

Viviendo dentro del enemigo: supervivencia de *Leishmania* en el interior de las células fagocíticas

Zelandia Fermín¹

zelandiafermin@gmail.com

<https://orcid.org.0000-0001-5140-9007>

Ana Andreína Alviares¹

anaalviares@gmail.com

Luis José Díaz¹

ljdp0754@gmail.com

¹Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit", Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

Leishmania es un género de protozoarios parásitos causantes en el hombre de un conjunto de enfermedades conocidas colectivamente como leishmaniasis. Estos organismos presentan dos estadios evolutivos; el promastigote, flagelado extracelular, que se encuentra dentro del intestino del insecto vector, y el amastigote, intracelular, no móvil, que parasita distintas células de mamíferos. El amastigote, sobrevive y se multiplica en el interior de vacuolas parasitóforas, dentro de los macrófagos y neutrófilos, apropiándose de sus nutrientes y evadiendo los mecanismos de destrucción de estas células inmunitarias. Para mantener la infección a largo plazo, *Leishmania* debe asegurar su supervivencia dentro del macrófago, su célula hospedadora principal, para lo cual se vale de numerosas estrategias tendientes a: (1) garantizar su entrada silenciosa a estas células, valiéndose en ocasiones de su paso encubierto dentro de los neutrófilos; (2) evitar su destrucción por metabolitos tóxicos y (3) prevenir la presentación de sus antígenos en la membrana celular, que alerten a los linfocitos Th1 y Tc de su presencia. Aunque se ha progresado mucho en la comprensión general de estos procesos, la completa identificación de las moléculas del parásito y del hospedador involucradas en esta contienda hospedador-parásito será crucial para el avance en el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas más efectivas contra las leishmaniasis.

Palabras clave: *Leishmania*; macrófago; neutrófilo; fagosoma

LIVING WITHIN THE ENEMY: SURVIVAL OF *LEISHMANIA* INSIDE THE PHAGOCYtic CELLS

ABSTRACT

Leishmania is a genus of protozoan parasites causing a group of diseases in humans collectively known as leishmaniasis. These organisms present two evolutionary stages; the promastigote, extracellular flagellate, found inside the intestine of the vector insect, and the amastigote, intracellular non-motile, that parasitizes

different mammalian cells. The amastigote survives and multiplies inside parasitophorous vacuoles, within macrophages and neutrophils, appropriating nutrients and evading the destruction mechanisms of these immune cells. To maintain the infection in the long term, *Leishmania* must assure its survival within the macrophage, its main host cell, for which it uses numerous strategies aimed to: (1) guarantee its silent entry into these cells, sometimes undercover within neutrophils, (2) avoid their destruction by toxic metabolites, (3) and prevent the presentation of its antigens on the cell membrane, which could alert Th1 and Tc lymphocytes of their presence. Although much progress has been made in the general understanding of these processes, the complete identification of the parasite and host molecules involved in this host-parasite contest will be crucial to attain progress in the development of more effective therapeutic and prophylactic strategies against leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania*; macrophage; neutrophil; phagosome

INTRODUCCIÓN

Leishmania es el nombre de un género de protozoarios parásitos causantes de un conjunto de enfermedades en el hombre denominadas colectivamente leishmaniasis. Estas patologías presentan un espectro de manifestaciones, que va desde formas cutáneas de variable grado de severidad (leishmaniasis cutánea: localizada, difusa, diseminada), a lesiones desfigurantes de la mucosa oro-naso-faríngea (leishmaniasis mucocutánea), o el grave compromiso de órganos internos (leishmaniasis visceral), generalmente mortal si no es atendida (WHO, 2010). La evolución y respuesta al tratamiento de estas enfermedades está influenciada tanto por la especie de parásito causante de la infección, como por el terreno genético del hospedador (condicionante de la respuesta inmunitaria) y su estado general de salud (Burza *et al.*, 2018). La malnutrición y la inmunosupresión, especialmente la causada por la infección por el virus de inmunodeficiencia humana, aumentan la susceptibilidad al desarrollo de

manifestaciones clínicas, y pueden conducir a lesiones en localizaciones atípicas (WHO, 2010).

Las leishmaniasis son endémicas en 102 países de áreas tropicales y sub-tropicales del planeta, donde 1,3 millones de personas se infectan cada año, entre 20.000 - 30.000 fallecen y más de 350 millones viven en riesgo de contraer la infección (OPS, 2019). La incidencia de esta parasitosis ha mostrado un importante aumento en las últimas décadas debido a múltiples factores, entre los que destacan: falla en las medidas de prevención y control, migraciones causadas por conflictos bélicos e inestabilidad política, calentamiento global, y el surgimiento de cepas de parásitos resistentes a los fármacos disponibles (WHO 2010; Berry *et al.*, 2016). La ausencia de una vacuna efectiva y las limitaciones asociadas a los pocos fármacos existentes para su tratamiento (vía de administración, toxicidad, desarrollo de resistencia) han dificultado el control de estas enfermedades lo cual hace prioritario el desarrollo de nuevos tratamientos (Burza *et al.*, 2018). Una mejor comprensión de los mecanismos empleados por *Leishmania* para subvertir las funciones básicas de sus células blanco en su beneficio, podría abrir importantes vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas o profilácticas novedosas. En este trabajo se revisan los avances logrados en esta área hasta la fecha.

Metaciclogénesis e invasión del hospedador vertebrado

Leishmania presenta un ciclo de vida digenético; una parte de este ocurre en un insecto vector (género *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomya* en el nuevo mundo) y la otra en el interior de células fagocíticas de organismos vertebrados susceptibles. En el insecto se desarrolla el estadio promastigote; elongado, de 20 a 30 μm de longitud, con un flagelo largo que emerge de la parte anterior del cuerpo y le proporciona movilidad. El promastigote presenta dos morfotipos principales: el promastigote procíclico, forma proliferativa, no infectiva, localizada generalmente en el intestino medio, y el promastigote metacíclico, forma infectiva, no proliferativa, que se

localiza en el intestino anterior y la probóscide del insecto, y es transmitida al hospedador vertebrado a través de la picadura. En el hospedador mamífero se encuentra la forma amastigote, la cual es redondeada a ovoide, mide de 2 a 5 μm de largo y no presenta flagelo aparente. Es intracelular obligatoria, pues vive y se multiplica en el interior de vacuolas parasitóforas dentro de las células blanco (OPS, 2019).

Cuando un insecto vector hembra infectado se alimenta de la sangre de un vertebrado, inocula en la dermis un pequeño número (10-200) de promastigotes metacíclicos presentes en su probóscide. En la piel, los promastigotes son internalizados por células fagocíticas, como: neutrófilos, macrófagos, y células dendríticas; particularmente dentro de los macrófagos se transforman en amastigotes, y se multiplican en el interior de vacuolas parasitóforas, hasta hacerlos estallar. Los parásitos liberados infectan nuevas células o son ingeridos por un insecto vector (Kaye, 2011). *Leishmania* ha desarrollado una serie de mecanismos destinados a garantizar su supervivencia frente al sistema inmunitario del hospedador vertebrado; inicialmente, frente a los efectores solubles presentes en el plasma, y más tarde, contra aquellos que amenazan su permanencia en el interior de las células fagocíticas.

Supervivencia frente a la eliminación por el sistema del complemento

Cuando el insecto vector deposita los parásitos en la epidermis del hospedador mamífero ocurren eventos importantes para el establecimiento de la infección. Los promastigotes desencadenan inmediatamente la activación del sistema de complemento y la deposición del factor C3 en su superficie, lo que permite el ensamblaje del complejo de ataque de membrana (C5b-C9), dando como resultado la lisis de cerca de 90% de los parásitos durante los primeros minutos de la infección (Domínguez *et al.*, 2003). La resistencia de los promastigotes restantes a la destrucción es causada por cambios estructurales en la molécula de membrana lipofosfoglicano (LPG), ocurridos durante su diferenciación a promastigotes metacíclicos, que

les proporciona un glicocáliz más grueso, prácticamente impenetrable para el complejo de ataque de membrana (Puentes *et al.*, 1990). Por otra parte, los promastigotes metacíclicos poseen una ectoquinasa, que fosforila a los factores C3, C5 y C9 causando su inactivación (Hermoso *et al.*, 1991), y expresan en su superficie la glicoproteína gp63, una proteasa que escinde al factor C3b, generando el péptido inactivo iC3b, que además de abortar la activación del sistema, promueve la internalización del parásito por las células fagocíticas al ser reconocido como opsonina por el receptor CR3 (Brittingham *et al.*, 1996). Irónicamente, la activación del complemento facilita a los promastigotes metacíclicos sobrevivientes invadir las células fagocíticas y sobrevivir en su interior (Sacks y Sher, 2002).

EVASIÓN DE LOS MECANISMOS MICROBICIDAS DE LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS

Macrófagos

Aunque *Leishmania* tiene la capacidad de infectar distintos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, queratinocitos y fibroblastos) el macrófago constituye su célula blanco predilecta y principal responsable del mantenimiento de la infección (Kaye *et al.*, 2011). Una elección que presenta grandes desafíos, ya que esta poderosa célula de la inmunidad innata, además de tener la potencialidad de desplegar una potente actividad microbicida, posee la capacidad de presentar sus antígenos a los linfocitos T y alertarlos sobre su presencia. De modo que la supervivencia del parásito dependerá del equilibrio entre la capacidad del macrófago para activarse y la habilidad del parásito para evitar que esto ocurra.

Los promastigotes de *Leishmania* interactúan con el macrófago en varias etapas, comenzando por la adhesión, que involucra el reconocimiento, tanto de ligandos intrínsecos del parásito (lipofosfoglicano y gp63), como de opsoninas depositadas en su superficie (complemento, anticuerpos naturales), por receptores específicos; entre ellos: los receptores de

complemento CR1 y CR3, el receptor de fibronectina, el receptor de manosa y los receptores de IgG (Fc γ RI y Fc γ RIII) (Ueno *et al.*, 2012). Posteriormente, el parásito es internalizado mediante el proceso de fagocitosis, dependiente principalmente de las GTPasas Rac-1 y Arf6 (Lodge y Descoteaux, 2006; Moradin y Descoteaux, 2012). La membrana plasmática del macrófago lo envuelve, hasta incorporarlo en un compartimento especializado llamado fagosoma, el cual evoluciona hasta convertirse en una vacuola parasitófora. La vacuola parasitófora es un compartimento híbrido, de composición dinámica, que si bien se origina a partir del sistema endocítico de la célula hospedadora, es modificado en el tiempo por la incorporación de componentes del parásito y de la vía de secreción (retículo endoplasmático-Golgi) (Ndjamen *et al.*, 2010; Young y Kima, 2019). Como consecuencia, en distintas etapas, se pueden encontrar en la membrana vacuolar moléculas asociadas a la membrana de lisosomas, como las proteínas LAMP1, LAMP2 y la bomba de protones vacuolar V-ATPasa; y pertenecientes al sistema de secreción, como calnexina y Sec22b. Además, se han identificado en estos organelos: moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), la sub-unidad gp91phox del complejo nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa, macrosialina, así como las proteasas solubles catepsina B, D, H, L, y otras hidrolasas lisosomales (Young y Kima, 2019). En esta estructura, *Leishmania* inicia su transformación de la forma promastigote a amastigote, un proceso desencadenado por el aumento de la temperatura, la disminución del pH y la disminución de la disponibilidad de hierro (Mittra *et al.*, 2013).

Dentro de las primeras horas, dependiendo de la especie, el promastigote pierde su flagelo y adopta una forma ovoide y reducida, pudiéndose registrar la expresión de genes específicos de la forma amastigote (de Pablos *et al.*, 2016). La reducción de tamaño que tiene lugar durante la transformación está asociada a un proceso de invaginación masiva del complejo membrana plasmática-citoesqueleto, similar a lo

observado en los procesos autofágicos de eucariotas superiores (Dagger *et al.*, 2017).

Luego de la internalización de la mayoría de los microorganismos, los fagosomas de los macrófagos sufren un proceso de maduración, en el que adquieren propiedades microbicidas al fusionarse con lisosomas y endosomas, bajo regulación de las GTPasas Rab5 y Rab7, convirtiéndose en fagolisosomas (Kaye y Scott, 2011). Durante este proceso, tiene lugar la acidificación progresiva del organelo, debido a la incorporación a su membrana de la bomba de protones vacuolar y la adquisición de enzimas lisosomales (Podinovskaia y Descoteaux, 2015). Por otra parte, los macrófagos producen una variedad de compuestos tóxicos que ayudan a destruir al microorganismo fagocitado, entre ellos: péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno. El complejo multicomponente NADPH oxidasa se ensambla en la membrana del fagosoma e inicia un proceso conocido como “estallido respiratorio”, en el que se produce el ion superóxido (O₂⁻) a partir de oxígeno molecular. Posteriormente, la enzima superóxido dismutasa convierte el O₂⁻ en peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y en una serie de reacciones adicionales se producen a partir de este último un conjunto de sustancias tóxicas, entre ellas los radicales hidroxilo (OH), hipoclorito (OCl⁻) e hipobromito (OBr⁻) (Nauseef *et al.*, 2008). Por otra parte, se inicia la expresión en la membrana vacuolar de la enzima sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS o NOS2), la cual cataliza la producción de óxido nítrico (NO) a partir de la L-arginina (Miller *et al.*, 2004). De forma tal que, una vez fagocitados, muy pocos microorganismos pueden sobrevivir a las condiciones adversas dentro de los fagolisosomas de los macrófagos.

Numerosos trabajos han demostrado que la acidificación que se presenta típicamente al transformarse el fagosoma inicial en fagolisosoma, es inhibida transitoriamente en aquellos que contienen promastigotes vivos de *Leishmania* (Kaye y Scott, 2011). El lipofosfoglicano, un componente de la membrana celular del parásito, de expresión

abundante en la superficie del promastigote y moderada o ausente en el amastigote, ha sido identificado como el principal responsable de alterar el tráfico intracelular y la biogénesis del fagolisosoma (Turco y Sacks, 1991; Moradin y Descoteaux, 2012). Este glicofosfolípido ocasiona la acumulación de F-actina en la periferia del fagosoma, lo que interfiere con la maduración al modificar la estructura de los microdominios lipídicos de la membrana involucrados en distintas vías de señalización (Lodge *et al.*, 2006; Moradin y Descoteaux, 2012). También se ha demostrado la participación de la metaloproteasa gp63 mediante la inactivación proteolítica del SNARE VAMP8, parte de la maquinaria responsable de la fusión de organelos (Matheoud *et al.*, 2013). De esta manera, son excluidas la NADPH oxidasa, la bomba de protones y las hidrolasas ácidas lisosomales el tiempo necesario para que ocurra la diferenciación del promastigote a la forma amastigote, mejor adaptada para la supervivencia en el fagolisosoma (Matheoud *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2014). Las características de las vacuolas formadas durante la internalización de los amastigotes son distintas a las de los promastigotes; en el caso de las vacuolas de amastigotes, ocurre libremente la fusión de los lisosomas con la vacuola parasitófora, ya que estos no se ven afectados por las enzimas lisosomales (Moradin y Descoteaux, 2012; Podinovskaia y Descoteaux, 2015). El hecho de que la forma amastigote resida dentro de un ambiente ácido en la vacuola parasitófora, es consistente con el pH óptimo al cual se llevan a cabo muchos de sus procesos metabólicos (pH 4 – 5,5), como: respiración, catabolismo de sustratos energéticos e incorporación de precursores en macromoléculas, a diferencia de las condiciones de pH neutro requeridas por la forma promastigote (Moradin y Descoteaux, 2012). Sin embargo, tanto el promastigote como el amastigote evitan la exposición a oxidantes, lo cual consiguen a través de la inhibición del ensamblaje de la NADPH oxidasa responsable de su síntesis (Ueno y Wilson, 2012; Moradin y Descoteaux, 2012), proceso en el cual participa además del LPG, la proteína gp63 (Yao *et al.*, 2003).

El desarrollo funcional de los fagosomas es influenciado por los receptores que desencadenan su formación; la internalización de *Leishmania* mediante los receptores CR3 y CR1, inhibe la inflamación, el estallido respiratorio y la acumulación de marcadores lisosomales, creando condiciones “inmunológicamente silenciosas” más favorables para su supervivencia, mientras que la fagocitosis mediada por los FcR conduce a una mayor activación de la NADPH-oxidasa en el recién formado fagosoma (Ueno *et al.*, 2012). Sin embargo, el destino final de la vida intracelular de *Leishmania* dentro del macrófago es determinado por la vía que este tome en el metabolismo de la L-arginina, aminoácido de gran importancia en la regulación de un importante mecanismo efector de los macrófagos. La L-arginina puede ser catabolizada por la enzima iNOS2 para producir NO, o por la arginasa para la síntesis de poliaminas, dependiendo del estímulo de activación. Cuando los macrófagos son expuestos a citoquinas de tipo Th1, como interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), o al lipopolisacárido (LPS), ligando del receptor tipo Toll 4 (TLR4), la expresión de la iNOS es sobre-regulada, conduciendo al metabolismo de la arginina hacia la producción de NO, principal molécula leishmanicida del macrófago (Green *et al.*, 1990; Liew *et al.*, 1991). En cambio, las citoquinas de tipo Th2, como la interleuquina (IL)-4, la IL-10, la IL-13 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), inducen preferiblemente la utilización de la L-arginina para la producción de poliaminas, las cuales son importantes nutrientes requeridos por *Leishmania* para su proliferación (Iniesta *et al.*, 2002; Barksdale *et al.*, 2004; Kane *et al.*, 2001). Estos estados de activación del macrófago, han sido denominados, respectivamente, M1 o “activados de manera clásica” y M2 o “activados de manera alternativa”, y conducen a desenlaces divergentes de la infección (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018). La estrategia asumida por *Leishmania* para su supervivencia en este caso ha sido la regulación de la producción de las citoquinas inductoras del fenotipo M1 por las células dendríticas y linfocitos Th1 o el bloqueo de las vías de señalización de sus

receptores en el macrófago. Luego del establecimiento de la vacuola parasitófora, el macrófago es capaz de cargar ciertos antígenos parasitarios en moléculas del MHC-II. Sin embargo, los amastigotes de *Leishmania* interfieren con el transporte de estas moléculas a la membrana celular, manteniéndolas retenidas en la membrana vacuolar (Antoine *et al.*, 1998), a la vez que las internaliza y degrada dentro de sus megasomas (Antoine *et al.*, 1999). Por otra parte, ha sido demostrado que la invasión silenciosa de los macrófagos por *L. major*, mediada por CR3, conduce al bloqueo selectivo de la cascada de señalización de la IL-12, interfiriendo de esta manera con las señales requeridas para la diferenciación funcional de los linfocitos al fenotipo protector Th1 (Carrera *et al.*, 1996; Sacks y Noben-Trauth, 2002). Por último, factores producidos por *Leishmania* bloquean en distintos puntos las vías de transducción del receptor del IFN- γ en el macrófago (Kima *et al.*, 2007), impidiendo de esta manera que el macrófago pueda ser reconocido y activado por los linfocitos Th1.

Existe una diferencia evidente en la morfología de las vacuolas parasitóforas entre distintas especies de *Leishmania*; *L. mexicana* y *L. amazonensis*, por ejemplo, residen en grandes vacuolas comunales que ocupan una gran proporción del volumen de la célula hospedadora, mientras que otras especies, como *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum*, lo hacen en pequeñas vacuolas individuales (Alexander *et al.*, 1999). Si bien, ha sido sugerido que un tamaño mayor de vacuola sería beneficioso para la dilución de metabolitos tóxicos, aún no ha sido posible establecer de manera definitiva las ventajas que confieren a cada grupo estos comportamientos opuestos para su supervivencia.

Neutrófilos

Los neutrófilos desempeñan un importante, aunque no completamente comprendido, rol en la infección por *Leishmania*. Son las primeras células fagocíticas en migrar rápida y masivamente al sitio de la inoculación, siendo detectadas a partir de los 30 segundos en lesiones experimentales, pero también se observan

tardíamente en lesiones crónicas (Peters *et al.*, 2008). Los neutrófilos son reconocidos por su función antimicrobiana, desempeñando un rol decisivo en la respuesta inmunitaria innata del hospedador (Nauseef, 2014). Durante la fagocitosis, facilitada por opsoninas, extienden pseudópodos que recubren a los microorganismos y los encierran en un fagosoma, el cual se transforma en un fagolisosoma al fusionarse con diferentes gránulos citoplasmáticos (Nauseef, 2014): los primarios o azurófilos, que contienen mieloperoxidasa, defensinas, lisozimas, arginasa I, elastasas y captasinas G; los secundarios o específicos, que contienen lisozimas, lactoferrina, colagenasa y gelatinasa; los terciarios, que contienen gelatinasa y metaloproteinasas de matriz, y las vesículas secretoras (Borregaard *et al.*, 2007). Adicional a esto, ensamblan el complejo NADPH oxidasa en la membrana del fagolisosoma, y producen ROS (Nauseef *et al.*, 2008); este mecanismo en conjunto con la mieloperoxidasa, contenida en los gránulos azurófilos, cataliza la formación de ácido hipocloroso que desempeña un rol crítico en la destrucción de patógenos de forma directa o indirecta (Mayadas *et al.*, 2014). Los neutrófilos, además, pueden producir NO, gracias a la enzima iNOS expresada en sus gránulos azurófilos (Evans *et al.*, 1996). Las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) son un mecanismo microbicida descrito más recientemente en estas células, que consiste en la extrusión de mallas de cromatina, entrelazadas con proteínas de origen nuclear y granular, que inmovilizan microorganismos extracelularmente facilitando su destrucción (Brinkmann *et al.*, 2004). Este proceso ha sido asociado a vías independientes o dependientes de la producción de ROS, así como a la liberación de ADN nuclear o mitocondrial (Nauseef, 2014; Sorensen y Borregaard, 2016).

En 1981, Chang demostró por primera vez la capacidad leishmanicida de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) de hámsters, sobre amastigotes de *L. donovani*. En este trabajo observó la fusión de lisosomas a los fagosomas que contenían los parásitos y detectó la producción de ROS en ellos (Chang *et al.*, 1981). El mismo año se demostró mediante microscopía

electrónica la destrucción intracelular de promastigotes de *L. donovani* por PMN humanos, lo cual fue relacionado con la activación del estallido respiratorio, ya que los PMN de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica eran incapaces de eliminar al parásito (Pearson y Steigbigel, 1981). En ambos casos se infirió un rol protector de estas células, sin embargo, ha sido demostrado que *Leishmania* es capaz de resistir las funciones microbicidas de los neutrófilos mediante distintas estrategias (Regli *et al.*, 2017). *L. major* y *L. donovani* permiten la fusión de los gránulos azurófilos, pero previenen la fusión de los gránulos específicos y de gelatinasa, que contienen la bomba V-ATPasa y el citocromo b. De esta manera evitan la acidificación del fagosoma y la activación de la NADPH oxidasa, con lo cual reducen la acción de las hidrolasas ácidas y las mieloperoxidasas presentes en los gránulos azurófilos (Mollinedo *et al.*, 2010). La forma amastigote de *L. braziliensis* induce la producción de altos niveles de ROS tanto por neutrófilos humanos como murinos, pero estos no afectan su viabilidad (Carlsen *et al.*, 2015; Falcao *et al.*, 2015). Se desconoce el mecanismo específico en cada caso, pero ha sido demostrado que el LPG y la proteína gp63 poseen un efecto inhibitorio sobre el estallido respiratorio de neutrófilos humanos (Brandonisio *et al.*, 1994; Sørensen *et al.*, 1994), y los promastigotes de *L. donovani* expresan una fosfatasa ácida, en su superficie externa, capaz de inhibir la producción de aniones superóxido por los neutrófilos humanos (Remaley *et al.*, 1984). La destrucción por los agentes microbicidas de los neutrófilos, parece ser, como en el caso de los macrófagos, estadio-específica, ya que los promastigotes, pero no los amastigotes, de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* son destruidos intracelularmente por su efecto (Carlsen *et al.*, 2013). Por otra parte, la arginasa I presente en los gránulos azurófilos interfiere con la producción de NO por la iNOS al competir por la L-arginina, sustrato común de ambas enzimas, promoviendo así la supervivencia de los parásitos (Gotoh y Mori, 1999; Iniesta *et al.*, 2001). Aunado a esto, ha sido descrito en el caso de *L. donovani* el traslado de entre 20-25% de los

promastigotes fagocitados a compartimientos no líticos, lo que sugiere la existencia de otras estrategias de evasión menos conocidas (Gueirard *et al.*, 2008). La eficacia de las trampas extracelulares de neutrófilos o NETs contra *Leishmania* depende de la especie del parásito. Las NETs, son un eficaz mecanismo microbicida contra *L. amazonensis* (Guimarães-Costa *et al.*, 2009), pero otras especies han desarrollado variados mecanismos para lograr evadirlas promoviendo su supervivencia; *L. donovani* puede resistir la actividad microbicida de las NETs por el grueso glicocálix que forma su LPG (Gabriel *et al.*, 2010); *L. infantum* es capaz de degradar la estructura de ADN de las NETs mediante la enzima de superficie 3'nucleotidasa/nucleasa (Guimarães-Costa *et al.*, 2014), y tanto *L. infantum* como *L. major* inhiben la producción de las NETs dependientes de ROS al interferir con la producción de estos metabolitos (Guimarães-Costa *et al.*, 2014; Salei *et al.*, 2017). Las observaciones hasta la fecha sugieren que el desenlace de la interacción entre distintas especies de *Leishmania* y los neutrófilos es diverso, y en algunos casos contradictorio.

Los neutrófilos son células de vida media muy corta y ha sido propuesto que *Leishmania* es capaz de alterar su tiempo de vida, ya sea estimulando o inhibiendo la apoptosis de estas células, en su beneficio. Las observaciones hasta la fecha han sido muy variables y parecen depender de la especie del parásito, de la especie del hospedador y del origen de las células. *Leishmania mexicana* no influencia la apoptosis de neutrófilos dérmicos *ex vivo* (Hurrell *et al.*, 2015) y *L. infantum* no induce la apoptosis de los neutrófilos *in vitro* (Marques *et al.*, 2015). Por el contrario, *L. braziliensis* induce la apoptosis de neutrófilos *in vitro* (Falcao *et al.*, 2015), y *L. major* induce la apoptosis de los neutrófilos en la dermis (Peters *et al.*, 2008), pero retrasa la de los neutrófilos derivados de sangre periférica (Sarkar *et al.*, 2013). El efecto anti-apoptótico de *Leishmania major* ha sido asociado al incremento sostenido de las moléculas Bcl-2 and Bfl-1, y de la expresión de FAS, por lo que la infección afecta tanto la vía intrínseca,

como extrínseca de inducción de la apoptosis (Sarkar *et al.*, 2013).

En el año 2004, se demostró que los macrófagos fagocitan ávidamente neutrófilos apoptóticos infectados con *Leishmania major*. Esta forma de internalización induce producción de TGF- β , lo que modula sus funciones microbicidas, favoreciendo la supervivencia del parásito. Esto llevó a proponer que *Leishmania* podría emplear a los PMN como un "caballo de Troya" para ingresar de manera silenciosa a los macrófagos, sus células hospedadoras definitivas, sin ser eliminados (van Zandbergen *et al.*, 2004). Esta observación hizo pensar que *Leishmania* solo usaba al neutrófilo como un refugio transitorio para ganar acceso a su célula blanco definitiva, sin embargo, recientemente se demostró que amastigotes de *L. mexicana* son capaces de replicarse dentro de los fagolisosomas de neutrófilos, lo cual sugiere un rol más activo de este tipo celular en el desarrollo crónico de la enfermedad (Hurrell *et al.*, 2017).

Por último, el subconjunto de neutrófilos con el que interactúan los parásitos puede afectar la respuesta inmune adaptativa; por ejemplo: la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos infectados por las células dendríticas perjudica su maduración y el desarrollo de una respuesta eficiente (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2012), y la fagocitosis de neutrófilos de baja densidad induce la expresión de altos niveles de PDL1, un marcador que promueve el agotamiento de las células T (Sharma *et al.*, 2016). Las evidencias acumuladas hasta la fecha muestran que el desenlace de la internalización de *Leishmania* por los neutrófilos es muy variable, ya que depende de la especie del parásito, de la forma evolutiva y de la sub-población de neutrófilos.

La evidencia apunta a un rol complejo de los neutrófilos en la infección por *Leishmania*, pudiendo en ocasiones destruir eficientemente al parásito, pero en otras ser manipulado por este para servirle de camuflaje en su entrada silenciosa a otras células, o de refugio seguro el tiempo suficiente para permitir su proliferación. Se debe ser cuidadoso en la interpretación de los resultados observados, ya que estas células han mostrado ser una población más heterogénea

de lo que se pensaba (Pillai *et al.*, 2012), por lo que la identificación de marcadores de subpoblaciones permitirá comparar de manera más clara los resultados obtenidos por distintos grupos frente a *Leishmania*.

OBSERVACIONES FINALES

De lo descrito anteriormente, se concluye que para mantener la infección a largo plazo, *Leishmania* debe asegurar su supervivencia dentro del macrófago, su célula hospedadora principal, para lo cual se vale de numerosas estrategias tendientes a: garantizar su entrada silenciosa a estas células (valiéndose en ocasiones de su paso encubierto dentro de los neutrófilos), evitar su destrucción por metabolitos tóxicos y prevenir la presentación de sus antígenos en la membrana celular, que alerten a los linfocitos T de su presencia. Un tercer tipo celular importante en la orquestación del desenlace de la respuesta inmunitaria del hospedador frente a *Leishmania* son las células dendríticas. Estas células fagocíticas/pinocíticas, a diferencia de los macrófagos y neutrófilos, logran internalizar distintas especies del parásito, pero no parecen ser capaces de destruirlo, ni de apoyar su proliferación intracelular (von Stebut y Tenzer, 2018). Sin embargo, ha sido evidenciada la presencia en los ganglios linfáticos de ratones infectados, de células dendríticas portadoras de amastigotes en su interior mucho tiempo después de la cura clínica, por lo que se ha propuesto que actuarían como reservorio de la infección (Moll *et al.*, 1995). Por su capacidad excepcional para presentar antígenos, activar a los linfocitos T vírgenes y dirigir su diferenciación funcional, las células dendríticas son consideradas el puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Varias especies de *Leishmania* emplean estrategias para atenuar la presentación de sus antígenos por estas células luego de su internalización. Pese a esto, en individuos infectados se observan sub-poblaciones de células dendríticas que conservan el control de su maquinaria de presentación de antígenos (probablemente aquellas que han capturado antígenos libres del parásito), lo que explica la generación de linfocitos T

específicos, tanto cooperadores como citotóxicos y supresores, durante la infección (Tiburcio *et al.*, 2019). Sin embargo, el estado funcional de las células dendríticas no escapa de la modulación por el microambiente de citoquinas y quimiocinas propiciado por el parásito, el cual determina su capacidad de activar o no a los macrófagos para la destrucción intracelular del parásito (Sacks y Noben-Trauth, 2002; Tiburcio *et al.*, 2019). Lamentablemente, la gran heterogeneidad, tanto ontogénica como funcional, de esta familia de células ha dificultado armonizar los datos, muchas veces contradictorios, obtenidos por los distintos grupos de investigación (Collin *et al.*, 2018; Tiburcio *et al.*, 2019). La identificación reciente de marcadores moleculares de los distintos sub-grupos de células dendríticas podría contribuir al avance en este sentido (Rhodes *et al.*, 2019; Patente *et al.*, 2019).

Por otra parte, es importante considerar que el amastigote, como parásito intracelular obligatorio, requiere garantizar la provisión de nutrientes necesarios para su desarrollo y replicación dentro de la vacuola parasitófora, para ello recurre al secuestro de los sistemas empleados por la célula hospedadora para su incorporación o generación (Podinovskaia *et al.*, 2015; Young *et al.*, 2019). El establecimiento de *Leishmania* en el hospedador dependerá, por tanto, no solo del éxito de sus mecanismos para evadir la destrucción intracelular, sino de aquellos que le permitan apropiarse de los recursos nutricionales de la célula hospedadora. Aunque se ha progresado mucho en la comprensión general de estos procesos, la completa identificación de las moléculas del parásito y el hospedador involucradas en esta contienda hospedador-parásito será crucial para avance en el desarrollo de estrategias terapéuticas y profilácticas más efectivas contra las leishmaniasis. En este sentido, debido al rápido surgimiento de cepas de *Leishmania* resistentes a los fármacos, ha sido propuesta una nueva aproximación para el diseño de fármacos, basada en la intervención sobre blancos moleculares del hospedador involucrados en la interacción con parásito, mucho

más estables desde el punto de vista evolutivo que los del parásito (Lamotte *et al.*, 2017).

REFERENCIAS

- ANTOINE J.C., LANG T., PRINA E., COURRET N., HELLIO R. (1999). "H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*". *Journal of Cell Science* 112:2559–2570.
- ANTOINE J.C., PRINA E., LANG T., COURRET N. (1998). "The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages". *Trends in Microbiology* 6:392–401.
- BARKSDALE A.R., BERNARD A.C., MALEY M.E., GELLIN G.L., KEARNEY P.A., BOULANGER B.R., TSUEI B.J., OCHOA J.B. (2004). "Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol". *Surgery* 135:527–35.
- BERRY I., BERRANG-FORD L. (2016). "Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis". *Social Science & Medicine* 167:140–149.
- BORREGAARD N., SORENSEN O.E., THEILGAARD-MONCH K. (2007). "Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins". *Trends in Immunology* 28:340–5.
- BRANDONISIO O. PANARO M., MARZIO R., MARANGI A., FALIERO S., JIRILLO E. (1994). "Impairment of the human phagocyte oxidative responses caused by *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG): *In vitro* studies". *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 8:57–62.
- BRINKMANN V., REICHARD U., GOOSMANN C., FAULER B., UHLEMANN Y., WEISS D., WEINRAUCH Y., ZYCHLINSKY A. (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria". *Science* 303:1532–1535.
- BRITTINGHAM A., MOSSER DM. (1996). "Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes". *Parasitology Today* 12:444–447.
- BURZA S., CROFT S.L., BOELAERT M. (2018). "Leishmaniasis". *Lancet* 392:951–970.
- CARRERA L., GAZZINELLI R.T., BADOLATO R., HIENY S., MULLER W., KUHN R., SACKS D.L. (1996). "*Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice". *Journal of Experimental Medicine* 183:515–26.

- CARLSEN E.D., HAY C., HENARD C.A., POPOV V., GARG N.J., SOONG L. (2013). "Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms". *Infection and Immunity* 81:3966–74.
- CARLSEN E., JIE Z., LIANG Y., HENARD C., HAY C., SUN J., DE MATOS GUEDES H., SOONG L. (2015). "Interactions between neutrophils and Leishmania braziliensis amastigotes facilitate cell activation and parasite clearance". *Journal of Innate Immunity* 7:354–363.
- CHANG K. (1981). "Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30:322–33.
- COLLIN M., BIGLEY V. (2018). "Human dendritic cell subsets: an update". *Immunology* 154:3–20.
- DAGGER F., BENGIO C., MARTINEZ A., AYESTA C. (2018). "Leishmania mexicana differentiation involves a selective plasma membrane autophagic-like process". *Cell Stress and Chaperones* 23:783–789.
- DE PABLOS L.M., FERREIRA T.R., WALRAD P.B. (2016). "Developmental differentiation in Leishmania lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra". *Current Opinion in Microbiology* 34:82–89.
- DOMÍNGUEZ M., MORENO I., AIZPURUA C., TORAÑO A. (2003). "Early mechanisms of Leishmania infection in human blood". *Microbes and Infection* 5:507–513.
- EVANS T., BUTTERY L., CARPENTER A., SPRINGALL D., POLAK J., COHEN J. (1996). "Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:9553–9558.
- FALCÃO S.A., WEINKOPFF T., HURRELL B.P., CELES F.S., CURVELO R.P., PRATES D.B., BARRAL A., BORGES V.M., TACCHINI-COTTIER F., DE OLIVEIRA C.I. (2015). "Exposure to Leishmania braziliensis triggers neutrophil activation and apoptosis". *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9:e0003601.
- FEIJÓ D., TIBÚRCIO R., AMPUERO M., BRODSKYN C., TAVARES N. (2016). "Dendritic Cells and Leishmania Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease". *Journal of Immunology Research* 2016:3967436.
- GABRIEL C., MCMASTER W., GIRARD D., DESCOTEAUX A. (2019). "Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps". *Journal of Immunology* 185:4319–27.
- GOTOH T., MORI M. (1999). "Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents no-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells". *Journal of Cell Biology* 144:427–434.
- GREEN S.J., CRAWFORD R.M., HOCKMEYER J.T., MELTZER M.S., NACY C.A. (1990). "Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha". *Journal of Immunology* 145:4290–7.
- GUEIRARD P., LAPLANTE A., RONDEA C., MILON G., DESJARDINS M. (2008). "Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages". *Cellular Microbiology* 10:100–111.
- GUIMARÃES-COSTA A., NASCIMENTO M., FROMENT G., SOARES R., MORGADO F., CONCEIÇÃO F., SARAIVA E. (2009). "Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:6748–6753.
- GUIMARÃES A., DE SOUZA T., PALETTA R., FREITAS A., MEYER J., SARAIVA E. (2014). "3'-nucleotidase/nuclease activity allows Leishmania parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps". *Infection and Immunity* 82:1732–40.
- HERMOSO T., FISHELSON Z., BECKER S.I., HIRSCHBERG K., JAFFE C.L. (1991). "Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system". *EMBO Journal* 10:4061–4067.
- HURRELL B.P., BEAUMANN M., HEYDE S., REGLI I.B., MÜLLER A.J., TACCHINI-COTTIER F. (2017). "Frontline Science: Leishmania mexicana amastigotes can replicate within neutrophils". *Journal of Leukocyte Biology* 102:1187–1198.
- HURRELL B.P., SCHUSTER S., GRUN E., COUTAZ M., WILLIAMS R.A., HELD W., MALISSEN B., MALISSEN M., YOUSEFI S., SIMON H.U., MÜLLER A.J., TACCHINI-COTTIER F. (2015). "Rapid sequestration of Leishmania mexicana by neutrophils contributes to the development of chronic lesion". *PLOS Pathogens* 11:e1004929.
- INIESTA V., GÓMEZ-NIETO L., CORRALIZA I. (2001). "The inhibition of arginase by N (omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages". *Journal of Experimental Medicine* 193:777–784.
- INIESTA V., GOMEZ-NIETO L.C., MOLANO I., MOHEDANO A., CARCELEN J., MIRON C., ALONSO C., CORRALIZA I. (2002). "Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular Leishmania parasites". *Parasite Immunology* 24:113–8.

- KAYE P., SCOTT P. (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface". *Nature Reviews in Microbiology* 9:604-615.
- LAMOTTE S., SPÄTH G.F., RACHIDI N., PRINA E. (2017). "The enemy within: Targeting host-parasite interaction for antileishmanial drug discovery". *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11:e0005480.
- LIEW F.Y., LI Y., MOSS D., PARKINSON C., ROGERS M.V., MONCADA S. (1991). "Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages". *European Journal of Immunology* 21:3009-3014.
- LODGE R., DESCOTEAUX A. (2006). "Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is *Rac1* dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation". *European Journal of Immunology* 36:2735-2744.
- LODGE R., DIALLO T.O., DESCOTEAUX A. (2006). "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane". *Cellular Microbiology* 8:1922-1931.
- MARQUES C.S., PASSERO L.F., VALE-GATO I., RODRIGUES A., RODRIGUES O.R., MARTINS C., CORREIA I., TOMÁS A.M., ALEXANDRE-PIRES G, FERRONHA MH, SANTOS-GOMES GM. (2015). "New insights into neutrophil and *Leishmania infantum* in vitro immune interactions". *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 40:19-29.
- MATHEOUD D., MORADIN N., BELLEMARE-PELLETIER A., SHIO M.T., HONG W.J. OLIVIER M., GAGNON E., DESJARDINS M., DESCOTEAUX D. (2013). "*Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8". *Cell Host & Microbe* 14:15-25.
- MAYADAS T., CULLERE X., LOWELL C. (2014). "The multifaceted functions of neutrophils". *Annual Review of Pathology* 9:181-218.
- MILLER B.H., FRATTI R.A., POSCHET J.F., TIMMINS G.S., MASTER S.S., BURGOS M., MARLETTA M.A., DERETIC V. (2004). "Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection". *Infection and Immunity* 72:2872-2878.
- MITTRA B., ANDREWS N.W. (2013). "IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation". *Trends in Parasitology* 29:489-496.
- MOLL H., FLOHÉ S., RÖLLINGHOFF M. (1995). "Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response". *European Journal of Immunology* 25:693-699.
- MOLLINEDO F., JANSSEN H., DE LA IGLESIA J., VILLA J., CALAFAT J. (2010). "Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils". *Journal of Biological Chemistry* 285:34528-34536.
- MORADIN N., DESCOTEAUX A. (2012). "*Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2:121.
- NAUSEEF W.M. (2008). "Biological roles for the NOX family NADPH oxidases". *Journal of Biological Chemistry* 283:16961-16965.
- NAUSEEF W.M., BORREGAARD N. (2014). "Neutrophils at work". *Nature Immunology* 15:602-611.
- NDJAMEN B., KANG B.H., HATSUZAWA K., KIMA P.E. (2010). "*Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments". *Cellular Microbiology* 12:1480-1494.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2019). "Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas". OPS. Washington, D.C.
- PATENTE T.A., PINHO M.P., OLIVEIRA A.A., EVANGELISTA G.C.M., BERGAMI-SANTOS P.C., BARBUTO J.A.M. (2019). "Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy". *Frontiers in Immunology* 9:3176.
- PEARSON R., STEIGBIGEL R. (1981). "Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes". *Journal of Immunology* 127:1438-1443.
- PETERS N.C., EGEN J.G., SECUNDINO N., DEBRABANT A., KIMBLIN N., KAMHAWI S., LAWYER P., FAY M.P., GERMAIN R.N., SACKS D. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies". *Science* 321:970-974.
- PODINOVSKAIA M., DESCOTEAUX A. (2015). "*Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction". *Future Microbiology* 10:111-129.
- PUENTES S.M., DA SILVA R.P., SACKS D.L., HAMMER C.H., JOINER K.A. (1990). "Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9". *Journal of Immunology* 145:4311-4316.
- REGLI I.B., PASSELLI K., HURRELL B.P., TACCHINI-COTTIER F. (2017). "Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing". *Frontiers in Immunology* 8:1558.
- REMALEY A., KUHNS D., BASFORD R., GLEW R., KAPLAN S. (1984). "*Leishmanial* phosphatase blocks neutrophil O₂

- production". *Journal of Biological Chemistry* 259:11173-11175.
- RHODES J.W., TONG O., HARMAN A.N., TURVILLE S.G. (2019). "Human Dendritic Cell Subsets, Ontogeny, and Impact on HIV Infection". *Frontiers in Immunology* 10:1088.
- RIBEIRO-GOMES F.L., PETERS N.C., DEBRABANT A., SACKS D.L. (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response". *PLOS Pathogens* 8:e1002536.
- RODRIGUEZ P.C., OCHOA A.C., AL-KHAMI A.A. (2017). "Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity". *Frontiers in Immunology* 8:93.
- SACKS D., NOBEN-TRAUTH N. (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice". *Nature Reviews in Immunology* 2:845-858.
- SALEI N., HELLBERG L., KÖHL J., LASKAY T. (2017). "Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells". *PLOS One* 12:e0171850.
- SARKAR A., AGA E., BUSSMEYER U., BHATTACHARYYA A., MOLLER S., HELLBERG L., BEHNEN M., SOLBACH W., LASKAY T. (2013). "Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis". *Medical Microbiology and Immunology* 202:25-35.
- SCHUSTER S., HURRELL B., TACCHINI-COTTIER F. (2012). "Crosstalk between neutrophils and dendritic cells: a context-dependent process". *Journal of Leukocyte Biology* 94:671-675.
- SHARMA S., DAVIS R.E., SRIVASTVA S., NYLEN S., SUNDAR S., WILSON M.E. (2016). "A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis". *Journal of Infectious Diseases* 214:1531-8.
- SØRENSEN A., HEY A., KHARAZMI A. (1994). "*Leishmania major* surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro". *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 102:265-271.
- TIBÚRCIO R., NUNES S., NUNES I., AMPUERO M.R., SILVA I.B., LIMA R., MACHADO TAVARES N., BRODSKYN C. (2019). "Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View". *Frontiers in Immunology* 10:227.
- TURCO S.J., SACKS D.L. (1991). "Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes". *Molecular and Biochemical Parasitology* 45:91-99.
- UENO N., WILSON M.E. (2012). "Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival". *Trends in Parasitology* 28:335-344.
- VAN ZANDBERGEN G., KLINGER M., MUELLER A., DANNENBERG S., GEBERT A., SOLBACH W., LASKAY T. (2004). "Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages". *Journal of Immunology* 173:6521-6525.
- VON STEBUT E., TENZER S. (2018). "Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*". *International Journal of Medical Microbiology* 308:206-214.
- WALKER D.M., OGHUMU S., GUPTA G., MCGWIRE B.S., DREW M.E., SATOSKAR A.R. (2014). "Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites". *Cellular and Molecular Life Sciences* 71:1245-1263.
- WANASEN N., SOONG L. (2008). "L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection". *Immunologic Research* 41:15-25.
- WHO EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASES & WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2010). "Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis". World Health Organization. Geneva.
- YAO C., DONELSON J.E., WILSON M.E. (2003). "The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function". *Molecular and Biochemical Parasitology* 132:1-16.
- YOUNG J., KIMA P.E. (2019). "The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface". *Yale Journal of Biology and Medicine* 92:511-521.