, la VP presenta una forma alargada adaptada a la del promastigote, aunque al cabo de 2-5 horas después de la fagocitosis el flagelo involucre hasta perderse totalmente, mientras el cuerpo del parásito se ensancha y se va transformando poco a poco en un elemento elipsoide. Hasta el momento presente no se conocen las causas que determinan la metamorfosis de la forma promastigota en amastigota, aunque se intuye que pueda ser debido, entre otras, a un cambio cuantitativo de los constituyentes de la envoltura del parásito, a la acción

de los enzimas lisosómicos sobre la membrana parasitaria, a la influencia de la actividad de la actina y la tubulina en la neoformación de las estructuras del parásito y/o tal vez a un reajuste de su metabolismo inducido por la célula hospedadora cuyo entorno ahora es teóricamente más hostil que el proporcionado por el aparato digestivo del vector.

La transformación se completa como pronto no antes de 5 días. A partir de este momento y bajo forma amastigota permanecerá en el hospedador todo el tiempo que dure la infección, siempre dentro de las células del sistema mononuclear fagocítico, en cuyo interior se multiplica activamente y se distribuyen por todo el organismo. Cada vez que se rompe una célula hospedadora las formas amastigotas que se liberan son fagocitadas, además de por los receptores del MΦ ya citados, por otros relacionados con la fijación del fragmento Fcγ de las IgGs anti-*Leishmania* que estén ligados a los antígenos de superficie del parásito.

A pesar de haberse detectado en esta forma parasitaria una minoración notable de las moléculas de expresión de los glucoconjugados (LPG, *gp63*) y de otros determinantes antigénicos de la membrana, no parece plausible que esta circunstancia influya en la celeridad con la que los amastigotes son internalizados, aunque sí parece que pueden verse afectadas otras acciones como son las relacionadas con la formación y evolución de endosomas y lisosomas y su fusión con el fagosoma

La **supervivencia de las leismanias en el interior del MΦ** está relacionada con una serie de mecanismos propios encargados de resistir o inhibir la acción lítica espontánea de los MΦs. El primer paso en el intento de destrucción que se ejerce en el seno del fagolisosoma es la **acidificación del medio** (pH= 4,5-5) a la vez que se produce el vertido de los enzimas hidrolíticos encargados de lisar y digerir a los parásitos. Esta vía espontánea de destrucción del MΦ resulta ineficaz en la mayoría de las ocasiones ya que las leismanias poseen una serie de constituyentes de superficie (*gp63*, LPG y GIPL) que neutralizan la acción de los enzimas lisosómicos.

No obstante los MΦs detentan otros **mecanismos leismanicidas** como son los denominados **radicales intermediarios del oxígeno (ROI) e intermediarios del nitrógeno (RNI)**. Su actividad depende del nivel de activación que posean los MΦs, es decir la capacidad que tengan para procesar los mensajes que recibe de mediadores bioquímicos como son las citocinas. Existen dos vías de activación macrofágica, una denominada clásica que responde de manera positiva a los estímulos del IFN-γ (interferón gamma) y TNF-α (factor de necrosis tumoral alfa) y otra denominada alternativa promovida por la IL-4 e IL-10 cuyos efectos negativos inhiben la producción de radicales tóxicos.

Entre los mecanismos efectores innatos que ponen en marcha los MΦs activados para la destrucción parasitaria se encuentra el denominado estallido respiratorio o **estrés oxidativo**. El proceso comienza con la captura de oxígeno molecular extracelular y su transporte hacia el citoplasma a través de la membrana plasmática. El proceso se desencadena por la estimulación de la membrana del fagocito por la enzima NADPH oxidasa de origen citosólico, la cual también está presente en la membrana del fagolisosoma. Su función es donar electrones al oxígeno molecular (O₂) y reducirlo a anión superóxido (O₂⁻) que en presencia del pH

ácido del fagosoma se convierte en peróxido de hidrogeno (H_2O_2) el cual reacciona nuevamente con el anión superóxido para dar radicales hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno atómico (1O_2). Son productos oxigenados altamente reactivos y tóxicos para las leishmanias conocidos con el nombre de **intermediarios reactivos del oxígeno (ROI)**.

El estrés oxidativo es uno de los elementos de defensa más sofisticados que poseen los fagocitos para enfrentarse a los patógenos intracelulares, sin embargo existen causas que hacen fracasar estos intentos debido a que los parásitos son, en algunos casos, capaces de interferir la actividad leishmanicida. **El fallo del estrés oxidativo** se debe entre otras razones a la presencia de LPGs, constituyentes estructurales de la membrana plasmática de las leishmanias, que actúan como auténticos antioxidantes y también a la capacidad que tienen ciertos enzimas como la superóxido dismutasa que transforma los radicales superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y las catalasas que desdoblan el peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua que son elementos absolutamente inocuos para el parásito.

Otro dispositivo microbicida que ejecutan los MΦs es la generación de **radicales intermediarios del nitrógeno (RNI)**, su producción está ligada al tipo de activación promovido por las citocinas de los linfocitos T efectoras. La producción o no de dichos radicales depende del destino metabólico de la L-arginina, aminoácido que sirve como sustrato de dos enzimas: la óxido-nítrico-sintasa inducible por citocinas (iNOS) y la arginasa. La activación del MΦ por la vía clásica, Th1, se produce cuando la L-arginina es oxidada por la iNOS para dar óxido nítrico (NO) y citrulina. En el transcurso de esta degradación se originan productos intermediarios como los peroxinitritos, que junto al NO constituyen los denominados RNI de gran poder citotóxico. Cuando el MΦ se activa por la vía alternativa, Th2, se induce la producción de arginasa la cual transforma la arginina en urea y ornitina, ésta es un componente fundamental para la biosíntesis de poliaminas, sustancias utilizadas por las leishmanias en propio beneficio como factores esenciales de su metabolismo al catalizar procesos de diferenciación, proliferación y multiplicación de los amastigotes. Esta es la razón por la que los MΦs activados por esta vía resultan ser altamente permisivos y condescendientes con la expansión parasitaria. Se trata más bien de una célula nodriza que le proporciona sustento y protección, facilitando su supervivencia y haciendo del MΦ un nicho ecológico altamente favorable para los intereses vitales del propio parásito. Se ha observado en el perro el papel importante que desempeña el óxido nítrico en la diseminación del parásito por el organismo, se ha comprobado matemáticamente una correlación negativa entre la expresión de iNOS y la parasitación de los MΦs, esto es lo que sucede en la leishmaniosis cutánea donde la expresión de iNOS es más alta que en los animales con lesiones viscerales, de ahí que el proceso se localice sólo en la piel dificultando su difusión por el organismo e impidiendo que se transforme en un proceso visceral o viscerocutáneo.

2.2.2. RESPECTO A LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

Hasta ahora hemos visto como la inmunidad natural que desarrolla el organismo frente a los patógenos es llevada a cabo por mecanismos espontáneos de naturaleza humoral (activación del complemento por la vía alternativa) y de naturaleza celular (fagocitosis). Sin embargo, existen otras acciones complementarias, consecuentes a las primeras que constituyen otro tipo de respuesta denominada

inducida o adaptativa que conlleva la participación de mecanismos humorales relacionados con la producción de anticuerpos por linfocitos B y de otros mecanismos de índole celular desempeñados básicamente por los linfocitos T (LT). Ambos sistemas constituyen la base de la inmunidad adquirida.

Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los amastigotes y sus antígenos pueden estar presentes en cuatro tipos de células, MΦs, células dendríticas (DC), polimorfonucleares y fibroblastos; entre todas ellas las únicas que se identifican como **células presentadoras de Ags (APCs)** son las DCs y los MΦs que poseen moléculas de restricción del **complejo principal de histocompatibilidad de clase II** (MHC-II) que otorgan a tales células la capacidad de funcionar como células portadoras y presentadoras de los antígenos (Ags) parasitarios para que puedan ser reconocidos por los receptores de los linfocitos T. A partir de este momento se desencadena una respuesta inmunológica de tipo adaptativo cuyo proceso se realiza en dos fases una relativa a la formación de moléculas de clase II en la APCs y otra referida a la mecánica que se sigue en los LT para proceder a las lecturas de los antígenos presentados.

Las moléculas de clase II son proteínas de membrana, heterodímeros formados por dos cadenas α y β , cada una de ellas tiene dos porciones, una extracelular transmembranosa y otra citoplasmática. Los dominios externos, extracelulares, presentan entre las moléculas α y β un hueco o “surco de acoplamiento” donde ha de encajarse el péptido antigénico. Sus características y funciones se desarrollan ordenadamente de la manera siguiente:

- 1.- Las cadenas α y β son sintetizadas separadamente por polisomas del retículo endoplásmico granular (RER) en cuyas cisternas se unen con la calnexina, proteína “chaperona” que contribuye al ensamblaje de ambas cadenas evitando el plegamiento aberrante. Todavía el complejo formado es inestable y no puede prescindir de la chaperona que ahora es desplazada por otra proteína, la “cadena invariable” (Ii), que la sustituye en el surco de acoplamiento proporcionando estabilidad al sistema e impidiendo la fijación de péptidos endógenos.
- 2.- El transporte del complejo cadena invariable-MHC-II se hace a través de los sistemas de membrana de la célula mediante vesículas de transferencia desde el RER hasta al Golgi y desde éste hasta los endosomas.
- 3.- Formación de compartimentos citoplasmáticos para el procesamiento de moléculas de clase II asociada a la cadena invariable o “**MIIC**”. Son endosomas ácidos disgregados de la vacuola parasitófora que contienen proteasas como las catepsinas y péptidos parasitarios. En estos lugares las catepsinas producen la ruptura progresiva de la cadena invariable a excepción de un fragmento peptídico denominado **CLIP** que sigue bloqueando el surco de acoplamiento.
- 4.- Participación necesaria de **moléculas de clase II no clásicas**, como la H-2M de ratón o HLA-DM humana, presentes en la luz de los compartimentos MIIC, donde actúan como chaperonas catalizando el intercambio del CLIP por los péptidos parasitarios.

La eficacia de la presentación de Ags por MHC-II depende de la cantidad de antígeno (Ag) existente en los compartimentos de procesamiento (MIIC).

Formados los complejos MHC-II-péptido son transportados por membranas a través de la ruta endosómica ascendente hasta fusionarse con la membrana plasmática de la APC para que sean reconocidos por los linfocitos T CD4. El pH neutro del exterior celular estabiliza y refuerza la unión MHC-II-péptido antigénico, que se sitúa aleatoriamente sobre la membrana del macrófago. Sin embargo, con objeto de hacer más efectivo el reconocimiento de Ags por los linfocitos, los complejos MHC-II-péptido, son agrupados principalmente en las denominadas “**balsas lipídicas**” o “**raft lipídicos**”. Son microdominios especializados de la membrana plasmática de la APC constituidos por colesterol, una proteína de transmembrana, por ejemplo una molécula de MHC-II y un glucoesfingolípido. Actúan como auténticos centros de organización, montaje y concentración de las moléculas de señalización (MHC-II). De esta manera las balsas lipídicas permiten que las células T mejoren las inmunorrespuestas al estar las MHC-II agrupadas y en número mayor que las que se sitúan de manera aleatoria y dispersa en el resto de la membrana plasmática. Las células que expresan de forma constitutiva moléculas de clase II portadoras de péptidos antigénicos exógenos capaces de activar a los linfocitos T CD4 se denominan células presentadoras de Ags profesionales.

Ha sido demostrado en ratones que en algunas ocasiones, pueden participar además, moléculas del **complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I)**, encargadas de transportar los Ags de procedencia endógena. La intervención de MHC-I tiene que ver con la interferencia de la vía ordinaria de ensamblaje entre las moléculas del MHC-II y los péptidos antigénicos de *Leishmania* por un proceso intercalado de disociación/cambio de péptidos, mecanismo basado en la pérdida del péptido endógeno que porta el MHC-I y su sustitución por el de procedencia exógena. Dicho fenómeno sólo es posible en un medio con pH ácido como el que se encuentra en los compartimentos MIIC o en cualquiera de las vesículas de la ruta endocítica. Los Ags de las leismanias asociados a las moléculas MHC-I son mostrados por la célula hospedadora, que ahora se denomina diana, para que sean reconocidos por los linfocitos CD8 (LTc) desencadenándose de esta manera una respuesta protectora de naturaleza citotóxica debida al IFN- γ y al TNF- α/β que activan M Φ s y favorecen la producción de perforinas, sustancias que fomentan el proceso de apoptosis de las células dianas infectadas. El fenómeno es frecuente en las leismaniosis cutáneas y raramente demostrado en animales infectados experimentalmente con *L. infantum*, en cualquier caso lleva a la instauración de un estado de resistencia y a la ausencia de síntomas de enfermedad.

Los mecanismos que utilizan las leismanias para **interferir la maquinaria que se encarga de la presentación de Ags** por parte de M Φ s y células dendríticas a través de las moléculas del MHC-II son muy variados entre ellos destacan los siguientes.

- El gran desarrollo de las vacuolas parasitóforas de las células hospedadoras llenas de amastigotes inducen al M Φ a incrementar su tamaño y a deformarse, circunstancia que hace posible la aparición de distintos tipos de alteraciones vinculados con:

- ✓ La presencia de los parásitos que obstaculizan, por ocupación del espacio intravacuolar, el tráfico de las moléculas de clase II en su ruta endosómica hacia la superficie de la célula hospedadora.
- ✓ El desmesurado tamaño de la VP que hace que las moléculas MHC-II y sus chaperonas se encuentren muy dispersas en la membrana de la VP dificultando el encuentro con los Ags y por tanto su acoplamiento.
- ✓ Un número importante de moléculas MHC-II tiende a concentrarse en las zonas de membrana que contactan con las leishmanias, dicha proximidad impide a los péptidos antigénicos liberados por la acción de las hidrolasas que se engargan con las moléculas de clase II. El resultado es que muchas de éstas pierden su funcionalidad al quedarse totalmente vacías.
- Los amastigotes tienen la particularidad de interiorizar en su citoplasma moléculas de clase II vacías, acopladas al Ag o a chaperonas que antes o después terminan siendo degradadas por los megasomas (orgánulos citoplasmáticos de las leishmanias con funciones semejantes a la de los lisosomas). El resultado es una reducción importante del número de dichas moléculas y por tanto del potencial de la célula como procesadora y presentadora de Ags parasitarios.
- Los únicos productos metabólicos con actividad antigénica presentes en la VP y en los CIIM secretados por los amastigotes son los proteofosfogluanos (PPG). Tienen la propiedad de ser escasamente inmunógenos y la capacidad de competir con los péptidos antigénicos derivados de la membrana plasmática de las leishmanias por la ocupación del surco de acoplamiento. El inconveniente es que los PPGs son incapaces de promover una respuesta T CD4 efectiva.
- Las leishmanias inducen a una modificación de la estructura y función de las balsas lipídicas encargadas de concentrar las moléculas de clase II con sus determinantes antigénicos. Ello se debe a la sustitución de los lípidos estructurales que posee, esfingolípidos y colesterol, por glucolípidos parasitarios, transformándose en áreas con membranas desestructuradas, más fluidas y por tanto menos eficientes en la realización de tareas relacionadas con la presentación de Ags parasitarios a las células T.

A pesar de las limitaciones que suponen las actuaciones de los MΦs infectados con leishmanias relacionadas con el procesamiento de moléculas de clase II, la célula hospedadora como presentadora profesional de Ags, adquiere el compromiso de evitar las interferencias que se le presentan, sin embargo, ante tan variado y heterogéneo repertorio de determinantes antigénicos, los mensajes que emiten no son eficientes y en la mayoría de las veces desconcertantes, por lo que la respuesta de las células efectoras resulta ser muy heterogénea y a veces confusa.

Las **estructuras encargadas de efectuar la lectura de los Ags** comprende una serie de receptores de membrana en los linfocitos T denominados **TCR** (T cell receptor), heterodímeros relacionados con las inmunoglobulinas formados por dos cadenas peptídicas α y β acompañadas de moléculas transmembrana accesorias CD4 y CD8 que actúan como correceptoras y cuya misión es la de realizar funciones de adhesión y reconocimiento de los Ags cuando son presentados por las moléculas MHC-II o MHC-I respectivamente. Un mismo linfocito no puede tener ambos

determinantes, o uno CD4 u otro CD8, por lo que sólo existen dos poblaciones de LT, los llamados cooperadores o CD4+ (LTh) y los CD8+ o citotóxicos.

Los TCRs que reconocen antígenos presentados por moléculas de clase II confieren a los LT capacidad para poderse activar, ello sucede siempre que participen otras 5 proteínas transmembrana que se asocian al heterodímero α - β y así formar el denominado “complejo TCR funcional”. Tres de dichas proteínas (γ , δ y ϵ) son las denominadas moléculas CD3, están situadas en las membranas del LT con una porción libre, las colas, que pertenecen a dominios citoplasmáticos. Dichos dominios o regiones son denominados **ITAM** (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs*). Su función está relacionada con el envío de señales al interior de la célula por medio de las cinasas, como la PTK (proteína tirosina cinasa) que activan los LT mediante fosforilizaciones. Las otras dos proteínas, especialmente la cadena ζ zeta, con colas citoplasmáticas más largas, tienen tres ITAM, aportan, por tanto, un complemento amplificado de las señales transmitidas por las cinasas. La estructura encargada, por tanto, del reconocimiento de Ags presentados por la APC es un complejo formado por moléculas TCR-CD3-CD4 que inducen al linfocito a un estado de activación de las vías bioquímicas del citosol a través de las cinasas. Esta primera señal recibida es verificada por la proteína de membrana CD28 del LT CD4+ que se liga con las moléculas B7 (B7.1 o CD80 y B7.2 o CD86) de las APCs, dicha asociación resulta imprescindible para que los LT CD4+ respondan adecuadamente.

Los **mecanismos que poseen las leishmanias para dificultar el reconocimiento de antígenos** por los linfocitos Th CD4 son, entre otros, los siguientes:

- Los relacionados con la actividad proteolítica de la *gp63* que hidroliza el receptor CD4 de los LT evitando así la interacción del TCR funcional con las moléculas de clase II de las APCs.
- Los que provocan una reducción de moléculas coestimuladoras CD28 que se ligan con receptores de la familia B7 de la APC ocasionando por tanto un debilitamiento de las señales necesarias para la activación de los LT CD4.
- Los que fomentan en los linfocitos T activados la expresión de receptores alternativos del tipo CTLA-4 (molécula-4 asociada a LT citotóxico o LTc asociado a la proteína 4) que compiten con los CD28 por fijarse a los ligandos B7 del MΦ. Tal asociación conlleva al bloqueo de la producción de IFN- γ y a la de las sinapsis inmunológicas encargadas de la transmisión de señales mediadas por la PTK que tiene lugar en las colas citoplasmáticas de las proteínas CD3 que intervienen en la activación de los LT.
- Los que, debido al alto polimorfismo de las moléculas antigénicas en la superficie de las APCs, entre otros los panantígenos y PPGs, inducen a los LT a tener que mostrar otros tantos receptores TCR muchos de ellos carentes de efectividad en relación con los cometidos relacionados con la activación y diferenciación de las subpoblaciones Th1 y Th2.

El reconocimiento de los Ags y las señales coestimuladoras activan a las células Th vírgenes (Th0) para que sufran una expansión clonal y diferenciación en células T efectoras y de memoria. La activación clonal o proliferación de LTh se debe

a la liberación por el MΦ de un poderoso factor de crecimiento denominado IL-2. También se producen otras citocinas como la IL-12 que estimula la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia el subgrupo celular Th1 o su antagónica, la IL-4, que lo hace hacia el subgrupo Th2.

- Los Th1 liberan TNF- γ , TNF- α , IL-2, IL-12 que activan a los macrófagos favoreciendo la fagocitosis, la producción de radicales tóxicos y la muerte intracelular del parásito.
- Los Th2 secretan una amplia gama de citocinas, IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β (factor transformante de crecimiento beta), IL-10 y IL-13 que actúan sobre los linfocitos B (LB) estimulando su proliferación, expansión clonal y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos (Ac), al mismo tiempo que inhiben la respuesta de tipo Th1 encargada de dificultar la diseminación de los parásitos.

El escenario en el que se desarrolla el proceso viene determinado por un desbarajuste del sistema inmunitario provocado por la gran variabilidad en calidad y cantidad de las moléculas mensajeras que se liberan en las distintas células, entre éstas destacan las que se encargan de procesar y presentar los antígenos (APCs) y las que tienen la misión de reconocerlos como son los LT. El que los animales ofrezcan una respuesta inmune adecuada o no, depende de que exista un mecanismo eficaz de protección que evite la diseminación de la infección eliminando o acantonando al parásito o por el contrario que el mecanismo sea ineficaz porque sea incapaz de destruirlo, situación que conlleva a la instauración de un estado de enfermedad.

3. EFECTOS DE LAS LEISMANIAS EN EL PERRO

En el perro se ha comprobado que existe una correlación entre inmunidad protectora y expansión de linfocitos Th1, cuando así sucede la consecuencia más sobresaliente es la activación de los MΦs que lleva aparejada la producción de radicales tóxicos que se encargan de promover la muerte de las leishmanias como también de la liberación de citocinas IL-12 e IL-18 que median respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado. Sin embargo existe otra alternativa representada por una respuesta eminentemente humoral e inefectiva de tipo Th2, que lleva aparejada la instauración de un proceso sintomático promovido por la expansión policlonal de los linfocitos B asociado a una inhibición de la activación macrofágica y de respuestas linfoproliferativas. Aunque dicha alternativa existe, la dicotomía excluyente entre ambos tipos de reacciones (Th1 o Th2) no se establece en términos absolutos sino que, como sucede en las infecciones naturales, se debe a un combinado de ambas vías de respuesta. Bien es cierto que puede haber cierta predominancia de una tendencia sobre la otra pero el resultado es prácticamente el mismo, el de tolerar y facilitar la extensión de la infección. En ambas situaciones se desarrollan respuestas de naturaleza celular que según sea la tendencia sus consecuencias se asociarán bien con la implantación de una reacción de hipersensibilidad retardada de tipo IV de naturaleza granulomatosa o bien con una reacción de hipersensibilidad de tipo III donde predominan las reacciones mediadas por inmunocomplejos.

Si la respuesta dominante de naturaleza celular es mediada por linfocitos Th1 CD4 lo que se desarrolla es una reacción de **hipersensibilidad retardada (HR) o de tipo IV** caracterizada por una lesión de tipo granulomatoso propia de enfermedades con estímulo antigénico crónico y persistente semejante a las de la tuberculosis, lepra, o esquistosomosis, donde las citocinas, principalmente TNF- α , se liberan de forma continua favoreciendo la activación y diferenciación de los macrófagos en células epitelioides e induciendo la formación de **granulomas** con presencia de parásitos que sobreviven largos períodos de tiempo. Es un estado quiescente en el que la infección es controlada localmente por un estímulo inmunológico constante que evita la recrudescencia de la infección ahora latente. Se trata de un mecanismo apropiado para el control de la infección, si bien, la mayoría de las veces son los causantes principales del daño tisular porque la deficiente producción de IFN- γ hace que el M Φ no se active adecuadamente incitándolo a evolucionar hacia una célula metabólica que con el tiempo termina transformándose en una célula epitelioides, que a medida en que avanza la infección, coloniza poco a poco la mayoría de los órganos y tejidos. La lesión más común es la de un granuloma compuesto por células epitelioides, histiocitos parasitados, abundantes linfocitos, células plasmáticas y más raramente polimorfonucleares. En otros casos la respuesta inflamatoria es exacerbada por la falta de estímulos de las citocinas, generándose entonces zonas de necrosis más o menos extensas con granulomas poco reconocibles y donde la presencia de M Φ s infectados es testimonial. Esta es la imagen característica y propia de los estadios sintomáticos de la enfermedad y es precisamente el momento en que la mayoría de los órganos vitales se encuentran repletos de leismanias acompañadas por lesiones degenerativas y por reacciones inflamatorias proliferativas que ocupan amplias zonas del órgano parasitado, afectando con ello la actividad fisiológica del órgano comprometido. El nivel de anticuerpos cuando predomina la componente Th1 es menor que en otros estados patológicos siendo el isotipo IgG2 el dominante, cuando esto sucede la respuesta propende a ser protectora, lo que sólo acontece en casos excepcionales.

En animales con respuesta celular de tipo Th2, la producción de anticuerpos es muy manifiesta siendo el isotipo IgG1 el que destaca, cosa que suele suceder en la mayoría de los animales infectados, aunque lo que más comúnmente se observa es una mezcla de los distintos isotipos. La capacidad protectora de los anticuerpos es limitada y en las infecciones naturales no se observa relación alguna entre niveles altos de anticuerpos y resistencia.

Los anticuerpos antileismania son capaces de reconocer de forma específica, aparte de los principales componentes de la membrana del parásito (LPG, GIPL y *gp63*), otros componentes estructurales de naturaleza antigénica vinculados a las proteínas del citoesqueleto (quinesina, tubulina, actina), proteínas ribosómicas, histonas, proteínas de choque térmico y glicosomas. Dichos componentes, conocidos como **panantígenos, patoantígenos o superantígenos**, tienen la particularidad de tener epitopos comunes con las proteínas de igual denominación presentes en las células del hospedador. Hasta tal punto son similares que su homología genómica es en muchos casos superior al 50%. Tales “proteínas de secuencia conservada”, presentes en células procarióticas y eucarióticas, liberadas en el momento de la lisis de las leismanias son fagocitadas y procesadas por las células presentadoras de antígenos profesionales (M Φ s) a través de las moléculas de clase II del HMC. En estos casos las APCs ofrecen numerosos y heterogéneos determinantes antigénicos

que tienen que ser reconocidos por otros tantos receptores (TCRs) de los LT. Las citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 de los LTh2 inhiben la transformación de los Th0 en Th1 al mismo tiempo que favorecen la activación clonal de linfocitos B portadores de inmunoglobulinas de gran variedad y cantidad en respuesta tanto a los distintos antígenos específicos parasitarios como frente a los pertenecientes al grupo de “antígenos comunes de secuencia conservada” (panantígenos) procedentes de la lisis de los parásitos y de las células hospedadoras. Son los linfocitos B maduros tras la unión con los distintos antígenos los que determinan, por proliferación celular, una expansión clonal de “linfocitos B de memoria” y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas, muchas de las cuales son **autoanticuerpos** ya que tienen la particularidad de actuar contra los propios componentes del hospedador.

Las consecuencias son:

- Instauración paulatina de una hipergammaglobulinemia acompañada por una gran variedad de complejos inmunes circulantes que los MΦs son incapaces de eliminar.
- Tendencia a desarrollar procesos inmunopatológicos relacionados con los fenómenos de autoinmunidad.
- Los abundantes inmunocomplejos formados por IgGs, fracciones del complemento y antígenos parasitarios tienden a depositarse en el endotelio de los vasos pequeños, especialmente en aquellos que cumplen funciones de ultrafiltración como son los glomérulos renales, plexos coroideos del SNC, las membranas sinoviales articulares o los procesos ciliares del ojo, donde se producen alteraciones orgánicas inducidas por una reacción de **hipersensibilidad de tipo III**.

Se puede concluir que conforme a lo dicho son los tipos III y IV de hipersensibilidad los causantes principales de las lesiones y en consecuencia de las alteraciones del normal funcionamiento de los distintos órganos y sistemas en los que se asienta el parásito. Las leismanias se encuentran en cualquier tejido que contenga células móviles fagocíticas tales como el hígado, bazo, nódulos linfáticos, médula ósea, riñón, piel, aparato reproductor, digestivo, respiratorio, vejiga de la orina, etc, con lo que la distribución de los parásitos es muy variable, unas veces son unos órganos los afectados y en otras son otros, como también es variable la intensidad del cuadro lesional. Los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos han aportado que la base de las modificaciones tisulares se debe a la implantación de fenómenos proliferativos y degenerativos, ya comentados, que se van afianzando y acrecentando a lo largo de la infección que son el origen de las correspondientes alteraciones funcionales. De ahí que la enfermedad sea definida como un «**espectro clínico-patológico**» dada la complejidad de los mecanismos inmunopatogénicos que se van produciendo a lo largo de la infección, y es por ello que las formas de presentación son también muy variadas como también lo es su riqueza sintomática que oscilan desde formas latentes con manifestaciones clínicas muy limitadas, que a veces pasan desapercibidas, hasta formas patentes o sintomáticas con claros y variados signos de enfermedad.

Ésta ha sido, pues, la expresión de una sucesión de eventos, estrategias y procedimientos que tiene lugar en la más estricta intimidad entre dos seres vivos, el parásito de una parte y el hospedador de otra. La naturaleza de dicha relación así como los mecanismos que la regulan son hoy conocidos en parte, otros se intuyen y

otros son totalmente desconocidos, quedando aún mucho camino por descubrir. He procurado relatar con mayor o menor detalle cuanto parece suceder en este particular enfrentamiento, poniendo en evidencia aquéllos episodios que, según mi entender, resultan ser los más destacables. Es evidente que, ante la incursión del parásito en los territorios del hospedador, se ponen en marcha por parte de éste una serie de impedimentos más o menos eficaces orientados a neutralizar su avance, empleando para ello y en cada momento el arma estratégica más apropiada con el propósito de dificultar el asentamiento del parásito e impedir a toda costa que consigan sobrevivir y reproducirse en su interior, este antagonismo entre los intereses de cada uno origina un concurso de hostilidades entre el atacante y el defensor. La discordia que se establece entre ambos acarrea secuelas perjudiciales no tanto para el parásito sino, antes bien, para el propio hospedador, lo que da lugar a que se desencadenen en éste una sucesión de acontecimientos que resultan ser realmente nocivos para los intereses de los animales parasitados.

He dicho

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai S. (2012). Inmunología celular y molecular. 7th Edición. Elsevier España S.L. pp560.
- Abranches, P., *et al.* (1991). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, 13: 537–550.
- Alexander, J., Russell, D.G. (1992): The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.*, 31: 175–254.
- Alvar, J., *et al.* (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, 57: 1-88
- Antoine, J. C. (1995). Biology of macrophages-*Leishmania* interactions. *Pathol. Biol.* 43: 215–223.
- Antoine, J.C., *et al.* (1999). H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania* infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J Cell Sci.*,112: 2559-2570.
- Antoine,J.C., Prina, E., Courrent, N., Lang, T. (2004). *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells on the mammalian host. *Adv. Parasitol.*, 5: 1-68.
- Ashford, R. W. (1997). The leishmaniases as model zoonoses. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91: 693–701.
- Assche, T. Van, *et al.*, (2011). *Leishmania* macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic. Biol. Med.*, 51: 337-351.
- Barbieri, C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite inmunol.*, 28: 329-337.
- Blos, M., *et al.* (2003). Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania* major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. *Eur. J. Immunol.*, 33: 1224–1234.
- Bocedi, A., *et al.* (2004). Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315: 710–718.
- Bogdan, C. *et al.*, (2000). Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J. Exp. Med.*, 191: 2121–2130
- Bogdan, C., Rollinghoff, M. (1998). The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.*, 28: 121–134.
- Brittingham, A.,*et al.* (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.*, 155, 3102–3111.
- Burchmore, R.J.S., Barrett, M.P. (2001). Life in vacuoles—nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int. J. Parasitol.*, 3: 1311-1320.
- Bylund, J., *et al.* (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.*, 49: 1834–1845.

- Carroll, M.C., Fischer, M.B. (1997). Complement and immune response. *Current Opinion in Immunology*, 9: 64-69.
- Culley, F. J., *et al.* (1996). C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J. Immunol.*, 156: 4691–4696.
- Cunningham, A.C. (2002). Parasitic Adaptive Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.*, 72: 132-141.
- Descoteaux, A., *et al.* (1991). *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J. Immunol.*, 146: 2747–2753.
- Descoteaux, A., Turco, S. J. (1993). The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. *Parasitol. Today*, 9: 468–471.
- Descoteaux, A., Turco, S. J. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1455: 341–352.
- Descoteaux, A., Matlashewski, G., Turco, S. J. (1992). Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J. Immunol.*, 149: 3008–3015.
- Desjardins, M., Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.*, 185: 2061–2068.
- Desjardins, M., Descoteaux, A. (1998). *Survival strategies of Leishmania donovani* in mammalian host macrophages. *Res. Immunol.*, 149: 689-692
- Epstein, J., *et al.* (1997): The collectins in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 8:29-35.
- Gomes, N.A., Reis, G.A. dos. (2001). The dual role of CTLA-4 in *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.*, 17: 487-491.
- Gómez-Nieto, L.C. (1990). Epidemiología y clínica de la leishmaniosis canina en Cáceres. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.
- Green, P. J., *et al.* (1994). Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 66: 319–328.
- Hernández-Rodríguez, S., *et al.* (1987). Aspectos clínicos de la leishmaniosis canina. *Rev. Iber. Parasitol.* Vol. Extraordinario. pp 61-66.
- Isabel, K.F., *et al.* (2001). Mannan-Binding Lectin Enhances Susceptibility to Visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 69: 5212-5215.
- Iwaki, D., *et al.* (2011). The Role of Mannose-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 in Activation of the Alternative Complement Pathway. *J. Immunol.*, 187: 3751-3758.
- Kirkwood, M. L. (2000). Phosphoglycans and *Leishmania*. *Trends Microbiol.*, 8: 211
- Lachmann, P.J. (1991): The control of homologous lysis. *Immunol. Today*, 12: 312-315.
- Love, D. C., Esko, J. D., Mosser, D. M. (1993). A heparin binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J. Cell Biol.*, 123: 759–766.
- Martínez-Moreno, A., *et al.* (1993). Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.*, 51: 49-59.
- Martínez-Moreno, A., *et al.* (1995). Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 209-220.
- McNeely, T. B., Turco, S. J. (1987). Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148: 653–657.
- Moreno, J., Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.*, 18: 399-405.
- Mosser, D. M., Edelson, P. J. (1987). The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, 327: 329–331.
- Mukbel, R.M. (2007). Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76: 669–675.
- Olivier, M. *et al.* (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*. 15: 1377-1389.
- Poloso, N.J., Roche, P.A. (2004). Association of MHC class-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains. *Curr. Opin. Immunol.*, 16: 103-107.
- Proudfoot, L. *et al.* (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 10984–10989.
- Qi, H., Popov V., Soong, L. (2001). *Leishmania amazonensis* dendritic cell Interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4⁺ T cells *in vivo*. *J. Immunol.*, 167: 4534-4542
- Russell, D.G., Wilhelm, H. (1986). The involvement of a major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J. Immunol.*, 136: 2613–2620.

- Sacks, D.L. *et al.* (2000) The role of phosphoglycans in *Leishmania* sandfly interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97: 406–411.
- Strauss-Ayali, D., *et al.* (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.
- Wilson, M.E., Andersen, K.A., Britigan, B.E. (1994). Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect. Immun.*, 62: 5133–5141.
- Zafra, Z. *et al.* (2008). High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 123: 353–359