

LEISHMANIOSIS: ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

J. SILLERO F. DE CAÑETE

Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental como Académico Correspondiente

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Ilustrísimos señores Académicos, queridos amigos, señoras y señores:

Es para mí ciertamente un alto honor haber sido designado miembro de esta Academia y, de acuerdo con la normativa reglamentaria de pronunciar el Discurso de Ingreso dentro del año siguiente a la fecha del nombramiento, paso a cumplimentar lo establecido, con lo que mi condición de miembro electo se convertirá, si la intervención así lo merece, en académico efectivo, de pleno derecho. Antes de entrar de lleno en el tema que he seleccionado para mi discurso, quiero agradecer muy profundamente esta distinción, que colma las aspiraciones de cualquier persona con inquietudes en el campo de las ciencias biológicas. Mi agradecimiento es especial hacia el profesor Don Ramón Gálvez, por su señalada amabilidad al convertirse en portavoz de esta Real Academia contestando a mi ponencia.

Dicho lo cual, debo justificar la elección del tema "*Leishmaniosis. Estado actual y perspectivas de futuro*". Hay razones de diversa índole:

- La leishmaniosis es una entidad morbosa tendida a modo de puente entre la ciencia médica humana y veterinaria; por tanto, como internista de aquella, me siento en mi terreno.
- He tenido, desde mi condición de Jefe de un Servicio hospitalario de Medicina Interna receptor de toda la patología infecciosa giennense, suficiente experiencia sobre la leishmaniosis en humanos, con una incidencia creciente en relación a la pandemia de SIDA; daré cuenta más adelante

del binomio SIDA-Leishmaniosis, que ha confirmado esta protozoosis como enfermedad oportunista.

- Por lo demás, la leishmaniosis ha sido considerada por la OMS como *enfermedad olvidada* (yo diría, menos piadosamente, *negligida*), cuando en realidad representa un reto por su prevalencia a nivel mundial, según recordaremos más adelante.
- En el examen de esta afección, destacan a mi modo de ver dos hechos: una apasionante fisiopatología, que permite revisar a fondo los procesos inmunitarios del huésped -innatos y adquiridos-, ya sea en el humano o en el animal; y una terapia aún no muy eficaz en los cánidos, que acaso mejore precisamente con el recurso a inmunomoduladores.
- Por último, se registra un progreso indudable y prometedor: el reciente secuenciado del genoma de diversas leishmanias, que asimismo deberá repercutir en el mejor manejo terapéutico de estos procesos.

Concluyo este exordio señalando que mi atención preferencialmente se proyectará, como es lógico, sobre la leishmaniosis canina, que además sirve de reservorio para la patología del humano.

IMPORTANCIA DE LA ZONOSIS TRANSMISIBLE AL HUMANO

La leishmaniosis incluye un grupo de procesos causados por protozoos del género *Leishmania*, transmitidos por la picadura de insectos vectores de los géneros *Flebotomus* y *Lutzomyia*; su reservorio principal son ciertos mamíferos salvajes y domésticos, en tanto que el hombre se comporta como hospedador ocasional. En su expresión clínica hay formas cutáneo-mucosas y viscerales¹.

La leishmaniosis es una enfermedad con historia. Sin detenerme apenas en este interesante aspecto, quisiera recordar la referencia bíblica que de ella se hace en el Deuteronomio (c28, v27), cuando se dice “*Yavé te herirá con las úlceras de Egipto*” que, según mi criterio, se identifican con el botón del Nilo, Alepo, Biskra, etc., es decir, con el botón de Oriente o forma cutánea clásica de la leishmaniosis. Difiero en cambio de los que interpretan en igual sentido la sexta plaga con que Yahvé castigó a los egipcios y su faraón: es mayoritaria opinión adscribirla al carbunco. De todo ello, hablo en mi monografía *Patología bíblica*².

Es de justicia recordar algunos nombres destacados de esta historia³:

- Alexander Russell (1856), que describió por primera vez la enfermedad
- Leishman y Donovan (1903), por señalar el papel causal del protozoo
- Nicolle (1908), que introdujo el medio de cultivo del parásito
- Wenyon (1911), al indicar la condición de vector de un insecto
- Pitaluga (1912), que publicó el primer caso de kala azar en España
- Camacho (1914), primer caso español de Botón de Oriente
- Vianna (1913), clasificación del parásito
- Montenegro (1926), test cutáneo
- De la Loma (1985), coinfección VIH-Leishmania

Este proceso infeccioso representa un problema de salud pública de envergadura, instalado en 88 países (72 de ellos en vías de desarrollo) de áreas tropicales y subtropicales. La población humana en riesgo se eleva a 350 millones de personas, y la prevalencia de la enfermedad es de 12 a 14 millones de afectados^{4,5}, con una incidencia anual fijada entre 1 y 1.5 millones por lo que hace a leishmaniosis cutánea y 500.000 de la forma visceral; según Desjeux⁶ y otros, se contabilizan 70.000 muertes cada año. Hay además una casuística, aislada aunque significativa, de casos autóctonos en países tradicionalmente no endémicos (EE.UU., Canadá, Alemania), tanto animales como humanos⁷⁻⁸.

En los países industrializados, se ha observado a partir de década de los 80 de la pasada centuria un aumento de la incidencia, al adoptar la leishmania la condición de oportunista en sujetos VIH (+)⁹, lo que ha permitido justamente calificarla de enfermedad re-emergente. La OMS, por todo ello, ha considerado la leishmaniosis como una de las diez afecciones más importantes¹⁰, incluida dentro del "*Programa especial de investigación y formación en enfermedades infecciosas*". Considerada desde 1982 Enfermedad de Declaración Obligatoria (EDO) en España, pasó luego en 1996 al dominio de las Comunidades tras crearse la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

De acuerdo con estas fuentes, hay una primera línea de Comunidades Autónomas parasitadas integrada por Aragón, Baleares, Cataluña y Valencia, y una segunda línea de prevalencia algo menor, en la que se integran Andalucía, Castilla-La Mancha y Madrid. Según Alvar⁴, puede estimarse un global de 200 casos anuales de leishmaniasis visceral y 100 cutánea. Es criterio generalizado que la leishmaniasis es enfermedad infradiagnosticada.

Existen diversos reservorios de la leishmaniosis, de los que en la cuenca mediterránea el perro (*Canis lupus familiaris*) es el principal. La leishmaniosis canina tiene

relevancia per se, en el aspecto clínico-veterinario, y también por su condición de fuente habitual de la leishmaniosis humana.

Los estudios de prevalencia e incidencia en cánidos se han basado en encuestas serológicas a la búsqueda de anticuerpos frente a leishmania. En Andalucía, los resultados han oscilado entre un 8.8% de cánidos parasitados en Granada (según Reyes et al.¹¹) y 23.7% de Córdoba (Martínez Cruz et al.¹²). Existe otro trabajo de Acedo Sánchez et al.¹³ sobre Granada y Jaén, donde encuentran una seroprevalencia del 12.1%.

Estas cifras, de por sí considerables, acrecen muy significativamente si se indagan parámetros del parásito, más en concreto fragmentos de su ADN por técnicas PCR (reacción en cadena de la polimerasa): 67% en Mallorca¹⁴, 27% en la Comunidad de Madrid¹⁵, y hasta 80% en áreas francesas¹⁶. Y, como quiera que muchos de esos perros seropositivos se demuestran clínicamente indemnes, se ha impuesto lógicamente el concepto de *leishmaniosis críptica*¹⁷.

ESTADO ACTUAL DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Para ser definidos reservorio de leishmanias, los cánidos deben cumplir las condiciones especificadas por Ashford¹⁸ y asumidas por la OMS, a saber:

- Abundancia del animal huésped
- Representar una apreciable proporción dentro de la biomasa de mamíferos
- Frecuentemente se trata de especies gregarias
- Vivir suficiente tiempo para trasladar la afección a la estación climática viable para la transmisión
- Contacto suficiente entre el hospedador primario y el vector
- Curso de la infección en el hospedador prolongado y relativamente leve
- Los parásitos del animal reservorio han de demostrarse idénticos a los del humano

Cuadro clínico

Tras un periodo de incubación, que oscila entre pocos meses y algunos años, surgen manifestaciones clínicas extraordinariamente variables en función de factores diversos, tales como la virulencia de la cepa responsable, el estado inmunitario

del animal, tiempo de evolución, órganos afectados y, por supuesto, oportunidad y adecuación de la terapia¹⁹⁻²⁰.

Es típico clasificar la clínica de la leishmaniosis canina en dos amplios grupos: formas cutáneas o cutáneo-mucosas y formas viscerales, al estilo del paradigma humano, conllevando las primeras inferior gravedad y las segundas un pronóstico más ominoso. En mi caso, prefiero sustentar una óptica de matiz fisiopatológico y contemplar la sintomatología en función de su mecanismo de producción, admitiendo manifestaciones inflamatorias granulomatosas -fruto de la inmunopatología celular- de un lado, y de otro una fenomenología vasculítica -resultado del depósito de inmunocomplejos circulantes en diversos órganos y sistemas-²¹. Es una patogenia comparable a la de las afecciones autoinmunes humanas, de las que el lupus eritematoso sistémico es prototipo.

(a) El primero de los mecanismos subyace en lesiones cutáneas de vario aspecto: alopecia, dermatitis ulcerativa, nodular o pustular generalizadas. Hay áreas descamativas, con hiperqueratosis e hipopigmentación. A nivel visceral, da cuenta de linfadenopatías, hígato y esplenomegalia, hemorragias digestivas y epistaxis, etc. La afectación ocular es rica: conjuntivitis, queratitis, infiltrados linfoplasmocitarios en úvea ...²¹⁻²³

(b) La vasculitis de inmunocomplejos²⁴ causa lesiones diversas, entre las que se incluyen poliartritis, uveítis y lesiones renales, Éstas últimas, capaces de diseñar el curso degradativo del proceso, estriban en una glomerulonefritis en principio reversible pero más tarde de sesgo progresivo hacia la insuficiencia renal terminal, con edemas, poliuria isostenúrica, anemización, hiperazoemia, etc.²⁵

El estado general del animal sufre quebranto: anorexia, adelgazamiento, astenia, palidez, apatía, fiebre, somnolencia, trastornos de la locomoción, etc., denuncian enfermedad avanzada difícilmente recuperable.

La analítica elemental revela, a más de la anemia creciente, leucopenia y trombocitopenia, hiperproteinemia con hipergammaglobulinemia policlonal y descenso de la albúmina, proteinuria, alza de las enzimas de citólisis hepática y creatinina elevada²⁶.

Diagnóstico

Muy en síntesis, hay que hablar de métodos parasitológicos basados en la detección de leishmanias y procederles que valoran la respuesta inmune del huésped.

(a) Investigaciones sobre el parásito.

Comprenden:

- *Observación directa de las leishmanias* (amastigotes en macrófagos o exocelulares), aisladas de médula, ganglios, sangre o biopsia cutánea y coloreadas con Giemsa²⁷.
- *Cultivo* en agar-sangre (NNN: Novy-Nicolle-McNeal) o medios líquidos²⁸.
- *Inoculación en animales* (inyección intraperitoneal en hámster dorado)²⁹.
- *Xenodiagnóstico*. Investigación del intestino del flebotomo vector, tras la picadura provocada al animal sospechoso³⁰.
- *Investigación de antígenos leishmaniásicos* en fluidos corporales:
 - aglutinación de látex en orina²⁷
 - técnicas moleculares PCR (detección, amplificación y análisis) a la búsqueda de secuencias de ADN del parásito³¹.

(b) Indagaciones sobre la reacción inmune

Comprenden procederes que evidencian la respuesta tanto celular como humoral del hospedador, en este caso el perro parasitado:

- *Técnicas serológicas para la detección de anticuerpos*. Son muchos los tests que calibran la respuesta humoral a la presencia de antígenos de leishmania: contrainmunolectroforesis, inmunofluorescencia indirecta³², aglutinación directa³³, hemaglutinación indirecta, aglutinación con látex, enzimoimmunoanálisis (ELISA)³⁴, Dot-ELISA³⁵, Western-blot³⁶.
- *Métodos que valoran la inmunidad celular*. La clásica reacción cutánea de Montenegro³⁷ y la linfoestimulación (proliferación blástica de linfocitos enfrentados a antígeno parasitario)³⁸ se incluyen bajo este encabezado.

Concluiré el apartado señalando que en las investigaciones de campo en cánidos es rentable el Dot-ELISA, por su elevada sensibilidad y especificidad, a las que se une la facilidad para la lectura de resultados, que permite procesar con rapidez un gran número de muestras. Un Western-blot resulta indicado para denunciar casos en los que la respuesta de anticuerpos es limitada.

Manejo terapéutico

Hay que confesar que en el presente aún no disponemos de principios activos eficaces para la curación definitiva de la leishmaniosis canina. En una mayoría de casos se puede alcanzar una mejoría del estado del perro, incluso el pleno asintomatismo que se define como curación clínica, pero sin conseguir erradicación completa del protozoo, es decir, la curación parasitológica, lo que en un futuro no lejano expone a frecuentes recaídas³⁹. Por qué esto es así, en contraste con la resolución definitiva regular de los casos humanos (salvo en inmunocomprometidos), es algo que debería explicarse por la fisiopatología, objeto preferencial de este trabajo.

El conocimiento de estos hechos, ha llevado a dos posturas terapéuticas contrapuestas:

- De una parte, la concienciación para un tratamiento muy precoz, que consiga extirpar la enfermedad en sus primeras secuencias. Pero esa situación de leishmaniosis críptica a la que previamente aludía puede perdurar mucho tiempo antes de que la enfermedad descubra su faz clínica.
- De otra, el pronóstico comprometido ha inducido a la política del *culling-dog*, sacrificio sistemático de los animales enfermos. Con ello, se trataría sobre todo de aminorar el número de casos de leishmaniasis visceral humana en las zonas de elevada endemicidad. En Brasil, se llevó a cabo una amplia campaña de eliminación de animales parasitados entre 1990 y 1997: 176.000 canes sero-positivos fueron sacrificados, lo que sin embargo no obtuvo beneficio sensible sobre el número de los casos de kala azar. Según señalan Courtenay et al.⁴⁰, el fracaso del *culling* se produce por la alta tasa de nuevas infecciones caninas y la insuficiente sensibilidad de los métodos de detección usados.

He aquí un esquema de los recursos medicamentosos susceptibles de empleo en la leishmaniosis canina⁴¹:

- *Antimoniales pentavalentes* (Glucantime: antimonio de N-metil-glucamina), que actúan inhibiendo enzimas (fosfoglucoquinasa y piruvato deshidrogenasa) e interfiriendo así la síntesis de ATP y GTP. Dosis: 75-100 mg / Kg / día, 4-6 semanas. Parenteral⁴²
- *Pirazolo-pirimidinas* (Alopurinol), inhibidor de la interconversión de las purinas, lo que se traduce en una menor síntesis de ATP. Aumenta

la catabolia del ARN. Dosis: 20 mg/ Kg / día, 1-12 meses. Es sinérgico cuando se administra junto al antimonial. VO⁴³⁻⁴⁵.

- *Antibióticos poliénicos* (Anfotericina B), con capacidad para perforar la membrana plasmática de la leishmania por interacción con el ergosterol presente en la misma. Se administra en infusión venosa a razón de 0.5-0.8 mg/Kg/ día hasta una posología total de 15 mg/Kg⁴⁶.
- *Diamidinas aromáticas* (Pentamidina), capaces de desorganizar el ADN del parásito, en dosis de 4 mg/Kg/ día, vía intramuscular. Tanda de 20 inyectables días alternos⁴¹.
- *Aminoglucósidos* (Paromomicina); incide sobre el ribosoma parasitario. Posología: 10-40 mg/Kg/ día durante 30 días en aplicación intramuscular⁴⁷.
- *Derivados del imidazol* (Ketoconazol, Metronidazol). Estos antibióticos antifúngicos son más afines a los esteroides de leishmanias que a las células humanas; activan fosforilasa y por ende la glucogenolisis, empobreciendo las reservas glucogénicas del protozoo. De ketoconazol se usan dosis de 7 a 25 mg/ Kg/ día, durante 3 meses. VO⁴⁸.
- *Alquilfosfolípidos* (Miltefosina, edelfosina, ilmofofosina y SR 62-834). Introducidos en la terapia anticancerosa (carcinoma de mama, p.e.), miltefosina ha evidenciado un efecto citotóxico tanto sobre promastigotes como amastigotes de las leishmanias; se incorpora a la membrana del parásito, interfiere el metabolismo de los alquil-lípidos y aumenta la permeabilidad. Dosis: 2 mg/Kg/ día durante 4 semanas. VO⁴⁹.
- *Inmunomoduladores*, tendentes a modificar favorablemente la respuesta inmune. Ya que la inmunidad humoral está pervertida por la aparición de complejos inmunes, fármacos inmunosupresores pueden tener su papel cuando la vasculitis es predominante; en este sentido, el recurso a los corticoides puede ser legítimo⁵⁰. En la vertiente opuesta, el uso de inmunoestimulantes pretende corregir una respuesta celular inmune insuficiente y pervertida, según se discute después: levamisol (en concomitancia con alopurinol), INF- γ y domperidona (antiemético que propicia hiperprolactinemia y con ello estímulo a los linfocitos Th1) pueden jugar un rol útil, aunque limitado⁵¹.
- *Otros fármacos*. Sin más comentarios, merecen citarse: Buparvacuona, Enrofloxacino, y Marbofloxacino, amén de los sistemas de transporte de fármacos capaces de liberarlos en los órganos diana (liposomas, inosomas, complejos lipídicos, etc.)⁵²⁻⁵⁴

Prevención

Algunas de las medidas destinadas a la profilaxis en cánidos han sido ya anticipadas: diagnóstico precoz para una terapia exitosa del animal infectado, y sacrificio de los portadores de una enfermedad avanzada. La prevención de la picadura del díptero vector, la medida profiláctica más rentable en el presente, incluye insecticidas en sus hábitats, ubicación del perro en lugares seguros y repelentes de tipo piretrina. La OMS recomienda collares impregnados con el insecticida deltametrina como el recurso de mayor eficacia, con protección del 86% en las épocas de elevada transmisión⁵⁵. En todo caso, tal recurso resulta insuficiente en zonas de muy alta endemicidad.

Lo que antecede justifica el esfuerzo para alcanzar una profilaxis activa mediante vacunación⁵⁶. Se han preparado y usado sucesivamente:

- Vacunas preparadas con parásitos vivos, muertos o atenuados
- Vacunas a base de fracciones antigénicas de la leishmania purificadas o recombinantes
- Vacunas de ADN.

Los inconvenientes de las primeras han dejado paso a las *vacunas de antígenos aislados*. Son muchas las moléculas antigénicas identificadas: gp63, gp46/M2, PSA-2, gp72 y gp/70-28, proteína LACK, LeiFe, TSA, proteína Q, el ligando fucosa-manosa (FML) y el más reciente LIESAp (*Leishmania infantum excreted secreted antigen promastigote*)⁵⁷. Estas subunidades, proteicas en su mayor parte, inducen inmunización significativa si se aplican junto a adyuvante; aunque quizá sea efímera, salvo que las picaduras del mosquito complementen su actividad (como sucede en áreas endémicas). Es posible que un cóctel de antígenos sea más eficaz.

Las *vacunas de ADN* emplean genes que codifican para proteínas que se estiman protectoras, y se aplican a través de la inoculación parenteral con vectores plasmídicos. Son una fuente de proteínas antigénicas idénticas a las nativas del protozoo, la respuesta inmunitaria es satisfactoria, su manejo fácil y, conseguido el descifrado del genoma de los principales tipos de leishmanias recientemente, es de esperar que se alcancen resultados optimizados. Por lo pronto, hay informes positivos al respecto⁵⁸⁻⁵⁹.

PATOFISIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS

Representa, a mi juicio, el capítulo más atrayente de esta enfermedad, el que cualquier adicto a la biología molecular prefiere, porque plantea problemas y justifica

exposiciones teóricas como las que aquí se ofrece. Es una muestra paradigmática del enfrentamiento entre un agente infectante y la respuesta del huésped receptor. Una pregunta queda en el aire: *¿Es el perro el polo anérgico del espectro entre los parasitados por la leishmania?*

Examinaré sucesivamente el complejo agresor (protozoo y vector) y la reacción inmune que desencadena en el huésped.

Agente causal

El agente de la enfermedad se encuadra dentro del phylum *Protozoa*, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. En el Viejo Mundo, y más en concreto en el suroeste de Europa que nos concierne, el complejo filogenético dominante es *Leishmania infantum*, tanto a nivel canino como humano. Frente a la variabilidad de zimodemas o isoenzimas en las leishmanias que parasitan al hombre, es de destacar la uniformidad de las que invaden al perro⁶⁰.

Las leishmanias se definen como protozoos *digenéticos*, por cuanto que presentan dos formas o fases durante su ciclo biológico:

- *Promastigote*, forma exocelular monoflagelada y móvil, cuerpo elongado de 15 μm , presente en el intestino medio del flebótomo vector. En la fase metacíclica, con menor longitud y largo flagelo, son cedidos al huésped definitivo, en nuestro caso el perro.
- *Amastigote*, forma intracelular inmóvil, con un cuerpo redondeado de 2-4 μm de diámetro; morfología adoptada a las pocas horas de penetración en los macrófagos del hospedador.

Un inóculo típico contiene 100-1000 promastigotes⁶¹. Cuando el parásito entra en el vertebrado hospedador, la reacción inmune innata activa la cascada del complemento, que pretende la eliminación del parásito mediante estímulo a los leucocitos, opsonización tras recubrimiento de su superficie con la fracción C_{3b} , y lisis por el MAC o complejo de ataque a membrana⁶². Un rasgo común a la invasión de los mamíferos por este parásito es que la infección es en esencia intracelular, siendo muy breve el plazo durante el que la leishmania queda libre antes de albergarse en los macrófagos⁶³. Este hecho tiene importancia por lo que hace a la inmunidad del hospedador y al diseño de vacunas. Los leucocitos polimorfonucleares pueden albergar muy temporalmente leishmanias hasta su ubicación en la vesícula fagolisosómica macrófaga; se comportan a modo de “caballos de Troya” que transportan el invasor eludiendo

las acciones adversas del suero y permitiendo su transformación en amastigote⁶⁴. En compensación, la leishmania retrasa la apoptosis leucocitaria hasta 24 horas⁶⁵.

En el macrófago, el amastigote desarrolla un metabolismo anaerobio y pone en marcha mecanismos invasivos-evasivos con los que pretende eludir la lisis. Así, el lipofosfoglicano (LPG)⁶⁶ de membrana previene el ataque de varias subunidades del sistema del complemento, como componentes del MAC $C_{5b}C_9$; el antígeno de superficie gp63⁶⁷, dotado de actividad proteasa, convierte C_{3b} en C_{3bi} y es capaz de fosforilar (e inactivar así) varios componentes de la cascada del complemento. He aquí una lista de moléculas situadas en la superficie, cruciales para la infección y calificadas por tanto como *invasivas-evasivas*⁶⁸:

- Glicerofosfatidil-inositol
- Glicosil-fosfolípidos
- Lipofosfoglicanos
- Fosfoglicanos
- Proteofosfoglicanos
- Glicoproteína gp63
- Proteasas de cisteína
- Histonas
- ATPasas

Hay otro tipo de determinantes en la leishmania que se denominan con razón *patoantigénicos*, porque se estiman responsables del daño histológico en el hospedador y de la ubicación lesional, que oscila desde las formas cutáneas relativamente leves hasta las viscerales más graves⁶⁸. Pueden ser cualificados como factores de virulencia y están ínsitos en la estructura interna del parásito:

- Proteínas del citoesqueleto (quinesinas y tubulinas)
- Chaperonas (histonas HSP 60, 70 y 83)
- Proteínas ribosomales
- Nucleosomas
- Proteosomas

Vector

La leishmania se define también como parásito *heteroxeno*, porque goza de dos tipos de hospedadores: intermediario y definitivo. Aquél es un pequeño díptero, del

género *Phlebotomus* en la cuenca mediterránea. En España se han identificado hasta 7 especies: *P. perniciosus*, *P. ariasi*, *P. papatasi*, *P. sargenti*, *P. chabaudi*, *P. longicarpis* y *P. minutus*, de las que las dos primeras son las más habituales. La hembra es protagonista por ser hematófaga; muestra mayor actividad en el crepúsculo y la noche, durante las épocas de primavera-verano. Sobreviven 30 días y, una vez infectadas, resultan contaminantes toda su vida. Son muy activas inoculadoras (hasta 100 picaduras en una jornada) y la misma sangre ingerida, que representa obstáculo para su nutrición vegetal, le induce a picar. Su capacidad de vuelo está limitada a 500 m⁶⁹.

Este vector introduce junto a los promastigotes metacíclicos una saliva dotada de sustancias favorecedoras de la infección:

- Apirasa, un antiagregante plaquetario⁷⁰
- Maxadilán y adenosina, con actividad vasodilatadora⁷¹
- Prostaglandina E2, que pervierte la respuesta inmune efectiva⁷².
- Hialuronidasa, factor de difusión del parásito, y desintegrinas. .

Este papel coadyuvante cuenta en el éxito de la infección y por eso es obligada su cita.

Respuesta inmune del hospedador

Me referiré en primer lugar, por su mayor relevancia y complejidad, a la respuesta inmune celular, relegando a un segundo apartado la de tipo humoral.

(a) Inmunidad celular

El protagonismo compete a diversas estirpes celulares: leucocitos PMN, macrófagos, células presentadoras y, con un papel muy decidente, linfocitos. De un modo esquemático, el proceso implica estos pasos sucesivos:

- Reacción inflamatoria local. Captación y destrucción de algunos promastigotes por PMN neutrófilos y eosinófilos
- Presentación de leishmanias, a cargo de células de Langerhans y leucocitos dendríticos
- Penetración de los parásitos en el macrófago
- Síntesis macrofágica de interleuquina-12, inducida por la leishmania
- Reacción de las células *natural killer* (NK), con producción de interferón gamma (IFN- γ) y activación del macrófago

- Producción acrecida de IL-12 por el macrófago
- Presentación antigénica a linfocitos T4 *helper* (Th) por macrófagos o células dendríticas
- Respuesta tipo Th1 con sobreproducción de IFN- γ si la reacción inmune es adecuada
- Respuesta tipo Th2 con síntesis de IL-4 e IL-10, en caso de reacción inadecuada
- Producción de NO por el macrófago inducida por IFN- γ y destrucción del parásito.

1. Los *leucocitos polimorfonucleares* ejercen su actividad fagocitaria y de este modo pueden convertirse en portadores-protectores del parásito si puede eludir su lisis promovida por proteasas. Son susceptibles de transformación en CD28⁺, que a su vez interactúan con monocito-macrófagos, actuando como células presentadoras dendríticas con el concurso de moléculas del antígeno de histocompatibilidad mayor (MHC) tipo II⁷³. Si adoptan el módulo CD28⁺, van a sufrir apoptosis, y las leishmanias liberadas junto a residuos fosfolipídicos, pueden realizar una “invasión silenciosa” del macrófago⁷⁴.

Las células de Langerhans, por su parte, migran desde la epidermis al punto de la infección, captan parásitos y pueden trasladarlos hasta los ganglios linfáticos, para presentarlos a células T en reposo (Th0)⁷⁵⁻⁷⁶.

2. La *presentación del parásito a los macrófagos* y su ulterior fagocitosis exige un enlace a receptores de su superficie; la fracción C3b del complemento destaca en este aspecto, porque tras realizar su opsonización, los parásitos ya son reconocidos por el receptor macrofágico CR1. Cuando se ha producido el silenciado, el *binding* se hace al CR3. Otros posibles receptores de entrada a macrófagos incluyen: TLR (*toll-like receptor*), CR4, Fc (fracción cristalizable), manosa-fucosa y fibronectina⁷⁷. Los ligandos de la leishmania incriminados son gp63 (Zn-proteinasa) y lipofosfoglicanos (LPF) anteriormente citados.

3. Una vez *internalizado el promastigote en la vesícula fago-lisosómica del macrófago*, va a sufrir el ataque de enzimas proteolíticas y, sobre todo, la acción leishmanicida de los radicales libres de oxígeno: anión superóxido (O₂⁻), hidroxilo (OH⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y óxido nítrico (NO). Este último, resultado de la actividad de la sintetasa inducible (iNOS) sobre el aminoácido arginina, parece decisivo para la destrucción de la leishmania, de manera que si ésta es capaz de interferirla asegura su supervivencia⁷⁸⁻⁷⁹. Ello se consigue a través de activación de la arginasa, enzima que cataboliza la arginina a ornitina y urea.

El macrófago, a instancias de la leishmania, sintetiza una citoquina que resulta decisiva para una posterior reacción linfocitaria adecuada: IL-12. Pero no es menos cierto que los amastigotes son capaces de provocar una intensa producción de IL-10, que pervierte su actividad: en tal caso, la célula se hace refractaria al INF- γ de los linfocitos Th1 y disminuye su formación de IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)⁸⁰.

Pero el macrófago no sólo es albergue del parásito, sino que también se convierte en presentador del mismo (APC: *antigen-presenting cell*). Para ello, una fracción antigénica debe emerger en la superficie a través de la membrana, y ha de ir unida a una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor tipo II; el complejo antígeno-MHC II se vincula entonces al receptor en la superficie del linfocito T (TCR). Mas, para que la activación linfocitaria tenga lugar, resulta indispensable la presencia de una molécula coestimuladora, que va a asegurar el carácter *not self* del antígeno presentado; el coestimulador suele ser una molécula B7 (B7.1 ó B7.2) ubicada también en la membrana de la APC y capaz de enlazar con otra del linfocito, CD28⁸¹.

La multiplicidad de las funciones del macrófago es muy notable:

- *Inflamación*: secreción de citoquinas que inducen respuesta de fase aguda
- *Activación linfocitaria*: función APC y secreción de IL-1
- *Modulación de la reacción inmune*: IL-12 en respuesta Th1, IL-10 si la respuesta es Th2
- *Actividad microbicida*: Radicales libres de O. Síntesis de NO. Hidrolasas antimicrobianas
- *Inmunidad tumoral*
- *Reparación tisular*.

4. Varias *células del sistema inmune* se encuentran comprometidas en la defensa contra la invasión leishmaniásica.

- Lo están en primer lugar las células CD8+ citotóxicas que, según indica Bekkaid⁸², fabrican una proteína formadora de poros capaz de procurar la lisis osmótica del protozoo. A mayor abundamiento, secretan citoquinas activadoras del macrófago, tales INF- γ y TNF α ⁸³.

- Las células *natural killer* (NK) poseen un receptor para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, y cuando las reconocen unidas a los parásitos causan su destrucción por lisis osmótica. Liberan IFN- γ , activador del macrófago y a la vez promotor de la

respuesta linfocitaria tipo Th1. IL-10 y factor de crecimiento transformador gamma (TGF- γ) frenan la lisis de Leishmanias en este punto⁸⁴.

- Pero son las células T *helper* (Th o T CD4+), de ayuda o cooperadoras, las que se sitúan en el centro de la reacción inmune. Activadas en presencia de antígeno de leishmania, ofrecido por las APC en forma adecuada, se desplazan desde su forma virgen o naif (Thp) hacia subpoblaciones activas con signo Th1 o Th2, la primera de tipo protector y la segunda proclive a persistencia y hasta progresión de la enfermedad⁸⁵.

El que se decante por una u otra vía está en dependencia de factores de diversa índole, entre los que el más decidente es el tenor de citoquinas en las primeras fases de la infección. Así, la IL-12 originada en los macrófagos y otras células APC, actúa siempre en sentido positivo, de promoción de la respuesta Th1 que frena de la infección invasora, en tanto que IL-4 resulta más versátil y puede promover reacciones tipo TH1 o Th2⁸⁶, según el momento en que incida.

- Las células Th1 están capacitadas para segregar IFN- γ , IL-12 y TNF α .
 - Interferón gamma tiene un papel efector importante, por cuanto que su nivel es inversamente proporcional al grado de gravedad clínica: las formas cutáneas localizadas cursan con IFN- γ elevado mientras en las viscerales muy sistematizadas casi brilla por su ausencia. IFN- γ , según ya se ha dicho, muestra dos capacidades esenciales en la lucha contra la leishmania que parasita el macrófago: activación de esta célula e inducción de iNOS⁸⁷.
 - IL-12 es esencial, junto a IL-18, para la síntesis INF- γ por los linfocitos Th1 y células NK⁸⁸. Por ello, si se interfiere mediante anticuerpos en ratones refractarios tipo C3H, aparece una respuesta Th2 proclive a infección⁸⁹.
 - TNF α (la antigua caquetina) es un mediador de la inflamación, que *in vitro* estimula la actividad funcional de diversas células (PMN neutrófilos y eosinófilos, monocito-macrófagos, endotelio, fibroblastos). Por eso, cuando se aplica TNF α recombinante a múridos infectados con *Leishmania major*, mejora el curso del proceso⁹⁰.
- Las células Th2 sintetizan citoquinas en pro de la respuesta inmunitaria humoral: IL-4, IL-6 e IL-10.
 - IL-4 inactiva la labor lítica de los macrófagos y propende al progreso de la enfermedad, en razón a su capacidad inhibitoria de IL-12⁹¹. Los

ratones BALB/c genéticamente susceptibles a leishmaniosis, sintetizan precozmente IL-4, pero si están desnudos de esta citoquina (KO BALB/c) o se tratan con anticuerpos anti-IL-4, se tornan refractarios⁹². No siempre es así, y cepas de *L. major* virulentas pueden crear susceptibilidad en muridos KO BALB/c-; se estima entonces el papel prevalente de otras citoquinas, IL-10 ante todo⁹³.

- IL-6 se comporta como marcador de enfermedad activa y testigo de la eficacia del tratamiento emprendido⁹⁴.
- IL-10 se produce en macrófagos y células dendríticas, además de en los linfocitos T; considerada citoquina de la serie Th2⁹⁵, puede, no obstante, jugar un papel supresor de la parasitosis⁹⁶. Pero sólo los ratones desnudos de IL-4 e IL-10 alcanzan curación estéril de la leishmaniosis inducida⁹⁷.

- Es necesario considerar asimismo el papel de las células T reguladoras. Representan el 5-10% de las células T CD4+, y pueden tener un origen natural o ser inducidas por antígeno. Están capacitadas para producir IL-10 en cuantía significativa y así bloquear la respuesta inmune tipo Th1. Es ejemplo expresivo de cómo la inmunidad innata puede guiar la respuesta inmune adaptativa⁶¹.

(b) Inmunidad humoral

Es la reacción inmune de anticuerpos anti-leishmania producidos en los linfocitos B y células plasmáticas de ellos derivadas.

Su papel defensivo es cuestionable. De un lado, son aptos para activar citotoxicidad dependiente de anticuerpos y opsonización de los promastigotes en orden a su ulterior fagocitosis⁹⁸. De otra, los inmunocomplejos circulantes son capaces de fijarse en la pared vascular y con el concurso del complemento dan cuenta de daño visceral variado. Y aún más, pueden contribuir al progreso de la enfermedad parasitaria: la administración de IgG-antileishmania resulta en un agravamiento lesional en ratones infectados con *L. major*, al cambiar el signo interleuquínico (IL-10 en lugar de IL-12)⁹⁹.

Existen diversas subclases de inmunoglobulinas específicas:

- Las células Th1 inducen la liberación de IgG2 y 3 través del IFN- γ
- Las Th2 favorecen la secreción de IgG1 y 4, mediando IL-4 en el mensaje

- Estas mismas Th2 facilitan la secreción de IgA con el impulso de IL-5
- La IgE reciben el estímulo de Th2 a través de IL-4
- Finalmente, IgM responde al estímulo de ambos tipos de Th.

La inmunopatología refleja un esquema lesional acorde con la patogenia subyacente. Si domina la reacción inmune celular, son los granulomas a base de macrófagos y linfocitos los que causan daño estructural y funcional¹⁰⁰; si la reacción humoral prevalece, los inmunocomplejos se depositan en los vasos, hígado, bazo y riñón, con el efecto deletéreo consiguiente.

CO-MORBILIDAD EN LEISHMANIOSIS CANINA Y HUMANA

Se trata de una faceta de alto interés, que viene a demostrar el carácter oportunista de la leishmaniosis y que explica en buena parte su consideración de enfermedad re-emergente. Otro factor que facilita esa reciente expansión es la urbanización del reservorio animal.

Comorbilidad canina

Me ha llamado la atención la coexistencia de leishmaniosis y ehrlichiosis, de manera que en la estadística de Miró y Molina (2006)³⁹, donde se recogen 106 encuestas llevadas a cabo en todo el territorio español, tal comorbilidad se significa con mucho como la más frecuente (68%), seguida a gran distancia por sarnas, filariosis, babesiosis, etc. Las ehrlichias son microorganismos incursos en la familia rickettsiana y, de las diversas especies existentes, son la *E. canis*, *E. chaffeensis* y *E. ewingii* las más comunes, en especial la primera. Inoculadas a través de la picadura de garrapata (comúnmente, *Rhipicephalus sanguineus*), se localizan en el sistema mononuclear fagocítico con predilección, y dan lugar a un cuadro clínico que se escinde en tres fases.

La primera, aguda, surge tras un periodo de incubación de 8 a 20 días, se caracteriza por un cuadro clínico variable: deterioro general, fiebre, adenitis, hepatosplenomegalia, síndrome hemorrágico, síntomas neurológicos, etc. Hay luego una fase subclínica intercalar y, si el proceso no cura, pasa más tarde a un estadio crónico, con pancitopenia, afectación visceral y, lo que nos interesa aquí, una depresión inmunitaria que facilita su asociación a otras infectopatías, y explica que la leishmania pueda hacerse presente. A la postre, el macrófago es el campo de Marte para uno y otro agente infectante¹⁰¹.

El tratamiento, a base de tetraciclina (doxiciclina) e imicarb, resultará sin duda más complicado en caso de comorbilidad.

Comorbilidad humana

El binomio SIDA-leishmaniasis visceral (LV) no es raro, especialmente en nuestro medio. De 1700 casos censados por la OMS¹⁰² hasta 1998, 1440 pertenecían a la cuenca mediterránea, y de ellos 835 se registraron en España. En apenas un lustro (1987-1992), nuestro Servicio de Medicina Interna de la Beneficencia Provincial de Jaén recogió 9 casos de esta comorbilidad. Según Pineda et al.¹⁰³, la prevalencia de LV en VIH (+) ascendió al 11%, si bien casi la mitad de los casos (41%) eran subclínicos. Con la introducción de una terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), al mejorar la condición inmunológica de los sidosos y menguar así su receptividad hacia la infección protozoaria, es explicable que se haya reducido la incidencia¹⁰⁴.

La leishmania se comporta típicamente como un oportunista, al mismo título que *Pneumocystis carinii*, por poner un ejemplo. Si se tiene en cuenta que la inmunidad celular, y más en concreto, el nivel de linfocitos T CD4+ juega un papel decisivo en el destino del agente inoculado, es lógico que el déficit que comporta la infección por VIH haga más fácil su asiento y diseminación. Y la respuesta del hospedador es entonces de tipo Th2, tolerante para el invasor¹⁰⁵. El VIH ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción de IFN- γ . El resultado es que los pacientes con SIDA exhiben un riesgo de sufrir leishmaniasis cien a mil veces superior en áreas de alta endemidad.

Por lo demás, la leishmania puede ser inoculada en el VIH siguiendo el ciclo zoonótico clásico o en un ciclo antroponótico a través de jeringuilla, propio de los que usan drogas de vía parenteral, ahora en retroceso.

Por lo demás, el cuadro de LV en VIH (+) es muy similar al del VIH (-), salvo que la población linfocitaria CD4+ suele estar por bajo de las 200 cel/ μ l. Hay un grupo, no superior a un 10%, de clínica atípica, con manifestaciones no habituales del tracto digestivo, árbol respiratorio o cutánea muy diseminada. Es nuestra impresión que la enfermedad tiende a sistematizarse más y que la repercusión hepatosplénica puede ser prominente. La trombocitopenia severa y tendencia hemorrágica fue conflictiva en alguno de nuestros casos¹⁰⁶.

Y en lo que concierne al tratamiento, aunque la respuesta inicial a los fármacos al uso puede ser remunerativa, las recidivas son frecuentes y a veces problemáticas. En sujetos asintomáticos con leishmaniasis críptica, la postura más lógica es la de

vigilancia simple. En países en vías de desarrollo, con alta endemicidad de la zoonosis y terapia anti-VIH no satisfactoria, esta coinfección se convierte en auténtica amenaza.

MIRANDO AL FUTURO

Estimo que las lagunas e incógnitas que aún restan en el terreno de la leishmaniosis, y en especial la inmunoprofilaxis vacunal definitiva, van a recibir el impulso benefactor de las investigaciones genéticas en curso. Hablaré, pues, para concluir mi intervención, de las investigaciones acerca del genoma de las leishmanias y sus previsibles consecuencias.

En 1994, se celebró en la Fundación Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, la reunión preparatoria de la *Red de Genoma de Tripanosomatídeos*, a la que acudieron, además de grupos hispanos y latinoamericanos, una representación de dos instituciones de EE.UU. (los NIH y el Instituto TIGR) y otra británica, el Sanger Center. Se acordó seleccionar tres genomas de kinetoplastida para su secuenciación: el de *Leishmania major* y otros dos de tripanosomas, *T. cruzi* y *T. brucei*. Se decidió, para el caso de la leishmania, repartir los cromosomas entre los grupos participantes y concordar luego sus aportaciones.

La tarea, en principio ardua, se prolongaría más de una década antes de ser concluida y publicitada. Por fin, en julio de 2005, aparecieron en *Science* los resultados, que, en el caso de *L. major*, mostraban el secuenciado completo; el grupo informante estaba encabezado por Ivens¹⁰⁷. Pero la historia no concluye aquí. Pocos años después (2007) se nos da cuenta en *Nature Genomics* de la conclusión de estudios en otras dos leishmanias importantes, una en el Viejo Mundo (*L. infantum*) y otra en el Nuevo (*L. Braziliensis*). Un amplísimo grupo de investigadores, con Peacock¹⁰⁸ al frente, llevan a cabo el análisis comparativo de semejanzas y distinciones entre las tres subespecies.

Sus hallazgos resultan de interés: existe una amplia conservación de la sintenia, y se identifican sólo 200 genes con una distribución diferenciada y 78 de ellos restringidos a especies individuales. La sintenia estriba en localización conservada de genes con posiciones similares en especies relacionadas; un tal tipo de conservación apunta a la existencia de fuertes presiones de selección a fin de mantener determinados genes en proximidad: *linkage* genético.

Existen sólo 200 genes diferenciados. Habida cuenta que el número total de genes codificados en cada tipo de leishmania es algo superior a 8.000, debe concluirse que son muchas las semejanzas y pocos los distingos. Asimismo, existe un número dispar de pseudogenes: en la *L. braziliensis* se eleva a 161, es de 91 en *L. major* y se limita a 41 en *L. infantum*. Pseudogén es una secuencia nucleotídica similar a un gen normal de la que no resulta producto funcional, es decir, que no se expresa. A veces se comporta como ARN, y así puede generar una concreta proteína¹⁰⁹.

En conclusión, Peacock et al. estiman que la formación de pseudogenes y la pérdida de algunos genes auténticos son fuerzas principales que configuran los diversos genomas. Los genes que se hallan distribuidos en forma diferente según las especies, codifican proteínas implicadas en interacciones patógeno-huésped y modulan la supervivencia del parásito en el macrófago. Unas pocas disimilitudes pueden causar conductas distintivas especie-específicas, tanto en la patogenia cuanto en la expresión clínica del proceso.

El descifrado del genoma ha propiciado avances en torno a genómica, proteómica, interactoma, metaboloma y biología de sistemas

- La *genómica* implica el estudio simultáneo de la expresión de los genes de un organismo en diferentes estadios y condiciones.
- La *proteómica* contempla a gran escala las proteínas de una célula, sus estructuras y funciones.
- El *interactoma* promueve el conocimiento de cómo las proteínas influyen entre sí, como interactúan.
- El *metaboloma* pretende la clarificación de las relaciones entre genes y proteínas y su canalización a través de rutas metabólicas concretas.
- La expresión *biología de sistemas* (*systemic biology*) alude a una nueva área de la biología que desarrolla algoritmos y métodos de estudio para racionalizar y asumir los datos generados por estas investigaciones¹¹⁰.

Confiamos que, en un futuro próximo, todos estos avances se proyecten en un mejor conocimiento de las leishmaniosis en su doble vertiente animal y humana, y que nos conduzcan a un panorama menos ominoso que el que en la actualidad ofrece esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LORENZ, A; et al.- Consenso sobre leishmaniosis. *Sociedad Argentina de Dermatología*. 2008.

2. SILLERO FERNÁNDEZ DE CAÑETE, JM.- Patología bíblica. *Seminario Médico del IEG. Número monográfico*. Jaén, 2006.
3. GARCÍA ALMAGRO, D.- Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, 2004.
4. ALVAR, JP.- Leishmaniasis: de la biología al control. 2ª edición. *Lab. Intervet*. Madrid, 2001.
5. WORLD HEALTH ORGANIZATION.- Leishmaniasis: background information. The disease and its epidemiology. 2006. In: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>
6. DESJEUX, P.- Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 1996. 14(5): 417-423.
7. ENSERINK, M.- Has Leishmaniasis become endemic in U.S.? *Science*. 2000. 290:1881-1883.
8. BOGDAN, C; SCHÖNIAN, G; BAÑULS, AL; et al.- Visceral leishmaniasis in a German child who have never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2001. 32:302-306..
9. DESJEUX, P; ALVAR, J.- *Leishmania* /VIH co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2003. 97(Suppl. 1):3-15.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION.- TDR diseases. May, 2007. Geneva, Switzerland. In: <http://who.int/tdr/diseases/default.htm>.
11. REYES-MAGAÑA, A; MORILLAS-MÁRQUEZ, F; VALE, AM; et al.- Encuesta sobre la leishmaniasis canina en las comarcas naturales de la provincia de Granada (Sur de España). *Rev. Iber. Parasitol.* 1988. 48:233-240.
12. MARTÍNEZ-CRUZ, MS; MARTÍNEZ-MORENO, A; MARTÍNEZ-MORENO, FJ; et al.- Epidemiología de la leishmaniasis canina en Córdoba. *Rev. Iber. Parasitol.* 1990. 50:1-7.
13. ACEDO-SÁNCHEZ, C; MORILLAS-MÁRQUEZ, F; SÁNCHEZ-MORENO, MC; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.- Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in Southern Spain. *Veter. Parasitol.* 1998. 75:1-6.
14. SOLANO-GALLEGO, L; MORELL, P; ARBOIX, M; et al.- 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. 39:560-563.
15. FERNÁNDEZ-PÉREZ, FJ.- Valor diagnóstico y pronóstico de la respuesta celular (linfoproliferación, IFN- γ) y humoral (IFI, inmunodetección) en la leishmaniasis canina natural. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. 2000.
16. BERRAHAL, F; MARY, C; ROZE, M; et al.- Canine leishmaniasis identification of asymptomatic carriers by polimerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med.* 1996. 55:273-277.
17. INIESTA GONZÁLEZ, L.- Diagnóstico de la leishmaniasis críptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección..*Tesis Doctoral*. Universidad de Barcelona. 2007.
18. ASHFORD, RW.- Leishmaniasis reservoirs and their significance. *Clin. Dermatol.* 1996. 14: 523-532.
19. MOLINA, R; AMELA, C; NIETO, J; et al.- Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1994. 88:491-493.
20. OLIVIER, M; TANNER, CE.- Susceptibility of macrophage populations to infection in vitro by *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* 1987. 55:467-471.
21. FERRER, L.- Clinical aspects of canine leishmaniasis. In: *Proceedings of International Canine Leishmaniasis Forum. Canine Leishmaniasis: an update*. Barcelona, 1999.
22. ABRANCHES, P; SANTOS GÓMEZ, G; RACHAMIM, N; et al.- An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991. 13:537-550.
23. GARCÍA-ALONSO, M; BLANCO, A; REINA, D; et al.- Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1996. 18:617-623.

24. PUMAROLA, M; BREVIK, L; BADIOLA, J; et al.- Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J. Comp. Pathol.* 1991. 105:279-286.
25. MANCIANTI, F; POLI, A; BIONDA, A.- Analysis of renal immune deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parassitologia.* 1989. 31:213-230.
26. KEENAN, CM; HENDRICKS, LD; LIGHTNER, L; JOHNSON, AJ.- Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.* 1984. 21:80-86.
27. SUNDAR, S; RAI, M.- Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002. 9:951-958.
28. PORTÚS, M.- Diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis autóctonas. *Lab2000.* 1987. 12:21-28.
29. MARÍN INIESTA, F; MARÍN INIESTA, E; MARTÍN LUENGO, F.- Papel de perros y zorros como reservorio de leishmaniosis en la región murciana. *Rev. Iber. Parasitol.* 1982. 42:307-313.
30. TRAVI, BL; TABARES, CJ; CADENA, H; et al.- Canine visceral leishmaniosis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001. 64:119-124.
31. LACHAUD, L; MARCHERGUI-HAMMAMI, S; CHABBERT, E; et al.- Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:210-215.
32. MANCIANTI, F; MECIANI, N.- Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination and counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Vet. Res.* 1988. 29:1409-1411.
33. EL HARITH, A; SLAPPENDEL, RJ; REITER, I; et al.- Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J.Clin. Microbiol.* 1989. 27:2252-2257.
34. CHATTERJEE, M; JAFFE, L; SUNDAR, S; et al.- Diagnostic and prognostic potential of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for leishmaniasis in India. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. 6:550-554.
35. FISA, R; GÁLLEGO, M; RIERA, C; et al.- Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997. 9:50-55.
36. FERNÁNDEZ-PÉREZ, FJ; MÉNDEZ, S; DE LA FUENTE, C; et al.- Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1999. 11:170-173.
37. MONTENEGRO, J.- Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Arch. Dermatol. Syphilol.* 1926. 13: 187-194.
38. FERNÁNDEZ-PÉREZ, FJ; GÓMEZ-MUÑOZ, MT; MÉNDEZ, S; ALUNDA, JM.- *Leishmania*-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 2003. 86:83-91.
39. MIRÓ CORRALES, G; MOLINA MORENO, R.- Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España. *Ediciones Bayer Health Care.* 2006.
40. COURTENAY, O; QUINNELL, RJ; GARCEZ, LM; et al.- Infectiousness in a cohort of braziliensis dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmissions. *J. Infect. Dis.* 2002. 186:1314-1320.
41. NOLI, C; AUXILIA, ST.- Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 2005. 16:213-232.
42. SLAPPENDEL, RJ; TESKE, E.- The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet. Quart.* 1997. 19:10-13.
43. MOLINA, R; MIRÓ, G.- Canine leishmaniasis: conventional therapies influencing infectivity of dogs to sandflies. New challenges on tropical medicine and parasitology. *Oxford*, 2000. Pag. 95.

44. BANETH, G; HOFFMAN, O; JAFFE, D; et al.- Allopurinol treatment diminishes the infectivity of dogs with canine leishmaniasis to *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Israel J. Vet. Med.* .2001. 56. Abstract.
45. DENEROLLE, P; BOURDOISEAU, G.- Combination allopurinol and antimony treatment vs. antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis. *J. Vet. Intern. Med.* 1999. 13:413-415.
46. BANETH, G; SHAW, SE.- Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 2002. 106:315-324.
47. OLIVA, G; GRADONI, L; CARTESE, L; et al.- Comparative efficacy of meglumine antimoniate and aminosidine sulphate, alone or in combination, in canine leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1998. 92:165-171.
48. EUZEBY, J.- Therapeutique de la leishmaniose générale du chien. *Prat. Med. Chir. Anim.* 1988. 23 (S5): 103-110.
49. MAYNARD, L; WOERLY, V; SANQUER, A; MEDAILLE, C.- Clinical efficacy of miltefosine oral solution in the treatment of canine leishmaniasis. *World Congress WSAVA/ FECAVA/CSAVA (Praga)*. 2006. Pp 867-868.
50. ADAMAMA-MORAITOU, KK; SARIDOMICHELAKIS, MN; KRITSEPI, M; et al.- Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and cooper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Can. J. Vet. Res.* 2005. 69:287-292.
51. PROVERBIO, D; SPADA, E; RANDOLOTI, A; TRANQUILLO, V.- First clinical experiences with a feline omega interferon in the treatment of canine leishmaniasis. *Worldleish 3 (Palermo-Terrasina, Sicily, Italy)*. 2005. Pp. 193.
52. VEXENAL, JA; CROFT, SL; FURTADO CAMPOS, JH; MILES, MA.- Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 1998. 77:71-73.
53. VOULDOUKIS, I; ROUGIER, S; DUGAS, S, et al.- Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Vet. Parasitol.* 2006. 135:137-146.
54. NIETO, J.- Evaluación de nuevos vehículos lipídicos en el tratamiento de la leishmaniasis canina con anfotericina B y estibogluconato sódico. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. 1999.
55. MAROLI, M; MIZZON, V; SIRAGUSA, C; et al.- Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dogs collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* 2001. 15:358-363.
56. CARCELÉN, J; MOLANO, I; INIESTA, V; et al.- Leishmaniasis. Inmunoprofilaxis. Desarrollo de vacunas. *Revista del C.G.C.V.E.* Julio, 2005. Pag. 42-46-
57. LEMESRE, JL; HOLZMULLER, P; CAVALEYRA, M; et al.- Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine.* 2005. 23:2825-2840.
58. RAMIRO, MJ; ZÁRATE, J; HANKE, T; et al.- Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vector expressing LACK. *Vaccine.* 2003. 2:2474-2484.
59. GURUNATHAN, S; PRUSSIN, C; SACKS, D, SEDER, R.- Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 1997. 186:1137-1147..
60. ZORIO GRIMA, M.- Leishmaniasis canina. Panorámica general de la enfermedad. *Revista del C.G.C.V.E.* Junio, 2005. Pag. 14-18.
61. ROBERTS, MTM.- Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Brit. Med. Bull.* 2006. 75-76(1):115-130.

62. ROITT, IM; DELVER, PJ.- *Roitt's Essencial Immunology*. 10th ed. Blackwell Science. London, 2001.
63. HOMMAL, M.- Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. 1999. 39:101-111.
64. LAUFS, H; MÜLLER, K; FLEISCHER, J; et al.- Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.* 2002. 70:826-835.
65. AGA, L; KATSCHINSKI, DM; VAN ZANDBERGEN, G; et al.- Inhibition of spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 2002. 169:898-905.
66. PUENTES, SM; DWYER, DM; BATES, PA; JOINER, KA.- Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 1989. 143:3743-3749.
67. BRITTINGHAM, A; MORRISON, CJ; McMASTER, WR; et al.- Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 1995. 155:3102-3111.
68. RODRÍGUEZ, N.- Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de leishmaniasis. *Dermat. Ven.* 2003. 41:3-9.
69. GARCÍA ALMAGRO, D.- Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid. 2004.
70. VALENZUELA, JG; BELKAID, Y; ROWTON, E; RIBEIRO, JMC.- The salivary apirase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to novel Cimex family of apirases. *J. Exp. Biol.* 2001. 204:229-237.
71. LERNER, EA; RIBEIRO, JMC; NELSON, RJ; LERNER, MR.- Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* 1991. 266:11234-11236.
72. LONARDONI, MVC; RUSSO, M; JANCAR, S.- Essential role of platelet activating factor in control of *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.* 2000. 68:6355-6361.
73. AWASTHI, A; MATHUR, RK; SAHA, B.- Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 2004. 119:238-250.
74. TEIXEIRA, MJ; TEIXEIRA, CR; ANDRADE, BB; et al.- Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends. Parasitol.* 2006. 22:32-40.
75. MARCHAL, SA; MARCHAL, T; MOORE, PF; et al.- Infection of canine Langerhans cell and interdigitating dendritic cell by *Leishmania infantum* in spontaneous canine leishmaniasis. *Rev. Med. Vet.* 1997. 148:29-36.
76. MARCHAL, T; DEZUTTER-DAMBUYANT, C; BOURDOISEAU, G; et al.- Evidence that Langerhans cells migrate to regional lymph nodes during experimental contact sensitization in dogs. In: *Dendritic cells in fundamental and clinical Immunology. Advances in experimental Medicine and Biology*. D. Smith & J. Bacherau, ed. Plenum Press. London, 1995.
77. GORDON, S.- Pattern recognition receptor doubling up for innate immune response. *Cell.* 2002. 111:927-933.
78. BOGDAN, C; RÖLINGHOFF, M.- The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 1998. 28:121-134.
79. PROUDFOOT, L; NIKOLAEV, AV; FENG, GJ; et al.- Regulation of the expression of nitric oxide syntase and leishmanicidal activity by glucoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996. 93:10984-10989.
80. KANE, MM; MOSER, DM.- The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 2001. 166:1141-1147.
81. BRETSCHER, PA; WEI, G; MENON, JN; BIELEFELDT-OHMANN, H.- Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science.* 1992. 257:539-542.

82. BELKAID, Y; VON STEBUT, E; MÉNDEZ, et al.- CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. 2002. 168:3992-4000.
83. MÜLLER, I; KROPF, ETGES, RJ; LOUIS, JA.- Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect. Immun.* 1993. 61:3730-3738.
84. BOGDAN, C; SCHRÖPPEL, K; LOHOFF, M; et al.- Immunization of susceptible hosts with a soluble antigen fraction from *Leishmania major* leads to aggravation of murine leishmaniasis mediated with CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 1990. 20:2533-2540.
85. ALEXANDER, J; BRYSON, K.- T helper (h)1/th2 and *Leishmania* paradox rather than paradigm *Immunol. Lett.* 2005. 99:17-23.
86. BIEDERMANN, F; ZIMMERMANN, S; HIMMALRICH, H; et al.- IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice *Nat. Immunol.* 2001. 2:1054-1060.
87. CUNNINGHAM, AC.- Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.* 2002. 72:132-141.
88. KATO, T; YAMANE, H; NARIUCHI, H.- Differential effects of LPS and CD40 ligand stimulations on the induction IL-12 production by dendritic cells and macrofagues. *Cell Immunol.* 1997. 18:59:67.
89. HONDOWICZ, BD; SCHARTON-KERSTEN, TM; JONES, DE; SCOTT, P.- *Leishmania major* -infected C3H treated with anti-IL-12 mAb develop but do not maintain a Th2 response. *J. Immunol.* 1997. 159:5024-5031.
90. TITUS, RG; SHERRY, B<; CERAMI, A.- Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 1989. 170:2097-2104.
91. SCHARTON-KERSTEN, T; AFONSO, LC; WYSOCKA, M; et al.- Il-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* 1995. 154:5320-5330.
92. KOPF, M; BROMBACHER, F; KOHLER, G; et al.- IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with leishmania major. *J. Exp. Med.* 1996. 184:1127-1136.
93. NOBEN-TRAUTH, N; KROPF, P; MULLER, I.- Susceptibility to *Leishmania major* in iinterleukin-4-deficient mice. *Science.* 1996. 271:987-990. Abstract.
94. ANSARI, NA; SALUJA, S; SALOTRA, P.- Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin. Immunol.* 2006. 119:339-345.
95. HSIEH, CS; HEIMBERGER, AB; GOLD, AS; et al.- Differential regulation of T helper phenotype development by interleukin 4 and 10 in an $\alpha\beta$ T-cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. 89:6065-6069.
96. KARP, CL; EL-SAFI, SH; WYNN, TA; et al.- In vitro cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both, interleukin-10 and interferon-gamma. *J. Clin. Invest.* 1993. 91:1644-1648.
97. BELKAID, Y; HOFFMANN, K; MÉNDEZ, S; et al.- The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J. Exp. Med.* 2001. 194:1497-1506.
98. HERMAN, R.- Cytophylic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infect. Immun.* 1980. 28:585-593.
99. MILES, SA; CONRAD, SM; ALVES, RG; et al.- A role for IgG immune complexes during infection with intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* 2005. 20:747-754.
100. MIRÓ CORRALES, G (ed).- Leishmaniosis canina y felina. Monografía. *Canis et felis*. Ed. Aca-lanthis. Madrid, 2007.
101. NEER, TM.- Canine monocytic and granulocytic ehrlichiosis. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. CF Greene, ed. Pp 137-147. WB. Saunders. Philadelphia, 1998.

102. WORLD HEALTH ORGANIZATION.- Leishmaniasis and *Leishmania*/VIH coinfections. Fact Sheet N° 116. www.who.int/inf-fs/en/fact1116.html
103. PINEDA, JA; GALLARDO, JA; MACÍAS, J; et al.- Permanence of and factors associated with visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type1 infected patients from Spain in the area of highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:762-767.
104. ALVAR, J; CAÑAVATE, C; GUTIÉRREZ SOLAR, B; et al.- *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997. 10:298-307
105. NIGRO, L; CACOPARDO, B; PREISSER, W; et al.- In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfectd with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999. 60:142-145.
106. PINTADO, V; MARÍN-RABADÁN, P; RIVERA, ML; et al.- Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)*. 2001. 80:54-73.
107. IVENS, AC; PEACOCK, CS; WOORTHEY, EA; MURPHY, L et al.- The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science*. 2005. 309:436-442.
108. PEACOCK, CS; SEEGER, K; HARRIS, D; et al.- Comparative genomic analysis of the three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Gen.* 2007. 39:839_847.
109. TAM, OH; ARAVIN, AA; STEIN, P; et al.- Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*. 2008. 453:534-538.
110. KITANO, H.- Computational systems biology. *Nature*. 2002. 420:206-210.