

# Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis.

Noris Rodríguez, PhD.\*

(\*) Instituto de Biomedicina, Apdo 4.043, Caracas 1.010-A, Venezuela. Tel./Fax: (0212) 864.8624. E-mail: nrodrri@telcel.net.ve

## Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad crónica infecciosa que progresa desde el momento de la infección, pasando por una fase sintomática hasta la fase de recuperación o muerte del huésped.

La aparición de cada fase es debida a la interacción de moléculas específicas del parásito con un compartimiento específico del sistema inmune del hospedador. El primer grupo de moléculas se conoce como determinantes invasivos/evasivos, las cuales son indispensables para la infección; el segundo grupo de moléculas denominadas determinantes patoantigénicos, que conduce a la manifestación clínica de la enfermedad, conocido como fenotipo de virulencia; el tercer grupo de moléculas del parásito que serian hipotéticamente candidatos a vacuna, cuya interacción con el sistema inmune del huésped conduce a la cura clínica.

## Virulence factors in *Leishmania* and the relationship with the development of Leishmaniasis.

### Abstract

Leishmaniasis is a chronic infectious disease which progress from infection to symptomatic phase to host death or recovery. The outcome of each phase result from the interactions of a distinct group of parasite molecules with a specific host immune compartment. The first group consists of invasive/evasive determinants, they are indispensable for infection; the second group of molecules consist of pathoantigenic determinants, results in the clinical manifestation of the disease, namely the virulent phenotype. The third group of parasite molecules is hypothetically perceived as vaccine determinants, the interaction with the host immune system can effect the clinical cure.

## Introducción

Algunas especies de *Leishmania* son organismos patógenos, las cuales causan un espectro de enfermedades conocidas como leishmaniasis, el grado de patogenicidad de estos parásitos, tradicionalmente se define como "virulencia" y se manifiesta como un espectro de síntomas clínicos de la enfermedad en los humanos<sup>1</sup>. Aquellas especies que causan la leishmaniasis cutánea que cura espontáneamente son consideradas como "menos virulentas" que aquellas que causan la leishmaniasis visceral o Kala-azar.

Aunque la virulencia de la *Leishmania* puede ser modulada por factores ambientales y genéticos, así como por su hospedador vertebrado<sup>2</sup> y por los vectores<sup>3</sup>. De la misma manera los determinantes antigénicos y moleculares de *Leishmania* han sido asociados con la virulencia de estos parásitos, ya que no es posible una leishmaniasis sin infec-

ción por parásitos intactos vivos; mas aún cuando no existe ninguna evidencia en la literatura que indique la producción de "toxinas" por parte de *Leishmania spp*, que puedan causar directamente los síntomas clínicos de la leishmaniasis.

La respuesta a cómo la *Leishmania* produce leishmaniasis es bastante compleja, ya que en éste evento están involucrados múltiples factores asociados con el parásito y con el huésped.

Es evidente que *Leishmania* posee moléculas en su superficie que están relacionadas con la infección denominados determinantes invasivos/evasivos<sup>4,5</sup>, los cuales le permiten a éstos parásitos establecerse exitosamente en el fagolisosoma o vacuola parasitofora de los macrófagos<sup>6</sup>.

En la leishmaniasis humana solo los fagocitos mononucleares se observan parasitados, lo que hace suponer que esta es la principal célula hospedadora de *Leishmania*,

aunque evidencias experimentales sugieren infección por *Leishmania* de células dendríticas<sup>7</sup> y fibroblastos<sup>8,9</sup>; sin embargo la enfermedad en el humano ocurre por la infección de macrófagos "in vivo", se podría pensar que la patología y síntomas clínicos se originan de la interacción de macrófagos infectados con otros elementos del huésped, la hipótesis se basa en que algunos antígenos específicos del parásito derivados de las células infectadas interactúa con el sistema inmune del huésped de una manera negativa o inhibitoria, la cual sería directamente responsable para que se manifieste la inmunopatología con los síntomas clínicos vistos en la leishmaniasis, en apoyo a esta hipótesis están los hallazgos en pacientes de Kala-azar, quienes producen una gran cantidad de anticuerpos específicos anti - *Leishmania*, pero no producen anticuerpos protectivos contra ciertos antígenos intracelulares de estos organismos<sup>10</sup>.

Se podría pensar entonces que la virulencia de *Leishmania* es el resultado de las interacciones de diferentes determinantes antigénicos con compartimientos separados del sistema inmunológico del huésped, estos determinantes serían aquellos que participan en la infección y los que están envueltos en inmunopatología, si este modelo es correcto, los dos grupos de determinantes podrían ser blanco para el control de la leishmaniasis.

En la Tabla 1 se muestran los determinantes invasivos/evasivos en *Leishmania*, estos determinantes incluyen la mayoría de las moléculas que han sido estudiadas como factores de virulencia, todas estas moléculas parecieran jugar un papel crucial en la infección de macrófagos por *Leishmania*. Estas moléculas ayudan al parásito a establecer exitosamente el parasitismo intracelular participando en una secuencia de eventos que a continuación se mencionan.

### Eventos que conllevan al parasitismo intracelular:

1. Evasión de los factores líticos del suero.
2. Enlazamiento de parásitos al macrófago seguido por la entrada a la célula fagocítica.
3. La sobrevivencia intracelular de los parásitos endocitados.
4. Diferenciación de promastigotes a amastigotes.
5. Replicación de los amastigotes en el interior celular.

La categorización de la interacción huésped-parásito en eventos secuenciales pertenece a la infección primaria de macrófagos en el hospedador vertebrado por promastigotes. Sin embargo, los eventos 1, 2, 3 y 5 son también relevantes para la infección secundaria de macrófagos por amastigotes de células ya infectadas. La salida de amastigotes para infectar nuevas células puede ser considerado como un paso crucial para el desarrollo de la leishmaniasis; aunque este último podría considerarse como un mecanismo bastante simple si se considera como una función normal de los macrófagos, relacionada con la eliminación de células dañadas

así como los restos de células, lo cual incluye células de generadas debido a una alta parasitemia<sup>11</sup>.

Más atención se ha puesto a la infección de macrófagos por promastigotes, aunque el mecanismo mediante el cual las moléculas que mencionamos en la Tabla 1, participan en la infección permanece sin ser totalmente dilucidado. Los promastigotes son tomados mediante fagocitosis y se diferencian en amastigotes dentro del fagosoma, el cual es un ambiente hostil, donde las células tomadas por los macrófagos son normalmente destruidas por varios mecanismos tales como:

### Mecanismos para la destrucción intracelular de *Leishmania*

**Estallido respiratorio:** La fagocitosis de un cuerpo extraño activa una NADPH oxidasa en la membrana plasmática, esta enzima transfiere protones al oxígeno molecular formando superóxido que es altamente reactivo y radicales hidróxilo en el sitio de entrada de la partícula o cuerpo extraño. Este radical reacciona con los fosfolípidos de la membrana del patógeno y con sus macromoléculas<sup>12</sup>.

**Acidificación:** Después de la fusión del fagosoma con el endosoma, la vesícula es acidificada por una ATPasa de protones. La disminución en el pH causa la denaturación de las proteínas, las cuales se hacen susceptibles a las hidrolasas ácidas<sup>13</sup>.

**Digestión:** El endosoma se fusiona con los lisosomas primarios y luego las hidrolasas ácidas son liberadas para degradar DNA, RNA, proteínas y carbohidratos<sup>11,14</sup>.

Sin embargo, la *Leishmania* logra evadir los mecanismos de defensa de la célula huésped para desarrollar la infección. El parásito se defiende del estallido respiratorio, reduciendo el oxígeno a anión superóxido (oxígeno activado), el cual es un radical extremadamente reactivo y puede reducir u oxidar moléculas formando peróxido de hidrógeno. Los aniones superóxido pueden también reaccionar con peróxido de hidrógeno formando radicales hidróxilo que son altamente reactivos y peróxido de hidrógeno, el cual es sumamente tóxico<sup>14</sup>, luego viene la acción de la superóxido dismutasa, la cual combina radicales superóxido para formar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, consecuentemente, el peróxido es degradado por catalasas o peroxidases a oxígeno y agua, por lo que esta vía de destrucción resulta ineficaz en la mayoría de las ocasiones, ya que la *Leishmania* en su superficie posee una serie de proteínas, las cuales además de estar involucradas en la unión de los promastigotes al macrófago, están directamente implicadas en la protección contra las enzimas lisosomales<sup>15</sup>.

Otro de los mecanismos microbicidas propuesto en la actualidad, es la generación de óxido nítrico sintetizado por la enzima óxido nítrico sintetasa, la cual es inducible a través de determinadas citocinas, los estudios han demostrado que los macrófagos murinos pueden producir suficiente óxido

nítrico para destruir *Leishmania in vitro*<sup>16,17</sup>, en la actualidad se sospecha que el grado de activación macrofágica depende del destino metabólico de la L-arginina en los macrófagos, ya que este aminoácido es el sustrato común para las enzimas arginasa y óxido nítrico sintetasa, las cuales son inducidas dependiendo del tipo de células CD4 donde actúen<sup>18</sup>.

Se puede considerar a la leishmaniasis como una larga guerra de desgaste, donde el hospedador logra contener solo medianamente el avance de *Leishmania*. Los antígenos del parásito implicados en estos acontecimientos son variados y numerosos, bien situados en la superficie o localizados en el interior del parásito.

### Moléculas relacionadas con la virulencia en *Leishmania*

La superficie de los promastigotes de *Leishmania* está cubierta por glicoproteínas, donde la manosa es el componente más abundante de estas moléculas, allí se encuentran presente varias clases de fosfatidilinositol o moléculas de anclaje tales como: lipofosfoglicano o LPG, un pequeño grupo de glicoinositolfosfolípidos (GIPLS), proteínas con GPI como la GP63 y proteofosfoglicanos (PPGs), los cuales constituyen otro mecanismo de defensa contra el estallido respiratorio<sup>19,20,21</sup>.

Las moléculas ubicadas en la superficie del parásito (Tabla 1) y denominadas determinantes invasivos/evasivos, son cruciales para la infección pero no producen patología en el huésped. Las más extensivamente estudiadas relacionadas con la virulencia en *Leishmania* han sido la GP63 y LPG. La GP63 ayuda a los promastigotes contra la lisis por complemento<sup>22</sup>, también ayuda junto con la LPG al enlazamiento de los parásitos al macrófago y su entrada a la célula<sup>22,23</sup>. Ambas proteínas pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito dentro del fagolisosoma<sup>23,24,25</sup>. Algunas otras moléculas listadas en la Tabla 1 pueden estar involucradas en los mecanismos de diferenciación y replicación del parásito una vez dentro del macrófago.

En la Tabla 2 se muestran algunos antígenos de *Leishmania* que generan una respuesta humoral con altos títulos en pacientes con leishmaniasis visceral, también se ha encontrado respuesta contra Gp63 y LPG en pacientes con esta enfermedad pero con títulos sumamente bajos en comparación con la que se produce con las moléculas mencionadas en la Tabla 1, esto sería lo esperado ya que los determinantes evasivos /invasivos existen en la superficie celular o son secretados por lo que están siempre expuestos al sistema inmune del huésped.

La presión evolutiva puede seleccionar estos determinantes evasivos/invasivos debido a su baja antigenicidad, que escaparían de la neutralización por anticuerpos específicos u otros factores líticos para asegurar el éxito del parasitismo<sup>5,9</sup>. Otro hecho importante es que todas las moléculas que se mencionan en la Tabla 2 son proteínas citoplasmáticas o

estructuralmente conservadas, las cuales a menudo se acomplejan con otras moléculas para formar partículas subcelulares, aunque algunas de ellas como las histonas y las proteínas de choque térmico son homologas con aquellas encontradas en las enfermedades auto inmunes, que no tienen reactividad cruzada. Para leishmaniasis se ha descrito una secuencia única de epitopes en *Leishmania*, la cual es solo reconocida por suero de pacientes con Kala-azar. Se trata de una secuencia repetida de 117 bp del gene de la kinesina que es expresada en los amastigotes de *Leishmania* que causan lesiones viscerales pero no en las especies que producen las formas cutáneas. Los sueros de pacientes con Kala-azar contienen anticuerpos específicos contra un péptido de 39 amino ácidos (rK39), anticuerpos contra el rK39 generan elevados títulos en pacientes de Kala-azar de la India. Aunque este antígeno se ha utilizado exitosamente en el diagnóstico de Kala-azar, es muy difícil asignarle alguna función protectora debido a los altos títulos de anticuerpo generados contra este y otros antígenos similares<sup>26</sup>.

Tabla 1. Determinantes Invasivos/Evasivos.

• Glicofosfatidil inositol	• Glicoproteína GP63
• Glicosil fosfolípidos	• Proteasas de cisteína
• Lipofosfoglicanos	• Histonas
• Fosfoglicanos	• ATPasas
• Proteofosfoglicanos	

Tabla 2. Determinantes patoantigénicos que causan inmunopatología.

• Proteínas del citoesqueleto (kinesinas y tubulinas)
• Chaperonas (Histonas: HSP 60, 70, 83)
• Proteínas ribosomales
• Nucleosomas
• Proteosomas

Se ha encontrado que estas moléculas tienen epitopes inmunogenicos de células B.

### Genes relacionados con virulencia en *Leishmania*

Recientemente y debido al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y de transfección genética se han podido adelantar estudios que involucran directamente a algunos otros genes en los procesos de virulencia en *Leishmania*, en este sentido podemos mencionar los genes que codifican para la proteína disulfuro isomerasa<sup>27</sup>, fosfomanosa isomerasa<sup>28</sup> y Ca<sup>2+</sup>ATPasa<sup>29</sup>. Estos genes cuya sobre expresión a nivel de RNA mensajero ha sido comprobada después de haber sido transfectados en clones avirulentos de *Leishmania* han revertido el genotipo transformando estos parásitos en altamente virulentos.

La mayoría de los estudios de virulencia en *Leishmania* han sido basados en clones de laboratorio, sin embargo en

los últimos tiempos se han utilizado diferentes técnicas, como en el caso del gen de la bisulfito isomerasa donde se utilizaron aislados silvestres de *L. major* con diferentes patogenicidades en ratones Balb/c, con la hipótesis que los genes diferencialmente expresados entre los diferentes aislados puede constituir un candidato a genes de virulencia en el parásito, allí se identificaron tres transcritos diferencialmente expresados en dos aislados altamente virulentos, uno de los cuales totalmente caracterizado es el responsable de la expresión la proteína antes mencionada (LmPDI), la cual es conservada en *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum*. Esta proteína juega un importante papel en la formación de enlaces bisulfito, isomerización y reducción dentro del retículo endoplasmático, los resultados obtenidos indican que este gen puede jugar un papel importante en la virulencia de *L. major* ya que la inhibición de este gen causa un efecto negativo en el crecimiento del parásito en medio líquido, así mismo se atenúa la progresión de la enfermedad en ratones Balb/c<sup>27</sup>.

En cuanto a la Ca<sup>+2</sup> ATPasa del retículo endoplasmático, se ha demostrado que esta proteína está involucrada en los fenómenos de virulencia de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, ya que su sobre expresión en el parásito "no virulento" incrementa la virulencia al producir lesiones en ratones Balb/c en un periodo de tiempo similar al de los clones virulentos (Fig. 1), así mismo se incrementa su enlazamiento al macrófago tanto como su penetración y sobrevivencia. Los parásitos transfectados con el gen de la CaATPasa se transforman más rápido en metacíclicos, este efecto podría estar mediado por Calcio y magnesio, los cuales son transportados por estas enzimas del retículo endoplasmático, incluyendo las de mamíferos<sup>30</sup> y plantas<sup>31</sup>. Los iones Ca<sup>+2</sup> y Mg<sup>+2</sup> están envueltos en los procesos de ensamblaje de proteínas, degradación de las proteínas no ensambladas y glicosilación<sup>32</sup>.

Otros genes relacionados con la virulencia en *Leishmania* se presentan en la Tabla 3; el gene A2, específico de amastigotes de *L. donovani*, es importante para la sobre vivencia del

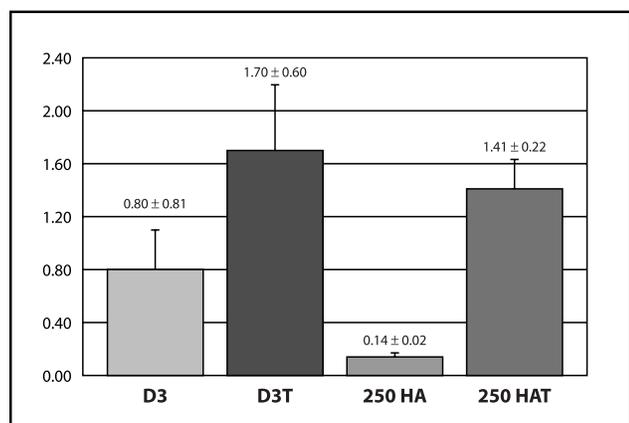
macrófago así como también la histona HSP100 de *L. major* y las proteasas de cisteína en *L. mexicana*<sup>33,34,35</sup>.

**Tabla 3. Genes asociados a virulencia en *Leishmania* sp.**

Gen	Especie de <i>Leishmania</i>
GP63	<i>L. major</i> <i>L. amazonensis</i>
A2	<i>L. donovani</i>
PMI (fosfomanosaisomerasa) GDPMP (GDP-manosa pirofosforilasa)	<i>L. mexicana</i>
CPA (Proteasas de cisteína)	<i>L. mexicana</i>
GPI (Glicofosfatidil inositol)	<i>L. mexicana</i>
LPG 1 y 2 (Lipofosfoglicano)	<i>L. major</i> <i>L. mexicana</i>
HSP 70; HSP 100 (histonas)	<i>L. major</i>
TR (Tripanotion reductasa)	<i>L. donovani</i> <i>L. major</i>
DI (Disulfito isomerasa)	<i>L. major</i>
Lma11 ATPasa (Calcio ATPasa)	<i>L. mexicana</i>

Los datos obtenidos de diferentes sistemas huésped-parásito no son siempre consistentes, inclusive con las moléculas más extensivamente estudiadas como GP63 y LPG<sup>36,37</sup>.

La Gp63 (glicoproteína de 63 Kda), es una ecto-metaloproteasa que es especialmente abundante en la superficie de promastigotes, de donde es liberada por estas formas del parásito. Esta glicoproteína es codificada por una familia de genes<sup>38,39</sup>, sin embargo la delección de estos genes produce efectos genotípicos menores in vitro afectando la deposición del complemento, pero no tiene efecto en vectores, macrófagos ni en la infección en ratones<sup>40</sup>, delecciones similares han sido realizadas en el gen SEP/HASP, el cual codifica para proteínas metacíclicas en *L. major*, tiene muy poco efecto<sup>41</sup>.



**Fig. 1.** Infección experimental en ratones Balb/c; el gráfico corresponde al tamaño de la lesión en función de la variante de promastigote utilizada para la infección:

**D3** = Promastigotes de *L. amazonensis* virulentos.

**D3T** = Promastigotes de *L. amazonensis* virulentos, transfectados con el gen Ca<sup>2+</sup> ATPasa.

**250 HA** = Clon de Promastigotes de *L. amazonensis* NO virulentos.

**250 HAT** = Clon de *L. amazonensis* NO virulento transfectado con el gen Ca<sup>2+</sup>ATPasa.

Uno de los hallazgos más importantes es que los genes o moléculas putativas asociados con virulencia no son igualmente activos en todas las especies de *Leishmania*. En *L. major*, la delección de LPG1 que codifica una galactofuranosil transferasa requerida para la síntesis de heptasacáridos que forman la estructura externa del LPG, produce promastigotes que son específicamente deficientes en la biosíntesis del LPG, estos parásitos son incapaces de sobrevivir en vectores o establecer eficientemente infecciones en ratones o macrófagos<sup>20,42</sup>, sin embargo en *L. mexicana* las delecciones en el LPG1 tienen muy poco efecto fenotípico en infecciones de macrófagos o en ratones<sup>43</sup>. Una discrepancia similar ha sido reportada entre estas dos especies con las mutantes LPG2 las cuales no son capaces de sintetizar todas las unidades repetidas de fosfoglicanos debido a la pérdida del transportador GDP- manosa en el aparato de Golgi<sup>44,45</sup>.

Estos hallazgos confirman que las diferentes especies de *Leishmania* hacen uso de su propio repertorio de potenciales genes de virulencia y moléculas para sus interacciones con la célula huésped.

### Modelo hipotético para la virulencia en *Leishmania* tomando en cuenta los determinantes invasivos/evasivos y pato antigénicos

Tomando en cuenta todos los antígenos y moléculas que putativamente se han descrito como agentes de virulencia en el parásito *Leishmania*, se ha propuesto un modelo (Fig. 2), donde los factores invasivos/evasivos y los determinantes pato antigénicos presumiblemente interactúen secuencialmente con diferentes compartimientos del sistema inmune para causar la leishmaniasis. Los determinantes invasivos/evasivos de *Leishmania* en la presentación de las barreras inmunes y no-inmunes del huésped para establecer la infección intracelular del macrófago. Esta infección puede no causar la enfermedad pero es un prerrequisito para ese estado. La infección debe ser mantenida para la transición de la fase sintomática a la

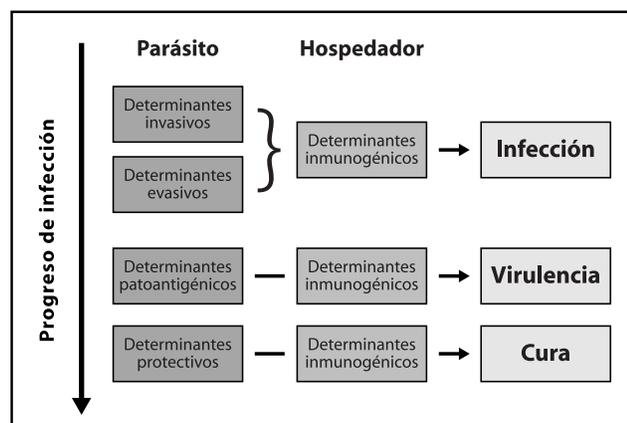
asintomática, especialmente cuando la inmunidad del huésped está disminuida.

Los determinantes invasivos/evasivos serían factores de virulencia en el momento que ellos contribuyen de manera indirecta con el fenotipo de virulencia. Durante el curso crónico de la infección algunos amastigotes intracelulares son lisados debido a la protección incompleta por parte de sus determinantes invasivos/evasivos; como resultado de esto algunas moléculas citoplasmáticas de amastigotes son expuestas al sistema inmunológico del huésped. La respuesta inmune que resulta de la exposición de estas moléculas no contribuye a la inmunidad contra la *Leishmania*, pero sí contribuye a los síntomas clínicos observados en la leishmaniasis<sup>19,20</sup>.

Los determinantes de infección e inmunopatología en *Leishmania* son considerados distintos según este análisis, pero son secuencialmente componentes necesarios para la expresión de virulencia.

### Regulación de la virulencia en *Leishmania* por la vía antigénica

De acuerdo con el modelo hipotético presentado en la Fig. 2, es posible visualizar el fenómeno de la virulencia en *Leishmania* por la vía de la expresión diferencial o diferencias cualitativas de los determinantes evasivos/invasivos y patoantigénicos. La virulencia se manifiesta en el aspecto clínico como un espectro de enfermedades humanas con diferente severidad que van desde las afecciones asintomáticas a la aparición de nódulos que curan espontáneamente, lesiones necróticas localizadas, muco cutáneas y lesiones difusas hasta las formas viscerales que son las más fatales. La regulación positiva o negativa de grupos o de determinantes individuales, cualitativa o cuantitativamente pueden resultar en el espectro de síntomas clínicos que se observan en la enfermedad, en los escenarios extremos se encuentran la infección asintomática y la infección fatal, lo cual puede ser debido a la expresión variable de los determinantes. En este



**Fig. 2.** Modelo hipotético para explicar el fenotipo de virulencia en leishmaniasis: En este modelo se propone que los tres grupos de determinantes (Invasivos/evasivos, Patoantigénicos y protectivos) interactúan con el sistema inmune del huésped de manera independiente, progresando secuencialmente para producir el espectro de manifestaciones clínicas y sub-clínicas, como base del fenotipo de virulencia observado.

sentido los determinantes en *Leishmania* son considerados como la fuerza que conduce el fenotipo de virulencia<sup>5</sup>. Los determinantes del huésped y del vector indudablemente están involucrados en un papel secundario o pasivo en las condiciones naturales.

## Regulación de la virulencia a nivel genético

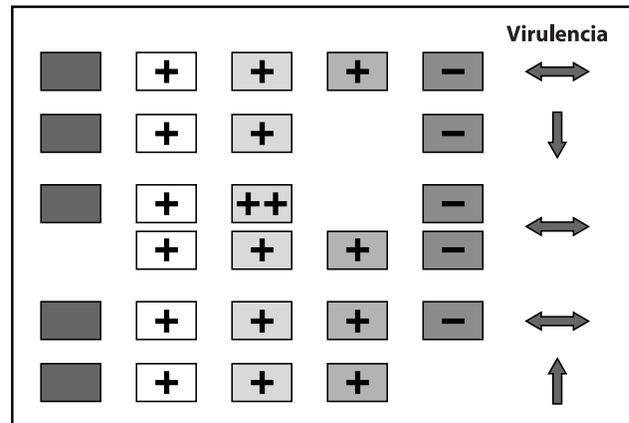
En la Fig. 3 se presenta un modelo hipotético sobre la regulación genética del fenómeno de virulencia<sup>9,45,46,47</sup>.

En este modelo se proponen tres grupos de genes:

1. Genes contributivos positivos, que serían aquellos que codifican para todos los determinantes antigénicos que hemos descrito anteriormente.
2. Genes contribuyentes negativos, los cuales codifican para productos que reducen la virulencia.
3. Genes contribuyentes facultativos, que codifican para productos que no participan en virulencia, pero que pueden hacerlo en ausencia de un contribuyente positivo.

Normalmente el genotipo de virulencia observado en una condición dada representa la presencia de un balance de genes positivos y negativos sin la presencia de los genes facultativos<sup>48,49</sup>. Cuando uno de los genes positivos es silenciado o se pierde, la virulencia puede disminuir, alternativamente podría permanecer sin cambios cuando el gen de interés es funcionalmente reemplazado con otro contribuyente positivo a través de la regulación de su expresión, la pérdida de un gen negativo siempre viene acompañado de un incremento en la virulencia<sup>50</sup>.

Este esquema es especulativo, especialmente por la falta de evidencias sobre la existencia de genes de respaldo en *Leishmania*, aunque se tienen evidencias de la existencia de genes funcionalmente superpuestos con secuencias diferentes en otros sistemas biológicos<sup>48</sup>, si tal estrategia pudiera existir en *Leishmania* y contribuir a la regulación de su virulencia, la presión evolutiva de mantener un parasitismo exitoso podría favorecer este mecanismo por los determinantes evasivos/invasivos pero no así por los determinantes patoantigénicos, ya que estos podrían ser blancos para producir modificaciones moleculares de la virulencia mediante deleciones, produciendo mutantes infectivas pero no generaría mutantes no patogénicas que eventualmente pudieran ser utilizadas en esquemas de inmunización contra la enfermedad<sup>51,52,53</sup>.



**Fig. 3.** Modelo hipotético de regulación de la virulencia a nivel genético:

Los signos positivos (+) corresponden a los genes contribuyentes positivos para los múltiples determinantes antigénicos; los signos negativos (-), corresponden a genes que codifican para productos que reducen la virulencia denominados contribuyentes negativos; los cuadros sin signos corresponden a genes facultativos que no contribuyen a la virulencia en condiciones normales, pero que si lo harían cuando falte un contribuyente positivo.

## Agradecimientos

Proyecto FONACIT, SI-2001000761.

## Referencias

1. Desjeux P. Leishmaniasis. Public Health aspects and control. Clin Dermatol 1996;14:417-423.
2. Blackwell JM. Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man. Parasitology 1996;112:567-574.
3. Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science 1988;239:1306-1308.
4. Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annu Rev Microbiol 1990;44:499-529.
5. Chang KP and McGwire BS. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid Biol Dis 2002;1(1):1-7.
6. Chang KP, Dwyer DM. Multiplication of human parasites (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. Science 1976;193:678-680.
7. Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis* dendritic cells interaction in vitro and the priming of parasite-specific CD4+ T cells in vivo. J Immunol 2001;167:4534-4542.
8. Chang KP. *Leishmania* infection of human skin fibroblasts in vitro: absence of phagolysosomal fusion after induced phagocytosis of promastigotes and their intracellular transformation. Am J Trop Med Hyg 1978;27:1084-1096.
9. Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M y Col. Fibroblast as host cells in latent leishmaniasis. J Exp Med 2000;191:2121-2130.
10. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:775-779.

11. Chang KP. Cellular and molecular mechanism of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Intl Rev of Citol* 1983;14:267-305.
12. Mosser DM and Rosenthal LA. Divergent strategies used by the promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania* to invade mammalian cells. In strategies for intracellular survival of macrophages. *Clinical Infectious Disease* 1994;Vol 1 (ed. D.G Russell), pp 191-212. W.B. Saunders.
13. Antoine J.C, Prina E, Jouanne C y Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* -infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun* 1990;58:779-787.
14. Alexander J y Russel DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Advan Parasitol* 1992;31:175-254.
15. Mosser DM and Rosenthal LA. *Leishmania*-macrophages interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol* 1993;4:315-322.
16. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 1994;78(6):915-918.
17. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990;144(12):4794-4797.
18. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995;375(6530):408-11.
19. Guy RA y Belosevic M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect Immun*. 1993;61,1,553-1.558.
20. Spath F Erald, Epstein Linda, Leader Ben, Singer Steven, Avila Gerber A, Turco Salvatore J y Beverley Stephen M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;Vol97(16)9.258-9.263.
21. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(16):9.536-9.541.
22. Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS. Role of *Leishmania* surface protease (Gp63) in complement fixation, cell adhesion and resistance to complement-mediated lysis. *Journal Immunol* 1995;155(6):3.102-3.111.
23. Chang CS, Chang KP. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophage binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:100-104.
24. McGwire B, Chang KP. Genetic rescue of surface metalloproteinase (Gp63)-deficiency in *Leishmania amazonensis* increase their infection of macrophages at the early phase. *Mol Biochem Parasitol* 1994;66:345-347.
25. Chaudhuri G, Chudhuri M, Pan A, Chang KP. Surface acid proteinase Gp63 of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:7.483-7.489.
26. Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J Parasitol* 1995;81:1.000-1.003.
27. Ben Achour Y, Chenik M, Louzir H y Dellagi K. Identification of a Disulfide Isomerase protein of *Leishmania major* as a putative virulence factor. *Infection and Immunity*. 2002;Vol70(7):3.576-3.585.
28. Garami A, Ilg T. The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence. *J Biol Chem* 2001;276(9):6.566-6.575.
29. Rodríguez NM, Docampo R, Lu HG, Scott DA. Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca<sup>2+</sup> ATPase gene *Lmaa1* enhances virulence. *Cell Microbiol* 2002;4(2):117-126.
30. Kaufman RJ, Swaroop M and Murtha -Riel P. Depletion of manganese within the secretory pathway inhibits O-linked glycosylation in mammalian cells. *Biochemistry* 1994;33:9.813-9.819.
31. Liang F, Cunningham KW, Harper JF and Sze H. ECA1 complements yeast mutants defective in Ca<sup>2+</sup> pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8.579-8.584.
32. Durr G, Strayle J, Plempler R, Elbs S et al. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol Cell* 1998;9:1.149-1.162.
33. Zhang WW y Matlashewski G. Characterization of the A2-A2 gene cluster in *L. donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol* 2001;39(4):935-948.
34. Alexander J, Coobs GH, Mottran JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 1998;161(12):6.794-6.801.
35. Hubel A, Krobtsch S, Horauf A and Clos J. *Leishmania major* Hsp 100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol. Cell Biol* 1997;17(10):5.987-5.995.
36. Russell DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (Gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* 1986;136:2.613-2.620.
37. Liu X, Chang KP. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (Gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4.991-4.995.
38. Beverley SM, Turco SJ. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol* 1998;6:35-40.
39. Medina-Acosta E, Beverley SM, Russell DG. Evolution and expression of *Leishmania* surface (Gp63) gene locus. *Infect Agents Disease* 1993;2(1):25-39.
40. Joshi PB, Sacks DL, Modi G, McMaster WR. Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage specific leishmanolysin (Gp63). *Mol Microbiol* 1998;27(3):519-530.
41. McKeen PG, Keer JK, Smith DF, Benson FE. Identification and characterization of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2001;115(7):209-216.
42. Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G y col. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sandfly interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(1):406-411.
43. Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today* 2000;16(11):489-497.
44. Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasite remain infectious to macrophage and mice. *J Biol Chem*. 2001;276(7):4.988-4.997.
45. Turco SJ, Spath GF and Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2001;17(5):223-226.
46. Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M y Overath P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1993;58,107-122.
47. Mottram JC, Brooks DR y Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of Trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:455-460.
48. Krakauer DC, Plotkin JB. Redundancy, antiredundancy and the robustness of genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1.405-1.409.
49. LeBowitz JH, Cruz A, Beverley SM. Thymidina kinase as a negative selectable marker in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:321-325.
50. Cunningham ML, Titus RG, Turco SJ, Beverley SM. Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science* 2001;292:285-287.
51. Antoniazzi S, Lima HC y Cruz AK. Overexpression of minixon gene decrease virulence of *Leishmania major* in BALB/c mice in vivo. *Mol Biochem Parasitol* 2000;107:57-69.
52. Kebaier C, Louzir H, Chenik M y col. Heterogeneity of wild *Leishmania major* isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response. *Infect Immun* 2001;68:4.906-4.915.
53. Requena JM, Alonso C, Soto M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today* 2000;16:246-250.