



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Postgrado de Biología Celular

Tesis Doctoral

**Caracterización funcional y molecular parcial de
un sistema *in vitro* de co-infección
Leishmania/VIH**

Dr. Hector Rangel
Dra. Mariana Hidalgo
Tutores

Caracas, Diciembre 2017



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Postgrado de Biología Celular

Tesis Doctoral

**Caracterización funcional y molecular parcial de
un sistema *in vitro* de co-infección
Leishmania/VIH**

Tesis Doctoral presentada por el Lic. **Semer Maksoud Maksoud** ante la ilustre Universidad Central de Venezuela como requisito para optar al título de Doctor en Ciencias, Mención Biología Celular.

Caracas, Diciembre 2017



Comisión de Estudios de Postgrado

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ACTA DE
DEFENSA TESIS DOCTORAL

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: Semer Maksoud Maksoud portador de la cédula de identidad N° 19.255.409, bajo el título "**Caracterización funcional y molecular parcial de un sistema *in vitro* de co-infección *Leishmania*/VIH**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Doctor en Ciencias Mención Biología Celular**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 13 de julio de 2018 a las 9:30 am, para que Semer Maksoud Maksoud lo defendiera en forma pública, lo que hizo en la Sala Werner Jaffe del Instituto de Biología Experimental, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por Semer Maksoud Maksoud, que dicho trabajo se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado contribuye al conocimiento de aspectos fisiológicos e inmunológicos en el estudio de la coinfección entre el virus VIH y el parásito *Leishmania*.



3.- El jurado por unanimidad otorga la mención **EXCELENTE** al trabajo tomando en cuenta que el mismo desarrolla un modelo *in vitro* novedoso para el estudio de la coinfección VIH- *Leishmania*, donde se muestra un conjunto de variables inmunológicas importantes que a futuro pueden correlacionarse y establecerse nuevas aproximaciones terapéuticas.

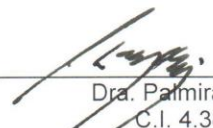
Se resalta la independencia e iniciativa de Semer Maksoud Maksoud en el desarrollo, elaboración experimental e interpretación del trabajo.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 13 días del mes de julio del año 2018. Conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuaron como miembros del jurado Dr. Alexis Mendoza-León (UCV); Dra. Palmira Guevara (UCV) Dr. Juan de Sanctis (UCV) y Dr. Iván Galindo (IDEA). El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Héctor Rangel (IVIC) y Dra. Mariana Hidalgo (IVIC).



Dr. Alexis Mendoza-León,
C.I. 3.968.800

Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



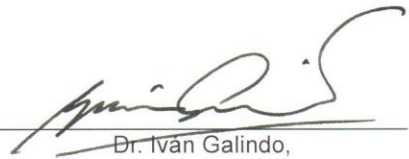
Dra. Palmira Guevara,
C.I. 4.387.343

Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



Dr. Juan de Sanctis,
C.I. 5.532.797

Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Dr. Iván Galindo,
C.I. 6.374.711

Fundacion IDEA
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Dr. Héctor Rangel,
C.I. 9.418.210

Instituto Venezolano de Investigaciones
Científicas (IVIC)
Tutor



Dra. Mariana Hidalgo
C.I. 15.581.697

Instituto Venezolano de Investigaciones
Científicas (IVIC)
Tutor



Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2-17
1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana.....	2-3
1.1.1. Ciclo de vida del VIH.....	4-5
1.1.2. Transmisión e infección del VIH.....	5-6
1.1.3. Los sincitios.....	7-8
1.1.4. Respuesta inmune a VIH.....	8-10
1.2. El parásito <i>Leishmania</i>	10-11
1.2.1. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.....	11-13
1.2.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	13-14
1.2.3. Respuesta inmune a <i>Leishmania</i>	14-17
2. Antecedentes.....	17-18
2.1. Epidemiología de la co-infección <i>Leishmania</i> /VIH.....	18-21
2.1.1. Co-infección <i>Leishmania</i> /VIH en Venezuela.....	21-23
2.2. Inmunopatogénesis de la co-infección <i>Leishmania</i> /VIH.....	23-29
2.3. Respuesta inmune humoral y celular.....	29-30
en las co-infecciones <i>Leishmania</i> /VIH.	
2.4. Efecto de las citoquinas en la patogénesis.....	30-34
de las co-infecciones <i>Leishmania</i> /VIH.	
3. Justificación.....	34
4. Objetivos.....	35
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
5. Metodología.....	35
5.1. Cultivo de células.....	35-36
5.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	36
5.3. Obtención del VIH AZT-resistente.....	36
5.4. Determinación de la viabilidad de células incubadas.....	37
con <i>L. donovani</i> y VIH.	
5.5. Evaluación de la formación de sincitios en células.....	37
expuestas a <i>L. donovani</i> y VIH.	
5.6. Cuantificación de la producción del antígeno p24.....	38
en células incubadas con <i>L. donovani</i> y VIH.	
5.7. Valoración del impacto del VIH sobre la infectividad.....	38-39
y replicación intracelular de <i>L. donovani</i> en monocitos primarios.	
5.8. Evaluación del efecto del sobrenadante de cultivos.....	39
de linfocitos T infectados con el VIH sobre la replicación de <i>L. donovani</i> .	
5.9. Determinación de la expresión de superficie.....	40
de los receptores CXCR4 y CCR5 en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
5.10. Estimación de la activación del NFκB.....	40-41
en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
5.11. Análisis del perfil de citoquinas/quimioquinas.....	41
en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
6. Resultados.....	42-56

6.1. Viabilidad de linfocitos MT-4 y monocitos primarios.....	42-43
expuestos simultáneamente a <i>L. donovani</i> y VIH.	
6.2. Variaciones inducidas por <i>L. donovani</i> sobre la formación.....	44-45
de sincitios generados por la infección viral en los linfocitos MT-4.	
6.3. Efecto de <i>L. donovani</i> sobre la replicación del VIH.....	45-46
en linfocitos MT-4 y monocitos primarios.	
6.4. Efecto del VIH sobre la replicación e infectividad de <i>L. donovani</i>	46-48
6.5. Expresión de los receptores de superficie CXCR4 y CCR5.....	49-50
tras la exposición de linfocitos T y monocitos primarios a <i>L. donovani</i> y VIH.	
6.6. Activación del NF- κ B en linfocitos T y monocitos primarios.....	50-52
incubados con <i>L. donovani</i> y VIH.	
6.7. Variaciones del perfil de citoquinas/quimioquinas.....	52-56
en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
7. Discusión.....	56-104
8. Conclusiones.....	104-105
9. Bibliografía.....	105-136

Índice de figuras.

Figura 1: Organización genómica del VIH-1.....	3
Figura 2: Estructura proteica del VIH.....	3
Figura 3: Visión esquemática del ciclo de replicación del VIH-1.....	5
Figura 4: Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.....	12
Figura 5: Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i>	14
Figura 6: Distribución global de los casos reportados.....	19
de leishmaniasis y co-infección <i>Leishmania</i> /VIH para los años 1990-1998.	
Figura 7: Distribución geográfica de la incidencia de co-infección.....	22
<i>Leishmania</i> /VIH en Venezuela.	
Figura 8: Impacto de la presencia simultánea de <i>L. donovani</i> y VIH.....	43
sobre la viabilidad celular.	
Figura 9: Variaciones impulsadas por <i>L. donovani</i> sobre la formación.....	44
de sincitios inducidos por el VIH.	
Figura 10: Efecto de <i>L. donovani</i> sobre la producción de la proteína viral p24.....	45
Figura 11: Variación de la replicación e infectividad parasitaria monocítica.....	47
impulsada por el VIH.	
Figura 12: Efecto del sobrenadante de cultivos de linfocitos MT-4 infectados.....	48
con el VIH sobre la proliferación de <i>L. donovani</i> .	
Figura 13: Expresión de los receptores CXCR4 y CCR5.....	49
en la co-incubación/co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Figura 14: Activación del NF- κ B en la co-incubación/co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.....	51
Figura 15: Secreción de citoquinas pro-inflamatorias en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.....	53
Figura 16: Secreción de citoquinas anti-inflamatorias en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.....	54
Figura 17: Secreción de quimioquinas en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.....	55

Índice de tablas.

Tabla I: Tratamientos desarrollados para la determinación.....	37
de la viabilidad celular en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Tabla II: Condiciones experimentales empleadas para la evaluación.....	37
de la formación de sincitios en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Tabla III: Procesos experimentales para la cuantificación de la producción.....	38
del antígeno p24 en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Tabla IV: Ensayos experimentales para el estudio del impacto.....	39
de la infección viral sobre la infectividad parasitaria monocítica.	
Tabla V: Tratamientos incluidos para la evaluación de la replicación parasitaria.....	39
en sobrenadantes de cultivos de linfocitos MT-4 infectados con el virus.	
Tabla VI: Experimentos para la determinación de la expresión de receptores.....	40
de entrada viral en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Tabla VII: Tratamientos realizados para la estimación de la activación.....	41
del NF- κ B en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	
Tabla VIII: Pruebas experimentales para el análisis del perfil de.....	41
citoquinas/quimioquinas en la co-infección <i>L. donovani</i> /VIH.	

Listado de abreviaturas.

CCR5: co-receptor de quimioquina- β de tipo 5.
CD: célula dendrítica.
CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades.
cGAS: sintasa GMP-AMP cíclica.
CPA: célula presentadora de antígeno.
CPH: Complejo Principal de Histocompatibilidad.
CXCR4: co-receptor de quimioquina- α de tipo 4.
DC-SIGN: DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin.
EBV: virus Epstein-Barr.
Env: envoltura.
HLA-G: antígeno leucocitario humano G.
HRP: peroxidasa de rábano.
HTLV: virus T-linfotrópico humano.
IFAT: Indirect Fluorescent Antibody Technique.
IFI16: proteína inducible por interferón 16
IFN- γ : interferón-gamma.
Ig: inmunoglobulina.
I κ B: inhibidor del factor de transcripción NF κ B.
IL: interleukina.
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.
IVDUs: intravenous drug users.
KIRs: receptores aniquiladores semejantes a inmunoglobulina.
LC: leishmaniasis cutánea.
LCD: leishmaniasis cutánea difusa.
LCI: leishmaniasis cutánea intermedia.
LM: leishmaniasis mucocutánea.
LNM: leishmaniasis del Nuevo Mundo.
LPG: lipofosfoglicano.
LTRs: repeticiones terminales largas.
LV: leishmaniasis visceral.
LVM: leishmaniasis del Viejo Mundo.
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1.
MDMs: macrófagos derivados de monocitos.
MFI: media de la intensidad de la fluorescencia.
MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1- α .
NA: neuraminidasa.
NK: natural killer.
NO: óxido nítrico.
PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos.
PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.
PHA: fitohaemaglutinina.
PI: fosfatidilinositol.
PIC: complejo de pre-integración.
PKC: proteína quinasa C.
PKR: proteína quinasa R.
PRRs: receptores de reconocimiento de patógenos.
RANTES: regulated upon activation normal T cell expressed and secreted.
RNI: intermediarios reactivos de nitrógeno.
ROI/ROS: intermediarios reactivos de oxígeno/especies reactivas de oxígeno.
RPMI: Roswell Park Memorial Institute.
SAIB: Servicio de Leishmaniasis del S.A. Instituto de Biomedicina.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
SDF-1: factor derivado del estroma 1.
SFBi: suero fetal bovino inactivado.
SI: inductor de sincitios.
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SRDS: Servicios Regionales de Dermatología Sanitaria.
Tat: proteína de transactivación del VIH.
TGF- β : factor de crecimiento transformante β .
TLRs: receptores toll-like.
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
Treg: células T reguladoras.

Agradecimientos

- A mis padres y hermanos por su constante ayuda y apoyo en mis años de carrera.
- A los Dres. Mariana Hidalgo, Flor Pujol y Hector Rangel por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme apoyo y consejo durante la investigación.
- Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por permitirme realizar la Tesis de Doctorado en sus instalaciones.
- A todo el personal del Laboratorio de Virología Molecular (IVIC), Laboratorio de Inmunoparasitología (IVIC), Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos (Instituto de Estudios Avanzados, IDEA) y Laboratorio de Biología Celular de Parásitos (Instituto de Biología Experimental, IBE) por su invaluable ayuda.
- A todo el personal docente involucrado en mi formación académica durante la licenciatura y el doctorado.

Palabras Claves. VIH. *Leishmania*. Linfocitos T. Monocitos. PBMCs. Sincitios. CXCR4. CCR5. NF- κ B. IL-1 α . IL-4. IL-5. IL-6. IL-10. IL-12. IFN- γ . TNF- α . TGF- β . MCP-1. MIP-1 α . RANTES. Co-infección.

Resumen

La infección por VIH causa un debilitamiento progresivo del sistema inmunitario al infectar y destruir células involucradas en las defensas del hospedero tales como linfocitos T, monocitos/macrófagos y células dendríticas. Los síntomas de la infección viral se generan y agravan a medida que la inmunosupresión progresa, disparándose por la presencia de infecciones oportunistas que el sistema inmune normalmente pudiera combatir. Entre estas infecciones oportunistas se encuentra la leishmaniasis, una enfermedad tropical causada por un parásito intracelular del género *Leishmania*, transmitido a través de la mosca de arena. La presentación clínica de la leishmaniasis es dependiente de la especie que infecta, el vector, el estado inmune, edad, estatus nutricional, sitio de inoculación y factores genéticos asociados al hospedero.

Leishmania y VIH infectan monocitos/macrófagos y células dendríticas. La infección viral induce la pérdida de la inmunidad protectora, favoreciéndose la multiplicación no controlada de los parásitos, mientras que la co-infección con el parásito de células que están infectadas con el VIH provocaría un incremento de la expresión genética viral. Podríamos resumir la co-infección *Leishmania*/VIH como un sistema que comprende modulaciones de la expresión de moléculas de superficie celular, producción de factores solubles y actividades de muerte intracelular que finalmente conducen a la potenciación de la infectividad, replicación y propagación de ambos patógenos.

En Venezuela, al igual que el resto del Mundo, la incidencia de las co-infecciones *Leishmania*/VIH crece lenta y progresivamente. Las distribuciones geográficas del virus y parásito se solapan. Además, existen factores que contribuyen a la diseminación de los patógenos a nuevas áreas, aumentando el número de localidades donde probablemente se establezcan co-infecciones. La co-infección con el VIH puede exacerbar la leishmaniasis al impulsar la diseminación parasitaria, localización atípica, manifestaciones clínicas más severas e inusuales, retraso de la sanación, pobre respuesta al tratamiento y recurrencias más frecuentes de la enfermedad. Asimismo, la co-infección con *Leishmania* resulta en una elevación de la viremia, aumento de la seroconversión, mayor reducción del conteo de linfocitos T CD4⁺ y progresión más acelerada a la etapa del SIDA.

En la actualidad son muy pocas las investigaciones que analizan la co-infección *Leishmania*/VIH. Nuestro grupo de investigación se enfocó en los aspectos funcionales y moleculares de un sistema de co-infección *L. donovani*/VIH *in vitro*, permitiéndonos identificar diferentes moléculas participantes en el sistema. Demostramos que durante la co-infección hay un incremento en la activación del NF- κ B y cambios en la expresión de superficie de CXCR4 y CCR5 en linfocitos T y monocitos primarios que favorecerían la infectividad viral. Adicionalmente, revelamos el perfil de 12 citoquinas/quimioquinas secretadas durante la co-infección, evidenciándose en esencia un cambio Th1→Th2 en la respuesta inmune. Dichas modulaciones a nivel molecular serían las responsables de las variaciones apreciadas a nivel funcional sobre los elementos participantes en la co-infección: la potenciación de la replicación e infectividad parasitaria y viral, la amplificación en la inducción de sincitios y las alteraciones de la viabilidad celular. Nuestro objetivo fue alcanzar un mayor nivel de comprensión del sistema de co-infección *Leishmania*/VIH, con la finalidad de desarrollar eventualmente drogas terapéuticas.

1. Introducción.

1.1. El virus de la inmunodeficiencia humana.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) fue reconocido como el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) hace más de 30 años. Desde entonces, el SIDA ha cobrado la vida de más de 30 millones de personas. Aunque el número de muertes relacionadas al SIDA ha caído de 2.2 millones/año a 1.1 millones/año, la epidemia continúa teniendo un efecto sustancial en ciertos países y grupos de riesgo (UNAIDS, 2016).

Según datos de UNAIDS, a nivel mundial, hubo un estimado de 36.7 millones de personas que vivían con el VIH para el año 2016, reportándose aproximadamente 2.1 millones de nuevos casos de infección en el 2015. Actualmente, el número estimado de nuevas infecciones con el VIH es significativamente menor (15-20%) en comparación a los inicios del milenio, debido principalmente a los avances que se han realizado en el tratamiento antiretroviral y las campañas de prevención (CDC, 2012; UNAIDS, 2016).

El VIH infecta células en el sistema inmune y el sistema nervioso central. Por ejemplo, el VIH es capaz de infectar las células T CD4⁺; éstas juegan un papel esencial en la coordinación de las acciones de otras células del sistema inmune para combatir infecciones (Abbas y col., 2009). Una reducción significativa del conteo de células T debilita seriamente el sistema inmune. Varios médicos constataron hace varias décadas que el SIDA es una enfermedad más letal en comparación a inmunodeficiencias asociadas con otras infecciones virales, bacterianas o fúngicas, enfermedades autoinmunes y perturbaciones endocrinas (McElrath y Haynes, 2010).

El VIH es un miembro del género *Lentivirus*, perteneciente a la familia *Retroviridae*. Existen varios grupos de lentivirus capaces de infectar a varios tipos de hospederos: por ejemplo, caballos, primates, ovejas, humanos, entre otros. Estos virus están caracterizados por un período de latencia largo y una infección progresiva, donde el virus evade la respuesta inmune del hospedero. Los lentivirus insertan la información genética en el ADN de la célula hospedera y tienen la habilidad única de replicarse en células que no están en división (Douek y col., 2009).

La forma integrada del VIH-1, también conocida como provirus, es de aproximadamente 9.8kpb en longitud. El genoma consiste de dos hebras idénticas de ARN de cadena sencilla y sentido positivo que se asocian estrechamente con las enzimas transcriptasa reversa e integrasa y con la nucleocápside, la cual protege al ARN de ser degradado por endonucleasas. El genoma está rodeado por una cápside cónica y una matriz formadas por las proteínas p24 y p17, respectivamente. La envoltura viral es la capa externa del virión y está formada por una bicapa

lipídica derivada de la célula hospedera. Ambas terminaciones del material genético, los extremos 5' y 3', están flanqueadas por secuencias repetidas denominadas “repeticiones terminales largas” (LTRs), las cuales son necesarias para el inicio y terminación de la transcripción, integración y unión de la proteína transactivadora transcripcional (Tat). El genoma del VIH-1 está organizado eficientemente, con varios marcos de lectura que permiten el solapamiento de genes en la secuencia nucleotídica (Fig.1) (Emerman, 1996).

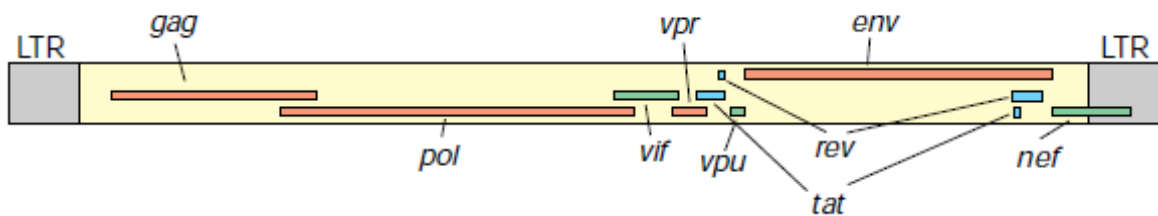


Figura 1: Organización genómica del VIH-1. Los marcos abiertos de lectura que codifican las proteínas que son eficientemente incorporadas en los viriones están señalados en color naranja, aquellos que codifican proteínas regulatorias están indicados en color azul mientras que el color verde representa la codificación de proteínas accesorias. (Emerman, 1996).

Los genes del VIH están localizados en la región central del ADN proviral y codifican nueve proteínas. Las proteínas del VIH están divididas en tres clases (Fig.2):

- 1- Las proteínas estructurales Gag, Pol y Env (gp120 y gp41).
- 2- Las proteínas regulatorias Tat y Rev.
- 3- Las proteínas accesorias Vpu, Vpr, Vif y Nef.

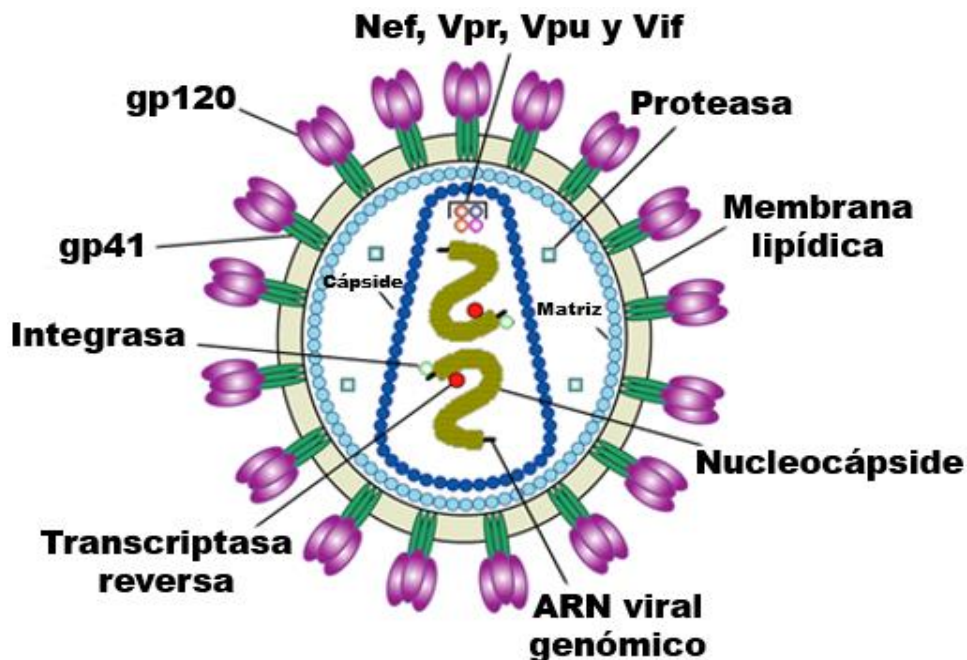


Figura 2: Estructura proteica del VIH. En el esquema se ilustran las proteínas que forman parte de la partícula viral¹.

1.1.1. Ciclo de vida del VIH.

El ciclo de vida del VIH es un proceso complejo que abarca ocho etapas principales (*Fig.3*): (i) reconocimiento y unión a la célula hospedera, (ii) fusión del virus con dicha célula (iii) transcripción reversa del genoma viral, (iv) integración al genoma del hospedador, (v) generación de copias del virus, (vi) ensamblaje del virión, (vii) abandono de la célula hospedera y (viii) maduración viral.

La interacción inicial del virus y los receptores CD4 de la célula blanco ocurre a través de la proteína gp120, promoviéndose la interacción posterior con los co-receptores en la superficie celular, lo que permitirá la exposición de las moléculas gp41 embebidas en la envoltura viral. Las interacciones con los receptores disparan cambios conformacionales en las proteínas de la envoltura viral, lo que a su vez conduce a la fusión de la bicapa lipídica del virus y la célula (*Goto y col., 1998*). A medida que la cápside del VIH penetra la célula, las proteínas de la matriz y la cápside en el virus se desensamblan, liberando proteínas virales y ARN en el citoplasma de la célula. Usando los nucleótidos del hospedero, la enzima transcriptasa reversa del VIH transforma el ARN viral en ADN de cadena sencilla que es nuevamente transcrito y sintetizado como una molécula de doble cadena. Durante el proceso de transcripción reversa ocurren errores al azar muy comunes debido a la ausencia de actividad correctora de la enzima (*Freed, 1998*).

Durante el proceso de integración, el ADN proviral se somete a cambios estructurales complejos antes de ganar acceso al núcleo de la célula infectada. La enzima integrasa conduce al ADN de doble cadena viral a través de un poro nuclear hacia el interior del núcleo. Dentro de éste la integrasa halla el cromosoma del hospedero y realiza una “mella” en el ADN, permitiendo la inserción del ADN viral en dicho cromosoma. El ADN viral integrado puede replicarse o transcribirse usando la maquinaria proteica de la célula hospedera. El proceso de transcripción resultará en la producción de moléculas de ARNm viral que funcionarán como templatado para la síntesis de proteínas virales tras su asociación a ribosomas localizados en la superficie del retículo endoplasmático rugoso (*Engelman y col., 1991*).

Luego, durante el ensamblaje, grupos de proteínas virales son colectados y desplazados hacia la superficie celular como un virus no formado. En general, el ensamblaje (i) minimiza el número de proteínas que son fijadas hacia la membrana plasmática, (ii) regula la morfogénesis de las partículas virales, (iii) condiciona las proporciones entre las proteínas estructurales y (iv) posiciona dichas proteínas en la partícula viral (*Sundquist y Kräusslich, 2012*). Cuando el virus inmaduro se ha ensamblado en la superficie celular, abandona la célula. Finalmente, la proteasa del

VIH escinde las cadenas multiproteicas virales a sus respectivos tamaños, lográndose la maduración funcional y morfológica del virión. El VIH maduro ahora está listo para infectar otra célula (Briggs y col., 2009).

El VIH puede infectar un número de células del sistema inmune, incluyendo las células T CD4⁺, monocitos/macrófagos y células de la microglía. El término “tropismo viral” hace referencia a la categorización de las cepas del VIH por el tipo de células que éstas infectan. Las cepas M-trópicas se replican en monocitos y macrófagos y utilizan el co-receptor de quimioquina-β de tipo 5 (CCR5) para la entrada. Las cepas T-trópicas se replican en las células T CD4⁺ y precisan del co-receptor de quimioquina-α de tipo 4 (CXCR4) para penetrar la célula (Coakley y col., 2005).

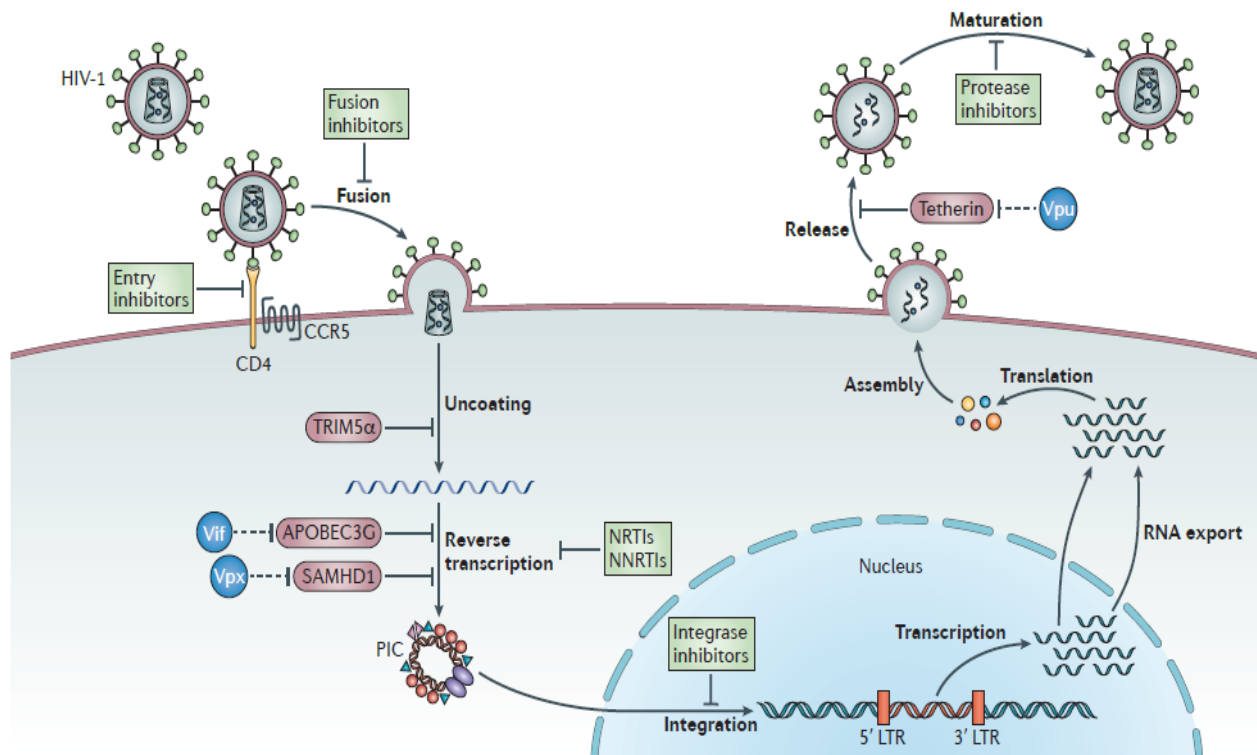


Figura 3: Visión esquemática del ciclo de replicación del VIH-1. La figura ilustra los pasos principales del ciclo de replicación del virus: unión al receptor CD4 y co-receptores, fusión con la membrana de la célula hospedera, apertura de la cápside viral, liberación del ARN y las proteínas virales al citoplasma, transcripción reversa del material genético, formación del complejo de pre-integración (PIC) y translocación al núcleo, integración del ADN viral, transcripción y síntesis de proteínas virales y ARN, ensamblaje, liberación y maduración del virión (Barré-Sinoussi y col., 2013).

1.1.2. Transmisión e infección del VIH.

El VIH es transmitido desde una persona infectada hacia un sujeto sano a través de la sangre, el semen, los fluidos vaginales y la leche de las mamas. El VIH puede entrar al cuerpo

humano mediante un contacto directo con la corriente sanguínea o atravesando membranas mucosas delicadas, como aquellas presentes en el recto, vagina o la uretra. Así pues, un individuo sano puede infectarse con el VIH a través de relaciones sexuales, el uso compartido de jeringas con sujetos infectados, transfusiones de sangre, trasplante de órganos provenientes de personas infectadas e incluso se ha reportado la transmisión vertical del virus ya sea durante el embarazo, parto o a través de la lactancia materna. El VIH no sobrevive mucho tiempo fuera del cuerpo humano y no puede ser transmitido a través de las lágrimas o el sudor. Se ha demostrado que la saliva contiene partículas virales; no obstante, el virus suele estar presente en cantidades limitadas y nunca se ha demostrado que la saliva sea una ruta directa para la infección viral (*CDC, 2012*).

La infección por VIH ocurre en 4 etapas: infección primaria, estadio clínicamente asintomático, infección sintomática y progresión al SIDA. La primera etapa de la infección normalmente dura unas pocas semanas; la persona infectada podría no experimentar síntomas o presentar síntomas similares a los de una gripe breve. Usualmente, durante este tiempo hay una considerable cantidad de virus circulando en la sangre periférica de la persona. El sistema inmune comienza a responder al virus generando anticuerpos y linfocitos T citotóxicos (*Moss, 2013*).

El período asintomático clínico tiene un promedio de duración de 10 años. Muchos de los síntomas están ausentes, aunque una persona infectada podría presentar glándulas inflamadas. Los niveles del VIH en la sangre periférica disminuyen. Estudios han mostrado que el VIH en esta etapa no está inactivo y se encuentra replicándose en los ganglios linfáticos. Cuando el conteo de linfocitos T CD4⁺ decrece, ubicándose por debajo de los niveles estándar de 500-2000 células/ μ L de sangre, el individuo suele exhibir inflamación de las glándulas linfáticas y varios problemas de piel como la psoriasis, herpes y algunos derivados de otros tipos de infecciones (*Moss, 2013*).

Tras un período asintomático prolongado, la infección viral comienza a ser sintomática. Los síntomas aparecen y se agravan a medida que el sistema inmune del sujeto se deteriora. Esto ocurre por varias razones incluyendo daño excesivo a los tejidos y ganglios linfáticos, mutación viral, destrucción aumentada y reemplazo reducido de las células T. Cuando el conteo de los linfocitos T CD4⁺ se reduce a menos de 200 células/ μ L de sangre, la infección sintomática viral se dispara por la presencia de infecciones oportunistas que el sistema inmune normalmente pudiera prevenir. Las infecciones oportunistas generalmente provocan neumonía, diarrea, infección ocular y meningitis; los agentes causantes de estas infecciones están representados por los diversos microorganismos patógenos presentes en el ambiente, como lo pudieran ser los parásitos del género *Leishmania* (*Grossman y col., 2006*).

1.1.3. Los sincitios.

La fusión célula-célula es una forma de organización celular que ocurre en condiciones fisiológicas y patológicas tales como la formación del músculo, placenta, reparación de órganos por células madres y transformación maligna. La íntima asociación entre células pertenecientes al mismo linaje, formando los llamados “sincitios”, podría resultar en una sincronización altamente funcional y eficiente con el objetivo de lograr tareas complejas, derivando incluso en un fenotipo alterado. Podemos definir a los sincitios como células gigantes multinucleadas generadas por eventos de fusión celular (*Huerta y col., 2009*).

Varios virus, incluyendo el VIH, poseen glicoproteínas que interactúan con receptores presentes en la superficie de células blanco, induciendo la fusión virus-célula. Las células infectadas sintetizan y luego exponen las proteínas de fusión viral en sus membranas, confiriendo a dichas células la habilidad de fusionarse con aquellas no infectadas. Entre los virus que inducen la fusión célula-célula se encuentran algunos responsables de determinadas enfermedades humanas, tales como la familia Herpesviridae (virus del herpes, citomegalovirus, varicela zóster y Epstein-Barr), Paramyxoviridae (virus sincitial respiratorio y sarampión) y Retroviridae (VIH y HTLV). Generalmente, se ha asumido que la capacidad de inducir los sincitios es un indicativo de la habilidad de los virus de ser transmitidos a través de una vía célula-célula, sin la exposición al medio extracelular, permitiendo propagarse rápidamente y evadiendo así la respuesta inmune del hospedero (*Sattentau, 2008*). De hecho, varios reportes señalan que la detección de variantes virales con la habilidad de inducir sincitios en cultivos de linfocitos T se correlaciona con una mayor reducción del conteo de células T CD4⁺ y progresión más acelerada al SIDA (*Connor y col., 1993; Miedema y col., 1994; Blaak y col., 2000*).

Las moléculas de adhesión y las proteínas de fusión son usadas por los virus para superar la barrera electrostática formada por la superficie cargada negativamente de las membranas celulares. La fusión celular requiere la aposición cercana de la superficie de las membranas celulares, la inducción de perturbaciones lipídicas y la formación de poros de fusión que eventualmente se expanden y generan una completa fusión célula-célula (*Chernomordik y Kozlov, 2008*). La fusión requiere una secuencia de cambios conformacionales complejos que involucran la interacción específica de Env, expresada en la superficie de una célula infectada, con la molécula CD4 y un co-receptor perteneciente a la familia de receptores de quimioquinas presentes en la superficie de una célula no infectada (*Chen y Olson, 2005*).

La formación de los sincitios, provocada por la interacción Env-CD4, conduce a la apoptosis. Se ha establecido una correlación positiva entre la disminución del conteo de células T CD4⁺ y la infección por variantes inductoras de sincitios *in vitro* (Sylwester y col., 1997; Scheller y Jassoy, 2001), y más importante *in vivo*, en humanos con SIDA (Blaak y col., 2000; Maas y col., 2000). Se han estudiado varios modelos de apoptosis sincitial, provocado por un proceso secuencial, usualmente afectando el 50% de los sincitios a 36-48h tras su formación, donde p53 emerge como mediador crítico del proceso (Nardacci y col., 2015).

1.1.4. Respuesta inmune a VIH.

A diferencia del brazo adaptativo del sistema inmune, el cual usa receptores específicos de antígeno para reconocer antígenos foráneos, el sistema inmune innato emplea un conjunto de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs) que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Dichos patrones están representados por estructuras lipídicas, oligosacarídicas y/o proteicas exclusivas de los patógenos. La activación de diferentes combinaciones de estos receptores, en distintos subconjuntos celulares del sistema inmune innato, resulta en la inducción de distintos procesos inflamatorios que promueven la creación de un ambiente antiviral no específico a través de la liberación de citoquinas que bloquean la replicación viral, la activación/reclutamiento de otras células del sistema inmune y la estimulación de la respuesta inmune adaptativa (Abbas y col., 2009).

Varias investigaciones muestran que la presencia del VIH es detectada en células infectadas mediante el reconocimiento de productos de la transcriptasa reversa viral en la etapa temprana del ciclo de replicación del virus a través de al menos dos PRRs intracelulares, la proteína inducible por interferón 16 (IFI16) y la sintasa GMP-AMP cíclica (cGAS). IFI16 y cGAS pueden reconocer y unirse al ADN viral citoplasmático cuando no se encuentra protegido por chaperonas o la cápside viral. Luego, IFI16 se asocia a la proteína adaptadora STING (estimulador de genes de interferon) mientras que cGAS genera el segundo mensajero cGAMP que interactúa con dicha proteína. STING es activada y recluta co-factores de señalización como TBK1 e IKK- α/β que a su vez activan a los factores de transcripción IRF3 y NF- κ B, induciéndose la expresión de la IL-1, interferones de tipo I, citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y factores de restricción viral tales como SAMHD1 o APOBEC3G, inducidos por IRF3 (Orzalli y col., 2012; Wu y col., 2013).

Los receptores tipo toll (TLRs) son PRRs asociados a membrana, presentes en la superficie celular o endosomas, que reconocen diferentes PAMPs. La glicoproteína de envoltura viral gp120 puede ser reconocida por TLR2 y TLR4 en la superficie de células epiteliales de la mucosa; aunque

estas células no son blancos de infección viral, la interacción gp120-TLR inicia eventos de señalización que promueven la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas que reclutan y activan células inmunes innatas cercanas (*Nazli y col., 2013*). Adicionalmente, el ARN genómico viral puede ser detectado por TLR7 y TLR8 endosomal, los cuales activan y programan a las células dendríticas (CDs) y células mieloides específicas, respectivamente, a responder a la infección con VIH (*Schlaepfer y col., 2006*). RIG-I también reconoce el ARN genómico viral e induce la señalización inmune innata en células infectadas (*Wang y col., 2013*). Durante la etapa tardía del ciclo de replicación del VIH los nuevos viriones generados están preparados para abandonar la célula: como resultado de la señalización temprana de los PRRs, la activación inmune innata produce un ambiente local rico en interferones y otras citoquinas que inducen la expresión de productos proteicos antivirales. La teterina (BST-2/CD137) es uno de esos productos inducidos por interferón que bloquea la liberación de las nuevas partículas virales formadas, impidiendo la propagación de la infección (*Neil y col., 2008*). La teterina incluso actúa como PRR e inicia una cascada de señalización intracelular que activa a NF- κ B e induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias (*Hotter y col., 2013*).

Entre las células del sistema inmune innato involucradas en el control temprano del VIH, las evidencias apuntan a un rol central de las células NK (*natural killer*). Varias citoquinas producidas durante la fase inicial de la infección con VIH, tras la acción de los PRRs, tales como IL-2, IL-12 e IL-15 funcionan como potentes activadores de las células NK (*Stacey y col., 2009*). Aunque dichas células también expresan PRRs, la activación de ellas mediante PAMPs depende principalmente de la presencia y estado de activación de macrófagos y/o CDs (*Alter y col., 2007*). Las células NK exhiben una expresión diferencial de receptores, estableciéndose diferentes subconjuntos celulares con distintas habilidades para responder a estímulos y células infectadas. Las células NK desarrollan varios mecanismos para la eliminación de células infectadas por el virus incluyendo reconocimiento directo de proteínas virales o ligandos celulares de estrés inducidos por el virus a través de receptores activados, pérdida de señales inhibitorias producidas por la regulación negativa viral de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) de clase I y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (*Jost y Altfeld, 2013*). Por ejemplo, las células NK expresan receptores aniquiladores semejantes a inmunoglobulina (KIRs) que son polimórficos, pudiendo ser activadores o inhibitorios. La interacción de KIRs inhibitorios con moléculas del CPH de clase I expresada en células normales es crucial para prevenir que las células NK las elimine (*Kim y col., 2008*). La infección con VIH resulta en una disminución de la

expresión de superficie de dichas moléculas, resultando ser más susceptibles a la lisis mediada por las células NK (Alter y col., 2011).

El sistema inmune adaptativo está representado por subconjuntos celulares que participan en el control de la replicación viral. La rápida caída de la carga viral durante la infección aguda está temporalmente correlacionada con la aparición de células T CD8⁺ específicas de VIH, las cuales interactúan directamente con células infectadas mediante receptores que detectan péptidos virales presentados por las moléculas del CPH de clase I (Rodriguez y col., 2006). Para mantener respuestas celulares T CD8⁺ completamente funcionales se requiere la asistencia de las células T CD4⁺ con la misma especificidad antigénica (Sun y Bevan, 2003). Las células T CD4⁺ específicas de VIH también poseen actividad citotóxica directa sobre células infectadas. La producción de la IL-2 por parte de las células T CD4⁺ está correlacionada con la capacidad proliferativa de los subconjuntos CD4⁺ y CD8⁺ de las células T. Debido a que las células T CD4⁺ son importantes para orquestar numerosas funciones inmunes celulares y humorales, su disminución es considerada la razón principal de falla del sistema inmune para el control viral (Imami y col., 2013).

1.2. El parásito *Leishmania* sp.

La leishmaniasis es una enfermedad tropical causada por un parásito intracelular del género *Leishmania*. El género *Leishmania*, el cual consiste de protozoarios tripanosomátidos pertenecientes al orden Kinetoplastida, abarca más de 20 especies diferentes. La presentación clínica depende de la compleja interrelación entre la respuesta inmune mediada por las células hospederas y las especies específicas de vectores y parásitos. Esta enfermedad es clasificada dependiendo de la región del mundo donde ocurre: la leishmaniasis del Viejo Mundo (LVM) existe en el hemisferio oriental y es endémico en Asia, África y el sureste de Europa. La leishmaniasis del Nuevo Mundo (LNM) es endémica en el hemisferio occidental extendiéndose desde el centro de Texas hasta Centro y Suramérica, excepto Chile y Uruguay. El vector de transmisión lo representa las hembras de dos géneros de moscas de arena, *Phlebotomus* (LVM) y *Lutzomyia* (LNM). Estos insectos miden usualmente entre 1,5-2mm de longitud, se alojan en regiones tropicales y subtropicales y suelen ser más activas desde el anochecer hasta el amanecer (Kevric y col., 2015).

Es difícil obtener cifras precisas de incidencia de la enfermedad. Se cree que las estimaciones realizadas subestiman la realidad debido a que la enfermedad puede ser subclínica y generalmente afecta a las zonas más pobres y aisladas del mundo. Los estimados sugieren que hay 12 millones de personas infectadas a nivel mundial, con dos nuevos millones de casos anualmente,

muchos de los cuales son infecciones cutáneas y mucocutáneas (CDC, 2013). La leishmaniasis es la segunda causa de muertes relacionadas a parásitos, superado por malaria, causando 20.000-30.000 muertes anualmente (WHO, 2014).

Aunque esta enfermedad está históricamente limitada a las regiones tropicales y subtropicales, existen varios factores que contribuyen a la diseminación del parásito a nuevas áreas. Esto incluye cambios climáticos, urbanización, deforestación, movimientos migratorios hacia y desde zonas endémicas, entre otros (Sutherst, 2004; Pavli y Maltezou, 2010).

1.2.1. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.

Existen cuatro categorías generalmente aceptadas de la manifestación clínica de la enfermedad: (i) leishmaniasis cutánea (LC), (ii) leishmaniasis cutánea difusa (LCD), (iii) leishmaniasis mucocutánea (LM) y (iv) leishmaniasis visceral (LV). Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis ocurren en un amplio rango que va desde infecciones asintomáticas a aquellas que son letales. Esto depende de la especie que infecta, el vector, el estado inmune del sujeto, edad, estatus nutricional, sitio de inoculación y determinados aspectos genéticos del hospedero (Akilov y col., 2007; Bogdan, 2012). Por ejemplo, algunas especies como *L. major* causan únicamente enfermedad cutánea, *L. donovani* resulta en visceralización mientras que *L. infantum* ocasiona tanto enfermedad cutánea como sistémica. Afortunadamente, la LC subclínica y auto-limitada es la más común. No obstante, una respuesta inmune inapropiada conduce a una replicación parasitaria no controlada, generándose subsecuentes manifestaciones clínicas no auto-curables (Kevric y col., 2015).

La LC (Fig.4A) usualmente ocurre en un área expuesta accesible a la picadura de las moscas de arena como la cara, el cuello y las extremidades. Independientemente de la especie que cause la infección, las lesiones cutáneas inician como pápulas solitarias circunscritas en el sitio de inoculación. Dichas pápulas podrían agrandarse, formando nódulos y placas que a menudo se ulceran. Las úlceras usualmente son indoloras a menos que sean infectadas secundariamente por bacterias u hongos (Aara y col., 2013). Los parásitos podrían persistir en cicatrices de LC curadas y en los ganglios linfáticos a pesar del tratamiento, posiblemente resultando en reactivación de la enfermedad durante un período de inmunosupresión (Bogdan, 2012).

La LCD también es conocida como anérgica o leishmaniasis lepromatosa, caracterizada por la presencia de pápulas o nódulos coloreados y diseminados, con una significativa propensión a numerosas lesiones faciales; la ulceración no es característica de esta forma (Lupi y col., 2009).

La diseminación linfática o hematógica de *Leishmania* sp. desde una lesión cutánea, al instante o en meses/años, puede provocar la infección de las mucosas de las vías respiratorias (Fig.4B). Las lesiones de la mucosa causadas por las especies de LVM son poco frecuentes, reportándose infección de la mucosa bucal y laríngea en sujetos ancianos e inmunocomprometidos (Fsadni y col., 2007). En el Nuevo Mundo la LM se manifiesta como nódulos e infiltrados del cartílago nasal, conduciendo al bloqueo de las narinas, destrucción del septo y el colapso nasal (Guerra y col., 2011). La faringe, laringe, paladar y labio superior también están involucrados, produciendo destrucción tisular severa (Amato y col., 2009).



Figura 4: Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis. (A) Lesión de leishmaniasis cutánea formando una úlcera que ha hecho metástasis. Suelen ser indoloras a menos que se presente otra infección: su complicación y falta de tratamiento puede evolucionar a una leishmaniasis mucocutánea. (B) Individuo con lesiones crónicas en la zona otorrinolaringológica, común en la leishmaniasis mucocutánea. Ocasiona dificultad para respirar y eflujos purulentos nasales en el individuo². (C) El individuo presenta distensión abdominal ocasionada por la inflamación del hígado y bazo, observado en varios sujetos con leishmaniasis visceral³.

La LV (Fig.4C) también es conocida como kala-azar (enfermedad negra), un tipo de leishmaniasis que se desarrolla de meses a años tras la inoculación, siendo causada por macrófagos parasitados diseminándose a través del sistema retículo-endotelial. Está caracterizada por fiebre, pérdida significativa de peso, anorexia, debilidad, palidez, diarrea, tos, epistaxis, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y retardo en el crecimiento de niños. En ciertas poblaciones de pacientes se nota una significativa hiperpigmentación de la piel, de ahí deriva el término de “enfermedad negra”. Si la LV no es tratada puede ser letal en menos de dos años (WHO, 2014).

La muerte generalmente es consecuencia de la misma infección, anemia severa o hemorragias. Existe en el Viejo y Nuevo Mundo, pero en cinco países (Brasil, Bangladesh, Etiopía, Sudán e India) se concentra aproximadamente 90% de los casos de LV a nivel mundial. Una posible secuela de la LV subclínica y no tratada es la leishmaniasis dérmica post-kala-azar, la cual aparece como máculas difusas hipopigmentadas, eritemas malares, pápulas, nódulos y placas en todas las partes del cuerpo. Es casi exclusivamente encontrada en la India y el este de África, donde *L. donovani* es el agente etiológico (Akilov y col., 2007; WHO, 2014).

La co-infección con VIH pre-existente es muy común, particularmente en los casos de LV, complicando aún más el panorama clínico al exacerbarse los síntomas de la enfermedad parasitaria (Alvar y col., 2008). Los individuos inmunocomprometidos tienen manifestaciones leishmaniales atípicas y más severas. Debido a que la activación de las células T es un componente clave en la inmunoregulación de la leishmaniasis, los pacientes VIH⁺ y aquellos con supresión iatrogénica de las células T, causada por corticosteroides, quimioterapia y otros elementos, son más vulnerables a la enfermedad parasitaria (Antinori y col., 2008).

1.2.2. Ciclo de vida de *Leishmania*.

El parásito tiene un ciclo de vida heteroxeno que se alterna entre mamíferos hospederos e insectos vectores. Las hembras de dos géneros de moscas de arena, *Phlebotomus* (LVM) y *Lutzomyia* (LNM), tienen importancia médica ya que son los únicos vectores para la transmisión de *Leishmania* identificados para el humano (Killick-Kendrick, 1999).

El género *Leishmania* tiene dos estadios de desarrollo, el amastigote y el promastigote. El amastigote es ovalado o esférico, posee membrana, kinetoplasto y núcleo. Es inmóvil y mide aproximadamente 2,5-3,5 micras. El promastigote es más alargado (18-20 micras), presenta un flagelo, núcleo central, citoplasma granulado, kinetoplasto adyacente al bolsillo flagelar y una superficie celular cubierta por lipofosfoglicanos (Romero, 2007).

En el vector el parásito se desarrolla en el tracto digestivo del hospedador y se presenta en forma flagelar (promastigote). En contraste, en el hospedador vertebrado, luego de ser fagocitado por los macrófagos, los promastigotes sufren un proceso de transformación hasta alcanzar la forma no flagelada o amastigote. La infección del insecto ocurre cuando éste ingiere sangre de un vertebrado infectado con macrófagos parasitados por las formas amastigote, los cuales son liberados en el tracto digestivo de éste, transformándose rápidamente en promastigotes; éstos se multiplican y migran hacia su probóscide, donde estarán disponibles para ser inoculados al nuevo hospedador mamífero en la siguiente ingesta de sangre (Alvar, 1997).

El insecto infectado suele inocular entre 10 y 200 promastigotes dentro de la dermis del mamífero, en cuyo interior se activa el sistema del complemento que genera la unión del receptor de complemento de tipo 3 (CR3) en la superficie del macrófago con la membrana del parásito; esto causa que el promastigote sea fagocitado por el macrófago. Una vez dentro de éste, los parásitos se transforman en la forma intracelular o amastigote, se multiplican y eventualmente lisan los macrófagos y re-infectan a otras células. El ciclo se cierra cuando otro vector ingiere macrófagos del mamífero infectado (Descoteaux y Turco, 1999) (Fig.5).

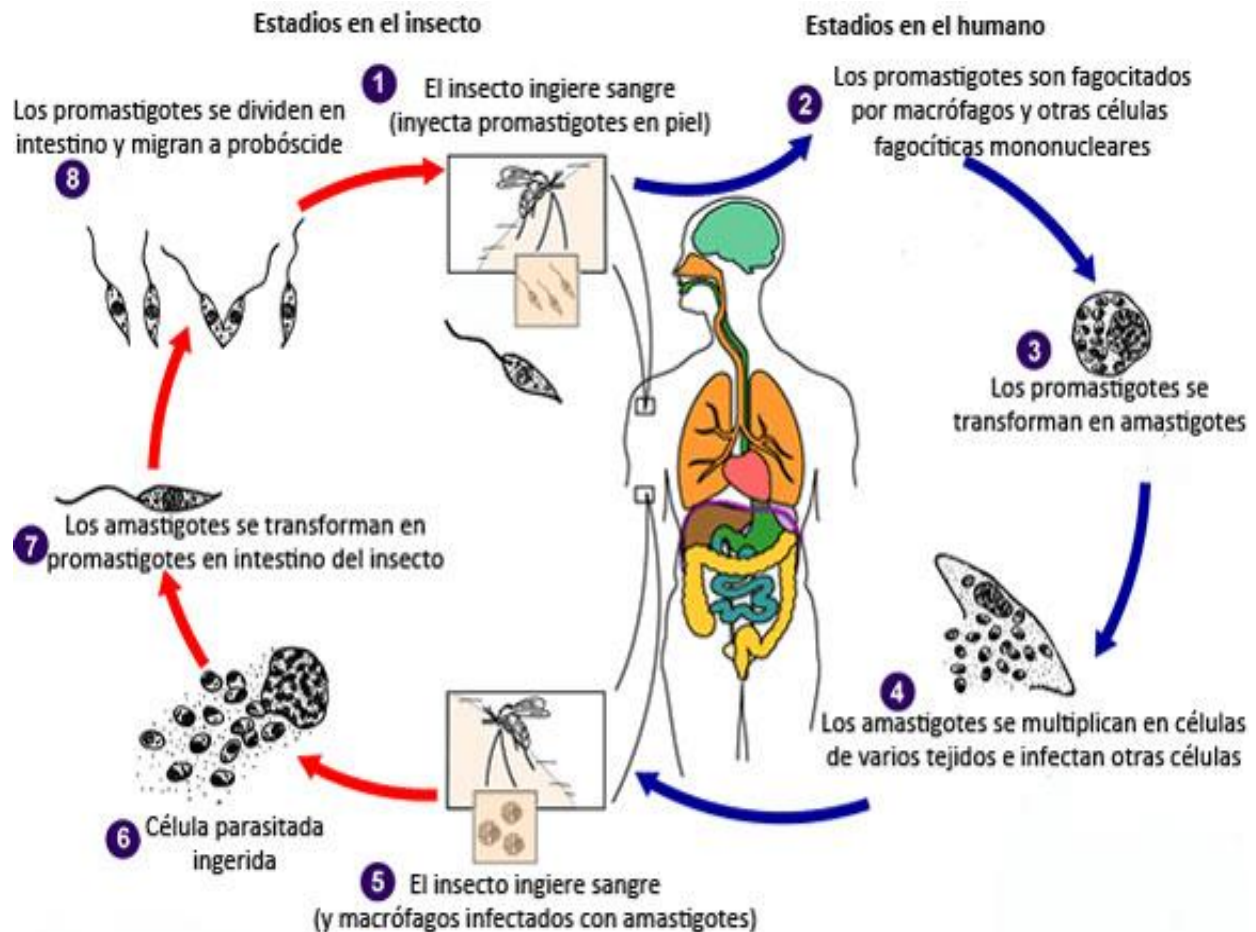


Figura 5: Ciclo de vida del parásito *Leishmania*. El esquema señala el proceso de varios pasos para la infección y multiplicación del parásito *Leishmania*⁴.

1.2.3. Respuesta inmune a *Leishmania*.

La respuesta inmune a la infección con *Leishmania* es muy compleja y, mientras podría acelerar la cura, en algunos casos exagera la enfermedad dependiendo de circunstancias particulares. Los resultados de la respuesta inmune son dependientes de la variación genética en el mamífero hospedador y el parásito, junto a determinados factores como la localización, tamaño del inóculo y número de picaduras infecciosas recibidas (Liew y O'Donnell, 1993; Awasthi y col.,

2004; Dunning, 2009). Con la finalidad de desarrollar una relación parasitaria exitosa con su hospedero, *Leishmania* debe evadir tanto las respuestas inmunes innatas como adaptativas.

La respuesta inmune innata a *Leishmania* está mediada por las células NK, fagocitos mononucleares/polimorfonucleares, citoquinas y proteínas del complemento. Tras la entrada al cuerpo del hospedero, los promastigotes son envueltos por las CDs y los macrófagos (Scharton-Kersten y col., 1995; Sharma y Singh, 2009), pero son resistentes a la proteólisis y degradación en los fagosomas. Dentro del hospedador mamífero *Leishmania* reside como amastigote en células fagocíticas tales como macrófagos, CDs y neutrófilos. La proteína de complemento C3b es una de las opsoninas inmunes más potentes; es capaz de unirse a *Leishmania*, resultando en una captura acelerada del parásito por parte de las células fagocíticas (Sharma y Singh, 2009). La glicoproteína de superficie de *Leishmania* gp63 convierte a C3b en iC3b, favoreciéndose la fagocitosis en lugar de la lisis dado que *Leishmania* es muy resistente a la degradación una vez posicionada dentro de los fagocitos (Hermoso y col., 1991).

A través de una vía dependiente del receptor tipo toll 9 (TLR-9), los macrófagos y CDs infectados tienen una participación importante en la producción de IL-12, permitiendo la activación de las células NK, la producción del IFN- γ y la subsecuente activación Th1 (Scharton-Kersten y col., 1995; Liese y col., 2008). La activación temprana de las células NK también es inducida por las quimioquinas IP-10, MCP-1 y la linfotactina. Las células NK activadas han mostrado ser citolíticas para los macrófagos infectados por *Leishmania*, pero el IFN- γ derivado de las células NK tiene un rol más prominente en la defensa del hospedero al activar los macrófagos, permitiendo que éstos eliminen al parásito a través de la generación de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) o de nitrógeno (RNI). *Leishmania* produce ácido-fosfatasas en su superficie que inhiben este aumento de radicales hidroxilo y superóxido. En adición al estrés oxidativo, los macrófagos activados a menudo intentan degradar los parásitos con enzimas acídicas; esto ocurre cuando los fagosomas se fusionan con los lisosomas. El parásito *Leishmania* resiste este ataque mediante una bomba de protones presente en su superficie, logrando que su pH intracelular permanezca cercano al neutral. Además, el lipofosfoglicano (LPG) ejerce un rol activo al inhibir las enzimas lisosomales. Así pues, el parásito ejecuta una serie de complejas interacciones parásito-hospedero dentro del ambiente hostil de los fagolisosomas, donde eventualmente evade este mecanismo inmune de defensa (Alexander y Russell, 1992).

La relevancia de las células NK en el control de los parásitos intracelulares al inducir la producción de IFN- γ ha sido bien documentada. Las células NK, purificadas a partir de células

mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas, proliferan y secretan IFN- γ en respuesta al LPG de *L. mexicana* (Nylen y col., 2003). La depleción de las células NK, dentro de los primeros siete días de infección con *L. major* en ratones, generó una reducción significativa de la producción del IFN- γ y una mayor carga parasitaria (Laurenti y col., 1999), sugiriendo un rol crucial de las células NK durante la respuesta inmune innata temprana a la infección con *Leishmania*. El TNF- α es un cofactor con el óxido nítrico (NO) y un importante sinergizante con el IFN- γ en la activación de macrófagos infectados. Los leucocitos polimorfonucleares activados eliminan parásitos principalmente a través de mecanismos oxidativos. La generación de RNI por macrófagos activados es el mecanismo primario de eliminación de parásitos en modelos murinos. El NO, sintetizado por la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), es una molécula citostática y citotóxica poderosa que participa en la eliminación de varios parásitos intracelulares, incluyendo *Leishmania*. Un mecanismo de inmunidad innata importante contra *Leishmania* lo constituye la apoptosis de macrófagos mediada por FasL (Huang y col., 1998). Por tanto, en la leishmaniasis los macrófagos tienen una función dual: representan una importante población responsable de la eliminación de los parásitos y también son el sitio principal para la replicación de *Leishmania* (Birnbbaum y Craft, 2011).

Respecto a la respuesta inmune humoral frente a *Leishmania*, la infección humana con este parásito está caracterizada por la presencia de anticuerpos anti-leishmaniales; dichos anticuerpos, los cuales son producidos a un bajo nivel en la LC y a un elevado nivel en la LV, no juegan ningún papel en la protección. No obstante, la función de elevados niveles de anticuerpos en pacientes con kala-azar hacia la protección o patogénesis no está comprendida en su totalidad. El análisis de los isotipos de inmunoglobulinas (Igs) específicas de antígenos de *Leishmania* reveló altos niveles de IgG, IgM, IgE y subclases de IgG durante la enfermedad (Ghosh y col., 1995; Atta y col., 1998; Ryan y col., 2002). IgG no solo falla en proveer protección contra este patógeno intracelular sino que contribuye a la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, la administración pasiva de IgG anti-leishmanial resultó en lesiones más grandes en ratones BALB/c con una mayor producción de IL-10 (Miles y col., 2005). Este resultado se correlaciona con los elevados niveles de anticuerpos anti-leishmaniales durante la fase activa de la enfermedad, con una consecutiva caída en el título de anticuerpos tras una cura exitosa. Generalmente, un alto nivel de anticuerpos es considerado como un marcador de enfermedad progresiva en la LV (Sharma y Singh, 2009).

Existe evidencia extensiva derivada de modelos experimentales donde se señala que los mecanismos de inmunidad celular median la resistencia adquirida a *Leishmania*. Después de la

infección en la piel, las células de Langerhans fagocitan y transportan a *Leishmania* a los ganglios linfáticos regionales donde inducen una respuesta mediada por las células T. La inmunidad adquirida en la LC murina, causada por *L. major*, está mediada por la producción, inducida por los parásitos, del IFN- γ por parte de las células T CD4⁺ (subconjunto Th1), pudiendo desarrollarse en ausencia de las células T CD8⁺. Ambos tipo de células, T CD4⁺ y T CD8⁺, son requeridas para una defensa efectiva contra la infección visceral murina producida por *L. donovani*, pero la función exacta de CD8 no está clara (Sharma y Singh, 2009). Sin embargo, en la infección visceral murina con *L. infantum* las células T CD8⁺ poseen múltiples roles, comprimiendo tanto la actividad citotóxica contra las células que expresan los antígenos de *Leishmania* como la secreción de citoquinas y quimioquinas (Tsagozis y col., 2003). Un mecanismo inmune celular relevante contra la leishmaniasis está representado por la destrucción de macrófagos infectados por los linfocitos T citotóxicos (Muller y col., 1991).

2. Antecedentes.

La co-infección con ciertos microorganismos oportunistas, incluyendo los parásitos protozoarios del género *Leishmania*, derivaría no sólo a una directa patogénesis y morbilidad sino también tendría un rol importante y activo en la progresión de la infección viral hacia la adquisición del SIDA. Dichas infecciones oportunistas inducen respuestas inflamatorias y eventos de señalización celular en el hospedero que promoverían la replicación viral (Tremblay y col., 1996). Curiosamente, es conocido que ciertos estímulos activan elementos regulatorios localizados dentro de los LTRs del VIH-1, logrando inducir la expresión genética de pro-virus latentes, acelerándose la replicación viral y la progresión de la enfermedad (Fauci, 1988a, b). Parece probable que la activación celular inducida en el curso de la infección por patógenos oportunistas conduzca a la activación de elementos regulatorios del VIH.

La infección con VIH promueve una respuesta inmune de tipo Th2, lo cual es perjudicial para los individuos con leishmaniasis. En la co-infección *Leishmania*/VIH, particularmente en las etapas tardías de la enfermedad viral donde hay una depleción marcada de células T CD4⁺ y una producción reducida del IFN- γ , la sanación de las lesiones se comprometería debido a la deteriorada capacidad de los macrófagos de eliminar amastigotes. Un reconocimiento apropiado de los antígenos de *Leishmania* y la estimulación de los linfocitos B dependen de una respuesta efectiva de las células T CD4⁺, pero cuando ésta es comprometida se manifiesta en una inhibición de la respuesta proliferativa *in vitro* a antígenos del parásito y en una falla *in vivo* al desarrollo de

una respuesta hipersensible, favoreciéndose la multiplicación, diseminación y localización parasitaria inusual (Clerici y Shearer, 1993).

Aunque el rol de los parásitos protozoarios como posibles co-factores que favorecen la progresión de la infección viral hacia el SIDA todavía requiere de mucho estudio, varios investigadores han discutido la participación putativa de *Leishmania* en la patogénesis de la infección con VIH. Sus ideas han sido inspiradas en las distribuciones geográficas del VIH y *Leishmania* que se solapaban en diferentes países. Existen reportes clínicos y epidemiológicos implicando a *Leishmania* como un patógeno oportunista en pacientes inmunosuprimidos con VIH. Dado que el parásito *Leishmania* constituye un grave problema de salud a lo largo de las áreas tropicales y sub-tropicales del mundo, no debería sorprender si las co-infecciones *Leishmania*/VIH emergieran en pacientes que viven en dichas regiones (Tremblay y col., 1996). A continuación, discutiremos los detalles epidemiológicos y moleculares más importantes con relación a las co-infecciones que involucran a estos dos patógenos.

2.1. Epidemiología de la co-infección *Leishmania*/VIH.

El incremento en la incidencia de la co-infección *Leishmania*/VIH puede ser atribuida en parte a la superposición geográfica de ambas enfermedades. La Fig.6 muestra aquellos países donde se han reportado casos de co-infección *Leishmania*/VIH para los años 1990-1998. En áreas endémicas de LV las personas que están inmunocomprometidas debido a la infección con el VIH son más propensas a desarrollar LV en comparación a aquellas no infectadas con el virus. De hecho, la co-infección *L. infantum*/VIH es ahora la tercera infección más frecuente en individuos VIH⁺ presentes en áreas endémicas de LV (Desjeux y Alvar, 2003). Los índices de infección por VIH son del 5% en Brasil, 2-5% en India (Sinha y col., 2011) y oscila entre 25 y 40% en Etiopía (Diro y col., 2011).

Desde 1994 la incidencia de la co-infección *Leishmania*/VIH ha sido monitoreada por una red de vigilancia que involucra a 16 instituciones (WHO, 2000) en cuatro países: Francia, Italia, Portugal y España (Alvar y col., 1997). España registra el mayor número de casos, una situación que estaría relacionada a una variedad de factores como la reactivación de la infección asintomática y una mayor superposición geográfica entre la leishmaniasis y las infecciones por VIH en contraste a otros países del sur de Europa (Alvar y col., 2008). En esta región, varios individuos asintomáticos son positivos para LST (leishmanin skin test) (Alvar y col., 1996), indicando que han estado expuestos activamente a *Leishmania* y podrían no haber desarrollado manifestaciones clínicas debido a una respuesta inmune efectiva. La infección con el VIH reactivaría infecciones latentes y

aumentaría las transmisiones antroponóticas (mediante la picadura de la mosca de arena) y artificiales (a través del intercambio de agujas por los consumidores de drogas intravenosas). En España, 68% de las co-infecciones *Leishmania*/VIH están representados por los IVDUs (intravenous drug users). Es importante notar que al momento de estos estudios España tuvo 5 a 7 veces más IVDUs que el promedio europeo (Desjeux y Alvar, 2003).

El sureste de Asia abarca 67% de todas las leishmaniasis (Hotez y col., 2004), donde la enfermedad se está esparciendo rápidamente. El número de casos reportados en el 2005 fue de 3.000, 7.000 y 32.800 en Nepal, Bangladesh e India, respectivamente (Bern y Chowdhury, 2006; Joshi y col., 2006; Schenkel y col., 2006). Estas cifras son altamente engañosas debido a que un estudio oficial casa por casa de personas que viven con LV en el estado Bihar de la India mostró que solo uno de ocho casos son reportados (Singh y col., 2006). Al igual que la leishmaniasis, la epidemia VIH/SIDA también se está propagando aceleradamente en el sureste de Asia, con 4 millones de personas infectadas con el virus para el año 2011. Se estimó que 2.4 millones de personas estaban infectadas con el VIH en la India, 64.000 en Nepal y 6.300 en Bangladesh para el año 2009. El problema de la co-infección parece ser exacerbado por migrantes económicos, quienes adquieren el VIH en entornos urbanos y luego retornan a sus hogares rurales presentes en áreas donde la LV es endémica. Ellos adquieren o reactivan la leishmaniasis latente debido a un deterioro del sistema inmune inducido por la infección viral (UNAIDS, 2012).

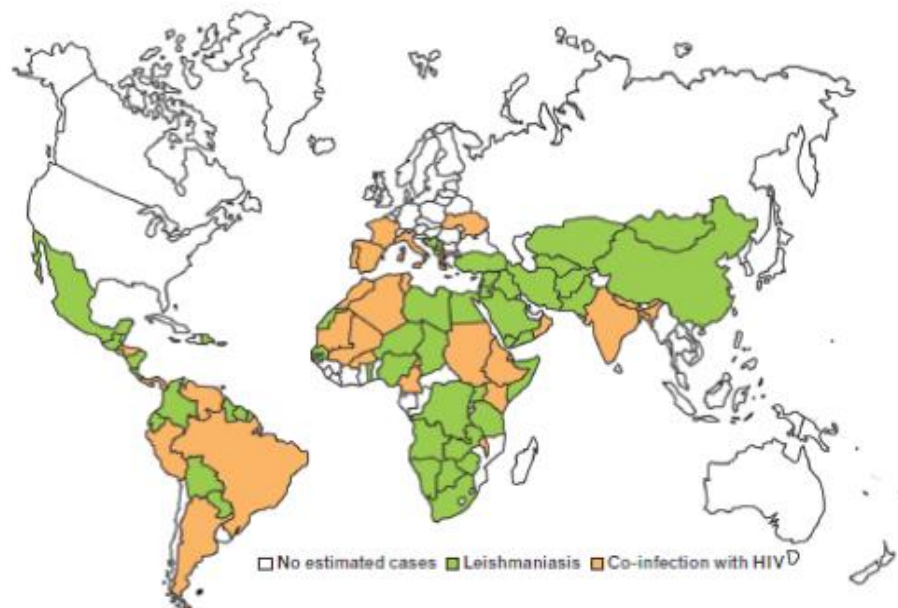


Figura 6: Distribución global de los casos reportados de leishmaniasis y co-infección *Leishmania*/VIH para los años 1990-1998. Actualmente hay más países que se han sumado a la lista de naciones con casos reportados de co-infección *Leishmania*/VIH (WHO, 2007).

Mientras muchas de las co-infecciones en el sureste de Asia involucran a la LV, tanto la LC como la LV son importantes en África debido a la propagación geográfica y distribución de las variadas especies de *Leishmania*. En Burkina Faso la seroprevalencia del VIH es de 1,2% (110.000 personas)⁵ y en el 2005 se reportaron 827 casos de LC, principalmente causados por *L. major*, aunque estas cifras quizás estén considerablemente subestimadas. Cerca del 14% de pacientes con LC estaban co-infectados con el VIH, los cuales exhibían muchos signos clínicos inusuales (Guigumde y col., 2003). En Guyana Francesa, los pacientes co-infectados manifestaron más lesiones, con una respuesta más pobre al tratamiento y un mayor índice de recurrencia a diferencia de los casos inmunocompetentes (Couppie y col., 2004). En Etiopía se han reportado co-infecciones LC/VIH y LV/VIH, aunque esta última parece ser más prevalente. En la región Humera del noroeste de Etiopía el 40% de los pacientes con LV estaban co-infectados con el VIH para el año 2006, representando un incremento de 21,5% desde 1999. Más relevante son los datos que señalan que el índice de fatalidad de pacientes LV/VIH co-infectados fue cuatro veces mayor al compararse con aquellos individuos que presentaron solo LV (Lyons y col., 2003). Generalmente, la colección y análisis de datos en esta región del mundo es deficiente. También existe una muy limitada vigilancia, reportaje y programas de control para estas enfermedades en muchos países africanos. En consecuencia, es altamente probable que los pocos datos disponibles subestimen las cifras verdaderas y que además no sean estadísticamente suficientes. Esta afirmación tiene fundamento porque en esa parte del mundo el potencial para las co-infecciones de *Leishmania*/VIH se nutre por varios factores como la pobreza, inestabilidad política (guerra), hambruna y condiciones salubres paupérrimas.

Al igual que en África, los datos de la prevalencia de las co-infecciones *Leishmania*/VIH en Suramérica son también escasos y podrían ser erróneos. En el 2005, la Pan American Health Organization reportó 62.000 casos de LC y 5.000 de LV para la región, donde la mayoría de los casos se localizaron en Brasil. No obstante, las bases de datos de los Sistemas de Vigilancia Nacional en Brasil para el período 2002-2003 generaron un estimado de 10.207 casos de LV para el mismo período, indicando que el 40-50% de los casos no se encuentran reportados. De los 315 casos estimados de co-infección *Leishmania*/VIH entre 2001 y 2005, el 78% eran hombres con una edad media de 38 años (WHO, 2007). Estos datos se correlacionan con estudios más recientes, los cuales muestran que el 86,6% (Daher y col., 2009) y 88% (Nascimento y col., 2013) de los individuos co-infectados eran hombres. A diferencia del resto de las regiones, en Latinoamérica el número de nuevas infecciones con el VIH ha permanecido estable; esto en contraste al 28% de

reducción en la ocurrencia de nuevos casos a nivel mundial (*Lindoso y col., 2014*). Un estudio mostró que muchos (66,6%) de los sujetos co-infectados con LV/VIH eran de áreas rurales e incluía diferentes ocupaciones como peluqueros, porteros, vendedores, asistentes de oficina, granjeros y desempleados (*Daher y col., 2009*). Aunque este fue un estudio muy pequeño ($n=15$), basta con concluir que muchas de las personas eran de bajos ingresos económicos. Existe una fuerte superposición geográfica entre la LV y el VIH en Brasil; esto puede ser atribuido a la propagación del VIH desde las áreas urbanas a las rurales (*Orsini y col., 2012*). Debido a que en el 57% de pacientes en Brasil se le han diagnosticado con el VIH tras la aparición de manifestaciones clínicas de la LV, el Ministro de Salud ha recomendado que todos los pacientes con LV se sometan a exámenes para la detección de una posible infección viral (*Lindoso, 2011*).

2.1.1. Co-infección *Leishmania*/VIH en Venezuela.

En Venezuela la leishmaniasis representa un problema de salud pública, donde la tasa de incidencia está comprendida entre 10-30 infectados con LC y 0,03-0,24 con LV por cada 100.000 habitantes (*De Lima y col., 2011*). Considerando que no se había realizado un reporte de la prevalencia de co-infección *Leishmania*/VIH a nivel nacional, *Moreno y col. (2014)* se propusieron a evaluar algunos aspectos clínicos y epidemiológicos de los pacientes co-infectados que acudieron a los diferentes Servicios de Dermatología Sanitaria de Venezuela. Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo, para el período 2000-2013, de pacientes con LC y LV que acudieron al Servicio de Leishmaniasis del S.A. Instituto de Biomedicina (SAIB) y a los diferentes Servicios Regionales de Dermatología Sanitaria (SRDS) del país. La *Fig.7* muestra la tasa de incidencia de la co-infección para los diferentes estados de Venezuela.

El diagnóstico para la LC fue de acuerdo a criterios clínicos, epidemiológicos, inmunológicos y parasitológicos establecidos por *Convit (1974)*, los cuales abarcan las características morfológicas de las lesiones típicas para la LC, identificación de amastigotes en extendidos por escarificado teñidos con Giemsa bajo microscopio óptico y biopsias de las lesiones. También se aplicó una prueba inmunológica de hipersensibilidad retardada. En los pacientes con LV se realizó el diagnóstico por medio de la sintomatología clásica (*De Lima y col., 2011*), caracterizada por fiebre, anemia, hepatomegalia y/o esplenomegalia, confirmándose la presencia de amastigotes en extendidos realizados con punción de médula ósea y teñidos con Giemsa bajo un microscopio óptico. Se confirmó serológicamente el estado del VIH para cada paciente infectado con el parásito usando kits disponibles comercialmente, por medio de pruebas realizadas

en laboratorios clínicos privados bajo la supervisión de profesionales de salud, además del monitoreo de los Servicios de Infectología de los Hospitales regionales del país.

De 33.119 pacientes con LC y LV que acudieron a la consulta de leishmaniasis del SAIB y a los SRDS del país en el periodo 2000-2013, 36 (0,11%) manifestaron co-infección *Leishmania*/VIH. De los 36 sujetos co-infectados, aproximadamente 81% exhibió LC/VIH y 19% LV/VIH. La mayoría de los pacientes eran hombres (86%), siendo las mujeres el grupo minoritario (14%). La edad de estos sujetos estuvo comprendida entre 1 a 60 años; el 12% de los casos con LV/VIH se halló en individuos menores de 30 años mientras que el 66% de los pacientes con LC/VIH tenían entre 21 y 50 años de edad.

La co-infección fue encontrada en 11 de las 24 entidades federales que conforman el país, donde el 31% de los casos reportados con la co-infección se encontraron en el estado Bolívar, seguido por los estados Anzoátegui (22%), Lara (14%) y Aragua (11%). La incidencia para los estados Guárico, Carabobo, Zulia, Nueva Esparta, Táchira, Falcón y Miranda estuvo comprendida entre el 3% y 6%.

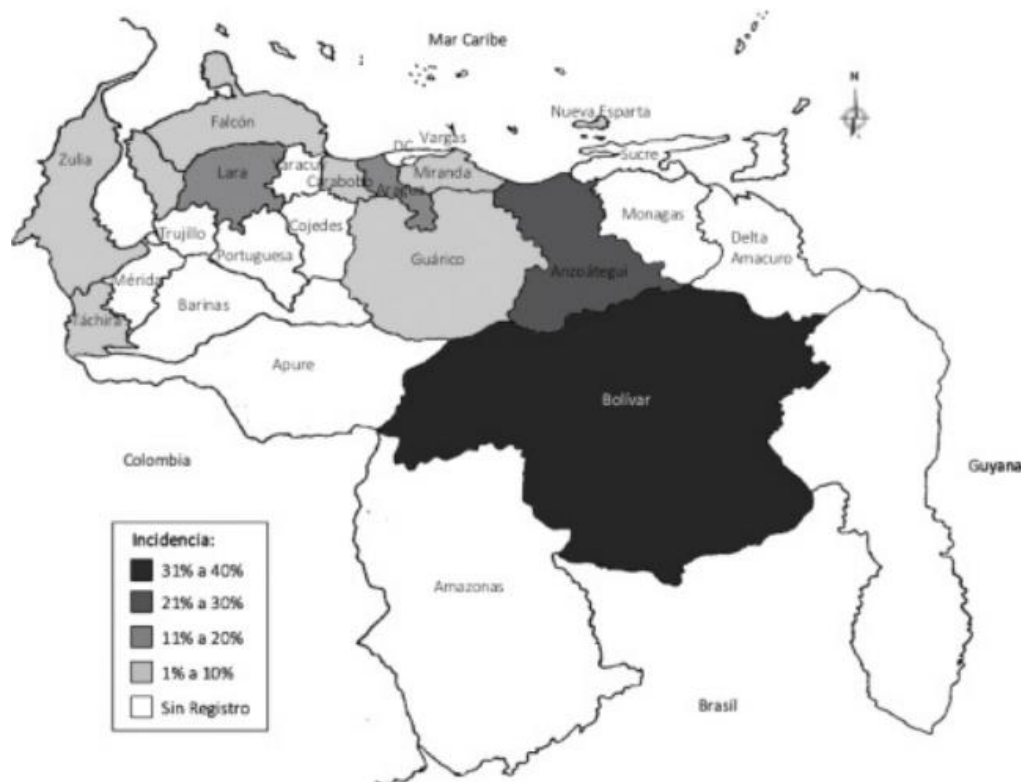


Figura 7: Distribución geográfica de la incidencia de co-infección *Leishmania*/VIH en Venezuela. Los datos para la elaboración del mapa fueron extraídos de los casos reportados en los Servicios de Dermatología Sanitaria a nivel nacional en el periodo 2000-2013 (Moreno y col., 2014).

Algunos autores señalan que la incidencia de la co-infección *Leishmania*/VIH se atribuye a la superposición de las enfermedades. En algunas zonas endémicas de Venezuela tales como

Mérida, Trujillo, Cojedes, Yaracuy y Monagas, que han sido catalogadas como zonas con un índice de alto riesgo para la leishmaniasis, con una tasa de incidencia mayor a 8 sujetos por cada 100.000 habitantes (*De Lima y col., 2010; 2011*) no se encontraron pacientes co-infectados. Probablemente esto sea debido a una subestimación en los registros ejecutados por los programas de control de ambas enfermedades y no a la ausencia *per se* de sujetos co-infectados.

La información sobre la incidencia y prevalencia del VIH-SIDA en Venezuela es escasa, siendo limitado el análisis epidemiológico de la situación de esta enfermedad. Sin embargo, para el período 1997-2010 el número de casos nuevos reportados en el país fue de 101.544 pacientes VIH⁺; para el 2011 fue de 38.204 personas con VIH, siendo el Distrito Capital (14.680), Zulia (4.146), Carabobo (3.427), Bolívar (2.242) y Aragua (2.193) los estados con mayor prevalencia del virus (*MPPS, 2011*), coincidiendo las últimas cuatro entidades federales con aquellos estados en los que se halló co-infección *Leishmania*/VIH.

En un reporte elaborado por *Molina y col. (2013)* se evidenció que el 81% de los casos de co-infección presentaron LC/VIH y 19% padecieron LV/VIH. No obstante, hay que estar alerta frente a pacientes con LC/VIH en cualquiera de sus formas clínicas, debido a la existencia de informes que señalan que algunas especies de *Leishmania* dermatropas cambian su tropismo cuando el paciente está inmunosuprimido por acción del VIH e invaden órganos internos (*Paredes y col., 2003*). Se ha observado que en algunos casos de co-infección el parásito no está confinado exclusivamente a órganos típicamente afectados sino también está difundido en regiones periféricas como la piel, el intestino, los pulmones, sangre periférica y líquido peritoneal (*Russo y col., 2003*). Además, los pacientes con LV/VIH exhiben cuadros clínicos más severos y prolongados, propensos a recaídas y resistentes a las terapias con antimoniales (*Molina y col., 2003*), exacerbándose el peligro de la propagación de la co-infección a otros individuos tanto por vía intravenosa como por el uso compartido de agujas, ya sea por consumo de drogas o por otros motivos que impliquen esta vía de transmisión (*Alvar y col., 1997*).

En Venezuela, la asociación del VIH y la leishmaniasis no ha sido suficientemente estudiada, por lo que este tipo de investigaciones son importantes y requeridas, permitiendo a futuro aplicar estrategias de prevención y control por parte de las autoridades sanitarias en las zonas más necesitadas.

2.2. Inmunopatogénesis de la co-infección *Leishmania*/VIH.

La existencia de *Leishmania* y VIH en la misma célula tiene influencia en la multiplicación de ambos patógenos (*Bernier y col., 1995*). Se cree que en los pacientes co-infectados se establece

una retroalimentación positiva entre el parásito *Leishmania* y el VIH. El parásito *Leishmania* estimula la activación inmune crónica, conduciendo a una carga viral aumentada y a una rápida progresión hacia el SIDA (Bentwich, 2003). Por su parte, la inmunosupresión causada por el VIH es particularmente favorable para la multiplicación no controlada de los parásitos. A través de los años se han realizado numerosos esfuerzos para determinar el mecanismo que subyace la patogénesis de la co-infección *Leishmania*/VIH y también para confirmar si existen interacciones entre ambos patógenos (Alvar y col., 2008). *Leishmania* y VIH infectan e interactúan en monocitos/macrófagos (Stebbing y col., 2004; Murray y col., 2005); las consecuencias de esta co-infección no están completamente exploradas.

Estudios *in vitro* con macrófagos derivados de monocitos co-infectados con VIH-1 y promastigotes de *L. donovani* (Wolday y col., 1998) o *L. infantum* (Zhao y col., 2006) mostraron un aumento del crecimiento parasitario en las células co-infectadas a diferencia de aquellas infectadas únicamente con *Leishmania*. Esta replicación parasitaria magnificada fue atribuida a una discapacidad en las funciones efectoras de los macrófagos que usualmente permiten un control parasitario efectivo, tales como la fagocitosis, muerte intracelular, quimiotaxis y/o producción de citoquinas (Kedzierska y Crowe, 2002). A pesar que los macrófagos derivados de monocitos infectados con el VIH-1 exhiben una incompleta capacidad de fagocitar numerosos patógenos (Kedzierska y col., 2003; Azzam y col., 2006), la captura de *L. infantum* es incrementada tras la infección viral (Zhao y col., 2006).

En adición a la alteración de los estados de activación de los macrófagos infectados, la infección con VIH también perturba sus respuestas fisiológicas al dirigir la producción de moléculas inmunomodulatorias. Barreto-de-Souza y col. (2006) evaluaron el rol de la proteína Tat, esencial para la replicación del VIH-1, sobre la proliferación de *L. amazonensis* en macrófagos humanos. Tat es secretada en grandes cantidades por células infectadas con el VIH-1, logrando estimular la secreción de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , TNF- α y TNF- β . La proteína Tat fue capaz de anular el efecto leishmanicida del IFN- γ y elevar la replicación de *L. amazonensis* en macrófagos humanos a través de la expresión de la ciclooxygenasa-2 y la síntesis de la prostaglandina E₂, lo cual resulta a su vez en aumento de la producción del TGF- β 1 y del crecimiento parasitario; esto explicaría parcialmente la replicación acrecentada de *Leishmania* en células infectadas con el VIH-1.

Se ha descrito que *Leishmania* modula diferentes vías de señalización celular: por ejemplo, puede incrementar la expresión y activación de la proteína quinasa R (PKR) (Pereira y col., 2010).

Dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada en la infección, la activación de PKR aumenta el crecimiento intracelular parasitario debido a la producción de IL-10 e IFN- β (Vivarini y col., 2011; Faria y col., 2014). Por otro lado, la proteína Tat del VIH-1 es internalizada por diferentes células, incluyendo macrófagos, donde interactúa con quinasas intracelulares como PKR. Dicha interacción usualmente culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B y la expresión de citoquinas como el TNF- α y la IL-10 (Brand y col., 1997; Li y col., 2005). Adicionalmente, PKR puede fosforilar a Tat e impulsar la actividad transcritora de esta proteína sobre los LTRs del VIH-1, regulándose positivamente la producción viral (Meurs y col., 1995). Recientemente, Vivarini y col. (2015) determinaron que PKR es crucial para la inducción, mediada por Tat, de la proliferación de *L. amazonensis* en macrófagos humanos (Barreto-de-Souza y col., 2006). El tratamiento de las células con un inhibidor de PKR o la expresión de un constructo de Tat que contiene mutaciones en la región básica (aa 49-57), la cual es responsable de la interacción con PKR, no favoreció el crecimiento parasitario inducido por la proteína viral. Igualmente, la producción de la IL-10, una citoquina inhibitoria de macrófagos, impulsada por Tat fue afectada ante la ausencia de la participación de PKR.

El lipofosfoglicano (LPG) es el principal glicofosfato expresado en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*. Luego de la fagocitosis, los promastigotes son envueltos dentro de los fagolisosomas en células presentadoras de antígenos, especialmente macrófagos, donde se transforman en amastigotes. En el fagolisosoma la molécula LPG es liberada, quedando únicamente el ancla de alquilfosfatidilinositol. Se cree que el LPG es crítico para la supervivencia y establecimiento del parásito en macrófagos, participando en la modulación de las funciones de estas células (Turco, 1999). La alteración de eventos de señalización, dependientes de la proteína quinasa C (PKC), se ha implicado en la protección parasitaria mediada por el LPG dentro de los fagolisosomas de los macrófagos, y la inhibición, inducida por esta molécula, de varias funciones importantes de los macrófagos tales como la generación de radicales de oxígeno (Handman y col., 1986). Bernier y col. (1995) demostraron, usando dos líneas celulares monocíticas latentemente infectadas con el VIH, que la molécula LPG de *L. donovani* regula positivamente la expresión del virus.

En un estudio subsecuente se reportó que el LPG de *L. donovani* y su núcleo de fosfatidilinositol disparan la transcripción de las repeticiones terminales largas (LTRs) del VIH en las células T presumiblemente a través del motivo NF- κ B, sugiriendo que la exposición de las células T que albergan el VIH-1 con fagocitos infectados con *Leishmania* sería suficiente para

iniciar la activación del ADN pro-viral latente (Bernier y col., 1998). Se identificaron varios segundos mensajeros intracelulares cuya participación fue crucial en la activación mediada por el LPG de la secuencia LTR del VIH-1. Por ejemplo, la señalización dependiente de PTK, PKA/APMc, Ca^{2+} y calmodulina fue clave en la activación inducida por el LPG de la transcripción del VIH-1. Dichas observaciones no fueron sorprendentes debido a que la molécula LPG de *Leishmania* modula rápidamente la homeostasis del Ca^{2+} dentro de la célula huésped fagocitaria (Olivier y col., 1992; Olivier, 1996; Mansfield y Olivier, 2002). El LPG es capaz de inducir la translocación del NF- κ B al núcleo (Bernier y col., 1998). Esta molécula no es el único componente patogénico que activa NF- κ B; el lipopolisacárido bacteriano y el lipoarabinomano de *Mycobacterium tuberculosis* también son conocidos como poderosos inductores de la activación de este factor (Zhang y col., 1995; Bernier y col., 1998).

Aunque no se ha definido el mecanismo exacto, se creía que las moléculas LPG interactuarían con las células T infectadas con el VIH durante la presentación antigénica entre macrófagos infectados con *Leishmania* y las células T (Olivier y col., 2003). Además, *L. donovani* induciría la replicación del VIH en células infectadas a través de procesos específicos o inespecíficos de antígenos donde el TNF- α tiene una participación relevante (Wolday y col., 1999). Es necesario recalcar que el tratamiento de líneas celulares monocíticas con el LPG promueve la secreción del TNF- α , una citoquina capaz de impulsar la replicación del VIH-1 en células T y monocitos (Folks y col., 1987; 1989).

Se ha reportado la formación de sincitios en una variedad de cultivos celulares infectados con el VIH-1 (Lifson y col., 1986). La fusión de células T CD4^+ infectadas con el VIH con aquellos no infectados *in vitro* explica que la formación de sincitios constituiría un mecanismo alternativo por el cual estas células son agotadas durante el curso de la infección viral (Cohen, 1993). Además, se ha demostrado que el VIH circulante en un individuo infectado no es homogéneo, tratándose de una población compleja referida como “cuasi-especies”, las cuales se diferencian en varias propiedades tales como el índice de replicación o la habilidad de formar sincitios (Chang-Mayer y col., 1998).

Easterbrook y col. (1995) investigaron el efecto del LPG en la habilidad de las variantes SI (syncytia-inducing) de infectar y formar sincitios en líneas celulares. El LPG fue capaz de inhibir la formación de sincitios inducidos por el VIH-1 en células MT-2, una línea de linfocitos T humanos, de una forma dosis y tiempo dependiente, observándose una reducción en la formación de sincitios de hasta 76% a la máxima concentración y tiempo de incubación (60h + 20 μ M LPG).

Dicho efecto inhibitorio es dependiente de la porción oligosacáridica del LPG, es decir, a medida que la porción de carbohidrato de la molécula se reduce también lo hace la actividad anti-sincitial. También se evidenció que el LPG tiene efecto en la infección viral: el número de células infectadas por el VIH SI fue significativamente menor en todos los grupos donde las células o el virus fueron pre-tratados con el LPG. Mediante ELISA se determinó que el LPG disminuyó la producción de p24, con una eliminación completa a 40µM. A dicha concentración no se detectó formación de sincitios. Finalmente, mediante inmunofluorescencia indirecta seguido de análisis FACS se evaluó si el LPG se une a las superficies de las células T, demostrándose que se incorpora rápidamente a las membranas de las células MT-2, aunque luego lenta y progresivamente abandona dicha superficie.

Inicialmente se creía que la actividad anti-sincitial del LPG estaría asociada con una reducción de la expresión en la superficie de las moléculas CD4, CXCR4 y LFA-1, tres glicoproteínas de superficie conocidas por ser importantes mediadores en la formación de los sincitios; no obstante, *Genois y col. (2001)* no obtuvieron, mediante citometría de flujo, estos resultados. Estos investigadores confirmaron los datos obtenidos por *Easterbrook y col. (1995)* y destacaron que la molécula LPG como inhibidor de la replicación del VIH fija como blanco un paso post-unión viral, es decir, la unión del virus a la célula no fue obstaculizada por el LPG pero la entrada viral sí lo fue.

Ambos grupos de investigación sugieren que el efecto anti-sincitial del LPG sería debido a que la incorporación de esta molécula a una membrana celular blanco influenciaría en su fluidez, hidratación, curvatura intrínseca de la membrana o simplemente actuar como una barrera estérica para la fusión celular. Es curioso y paradójico que, a pesar de los numerosos informes que colocan al parásito *Leishmania* como un potenciador y contribuidor de la infección y progresión viral, exista un componente sintetizado por el parásito que antagonice la infectividad y replicación del virus. Además, los resultados obtenidos en las investigaciones de *Bernier y col. (1995; 1998)* y *Genois y col. (2001)* parecen dirigirse a direcciones opuestas.

Investigaciones en humanos destacan un acrecentamiento de la diseminación y alta parasitemia en pacientes con SIDA en España (*Lopez-Velez y col., 1998; Bossolasco y col., 2003*). Aunque no se ha demostrado *in vivo*, es concebible que la alta parasitemia en pacientes con SIDA se relacione con los defectos observados *in vitro* en las funciones efectoras de los macrófagos (*Kedzierska. y Crowe, 2002*). Esto también se explicaría por la elevada recurrencia y reactivación de la enfermedad observada en pacientes co-infectados. En adición, los pacientes LC/VIH co-

infectados con una moderada inmunosupresión tienen un mayor índice de re-infección, mayor número de lesiones y pobre respuesta al tratamiento en contraste a los individuos LC⁺/VIH⁻ (Couppie y col., 2004). Lindoso y col. (2009) reportaron lesiones inusuales en localizaciones no habituales en pacientes co-infectados con leishmaniasis tegumentaria y VIH; esto incluía placas eritematosas y úlceras extensas en labios y genitales, donde dichas lesiones inusuales fueron asociadas a una severa inmunosupresión en el 30% de estos pacientes. Por su parte, Akilov y col. (2007) destacaron la existencia en individuos co-infectados de lesiones de LC en localizaciones inusuales que no están normalmente expuestas a las picaduras de la mosca de arena tales como los genitales, palmas de las manos y planta de los pies; incluso estas lesiones presentaron morfologías peculiares (eripeloides, verrucoides, psoriasiformes, eccematoides o zosteriformes). Las variantes dermatrópicas de *L. infantum* así como también *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* son capaces de generar la enfermedad visceral en individuos VIH⁺. La participación cutánea ocurre en 8-12% de sujetos con LV/VIH (WHO, 1995). Es alarmante el fenómeno de “visceralización” de la LC observada en algunos pacientes inmunocomprometidos; además, es altamente probable que este porcentaje sea mucho mayor al no haber sondeos que detallen la posible existencia de variantes dermatrópicas del parásito en sujetos LV/VIH co-infectados.

Un ejemplo de cómo el VIH contribuye con la infectividad de *Leishmania* se encuentra representado en el estudio de Lodge y col. (2012). Estos autores señalan que la infección de macrófagos humanos con el VIH-1 incrementa la expresión en la superficie del receptor de fosfatidilserina CD91/LRP-1. La internalización del parásito ocurre a través de interacciones entre CD91/LRP-1 y residuos de fosfatidilserina expuestos en la superficie de *L. infantum*. También se determinó que el aumento de la expresión de CD91/LRP-1 en la superficie celular ocurre rápidamente tras la infección con el VIH-1 e implica la participación del TGF-β1.

Los monocitos/macrófagos no son los únicos tipos de células capaces de albergar ambos patógenos; las CDs también son infectadas por *Leishmania* y VIH (Stebbing y col., 2004; Murray y col., 2005). No hay información sobre las consecuencias de la estadía de ambos patógenos en CDs, pero se ha propuesto que dicha co-infección modificaría el curso de infección de cada patógeno (Garg y col., 2007). Además, la habilidad de *Leishmania* y el VIH-1 de unirse al mismo receptor para entrar a las CDs, DC-SIGN (DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin), afectaría el ciclo de vida de éstos (Colmenares y col., 2002; Cambi y col., 2004). No obstante, el resultado de la competencia de ambos agentes infecciosos por el mismo receptor es desconocido. Se ha demostrado que la transmisión del VIH-1 a las células T CD4⁺ es disminuida cuando las células

que expresan DC-SIGN son pre-incubadas con amastigotes de *L. infantum* (Zhao y col., 2005). Es probable que la presencia de *Leishmania* y VIH en las CDs module la expresión de varias moléculas de superficie celular, la inhibición de la función de estas células, la producción de factores solubles, el retraso de la fusión lisosomal y las actividades de muerte intracelular (Garg y col., 2007). Cuando las CDs y los macrófagos encuentran antígenos, procesan y muestran sus péptidos en sus superficies y migran hacia los órganos linfoides más cercanos donde presentan estos péptidos a las células T vírgenes. La infección de las CDs y los macrófagos con *Leishmania* y VIH podrían alterar las funciones fisiológicas de estas células, particularmente sus capacidades de procesamiento y presentación antigénica (Kedzierska y Crowe, 2002). Es necesario determinar la importancia de las CDs como reservorios del parásito y el virus, así como también el impacto de la presencia simultánea de ambos patógenos en CDs sobre los individuos co-infectados.

Finalmente, hay que destacar otros hallazgos realizados respecto a las co-infecciones *Leishmania*/VIH, los cuales corresponden a tópicos relativamente poco explorados. Esto incluye niveles elevados de sFas y sFasL en el plasma de pacientes con LV o LV/VIH (Eidsmo y col., 2002); marcado ascenso en los niveles circulantes de la forma soluble del antígeno leucocitario humano G (HLA-G) en pacientes VIH⁺ con o sin LV, una molécula del CPH de clase I con propiedades inmunosupresoras (Donaghy y col., 2007); alto índice de células T CD3⁺ CCR5 en sujetos co-infectados en comparación a individuos sanos o infectados únicamente con uno de los patógenos (Nigro y col., 2007); y la inducción, mediada por *L. major*, de la supervivencia, proliferación y elevación de los niveles de dNTPs en monocitos humanos, promoviendo la aceleración de la co-infección (Mock y col., 2012). En conjunto, estas observaciones recalcan una regulación recíproca entre ambos patógenos en los sujetos co-infectados.

2.3. Respuesta inmune humoral y celular en las co-infecciones *Leishmania*/VIH.

Los pacientes LV/VIH co-infectados tienen un menor título de anticuerpos dirigidos contra *Leishmania* (Mary y col., 1992) y mayor frecuencia a recaídas clínicas tras un tratamiento anti-leishmanial (Alvar, 1994), a diferencia de los casos inmunocompetentes. A pesar de los numerosos casos de co-infección que han sido reportados, son muy pocas las investigaciones detalladas respecto a las respuestas inmunes de estos pacientes.

La quimioterapia exitosa sobre la LV en pacientes no inmunocomprometidos disminuye la carga antigénica a través de la destrucción parasitaria, logrando reducir los títulos séricos de anticuerpos específicos y no específicos y restaurar la inmunidad específica mediada por las células T (Haldar y col., 1983). Parece no haber una respuesta inmune específica protectora en muchos de

aquellos con una co-infección *L. infantum*/VIH, incluso seguido de un tratamiento con compuestos antimoniales pentavalentes. Esto explicaría por qué, en sujetos VIH⁺, la respuesta clínica y parasitológica al tratamiento anti-leishmanial es muy pobre (Medrano y col., 1992) y la frecuencia a las recaídas post-tratamientos es muy alta (Alvar, 1994).

Aunque los resultados del IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Technique) en una investigación realizada por Liew y O'Donnell (1993) indicaron que 5 de 14 casos de co-infección evaluados tuvieron un alto título de anticuerpos anti-leishmaniales, éstos no fueron capaces de controlar la propagación del parásito. Los 9 casos restantes exhibieron títulos de anticuerpos específicos que fueron bajos o indetectables mediante IFAT, reflejándose el valor limitado de esta técnica para la diagnosis de la leishmaniasis en pacientes VIH⁺. Kubar y col. (1998) revelaron más casos seropositivos (11 de 13) cuando fueron chequeados por inmunoblot; se confirmó que los casos co-infectados presentaron una respuesta humoral débil o parcial en comparación a la respuesta presente en los casos inmunocompetentes de LV, tal como reportó previamente Mary y col. (1992). El bajo título de anticuerpos generalmente observado no es consecuencia de la terapia sino del resultado de una inmunidad afectada por la infección con VIH. Las respuestas de las células B oligoclonales serían consecuencia de la ausencia de células T que fuesen capaces de reconocer antígenos de *Leishmania* específicos o de estimular a las células B. Esta pérdida de anticuerpos específicos ha sido descrita para otras infecciones en pacientes VIH⁺ (Biggar y col., 1987; Chamot y col., 1990).

Los humanos infectados con *L. infantum* y VIH son capaces de establecer una respuesta de células T en contra de los parásitos tras el tratamiento anti-leishmanial, pero esta respuesta se pierde a medida que la infección viral progresa y a menudo es seguida por recaídas de la infección parasitaria. La co-infección induce el esparcimiento incontrolable del parásito y la elevación de la replicación del virus. Es necesario que se desarrollen tratamientos efectivos contra el parásito sin que éstos puedan promover la replicación viral y viceversa (Alvar y col., 1998).

2.4. Efecto de las citoquinas en la patogénesis de las co-infecciones *Leishmania*/VIH.

Algunas de las interacciones que ocurren entre la infección viral y las enfermedades parasitarias pueden ser anticipadas por la inmunología de las infecciones parasitarias en humanos y los efectos conocidos del VIH sobre el sistema inmune de su hospedero. La infección viral acarrearía la pérdida o el no desarrollo de la inmunidad protectora, favoreciendo la proliferación no restringida de los parásitos, mientras que la estimulación parasitaria de las células hospederas

que están crónica o latentemente infectadas con el virus provocaría un incremento de la replicación del VIH o sus productos proteicos.

La resolución de la LC se correlaciona con el desarrollo de una respuesta inmune celular Th1 exitosa impulsada por la expresión del TNF- α (Antonelli y col., 2005) e iNOS (Serarslan y Atik, 2005), mediada por la IL-12 y el IFN- γ , produciéndose NO y muerte parasitaria (Qadoumi y col., 2002). De igual forma, la susceptibilidad ha sido atribuida a una sobreproducción de citoquinas asociadas a una respuesta Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5 e IL-10), los cuales inhiben las citoquinas Th1 e inactivan los macrófagos, conduciendo a la proliferación y supervivencia parasitaria (Antonelli y col., 2005). Así pues, en la leishmaniasis cutánea, causada por *L. major*, la sanación en ratones resistentes está asociada con el desarrollo de células Th1 CD4⁺ que producen el IFN- γ (Scott, 1989; Scott y col., 1989; Afonso y Scott, 1993; Scharton-Kersten y col., 1995). En contraste, los ratones susceptibles producen IL-4 tempranamente, promoviendo el desarrollo y expansión de las células Th2 (Scott, 1989; Scott y col., 1989; Himmelrich y col., 2000). Sin embargo, en la LV el rol de las citoquinas Th1 y Th2 en la resistencia y susceptibilidad, respectivamente, no es tan evidente debido a que ambos tipos de citoquinas se han detectado en pacientes con LV, mostrándose diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad (Tripathi y col., 2007).

Estudios *in vitro* han revelado que los amastigotes de *L. infantum* dentro de conjugados celulares CD/T amplifican la replicación del VIH-1; esto fue atribuido a la generación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) por las CDs infectadas (Garg y col., 2009). Con relación a esta observación, la inducción de la replicación del virus por *L. donovani* en células T CD4⁺ infectadas latentemente con el VIH-1 mostró ser dependiente del TNF- α , ya que el bloqueo de esta citoquina, a través de la inyección de talidomida, previno la replicación viral (Wolday y col., 1999).

Se ha mostrado en macrófagos derivados de monocitos humanos (Zhao y col., 2004a) y en tejido de amígdalas humanas cultivado *ex vivo* (Zhao y col., 2004b) que *L. infantum* no ejerce efecto directo sobre la expresión genética del virus sino que modula el ciclo de vida del VIH-1 a través de un fenómeno indirecto que está enlazado a la inducción o elevación del TNF- α y la IL-1 α ; esto funcionaría de una forma autocrina/paracrina para regular positivamente la expresión genética viral mediante la inducción del NF- κ B (Griffin y col., 1989; 1991). Para pacientes co-infectados se ha propuesto que el incremento en la producción de citoquinas inducido por el parásito tendría efecto sobre la producción del virus no solo en monocitos/macrófagos sino también en células T CD4⁺ infectadas con el VIH-1 (Zhao y col., 2004b).

Los estudios sugieren que la infección viral alteraría las respuestas de las células T frente a *Leishmania*. Por ejemplo, se ha demostrado que el VIH ejerce influencia sobre la respuesta de los PBMCs a los antígenos de *Leishmania*. El tratamiento de PBMCs derivados de individuos sanos con antígenos del VIH redujo la proliferación inducida por *L. donovani* así como también aquella promovida por la proteína purificada derivativa (PPD) de una manera dosis-dependiente (Wolday y col., 1994; Wolday y col., 2000); esta respuesta celular disminuida quizás sea debido a que la conocida señal inductora para el IFN- γ está ausente o probablemente sea provocado por la influencia directa de citoquinas Th2 anti-inflamatorias. Análisis de la producción *ex vivo* de citoquinas por células monocíticas de sangre periférica derivadas de pacientes *L. infantum*/VIH-1 co-infectados reveló mayor liberación de la IL-4 e IL-10 en comparación a pacientes VIH⁺ no parasitados (Nigro y col., 1999). Todos estos datos sugieren que un cambio hacia el tipo Th2 de la respuesta inmune específica de las células T a *Leishmania* ocurre en pacientes con defectos inducidos por el VIH en los linfocitos T, lo cual explicaría parcialmente la alta susceptibilidad a la infección parasitaria, la mayor severidad de la manifestación clínica y el por qué ocurre la reactivación frecuente de la leishmaniasis en estos pacientes (Cacopardo y col., 1996).

La estimulación de PBMCs provenientes de pacientes VIH⁺ con antígenos de *Leishmania* resultó en la producción de bajos niveles del IFN- γ y altos niveles de IL-4 e IL-10 (Zijlstra y col., 2003). De igual forma, la producción de la IL-12 e IL-18, citoquinas claves para la inducción de una respuesta Th1 robusta, en los PBMCs es más baja en pacientes con LV, infectados con el VIH o LV/VIH co-infectados en contraste a los individuos sanos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que el efecto inhibitorio del VIH y la LV sobre la producción del IFN- γ podría no ser únicamente dependiente del efecto anti-inflamatorio de las citoquinas Th2, sino que estaría relacionado al efecto del VIH en la regulación negativa de factores inductores del IFN- γ , tales como la IL-12 e IL-18. La co-infección de PBMCs aisladas de sujetos sanos con *L. donovani* y VIH provocó una elevación de los niveles de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-10) y una disminución de la producción de citoquinas Th1 (IL-12 e IFN- γ) (Wolday y col., 2000), un resultado que se correlaciona con las observaciones realizadas por Nigro y col. (1999).

Otra citoquina que parece ser modulada en las co-infecciones *Leishmania*/VIH es la IL-15, una molécula importante que eleva las respuestas de las células T CD8⁺ y la producción de citoquinas que incrementan la respuesta inmune protectora frente a parásitos intracelulares (Milano y col., 2002). Se han reportado bajos niveles de la IL-15 en los sueros de pacientes VIH⁺ e inmunocomprometidos. Curiosamente, se detectaron niveles elevados de la IL-15 en pacientes

LV/VIH⁺ y LV/VIH⁻ con respuestas clínicas y parasitológicas a la terapia. Estos hallazgos indican que existe una relación entre la IL-15 con la enfermedad y la respuesta a la terapia, sugiriendo que esta citoquina jugaría un rol crítico en las co-infecciones *Leishmania*/VIH (*d'Ettorre y col., 2006*).

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β), un potente inhibidor de la respuesta inmune, está sobre-expresado en las infecciones con VIH y por tanto podría contribuir a las deficiencias inmunes observadas (*Kekow y col., 1990*). Sin embargo, esta citoquina es un supresor de la expresión del VIH en células pro-monocíticas crónicamente infectadas y macrófagos derivados de monocitos (*Poli y col., 1991*). El TGF- β es producido por macrófagos murinos expuestos a *L. braziliensis* y causa susceptibilidad a leishmaniasis sintomática (*Barral y col., 1993*). Por consiguiente, en teoría, los individuos co-infectados, quienes parecen tener menor concentración sérica del TGF- β al compararse a los sujetos infectados únicamente con el VIH, deberían tener una menor supresión de su VIH y también menor probabilidad de desarrollar leishmaniasis sintomática (*Olivier y col., 2003*). La pregunta que surge es ¿puede el tratamiento anti-leishmanial de los casos co-infectados, al reducir la concentración sérica del TGF- β , provocar una elevación de la replicación viral en los macrófagos? (*Medrano y col., 1998a*).

Las citoquinas pro-inflamatorias también se han implicado en la patogénesis de las co-infecciones *Leishmania*/VIH, tal como mencionábamos previamente. Una investigación en España comparó los niveles de citoquinas pro-inflamatorias en el suero de pacientes co-infectados con aquellos presentes en pacientes VIH⁺: el nivel del TNF- α fue mayor, y permaneció alto tras la recuperación de la LV, en individuos co-infectados (*Olivier y col., 2003*). Asimismo, monocitos latentes infectados con el VIH-1 produjeron altas cantidades del TNF- α cuando fueron re-estimulados con antígenos de *Leishmania* tanto *in vitro* (*Bernier y col., 1995*) como *in vivo* (*Medrano y col., 1998b*), generándose un incremento de la replicación viral. El efecto patológico del TNF- α en pacientes co-infectados otorgaría una explicación para la elevada viremia, disminución del número de células T CD4⁺ y aumento de la seroconversión manifestada en estos individuos (*Medrano y col., 1998a, b*). Al respecto, *Olivier y col. (2003)* destacaron que las infecciones oportunistas durante la infección del VIH conducirían a la producción de citoquinas pro-inflamatorias durante la etapa de la inmunodeficiencia, acelerándose así la progresión de la enfermedad viral.

En resumen, la co-infección con el VIH tiene el potencial de afectar negativamente el curso de la leishmaniasis a medida que la inmunosupresión progresa ya que se promueve la diseminación parasitaria, localización atípica, manifestaciones clínicas más severas e inusuales (por ejemplo, la

visceralización de la enfermedad), retraso de la sanación, pobre respuesta al tratamiento, recurrencias más frecuentes de la enfermedad y dificultad de la diagnosis, independientemente de la especie participante. La principal causa de estas atribuciones sería el cambio a una respuesta Th2 predominante, impulsada por la desregulación inmune del hospedador al ser infectado con el VIH, lo cual socava la respuesta Th1 que es característica de individuos con LC/VIH⁺.

3. Justificación.

A través de los años se ha expandido el solapamiento de las distribuciones geográficas de *Leishmania* y VIH, incrementándose las localidades donde puedan establecerse co-infecciones. Desde finales de los 80 la co-infección *Leishmania*/VIH ha sido reportada en 35 países (Alvar y col., 2008). Ambos patógenos comparten mecanismos inmunopatológicos, comprometiendo la integridad de CDs y monocitos/macrófagos. Otras células del sistema inmune, tales como los linfocitos T y B, también manifiestan perturbación de sus actividades, aunque no puedan ser co-infectadas. Esto finalmente contribuye a la amplificación de la replicación de ambos patógenos, acelerándose la progresión de la enfermedad viral y parasitaria.

Los individuos co-infectados manifiestan una sintomatología más severa e inusual. Actualmente, el tratamiento de los pacientes co-infectados se caracteriza por una baja eficiencia. La inmunosupresión causada por el VIH provoca retrasos en la sanación y numerosas recaídas post-tratamiento anti-leishmanial. El parásito potencia la patogenicidad del virus agravando aún más el estado de inmunosupresión de los sujetos.

El desarrollo de una terapia que permita controlar e incluso reprimir la progresión de ambos patógenos parece ser una tarea imposible. La principal causa de ello se encuentra en los muy escasos estudios donde se ha analizado la co-infección *Leishmania*/VIH; la mayoría de las investigaciones son de carácter clínico o epidemiológico. En nuestro proyecto estudiamos la co-infección *in vitro* desde un punto de vista molecular: examinamos el funcionamiento de los elementos participantes en la co-infección y determinamos la expresión o activación de una serie de moléculas que participan en él. La detección de proteínas implicadas en la co-infección *Leishmania*/VIH tendría aplicación en la fijación de dichas moléculas que funcionarían como blancos para terapia, diagnóstico o marcadores de progresión de enfermedad. Creemos que el establecimiento de un sistema *in vitro* mediante el cual podamos describir los eventos que transcurren durante una co-infección *Leishmania*/VIH tiene un gran potencial: a través de éste y otros proyectos subsecuentes se podría identificar y describir una gran red de procesos bioquímicos y celulares que transcurren en la co-infección, permitiendo una mejor comprensión del sistema.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Se plantea como objetivo general de este proyecto emplear un sistema de co-infección *L. donovani*/VIH *in vitro*, para identificar los diferentes eventos celulares y moleculares que se desarrollan.

4.2. Objetivos específicos.

- Definir el impacto de la presencia simultánea de *L. donovani* y VIH sobre la viabilidad celular y la formación de sincitios en linfocitos MT-4 y monocitos primarios.
- Evaluar el efecto del VIH sobre la proliferación e infectividad de *L. donovani* y viceversa en linfocitos MT-4 y monocitos primarios incubados con ambos patógenos.
- Determinar los niveles de expresión de los receptores de superficie CXCR4 y CCR5, la activación del factor de transcripción NF- κ B y la secreción de citoquinas/quimioquinas en linfocitos MT-4, monocitos primarios y células mononucleares de sangre periférica expuestas a *L. donovani* y VIH.

5. Metodología.

En este estudio establecimos un sistema de co-infección *L. donovani*/VIH que ofrece dos ventajas importantes; *L. donovani* es considerada el agente etiológico de la LV en Asia, África y Europa Oriental, regiones seriamente afectadas por la leishmaniasis, con un alto índice de mortalidad (WHO, 2014). Primero, empleamos una cepa de VIH de tropismo dual, capaz de infectar linfocitos T y monocitos primarios. Segundo, las condiciones experimentales relacionadas a la proporción célula:parásito y la multiplicidad de infección están ajustadas de tal manera que nos permite apreciar efectos significativos en un mismo período de tratamiento. Así pues, en nuestro modelo podremos realizar una comparativa de las respuestas desarrolladas por los linfocitos T y monocitos primarios entre los distintos grupos de tratamiento sin la dependencia del tiempo y la cepa viral. Adicionalmente, gracias a nuestro ensayo de determinación de la viabilidad celular, el cual se describe más adelante, podemos garantizar que no existen diferencias en esta variable entre los variados grupos de tratamiento establecidos en todos los experimentos.

5.1. Cultivo de células.

Los parásitos que fueron utilizados en todos los experimentos pertenecieron a la especie *L. donovani*, cepa DD8. Los promastigotes se cultivaron a temperatura ambiente en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con penicilina (100U/mL), estreptomicina (10.000 μ g/mL), 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (SFBi) y bicarbonato de sodio (2g/L). Para todos los ensayos se emplearon cultivos de promastigotes en fase estacionaria de

crecimiento a una proporción célula:parásito de 1:10, exceptuando aquellos experimentos donde se señalen otras condiciones.

En nuestra investigación dispusimos de las células MT-4, PBMCs y monocitos primarios derivados de la sangre para la ejecución de los experimentos. Las células MT-4 se originaron a partir de un aislamiento de células T leucémicas de un paciente (*Harada y col., 1985*). Todas las células se cultivaron en medio RPMI 1640, suplementado tal como se describió previamente, y mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

5.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica.

Las muestras de sangre derivadas de individuos sanos se añadieron en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. En tubos estériles de 15mL añadimos 5mL de Ficoll Hypaque y luego cuidadosamente, sin romper el gradiente, agregamos 10mL de sangre. Centrifugamos los tubos a 300 x g por 20min y obtuvimos tres fases. Con cuidado extrajimos la banda perteneciente a los PBMCs, localizada entre el plasma y el Ficoll, los cuales fueron lavados con PBS (1X) dos veces antes de sembrarse en los frascos de cultivo. Los monocitos primarios se separaron del resto de las poblaciones celulares en los PBMCs mediante adherencia a los frascos de cultivo tras 24h de siembra; antes de la ejecución de los experimentos los monocitos se mantuvieron en medio de cultivo por un período de 96h más para permitir que se estabilicen, expandan su tamaño y alcancen un nuevo estado de reposo.

5.3. Obtención del VIH AZT-resistente.

El virus se obtuvo a través del programa de reactivos para VIH/SIDA del Instituto Nacional de Higiene (NIH-USA). El VIH AZT-resistente es muy útil por ser un virus X4 y R5, es decir, tiene la habilidad de infectar linfocitos T y monocitos/macrófagos, respectivamente (*Larder y col., 1989*). Los virus fueron aislados de los sobrenadantes de cultivos de células MT-4 (3 x 10⁶ células/20mL de medio), infectados con 500µL de stock viral durante 72h, congelándose el sobrenadante viral libre de células a -70°C. Adicionalmente, obtuvimos el sobrenadante de un cultivo similar de células MT-4 tras 72h, aunque éstas no fueron infectadas, con el objetivo de evaluar el posible impacto que pueda ejercer este medio condicionado sobre las variantes a analizar: esto fue denominado como “control sobrenadante” en los ensayos. La titulación del virus se realizó a través de un kit comercial de ELISA p24 que describiremos más adelante, usando diluciones seriadas para ello. En todos los experimentos agregamos una dilución del VIH que nos posibilitó alcanzar una multiplicidad de infección de 10. Los sobrenadantes derivados de cultivos celulares no infectados se diluyeron de forma idéntica para fines comparativos.

5.4. Determinación de la viabilidad de células incubadas con *L. donovani* y VIH.

En este experimento analizamos la viabilidad de los monocitos primarios y linfocitos MT-4 tras ser expuestos a *L. donovani* y/o VIH. Sembramos $2,5 \times 10^5$ (linfocitos MT-4) o 5×10^5 (monocitos primarios) células/pozo en placas de 6 pozos; el volumen final fue 4mL. La siembra de *L. donovani* respondió a las relaciones célula:parásito de 1:5 y 1:10. Cuantificamos el número de células viables cada 24h durante 6 días mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano. Las diferentes condiciones experimentales examinadas fueron las siguientes:

Tabla I: Tratamientos desarrollados para la determinación de la viabilidad celular en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control célula	Monocitos/Linfocitos T + medio de cultivo
Control sobrenadante	Monocitos/Linfocitos T + medio condicionado
Efecto parasitario	Monocitos/Linfocitos T + <i>L. donovani</i> (proporciones célula:parásito de 1:5 y 1:10)
Efecto viral	Monocitos/Linfocitos T + VIH
Efecto de co-incubación	Monocitos/Linfocitos T + <i>L. donovani</i> (proporción célula:parásito de 1:10) + VIH

5.5. Evaluación de la formación de sincitios en células expuestas a *L. donovani* y VIH.

En este ensayo cuantificamos los sincitios inducidos por el VIH en presencia o ausencia del parásito con la finalidad de valorar el impacto de *L. donovani* sobre la propagación del virus en un cultivo de células MT-4. Sembramos 30.000 linfocitos MT-4/pozo en una placa de 96 pozos; el volumen final en cada pozo fue 200µL. Realizamos diluciones seriadas del virus para evaluar la dosis dependencia (10^{-1} - 10^{-8}). A continuación, los tratamientos desarrollados para este experimento:

Tabla II: Condiciones experimentales empleadas para la evaluación de la formación de sincitios en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control célula	Linfocitos T + medio de cultivo
Control sobrenadante	Linfocitos T + medio condicionado
Control parásito	Linfocitos T + <i>L. donovani</i>
Efecto viral	Linfocitos T + VIH (distintos m.o.i.)
Efecto de co-incubación	Linfocitos T + VIH (distintos m.o.i.) + <i>L. donovani</i>

El número de sincitios se cuantificó mediante microscopía de contraste de fases tras 24, 48 y 72h de incubación; consideramos a sincitio como cualquier célula que posea un tamaño considerablemente superior al resto de la población celular y varios núcleos. También verificamos cualquier otro tipo de efecto citopático apreciable.

5.6. Cuantificación de la producción del antígeno p24 en células incubadas con *L. donovani* y VIH.

En este ensayo procedimos a estimar el impacto de *L. donovani* sobre la replicación del VIH en los monocitos primarios y linfocitos T (MT-4). Para ello determinamos la producción de p24 en sobrenadantes de cultivos infectados mediante el kit de medición Bioelisa HIV-1+2 Ag/Ab (Biokit, Barcelona/España), de acuerdo a las indicaciones del fabricante (protocolo 3000-1172). Sembramos 30.000 monocitos primarios o linfocitos MT-4/pozo en una placa de 96 pozos, siendo el volumen final de 200µL. Las incubaciones de los monocitos/linfocitos T con el parásito, virus o ambos se efectuaron durante 72h. Los tratamientos incluidos en este experimento fueron:

Tabla III: Procesos experimentales para la cuantificación de la producción del antígeno p24 en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control células	Monocitos/Linfocitos T + medio de cultivo
Control sobrenadante	Monocitos/Linfocitos T + medio condicionado
Control parásito	Monocitos/Linfocitos T + <i>L. donovani</i>
Efecto viral	Monocitos/Linfocitos T + VIH
Efecto de co-incubación	Monocitos/Linfocitos T + VIH + <i>L. donovani</i>

5.7. Valoración del impacto del VIH sobre la infectividad y replicación intracelular de *L. donovani* en monocitos primarios.

Con la finalidad de estimar el efecto de la infección viral sobre la infectividad parasitaria en monocitos derivados de la sangre desarrollamos un ensayo que nos facultó cuantificar el porcentaje de monocitos infectados por *L. donovani* en los diferentes grupos de tratamiento. Sembramos 30.000 monocitos primarios/cámara en placas de cuatro pozos a un volumen final de 500µL. La infección viral tuvo una duración de 72h aunque realizamos dos lavados con PBS a las 24h para eliminar los viriones que no lograron penetrar la célula; aplicamos el mismo procedimiento para aquellas células tratadas con el sobrenadante derivado de un cultivo celular (MT-4) no infectado o el medio de cultivo. Posteriormente, las células fueron infectadas con el parásito por 48h a una proporción célula:parásito de 1:5; previo a la infección parasitaria lavamos las cámaras con PBS para eliminar cualquier elemento celular y/o viral que se encuentre en el medio extracelular. Tras completarse las 48h hicimos dos lavados con PBS e incubamos las células infectadas con *L. donovani* por 24h más.

Transcurrido el lapso de 6 días de tratamiento descartamos el sobrenadante de cultivo de cada cámara y fijamos las células en la placa con metanol puro durante 3 minutos. A continuación, efectuamos la tinción de Giemsa vertiendo el colorante, el cual se diluyó 1/10 en agua destilada,

sobre las placas con las células fijadas, incubándose durante 15 minutos. Secamos las placas y visualizamos las células por microscopía de luz con objetivo de inmersión a 1000X: escogimos diez campos al azar en cada cámara y establecimos el porcentaje de monocitos infectados con *L. donovani* en cada tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tabla IV: Ensayos experimentales para el estudio del impacto de la infección viral sobre la infectividad parasitaria monocítica.

Tratamiento	Descripción
Control células	Monocitos en medio de cultivo
Control sobrenadante	Infección parasitaria de monocitos pre-tratados durante 72h con medio condicionado
Control parasitario	Infección parasitaria de monocitos pre-tratados durante 72h con medio de cultivo
Efecto de co-infección	Infección parasitaria de monocitos pre-infectados durante 72h con VIH

Con respecto a la determinación de la replicación intracelular parasitaria, la metodología fue muy similar. No obstante, en este caso la incubación de los monocitos primarios con *L. donovani* más medio de cultivo, medio condicionado o VIH duró 72h empleando la relación célula:parásito de 1:5. Posteriormente realizamos dos lavados con PBS y procedimos a realizar la tinción Giemsa, tal como se describió previamente. Los amastigotes intracelulares fueron cuantificados a través de la microscopía con objetivo de inmersión a 1000X.

5.8. Evaluación del efecto del sobrenadante de cultivos de linfocitos T infectados con el VIH sobre la replicación de *L. donovani*.

Aunque el parásito *Leishmania* no infecta a los linfocitos MT-4, es posible que su replicación sea modulada en presencia de sobrenadantes de cultivos de linfocitos T infectados con el virus. Para este experimento sembramos 1×10^6 promastigotes o 2×10^6 amastigotes de la especie *L. donovani*, obtenidos de cultivos en fase exponencial de crecimiento, en placas de 6 pozos a un volumen final de 4mL; los promastigotes se incubaron a temperatura ambiente mientras que los amastigotes se mantuvieron a 37°C. Efectuamos un conteo del número de parásitos presentes en los pozos cada 24h durante 10 días a través de una cámara de Neubauer y el colorante azul de tripano (0,4%). Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

Tabla V: Tratamientos incluidos para la evaluación de la replicación parasitaria en sobrenadantes de cultivos de linfocitos MT-4 infectados con el virus.

Tratamiento	Descripción
Control parásito	Parásitos + medio de cultivo
Control sobrenadante	Parásitos + medio condicionado (dilución ½)
Efecto de co-incubación	Parásitos + medio condicionado derivado de un cultivo celular infectado con VIH (dilución ½)

5.9. Determinación de la expresión de superficie de los receptores CXCR4 y CCR5 en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Los cambios en la expresión de determinados receptores de superficie contribuirían a la potenciación de la infectividad viral y parasitaria en las co-infecciones *Leishmania*/VIH. En este ensayo determinamos los niveles de expresión en la superficie de CXCR4 y CCR5, dos receptores de entrada para el VIH en linfocitos T y monocitos/macrófagos, respectivamente. Sembramos monocitos primarios o linfocitos MT-4 en placas de seis pozos (1×10^6 células/4mL de medio) y se procedió a los siguientes tratamientos durante 72h:

Tabla VI: Experimentos para la determinación de la expresión de receptores de entrada viral en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control células	Monocitos/Linfocitos T + medio de cultivo
Control sobrenadante	Monocitos/Linfocitos T + medio condicionado
Efecto parasitario	Monocitos/Linfocitos T + <i>L. donovani</i>
Efecto viral	Monocitos/Linfocitos T + VIH
Efecto de co-incubación	Monocitos/Linfocitos T + VIH + <i>L. donovani</i>

Luego, colectamos el contenido de cada pozo y realizamos dos lavados con PBS, con la finalidad de remover cualquier elemento extracelular que pudiera generar alteraciones en las mediciones. Los pellets fueron resuspendidos en 100µL de medio de cultivo, transfiriéndose a placas de 96 pozos. Después, añadimos los anticuerpos anti-hCXCR4 (linfocitos MT4) y anti-hCCR5 (monocitos primarios) (R&D Systems, Minneapolis/USA): adicionalmente establecimos pocillos únicamente con medio de cultivo más anticuerpo como blanco del ensayo. Dichos anticuerpos tienen conjugado el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC).

La incubación con los anticuerpos se desarrolló durante 45 minutos a temperatura ambiente, oscuridad y agitación constante a una concentración final de 20mM, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Finalmente, efectuamos un lavado con PBS para eliminar el anticuerpo excedente que no pudo asociarse. A través del fluorímetro Infinite F200 medimos la fluorescencia en los diferentes grupos de tratamiento. El FITC tiene un pico máximo de excitación y emisión de 490nm y 520nm, respectivamente.

5.10. Estimación de la activación del NF-κB en la co-infección *L. donovani*/VIH.

El rol del NF-κB en la activación de la transcripción de los genes del VIH se ha estudiado ampliamente. La translocación al núcleo de este factor de transcripción fue examinado en los linfocitos MT-4 y monocitos primarios mediante el kit ELISA RelA (p65) NF-κB (FivePhoton Biochemicals, California/USA), siguiendo las instrucciones del fabricante⁶. Empleamos un kit de

fraccionamiento nuclear-citoplasmático para analizar la activación del NF- κ B al determinar los niveles de p65 en el núcleo y citoplasma⁷. Sembramos 1×10^6 monocitos primarios o linfocitos MT-4/pozo en placas de 6 pozos con un volumen final de 4mL. En este procedimiento incluimos los siguientes tratamientos que se ejecutaron durante 72h:

Tabla VII: Tratamientos realizados para la estimación de la activación del NF- κ B en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control células	Monocitos/Linfocitos T + medio de cultivo
Control sobrenadante	Monocitos/Linfocitos T + medio condicionado
Efecto parasitario	Monocitos/Linfocitos T + <i>L. donovani</i>
Efecto viral	Monocitos/Linfocitos T + VIH
Efecto de co-incubación	Monocitos/Linfocitos T + VIH + <i>L. donovani</i>

5.11. Análisis del perfil de citoquinas/quimioquinas en la co-infección *L. donovani*/VIH.

En nuestro experimento analizamos el perfil de 12 citoquinas/quimioquinas con la finalidad de correlacionar las diferentes mediciones realizadas con los niveles obtenidos de estas proteínas. Las citoquinas/quimioquinas a ser evaluadas son IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β 1, MCP-1, RANTES y MIP-1 α . Sembramos $2,5 \times 10^5$ PBMCs/pozo en placas de 96 pozos a un volumen final de 200 μ L, los cuales fueron tratados durante 72h de la siguiente manera:

Tabla IX: Pruebas experimentales para el análisis del perfil de citoquinas/quimioquinas en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Tratamiento	Descripción
Control células	PBMCs + medio de cultivo
Efecto parasitario	PBMCs + <i>L. donovani</i>
Efecto viral	PBMCs + VIH
Efecto de co-infección	PBMCs + VIH + <i>L. donovani</i>

Luego, empleamos el kit Multi-Analyte ELISArray (QIAGEN, Maryland/USA), siguiendo las instrucciones del fabricante⁸. Los sobrenadantes de cada cultivo tratado fueron colectados y depositados en una placa de 96 pocillos recubiertos con anticuerpos específicos para cada citoquina/quimioquina, determinándose los niveles de éstos mediante absorbancia a 450nm en un lector de microplaca de multidetección.

6. Resultados.

6.1. Viabilidad de linfocitos MT-4 y monocitos primarios expuestos simultáneamente a *L. donovani* y VIH.

A través de un ensayo de exclusión de azul de tripano logramos evaluar la viabilidad de linfocitos MT-4 y monocitos primarios que fueron incubados con *L. donovani* y VIH. Debemos aclarar que el medio de cultivo no cambió su coloración con ningún tratamiento/día, es decir, la muerte celular no fue provocada por posibles variaciones radicales del pH indirectamente vinculadas a alta actividad metabólica y presunto agotamiento de nutrientes. La reducción de la viabilidad celular se observa en los linfocitos MT-4 (Fig.8A) desde el cuarto día de tratamiento en los grupos infectados con VIH y co-incubados con *L. donovani*/VIH en comparación al control, aunque solo se presentaron diferencias de la viabilidad celular entre ambos conjuntos a partir del quinto día. Curiosamente, aunque *L. donovani* no infecta linfocitos T, la viabilidad celular disminuyó ligeramente en los cultivos incubados con el parásito durante 6 días; sin embargo, esto sólo ocurrió cuando se aplicó la relación célula:parásito de 1:10. Evidentemente, la infección con VIH ejerció un efecto citopático más potente que *L. donovani*, observándose un mayor y más acelerado decrecimiento del número de células viables. La incubación con ambos patógenos resultó en una mayor disminución de la viabilidad desde el quinto día. La declinación de la viabilidad celular en los grupos tratados con *L. donovani*, VIH o ambos fue de 11,15%, 70,38% y 83,63% al contrastarse con el control tras 6 días de tratamiento. Adicionalmente, la siembra de linfocitos MT-4 en medio condicionado aumentó sutilmente la proliferación celular durante el sexto día.

Los cambios de la viabilidad monocítica fueron diferentes a los descritos en los linfocitos MT-4 (Fig.8B). Es importante destacar la menguada capacidad proliferativa de los monocitos primarios, donde apenas se elevó el número de células viables en 49,4% aproximadamente tras 6 días de siembra en medio de cultivo, a diferencia del incremento de casi 3000% observado en los linfocitos MT-4. Los cambios de la viabilidad de monocitos se detectaron de forma más tardía, con una reducción significativa del número de células viables en las infecciones individuales y simultáneas durante el quinto día. En este caso, existen disimilitudes de la viabilidad de monocitos parasitados con diferentes proporciones célula:parásito durante el sexto día. A diferencia de lo visualizado en los linfocitos MT-4, las infecciones virales y parasitarias provocaron efectos similares sobre la viabilidad monocítica. Además, la co-infección *L. donovani*/VIH derivó en una mayor muerte celular durante el sexto día. El descenso de la viabilidad celular en los cultivos monocíticos infectados con *L. donovani* (proporciones célula:parásito de 1:5 y 1:10), VIH o ambos

fue de 42,88%, 60,78%, 57,16% y 85,68% al compararse con el grupo control tras 6 días de tratamiento. La siembra de monocitos primarios en medio condicionado no modificó su viabilidad.

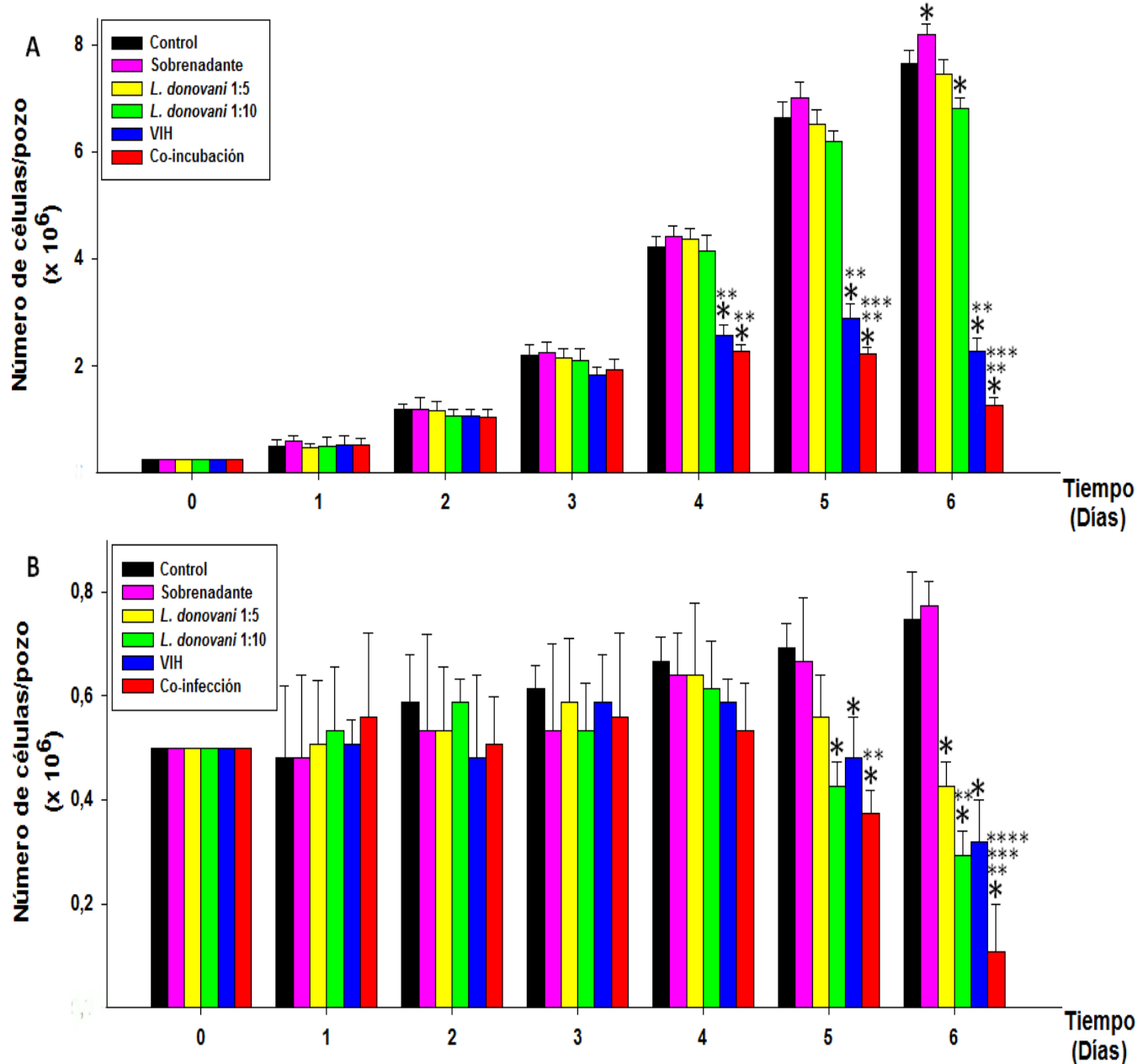


Figura 8: Impacto de la presencia simultánea de *L. donovani* y VIH sobre la viabilidad celular. Los linfocitos MT-4 ($2,5 \times 10^5$ células/pozo) (A) y monocitos primarios (5×10^5 células/pozo) (B) fueron expuestos a *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:5 y 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10). En la co-infección solo se estableció la proporción célula:parásito de 1:10. Los monocitos/linfocitos T sin tratamiento representan el control negativo mientras que el tratamiento con medio condicionado evaluó el efecto del vehículo que alberga el virus. El número de células viables fue cuantificado cada 24h durante 6 días mediante un ensayo de exclusión de azul de tripano. Las barras representan la media $\pm$ la desviación estándar derivada de tres réplicas. Panel A: *, ** y *** $p < 0,05$ comparado a células no tratadas, incubadas con *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) e infectadas con VIH, respectivamente. Panel B: *, **, *** y **** $p < 0,05$ comparado a células no tratadas, infectadas con *L. donovani* (relación 1:5 y 1:10) y VIH, respectivamente.

6.2. Variaciones inducidas por *L. donovani* sobre la formación de sincitios generados por la infección viral en los linfocitos MT-4.

Examinamos el efecto de *L. donovani* sobre la formación de sincitios inducidos por el VIH en los linfocitos MT-4 ya que estos representan uno de los mecanismos por el cual el virus se disemina. De acuerdo a la Fig.9, la inducción de sincitios es dependiente de la m.o.i. y el tiempo de incubación. A las 72h dichas dependencias sólo se aprecian en las m.o.i. de 0,05-5. Inclusive, hay una disminución del número de sincitios detectados a las 72h en la m.o.i. de 500 para ambos grupos de tratamiento en contraste al día anterior. Para la m.o.i. de 50 a 72h, el número de sincitios

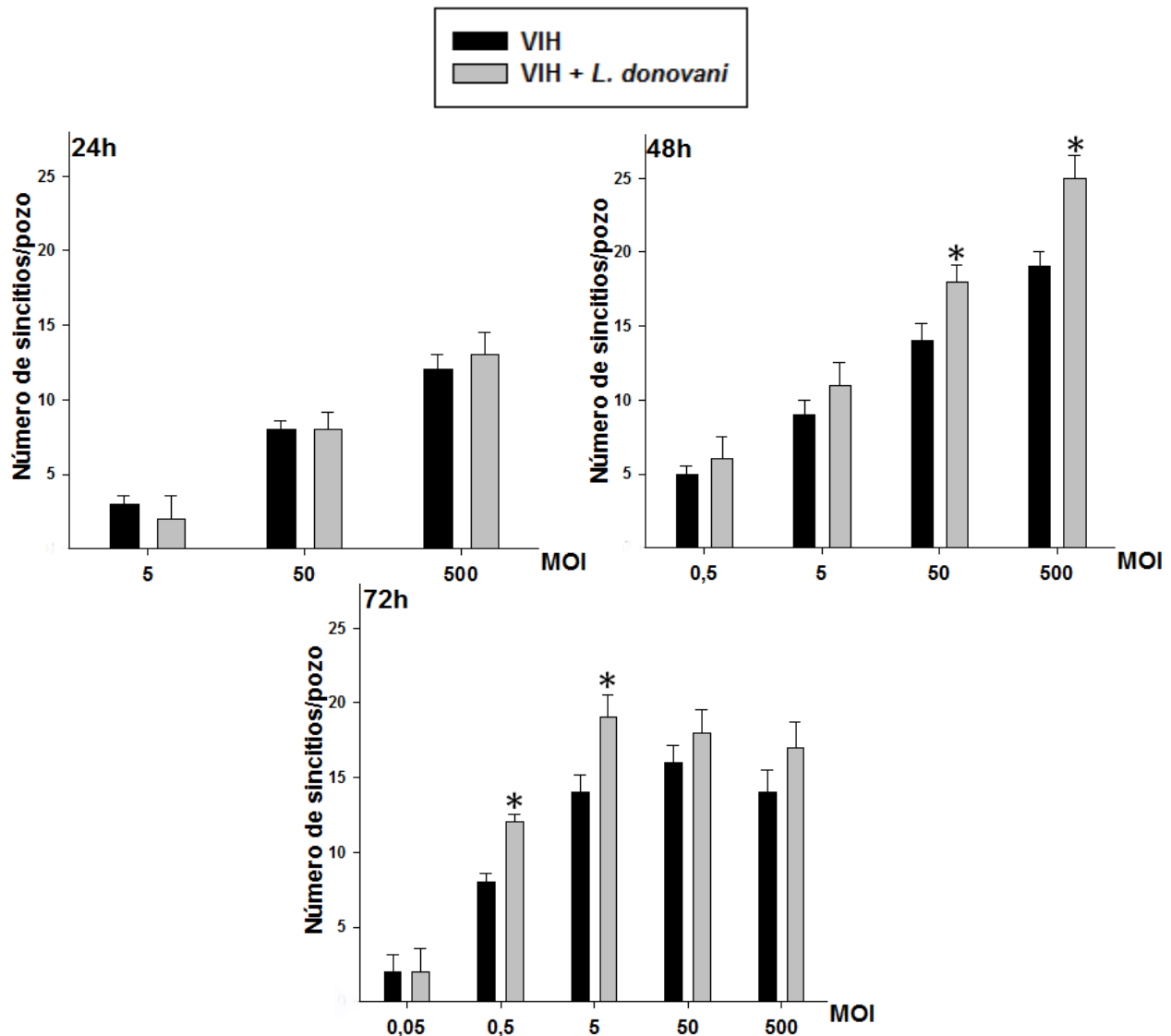


Figura 9: Variaciones impulsadas por *L. donovani* sobre la formación de sincitios inducidos por el VIH. Los linfocitos MT-4 (3×10^4 células/pozo) fueron tratados con *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (diferentes m.o.i.). Se cuantificaron los sincitios mediante microscopía de contraste de fases cada 24h durante tres días. Las barras representan la media $\pm$ la desviación estándar derivada de tres réplicas. * $p < 0,05$ comparado a células infectadas con VIH.

se mantuvo invariable en la co-incubación mientras que hubo un tenue crecimiento del mismo en la infección viral al compararse con el día anterior; es muy probable que ocurran reducciones del número de sincitios para las m.o.i. menores a 500 en tiempos de incubación superiores a las 72h.

La co-incubación de linfocitos MT-4 con *L. donovani* y VIH produjo un acrecentamiento del número de sincitios obtenidos, sugiriendo que el parásito promueve la propagación viral posiblemente al facilitar la fusión de linfocitos T. Las desigualdades entre ambos grupos de tratamiento se manifestaron a partir de las 48h y dependen de la m.o.i.: el incremento del número de sincitios en las co-incubaciones ocurrió en las m.o.i. de 50/500 y 0,5/5 para las 48h y 72h, respectivamente. La acrecencia del número de sincitios en presencia del parásito osciló entre 30-50% dependiendo del tiempo de tratamiento y la m.o.i.

6.3. Efecto de *L. donovani* sobre la replicación del VIH en linfocitos MT-4 y monocitos primarios.

Cuantificamos la producción del antígeno p24 en linfocitos MT-4 y monocitos primarios con la finalidad de establecer una correlación entre la generación del antígeno y la replicación viral durante la co-infección (Fig.10). La presencia simultánea de *L. donovani* y VIH fue capaz de aumentar la producción de p24 en 41,85% y 93,59% en linfocitos MT-4 y monocitos primarios, respectivamente, al compararse con células infectadas únicamente con el virus, demostrándose que

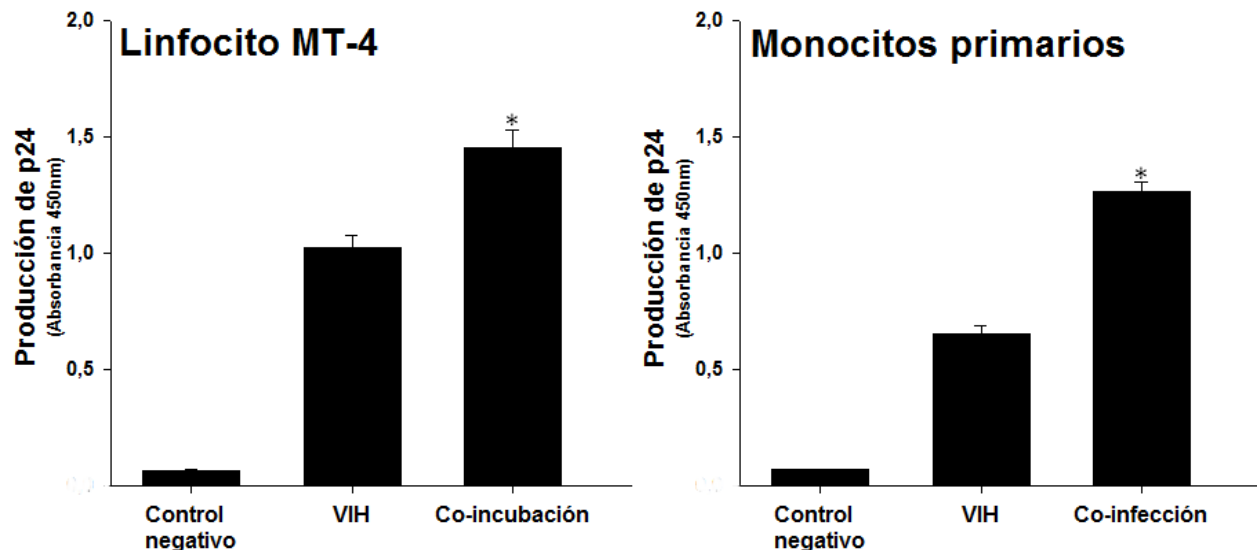


Figura 10: Efecto de *L. donovani* sobre la producción de la proteína viral p24. Los linfocitos MT-4 y monocitos primarios (3×10^4 células/pozo) se incubaron en presencia de *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10) durante 72h, cuantificándose la producción de p24 mediante un ensayo ELISA. Los controles consistieron de células sembradas en medio de cultivo y condicionado, en conjunto con un control negativo otorgado por el kit. Las barras representan la media $\pm$ la desviación estándar derivada de tres réplicas. * $p < 0,01$ comparado a células infectadas con VIH.

L. donovani potencia la replicación viral, inclusive sin infectar la célula. Los monocitos/linfocitos T no tratados, parásitos y el medio condicionado no perturbaron las mediciones ya que se obtuvieron absorbancias similares al del control negativo provisto por el kit (*data no mostrada*). En adición, el control positivo, constituido por un suero humano que contiene p24 recombinante, funcionó correctamente (*data no mostrada*).

6.4. Efecto del VIH sobre la replicación e infectividad de *L. donovani*.

Varias investigaciones han revelado que el VIH promueve la replicación intracelular de *L. donovani* en las co-infecciones. De hecho, una de las principales características de los sujetos co-infectados es la alta parasitemia detectada. Al establecerse un nuevo modelo de co-infección *in vitro* hemos decidido desarrollar un experimento similar, evaluándose el efecto del VIH sobre la multiplicación intracelular de *L. donovani* en monocitos primarios extraídos de un individuo sano. La Fig.11 señala que durante la co-infección *L. donovani*/VIH de monocitos primarios se amplificó significativamente la replicación intracelular parasitaria al detectarse un mayor número de amastigotes intracelulares mediante la tinción Giemsa. Por su parte, la incubación de monocitos primarios parasitados con medio condicionado, obtenido a partir de un cultivo de linfocitos MT-4 no infectado con el virus, no modificó la variable analizada.

La amplificación de la replicación intracelular de *L. donovani* en monocitos podría ser causada por un incremento de la permisividad a la infección parasitaria. Según la Fig.11, el porcentaje de monocitos parasitados aumentó casi 21% cuando fueron pre-infectados con el VIH, sugiriendo que el virus hace a los monocitos más permisivos a la infección parasitaria, aunque a través un mecanismo desconocido. Es curioso notar que, a pesar de emplear una relación célula:parásito de 1:5, apenas el ~50% de monocitos pre-incubados en medio de cultivo fueron parasitados. El pre-tratamiento de los monocitos con medio condicionado no alteró la infectividad monocítica de *L. donovani* (Fig.11, *sobrenadante*).

Adicionalmente, indagamos el efecto de los sobrenadantes de cultivos de linfocitos MT-4 infectados con VIH sobre la misma variable. Ciertamente, *L. donovani* no infecta linfocitos T pero esto no impide que estas células no puedan secretar elementos proteicos o de otra naturaleza que modifiquen la proliferación parasitaria extracelular. En efecto, la Fig.12A destaca que la incubación de promastigotes en sobrenadantes extraídos de cultivos celulares infectados con VIH acrecentó notablemente la replicación parasitaria; se observaron diferencias significativas tan pronto como al segundo día de tratamiento. Sorpresivamente, los sobrenadantes derivados de cultivos MT-4 no infectados también produjeron un efecto potente sobre la multiplicación parasitaria, aunque en

menor magnitud y a partir del tercer día. A partir del séptimo día la velocidad de proliferación de *L. donovani* en sobrenadantes de cultivos infectados con el virus se reduce, esto evidenciado por una caída en la pendiente de la curva; inclusive, al décimo día no existen diferencias en el conteo de parásitos obtenidos con los medios condicionados de cultivos infectados o no.

Mediciones similares fueron realizadas con amastigotes de *L. donovani* (Fig.12B), apreciándose ciertas diferencias. En efecto, los sobrenadantes derivados de cultivos infectados o no con el virus indujeron un aumento de la replicación parasitaria, siendo este efecto más intenso y veloz en el grupo de amastigotes incubados con sobrenadantes de cultivos MT-4 infectados con VIH, tal como ocurrió con los promastigotes. Adicionalmente, la estimulación de dichos medios

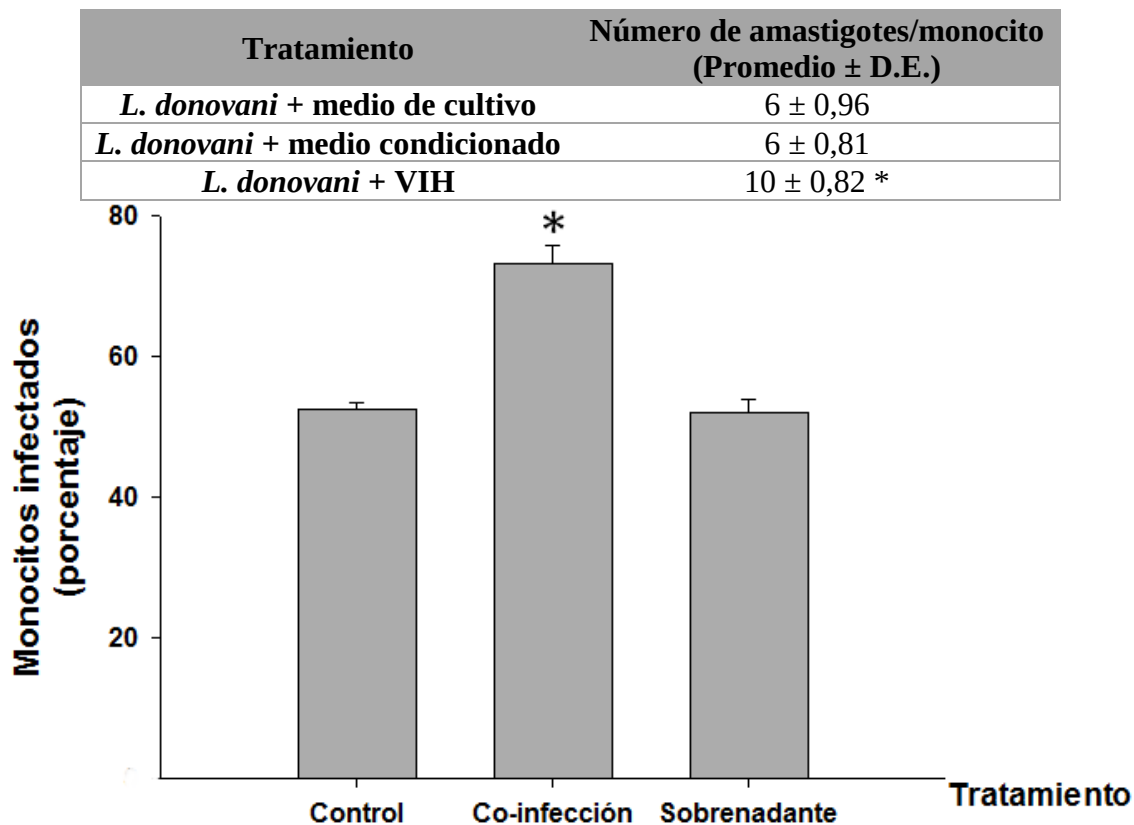


Figura 11: Variación de la replicación e infectividad parasitaria monocítica inducida por el VIH. *Panel superior:* Los monocitos primarios (3×10^4 células/cámara) se incubaron durante 72h con *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:5) más medio de cultivo, medio condicionado o VIH (m.o.i.=10). Luego, los amastigotes intracelulares fueron visualizados y cuantificados gracias a la tinción Giemsa y la microscopía. Las barras representan la media ± la desviación estándar derivada de cuatro réplicas. * $p < 0,01$ comparado a monocitos únicamente parasitados en medio de cultivo. *Panel inferior:* Los monocitos primarios (3×10^4 células/cámara) fueron incubados durante 72h en medio de cultivo, medio condicionado o infectados con VIH (m.o.i.=10). Posteriormente, las células se infectaron con *L. donovani* (relación célula:parásito de 1:5) por 72h más. Finalmente, realizamos la tinción Giemsa y establecimos el porcentaje de monocitos parasitados mediante microscopía de luz con objetivo de inmersión. Las barras representan la media ± la desviación estándar derivada de tres réplicas. * $p < 0,01$ comparado a células parasitadas pre-incubadas en medio de cultivo.

condicionados sobre la proliferación parasitaria es más retrasada y atenuada al comparar amastigotes con promastigotes. De hecho, la replicación de los amastigotes en medio de cultivo es considerablemente más lenta en contraste a los promastigotes, donde no evidenciamos disminución de la velocidad de replicación durante los diez días de ensayo.

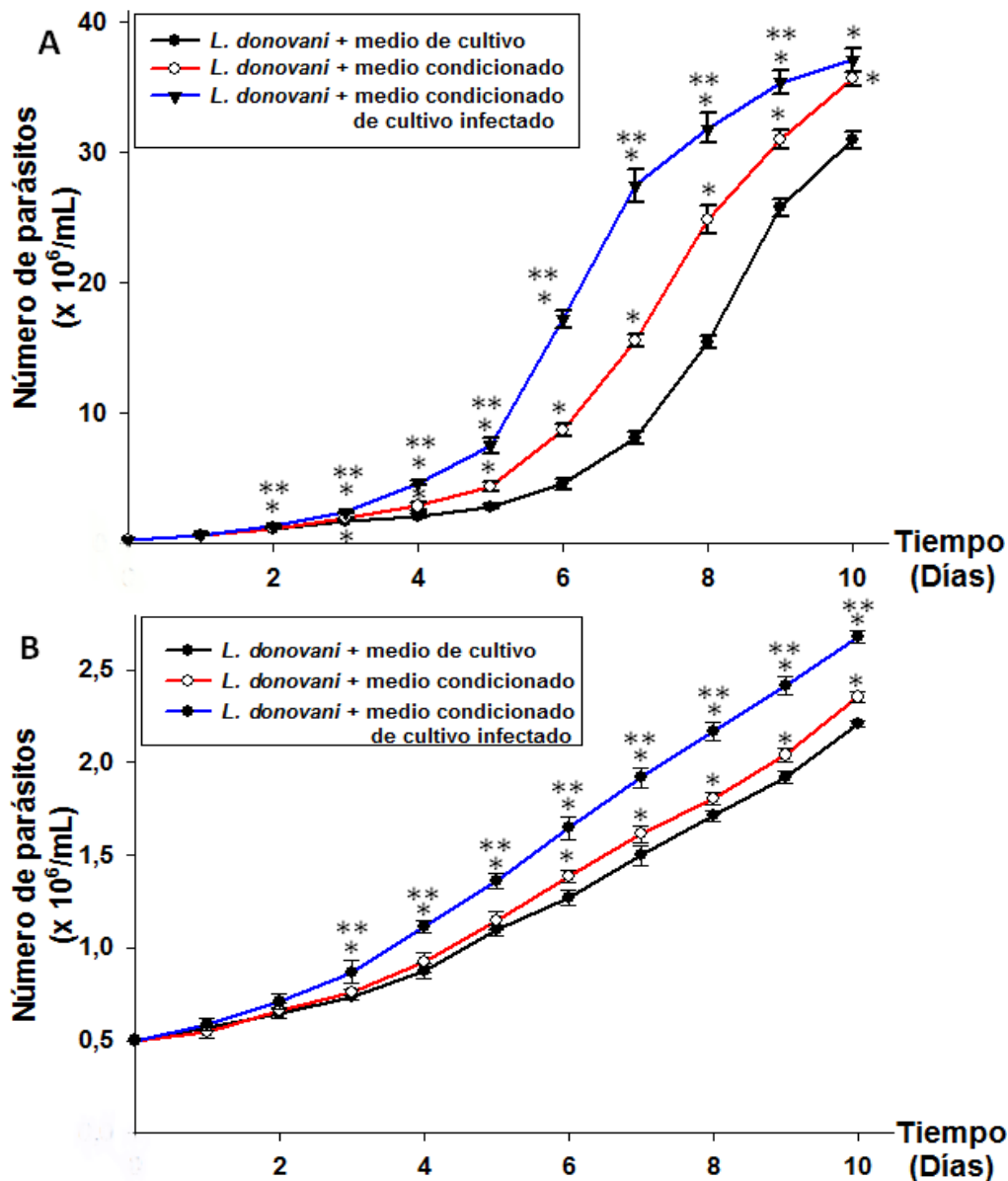


Figura 12: Efecto del sobrenadante de cultivos de linfocitos MT-4 infectados con el VIH sobre la proliferación de *L. donovani*. Promastigotes (1×10^6 parásitos/pozo/4mL; A) o amastigotes (2×10^6 parásitos/pozo/4mL; B) de *L. donovani* fueron incubados con el sobrenadante (dilución $\frac{1}{2}$) derivado de un cultivo de linfocitos MT-4 infectado con VIH a temperatura ambiente o 37°C , respectivamente. Adicionalmente, establecimos controles donde el parásito es incubado con medio de cultivo o el sobrenadante de un cultivo celular similar aunque no infectado. Realizamos un conteo del número de parásitos presentes en los pozos cada 24h durante 10 días a través de una cámara de Neubauer. Los datos están representados como la media $\pm$ la desviación estándar derivada de tres réplicas. * y ** $p < 0,05$ comparado a parásitos sembrados en medio de cultivo y medio condicionado, respectivamente.

6.5. Expresión de los receptores de superficie CXCR4 y CCR5 tras la exposición de linfocitos T y monocitos primarios a *L. donovani* y VIH.

Gracias al uso de anticuerpos específicos conjugados a FITC logramos detallar las variaciones de la expresión a nivel de superficie de los co-receptores de entrada viral CXCR4 (linfocitos MT-4) y CCR5 (monocitos primarios), tras la incubación de las células con *L. donovani* y/o VIH.

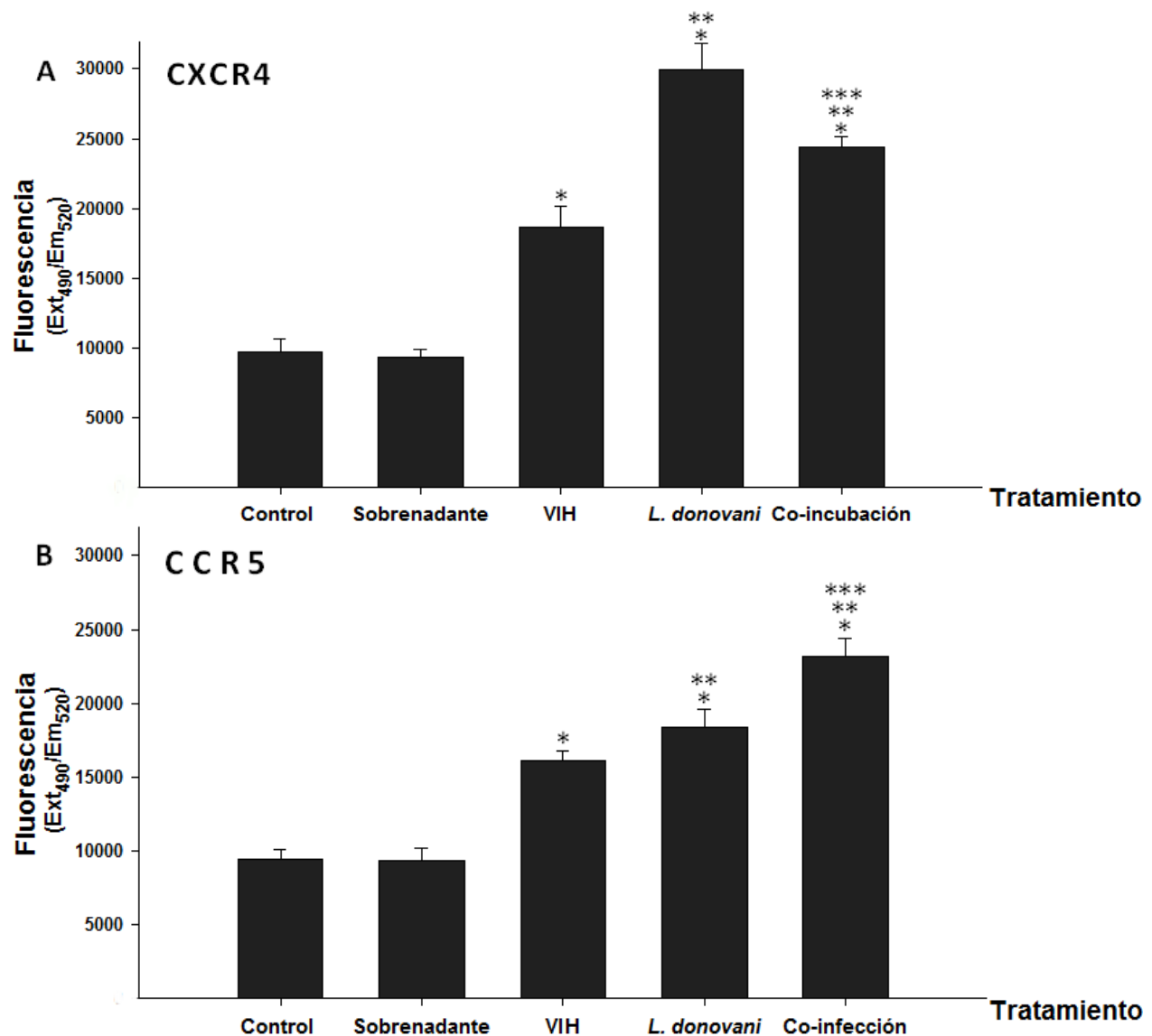


Figura 13: Expresión de los receptores CXCR4 y CCR5 en la co-incubación/co-infección *L. donovani*/VIH. Los linfocitos MT-4 (A) y monocitos primarios (B) (1×10^6 células/pozo) fueron expuestos durante 72h a *L. donovani* (relación célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10), examinándose la expresión de superficie de CXCR4 y CCR5, respectivamente, mediante anticuerpos específicos conjugados a FITC. Adicionalmente, establecimos controles de células incubadas en medio de cultivo y condicionado. Las barras representan la media $\pm$ la desviación estándar derivada de cuatro réplicas. * y *** $p < 0,01$ comparado a células no tratadas e incubadas con *L. donovani*, respectivamente; ** $p < 0,05$ comparado a células expuestas a VIH.

La expresión de superficie de CXCR4 fue elevada significativamente conforme a lo observado en la *Fig.13A*; dicha expresión fue significativamente mayor en los linfocitos MT-4 tratados con *L. donovani* a diferencia de aquellos infectados con el virus. La co-incubación de los linfocitos MT-4 con ambos patógenos también potenció la expresión de dicho receptor, aunque no alcanzó los niveles obtenidos con el tratamiento parasitario; sin embargo, sí fueron mayores a los observados en la infección viral. El aumento de la expresión observada fue, respecto al control, de 91,85%, 207,58% y 150,93% para los grupos tratados con el virus, parásito o ambos, respectivamente. En adición, el tratamiento de los linfocitos MT-4 con medio condicionado no indujo cambios en la expresión de CXCR4.

La variación de la expresión de superficie de CCR5 en los monocitos primarios presentó características similares a lo contemplado con CXCR4 (*Fig.13B*); hubo un aumento significativo en los niveles de expresión de superficie de esta proteína cuando los monocitos fueron infectados con *L. donovani* o VIH, siendo ésta mayor en los monocitos parasitados. No obstante, en este caso la co-infección *L. donovani*/VIH consiguió una elevación aún mayor en los niveles de expresión de CCR5. La elevación de la expresión fue con relación al control de 71,31%, 94,57% y 145,71% para los grupos tratados con el virus, parásito o ambos, respectivamente. Asimismo, el medio condicionado no logró modificar la variable analizada en los monocitos. Colectivamente, estos hallazgos sugieren que la presencia de *L. donovani* amplifica la infectividad del VIH a través del incremento de la expresión de los co-receptores de superficie de entrada viral CXCR4 y CCR5.

6.6. Activación del NF- κ B en linfocitos T y monocitos primarios incubados con *L. donovani* y VIH.

El NF- κ B es un factor de transcripción nuclear central en la respuesta inmune frente a numerosos patógenos. Inclusive, puede asociarse a los LTRs del ADN proviral e impulsar la expresión de los genes del VIH. Su activación fue valorada a través de la obtención de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de linfocitos MT-4 (*Fig.14A*) y monocitos primarios (*Fig.14B*), tratados con *L. donovani* y/o VIH, en los cuales se cuantificaron los niveles proteicos de p65 mediante un ensayo ELISA. En la *Fig.14* se muestra que la concentración proteica del NF- κ B es mayor en el citoplasma y núcleo de los linfocitos MT-4 al compararse con los monocitos primarios, independientemente del grupo de tratamiento (*A* vs *B*). No es una observación sorpresiva si consideramos que las líneas celulares generalmente poseen una actividad metabólica superior a aquella presente en células sanguíneas no estimuladas; además, recordemos que el número de linfocitos T viables tras 72h, en cualquier grupo de tratamiento, es superior al compararse con los

monocitos. Es crucial advertir que las fracciones citoplasmáticas y nucleares no son equiparables ya que son obtenidas en dos volúmenes finales muy diferentes. Por ejemplo, podríamos destacar que hay una mayor concentración del NF- κ B en el núcleo de linfocitos MT-4 en contraste al citoplasma; esto es falso, ya que la fracción nuclear se colecta en 60 μ L de volumen mientras que la citoplasmática es adquirida en 500 μ L, por tanto la proteína nuclear está más concentrada.

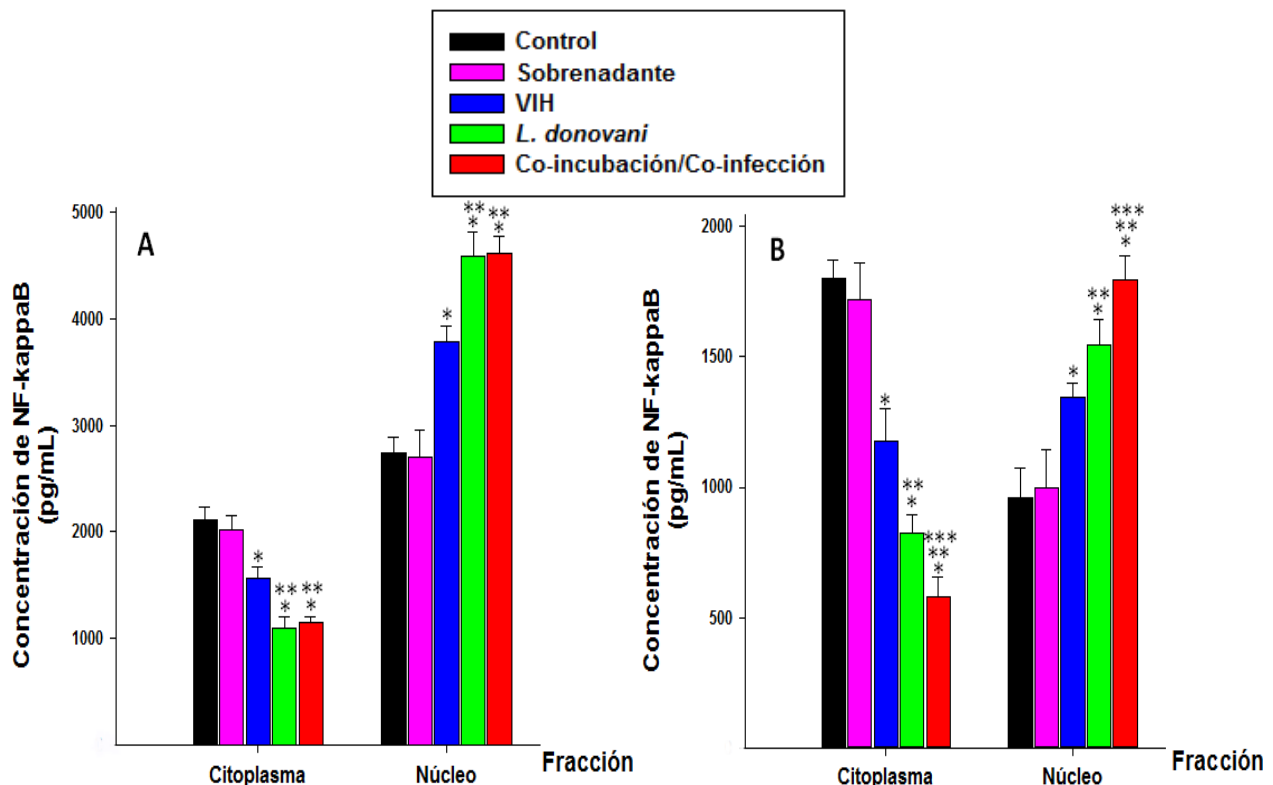


Figura 14: Activación del NF- κ B en la co-incubación/co-infección *L. donovani*/VIH. La fracción citoplasmática y nuclear del NF- κ B fue extraída de linfocitos MT-4 (A) y monocitos primarios (B) (1×10^6 células/pozo) incubados durante 72h con *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10). Establecimos controles de células incubadas en medio de cultivo y medio condicionado. Los niveles del NF- κ B fueron determinados mediante un kit ELISA, obteniéndose las concentraciones proteicas a través de una curva de calibración con un péptido estándar. Las barras representan la media $\pm$ la desviación estándar derivada de tres réplicas. * p < 0,01 comparado a células no tratadas; ** y *** p < 0,05 comparado a células expuestas a VIH y *L. donovani*, respectivamente.

La incubación de linfocitos MT-4 con *L. donovani* y/o VIH provocó la activación del NF- κ B (Fig.14A), esto demostrado por una reducción de sus niveles citoplasmáticos y acrecencia de aquellos nucleares respecto al control. La activación de dicha proteína fue mayor en linfocitos MT-4 expuestos al parásito que aquellos infectados con VIH, lo cual es llamativo considerando que precisamente es el parásito quien no puede penetrar la célula. La incubación con ambos patógenos activó la molécula a un nivel superior al de las células infectadas con el virus, pero fue similar al de aquellas incubadas con el parásito. La disminución de los niveles proteicos del NF- κ B

citoplasmático fue de 26,37%, 48,02% y 45,86% para los grupos tratados con VIH, *L. donovani* o ambos, respectivamente, al compararse con el control. Asimismo, la elevación de los niveles del NF- κ B nuclear fue de 38,42%, 67,4% y 68,72%, siguiendo el mismo orden. En adición, el medio condicionado no ejerció efecto sobre la variable analizada.

La co-infección *L. donovani*/VIH también activó NF- κ B en los monocitos primarios (Fig.14B). Se observó una mayor activación en los monocitos parasitados a diferencia de aquellos infectados con el virus, tal como ocurre con los linfocitos MT-4. No obstante, a diferencia de éstos, la co-infección provocó una activación aún mayor. La concentración del NF- κ B citoplasmático decreció 34,79%, 54,44% y 67,73% mientras que la nuclear se elevó 40,25%, 61,35% y 87,68% para los monocitos infectados con VIH, *L. donovani* o co-infectados, respectivamente, en comparación al control. De igual forma, el medio condicionado no tuvo impacto sobre la activación de esta proteína.

6.7. Variaciones del perfil de citoquinas/quimioquinas en la co-infección *L. donovani*/VIH.

Los cambios en los perfiles de citoquinas/quimioquinas son relevantes en la co-infección *Leishmania*/VIH dado que influyen en la respuesta inmunitaria. Mediante un ensayo ELISA logramos determinar los niveles de citoquinas/quimioquinas secretadas por PBMCs co-infectados. Debemos destacar que los resultados entre estas moléculas no son equiparables debido a que los valores no están normalizados a unidades de concentración proteica: es decir, valores de absorbancia similares entre citoquinas/quimioquinas no reflejan niveles proteicos semejantes de ellas ya que la sensibilidad de los distintos anticuerpos por sus respectivos antígenos difiere. Adicionalmente, no hubo cambios significativos de la viabilidad de los PBMCs en los diferentes grupos de tratamiento (*data no mostrada*); por tanto, los resultados son comparables dado que el número de células iniciales fue el mismo.

La Fig.15 muestra los niveles de citoquinas pro-inflamatorias derivadas del sobrenadante de PBMCs. La infección parasitaria indujo una secreción elevada de IL-1 α y moderada de IL-12, IFN- γ y TNF- α con respecto al control donde se evidencia una respuesta basal. En el caso de la infección viral se detectó una leve producción de IL-12 e IFN- γ mientras que aquella observada con IL-1 α y TNF- α fue moderada en comparación al control; hubo una reducción de la liberación de estas citoquinas a diferencia del grupo infectado con *L. donovani*, a excepción del TNF- α . En adición, la co-infección *L. donovani*/VIH resultó en una disminución de la generación de IL-1 α , IL-12 e IFN- γ al compararse con el grupo de tratamiento parasitario aunque sus niveles se

mantuvieron superiores a los detectados en el tratamiento viral, exceptuando la IL-12. La producción del TNF- α fue diferente en la co-infección al ser sus niveles superiores en ella, lo cual refleja adición entre los efectos virales y parasitarios.

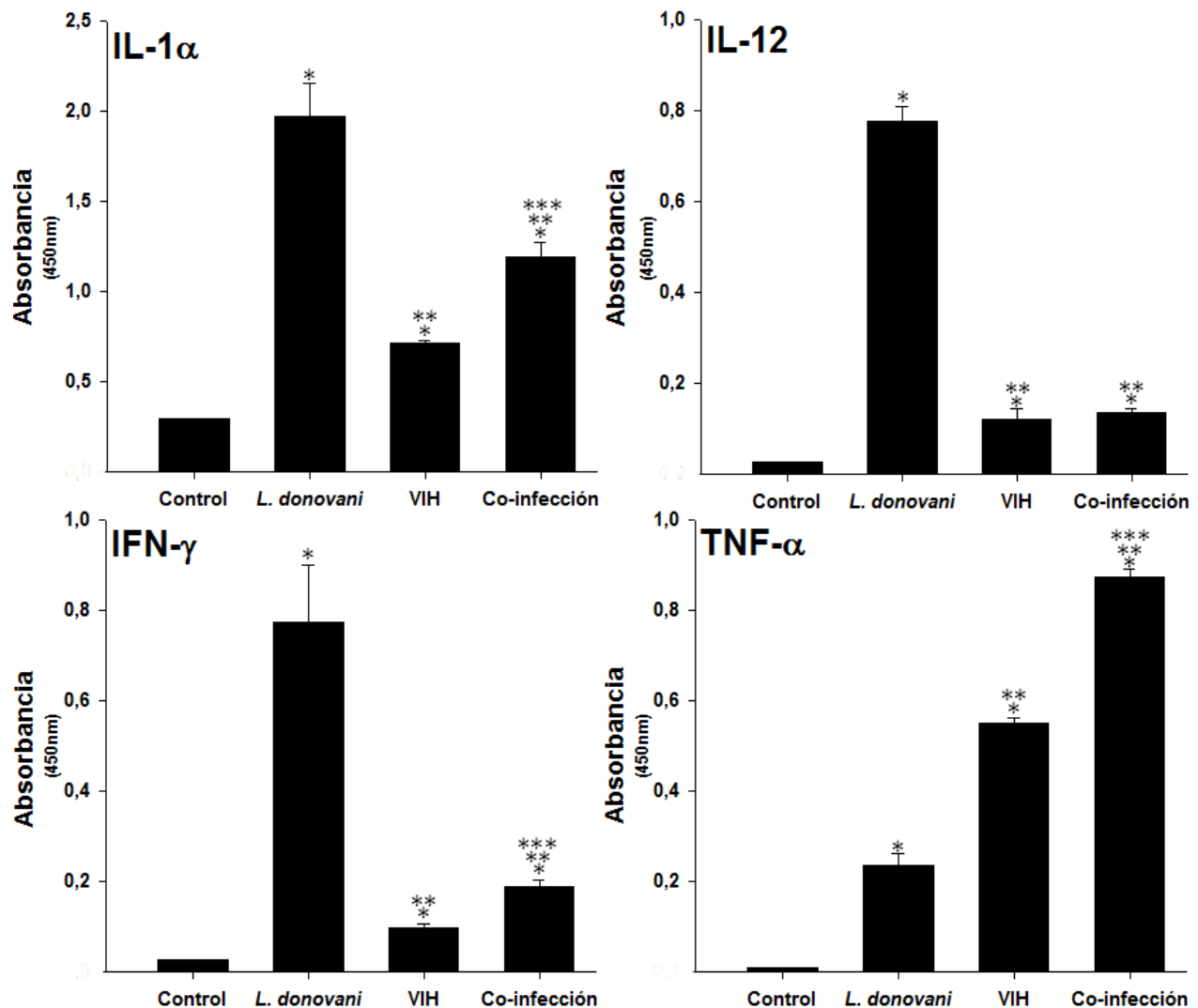


Figura 15: Secreción de citoquinas pro-inflamatorias en la co-infección *L. donovani*/VIH. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) extraídas de un individuo sano ($2,5 \times 10^5$ células/pozo) fueron expuestas a *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10). El control está representado por PBMCs incubados en medio de cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados tras 72h, determinándose los niveles de citoquinas mediante ELISA. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar derivada de duplicados. * $p < 0,01$ comparado al control; ** y *** $p < 0,05$ comparado a PBMCs infectados con *L. donovani* o VIH, respectivamente.

Las citoquinas anti-inflamatorias también fueron evaluadas en la co-infección *L. donovani*/VIH de PBMCs, con resultados más homogéneos (Fig.16). La infección parasitaria indujo la secreción de mayores niveles de IL-4, IL-5, IL-6, TGF- β 1 aunque no de IL-10 en comparación al control; sin embargo, la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6 fue baja, con niveles cercanos

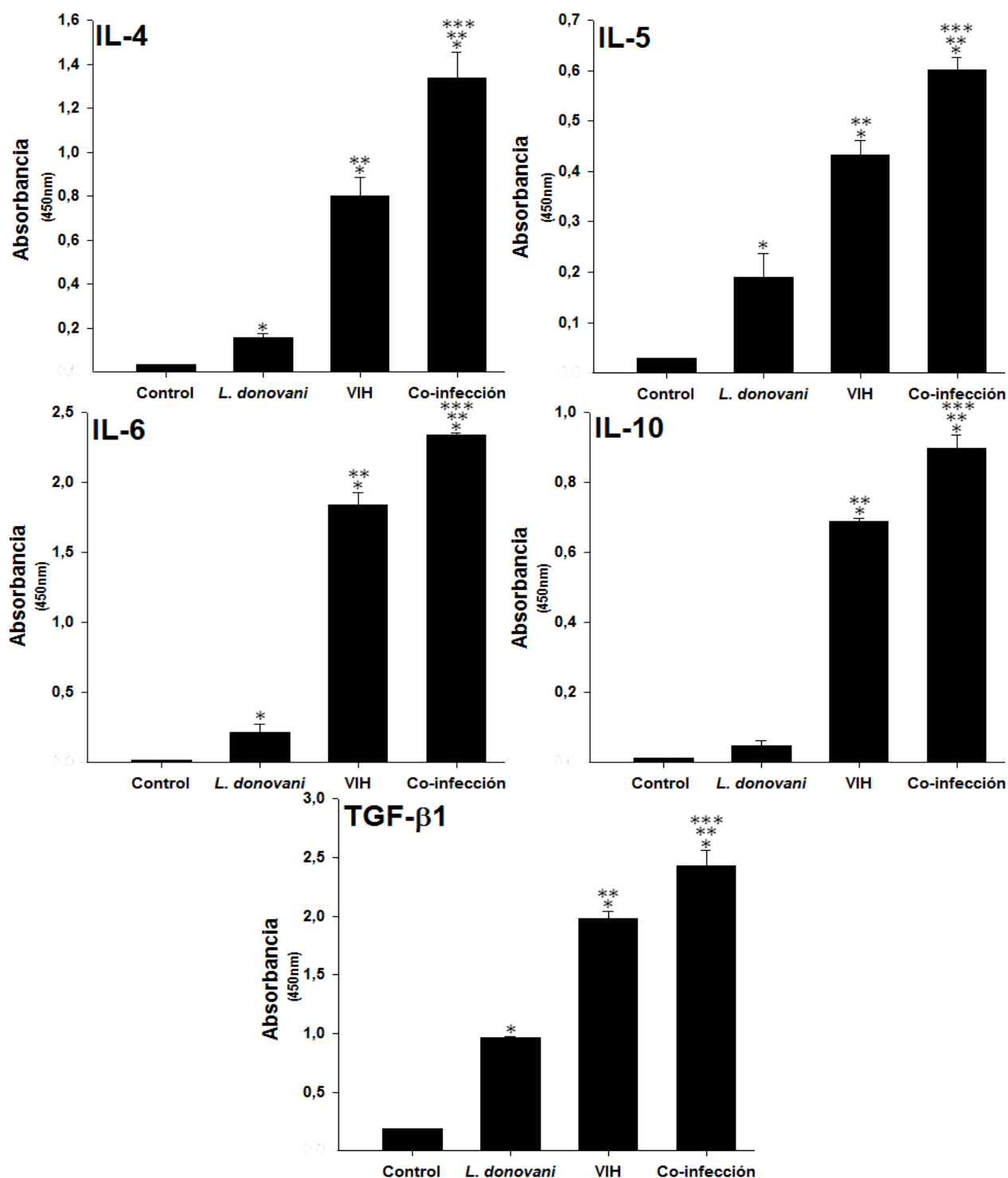


Figura 16: Secreción de citoquinas anti-inflamatorias en la co-infección *L. donovani*/VIH. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) extraídas de un individuo sano ($2,5 \times 10^5$ células/pozo) fueron expuestas a *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10). El control está representado por PBMCs incubados en medio de cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados tras 72h, determinándose los niveles de citoquinas mediante ELISA. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar derivada de duplicados. *, ** y *** $p < 0,05$ comparado al control, PBMCs infectados con *L. donovani* o VIH, respectivamente.

a los basales contemplados en los PBMCs no infectados. La producción de todas las citoquinas anti-inflamatorias examinadas fue moderada/elevada en la infección viral, con niveles significativamente superiores a los contemplados en el tratamiento parasitario. En todos los casos la co-infección *L. donovani*/VIH resultó en una aún mayor liberación de este tipo de citoquinas. En conjunto, estos resultados demuestran un cambio del perfil Th1 a Th2 en las citoquinas secretadas durante la co-infección *L. donovani*/VIH.

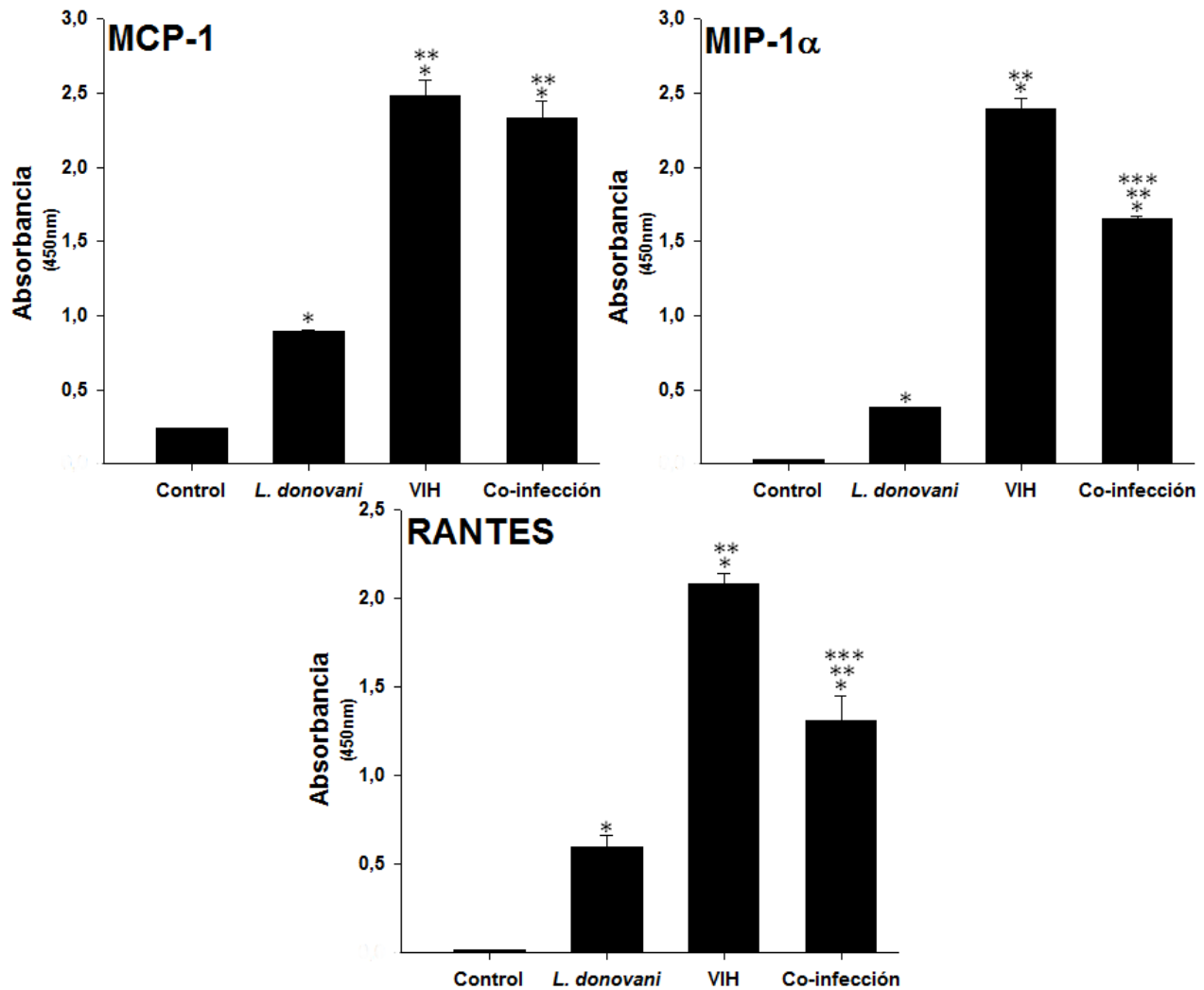


Figura 17: Secreción de quimioquinas en la co-infección *L. donovani*/VIH. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) extraídas de un individuo sano ($2,5 \times 10^5$ células/pozo) fueron expuestas a *L. donovani* (proporción célula:parásito de 1:10) y/o VIH (m.o.i.=10). El control está representado por PBMCs incubados en medio de cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos fueron colectados tras 72h, determinándose los niveles de quimioquinas mediante ELISA. Cada barra representa la media $\pm$ la desviación estándar derivada de duplicados. * $p < 0,01$ comparado al control; ** y *** $p < 0,05$ comparado a PBMCs infectados con *L. donovani* o VIH, respectivamente.

Finalmente, determinamos la producción de MCP-1, MIP-1α y RANTES en PBMCs co-infectados con *L. donovani*/VIH (Fig.17). La infección parasitaria indujo la secreción de

moderados y superiores niveles de estas quimioquinas a diferencia del control de células no infectadas. Lo propio realiza la infección viral, aunque en este caso la generación de dichas quimioquinas fue significativamente mayor a la detectada en el grupo de tratamiento parasitario. Adicionalmente, en la co-infección los niveles de producción de MIP-1 α y RANTES disminuyeron notoriamente al compararse con el tratamiento viral aunque siguió siendo significativamente superior al grupo de PBMCs parasitados, mientras que la respuesta de MCP-1 permaneció invariable con respecto a aquella obtenida en los PBMCs infectados con el VIH.

7. Discusión.

La co-infección *Leishmania*/VIH eleva notablemente el riesgo de desarrollo de leishmaniasis en individuos VIH⁺ ya sea mediante una disminución de la resistencia a una infección primaria o reactivación de una subclínica. Simultáneamente, la infección parasitaria promueve la progresión clínica de la enfermedad viral y el inicio de condiciones definitorias del SIDA. Esto ocurre debido a un efecto perjudicial aditivo sobre las respuestas efectoras de diversas células del sistema inmune.

La presencia simultánea de *Leishmania* y VIH en la misma célula permite el desarrollo de diferentes eventos moleculares que intensifican la retroalimentación positiva entre ambos patógenos (Alvar y col., 2008). Además, también se inician mecanismos variados que desembocan en la muerte de la célula que los alberga. Durante los primeros tres días de incubación no se observaron cambios significativos de la viabilidad celular en los diferentes grupos de tratamiento, independientemente del tipo celular (Fig.8, tercer día). Es necesario recalcar la importancia de este resultado ya que los demás ensayos fueron hechos con tratamientos de 72h; en todos los experimentos realizados ejecutamos adicionalmente ensayos de viabilidad celular donde no se evidenciaron diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento (*data no mostrada*), garantizándonos que los cambios apreciados en las diferentes variables evaluadas en nuestra investigación se deben exclusivamente a la fluctuación misma de la variable y no a alteraciones de la viabilidad celular. Advertimos que la no reducción del número de células viables no necesariamente implicaría que no haya muerte celular ya que se podría establecer un recambio entre el número de células muertas y las nuevas que han sido producidas. Solo en un experimento, donde determinamos el porcentaje de monocitos parasitados, empleamos períodos de incubaciones superiores a las 72h, aunque en este caso desarrollamos varios lavados con PBS y adiciones de medio de cultivo fresco que permitieron mitigar considerablemente la disminución de la viabilidad

celular, permitiéndose la remoción continua de elementos secretados por las células que han mostrado inducir muerte celular.

Curiosamente, *L. donovani* por sí misma provocó una tenue disminución de la viabilidad en los linfocitos MT-4, pese a que no puede infectar este tipo de células (*Fig.8A*): es probable que el parásito interactúe con la célula a nivel de superficie o secrete proteínas que se asocien a receptores de membrana o que logren penetrar la célula. Por ejemplo, el LPG expresado en la superficie de los promastigotes puede ser secretado, alterando eventos de señalización celular e inhibiendo diferentes funciones efectoras protectoras (*Turco, 1999*). Evidentemente, el efecto citopático parasitario es más potente en los monocitos primarios a los que sí puede infectar, siendo éste dependiente del número de parásitos, sugiriendo el desarrollo de mecanismos adicionales iniciados dentro de la célula (*Fig.8B*).

El efecto citopático viral es más acelerado y pronunciado en los linfocitos MT-4 en contraste a los monocitos primarios (4to vs 5to día; 70,38% vs 57,16% de reducción de viabilidad respecto al control en el sexto día de tratamiento, respectivamente) (*Fig.8*). Además, el efecto del VIH sobre la reducción de la viabilidad de los linfocitos T es mayor en comparación al parásito, lo cual probablemente esté asociado a la capacidad del virus de infectar las células, entre otros factores. El ciclo del VIH, mediante la fijación de las células T CD4⁺ como blancos principales de infección, generalmente dura años y permite la generación de nuevas partículas virales. Los nuevos virus al abandonar las células T CD4⁺ masivamente por gemación ocasionan daños irreparables a las células que son inevitablemente destruidas. Cuando los nuevos virus liberados invaden y destruyen otras células T el sistema inmune de la persona infectada se debilita: paulatinamente se produce una disminución del conteo de este tipo de células hasta niveles por debajo de 200 células/ μ L de sangre, lo cual conduce al inicio del SIDA (*Moss, 2013*). Aunque las células T CD4⁺ son importantes blancos del VIH, los monocitos también poseen un papel crucial en la infectividad viral. Los monocitos son células no divisorias que constituyen una de las primeras líneas de defensa contra patógenos. La salida de viriones desde la superficie de los monocitos ocasiona daños celulares mínimos, al ser éstos más resistentes al efecto lítico del virus (*Deneka y col., 2007*); esto explicaría las diferencias previamente referidas. Sin embargo, no solo debemos limitarnos a pensar en la disminución de la viabilidad celular en términos estrictos de la ruptura de la membrana; también podrían dispararse procesos anti-proliferativos y/o apoptóticos. De hecho, logramos observar vesículas citoplasmáticas, encogimiento celular y pérdida de la adhesión a la placa

(monocitos primarios) (*data no mostrada*) tras la exposición a cualquiera de los patógenos, siendo éstos eventos característicos de la apoptosis.

La exposición de linfocitos MT-4 y monocitos primarios a ambos patógenos se manifestó en una adición de los efectos virales y parasitarios (*Fig.8*). Creemos que *L. donovani* potencia los efectos citopáticos del VIH en estas células a través de la estimulación de su replicación (*Fig.10*) y viceversa (*Fig.11*). Dichas replicaciones son a su vez moduladas, en teoría, por las demás variables estudiadas, las cuales serán discutidas más adelante. Sería interesante determinar en investigaciones posteriores exactamente cuáles son los procesos moleculares y elementos participantes que ocasionan una declinación de la viabilidad celular en las co-infecciones *in vitro* e *in vivo*: proponemos la pérdida de la integridad de membrana por la salida continua de los patógenos desde las células, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en la que participan linfocitos B y NK, el inicio de la vía extrínseca apoptótica tras la activación de receptores de muerte mediada por ligandos como el TNF- α (*Fig.15*), el reconocimiento y posterior destrucción de células infectadas por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, entre otros.

Otro efecto citopático evaluado durante la co-infección fue la formación de los sincitios. Sospechamos que una de las razones por las cuales se ha observado una elevada viremia y mayor aceleración a la etapa del SIDA en pacientes co-infectados (*Medrano y col., 1998a, b*) sería la contribución parasitaria sobre la propagación viral. Aunque todavía persiste el debate sobre la función exacta de los sincitios, varios investigadores apuntan a que éstos permiten una propagación viral más efectiva: el VIH se transmite más rápido por contacto celular, evadiendo la respuesta inmune del medio extracelular. En efecto, las variantes SI causan una mayor reducción del conteo de linfocitos T CD4⁺ y aceleran aún más la progresión hacia la etapa del SIDA en los pacientes VIH⁺ (*Connor y col., 1993; Miedema y col., 1994; Blaak y col., 2000*). La variante de VIH utilizada en este estudio indujo sincitios en los cultivos de linfocitos MT-4 con un comportamiento dependiente del tiempo y la m.o.i. (*Fig.9*). En teoría, a medida que la m.o.i. aumenta también lo hace el porcentaje de células infectadas con al menos una partícula viral, lo que se traduciría en una mayor probabilidad de inducción de sincitios. Dicha probabilidad se acrecienta con el tiempo al ser la formación de los sincitios un proceso secuencial de múltiples eventos moleculares.

La formación de sincitios también fue examinada en los monocitos primarios, donde apenas se observaron 0-3 sincitios/pozo (*data no mostrada*). Además, la aparición de estas células gigantes multinucleadas no respondió a dependencias de tiempo o dosis, incluso superándose las 72h de tratamiento: la fusión celular en este tipo de células parece ser azarosa al no responder a ninguna

variable. Los sincitios se originan por la fusión de linfocitos T, monocitos/macrófagos o CDs; sin embargo, los virus T-trópicos son casi exclusivamente responsables de provocar este tipo de efecto citopático. Hasta la fecha se desconoce el por qué exactamente los sincitios son producidos con mayor facilidad y frecuencia en cultivos celulares de linfocitos T: surge la interrogante ¿es el tropismo del virus, el tipo de célula o ambos la causa de este fenómeno? En nuestro caso podemos sugerir que la merma inducción sincitial monocítica está asociada al tipo de célula, ya que nuestra cepa de VIH, la cual es X4 y R5, sí pudo estimular una generación notoria de sincitios en los linfocitos T, con dependencias en m.o.i. y tiempo. Es presumible que algunas propiedades de membrana o la presencia/ausencia de determinados factores intracelulares y de membrana dificulten la expresión de superficie de proteínas virales o la fusión de monocitos. Precisamente, ahí radica uno de los problemas de este tópico: en contraste a los avances realizados sobre la comprensión de los procesos moleculares de la fusión celular, muy poco se conoce respecto a cuáles son los factores intracelulares/superficie involucrados y en consecuencia es difícil esclarecer la pregunta formulada.

La incubación de linfocitos MT-4 o monocitos primarios en medio de cultivo o en presencia de *L. donovani* no derivó en fusión celular, un resultado esperado ante la ausencia del virus (*data no mostrada*). No obstante, la fusión celular también ocurre en la infección parasitaria *in vivo*. Por ejemplo, se han detectado células gigantes multinucleadas originadas por la fusión de macrófagos de hámster infectados con *L. mexicana/braziliensis* (Zeledón y col., 1982) o *L. chagasi* (Laurenti y col., 1990), monocitos/macrófagos extraídos de lesiones de LC en humanos (El-Shoura y col., 1996), CDs de ratones BALB/c infectados con *L. major* (Muraille y col., 2003) y macrófagos derivados de pacientes con LM (Daneshbod y col., 2011) y LV (Chandra y col., 2013). Ninguna de estas publicaciones puntualiza cómo o quiénes participan en la fusión de estas células. Muraille y col. (2003) reportaron una “dramática acumulación” de parásitos en estas células gigantes multinucleadas y sugirieron que éstas constituirían un gran reservorio parasitario en los ganglios linfáticos.

Los sincitios originados por el VIH mueren por la activación de una vía apoptótica intrínseca mitocondrial; Nardacci y col. (2015) detallan los mecanismos y elementos participantes en la apoptosis sincitial. Resumidamente, la fosforilación del inhibidor del NF- κ B (I κ B) en serina 32 y 36 induce su degradación e inicia la transcripción dependiente de este factor. Cdk1 es inducida y causa una entrada abortiva en la profase mitótica, ocasionando la fusión de varios núcleos dentro del mismo citoplasma (cariogamia). MAPK y mTOR, dos quinasas activadas por la fusión nuclear,

fosforilan a p53 en serina 15 y 46, facilitando la transcripción dependiente de esta proteína. Puma y Bax, inducidos por p53, disparan la permeabilización de la membrana mitocondrial, con la consecuente activación de caspasas que escindirán los diferentes sustratos apoptóticos. Así pues, no descartamos que la activación del NF- κ B en linfocitos MT-4 (*Fig.14A*) contribuya con la apoptosis sincitial y por tanto con la disminución de la viabilidad celular estimada (*Fig.8A*). Es cierto que la reducción del número de sincitios observado (*Fig.9, 48h vs 72h*) pudo ser provocado no solo por la apoptosis sincitial sino también por la misma fusión de sincitios; ahí se refleja el valor limitado de nuestra metodología, donde podemos determinar el número de sincitios aunque no cuántas células se fusionaron para formar parte de él.

El parásito *L. donovani* potencia la infectividad y propagación viral al facilitar la inducción de sincitios en los linfocitos MT-4 (*Fig.9*), existiendo precedentes al respecto. Por ejemplo, en la co-infección Epstein-Barr (EBV)/VIH de linfocitos primarios T CD4⁺, T CD8⁺ y la línea celular SupT1 se evidenció una mayor generación de sincitios causada por el aumento en la tasa de la replicación del VIH inducida por EBV, aunque no pudo concluirse cómo esto ocurría (*Guan y col., 1996*). Adicionalmente, el virus de la gripe infecta monocitos, macrófagos y linfocitos humanos y se co-localiza junto con el VIH en la superficie mucosa de los tractos respiratorios y en tejidos linfoides asociados a mucosas: *Sun y col. (2002)* demostraron que la neuraminidasa (NA) purificada o asociada al virus de la influenza aumenta la formación de sincitios inducidos por el VIH y su replicación en diferentes líneas celulares. Según los autores, la NA redujo los niveles de sialilación de los glicoconjugados expresados en la superficie del VIH y las células blanco; la carga negativa de los ácidos siálicos genera fuerzas electrostáticas repulsivas que pueden complicar la interacción virus-célula. Asimismo, la NA purificada de la bacteria *Arthrobacter* ejerce un efecto similar (*Sun y col., 2001*). Por otra parte, *Horbul y col. (2011)* demostraron que la infección con el virus del herpes simple 1 y 2 (HSV-1/2) hace a las células más permisivas a ser infectadas con el VIH y, pese a que no fue demostrado, propusieron que esto provocaría una consecuente elevación de la replicación viral y la formación de sincitios. Esto soportaría la noción en la cual la pre-existencia de infecciones de transmisión sexual representaría un factor de riesgo para la transmisión del VIH; en efecto, las cantidades de VIH en úlceras y fluidos genitales de aquellos infectados con herpes, sífilis y gonorrea es más alta (*CDC, 2012*). Inclusive, se ha reportado el caso reverso donde el VIH facilita la fusión celular; la aparición de células hepáticas gigantes multinucleadas fue mayor en pacientes HCV⁺ (virus de la hepatitis C)/VIH⁺ co-infectados al compararse con los individuos HCV⁺/VIH⁻ (*Micchelli y col., 2008*).

Con base a nuestros resultados sugerimos que *L. donovani* facilita la formación de sincitios virales mediante dos vías. La primera corresponde al efecto del parásito sobre la replicación del VIH en los linfocitos MT-4 (Fig.10); la aumentada replicación viral facilitaría la infección subsecuente de células vecinas así como probablemente los eventos de procesamiento y exposición en la superficie de proteínas virales. La segunda vía lo constituye la incrementada expresión del receptor CXCR4 en los linfocitos MT-4 co-incubados con *L. donovani* y VIH en comparación al grupo de células infectadas únicamente con el virus (Fig.13A); esta glicoproteína de superficie asiste en la fusión celular junto a CD4. Al respecto, Zoetewij y col. (1998) vincularon la aumentada expresión de CXCR4, inducida por IL-4 y TGF- β , con una mayor generación de sincitios en CDs humanas infectadas con VIH. Desconocemos el efecto del parásito sobre la expresión de otras glicoproteínas de superficie, los procesos de exposición de proteínas virales en la superficie celular o en determinadas propiedades de membrana que modularían la fusión celular, las cuales en teoría tendrían un impacto notorio sobre la inducción de sincitios. Curiosamente, el LPG purificado de *L. donovani* exhibe el efecto opuesto al inhibir la formación de sincitios, inducidos por el VIH, en los linfocitos T (Easterbrook y col., 1995; Genois y col., 2001). Considerando estas investigaciones nos preguntamos ¿Sería el efecto valorado mayor si usáramos parásitos libres de LPG? ¿Se podrá alcanzar *in vivo* las concentraciones del LPG empleadas en dichos estudios (máxima 20 μ M)?

En efecto, demostramos que la presencia de *L. donovani* logra potenciar la replicación del VIH en linfocitos T y monocitos primarios en 41,85% y 93,59%, respectivamente (Fig.10). La producción de p24 fue superior en los linfocitos MT-4 en contraste a los monocitos primarios, probablemente debido a que estas células son más permisivas a la infección viral, considerando además que los linfocitos MT-4 proliferan más aceleradamente (Fig.8). Sin embargo, el impulso parasitario sobre la replicación viral fue poco más del doble en los monocitos primarios. Es factible que en adición a las características propias de las células estas diferencias también se expliquen por la habilidad de *L. donovani* de infectar los monocitos primarios. No existen precedentes donde se comparen *in vitro* el efecto de *Leishmania* sobre la producción viral en ambos tipos de células.

No debería sorprender que este efecto se haya observado en los linfocitos MT-4 (Fig.10); Zhao y col. (2004b) advertían que *Leishmania* no solo tendría impacto sobre la producción viral en monocitos, macrófagos y CDs donde ambos coexisten sino también en los linfocitos T infectados crónica o latentemente con el virus. Comentábamos que *L. donovani* podría asociarse directamente con receptores de membrana y disparar el inicio de vías de señalización celular que finalmente podrían confluir en la producción de factores solubles pro-virales. Otra posibilidad la constituye la

secreción de proteínas parasitarias que se unen y activan moléculas de superficie o que puedan penetrar la célula. Al respecto, la molécula LPG de *L. donovani* ha mostrado ser capaz de aumentar la replicación del VIH en líneas celulares monocitoides y de linfocitos T (Bernier y col., 1995; 1998).

Al igual que *Leishmania*, otros patógenos desempeñan acciones similares. Por ejemplo, Szabó y col. (1999) señalaron que HTLV-I aumenta significativamente la replicación del VIH en macrófagos co-infectados, posiblemente a través de la proteína Tax. La proteína del núcleo de HCV hace lo propio mediante la estimulación de la secreción de IL-6 y TNF- α , al activarse vías dependientes de TLR2, JNK y MEK1/2 (Swaminathan y col., 2014). Con relación a los parásitos, la infección con malaria está ligada a una fuerte activación celular CD4⁺ y la regulación positiva de citoquinas pro-inflamatorias, generando un microambiente ideal para la propagación y replicación del VIH (Alemu y col. 2013). Sugerimos que *L. donovani* fomenta la replicación viral a través de la modulación de la expresión de CXCR4 y CCR5, activación del NF- κ B y secreción de ciertas citoquinas/quimioquinas.

Con relación al crecimiento parasitario éste fue superior en los monocitos primarios co-infectados a diferencia de aquellos infectados únicamente con *L. donovani* (Fig.11). Esta observación se enfila con resultados originados de estudios clínicos que revelan una alta incidencia de leishmaniasis diseminada en pacientes con SIDA (Lopez-Velez y col., 1998). Por su parte, Martinez y col. (1993) hallaron que más del 50% de pacientes LV/VIH co-infectados exhibieron parasitemia periférica, siendo ésta un indicativo de proliferación parasitaria descontrolada. La proliferación parasitaria exacerbada causaría, en últimas instancias, las lesiones de morfologías peculiares y locaciones atípicas, visceralización de la enfermedad, retraso en la sanación y reactivación de la leishmaniasis tras los tratamientos que han sido mencionadas en múltiples investigaciones con pacientes co-infectados (Lopez-Velez y col., 1998; Bossolasco y col., 2003; Couppie y col., 2004; Akilov y col., 2007; Lindoso y col., 2009).

La infección de monocitos/macrófagos con *Leishmania* tiene significancia fisiológica para la patogénesis de ambas infecciones. Por ejemplo, *Leishmania* logra desarrollar, dentro de las células, mecanismos adaptativos únicos que la protegen de su degradación en los fagolisosomas, manipulando la respuesta inmune hospedera. La acentuada proliferación intracelular de *L. donovani* puede ampliar la producción viral (Fig.10) y ésta a su vez la parasitaria (Fig.11) en los monocitos primarios, desarrollándose una retroalimentación positiva entre ambos patógenos. Es altamente probable que la infección con VIH afecte las diferentes funciones efectoras de los

monocitos que normalmente pudieran controlar el crecimiento parasitario tales como la generación de enzimas acídicas, la producción de citoquinas/quimioquinas leishmanicidas y/o la formación de intermediarios radicales de nitrógeno y oxígeno entre otros, conduciendo a una mayor proliferación y supervivencia parasitaria (Kedzierska y Crowe, 2002). Ha sido descrito que la producción/activación de moléculas inmunomodulatorias se ha implicado en la inducción de la replicación parasitaria mediada por el VIH (Barreto-de-Souza y col., 2006; Vivarini y col., 2015).

Aunque *L. donovani* no infecta los linfocitos T es factible que su replicación sea modificada en presencia de sobrenadantes de cultivos celulares infectados por el VIH. En efecto, hubo un incremento notable de la proliferación parasitaria al incubarse con un sobrenadante aislado de un cultivo de células MT-4 infectado con el virus (Fig.12); en dicho sobrenadante están presentes viriones, moléculas secretadas y aquellas liberadas tras la lisis celular. En el caso particular de los promastigotes (Fig.12A) la inducción de la proliferación parasitaria va atenuándose a partir del séptimo día; es posible que el espacio físico y la escasez de nutrientes en el medio estén comenzando a afectar el crecimiento parasitario. Al compararse la respuesta de promastigotes y amastigotes frente a estos sobrenadantes obtuvimos que la inducción de la proliferación fue más atenuada y retardada en estos últimos. En adición a los evidentes cambios morfológicos, en los amastigotes se presenta una variación de la expresión de ciertas proteínas tales como la reducción de la expresión de superficie de gp63 y LPG (Muskus y Villa, 2002); en consecuencia, estas modulaciones proteicas que transcurren durante la transformación promastigote → amastigote podrían estar asociadas a cambios metabólicos y al desarrollo de respuestas diferenciales ante la exposición a determinados elementos celulares o de otra índole.

Independientemente del estadio, estos resultados explicarían parcialmente por qué *in vivo* la parasitemia es elevada en los pacientes co-infectados: no solo la ausencia *per se* de linfocitos T esenciales para la inmunoregulación de la leishmaniasis sería la causa sino también aquellos linfocitos T infectados con el virus que secretan un conjunto de factores celulares/virales que ampliarían notablemente el crecimiento parasitario. Curiosamente, el sobrenadante derivado de un cultivo no infectado también desarrolla un efecto similar aunque a menor escala. Sería interesante conocer cuáles proteínas están presentes en los sobrenadantes de estos cultivos para esclarecer la razón del resultado obtenido y sus distinciones. No excluimos la posibilidad de una interacción física directa entre ambos patógenos; no obstante, la incubación de *L. donovani* con VIH purificado no moduló las respuestas proliferativas del parásito (*data no mostrada*). Sin embargo, no se determinó la potencial existencia de un efecto dosis-dependiente viral al no contar con una

herramienta que permita cuantificar la cantidad de virus presente en la mezcla: la m.o.i. no puede ser empleada en este caso dado que no estamos infectando ningún elemento. En adición, sería curioso examinar si las proteínas virales purificadas pudieran interactuar directamente con el parásito, con las consecuencias insospechadas que ello acarrearía.

La magnificada replicación intracelular parasitaria en los monocitos primarios puede ser explicada por un incremento de la permisividad celular al patógeno, reflejado en un incremento del porcentaje de células parasitadas (*Fig.11*). En adición a los eventos moleculares intracelulares, inducidos por el VIH, es posible que también se entablen procesos a nivel de superficie celular que amplifiquen la infectividad de *L. donovani*, siendo las células más permisivas al parásito. Se ha demostrado que la infección con VIH ocasiona alteraciones en la fagocitosis mediada por monocitos/macrófagos de varios patógenos tales como *Mycobacterium avium*, *Candida albicans* y *Toxoplasma gondii* (Kedzierska y col., 2003), a través de un incremento en los niveles intracelulares de AMPc que perturba la fagocitosis mediada por los receptores de complemento; sin embargo, no se reduce la expresión de superficie de estos receptores sino que se alterarían eventos de señalización celular corriente abajo (Azzam y col., 2006). No obstante, la infección viral de MDMs incrementa la captura del parásito *L. infantum* (Zhao y col., 2006); aunque estos hallazgos parecen ser contradictorios a primera vista, debemos recalcar que los diferentes estudios relacionados a la captura de microorganismos han revelado que los mismos entran a las células mamíferas a través de distintos mecanismos fagocíticos. Por tanto, la infección con VIH no debería afectar necesariamente todos los procesos que emplea la célula para la captura de microorganismos.

Desconocemos cuál sería el mecanismo exacto por el cual el VIH favorece la infectividad de *L. donovani* en los monocitos primarios (*Fig.11*). Planteamos que la infección viral de monocitos primarios estimula la producción de un (varios) factor(es) soluble(s) determinado(s) que puede(n) modular la captura del parásito. Dicho(s) factor(es) regularía(n) la expresión de uno o varios receptores de superficie celular conocidos por estar involucrados en la unión de *Leishmania* a las células. Por ejemplo, Lodge y col. (2012) demostraron que el VIH potencia la infectividad parasitaria al elevar la expresión de superficie del receptor de fosfatidilserina CD91/LRP-1 en MDMs. No debemos descartar que el VIH ocasione variaciones en ciertas propiedades de membrana que faciliten la incorporación del parásito, aunque esto parece menos probable. Investigaciones posteriores deberían determinar el efecto de la infección viral sobre la posible inducción de la expresión de receptores de entrada para *Leishmania* tales como el receptor de

complemento 1 y 3 (CR1 y CR3), el receptor de fibronectina y el receptor de manosa-fucosa, los cuales son cruciales en la invasión parasitaria de monocitos/macrófagos (Guy y Belosevic, 1993).

Aunque no logramos estudiar cambios en la expresión de receptores de entrada parasitaria, sí conseguimos examinar variaciones en la expresión de los receptores de superficie de entrada viral, CXCR4 y CCR5. CXCR4 es el receptor fisiológico de la quimioquina CXC conocida como factor derivado de estroma 1 (SDF-1). La interacción entre SDF-1 y CXCR4 conduce a la activación de varios eventos de transducción de señales intracelulares que median la supervivencia, proliferación, adhesión y migración celular (Dewan y col., 2006). La ampliada expresión de superficie de CXCR4 en los linfocitos MT-4 inducido por la exposición a *L. donovani*/VIH (Fig.13A) facilitaría la infección de nuestra cepa viral dual X4R5, lo cual explicaría parcialmente la incrementada replicación viral (Fig.10), inducción de sincitios (Fig.9) y en últimas instancias la disminución de la viabilidad celular (Fig.8A). Debido a que la distribución tisular de CXCR4 es mucho más amplia que CCR5, si este efecto se demostrara *in vivo* podemos asegurar que el virus accedería a un mayor rango de células blanco potenciales o alternatively se fusionaría con células más permisivas, simplificando su replicación y propagación en las co-infecciones. No solo debemos concebir a CXCR4 como un simple receptor de entrada viral, es decir, a consideración de sus múltiples funciones celulares en conjunto con su ligando ¿cuáles serían las otras implicaciones funcionales que originaría su acrecentada expresión?

Curiosamente, la co-incubación *L. donovani*/VIH redujo la expresión de superficie de CXCR4 en comparación al grupo de tratamiento parasitario aunque siguió siendo mayor a aquel obtenido en el grupo de infección viral (Fig.13A); proponemos tres escenarios que expliquen este fenómeno. Primero, la expresión de superficie de CXCR4 podría ser transitoria, es decir, es posible que en un tiempo de tratamiento menor al aplicado sí se pudo haber detectado un mayor nivel de CXCR4 en la co-incubación *L. donovani*/VIH. Segundo, la exposición celular prolongada a SDF-1 causa la internalización y desensibilización de CXCR4 tras la activación corriente abajo de β -arrestina (Dewan y col., 2006): por tanto, sería interesante conocer si *L. donovani* o VIH modulan los niveles de producción de esta quimioquina. En efecto, Hidalgo-Estévez y col. (2008) señalaron que la proteína Tat intracelular potencia la regulación negativa de CXCR4, inducida por SDF-1, en la superficie de células T Jurkat mediante la activación de PKC ζ , sin alterar los niveles proteicos intracelulares o de ARNm, un resultado que discrepa con lo publicado por Secchiero y col. (1999). Tercero, es posible la producción de un factor soluble no identificado que perturbe la relación expresión:internalización/degradación del receptor.

Xu y col. (2015) señalan los diversos procesos que regulan la expresión de este receptor, destacando el rol del NF- κ B en la regulación transcripcional de CXCR4 al ser capaz de asociarse a una región del promotor del gen *CXCR4*, activando su transcripción. Las subunidades del NF- κ B, p65 y p50, se unen al promotor en los sitios -66 y +7, respectivamente. Es posible que el aumento de la expresión de CXCR4 en células MT-4 infectadas con *L. donovani* o VIH (*Fig.13A*) está ligado en parte al incremento de la activación del NF- κ B observado (*Fig.14A*); incluso el efecto diferencial entre ambos patógenos fue similar para ambas variables. En consecuencia, la activación del NF- κ B estaría asistiendo indirectamente a la formación de sincitios en los linfocitos MT-4 mediante la inducción de CXCR4 (*Fig.9*). Las variaciones en los perfiles de citoquinas/quimioquinas, las cuales detallaremos más adelante, también estarían implicadas en la regulación de la expresión del receptor.

La inducción de la expresión de superficie de CXCR4 mediada por el VIH ha sido reportada. *Secchiero y col. (1999)* hallaron que la proteína Tat aumenta la expresión de superficie de CXCR4 en células T CD4⁺, aunque no de CCR5, requiriéndose la síntesis *de novo* de este receptor y no una simple reubicación de ella, facilitándose la infección de una cepa viral X4; al ser Tat secretada en significativas proporciones por células infectadas con el VIH no se descarta un efecto *trans*. En adición, *Quaranta y col. (2002)* demostraron un efecto similar en CDs tratadas con la proteína viral Nef. Ambos grupos de investigación no especifican el mecanismo de acción de estas proteínas virales aunque es probable que esté implícito un cambio del perfil de citoquinas/quimioquinas generadas.

Existe un precedente que vincula a *Leishmania* y el receptor CXCR4. *Hailu y col. (2004)* determinaron, mediante citometría de flujo, la influencia de la LV sobre la expresión de CXCR4 y CCR5 en la superficie de células T CD4⁺ extraídas de sujetos provenientes de Etiopía. Los pacientes con LV activa manifestaron la mayor proporción de células T CD4⁺ positivas para CXCR4 al compararse con los individuos sanos, con LV tratada o subclínica; no obstante, estos autores no revelaron el mecanismo putativo por el cual *Leishmania* desarrollaría este efecto. En adición, la proporción de células positivas para CCR5 fue muy baja y sin diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio.

También se han descrito estos efectos en las co-infecciones. Por ejemplo, *Puri y col. (2000)* revelaron que la infección de células HeLa-CD4 con el virus de la influenza provocó un marcado ascenso de la replicación del VIH_{NL4-3} X4, un resultado que no se repitió en una cepa viral R5; el incremento de la susceptibilidad de estas células al virus se relacionó con el aumento de expresión

de superficie del receptor CXCR4. Plantean, al igual que lo hacemos nosotros, que la activación del NF- κ B es responsable del aumento de expresión de CXCR4, basándose en los resultados de *Pahl y Baeuerle (1995)*. En adición, *Hoshino y col. (2004)* destacaron que la infección de MDMs con *Mycobacterium tuberculosis* elevó la expresión de superficie de CXCR4 y la producción de quimioquinas CC, como RANTES, que inhiben la entrada de aislados R5, impulsándose una presión selectiva para la replicación viral X4. En ambos estudios se propuso que los factores paracrinicos no serían responsables de la inducción de la expresión de superficie de CXCR4 al establecerse una correlación entre la cantidad de antígenos expresados en las células y los niveles del receptor.

Por su parte, CCR5, un receptor acoplado a proteína G, se une a múltiples quimioquinas incluyendo MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. Se expresa en macrófagos, monocitos, células Th1, CDs inmaduras y linfocitos T citotóxicos. Este receptor es de suma importancia en la patogénesis del VIH ya que es empleado por los aislados virales R5 para la penetración celular, desde el inicio de la infección hasta el desarrollo del SIDA; de hecho, una delección de 32pb del gen *CCR5* que codifica una molécula truncada que no se expresa en la superficie celular está asociada a no-infectividad para homocigotos (*Liu y col., 1996*) y retraso en la progresión de la infección viral para heterocigotos (*Mummidi y col., 1998*). También participa en la exacerbación de la leishmaniasis, pero puede exhibir propiedades anti-parasitarias dependientes de su señalización (*Vallejo y col., 2015*).

La densidad de CCR5 en la superficie de células T CD4⁺ es un factor determinante relacionado directamente a la carga viral en individuos VIH⁺ (*Reynes y col., 2000*). CCR5 asiste al VIH en su infección y éste a su vez puede inducir la expresión del receptor. Por ejemplo, el tratamiento de monocitos primarios con Tat estimuló la expresión de superficie de CCR5, posiblemente a través de variaciones en los perfiles de citoquinas/quimioquinas (*Weiss y col., 1999*). Adicionalmente, la incubación de la línea celular astrocítica U87 o neuronal SK-N-SH con la proteína de envoltura gp41 amplió la expresión de superficie de CCR5 mediante la secreción de la IL-10 (*Speth y col., 2000*).

También se han reportado incrementos de la expresión de CCR5, inducidos por mecanismos no especificados, en los linfocitos T CD4⁺ de los ganglios linfáticos de ratones C57BL/6 (*Ji y col., 2003*) y neutrófilos de ratones BALB/c (*Akhzari y col., 2016*), ambos infectados con *L. major*, células THP1 y monocitos primarios infectados con *L. donovani* (*Dasgupta y col., 2003*). No obstante, la expresión de esta molécula se redujo en CDs colectadas de cepas de ratones resistentes

y susceptibles a *L. major* (Steigerwald y Moll, 2005) y en el tejido hepático de perros parasitados (Nascimento y col., 2013), los cuales constituyen junto a los ratones los mayores reservorios de *Leishmania*. Las variaciones de la expresión de CCR5 se determinaron por cambios en los niveles proteicos o de ARNm que en teoría también se reflejarían a nivel de superficie; solo Dasgupta y col. (2003) mostraron directamente, mediante microscopía confocal, el cambio de la expresión del receptor en la superficie celular.

El receptor CCR5 exhibe un rol activo en la patogénesis de la leishmaniasis. Bhattacharyya y col. (2008) hallaron que la transfección de un ARN de interferencia pequeño específico de CCR5 en macrófagos murinos peritoneales restringió la carga parasitaria hasta un 70%, derivando en una aumentada respuesta pro-inflamatoria gracias a una mayor producción de NO y mayor proporción TNF- α :IL-10; estos resultados sugieren que CCR5 contribuye con la entrada y establecimiento de *L. donovani*. Asimismo, CCR5 favorecería la persistencia del patógeno tras un tratamiento clínico: Yurchenko y col. (2006) señalaron que CCR5 direcciona, mediante quimioquinas, la migración de células Treg CD4⁺ CD25⁺ a locaciones dérmicas murinas infectadas, donde impulsan el establecimiento de dicha infección y aseguran la supervivencia parasitaria a través de la supresión de respuestas específicas de células T CD4⁺. Incluso, la cronicidad de la enfermedad parasitaria dependería de este receptor ya que Navas y col. (2014) demostraron, a través de PCR, que la infección de macrófagos humanos con cepas de *L. panamensis* derivadas de pacientes con enfermedad crónica, aunque no en aquellos con enfermedad auto-curable, elevó la expresión de *ccr5*, entre otros receptores y quimioquinas. A pesar que numerosas publicaciones resaltan que CCR5 exacerba la leishmaniasis, una reducción de su expresión no necesariamente implica un efecto beneficioso para el hospedero ya que también puede traducirse como una pérdida de la respuesta celular al parásito tras afectarse sus propiedades migratorias. En contraste a los estudios previos, la ausencia de CCR5 en ratones también pudiera agravar la enfermedad parasitaria al alterar la generación del IFN- γ (Sato y col., 1999).

En la co-infección *Leishmania*/VIH la proporción de linfocitos T CD3⁺, aislados de la sangre periférica, positivos para CCR5 fue mayor en los individuos co-infectados a diferencia de los sujetos sanos, VIH⁺ o parasitados; esto se relacionó con una acelerada progresión de la infección viral (Reynes y col., 2001; Nigro y col., 2007). Adicionalmente, los niveles de células Treg CD4⁺ CTLA-4⁺ y de superficie de CCR5 fueron mayores en pacientes LV/VIH⁺ co-infectados en contraste a los sujetos infectados únicamente con el virus; las células Treg suprimen respuestas de células T específicas de antígeno controlando la activación inmune exagerada o inapropiada pero

beneficiando la persistencia de los patógenos, lo cual explicaría las recaídas frecuentes de la enfermedad parasitaria en los individuos co-infectados (Vallejo y col. 2015).

Modulaciones de la expresión de CCR5 ya han sido descritas en otras co-infecciones. La infección de CDs derivadas de monocitos con HSV-2 elevó la expresión de superficie de CCR5, inducido por el TNF- α , con un consecuente aumento de la replicación del VIH (Marsden y col., 2015). Por su parte, la bacteria *Porphyromonas gingivalis* facilita la infección *trans* del VIH mediante este receptor (Giacaman y col., 2008). El receptor CCR5 no solo asiste al VIH en su infección de células blanco: en asociación con sus ligandos puede iniciar eventos de señalización celular pro- o incluso anti-virales. Al respecto, Barrios y col. (2014) destacaron que la lentificada declinación del conteo de células T CD4⁺ y retrasada progresión hacia el SIDA observada en los pacientes HTLV/VIH co-infectados es causada por una acrecentada expresión de CCR5 y sus ligandos en PBMCs expuestos a Tax2, una proteína del HTLV. En contraste, *Mycobacterium tuberculosis* potencia la replicación viral mediante la regulación positiva de CCR5, aunque reduciendo los niveles de producción de sus ligandos (MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES), en células mononucleares del líquido pleural aislado de pacientes co-infectados (Toossi y col., 2001).

La infección de monocitos primarios con *L. donovani* y/o VIH incrementó la expresión de superficie de CCR5 (Fig.13B). Es curioso que el efecto parasitario sobre la expresión de CXCR4 fue mayor con relación a CCR5 pese a que *L. donovani* no infecta los linfocitos T pero sí a los monocitos primarios. Evidentemente, no solo debemos tomar a consideración el hecho de que *L. donovani* infecte a uno u otro tipo celular sino también las características propias de las células y las proteínas que se analizaron; posteriormente sería apropiado conocer, para fines comparativos, las variaciones inducidas por ambos patógenos sobre la expresión de CXCR4 y CCR5 en monocitos primarios y linfocitos T, respectivamente. En este caso, a diferencia de lo contemplado con CXCR4, hubo una posible sinergia entre los efectos de cada patógeno lo que derivó en una aún mayor expresión del receptor durante la co-infección. Es probable que *L. donovani* y VIH induzcan este efecto a través de una ruta común y/o activando un mismo blanco específico particular. Otra posibilidad sería la inducción de la expresión de CCR5 a través de mecanismos diferentes, los cuales durante la co-infección se adicionarían. No descartamos que este efecto sea transitorio, es decir, quizás en períodos de tratamiento superiores a las 72h observemos una disminución de los niveles proteicos de membrana de CCR5.

Con base a los antecedentes discutidos sugerimos que la acrecentada expresión de superficie de CCR5 en los monocitos primarios pudo ser causada por la acción de

citoquinas/quimioquinas, proteínas virales y/o parasitarias. Al igual que CXCR4 existe un vínculo directo entre el NF- κ B y CCR5, siendo un potente activador del promotor de *CCR5* (Liu y col., 1998). Por consiguiente, es factible que su activación en los monocitos primarios (Fig.14B) cause la estimulación directa de la expresión del receptor. Además, al ser el NF- κ B un regulador de la expresión de múltiples genes, incluyendo la regulación positiva de proteínas del VIH que a su vez inducen la expresión de CCR5, también provocaría la expresión del receptor de una manera indirecta. Similar a CXCR4, el aumento de la expresión de superficie de CCR5 (Fig.13B) hace a los monocitos primarios más permisivos a la infección con VIH, facilitando la replicación viral (Fig.10) y la declinación de la viabilidad monocítica (Fig.8). Asimismo, es necesario analizar el impacto de la señalización CCR5/ligandos sobre la funcionalidad de *L. donovani*; creemos que este receptor asistiría al parásito en su infectividad y replicación (Fig.11). El incremento de CCR5 en la superficie y la disminución de la secreción de sus ligandos en las co-infecciones (MIP-1 α y RANTES) (Fig.17), los cuales discutiremos más adelante, soportan la noción de una función patogénica de este receptor en la co-infección.

Con relación al NF- κ B, se trata de una familia que consiste de cinco proteínas: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) y p100/52 (NF- κ B2) que se asocian entre ellas formando distintos complejos activos, homodiméricos o heterodiméricos, de transcripción. Todos comparten un dominio conservado de homología a Rel (RHD) N-terminal de 300 aminoácidos y dentro de éste existen ciertas secuencias necesarias para la dimerización, unión al ADN, interacción con I κ Bs, y translocación nuclear. En células no estimuladas estas cinco proteínas existen como homodímeros o heterodímeros unidos a la familia proteica I κ B que previene la translocación nuclear y mantiene al NF- κ B en un estado inactivo (Victoriano y Okamoto, 2012).

En adición a su rol protector previamente discutido, el NF- κ B es usado por el VIH facilitando su replicación y propagación. La transcripción de los genes virales puede ser iniciada por heterodímeros p50/RelA, asistiendo durante el proceso de iniciación y elongación. La región potenciadora, ubicada a -104 y -80 del sitio de inicio de la transcripción dentro del 5' LTR, alberga dos sitios κ B idénticos altamente conservados. El heterodímero inicia la transcripción al asociarse a p300, conduciendo a la acetilación de la cromatina asociada al LTR, facilitándose el acceso a RNAPII. Además, p50/RelA estimula las rondas iniciales de elongación de RNAPII al reclutar el complejo TEFb que fosforila el dominio carboxilo y transforma a RNAPII en una proteína altamente procesadora (Chan y Greene, 2012). Victoriano y Okamoto (2012) describen en su revisión de manera extensiva las variadas estrategias terapéuticas con compuestos naturales y

sintéticos que inactivan al NF- κ B y en consecuencia inhiben la replicación viral; sin embargo, dado que este factor regula un amplio rango de funciones celulares su fijación como blanco en los tratamientos clínicos debe realizarse con precaución para evadir efectos adversos potenciales.

La activación del NF- κ B es frecuente en las infecciones virales. Dicha activación serviría a dos funciones opuestas: mediar la respuesta inmune protectora frente al patógeno invasor o en algunas ocasiones promover la replicación viral. Varios productos virales activan NF- κ B incluyendo la proteína Tat del VIH, la cual desarrolla este efecto gracias a la activación de PKR y la degradación de I κ B α ; la producción de citoquinas como el TNF- α , estimulada por Tat, es generalmente NF- κ B dependiente (*Albini y col., 1998*). Asimismo, varias citoquinas como IL-1 α y TNF- α estimulan la replicación viral a través de la activación del NF- κ B. Adicionalmente, los efectos anti-apoptóticos de la señalización de este factor lo han implicado en el establecimiento de reservorios virales latentes (*DeLuca y col., 1999*). Sin embargo, *Chan y Greene (2011)* advierten que una prolongada y fuerte señalización del NF- κ B ocasionaría activación de la expresión viral. Además, se ha postulado que gp120 potencia la activación del NF- κ B, inducida por el TNF- α , mediante la formación de intermediarios reactivos de oxígeno como H₂O₂ (*Shatrov y col., 1996*).

Los monocitos primarios y linfocitos MT-4 infectados con el virus exhiben activación del NF- κ B, particularmente la subunidad p65, de forma similar en ambos tipos celulares (*Fig.14, barras rojas*). Desconocemos si en adición a p65 ocurre la translocación de p50, generándose el heterodímero activador de la expresión genética viral; aunque los antecedentes nos invitan a suponer que es muy probable que haya ocurrido. No existe información disponible sobre algún otro complejo NF- κ B, homodimérico o heterodimérico, que se una a los LTRs del VIH. Así pues, se establecería una retroalimentación positiva entre la replicación viral y la activación del factor.

Varios virus contribuyen con la patogenicidad del VIH gracias a este factor nuclear. La infección de células HeLa con HSV-1 resultó en un aumento de la expresión genética dirigida por los LTRs del VIH mediante la generación de un factor nuclear que se asocia a las secuencias del NF- κ B y Sp1 (*Gimble y col., 1988*). Igualmente, el virus humano del herpes 6 desarrolla un efecto similar en linfocitos T CD4⁺, elevándose la producción del VIH (*Ensoli y col., 1989*). Asimismo, la proteína X del virus de hepatitis B favorece la replicación viral en linfocitos T de una manera NF- κ B dependiente, lo cual esclarecería la acelerada progresión hacia el SIDA en pacientes co-infectados (*Gómez-Gonzalo y col., 2001*).

La infección de macrófagos derivados de la médula ósea con amastigotes de *L. mexicana* indujo la activación del NF- κ B a través de la degradación del I κ B, gracias a la acción de la cisteín

peptidasa B, inhibiéndose la producción de IL-12 (Cameron y col., 2004). En contraste, se evidenció en las CDs derivadas de monocitos infectadas con *L. major* la translocación al núcleo de p50, p65 y c-Rel, los cuales inducen la expresión de IL-12 (Jayakumar y col., 2008). Por su parte, la infección con *L. major* de monocitos primarios y células U937 impulsó la producción de IL-10 y TNF- α tras la activación del heterodímero p50/c-Rel (Guizani-Tabbane y col., 2004). La activación del NF- κ B por *Leishmania* ha mostrado ser dependiente de la generación de especies reactivas de oxígeno (Singh y col., 2004) o secreción del LPG (Becker y col., 2003). Inclusive, Gregory y col. (2008) reportaron que la infección de macrófagos murinos con *Leishmania* ocasiona una escisión específica en el citoplasma de la subunidad p65 causada por la proteasa gp63: el fragmento p35 resultante migra al núcleo y en conjunto con p50 activa la transcripción de MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y MIP-2 que favorecen el reclutamiento de fagocitos a los sitios de inoculación.

La supresión de la activación del NF- κ B también se ha observado en las infecciones con *Leishmania*. La generación de ceramida en macrófagos murinos peritoneales infectados con *L. donovani* restringe la activación de este factor (Ghosh y col., 2002). Adicionalmente, la infección con *L. amazonensis* en macrófagos THP1 conduce a la activación del homodímero represor p50/p50 que anula la expresión genética NF- κ B dependiente (Calegari-Silva y col., 2009). Privé y Descoteaux (2000) argumentan que la habilidad de los promastigotes de perturbar la activación del NF- κ B sería parte de la estrategia evolutiva del parásito que le facultaría evadir las respuestas inmunes innatas, incitando a la tolerancia e hiporeactividad celular.

No es sencillo analizar el rol del NF- κ B en la leishmaniasis. La evidencia acumulada en investigaciones con modelos murinos deficientes en c-Rel, p52 o RelA apunta a un rol protector de este factor a través de la inducción de la expresión de citoquinas o factores leishmanicidas tales como la IL-12 o el NO. Sin embargo, el NF- κ B también exhibe una función patogénica durante el curso de la infección parasitaria: su activación logra desencadenar la generación de citoquinas tales como IL-10 e IL-17A o impulsar el desarrollo de células Treg que favorecen la proliferación parasitaria (Reinhard y col., 2012). A consideración de la multifuncionalidad del NF- κ B, al ser un regulador principal de la expresión de múltiples genes, es posible que ambos roles del factor, proteccionista y patogénico, se desenvuelvan simultáneamente aunque los eventos protectores “enmascaren” los efectos patogénicos al ser éstos más potentes o numerosos. Los diferentes resultados obtenidos en los estudios que asocian al NF- κ B y *Leishmania*, donde incluso algunos de ellos son contradictorios, son producto del tipo célula usada, la especie/cepa parasitaria, la(s) subunidad(es) del NF- κ B que se translocan, los genes que se expresan/reprimen, entre otras

variables. En nuestro caso, la infección de monocitos primarios y linfocitos MT-4 con *L. donovani* activó significativamente a p65, con una translocación nuclear superior a la provocada por el virus (Fig. 14). Su activación en los linfocitos T nos invita a creer en un proceso de activación iniciado a nivel de receptores de membrana que interactúan con los parásitos o sus proteínas; no desechamos la idea de un efecto independiente de proteínas de superficie tras la penetración de moléculas secretadas por el patógeno.

Otros microorganismos parasitarios y bacterianos también estimulan la activación del NF- κ B. Por ejemplo, una de las principales toxinas de *Plasmodium falciparum* conocida como glicosilfosfatidilinositol impulsa la producción de NO en macrófagos murinos y células endoteliales vasculares humanas a través de la activación del NF- κ B (Tachado y col., 1996). De igual forma, dicha activación también facilita la adherencia del parásito a las células endoteliales vasculares tras una regulación positiva de la expresión de adhesinas (Schofield y col., 1996). Adicionalmente, la infección de monocitos primarios con *Mycobacterium avium* activa el NF- κ B ocasionando un incremento de los niveles de expresión de ARNm y superficie de CCR5, derivando en un mecanismo potencial por el cual se favorece la infección y replicación del VIH en las co-infecciones (Wahl y col., 1998). De igual forma, el lipopolisacárido bacteriano y el lipoarabinomanano de *Mycobacterium tuberculosis* también activan al NF- κ B (Zhang y col., 1995; Bernier y col., 1998).

Con relación a la co-infección *Leishmania*/VIH existen pocos precedentes donde participe el NF- κ B. La molécula LPG de *L. donovani* activa la transcripción de los genes del VIH en los linfocitos T; aunque no fue demostrado directamente las evidencias acumuladas apuntaban a la posible implicación del NF- κ B en este fenómeno (Bernier y col., 1998). La proteína Tat del VIH activa la vía canónica del NF- κ B, induciéndose la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e iNOS; sin embargo, ambos efectos pueden ser subvertidos por la infección de *L. amazonensis* en los macrófagos (Vivarini y col., 2015). Por consiguiente, en adición a los distintos procesos moleculares que le permiten al parásito superar las diferentes barreras inmunes incluimos una regulación de la expresión genética NF- κ B dependiente. Por ejemplo, hemos comentado que *L. amazonensis* aplaca la activación del NF- κ B en los macrófagos y promueve la formación del homodímero represor p50/50 que silencia los elementos regulatorios *nk* presentes en el promotor de iNOS (Calegari-Silva y col., 2009).

Según nuestros resultados, la exposición de los monocitos primarios a *L. donovani*/VIH derivó en una aún mayor activación del NF- κ B, indicando posible sinergia entre ambos efectos

(Fig.14B). Dichos efectos aditivos no se manifestaron en los linfocitos MT-4, aunque la activación del factor en la co-infección siguió siendo mayor a aquella presente en el grupo celular infectado únicamente con el virus (Fig.14A); la acrecentada activación del NF- κ B en la co-incubación/co-infección sería la causa, al menos parcialmente, de la amplificada replicación viral (Fig.10) y la consecuente disminución de la viabilidad celular en células infectadas con VIH (Fig.8). También es posible que la activación de este factor en los linfocitos MT-4 sea mayor en la co-incubación aunque a tiempos previos a las 72h, es decir, una activación transitoria; con relación a esto, Ben-Othman y col. (2008) indicaron que *L. major* activa NF- κ B en macrófagos humanos y murinos aunque subsecuentemente regula negativamente el mismo, quizás como un tipo de mecanismo parasitario evolutivo.

El efecto aditivo estaría causado por la sumatoria de diferentes rutas de activación, inducidas diferencialmente por los patógenos, o la potenciación de una misma vía. La hipotética actividad anti-parasitaria del NF- κ B es deficiente ya que su activación adicional en los monocitos primarios (Fig.14B) no resultó en inhibición parcial del crecimiento parasitario al contrastarse las mediciones obtenidas en los grupos celulares parasitados y co-infectados (Fig.11). Por su parte, la activación del NF- κ B en los linfocitos MT-4 infectados con el VIH podría estimular la síntesis de proteínas virales o celulares que se secretarían e influenciarían en la replicación parasitaria extracelular (Fig.12). Tomando en cuenta el balance patogénico/protector de este factor nos preguntamos ¿La aplicación de un inhibidor de su activación traería como consecuencia una mayor proliferación parasitaria (Fig.11) y por ende un efecto citopático más potente (Fig.8B)?

La producción de proteínas virales, secreción de proteínas parasitarias, generación de citoquinas pro-inflamatorias o la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno serían las presuntas causas de la determinada activación del NF- κ B. Discutíamos la inducción de la expresión de superficie de CXCR4 y CCR5 mediada por la activación del NF- κ B. El fenómeno reverso también ocurre ya que el desarrollo de la señalización CXCR4/SDF-1 y CCR5/ligandos induce la activación del NF- κ B en varios modelos celulares de manera tal que se constituiría una retroalimentación positiva entre ambos componentes, receptores y factor de transcripción (Ramos y col., 2012; Xu y col., 2015). En consecuencia, sugerimos que dicha retroalimentación también podría estar funcionando en nuestro modelo *in vitro*. Inclusive, el efecto diferencial entre virus y parásito en la activación del NF- κ B podríamos endosarla, al menos parcialmente, a la superior inducción parasitaria de la expresión de superficie de CXCR4 y CCR5 (Fig.13).

En adición, el dolabelladienetro, un compuesto aislado del alga *Dictyota paffii*, inhibió significativamente la multiplicación intracelular de *L. amazonensis* en macrófagos humanos, incluso en presencia de cofactores que exacerban su proliferación como la IL-10 o el VIH (Soares y col., 2012). De hecho, este compuesto además exhibe actividad antiviral al inhibir la transcriptasa reversa del VIH (Cirne-Santos y col., 2008). Entre los efectos causados por el compuesto se encuentra una reducción de la producción del TNF- α y el NO; aunque ambos cooperan en la muerte parasitaria, existen evidencias de la persistencia de la leishmaniasis originada por una fuerte respuesta inflamatoria inducida a través de elevados niveles del TNF- α . Dicha reducción fue promovida mediante la inhibición, a través de un mecanismo desconocido, de la activación del NF- κ B (Soares y col., 2012).

El tratamiento de la leishmaniasis en pacientes VIH⁺ está caracterizado por un reducido número de opciones terapéuticas. Las drogas suelen ser altamente costosas, tóxicas y relativamente ineficaces. El bajo conteo de células T CD4⁺ previene una completa recuperación y las múltiples recaídas serían las responsables de la poca respuesta que se obtiene frente a drogas previamente usadas. Entre las drogas leishmanicidas más comúnmente usadas en el tratamiento de la leishmaniasis de pacientes co-infectados se encuentran los antimoniales pentavalentes, anfotericina B, paromicina, pentamidina, miltefosina, entre otros (Alvar y col., 1998). El glucantime es conocida por ser una droga antiparasitaria efectiva y de bajo costo en el tratamiento de pacientes co-infectados aunque algunos autores han argumentado que es más tóxica y con una eficacia similar a la anfotericina B (Laguna y col., 2003). Por su parte, la cloroquina es capaz de reducir el tamaño de lesiones y la carga parasitaria en la infección cutánea y visceral murina, siendo útil en terapias combinadas aunque no se ha definido exactamente el mecanismo de acción sobre *Leishmania* (Rocha y col., 2013). Adicionalmente, este compuesto inhibe la replicación viral al alterar la glicosilación de gp120 y mitiga la activación inmune excesiva ocasionada por la infección viral crónica que conduce al agotamiento de linfocitos T CD4⁺ (Al-Bari, 2017); esta droga sería un candidato potencial para el tratamiento de sujetos co-infectados.

Mención aparte para los inhibidores de proteasas, los cuales retrasan la maduración del VIH e inhiben directamente el crecimiento de *Leishmania* de una manera dosis dependiente. No obstante, el uso de estas drogas en las terapias debe realizarse con extrema precaución; es crucial el desarrollo de ensayos clínicos que analicen la efectividad de estos compuestos. Por ejemplo, Alves y col. (2015) demostraron que el tratamiento de macrófagos extraídos de ratones BALB/c con lopinavir/ritonavir derivó en un mayor índice de infección y replicación intracelular de *L.*

amazonensis. Según los autores, la reducida activación del NF- κ B no impulsó la expresión de genes de citoquinas pro-inflamatorias, lo cual explicaría la disminuida producción del TNF- α que a su vez provoca una disminuida generación de NO, conduciendo a proliferación y supervivencia parasitaria; estos autores advierten sobre el uso de estas drogas en las co-infecciones a pesar de ser efectivas contra el virus. Destacamos la importancia de este tipo de investigaciones que nos permitan esclarecer por qué generalmente durante el tratamiento de pacientes co-infectados con este tipo de drogas ocurre la reactivación de la enfermedad parasitaria.

Comparando ambos estudios, *Soares y col. (2012)* ofrece una visión más positiva sobre la mermada respuesta inflamatoria tras la disminuida activación del NF- κ B argumentando que si dicha respuesta fuera exagerada se agravaría la enfermedad parasitaria. Por consiguiente, no es sencillo fijar al NF- κ B como blanco para el desarrollo de drogas terapéuticas ya que su expresión/activación no debe disminuir a niveles que socaven las respuestas antiparasitarias y antivirales que ésta induce ni tampoco ser crónica donde eleve sustancialmente la expresión de los genes del VIH y exacerbe la leishmaniasis. En lugar de modular sus niveles de expresión o translocación al núcleo sería más apropiado investigar los procesos agravantes corriente abajo y fijar a éstos para las diferentes estrategias terapéuticas.

Finalmente, hemos evaluado la secreción de 12 citoquinas/quimioquinas en la co-infección *L. donovani*/VIH de PBMCs aislados de un individuo sano. Las citoquinas pro-inflamatorias, tal como lo indica su nombre, impulsan variados procesos inflamatorios tras su unión a sus respectivos receptores (*Abbas y col., 2009*); en nuestra investigación determinamos la secreción de IL-1 α , IL-12, IFN- γ y TNF- α .

La IL-1 α es producida por las células endoteliales, epiteliales, astrocitos, monocitos, macrófagos, CDs y de la microglía (*Dinarelli y col., 2011*). Afecta virtualmente todas las células y órganos, siendo un mediador esencial en enfermedades autoinmunes, autoinflamatorias, infecciosas y degenerativas (*Garlanda y col., 2013*). Prolonga marcadamente la vida y estimula las funciones efectoras de neutrófilos, células T y macrófagos (*Dinarelli y col., 2012*). Adicionalmente, orchestra la diferenciación y función de las células linfoides innatas y adaptativas (*Mantovani y col., 2011*). La infección de PBMCs con *L. donovani*, VIH o ambas indujo la producción de la IL-1 α , con diferencias notorias (*Fig.15*).

Esta citoquina afecta la patogenicidad de la leishmaniasis al generar una respuesta inflamatoria en los tejidos afectados y al modular respuestas inmunes adaptativas mediadas por las células T, las cuales actúan limitando la diseminación parasitaria. *Tachado y col. (1996)*

demonstraron que el glicoinositolfosfolípido de *L. mexicana* induce señales dependientes de PTK y PKC que regulan negativamente la expresión de IL-1 α , IL-6, TNF- α e iNOS en macrófagos murinos, representando un mecanismo de evasión inmune, favoreciéndose la multiplicación parasitaria. La IL-1 α , producida por CDs, promueve la diferenciación Th1 e inhibe la progresión de la enfermedad en ratones BALB/c susceptibles a *L. major*. Adicionalmente, la administración local de IL-1 α en ratones BALB/c y C57BL/6, durante los primeros tres días de infección con *L. major*, previno la progresión de la enfermedad y redujo dramáticamente el tamaño de las lesiones (Von Stebut y col., 2003). Ji y col. (2003) revelaron que la progresión cutánea de la leishmaniasis en la infección con *L. amazonensis* de ratones C57BL/6 resistentes, no evidenciada en la infección con *L. major* donde hubo sanación, se debió a una expresión significativamente retrasada y disminuida de IL-1 α , IL-12, IFN- γ , MIP-1 α y RANTES en células del ganglio linfático, los cuales son péptidos vinculados al desarrollo de células Th1. No existen precedentes de la producción de esta citoquina por PBMCs parasitados, aunque se indicó que la infección de monocitos humanos, presentes en una significativa proporción en los PBMCs, con *L. major* o *L. donovani* condujo a una disminución de la producción de la molécula; Delfino y col. (1995) destacaron que la producción de IL-1 α depende de la especie parasitaria y el tipo de célula que ésta infecta.

La IL-1 α fomenta la replicación del VIH en células U1, PBMCs y MDMs (Poli y col., 1994; Granowitz y col., 1995; Kinter y col., 1995). La infección *in vitro* de MDMs con VIH deriva en una regulación positiva de la expresión de la IL-1 α , con una secreción constitutiva de ella (Esser y col., 1998). La infección viral de timocitos también induce la producción de la IL-1 α , además de la IL-6; quizás esto afecte la maduración celular y contribuya a la falta de regeneración de linfocitos T CD4⁺ maduros (Sandborg y col., 1994). De igual forma, monocitos obtenidos de sujetos VIH⁺ exhiben producción constitutiva de IL-1 α e IL-1 β , los cuales son suprimidos durante el curso de la terapia antiretroviral (Sadegui y col., 1995; Baqui y col., 2000). Zavala y col. (1995) obtuvieron resultados similares donde se contemplaba la producción de la IL-1 α en monocitos humanos infectados con VIH pero curiosamente también detectaron la producción de significativas cantidades del antagonista de IL-1R, un receptor que transduce señales tras su asociación a su respectivo ligando: considerando el efecto amplificador de la IL-1 sobre la replicación del VIH, un incremento de la generación del antagonista específico de su receptor permitiría establecer una retroalimentación negativa que controlaría la inflamación relacionada al virus, la cual podríamos explotar en el desarrollo de terapias. Nuestros resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Berman y col. (1994) en los que detectaron una producción sustancial de IL-1 α e IL-6 en PBMCs

infectados *in vitro* con VIH durante 72h: estos autores destacan que la sostenida producción *in vivo* de ambas citoquinas contribuiría a la linfadenopatía, fiebre, fatiga y diversas manifestaciones inflamatorias. En adición, la proteína gp120 induce la secreción de IL-1 α , IL-6, IL-10 y TNF- α en PBMCs (Ameglio y col., 2004).

Solo dos investigaciones mencionan a la IL-1 α en la co-infección *Leishmania*/VIH. Zhao y col. (2004a) demostraron que en MDMs co-infectados hubo un aumento de la replicación viral, al contrastarse con células infectadas únicamente con el VIH, relacionado a la inducción de la secreción de IL-1 α mediada por *L. infantum*; no obstante, a diferencia de nuestros resultados en PBMCs, los niveles de IL-1 α secretados por MDMs co-infectados son superiores a aquellos obtenidos en células infectadas con VIH mientras que en aquellas parasitadas los niveles de producción de esta molécula fueron similares al control sin tratamiento. El mismo grupo de investigación desarrolló experimentos similares en tejidos amigdalinos, demostrándose la dependencia en la producción de esta citoquina para la inducción de la replicación viral mediada por el parásito; en este caso, la secreción de la IL-1 α fue mayor en el tratamiento parasitario, tal como ocurrió en los PBMCs, pero aquella obtenida en la co-infección fue aún mayor (Zhao y col., 2004b).

La disminución de la producción de la IL-1 α en la co-infección *L. donovani*/VIH de PBMCs tiene el potencial de exacerbar la multiplicación del parásito ya que esta citoquina ejerce un efecto inmune protector anti-parasitario. De igual forma, a pesar de dicha disminución, los niveles secretados de esta molécula son superiores en la co-infección con respecto a la infección viral y en consecuencia sugerimos que el aumento de la replicación viral reportado (Fig.10) estaría asociado a los aumentados niveles de secreción de esta citoquina. La inducción de la secreción de IL-1 α por *Leishmania* ha mostrado ser dependiente de MyD88, una proteína adaptadora que interactúa con TLRs (Hawn y col., 2002). Es posible que la incorporación del VIH a la co-infección haya perturbado la señalización mediada por los TLRs, resultando en una declinación de la producción de la citoquina, aunque no hay antecedentes de ello. También es probable que las citoquinas anti-inflamatorias generadas en superiores cantidades durante la co-infección (Fig.16) hayan provocado esta atenuada secreción de IL-1 α , tales como IL-4 (Velde y col., 1990) y TGF- β 1 (Harvey y col., 1991).

Debemos ser precavidos si deseamos usar las variaciones de la producción de la IL-1 α como estrategia terapéutica en las co-infecciones. Si deseamos elevar sus niveles debido a su papel protector en la leishmaniasis no podemos olvidar que es capaz de inducir la replicación del virus.

Además, la administración prolongada de IL-1 α promueve la expansión de células Th2, agravando la enfermedad parasitaria murina (*Kostka y col., 2006*). Si por el contrario deseamos disminuir la secreción de esta molécula evitando su regulación positiva sobre la replicación del VIH debemos tomar a consideración el impacto que tendría sobre *Leishmania*. La terapia combinada sería una gran solución: podríamos acompañar una estrategia de reducción de la producción de IL-1 α con la administración del IFN- γ leishmanicida o la elevación de su generación con una molécula que bloquee el mecanismo por el cual IL-1 α amplifica la replicación viral, el cual se cree que es posiblemente a través de la inducción del TNF- α (*Granowitz y col., 1995*).

La IL-12 es generada por monocitos, macrófagos, CD4 y linfocitos B. Dirige la diferenciación de los linfocitos Th hacia células efectoras tipo Th1 (*Trinchieri, 1997*). Incrementa la actividad citotóxica de las células NK, fomenta la producción de células LAK y linfocitos T citotóxicos y eleva la producción de citoquinas Th1, especialmente el IFN- γ (*Abbas y col., 2009*). Hemos obtenido un aumento significativo de su secreción en PBMCs infectados con *L. donovani* mientras que la infección viral y la co-infección solo indujeron una secreción basal (*Fig.15*).

La IL-12 asiste en la respuesta inmune temprana contra la infección parasitaria. La administración de IL-12 en ratones C57BL/6 Δ IL-12 durante las primeras dos semanas de infección con *L. major* permitió el desarrollo de respuestas antiparasitarias Th1 específicas. Inclusive, la transferencia de células Th1 derivadas de un ratón C57BL/6 curado de una infección primaria con *L. major* a un ratón similar Δ IL-12 no condujo al desarrollo de resistencia, indicando que la IL-12 no solo induce una respuesta Th1 sino que también la mantiene (*Park y col., 2000*). La función protectora de la IL-12 también se evidencia en la infección con especies del parásito que ocasionan la enfermedad mucocutánea y visceral (*Liese y col., 2008*). Una reducción de la expresión de la IL-12, entre otras citoquinas, está correlacionada con mayor diseminación parasitaria en modelos murinos (*Ji y col., 2003*). De hecho, la eficacia de la IL-1 α en la inmunidad protectora murina frente a *L. major* reseñada por *Von Stebut y col. (2003)* fue estrictamente dependiente de la IL-12. *Carrera y col. (1996)* observaron que la infección *in vitro* de macrófagos murinos derivados de la médula ósea con *L. major* inhibió completamente la producción de la IL-12, acompañado de una reducción parcial en los niveles proteicos y de ARNm de IL-1 α , TNF- α e iNOS y la ampliación de IL-10 y MCP-1; no se conoce cómo exactamente el parásito ejecutó este mecanismo de evasión inmune. *Park y Scott (2001)* definieron tres mecanismos generales por los cuales actúa la IL-12 en la leishmaniasis: (i) promoción de la proliferación y supervivencia de las células Th1, (ii) estimulación de la renovación de ellas y (iii) prevención del desarrollo de células Th2.

La aplicación de la IL-12 en MDMs anula la replicación viral (Akridge y Reed, 1996). La infección viral impulsa la producción de la IL-12 en macrófagos, con la consecuente acrecencia de la producción del IFN- γ por células T y NK (Trinchieri y Scott, 1999). La estimulación de monocitos y macrófagos con gp120 provoca la expresión y secreción de esta citoquina (Fantuzzi y col., 1996). No obstante, PBMCs aisladas de sujetos VIH⁺ manifiestan discapacidad en la producción de la IL-12 al compararse con aquellas extraídas de donantes sanos, reflejándose una modulación diferencial dependiente del tipo de célula e infección, sea *in vitro* o *in vivo* (Marshall y col., 1999). En nuestro caso, la infección *in vitro* de PBMCs con VIH provocó una leve secreción de la molécula, ligeramente superior al control (Fig.15).

Durante la co-infección el VIH mermó casi completamente la generación de la IL-12 disparada por *L. donovani* (Fig.15). Resultados casi idénticos fueron descritos en la co-infección *L. donovani*/VIH de PBMCs efectuada por Wolday y col. (2000). Ma y Montaner (2000) detallaron procesos potenciales que permitirían la supresión de la expresión de la IL-12 en la infección viral, tales como la señalización de receptores Fc y la producción de IL-10, TNF- α y TGF- β ; esto último demostrado en la co-infección de PBMCs (Fig.15 y 16). También se recalca la regulación negativa del VIH sobre la generación de CD40L en los linfocitos T CD4⁺, una molécula crucial en la formación de la IL-12. Es muy factible que la paupérrima producción de la IL-12 que hemos detectado sea responsable parcial de la incrementada replicación viral y parasitaria en las co-infecciones (Fig.10 y 11).

Según lo descrito, la potenciación de la producción de la IL-12 representa una estrategia terapéutica de gran potencial. Sin embargo, se ha señalado en algunos estudios que la aplicación de la IL-12 es beneficiosa únicamente en las etapas iniciales de la infección parasitaria. Gurunathan y col. (1998) indicaron que la eficacia de los tratamientos IL-12 dependientes precisan de una producción continua de la molécula y en consecuencia recomiendan el uso de plásmidos que codifican la citoquina como terapia auxiliar, los cuales otorgan protección frente al parásito en un mayor período de tiempo. Otra alternativa lo constituiría el uso de compuestos, naturales o sintéticos, que estimulen la generación de la IL-12: por ejemplo, la vacunación de ratones C57BL/6 infectados con *L. major* con el péptido de fusión TAT-LACK, creado por Kronenberg y col. (2010), fomentó una fuerte proliferación de células T CD8⁺ mediante la regulación positiva de la IL-12, con mejorías notables en la sintomatología de la enfermedad parasitaria.

El IFN- γ es producido por CDs, NK, NKT, monocitos, macrófagos, linfocitos T y B (Frucht y col., 2001). La IL-12 e IL-18 son los inductores más relevantes de la producción de esta citoquina.

Entre los reguladores negativos se encuentra la IL-4, IL-10, TGF- β y los glucocorticoides. Es un potente activador de fagocitos mononucleares, siendo uno de los principales promotores de la respuesta inmune Th1 (Schroder y col., 2004). Además, eleva la expresión de moléculas del CPH de clase I y II, favoreciéndose la defensa del hospedero contra patógenos intracelulares (Abbas y col., 2009). El patrón de producción del IFN- γ en los PBMCs infectados con *L. donovani* y/o VIH fue similar al conseguido con la IL-12 (Fig.15).

Existe evidencia extensiva que vincula al IFN- γ con la leishmaniasis, destacando su función protectora y antiparasitaria. La producción del IFN- γ por células NK, activadas por macrófagos y CDs generadoras de la IL-12, constituye uno de los principales eventos de la respuesta inmune innata temprana frente a *Leishmania* (Liese y col., 2008). Dichas células NK tienen la capacidad de destruir células parasitadas; en adición, el IFN- γ también tiene una función leishmanicida al activar macrófagos, incitando a la generación de ROI y RNI tales como NO e hidroxilo (Alexander y Russell, 1992). La delección del gen *NOS2*, el uso de inhibidores de iNOS o la disrupción de la síntesis del IFN- γ provoca susceptibilidad en los ratones a la infección parasitaria (Bogdan y Rollonghoff 1999; Laurenti y col., 1999). De igual forma, un acortamiento de la expresión de esta citoquina fomenta la propagación de las lesiones leishmaniales (Ji y col., 2003). Adicionalmente, el IFN- γ inhibe el desarrollo de una respuesta Th2 causada por una producción y actividad excesiva de la IL-1 α (Wagner y col., 1991). Previamente, hemos enunciado los variados mecanismos que emplea el parásito en su evasión frente a los numerosos procesos inmunes iniciados por la activación celular mediada por el IFN- γ .

La literatura concede evidencias conflictivas con respecto al efecto del VIH sobre la producción del IFN- γ . La infección *in vitro* de células T CD4⁺ resultó en una modulación negativa significativa de los niveles de ARNm del IFN- γ (Fan y col., 1997), pero otros investigadores reportaron secreción aumentada de la citoquina en el mismo tipo de células (Vyakarnam y col., 1990); esta discrepancia sería explicada por el tipo de co-receptor usado ya que ambas cepas virales empleadas poseían distintos tropismos. La síntesis del IFN- γ en individuos VIH⁺ decrece con la progresión de la enfermedad (Hong y col., 1998). La secreción del IFN- γ está significativamente mermada en PBMCs derivados de sujetos infectados en comparación a individuos sanos, aunque la infección *in vitro* activa moderadamente dicha secreción (Meroni y col., 1996); hemos demostrado que la infección viral *in vitro* de PBMCs aislados de un donante sano indujo una pequeña secreción de esta citoquina (Fig.15). La regulación negativa de la generación del IFN- γ en la infección viral es causada tanto por la atenuación de los niveles de ARNm como por la

mitigación de subconjuntos de células T CD4⁺ y T CD8⁺ productoras de la molécula (Meynard y col., 1996). El IFN- γ reprime la replicación del VIH en MDMs (Poli y Fauci, 1992), monocitos humanos (Fan y col., 1994), células U937 (Bovolenta y col., 1999), entre otros; la inhibición de la vía de señalización JAK/STAT o la regulación negativa de la expresión de CD4 representa algunos de los mecanismos por los cuales el IFN- γ ejecuta su efecto.

En la co-infección *L. donovani*/VIH de PBMCs el virus inhibió la secreción del IFN- γ inducida por el parásito pero a diferencia de la IL-12 sus niveles fueron levemente superiores al grupo de tratamiento viral (Fig.15); es posible que otros elementos inductores del IFN- γ , por ejemplo la IL-18, todavía participen en la co-infección. Wolday y col. (2000) reafirman la regulación negativa del VIH sobre la síntesis y liberación del IFN- γ en la co-infección de PBMCs pero la supresión fue absoluta y sus niveles sí fueron inferiores a los apreciados con la IL-12 en la co-infección; debemos destacar que en esta investigación se emplearon cepas virales/parasitarias diferentes y un tiempo de infección de 48h. Por su parte, Nigro y col. (1999) no fueron testigos de un cambio en la producción del IFN- γ en PBMCs extraídos de sujetos VIH⁺ y co-infectados, aunque sí evidenciaron un incremento sustancial de la generación de citoquinas Th2 en la co-infección. No obstante, Rodrigues y col. (2011) sí presenciaron una declinación de los niveles del IFN- γ en el plasma y PBMCs de pacientes LC/VIH⁺ co-infectados al compararse con sujetos LC/VIH⁻. Además, se ha sugerido que la represión de la síntesis del IFN- γ mediada por el VIH sería parcialmente responsable de la inhibición de respuestas linfoproliferativas inducidas por *L. donovani* en las co-infecciones (Wolday y col., 1994; 2000).

La trastornada expresión del IFN- γ en la co-infección *L. donovani*/VIH sería causa parcial de la potenciada replicación parasitaria y viral; por consiguiente, recomendamos la búsqueda de compuestos que asistan a la activación, proliferación y supervivencia de células que secreten esta citoquina. Por ejemplo, el uso del péptido LeIF (factor de iniciación de la elongación de *Leishmania*) induce la producción de IL-12 e IFN- γ , promoviendo una respuesta inmune Th1 específica provechosa en terapias (Skeiky y col., 1998). Sin embargo, considerar al IFN- γ en la terapia contra VIH no es tan sencillo ya que a diferencia de otros interferones de tipo I esta citoquina no tiene actividad antiviral directa y en algunas ocasiones no ha mostrado ser significativamente eficiente. Generalmente, es empleada como terapia auxiliar en combinación con otras vacunas al estimular las actividades de células NK y linfocitos T citotóxicos contra células infectadas con el virus (Roff y col., 2014).

El TNF- α es sintetizado por células NK, fibroblastos, mastocitos, monocitos, macrófagos, linfocitos T y B (Abbas y col., 2009). La señalización del TNF- α se produce a través de la unión del ligando con dos receptores, TNFR1 y TNFR2, que carecen de actividad metabólica propia, precisando la asociación de moléculas adaptadoras. Contribuye a la resistencia a infecciones mediante la activación de plaquetas y neutrófilos siendo capaz de amplificar la actividad de muerte de células NK y macrófagos (Shen y Pervaiz, 2006). La infección de PBMCs con *L. donovani* o VIH indujo secreción del TNF- α , siendo ésta superior en la co-infección (Fig.15).

Durante la leishmaniasis el TNF- α es principalmente producido por macrófagos, ejerciendo un efecto sinérgico en conjunto con el IFN- γ en la eliminación parasitaria mediante la síntesis del NO (Bogdan y Rollonghoff, 1999). Esta citoquina es capaz de promover respuestas Th1/IFN- γ frente a la infección con *L. major* (Sharma y Singh, 2009). Ratones C57BL/6 deficientes en TNF- α infectados con *L. major* exhibieron infecciones viscerales fatales a pesar de la producción de IL-12 e IFN- γ por macrófagos (Wilhelm y col., 2001). Infortunadamente, la síntesis excesiva del TNF- α es perjudicial, asociándose con daño tisular agravante en los sitios de infección parasitaria. En pacientes asintomáticos la moderada producción del TNF- α estuvo ligada a control del crecimiento parasitario pero un exceso de ésta se vinculó con lesiones de mayor tamaño y morfologías peculiares (Antonelli y col., 2005).

Macrófagos primarios infectados *in vitro* con VIH o tratados con gp120 secretan el TNF- α (Karsten y col., 1996). El TNF- α es un potente estimulador de la replicación del VIH en los linfocitos T y monocitos/macrófagos (Novak y col., 1990; Naif y col., 1994) a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B y/o AP-1 (Griffin y col., 1991). Sin embargo, a pesar de impulsar su replicación, el TNF- α complica la entrada del VIH a través de la regulación negativa de superficie de CD4 y CCR5 (Herbein y col., 1996). Sorpresivamente, el TNF- α induce la secreción de las quimioquinas MIP-1 α y RANTES, conocidos factores supresores del VIH (Herbein y Gordon, 1997). El TNF- α se encuentra entre los supresores de la producción de la IL-12 mediada por FcRs o inmunocomplejos, representando un mecanismo de atenuación de respuestas pro-inflamatorias excesivas (Berger y col., 1997). Aunque en las etapas tardías de la enfermedad viral hay una declinación de los niveles del TNF- α , por la acción de citoquinas Th2 anti-inflamatorias, varias proteínas del VIH tales como Nef, Vpr, Tat y gp120 activan vías de señalización que también son iniciadas por esta molécula (Herbein y Khan, 2008).

La infección con *L. donovani*, *L. infantum* o el tratamiento con LPG en líneas celulares monocitoides, conjugados celulares CD/T, linfocitos T CD4⁺, MDMs y tejidos amigdalinos

humanos indujo la replicación del VIH mediante la síntesis y secreción del TNF- α , entre otros procesos (Bernier y col., 1995; Medrano y col., 1998b; Wolday y col., 1999; Zhao y col., 2004, a,b; Garg y col., 2009); el patrón de secreción del TNF- α en MDMs y tejidos amigdalinos fue similar al obtenido en PBMCs (Fig.15), aunque en éstos últimos la producción estimulada por *L. infantum* fue superior a aquella promovida por el virus. Los niveles del TNF- α en el suero de pacientes co-infectados son superiores a los contemplados en individuos VIH⁺ (Olivier y col., 2003). Guimaraes y col. (2015) responsabilizaron a los excesivos niveles del TNF- α , entre otros elementos, en la potencial contribución al desarrollo de úlceras en la piel en los pacientes co-infectados. Es llamativo que el TNF- α intensifique notablemente la formación de sincitios en la infección viral *in vitro* de PBMCs y linfocitos T CD4⁺ (Vyakarnam y col., 1990); nos preguntamos si su aumentada síntesis (Fig.15) sería responsable parcial de la elevación en la formación de sincitios (Fig.9) durante la co-infección *L. donovani*/VIH.

Fijar como blanco terapéutico al TNF- α nos traslada a un escenario similar al de IL-1 α : buscar la reducción de sus niveles impidiendo su efecto regulador positivo sobre la replicación viral afectaría su función protectora antiparasitaria mientras que estimular su producción causaría los efectos reversos. Por ejemplo, si disponemos de algún compuesto que induzca la producción de esta citoquina sería sensato emplear además algún bloqueador que suprima su efecto sobre la activación del NF- κ B; para ello debemos realizar una revisión exhaustiva de los componentes participantes corriente abajo que en últimas instancias desemboquen en la mencionada activación. No obstante, creemos que sería más prudente explorar terapias que mitiguen la generación del TNF- α en la co-infección: ya hemos mencionado que elevados niveles de esta citoquina conducen a destrucción tisular y desarrollo de lesiones parasitarias progresivas. Inclusive, se ha sugerido que el TNF- α es responsable de la diseminación linfática de *Leishmania*, causando la infección de las mucosas de las vías respiratorias, al detectarse niveles superiores de ella en pacientes con LM en comparación a sujetos con LC (Oliveira y col., 2014). Adicionalmente, en algunos modelos murinos incapaces de expresar el TNF- α o sus receptores todavía se inician respuestas Th1 antiparasitarias estimuladas por otras moléculas (Nashleanas y Scott, 2000). Consideramos que aplacar la generación del TNF- α es una táctica adecuada que silenciaría su efecto pro-viral y suavizaría la sintomatología parasitaria; las actividades antiparasitarias protectoras podrían ser estimuladas a través de una combinación con compuestos que faciliten la síntesis de IL-12/IFN- γ . Por ejemplo, el uso de talidomida o LMP-420 reduce los niveles séricos de la citoquina y controla la carga viral (Pasquereau y col., 2017). Compuestos naturales como el mencionado

dolabelladienetriol son una excelente alternativa dado que fomenta una declinación de los niveles de producción del TNF- α , al bloquear la activación del NF- κ B, y además inhibe significativamente el crecimiento de *Leishmania* en macrófagos (Soares y col. 2012).

Las citoquinas anti-inflamatorias tienen la capacidad de bloquear los procesos inflamatorios e inclusive algunas de ellas inhiben directamente la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Abbas y col., 2009); hemos analizado la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y TGF- β . En este caso obtuvimos resultados más homogéneos, con una mayor secreción de estas citoquinas en la infección viral al compararse con la infección parasitaria, siendo ésta superada durante la co-infección (Fig.16).

La IL-4 es producida por las células NK, mastocitos y subconjuntos especializados de células T, basófilos y eosinófilos. Ejerce sus efectos a través de receptores específicos que son expresados en células hematopoyéticas, endotelio, hepatocitos, células epiteliales, fibroblastos, neuronas y músculos (Pestkoi y col., 2004). Regula la diferenciación de las células T activadas por antígeno y suprime la producción de células Th1 (Abbas y col., 2009).

La IL-4 es un importante contribuidor de la patogénesis parasitaria. La generación de la IL-4 regula positivamente la síntesis de arginasa y poliaminas que inhiben la actividad leishmanicida de macrófagos, prolongándose la supervivencia parasitaria (Kropf y col., 2005). Heinzel y col. (1989) detectaron niveles significativos del ARNm de la IL-4 solo en ratones BALB/c infectados con *L. major* pero no en las cepas resistentes infectadas. Mediante la supresión de la producción de la IL-2, la IL-4 limita la generación de citoquinas Th1 (Szabo y col., 1997) y además mitiga la producción de quimioquinas que reclutan células Th1 a los sitios de infección, entre ellas RANTES (Lazarski y col., 2013). Estudios en ratones susceptibles BALB/c deficientes en IL-4 han mostrado que éstas se hacen resistentes a la infección con *L. major* mientras que los ratones resistentes C57BL/6 que sobre-expresan esta citoquina son más susceptibles a la infección parasitaria en contraste a su contraparte silvestre (Kopf y col., 1996).

Varias investigaciones han mostrado una acrecentada secreción de la IL-4 ligada a la infección *in vivo* con el VIH: aumentados niveles de la citoquina han sido obtenidos en PBMCs y linfocitos T CD4⁺ aislados de pacientes VIH⁺ en distintas etapas de la enfermedad (Barcellini y col., 1994; Maggi y col., 1994); sin embargo, existen reportes contradictorios que muestran como la generación de la citoquina se mantiene invariable durante la infección viral (Meyaard y col., 1996). Detectables niveles del ARNm de la IL-4 en PBMCs de individuos VIH⁺ pasan a ser indetectables tras la aplicación de HAART (Imami y col., 1999). La IL-4 estimula la replicación

del VIH en PBMCs, monocitos, MDMs y líneas celulares promonocíticas (Kazazi y col., 1992; Naif y col., 1994, 1997; Foli y col., 1995). Curiosamente, Wang y col. (1998) demostraron que el tratamiento de monocitos primarios con IL-4 inhibió parcialmente la replicación del VIH aunque esto fue debido a su efecto negativo sobre la expresión de superficie de CCR5, bloqueando la entrada del virus (Lazarski y col., 2013); debemos destacar que el impacto de la IL-4 sobre CCR5 es dependiente del tipo celular y además su regulación negativa sobre la expresión del receptor no culmina en disminución de la replicación viral en los MDMs (Wang y col. 2002). La proteína Tat es requerida para el efecto estimulador de la IL-4 sobre el VIH. Asimismo, la IL-4 regula diferencialmente la expresión de receptores al elevar y disminuir los niveles de CXCR4 y CCR5 en linfocitos T primarios, respectivamente; por ello, se ha propuesto que la IL-4 facilita la propagación de cepas inductoras de sincitios, lo cual conduce a la aceleración de la progresión de la enfermedad viral (Valentin y col., 1998).

Con relación a la co-infección *Leishmania*/VIH apenas dos investigaciones evalúan el papel de la IL-4. Wolday y col. (2000) evidenciaron un incremento significativo en la secreción de la IL-4 en PBMCs *L. donovani*/VIH co-infectados en comparación a aquellos parasitados donde no hubo secreción de la molécula; lamentablemente, estos investigadores no cuantificaron la generación de la citoquina en PBMCs infectados únicamente con el virus. Sin embargo, Nigro y col. (1999) sí compararon los niveles de la IL-4, secretados por PBMCs, entre sujetos *L. infantum*/VIH co-infectados y VIH⁺, obteniéndose niveles superiores de la molécula en el grupo de co-infección; en su estudio no contaron con individuos únicamente parasitados. Nosotros hemos contrastado la producción de la IL-4 en PBMCs infectados con *L. donovani* y/o VIH, contemplándose una secreción leve en el grupo parasitado, notoria con la infección viral y magnificada en la co-infección (Fig.16), en concordancia con las investigaciones previas.

Debido a su efecto potenciador sobre ambos patógenos, las modulaciones de la IL-4 y su señalización deben ser consideradas en las estrategias terapéuticas. Las inmunoterapias que conducen a la elevación de IL-12/IFN- γ y declinación de la IL-4 aminoran la carga parasitaria y el tamaño de las lesiones (Heinzel y col., 1996). Sadick y col. (1990) hallaron que la neutralización de la IL-4 con anticuerpos monoclonales inhibió el desarrollo de respuestas Th2 en modelos murinos parasitados, con una cura completa en 85% de los ratones y atenuación de la infección en el 100% de dichos animales. Inclusive, la delección del gen de la IL-4R α derivó en una mayor resistencia y control de la infección parasitaria murina al compararse con la delección del gen de la citoquina (Noben-Trauth y col., 1999); esta observación abre un abanico de posibilidades para el

desarrollo de tratamientos alternativos al de la propia modulación de los niveles de una citoquina, tales como antagonistas de receptores o bloqueadores de proteínas activadas corriente-abajo tras la unión citoquina-receptor. Compuestos naturales como las emulsiones de eugenol tienen un gran potencial en el tratamiento de la leishmaniasis y el aplacamiento de la carga viral en pacientes co-infectados al impulsar la síntesis de IL-12/IFN- γ y perturbar la generación de IL-4/IL-10, entre otros efectos (*Islamuddin y col. 2016*).

La IL-5 es producida por las células Th2, monocitos, macrófagos, células NK, NKT, $\gamma\delta$ T y eosinófilos (*Sakuishi y col., 2007*). Estimula la proliferación y diferenciación de linfocitos B inducidos por antígeno (*Takatsu y col., 1994*). Impulsa la producción de anticuerpos tales como IgA. Además, regula el crecimiento, diferenciación, activación y supervivencia de eosinófilos (*Takatsu y col., 2011*).

Múltiples investigaciones correlacionan la exacerbación de la leishmaniasis con la síntesis de IL-4 e IL-10; no obstante, la IL-5 también tiene un espacio en la patogénesis parasitaria. El desarrollo de respuestas Th2 en ratones resistentes parasitados con disrupción del gen para el IFN- γ es impulsado por la IL-5, entre otras citoquinas (*Wang y col., 1994*). Mientras la IL-4 e IL-13 son inducidas al inicio de la infección parasitaria murina en grupos curados o no, la IL-5 e IL-10 son generadas solo en el grupo de ratones parasitados no curados, indicando que estas últimas citoquinas no solo son necesarias en la inducción de respuestas Th2 sino también en su mantenimiento (*Nashed y col., 2000*). No obstante, la IL-5 también ejecuta acciones protectoras: por ejemplo, en ratones transgénicos con IL-5, en los cuales el 50% de los leucocitos de sangre periférica eran eosinófilos, se suprimió la progresión de la infección con *L. amazonensis*, presumiblemente mediante la generación de peróxido de hidrógeno por eosinófilos activados (*Watanabe y col., 2004*). Asimismo, *Mary y col. (1999)* detectaron clones de células T CD4⁺ de dos individuos asintomáticos infectados con *L. infantum* que exhibían un fenotipo inusual al producir altos niveles de IFN- γ e IL-5 y bajos niveles de la IL-4: estos autores sugieren que una respuesta inmune completamente polarizada hacia la vía Th1 no es la mejor forma de controlar la infección parasitaria visceral dado que las citoquinas Th2 también evitarían respuestas inflamatorias excesivas.

Magnificados niveles de la IL-5 han sido hallados en células T CD4⁺ (*Meyaard y col., 1994*), T CD8⁺ (*De Maria y col., 2000*) y plasma/suero (*Shebl y col., 2012*) de individuos VIH⁺ en comparación a sus contrapartes no infectadas. No obstante, la infección con VIH o la transfección

de genes del virus no necesariamente concluyen en niveles acrecentados del péptido (*Sharma y col., 1995; Tanaka y col., 1999*).

Nuestros experimentos son los únicos que han determinado la secreción de la IL-5 en las co-infecciones *Leishmania*/VIH, con una acrecentada producción de ella en PBMCs expuestos simultáneamente a ambos patógenos (*Fig.16*). La información que vincula a IL-5 con *Leishmania* o VIH es escasa y a pesar de desconocerse exactamente el impacto de la citoquina sobre los patógenos asumimos la noción general de asociarla con la promoción de respuestas Th2 que debiliten el sistema inmune celular y favorezcan la replicación de ambos agentes infecciosos.

La insuficiente información presente en la bibliografía sobre las funciones de la IL-5 en la infección viral y su versátil papel en la leishmaniasis hace difícil considerarlo como blanco terapéutico. Si la molécula efectúa funciones protectoras o agravantes en la infección parasitaria sería de interés identificar los elementos participantes de cada ruta y determinar qué hace que la balanza se incline hacia uno u otro lado. Pese a que su función anti-inflamatoria y promotora de respuestas Th2 nos hace pensar intuitivamente en una terapia que busque mitigar sus niveles o atenuar su señalización es necesario considerar el impacto que esto tendría sobre los eosinófilos. Además, cuál sería el impacto en las co-infecciones de la infección viral de eosinófilos sobre las actividades efectoras de éstas y su potencial función antiparasitaria. Por otra parte, tomando en cuenta la incrementada producción de la IL-5 en las co-infecciones surge la posibilidad de considerar a la eosinofilia como un putativo marcador de progresión de enfermedad en los pacientes co-infectados.

La IL-6 es sintetizada por monocitos, macrófagos, osteoblastos, células endoteliales vasculares, CDs, fibroblastos y linfocitos T (*Abbas y col., 2009*). Modula la diferenciación, proliferación y producción de inmunoglobulinas en las células B, provoca la movilización de los neutrófilos e induce la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos (*Horn y col., 2000*).

La evidencia acumulada coloca a la IL-6 como un factor de susceptibilidad en la leishmaniasis. La IL-6 en conjunto con el TGF- β estimula el desarrollo de respuestas Th17 que producen las citoquinas IL-10 e IL-17, orientando a una restricción de estas células a funciones patogénicas (*McGeachy y col., 2007*). Experimentos en animales han demostrado que la IL-6 promueve respuestas Th2: por ejemplo, *Moskowitz y col. (1997)* mostraron que los ratones resistentes C57BL/6 deficientes en IL-6 infectados con *L. major* controlan la infección y manifiestan fuertes respuestas Th1 tan eficientes como aquellas exhibidas por sus contrapartes silvestres. Dicho control parasitario también ha sido reportado para la infección visceral murina

(Murray, 2008). La infección parasitaria *in vitro* de macrófagos murinos resistentes también ha contemplado un incremento en la generación de la citoquina (Filardy y col., 2014). Asimismo, en PBMCs aislados de donantes sanos infectados con *L. braziliensis* hay una estimulación en la producción de IL-6, IL-10 y TGF- β (Gomes y col., 2014). En adición, Hatzigeorgiou y col. (1993) hallaron que el pre-tratamiento de macrófagos con la IL-6 suprime la producción del IFN- γ y TNF- α , facilitando la supervivencia de *L. amazonensis*.

La infección *in vitro* de MDMs con VIH y la estimulación de la línea celular monocítica THP-1 o PBMCs con gp41 y gp120, respectivamente, incrementa la expresión y secreción de la IL-6 (Takeshita y col., 1995; Capobianchi, 1996; Esser y col., 1998; Foli y col., 1997). De igual forma, la concentración de la IL-6 es superior en el suero de individuos VIH⁺ al compararse con aquellos no infectados (Birx y col., 1990; Breen y col., 1990). La IL-6 amplifica la replicación del VIH en PBMCs, MDMs y células U937 (Poli y col., 1990; Poli y Fauci, 1992). Esta citoquina sinergiza con el TNF- α en la regulación positiva de la producción viral al potenciar la actividad transcritora del NF- κ B inducida por el TNF- α (Poli y col., 1994).

La producción de la IL-6 se ha correlacionado con la ampliación de la producción viral en MDMs co-infectados con *L. infantum*/VIH (Zhao y col., 2004a); similar a nuestros resultados en PBMCs (Fig.16), en los MDMs la concentración de la IL-6 secretada fue superior en las co-infecciones al compararse con la infección viral aunque no se detectó producción significativa de ella en la infección parasitaria. En adición, la infección *in vitro* de conjugados celulares CD/T con *L. infantum* induce la replicación del VIH mediante la secreción de la IL-6 desde las CDs (Garg y col. 2009). En un estudio *in vivo* se hallaron concentraciones proteicas superiores de la IL-6 y TNF- α en el plasma de pacientes co-infectados con LV/VIH (Santos-Oliveira y col., 2013).

Es factible que los elevados niveles de la IL-6 en la co-infección sean una de las causas principales de la potenciación parasitaria y viral. Es curioso el caso particular de la IL-6 ya que pese a que la evidencia extensiva la posiciona como una citoquina anti-inflamatoria también efectúa actividades pro-inflamatorias; de hecho, IL-1 α y TNF- α estimulan su síntesis e inclusive la IL-6 hace sinergia con algunos de sus efectos. No obstante, la IL-6 inhibe la síntesis de varias citoquinas involucradas en procesos inflamatorios tales como IL-2, IL-3, GM-CSF e IFN- γ así como también a las mismas IL-1 α y TNF- α , estableciéndose una retroalimentación negativa entre estos tres elementos (Abbas y col., 2009). Por consiguiente, a pesar que la disminución de la concentración de la IL-6 generada o el bloqueo de los variados elementos celulares que facilitan su señalización pueda parecer la mejor ruta en su uso como blanco de terapia no olvidemos que ella

logra atenuar las respuestas inflamatorias excesivas. Por ejemplo, el desarrollo de hiperalgesia en ratones susceptibles con alta carga parasitaria puede ser mitigada mediante un incremento sustancial de la producción de la IL-6 (*Karam y col., 2013*). La bibliografía menciona múltiples drogas que fijan como blanco a la IL-6 para el tratamiento de ciertas patologías como la artritis, las cuales podrían albergar el potencial de ser efectivas en el tratamiento de pacientes co-infectados.

La IL-10 es expresada en linfocitos T, linfocitos B, CD8, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células NK (*Maynard y Weaver, 2008*). Es un potente inhibidor de la IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, IL-18, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ y de ella misma (*Hazlett y col., 2014*). Es un reconocido promotor de la respuesta inmune Th2 y entre sus funciones más destacadas se encuentra suprimir las funciones efectoras de monocitos y macrófagos (*Pestkoi y col., 2004*).

La síntesis de la IL-10 limita la respuesta inmune contra patógenos intracelulares como *Leishmania*, asociándose con susceptibilidad y persistencia parasitaria en los sitios de infección. La ausencia de expresión de la IL-10, el bloqueo de su receptor o la depleción de células Treg que generan esta citoquina durante la infección cutánea crónica de ratones condujo a la eliminación parasitaria y cicatrización de las heridas (*Anderson y col., 2005*). *Buxbaum y Scott (2005)* hallaron que los ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* manifestaron respuestas inmunes mínimas y lesiones crónicas mientras que aquellos incapaces de generar la IL-10 exhibieron resolución de sus lesiones con una aumentada producción de IFN- γ y NO. A pesar de sus efectos supresores que fomentan la progresión y persistencia de la enfermedad parasitaria, esta citoquina es un inmunoregulador vital que modula la inmunopatología y daño tisular causados por respuestas inmunes Th1 excesivas iniciadas por el IFN- γ en la LC (*Gomes-Silva y col., 2007*). Durante la infección con *L. major*, las células Treg CD4⁺ CD25⁺ se acumulan en la dermis y suprimen la función de las células T CD4⁺ efectoras en su eliminación parasitaria mediante mecanismos dependientes e independientes de la IL-10; las células Treg CD4⁺ CD25⁺ son responsables de la persistencia del parásito en las lesiones cicatrizadas (*Belkaid y col., 2002*). En individuos parasitados las respuestas Th2 polarizadas están vinculadas a concentraciones notorias de la IL-10 (*Salhi y col., 2008*). La relación IFN- γ /IL-10 es una medida útil en la determinación de la efectividad de tratamientos leishmanicidas.

La infección *in vitro* con VIH así como el tratamiento con gp120 o gp41 de PBMCs, monocitos y MDMs resulta en una elevación significativa de la secreción de la IL-10 y los niveles de su ARNm en contraste a las células no infectadas o no tratadas (*Borghi y col., 1995*; *Gessani y*

col., 1997; Barcova y col., 1998). La expresión acrecentada de esta citoquina también ha sido evidenciada en sujetos VIH⁺ en todas las etapas de la enfermedad a diferencia de sus contrapartes seronegativas (Barcellini y col., 1994; Imami y col., 1999). La dupla IL-10 y TNF- α en individuos infectados se ha sugerido como marcador de progresión de enfermedad viral (Rizzardi y col., 1998). La IL-10 inhibe la replicación viral en monocitos y MDMs probablemente a través de la regulación negativa de la IL-6 y TNF- α (Weissman y col., 1994). No obstante, la IL-10 también bloquea la producción de citoquinas antivirales como IL-12 e IFN- γ y facilita la infección viral al elevar la expresión de superficie de CCR5 en monocitos y macrófagos (Sozzani y col., 1998; Makuta y col., 2003). En consecuencia, su rol en la infección viral no es definitivo, dependiendo de un balance entre sus múltiples funciones.

En la co-infección *Leishmania*/VIH varias evidencias señalan el papel agravante de la IL-10. En PBMCs co-infectados *in vitro* la secreción de la IL-10 fue mayor que la generada en las células parasitadas, las cuales no produjeron cantidades significativas del péptido al compararse con el grupo control sin tratamiento (Wolday y col. 2000), un resultado similar al nuestro (Fig.16). Análisis *in vivo* también muestran concentraciones superiores de la IL-10 en PBMCs y plasma obtenidos de pacientes co-infectados en comparación a los sujetos parasitados o VIH⁺ (Nigro y col., 1999; Rodrigues y col., 2011). Adicionalmente, la activación de PKR por Tat induce la producción de la IL-10, entre otros efectos, fomentándose la proliferación de *L. amazonensis* en macrófagos humanos (Vivarini y col. 2015).

Indudablemente, la mitigación de la señalización de la IL-10 a través de la modulación de su producción o la inhibición de aquellas proteínas participantes corriente abajo tras su unión al receptor deben estar incluidas en las futuras estrategias terapéuticas. Al ser una molécula inmunosupresora importante, atenuar la acción de esta molécula no solo permitiría la eliminación parasitaria mediante la activación celular y el inicio de actividades efectoras leishmanicidas sino también evitaríamos la persistencia y reactivación parasitaria, frecuentemente observada en individuos co-infectados tras ser sometidos a tratamientos. La anteriormente mencionada emulsión de eugenol ejerce efectos anti-parasitarios mediante el bloqueo de la síntesis de IL-10 (Islmauddin y col., 2016). El también comentado dolabelladienetriol inhibe significativamente la replicación de *Leishmania* inclusive en presencia de factores que potencian al parásito tales como IL-10 y TGF- β (Soares y col., 2014). No obstante, es necesario ser cauteloso: por ejemplo, las drogas anti-VIH lopinavir/ritonavir y atazanavir generan una reducción en la secreción de la IL-10 por macrófagos

murinos pero también disminuyen la síntesis de la IL-12 y NO, importantes moléculas antiparasitarias (Alves y col., 2015).

El TGF- β 1 es generado por monocitos, macrófagos, plaquetas, CDs, células endoteliales, neutrófilos, linfocitos T y B. Es uno de los reguladores negativos endógenos más potentes de la hematopoyesis (Kubiczkova y col., 2012). Tiene la habilidad de modular la proliferación, diferenciación y función de todos los linfocitos, macrófagos y CDs. Está implicado en la maduración y diferenciación de las células B (Lebman y Edmiston, 1999). Generalmente, es un supresor de varias funciones efectoras de monocitos y macrófagos, tales como la generación de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno (Massagué, 2012).

El TGF- β 1 es un inmunoregulador que inhibe las respuestas Th1 contra *Leishmania* al modular negativamente la expresión del IFN- γ , TNF- α y NO, inactivar los macrófagos, inhibir la estimulación de la IL-2R y suprimir la generación de T-bet, el principal regulador de la diferenciación de los linfocitos Th1 (Barral y col., 1995; Kedzierski y Evans, 2014). Esta citoquina exacerba la infección con *L. amazonensis* y *L. braziliensis* mediante la inducción de la IL-10 (Gorelik y col., 2002). Barral y col. (1995) reportaron que la adición del TGF- β recombinante a macrófagos murinos o humanos aumentó la carga parasitaria *in vitro*. Incluso en presencia de respuesta Th2 dominantes, la ausencia del TGF- β facilita la generación de bajos niveles del IFN- γ pero suficientes para la activación de macrófagos y la consecuente eliminación parasitaria en las lesiones (Li y col., 1999). Gantt y col. (2003) señalaron que en ratones infectados con *L. chagasi* y en humanos con LV hay una producción acrecentada del TGF- β y demostraron que dicha especie parasitaria ocasionaba la activación del TGF- β posiblemente mediante cisteín proteasas; esta citoquina al secretarse está inactiva por su asociación de forma no covalente al péptido asociado a latencia (LAP) y a la proteína de unión a TGF- β de latencia (LTBP). Por su parte, Kariminia y col. (2005) revelaron que las células Treg CD4⁺ CD25⁺ representan una de las principales fuentes generadoras del TGF- β 1 en PBMCs infectados *in vitro* con *L. guyanensis*.

Zoetewij y col. (1998) determinaron que IL-4 y TGF- β 1 inducen la expresión de CXCR4 en células de Langerhans facilitando la infección, formación de sincitios y replicación del VIH. El TGF- β 1 inhibe la producción de citoquinas inhibitorias de la replicación viral tales como IL-12 e IFN- γ aunque también hace lo propio en citoquinas potenciadoras como el TNF- α ; no obstante, la evidencia acumulada coloca al TGF- β 1 como un contribuidor del VIH y además esta citoquina ejerce un efecto diferencial sobre la expresión de IL-1 α , IL-6 y TNF- α dependiente del tipo celular (Lazdins y col., 1991; Shukla y col., 1993). La proteína gp120 es capaz de unirse al receptor $\alpha_4\beta_7$

en células B primarias elevándose la expresión del TGF- β 1 y el receptor inhibitorio de linfocitos B FcRL4 culminando en respuestas proliferativas defectuosas, indicando que esta citoquina participa en la disfunción de las actividades de las células B durante la infección viral (*Jelicic y col., 2013*). Asimismo, la proteína Tat induce la producción del TGF- β 1 en monocitos primarios aparentemente gracias a una regulación positiva tanto a nivel transcripcional, al unirse al promotor del gen de la citoquina, como post-transcripcional al promover la estabilidad de los transcritos de ARNm (*Gibellini y col., 1994*). De hecho, la secreción del TGF- β 1 en MDMs infectados con VIH o tratados con Tat ha mostrado estar implicada en el incremento de la replicación del tripanosomátido no patogénico *B. culicis* (*Barreto-de-Souza y col., 2008*).

El efecto agravante del TGF- β 1 también se extiende a la co-infección *Leishmania*/VIH. Por ejemplo, la neutralización del TGF- β 1 a través de anticuerpos monoclonales redujo significativamente el crecimiento, inducido por Tat, de *L. amazonensis* en macrófagos humanos (*Barreto-de-Souza y col., 2006*). Adicionalmente, la elevación de la expresión de superficie de CD91 en MDMs infectados con VIH, lo cual facilita la incorporación de los parásitos a las células, mostró ser dependiente de la activación del TGF- β 1 extracelular (*Lodge y col. 2012*). Es factible que la magnificada secreción del TGF- β 1 en PBMCs co-infectados (*Fig.16*) sea una de las principales responsables de la supresión de numerosas actividades efectoras inmunes que desembocan en una aún mayor patogenicidad viral y parasitaria.

Al ser el TGF- β 1 uno de los inmunosupresores más críticos es necesario su fijación como blanco terapéutico. El tratamiento de ratones susceptibles con anticuerpos monoclonales anti-TGF- β 1 causó una declinación y ampliación de IL-4 e IFN- γ , respectivamente, en los ganglios linfáticos que finalizó en una mejoría y atenuación de las lesiones (*Barral y col., 1993*). Otro estudio mostró que la inoculación local de dichos anticuerpos mitigó la carga parasitaria y aceleró la sanación sin modificar las concentraciones de IL-4 e IFN- γ , aunque si incrementó la síntesis de NO (*Li y col., 1999*). Recientemente, *Chowdhury y col. (2015)* caracterizaron un ligando del TLR2 conocido como lipoarabinomanano arabinosilado (Ara-LAM), un glicolípido de pared celular de *Mycobacterium smegmatis*: ratones susceptibles infectados con *L. donovani* exhibieron una fuerte respuesta Th1 protectora gracias a una disminución de la producción de IL-10 y TGF- β 1, entre otros eventos ocasionados por dicho ligando. Sin embargo, *Moreno y col. (2000)* destacaron que en los pacientes co-infectados con *L. infantum*/VIH, previamente tratados con antimoniales pentavalentes, los niveles del TGF- β 1 en el suero fueron significativamente inferiores y la carga viral fue mayor en comparación a los sujetos VIH⁺; según estos autores el tratamiento

antiparasitario habría alterado la expresión de la citoquina, facilitándose la replicación viral por lo que advierten que ciertos tratamientos pueden ser perjudiciales. Ciertamente, la evidencia posiciona al TGF- β 1 como un regulador positivo del VIH, aunque también existen estudios que destacan su función supresora (*Poli y col., 1991*). No obstante, cuestionamos tres aspectos fundamentales en la investigación de *Moreno y col. (2000)*: (i) no muestran los niveles del TGF- β 1 en el suero de pacientes co-infectados antes del tratamiento con antimoniales pentavalentes, (ii) las comparativas entre sujetos co-infectados y VIH⁺ no son acertadas al no ser equiparables ya que éstos últimos no fueron sometidos al tratamiento, y (iii) el análisis no efectúa una indagación más profunda sobre otros elementos proteicos presentes o ausentes que hayan logrado provocar la acrecencia de la carga viral durante la co-infección.

Las quimioquinas constituyen una grande familia de péptidos estructuralmente relacionados a las citoquinas, cuya función principal es regular el tráfico celular (*Rollins, 1997*). Hemos examinado la secreción de las quimioquinas MCP-1, MIP-1 α y RANTES durante la co-infección.

El MCP-1 es un miembro de la familia de quimioquinas C-C y un potente factor quimiotáctico para monocitos, también conocido como CCL2. CCL2 se produce constitutivamente o tras una inducción por estrés oxidativo, citoquinas o factores de crecimiento. Es generada por varios tipos de células incluyendo epiteliales, endoteliales, mesangiales, microgliales, monocíticas, astrocíticas, fibroblastos y del músculo liso (*Charo y col., 1994*). CCL2 regula la migración e infiltración de monocitos, linfocitos T de memoria y células NK. El receptor de MCP-1 está presente en dos isoformas, generadas por procesamiento alternativo, que podrían activar diferentes vías de señalización y ejecutar diferentes acciones; en efecto, CCR2 tiene roles duales al promover eventos pro- y anti-inflamatorios. El rol pro-inflamatorio de CCR2 es dependiente de las CPAs y células T, mientras que el rol anti-inflamatorio depende de la expresión del receptor en células Treg (*Deshmane y col., 2009*).

Los niveles de MCP-1 son modulados en infecciones parasitarias. Al respecto, se ha reportado el incremento de los niveles de MCP-1 en macrófagos derivados de médula ósea infectados con promastigotes de *L. major* (*Carrera y col., 1996; Racoosin y Beverley, 1997*). La inducción de la expresión de MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y MIP-2 por *Leishmania* es NF- κ B dependiente (*Gregory y col., 2008*). Sin embargo, la molécula LPG de *Leishmania* tiene la capacidad de inhibir la migración transendotelial de monocitos al disminuir la liberación de MCP-1 por parte de las células endoteliales (*Lo y col., 1998*). Además, la infección de CDs con *L. major* regula negativamente la expresión de CCL2 y CCR2, afectando su capacidad migratoria

(Steigerwald y Moll, 2005). La IL-12 y el IFN- γ contribuyen con la expresión de MCP-1 en ratones tras la infección con *L. major* (Zaph y Scott, 2003). Moll (1997) sugiere que la expresión de MCP-1 está asociada con la infiltración de macrófagos en lesiones de LC, con la consecuente estimulación de la actividad leishmanicida. Dicha actividad antiparasitaria es sinérgica entre MCP-1 e IFN- γ , mientras que la IL-4 anula el efecto de esta quimioquina (Ritter y Moll, 2000). MIP-1 α y MCP-1 inician una defensa antiparasitaria a través de la inducción de NO en macrófagos murinos, controlándose el crecimiento intracelular de *Leishmania* (Bhattacharyya y col., 2002; Brandonisio y col., 2002). Experimentos *in vivo* sugieren una asociación entre MCP-1 y la resistencia frente a la infección con *L. major*, al observarse una regulación positiva de sus niveles de ARNm en ratones resistentes pero no en aquellos susceptibles (Vester y col., 1999). En humanos, una investigación detectó alta expresión de MCP-1 en todos los pacientes con LC localizada (Valencia-Pacheco, 2014).

Dada la mayor expresión de CCR2 en células T CD4⁺ de memoria y monocitos, estas son las principales células a ser reclutadas por CCL2, siendo los blancos principales para la infección con VIH (Matsushima y col., 1989). La proteína Tat eleva significativamente la expresión y liberación de CCL2 en varias células, tanto a nivel transcripcional y post-traducciona (Conant y col., 1998). Otras proteínas derivadas del virus como gp120 (Fantuzzi y col., 2001), Nef (Lehmann y col., 2006) y la proteína de matriz p17 (Marini y col., 2008) también aumentan significativamente los niveles de expresión y liberación de CCL2. Existe una correlación entre los niveles del plasma de MCP-1 y la carga viral (Weiss y col., 1997). Debido a que los monocitos/macrófagos son la principal fuente de CCL2 *in vitro* e *in vivo*, esto explicaría por qué los monocitos migrantes infectados con el VIH son considerados potentes contribuidores para la propagación de la enfermedad (Cinque y col., 1998). Varios hallazgos soportan un modelo en el cual la encefalitis causada por el VIH es sostenida por la replicación del virus en células monocíticas, un proceso amplificado por el reclutamiento de células mononucleares vía CCL2 inducido por VIH; de hecho, se ha propuesto a la proporción de plasma:fluido cerebroespinal de MCP-1 como un marcador de pronóstico de trastornos neurocognitivos inducidos por el virus (Zink y col., 2001). Basado en hallazgos *in vivo* e *in vitro* podemos destacar tres mecanismos potenciales de patogénesis viral mediada por MCP-1: (i) una retroalimentación positiva donde la infección viral estimula la secreción de la quimioquina y ésta a su vez favorece el reclutamiento de células blanco a los sitios de infección (Ansari y col., 2007a), (ii) asistencia en la infección viral al elevar la expresión de superficie de CXCR4 en los linfocitos T CD4⁺ (Campbell y col., 2007), y (iii) a diferencia de las

demás quimioquinas C-C, el MCP-1 fomenta la diferenciación de los linfocitos T hacia el fenotipo Th2 (Ansari y col., 2011). Al respecto, se ha demostrado que MCP-1 induce la secreción de la IL-4 en linfocitos T, posiblemente activando directamente el promotor de su gen, iniciándose una respuesta Th2 dependiente de la concentración de la quimioquina (Karpus y col., 1997).

No existen análisis que conecten a MCP-1 y la co-infección *Leishmania*/VIH. Infortunadamente, no logramos presenciar cambios en la secreción de esta quimioquina durante la co-infección *L. donovani*/VIH *in vitro* de PBMCs al ser ésta similar a la obtenida con el grupo celular infectado con VIH, aunque si es superior al grupo parasitado (Fig.17). No descartamos que en tiempos inferiores o superiores a las 72h de infección se podrían haber detectado diferencias entre la infección viral y la co-infección con relación a esta variable. Es curioso que una quimioquina antiparasitaria esté presente en concentraciones superiores durante la co-infección, considerando que la respuesta inmune en ella se orienta de tal forma que se favorece la replicación y propagación viral y parasitaria; esto también ocurre con el TNF- α . Esto recuerda al fenómeno de la apoptosis donde también se expresan y actúan proteínas anti-apoptóticas que tratan de frenar la muerte celular. Adicionalmente, no olvidemos que MCP-1 ejecuta acciones anti-parasitarias pero también puede evocar respuestas Th2 que asisten a *Leishmania*. Ambas actividades, aunque antagónicas, no necesariamente son mutuamente excluyentes: para el caso de moléculas versátiles como MCP-1 sugerimos un modelo de balanza dependiente del tipo celular, estímulo, receptores, vías de señalización iniciadas, activadores y/o supresores de la quimioquina o de cualquier elemento corriente abajo a su señalización que pudieran estar presentes.

Los estudios clínicos destacan los beneficios de MCP-1 en el tratamiento parasitario. Por ejemplo, el pre-tratamiento de MDMs con MCP-1 fue capaz de inducir actividad antimicrobiana al inhibir la replicación de *Toxoplasma gondii* y *L. donovani* en un 50% aproximadamente (Mannheimer y col., 1996). Adicionalmente, Dey y col. (2005) determinaron que la administración de MCP-1 y MIP-1 α estimuló la síntesis de ROS *in vitro* y redujo la carga parasitaria *in vivo* en el hígado y bazo de ratones susceptibles infectados con *L. donovani*. De igual forma, MCP-1 y MIP-1 α se encuentran entre las quimioquinas con efectos antiparasitarios directos sobre *L. mexicana*, lo cual fue comprobado por daño a la integridad de la membrana plasmática y declinación de la actividad mitocondrial (Sobirk y col., 2013). En contraste, la reducción de MCP-1 es favorable en el tratamiento de individuos VIH⁺. Los niveles de MCP-1 han demostrado disminuir en pacientes infectados con VIH-1 tras un tratamiento con indinavir (Bisset y col., 1997). De igual forma, la

aplicación del esteroide prednisolone mermó la producción de MCP-1 y la replicación del VIH *in vivo* e *in vitro*, presumiblemente actuando a nivel del 5' LTR (Ansari y col., 2007b).

¿Qué hacer en la co-infección *Leishmania*/VIH? Se presenta el mismo problema que aquel discutido con IL-1 α y TNF- α : compuestos que aumenten o disminuyan la secreción de la quimioquina facilitarán la patogenicidad de uno u otro patógeno. Podríamos emplear herramientas de combinación donde si inducimos o bloqueamos su producción lo compensemos con otra estrategia; por ejemplo, si inhibimos la síntesis de MCP-1 para el tratamiento del virus el efecto protector anti-parasitario lo estimulamos mediante otra ruta como el eje IL-12/IFN- γ . También sería aún más apropiado indagar sobre los procesos corriente abajo que permiten que la quimioquina regule positivamente al virus, facilitando la fijación de blancos más precisos y selectivos en lugar de modular las concentraciones proteicas de la molécula.

RANTES, también conocida como CCL5, induce la migración *in vitro* de linfocitos T, CDs, eosinófilos, células NK, mastocitos y basófilos. Los receptores más relevantes conocidos para CCL5 son CCR1, CCR3 y CCR5. La afinidad de unión de CCL5 a sus receptores es variable, siendo ésta mayor para CCR1 y CCR5 (Blanpain y col., 2001). Aunque inicialmente fue considerada como específica de las células T, CCL5 es producida por plaquetas, macrófagos, monocitos, eosinófilos, fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y endometriales. Los eventos de señalización provocan polarización celular y translocación de NF- κ B, surgiendo un aumento de la habilidad fagocítica, supervivencia celular y transcripción de genes pro-inflamatorios, incluyendo quimioquinas y receptores de ellas (Marques y col., 2013).

Aunque en ocasiones no se han detectado cambios en la expresión de esta quimioquina durante la infección con *Leishmania* (Ritter y col., 1996; Racoosin y Beverley, 1997), algunas publicaciones conectan a RANTES con la leishmaniasis. Por ejemplo, Dasgupta y col. (2003) demostraron que la infección de fagocitos mononucleares humanos y de células THP1 con *L. donovani* ocasiona una elevación en los niveles de MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, así como también una ampliación de la expresión del receptor CCR5, aunque no de CCR1. Por su parte, Ji y col. (2003) reportaron una expresión retrasada y reducida de MIP-1 α y RANTES, entre otras citoquinas/quimioquinas, en ratones infectados con *L. amazonensis*, sugiriendo que una respuesta inmune temprana defectuosa contribuye a la patogénesis de la infección parasitaria. Inclusive, se ha descrito una respuesta inmune antiparasitaria por parte de las células T CD8⁺ en un modelo murino de LV a través de la generación del IFN- γ , TNF- α , MIP-1 α y RANTES (Tsagozis y col., 2003). La expresión de CCL5 se correlaciona con resistencia, donde un bloqueo de ella hace a los

ratones más susceptibles a una infección con *L. major* (Santiago y col., 2004). Recientemente, Murray y col. (2016) determinaron que en la infección visceral murina RANTES, inducido por el IFN- γ , promueve el control parasitario temprano y el ensamblaje de granulomas. La IL-4 (Lazarski y col., 2013) y la prostaglandina E2 (Saha y col., 2014) son capaces de regular negativamente la expresión de RANTES y MIP-1 α /RANTES, respectivamente, derivando en una menor actividad antiparasitaria.

RANTES es una quimioquina tempranamente expresada que también puede ser inducida por el TNF- α y el IFN- γ en etapas tardías de la infección viral (Grandvaux y col., 2002). Varios tipos de células activados por CCL5 están directamente involucrados en respuestas antivirales, incluyendo células NK, linfocitos T CD4⁺, mastocitos, monocitos y CDs (Tedla y col., 1996). La exposición de monocitos, MDMs y linfocitos T CD4⁺ al VIH o gp120 induce la secreción de MIP-1 α y RANTES (Fantuzzi y col., 2001). Al descubrirse, se indicó que RANTES era un inhibidor natural de la infección del VIH; luego, se halló que CCR5 era un co-receptor del VIH. Las competencias de RANTES en el contexto de la infección del VIH incluyen el impulso de las respuestas de las células T (Tedla y col., 1996), inhibición directa (Kinter y col., 1996) o favorecimiento de la infección viral (Appay y Rowland-Jones, 2001). Los efectos de RANTES en la infección del VIH varían debido a la concentración *in situ*, donde bajas concentraciones activan vías dependientes de receptores acoplados a proteínas G, mientras que altas concentraciones suscitan la agregación de RANTES y eventos de señalización subsecuentes, independientes de las proteínas G. La activación de receptores acoplados a proteínas G por RANTES inhibe la interacción VIH-CCR5 y suprime la infección viral. De forma inversa, las vías independientes de proteínas G no involucran una competencia entre RANTES y el VIH por el receptor, causando activación excesiva de efectores de señalización y culminando en activación celular e incremento de la infección viral (Appay y Rowland-Jones, 2001). La variedad de tejidos hospederos afectados por los virus más los diferentes contextos de infecciones crónicas y agudas hace difícil definir un papel para RANTES en las infecciones virales. Por tanto, los efectos de CCL5 son categorizados de acuerdo con el sitio de infección/enfermedad y el tropismo viral (Marques y col., 2013).

Con relación a la co-infección solo nuestro estudio ha determinado la secreción de RANTES. En PBMCs co-infectados con *L. donovani*/VIH hubo una declinación de la producción de esta quimioquina con respecto a la infección viral de estas células (Fig.17). Sugerimos que la acción de citoquinas anti-inflamatorias son responsables de esta reducción (Fig.16), por ejemplo la IL-4, entre otros elementos celulares. No olvidemos que en la co-infección la secreción de

RANTES fue superior al contrastarse con el grupo de tratamiento parasitario (*Fig.17*); por tanto, todavía podrían estar en desarrollo actividades anti-parasitarias importantes durante la co-infección. Infortunadamente, es difícil determinar el impacto de la quimioquina sobre el virus considerando su carácter volátil dependiente de su concentración, aunque dicha declinación en teoría facilitaría el inicio de procesos anti-virales. No obstante, no es tan sencillo arribar a esa conclusión ya que si bien con los reducidos niveles de la quimioquina se podría establecer algún tipo de competencia lo cierto es que también hemos demostrado una incrementada expresión de CCR5 en la co-infección (*Fig.13*), siendo viable que durante la misma haya una menor disputa entre el VIH y RANTES y por ende una mayor infectividad viral, no por las variaciones en la generación de la quimioquina sino por las modulaciones en la expresión del receptor.

El fortalecimiento de la señal de RANTES sería provechoso en el tratamiento de pacientes co-infectados. Evidentemente, no podemos ignorar los posibles efectos pro-virales que causaría la aglomeración de la quimioquina. Por consiguiente, podríamos considerar algunas estrategias que evitarían la agregación del péptido y su consecuente efecto pro-viral: la síntesis y aplicación de RANTES mutado o biotinilado en ciertos residuos aminoacídicos sería un ejemplo (*Appay y col., 1999; Vita y col., 2002*). Proteínas celulares como la protimosina α inducen la producción de RANTES e inhiben la replicación viral en MDMs (*Gusella y col., 2016*). En adición, antígenos de *Leishmania* han sido examinados para inmunización de animales, fomentándose la generación de factores anti-parasitarios como RANTES (*Vitoriano-Souza y col., 2013*).

El MIP-1 α es sintetizado por monocitos, macrófagos, neutrófilos, CDs, mastocitos, células NK, plaquetas, osteoblastos, microglía, astrocitos, fibroblastos, células epiteliales, linfocitos T y B. Su producción es inducida por varios agentes/citoquinas pro-inflamatorias incluyendo el lipopolisacárido bacteriano, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α/β y la infección viral, mientras que el tratamiento con IL-4, IL-10, dexametasón y otras señales anti-inflamatorias regulan negativamente la expresión de esta quimioquina (*Maurer y von Stebut, 2004*). Es esencial en la quimiotaxis de las células T desde la circulación a los tejidos inflamados y también participa en la regulación de la migración transendotelial de monocitos, CDs y NK. Además, coopera en la diferenciación de linfocitos hacia la subpoblación Th1 al asociarse con CCR5 (*Andres y col., 2000*).

En consecuencia, MIP-1 α es un jugador clave en la patogénesis de varias condiciones inflamatorias y enfermedades. El tratamiento con MIP-1 α recombinante reduce el índice de células de Langerhans infectadas con *L. major* en modelos murinos (*Arnoldi y Moll, 1988*). Se ha demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* que MIP-1 α parece estar involucrada en la defensa contra

Leishmania, como ya hemos discutido (Bhattacharyya y col., 2002; Brandonisio y col., 2002; Dasgupta y col., 2003; Ji y col., 2003; Tsagozis y col., 2003; Saha y col., 2014). Por ejemplo, Charmoy y col. (2010) destacaron que el MIP-1 α derivado de neutrófilos es esencial para el rápido reclutamiento de CD4 al sitio de inoculación de *L. major* en ratones resistentes, donde pueden activar células NK mediante la secreción de la IL-12; dicha movilización influenciada por la quimioquina es dependiente de la expresión del receptor CCR2 en las CD4 (Sato y col., 2000). En adición, MIP-1 α y MCP-1 regulan negativamente la expresión de la arginasa e IL-10, impulsándose la resistencia a la infección cutánea murina (Bhattacharyya y col., 2015).

Incluso antes del descubrimiento de CCR5, las quimioquinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES en humanos eran conocidas como potentes inhibidores de la infección con VIH M-trópico (RANTES > MIP-1 α > MIP-1 β) (Cocchi y col., 1995). La identificación de CCR5 como su receptor común, y subsecuentemente como el principal co-receptor para las cepas del VIH-1 M-trópicas, sugirió que el potencial inhibitorio de estas tres quimioquinas era mediado a través de su unión a CCR5. Además, MCP-1, -2, -3 y -4 son capaces de unirse a CCR5, de manera tal que son considerados inhibidores potenciales de la infección viral; no obstante, entre ellas sólo la MCP-2 mostró inhibir significativamente la entrada del virus a las células. Otros autores sugieren que estas tres quimioquinas evitarían la infección viral al inducir la dimerización o internalización de los receptores CCR5, impidiendo el contacto entre la envoltura viral y la membrana celular (Menten y col., 2002). Denis y Ghardirian (1994) señalaron que la infección *in vivo* de macrófagos alveolares con VIH induce una secreción significativa de MIP-1 α , la cual permite el reclutamiento de linfocitos T CD8⁺ que podrían eliminar células que expresan proteínas virales. No solo las quimioquinas facilitan el reclutamiento de los linfocitos T CD8⁺ sino que dichos péptidos representan los principales factores supresores del VIH generados por estas células (Cocchi y col., 1995). No obstante, la actividad anti-viral de las células T CD8⁺ no es completamente dependiente de RANTES y MIP-1 α (Moriuchi y col., 1996). Por su parte, Vincenzi y col. (2000) evidenciaron el efecto diferencial de MCP-1 (inducción) y MIP-1 α /RANTES (inhibición) sobre la replicación del VIH en PBMCs.

No existen precedentes de la participación de MIP-1 α en la co-infección *Leishmania*/VIH. La secreción de la quimioquina disminuye significativamente en la co-infección de PBMCs al compararse con el grupo de células infectadas con VIH, sugiriendo que la disminución de la producción de este péptido sería causa parcial de la aumentada replicación viral durante la co-infección (Fig.17). No obstante, los niveles de MIP-1 α en la co-infección son significativamente

superiores al contrastarse con aquel obtenido en PBMCs parasitados: por tanto, durante la co-infección todavía estarían desenvolviéndose procesos anti-parasitarios protectores, a pesar de la menguada expresión de citoquinas leishmanicidas como IL-12 e IFN- γ . Es factible que los inferiores y superiores niveles de los inductores IL-1 α /IFN- γ (Fig.15) y supresores IL-4/IL-10 (Fig.16) respectivamente, durante la co-infección, sean los responsables de la merma en la síntesis/secreción de MIP-1 α ; no descartamos la participación de otros elementos. Por ejemplo, en la co-infección *Mycobacterium tuberculosis*/VIH la elevada viremia en los pacientes se asoció con una disminución de la concentración de MIP-1 α y RANTES (Toossi y col., 2001).

Similar a RANTES, la señal de MIP-1 α debe amplificarse en las terapias sobre pacientes co-infectados mediante el uso de compuestos naturales o sintéticos. Por ejemplo, el factor de iniciación eucariótico de *L. infantum* (Lief), una proteína exosomal, es descrita por Koutsoni y col. (2014) como una novedosa molécula terapéutica al bloquear la infectividad y el crecimiento intracelular parasitario en los macrófagos J774A.1: entre sus efectos se encuentra una acrecencia en la generación de MIP-1 α , TNF- α , ROS y NO. Adicionalmente, Song y col. (2007) destacaron el potencial de las vacunas de ADN en la modulación de la respuesta inmune: en su estudio, la transfección de plásmidos que expresan MIP-1 α en ratones BALB/c fomentó la presencia de CDs activadas, acentuó la proliferación de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, favoreció la diferenciación Th1 y otorgó protección frente al virus vacuna que expresa Gag.

Sintetizando todos los resultados hemos demostrado que la infección parasitaria induce la secreción de citoquinas Th1 mientras que la infección viral evoca una respuesta principalmente Th2. Sin embargo, no son respuestas absolutas ya que se han detectado cantidades significativas de citoquinas Th1 y Th2 secretadas por PBMCs infectados por el virus y parásito, respectivamente. Por su parte, durante la co-infección se evidencia un cambio general Th1→Th2 de la respuesta inmune. A pesar de que dicho cambio favorecería la replicación parasitaria y viral, durante la co-infección también se detectaron niveles superiores de ciertas citoquinas/quimioquinas en comparación a los grupos infectados individualmente, ya sea viral o parasitario, que pudieran ejercer funciones protectoras: por ejemplo, la secreción del TNF- α antiparasitario es superior en la co-infección en contraste a las células parasitadas, sugiriendo el putativo desarrollo de mecanismos celulares protectores dependientes de la citoquina. Respecto a los tratamientos, debemos desarrollar alternativas terapéuticas que intensifiquen el eje IFN- γ /IL-12/MIP-1 α y mitiguen la señal iniciada por IL-4/IL-5/IL-6/IL-10/TGF- β 1. Otras citoquinas tales como IL-1 α , TNF- α , MCP-1 y RANTES deben ser consideradas en las terapias con mayor precaución a consideración de sus

efectos diferenciales sobre los patógenos: en lugar de modular sus niveles deberíamos fijar blancos más precisos corriente abajo a su señalización.

Debemos destacar que la unión citoquina/quimioquina-receptor ocasiona el inicio de vías de señalización que activan proteínas, entre ellas el NF- κ B. Se ha reportado la activación del NF- κ B inducida por IL-1 α (Hartupée y col., 2008), IL-5 (Wong y col., 2003), IFN- γ (Deb y col. 2001), TNF- α (Li y Lin, 2008) y TGF- β (Lu y Stark, 2004); inclusive el IFN- γ hace sinergia con el TNF- α en la translocación nuclear del factor (Cheshire y Baldwin, 1997). Entre los procesos iniciados por dicha activación se encuentra la estimulación de la expresión de moléculas de adhesión, citoquinas y quimioquinas, el impulso de la transcripción de genes del VIH y la regulación de la supervivencia celular, oncogénesis y apoptosis.

De igual forma, el NF- κ B induce la expresión de citoquinas tales como IL-1 α (Miyazaki y col., 2000), IL-4 (Li-Weber y col., 2004), IL-5 (Yang y col., 1998), IL-6 (Jin y col., 2011), IL-12 (Murphy y col., 1995), IFN- γ (Pfeffer y col., 2011), MCP-1 (Donadelli y col., 2000) y RANTES (Génin y col., 2000). De particular interés, Choe y col. (2002) demostraron que la infección de MDMs con una cepa del VIH de tropismo dual indujo la expresión de MIP-1 α y TNF- α mediante la activación del NF- κ B. No obstante, algunos de estos estudios no especifican si el NF- κ B se une directamente a la región promotora de los genes de las citoquinas/quimioquinas o si estimula la expresión de otra proteína que a su vez regula directamente la síntesis de estos péptidos. Es curioso que aunque la evidencia acumulativa destaque el papel pro-inflamatorio del NF- κ B éste favorezca también la expresión de citoquinas anti-inflamatorias. Un fenómeno similar ocurre con la apoptosis donde el NF- κ B ha sido implicado en eventos pro- y anti-apoptóticos, especialmente estos últimos. Esta variabilidad sería dependiente del estímulo, célula, tipo de hetero u homodímero de NF- κ B activado, genes accesibles así como también de la presencia/ausencia y/o estado de activación de diferentes proteínas participantes en procesos de señalización celular. En adición, debemos resaltar que algunas citoquinas regulan la expresión de otras a través de este factor de transcripción: por ejemplo, Hirano y col. (2003) revelaron que el TNF- α favorece la expresión de RANTES al activar el NF- κ B, mientras que Schottelius y col. (1999) señalaron que la IL-10 es capaz de suprimir la expresión de IL-1 α y TNF- α inducida por este factor de transcripción en monocitos humanos aunque a través de un mecanismo desconocido.

De igual forma, las señales iniciadas por las distintas citoquinas regularían la expresión de superficie de los receptores CXCR4 y CCR5. Entre los reguladores positivos de la expresión de CXCR4 se encuentra la IL-4 (Valentin y col., 1998), IL-6 (Odemis y col., 2002), TGF- β (Chen y

col., 2005), MCP-1 (Campbell y Spector, 2008), MIP-1 α y RANTES (Dolei y col., 1998) en una variedad de células incluyendo linfocitos T, monocitos, MDMs, CDs, microglía, astrocitos y eosinófilos. Por su parte, la IL-5 (Nagase y col., 2000) e IL-12 (Galli y col., 1998) figuran como reguladores negativos en los eosinófilos y linfocitos T, respectivamente. Otras citoquinas como IL-10 (Jinquan y col., 2000; Torres y col., 2001), TNF- α (Biswas y col., 2001; Han y col., 2001) e IFN- γ exhiben regulación diferencial dependiente del tipo celular: por ejemplo, el IFN- γ regula positiva o negativamente la expresión de CXCR4 en eosinófilos (Nagase y col., 2000) y linfocitos T/monocitos/CDs (Galli y col., 1998; Creery y col., 2004), respectivamente.

En el caso de CCR5, se ha reportado la inducción de su expresión por parte del TGF- β en cultivos de órgano tímico fetal (Choudhary y col., 2005), mientras que la IL-4 (Valentin y col., 1998) e IFN- γ (Creery y col., 2004) inhiben la expresión de éste en linfocitos T, monocitos y MDMs. También se ha demostrado la regulación diferencial dependiente del tipo de célula con las citoquinas IL-10 (Patterson y col., 1999; Makuta y col., 2003), IL-12 (Suzuki y col., 1999; Wang y col., 1999) y TNF- α (Hornung y col., 2000; Juffermans y col., 2002). Debemos aclarar que las variaciones en la expresión a nivel de superficie de estos receptores no necesariamente son un reflejo de lo que ocurre a nivel transcripcional y viceversa ya que por ejemplo pudiera ocurrir un aumento de éste al facilitarse su localización en la membrana, sin que ocurra la síntesis *de novo* de la proteína. Al respecto, Bruhl y col. (2003) demostraron que el tratamiento de neutrófilos con IFN- γ o TNF- α elevó significativamente los niveles del ARNm de CXCR4 pero redujo su expresión de superficie de manera casi absoluta, sugiriendo la presencia de algún tipo de regulación post-transcripcional o post-traducciona. No obstante, varias de las investigaciones mencionadas evidenciaron cambios de expresión tanto a nivel de superficie como de ARNm, donde siempre hubo una correlación entre ambos niveles.

De forma inversa, la señalización mediada por estos receptores regula la producción de las citoquinas. Por ejemplo, se ha reportado que la señalización iniciada por CXCR4/SDF-1 y CCR5/RANTES-MIP-1 α induce la expresión de IL-6 (Lu y col., 2009; Del Cornó y col., 2014) en CDs y microglía mientras que la producción y secreción del TNF- α es impulsada por CCR5 y sus ligandos en los astrocitos (Han y col., 2001); inclusive, la activación del NF- κ B estaría participando en dicha señalización. En consecuencia, es factible que en nuestro sistema de co-infección los cambios en la expresión de superficie de los co-receptores de entrada viral, la activación del NF- κ B y la secreción de citoquinas/quimioquinas estén interconectadas en una gran red regulatoria.

El campo de la investigación de la co-infección *Leishmania*/VIH debe dar saltos importantes. Primero, es necesario ampliar el número de moléculas identificadas que están involucradas en la co-infección, permitiéndonos maniobrar con un mayor abanico de posibilidades al momento de desarrollar drogas terapéuticas. Segundo, mediante el uso de inhibidores podríamos conocer la contribución de estas moléculas a la co-infección. Por ejemplo, en nuestro proyecto y a consideración de los precedentes anteriormente descritos sería interesante conocer qué ocurriría si se bloqueara la síntesis o acción de alguna citoquina, receptor o factor de transcripción evaluado sobre las demás variables y en últimas instancias sobre la replicación de los patógenos y los efectos citopáticos que éstos provocan. Finalmente, el tercer paso lo constituye el diseño de un sistema de co-infección *Leishmania*/VIH *in vivo* que permita comparar resultados con los sistemas *in vitro* descritos y eventualmente funcionar en la evaluación de la efectividad de drogas.

En resumen, hemos construido un sistema de co-infección *L. donovani*/VIH *in vitro* que nos ha permitido identificar diferentes moléculas participantes en el sistema. Demostramos variaciones en la translocación nuclear del NF- κ B y la expresión de superficie de CXCR4 y CCR5 en linfocitos T y monocitos primarios, los principales tipos de células sanguíneas involucradas en la respuesta inmune. Adicionalmente, revelamos el perfil de 12 citoquinas/quimioquinas secretadas durante la co-infección, siendo éste el perfil más completo analizado hasta la fecha. Sugerimos que dichas modulaciones a nivel molecular son las responsables de los cambios apreciados a nivel funcional sobre los elementos participantes en la co-infección: la potenciación de la replicación e infectividad parasitaria y viral, la amplificación en la inducción de sincitios y las alteraciones de la viabilidad celular.

8. Conclusiones.

-La incubación de linfocitos MT-4 y monocitos primarios con *L. donovani* o VIH produce una disminución de la viabilidad celular, la cual se acentúa ante la exposición simultánea a ambos patógenos. El efecto de la infección viral fue más acentuado y acelerado en los linfocitos MT-4 mientras que el parásito induce un efecto superior en los monocitos primarios a los que sí puede infectar.

-El parásito *L. donovani* ocasiona un incremento en la generación de sincitios inducidos por el VIH en un cultivo de linfocitos MT-4. Asimismo, el porcentaje de monocitos primarios parasitados se elevó significativamente cuando éstos son pre-infectados con el VIH. Así pues, durante la co-infección se desarrolla una estimulación de la infectividad y propagación viral y parasitaria.

-En presencia de *L. donovani* hay un aumento de la replicación del VIH en monocitos primarios y linfocitos MT-4. De igual forma, la replicación intracelular parasitaria monocítica se magnifica en presencia del virus. Inclusive, aunque *L. donovani* no infecta a los linfocitos T, la infección viral de este tipo de células permite la generación y secreción de un conjunto de moléculas que potencian la replicación parasitaria.

-La exposición de linfocitos MT-4 y monocitos primarios a *L. donovani* o VIH estimuló la activación del NF- κ B. Aunque la translocación nuclear de dicho factor no fue superior en los linfocitos MT-4 incubados simultáneamente con ambos patógenos, a diferencia de los monocitos primarios, esta sí fue mayor con respecto a los linfocitos MT-4 infectados únicamente con el virus, sugiriendo que la activación de este factor sería responsable parcial de la acrecentada replicación viral durante la co-infección, entre otros efectos.

-La expresión de los receptores de superficie CXCR4 y CCR5 fue superior en la co-infección *L. donovani*/VIH en comparación al grupo de células infectadas únicamente con el virus, posiblemente haciendo a las células más permisivas a la infección viral. Es factible que estos receptores contribuyan con la patogénesis parasitaria en las co-infecciones.

-El perfil de secreción de citoquinas en PBMCs infectadas con *L. donovani* o VIH exhibió una notoria diferencia con una respuesta predominantemente Th1 en el caso de la infección parasitaria mientras que la infección viral estimuló una respuesta casi totalmente Th2. Durante la co-infección ocurrió el cambio de perfil Th1→Th2; dicha variación sería la causa parcial de la potenciación de la replicación parasitaria y viral.

9. Bibliografía.

- Aara, N., Khandelwal, K., Bumb, R.A., Mehta, R.D., Ghiya, B.C., Jakhar, R., Dodd, C., Salotra, P. y Satoskar, A.R. (2013) Clinco-epidemiologic study of cutaneous leishmaniasis in Bikaner, Rajasthan, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **89**:111e5.
- Abbas, A.K, Lichtman, A.H. y Pillai, S. **Inmunología celular y molecular** (6^{ta} ed.). Barcelona: Elsevier, 2009. pp. 267-301.
- Afonso, L.C. y Scott, P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* **61**:2952-2959.
- Akhzari, S., Rezvan, H. y Zolhavarieh, M. (2016) Expression of pro-inflammatory genes in lesions and neutrophils during *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Iran J. Parasitol.* **11**:534-541.
- Akilov, O.E., Khachemoune, A. y Hasan, T. (2007) Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* **46**:132-142.
- Akridge, R.E. y Reed, S.G. (1996) Interleukin-12 decreases human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophage cultures reconstituted with autologous peripheral blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* **173**:559-564.
- Al-Bari, M.A.A. (2017) Targeting endosomal acidification by chloroquine analogs as a promising strategy for the treatment of emerging viral diseases. *Pharmacol. Res. Perspect.* **5**:e00293.

- Albini, A., Ferrini, S., Benelli, R., Sforzini, S., Giunciuglio, D., Aluigi, M.G., Proudfoot, A.E., Alouani, S., Wells, T.N., Mariani, G., Rabin, R.L., Farber, J.M. y Noonan, D.M. (1998) HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13153-13158.
- Alemu, A., Shiferaw, Y., Addis, Z., Mathewos, B. y Birhan, W. (2013) Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasit. Vectors* **6**:18.
- Alexander, J. y Russell, D.G. (1992) The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv. Parasitol.* **31**:175-254.
- Alter, G., Heckerman, D., Schneidewind, A., Fadda, L., Kadie, C.M., Carlson, J.M., Oniangue-Ndza, C., Martin, M., Li, B., Khakoo, S.I., Carrington, M., Allen, T.M. y Altfeld, M. (2011) HIV-1 adaptation to NK-cell-mediated immune pressure. *Nature* **476**:96-100.
- Alter, G., Suscovich, T.J., Teigen, N., Meier, A., Streeck, H., Brander, C. y Altfeld, M. (2007) Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J. Immunol.* **178**:7658-7666.
- Alvar, J. (1994) Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitol. Today* **10**:160-163.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R. y Moreno, J. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:334-359.
- Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, C., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R. y Moreno, J. (1997) *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:298-319.
- Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Pachón, I., Calbacho, E., Ramírez, M., Vallés, R., Guillén, J.L., Cañavate, C. y Amela, C. (1996) AIDS and *Leishmania infantum*. New approaches for a new epidemiological problem. *Clin. Dermatol.* **14**:541-546.
- Alves, É.A.R., de Miranda, M.G., Borges, T.K., Magalhães, K.G. y Muniz-Junqueira, M.I. (2015) Anti-HIV drugs, lopinavir/ritonavir and atazanavir, modulate innate immune response triggered by *Leishmania* in macrophages: the role of NF- κ B and PPAR- γ . *Int. Immunopharmacol.* **24**:314-324.
- Amato, V.S., Tuon, F.F., Imamura, R., Abegao de Camargo, R., Duarte, M.I. y Neto, V.A. (2009) Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **23**:1026e34.
- Anderson, C.F., Mendez, S. y Sacks, D.L. (2005) Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J. Immunol.* **174**:2934-2941.
- Andres, P.G., Beck, P.L., Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Bhan, A.K., Dawson, T., Kuziel, W.A., Maeda, N., MacDermott, R.P., Podolsky, D.K. y Reinecker, H.C. (2000) Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: Lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1⁺ lymphocyte-associated Th2-type immune response in the intestine. *J. Immunol.* **164**:6303-6312.
- Ameglio, F., Capobianchi, M.R., Castilletti, C., Cordiali, P., Fais, S., Trento, E. y Dianzani, F. (1994) Recombinant gp120 induces IL-10 in resting peripheral blood mononuclear cells; correlation with the induction of other cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **95**:455-458.
- Ansari, A.W., Heiken, H., Meyer-Olson, D. y Schmidt, R.E. (2011) CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. *Eur. J. Immunol.* **41**:3412-3418.
- Ansari, A.W., Heiken, H., Moenkemeyer, M. y Schmidt, R.E. (2007a) Dichotomous effects of C-C chemokines in HIV-1 pathogenesis. *Immunol. Lett.* **110**:1-5.

- Ansari, A.W., Schmidt, R.E. y Heiken, H. (2007b) Prednisolone mediated suppression of HIV-1 viral load strongly correlates with C-C chemokine CCL2: *in vivo* and *in vitro* findings. *Clin. Immunol.* **125**:1-4.
- Antinori, S., Cascio, A., Parravicini, C., Bianchi, R. y Corvellino, M. (2008) Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet. Infect. Dis.* **8**:191-199.
- Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M. y Gollob, K.J. (2005) Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **101**:226-230.
- Appay, V., Brown, A., Cribbes, S., Randle, E. y Czaplewski, L.G. (1999) Aggregation of RANTES is responsible for its inflammatory properties. Characterization of nonaggregating, noninflammatory RANTES mutants. *J. Biol. Chem.* **274**:27505-27512.
- Appay, V. y Rowland-Jones, S.L. (2001) RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* **22**:83-87.
- Arnoldi, J. y Moll, H. (1998) Langerhans cell migration in murine cutaneous leishmaniasis: regulation by tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Dev. Immunol.* **6**:3-11.
- Atta, A.M., D'Oliveira, J.A., Correa, J., Atta, M.L., Almeida, R.P. y Carvalho, E.M. (1998) Antileishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**:426-430.
- Awasthi, A., Mathur, R.K. y Saha, B. (2004) Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* **119**:238-258.
- Azzam, R., Kedzierska, K., Leeansyah, E., Chan, H., Doischer, D., Gorry, P.R., Cunningham, A.L., Crowe, S.M. y Jaworowski, A. (2006) Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **22**:619-629.
- Baqui, A., Jabra-Rizk, M., Kelley, J., Zhang, M., Falkler, W.J. y Meiller, T (2000) Enhanced interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by LPS stimulated human monocytes isolated from HIV+ patients. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**:401-421.
- Barcellini, W., Rizzardi, G., Borghi, M., Fain, C., Lazzarin, A. y Meroni, P. (1994) TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. *AIDS* **8**:757-762.
- Barcova, M., Kacani, L., Speth, C. y Dierich, M. (1998) gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin (IL)-10 in monocytes, but not in B, T, or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon-gamma production. *J. Infect. Dis.* **177**:905-913.
- Barral, A., Barral-Netto, M., Yong, E.C., Brownell, C.E., Twardzik, D.R. y Reed, S.G. (1993) Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3442-3446.
- Barral, A., Teixeira, M., Reis, P., Vinhas, V., Costa, J., Lessa, H., Bittencourt, A.L., Reed, S., Carvalho, E.M. y Barral-Netto, M. (1995) Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* **147**:947-954.
- Barré-Sinoussi, F., Ross, A.L. y Delfraissy, J.F. (2013) Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev.* **11**:877-883.
- Barreto-de-Souza, V., Pacheco, G.J., Silva, A.R., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Saraiva, E.M. y Bou-Habib, D.C. (2006) Increased *Leishmania* replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 synthesis. *J. Infect. Dis.* **194**:846-854.

- Barreto-de-Souza, V., Xavier, T., Machado, M.C., Bou-Habib, D.C. y Saraiva, E.M. (2008) HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes Infect.* **10**:642-649.
- Barrios, C.S., Castillo, L., Zhi, H., Giam, C.Z. y Beilke, M.A. (2014) Human T cell leukaemia virus type 2 tax protein mediates CC-chemokine expression in peripheral blood mononuclear cells via the nuclear factor kappa B canonical pathway. *Clin. Exp. Immunol.* **175**:92-103.
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L.G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A.P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C. y Isibasi, A. (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**:65-74.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M. y Sacks, D.L. (2002) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**:502-507.
- Ben-Othman, R., Guizani-Tabbane, L. y Dellagi, K. (2008) *Leishmania* initially activates but subsequently down-regulates intracellular mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in macrophages. *Mol. Immunol.* **45**:3222-3229.
- Bentwich, Z. (2003) Concurrent infections that rise the HIV viral load. *J. HIV Ther.* **8**:72-75.
- Berger, S., Chandra, R., Ballo, H., Hildenbrand, R. y Stutte, H.J. (1997) Immune complexes are potent inhibitors of interleukin-12 secretion by human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **27**:2994-3000.
- Berman, M.A., Zaldivar, F., Imfeld, K.L., Kenney, J.S. y Sandborg, C.I. (1994) HIV-1 infection of macrophages promotes long-term survival and sustained release of interleukins 1 alpha and 6. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:529-539.
- Bern, C. y Chowdhury, R. (2006) The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. *Indian J. Med. Res.* **123**:275-288.
- Bernier, R., Barbeau, B., Tremblay, M.J. y Olivier, M. (1998) The lipophosphoglycan of *Leishmania donovani* up-regulates HIV-1 transcription in T cells through the nuclear factor-kappaB elements. *J. Immunol.* **160**:2881-2888.
- Bernier, R., Turco, S.J., Olivier, M. y Tremblay, M. (1995) Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J. Virol.* **69**:7282-7285.
- Bhattacharya, P., Dey, R., Dagur, P.K., Kruhlak, M., Ismail, N., Debrabant, A., Joshi, A.B., Akue, A., Kukuruga, M., Takeda, K., Selvapandiyar, A., McCoy, J.P. y Nakhasi, H.L. (2015) Genetically modified live attenuated *Leishmania donovani* parasites induce innate immunity through classical activation of macrophages that direct the Th1 response in mice. *Infect. Immun.* **83**:3800-3815.
- Bhattacharyya, S., Dey, R., Majumder, N., Bhattacharjee, S. y Majumdar, S. (2008) A novel approach to regulate experimental visceral leishmaniasis in murine macrophages using CCR5 siRNA. *Scand. J. Immunol.* **67**:345-353.
- Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Dasgupta, B., Mazumder, D., Roy, S. y Majumdar S. (2002) Chemokine-induced leishmanicidal activity in murine macrophages via the generation of nitric oxide. *J. Infect. Dis.* **185**:1704-1708.
- Biggar, R.J., Goedert, J.J. y Hoofnagle, J. (1987) Accelerated loss of antibody to hepatitis B antigens among immunodeficient homosexual men infected with HIV. *New England Journal of Medicine* **316**:630-631.

- Birnbaum, R. y Craft N. (2011) Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatol. Clin.* **29**:89-102.
- Birx, D., Redfield, R., Tencer, K., Fowler, A., Burke, D. y Tosato, G. (1990) Induction of interleukin-6 during human immunodeficiency virus infection. *Blood* **76**:2303-2310.
- Bisset, L.R., Rothen, M., Joller-Jemelka, H.I., Dubs, R.W., Grob, P.J. y Opravil, M. (1997) Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 alpha and 11 beta, RANTES, monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir. *AIDS* **511**:485-491.
- Biswas, P., Mantelli, B., Delfanti, F., Cota, M., Vallanti, G., de Filippi, C., Mengozzi, M., Vicenzi, E., Lazzarin, A. y Poli, G. (2001) Tumor necrosis factor-alpha drives HIV-1 replication in U937 cell clones and upregulates CXCR4. *Cytokine* **13**:55-59.
- Blaak, H., van't Wout, A.B., Brouwer, M., Hoolbrink, B., Hovenkamp, E. y Schuitemaker, H. (2000) *In vivo* HIV-1 infection of CD45RA⁺ CD4⁺ T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4⁺ T cell decline. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1269-1274.
- Blanpain, C., Buser, R., Power, C.A., Edgerton, M., Buchanan, C., Mack, M., Simmons, G., Clapham, P.R., Parmentier, M. y Proudfoot, A.E. (2001) A chimeric MIP-1alpha/RANTES protein demonstrates the use of different regions of the RANTES protein to bind and activate its receptors. *J. Leukoc. Biol.* **69**:977-985.
- Bogdan, C. (2012) Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. *Ann. Rheum. Dis.* **71**:60-66.
- Bogdan, C. y Rollonghoff, M. (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today* **15**:22-28.
- Borghi, P., Fantuzzi, L., Varano, B., Gessani, S., Puddu, P., Conti, L., Capobianchi, M.S., Ameglio, F. y Belardelli, F. (1995) Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocyte/macrophages. *J. Virol.* **69**:1284-1287.
- Bossolasco, S., Gaiera, G., Olchini, D., Gulletta, M., Martello, L., Bestetti, A., Bossi, L., Germagnoli, L., Lazzarin, A., Uberti-Foppa, C. y Cinque, P. (2003) Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5080-5084.
- Bovolenta, C., Lorini, A.L., Mantelli, B., Camorali, L., Novelli, F., Biswas, P. y Poli, G. (1999) A selective defect of IFN-gamma- but not of IFN-alpha-induced JAK/STAT pathway in a subset of U937 clones prevents the antiretroviral effect of IFN-gamma against HIV-1. *J. Immunol.* **162**:323-330.
- Brand, S.R., Kobayashi, R. y Mathews, M.B. (1997) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. *J. Biol. Chem.* **272**:8388-8395.
- Brandonisio, O., Panaro, M.A., Fumarola, I., Sisto, M., Leogrande, D., Acquafredda, A., Spinelli, R. y Mitolo, V. (2002) Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in *Leishmania infantum*-infected human macrophages. *Clin. Exp. Med.* **2**:125-129.
- Breen, E., Rezai, A., Nakajima, K., Beall, G., Mitsuyasu, R., Hirano, T., Kishimoto, T. y Martinez-Maza, O. (1990) Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J. Immunol.* **144**:480-484.
- Briggs, J.A., Riches, J.D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G. y Kräusslich, H.G. (2009) Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**:11090-11095.

- Bruhl, H., Cohen, C.D., Linder, S., Kretzler, M., Schlöndorff, D. y Mack, M. (2003) Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. *Eur. J. Immunol.* **33**:3028-3037.
- Buxbaum, L.U. y Scott, P. (2005) Interleukin 10- and Fc γ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. *Infect. Immune* **73**:2101-2108.
- Cacopardo, B., Nigro, L., Preiser, W., Famá, A., Satariano, M.I., Braner, J., Celesia, B.M., Weber, B., Russo, R. y Doerr, H.W. (1996) Prolonged Th2 cell activation and increased viral replication in HIV-Leishmania co-infected patients despite treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**:434-435.
- Calegari-Silva, T.C., Pereira, R.M., De-Melo, L.D., Saraiva, E.M., Soares, D.C., Bellio, M. y Lopes, U.G. (2009) NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol. Lett.* **127**:19-26.
- Cambi, A., de Lange, F., van Maarseveen, N.M., Nijhuis, M., Joosten, B., van Dijk, E.M., de Bakker, B.I., Fransen, J.A., Bovee-Geurts, P.H., van Leeuwen, F.N., Van Hulst, N.F. y Figdor, C.G. (2004) Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J. Cell Biol.* **164**:145-155.
- Cameron, P., McGachy, A., Anderson, M., Paul, A., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Alexander, J. y Plevin, R. (2004) Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J. Immunol.* **173**:3297-3304.
- Campbell, G.R. y Spector, S.A. (2008) CCL2 increases X4-tropic HIV-1 entry into resting CD4⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* **283**:30745-30753.
- Campbell, G.R., Watkins, J.D., Singh, K.K., Loret, E.P. y Spector, S.A. (2007) Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *J. Virol.* **81**:5919-5928.
- Capobianchi, M. (1996) Induction of lymphomonocyte activation by HIV-1 glycoprotein gp120. Possible role in AIDS pathogenesis. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **10**:83-91.
- Carrera, L., Gazzinelli, R.T., Badolato, R., Hieny, S., Muller, W., Kuhn, R. y Sacks, D.L. (1996) *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J. Exp. Med.* **183**:515-526.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012) Basic Information About HIV and AIDS. www.cdc.gov/hiv/topics/basic/. (Consulta: 16 de junio de 2015).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013) Leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>. (Consulta: 24 de julio de 2015).
- Chamot, E., Hirschel, B., Wintsh, J., Robert, C.F., Gabriel, V., Deglon, J.J., Yerly, S. y Perrin, L. (1990) Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. *AIDS* **4**:1275-1277.
- Chan, J.K. y Greene, W.C. (2011) NF- κ B/Rel: agonist and antagonist roles in HIV-1 latency. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**:12-18.
- Chan, J.K. y Greene, W.C. (2012) Dynamic roles for NF- κ B in HTLV-I and HIV-1 retroviral pathogenesis. *Immunol. Rev.* **246**:286-310.
- Chandra, H., Chandra, S. y Kaushik, R.M. (2013) Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. *J. Trop. Med.* **2013**:861032.
- Chang-Mayer, C. Seto, D., Tateno, M. y Levy, J.A. (1988) Biological features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. *Science* **240**:80-82.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E. y Tacchini-Cottier, F. (2010) Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid

- recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* **6**:e1000755.
- Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J. y Coughlin, S.R. (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2752-2756.
- Chen, E.H. y Olson, E.N. (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* **308**:369-373.
- Chen, S., Tuttle, D.L., Oshier, J.T., Knot, H.J., Streit, W.J., Goodenow, M.M. y Harrison, J.K. (2005) Transforming growth factor-beta1 increases CXCR4 expression, stromal-derived factor-1alpha-stimulated signalling and human immunodeficiency virus-1 entry in human monocyte-derived macrophages. *Immunology* **114**:565-74.
- Chernomordik, L.V. y Kozlov, M.M. (2008) Mechanics of membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**:675-683.
- Cheshire, J.L. y Baldwin, A.S. (1997) Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation. *Mol. Cell Biol.* **17**:6746-6754.
- Choe, W., Volsky, D.J. y Potash, M.J. (2002) Activation of NF-kappaB by R5 and X4 human immunodeficiency virus type 1 induces macrophage inflammatory protein 1 alpha and tumor necrosis factor alpha in macrophages. *J. Virol.* **76**:5274-5277.
- Choudhary, S.K., Choudhary, N.R., Kimbrell, K.C., Colasanti, J., Ziogas, A., Kwa, D., Schuitemaker, H. y Camerini, D. (2005) R5 human immunodeficiency virus type 1 infection of fetal thymic organ culture induces cytokine and CCR5 expression. *J. Virol.* **79**:458-471.
- Chowdhury, B.P., Das, S., Majumder, S., Halder, K., Ghosh, S., Biswas, S., Bandyopadhyay, S. y Majumdar, S. (2015) Immunomodulation of host-protective immune response by regulating Foxp3 expression and Treg function in *Leishmania*-infected BALB/c mice: critical role of IRF1. *Pathog. Dis.* **73**:ftv063.
- Cinque, P., Vago, L., Mengozzi, M., Torri, V., Ceresa, D., Vicenzi, E., Transidico, P., Vagani, A., Sozzani, S., Mantovani, A., Lazzarin, A. y Poli, G. (1998) Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. *AIDS* **12**:1327-1332.
- Clerici, M. y Shearer, G.M. (1993) A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* **14**:107-111.
- Coakley, E., Petropoulos, C.J. y Whitcomb, J.M. (2005) Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **18**:9-15.
- Cocchi, F., De Vico, A.L., Garzino-Demo, A., Arya, S.K., Gallo, R.C. y Lusso, P. (1995) Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* **270**:1811-1815.
- Cohen, J. (1993) What causes the immune system collapse seen in AIDS. *Science* **260**:1956.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L. y Rivas, L. (2002) Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**:36766-36769.
- Conant, K., Garzino-Demo, A., Nath, A., McArthur, J.C., Halliday, W., Power, C., Gallo, R.C. y Major, E.O. (1998) Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in HIV-1 Tat-stimulated astrocytes and elevation in AIDS dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3117-3121.

- Connor, R.I., Mohri, H., Cao, Y. y Ho, D.D. (1993) Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4⁺ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* **67**:1772-1777.
- Convit, J. (1974) Leishmaniasis. Similar clinical-immunological-pathological models. *Ethiop. Med. J.* **12**:187-195.
- Couppie, P., Clyti, E., Sobesky, M., Bissuel, F., Del Giudice, P., Sainte-Marie, D., Dedet, J.P., Carme, B. y Pradinaud, R. (2004) Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br. J. Dermatol.* **151**:1165-1171.
- Creery, D., Weiss, W., Lim, W.T., Aziz, Z., Angel, J.B. y Kumar, A. (2004) Down-regulation of CXCR-4 and CCR-5 expression by interferon-gamma is associated with inhibition of chemotaxis and human immunodeficiency virus (HIV) replication but not HIV entry into human monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **137**:156-165.
- Daneshbod, Y., Oryan, A., Davarmanesh, M., Shirian, S., Negahban, S., Aledavood, A., Davarpanah, M.A., Soleimanpoor, H. y Daneshbod, K. (2011) Clinical, histopathologic, and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**:478-482.
- Dasgupta, B., Roychoudhury, K., Ganguly, S., Akbar, M.A., Das, P. y Roy, S. (2003) Infection of human mononuclear phagocytes and macrophage-like THP1 cells with *Leishmania donovani* results in modulation of expression of a subset of chemokines and a chemokine receptor. *Scand. J. Immunol.* **57**:366-374.
- De Lima, H., Borges, R., Escobar, J. y Convit, J. (2010) Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Mal. Salud Amb.* **50**:283-299.
- De Lima, H., Borges, R.H., Escobar, J. y García, J.C. (2011) Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Bol. Malariol. Salud Ambient.* **51**:215-224.
- De Maria, A., Mavilio, D., Costa, P., Dignetti, P., Fogli, M. y Mingari, M.C. (2000) Multiple HLA-class I-specific inhibitory NK receptor expression and IL-4/IL-5 production by CD8⁺ T-cell clones in HIV-1 infection. *Immunol. Lett.* **72**:179-182.
- Deb, A., Haque, S.J., Mogensen, T., Silverman, R.H. y Williams, B.R. (2001) RNA dependent protein kinase PKR is required for activation of NF-kappa B by IFN-gamma in a STAT1-independent pathway. *J. Immunol.* **166**:6170-6180.
- Del Cornó, M., Donninelli, G., Varano, B., Da Sacco, L., Masotti, A. y Gessani, S. (2014) HIV-1 gp120 activates the STAT3/interleukin-6 axis in primary human monocyte-derived dendritic cells. *J. Virol.* **88**:11045-11055.
- Delfino, D., Chiofalo, M.S., Riggio, G., Angelici, M.C., Gramiccia, M., Gradoni, L. y Iannello, D. (1995) Induction of interleukin 1 alpha in murine macrophages infected *in vitro* with different species and strains of *Leishmania*. *Microb. Pathog.* **18**:73-80.
- DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., Wainberg, M. y Hiscott, J. (1999) NF-kappaB activation and HIV-1 induced apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10**:235-53.
- Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E. y Marsh, M. (2007) In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J. Cell Biol.* **177**:329-341.
- Denis, M. y Ghadirian E. (1994) Alveolar macrophages from subjects infected with HIV-1 express macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha): contribution to the CD8⁺ alveolitis. *Clin. Exp. Immunol.* **96**:187-192.
- Descotaux, A. y Turco, S. (1999) Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Bio. Bioph. Acta.* **1455**:341-352.

- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S. y Sawaya, B.E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**:313-326.
- Desjeux, P. y Alvar, J. (2003) *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**:3-15.
- D'Ettorre, G., Cecarrelli, G. Carnevalini, M., Forcina, G., Zaffiri, L., Massetti, A.P., Mastroianni, C.M. y Vullo, V. (2006) Central role of interleukin-15 in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients with visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* **99**:83-87.
- Dewan, M.Z., Ahmed, S., Iwasaki, Y., Ohba, K., Toi, M. y Yamamoto, N. (2006) Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* **60**:273-276.
- Dey, R., Sarkar, A., Majumder, N., Bhattacharyya, M.S., Roychoudhury, K., Bhattacharyya, S., Roy, S. y Majumdar, S. (2005) Regulation of impaired protein kinase C signaling by chemokines in murine macrophages during visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**:8334-8344.
- Dinarelo, C.A., Novick, D., Kim, S. y Kaplanski, G. (2013) Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.* **4**:1-10.
- Dinarelo, C.A., Simon, A. y van der Meer, J.W. (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature Rev. Drug Discov.* **11**:633-652.
- Diro, A., Hailu, A. y Lynen, L. (2011) VL-HIV co-infection in East-Africa: current challenges and perspectives. In: 7th European congress on tropical medicine and international health. Barcelona, Spain.
- Dolei, A., Biolchini, A., Serra, C., Curreli, S., Gomes, E. y Dianzani, F. (1998) Increased replication of T-cell-tropic HIV strains and CXC-chemokine receptor-4 induction in T cells treated with macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta and RANTES beta-chemokines. *AIDS* **12**:183-190.
- Donadelli, R., Abbate, M., Zanchi, C., Corna, D., Tomasoni, S., Benigni, A., Remuzzi, G. y Zoja C. (2000) Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am. J. Kidney Dis.* **36**:1226-1241.
- Donaghy, L., Gros, F., Amiot, L., Mary, C., Maillard, A., Guiguen, C. y Gangneux, J.P. (2007) Elevated levels of soluble non-classical major histocompatibility class I molecule human leucocyte antigen (HLA)-G in the blood of HIV-infected patients with or without visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **147**:236-240.
- Douek, D.C., Roederer, M. y Koup, R.A. (2009) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu. Rev. Med.* **60**:471-484.
- Dunning, N. (2009) *Leishmania* vaccines: from leishmanization to era of DNA technology. *Bioscience Horizons* **2**:73-82.
- Easterbrook, M.D., Levy, M.H., Gomez, K.M., Turco, S.J., Epand, R.M. y Rosenthal K.L. (1995) Inhibition of HIV-1-induced syncytia formation and infectivity by lipophosphoglycan from *Leishmania*. *Journal of AIDS and Human Retrovirology* **10**:496-505.
- Eidsmo, L., Wolday, D., Berhe, N., Sabri, F., Satti, I., El Hassan, A.M., Sundar, S., Chiodi, F. y Akuffo, H. (2002) Alteration of Fas and Fas ligand expression during human visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **130**:307-313.
- El-Shoura, S.M., Tallab, T. y Bahamdan, K. (1996) Human cutaneous leishmaniasis: ultrastructural interactions between the inflammatory cells and Leishman bodies in the skin lesions. *Parasite* **3**:229-236.
- Emerman, M. (1996) HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr. Biol.* **6**:1096-1103.
- Engelman, A., Mizuuchi, K. y Craigie, R. (1991) HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer. *Cell* **67**:1211-1221.

- Ensoli, B., Lusso, P., Schachter, F., Josephs, S.F., Rappaport, J., Negro, F., Gallo, R.C. y Wong-Staal, F. (1989) Human herpes virus-6 increases HIV-1 expression in co-infected T cells via nuclear factors binding to the HIV-1 enhancer. *EMBO J.* **8**:3019-3027.
- Esser, R., Glienke, W., Andreesen, R., Unger, R., Kreutz, M., Rubsamen-Waigmann, H. y von Briesen, H. (1998) Individual cell analysis of the cytokine repertoire in human immunodeficiency virus-1- infected monocytes/macrophages by a combination of immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Blood* **91**:4752-4760.
- Fan, J., Li, P., Kok, T. y Burrell, C. (1997) AZT blocks down-regulation of IL-2 and IFN- γ gene expression in HIV acutely infected cells. *Arch. Virol.* **142**:1035-1043.
- Fan, S.X., Turpin, J.A., Aronovitz, J.R. y Meltzer, M.S. (1994) Interferon gamma protects primary monocytes against infection with human immunodeficiency virus type 1. *J. Leuk. Biol.* **56**:362-368.
- Fantuzzi, L., Canini, I., Belardelli, F. y Gessani, S. (2001) HIV-1 gp120 stimulates the production of beta-chemokines in human peripheral blood monocytes through a CD4-independent mechanism. *J. Immunol.* **166**:5381-5387.
- Fantuzzi, L., Gessani, S., Borghi, P., Varano, B., Conti, L., Puddu, P. y Belardelli, F. (1996) Induction of interleukin-12 (IL-12) by recombinant glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type 1 in human monocytes/macrophages: requirement of gamma interferon for IL-12 secretion. *J. Virol.* **70**:4121-4124.
- Faria, M.S., Calegari-Silva, T.C., Vivarini, A.C., Mottram, J.C., Lopes, U.G. y Lima, A.P. (2014) Role of protein kinase R in the killing of *Leishmania major* by macrophages in response to neutrophil elastase and TLR4 via TNF- α and IFN- β . *FASEB J.* **7**:3050-3063.
- Fauci, A.S. (1988a) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**:617-622.
- Fauci, A.S. (1988b) Immunopathogenic mechanisms of human immunodeficiency virus (HIV) infection. In *Human Retroviruses, Cancer, and AIDS: Approaches to Prevention and Therapy*, ed. Bolegnesi, D. p. 187. New York: Alan R. Liss.
- Filardy, A.A., Costa-da-Silva, A.C., Koeller, C.M., Guimarães-Pinto, K., Ribeiro-Gomes, F.L., Lopes, M.F., Heise, N., Freire-de-Lima, C.G., Nunes, M.P. y DosReis, G.A. (2014) Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. *PLoS One* **9**:e85715.
- Foli, A., Saville, M., Baseler, M. y Yarchoan, R. (1995) Effects of the Th1 and Th2 stimulatory cytokines interleukin-12 and interleukin-4 on human immunodeficiency virus replication. *Blood* **85**:2114-2123.
- Foli, A., Saville, M., May, L., Webb, D. y Yarchoan, R. (1997) Effects of human immunodeficiency virus and colony-stimulating factors on the production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by monocyte/macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**:829-839.
- Folks, T.M., Clouse, K.A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J.H. y Fauci, A.S. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2365-2368.
- Folks, T.M., Justement, J., Kinter, A., Dinarello, C.A. y Fauci, A.S. (1987) Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* **238**:800-802.
- Freed, E.O. (1998) HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1-15.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J. y Koyasu, S. (2001) IFN- γ production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22**:556-560.

- Fsadni, C., Fsadni, P., Piscopo, T. y Azzopardi, C. (2007) Laryngeal leishmaniasis in Malta. *J. Infect.* **54**:e61e3.
- Galli, G., Annunziato, F., Mavilia, C., Romagnani, P., Cosmi, L., Manetti, R., Pupilli, C., Maggi, E. y Romagnani, S. (1998) Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN-gamma of fusin/CXCR4. *Eur. J. Immunol.* **28**:3280-3290.
- Gantt, K.R., Schultz-Cherry, S., Rodriguez, N., Jeronimo, S.M., Nascimento, E.T., Goldman, T.L., Recker, T.J., Miller, M.A. y Wilson, M.E. (2003) Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* **170**:2613-2620.
- Garg, R., Barat, C., Ouellet, M., Lodge, R. y Tremblay, M.J. (2009) *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**:e441.
- Garg, R., Trudel, N. y Tremblay, M.J. (2007) Consequences of the natural propensity of *Leishmania* and HIV-1 to target dendritic cells. *Trends Parasitol.* **23**:317-324.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A. y Mantovani, A. (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* **39**:1003-1018.
- Génin, P., Algarté, M., Roof, P., Lin, R. y Hiscott, J. (2000) Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J. Immunol.* **164**:5352-5361.
- Genois, N., Barbeau, B., Olivier, M. y Tremblay, J. (2001) Inhibition of HIV-1 mediated syncytium formation and virus replication by the lypophosphoglycan from *Leishmania donovani* is due to an effect on early events in the virus life cycle. *Clin. Exp. Immunol.* **124**:32-42.
- Gessani, S., Borghi, P., Fantuzzi, L., Varano, B., Conti, L., Puddu, P. y Belardelli, F. (1997) Induction of cytokines by HIV-1 and its gp120 protein in human peripheral blood monocyte/macrophages and modulation of cytokine response during differentiation. *J. Leuk. Biol.* **62**:49-53.
- Ghosh, A.K., Dasgupta, S. y Ghose, A.C. (1995) Immunoglobulin G subclass-specific antileishmanial antibody responses in Indian kala-azar dermal leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**:291-296.
- Ghosh, S., Bhattacharyya, S., Sirkar, M., Sa, G.S., Das, T., Majumdar, D., Roy, S. y Majumdar, S. (2002) *Leishmania donovani* suppresses activated protein 1 and NF-kappaB activation in host macrophages via ceramide generation: involvement of extracellular signal-regulated kinase. *Infect. Immun.* **70**:6828-6838.
- Giacaman, R.A., Asrani, A.C., Gebhard, K.H., Dietrich, E.A., Vacharaksa, A., Ross, K.F. y Herzberg, M.C. (2008) *Porphyromonas gingivalis* induces CCR5-dependent transfer of infectious HIV-1 from oral keratinocytes to permissive cells. *Retrovirol.* **5**:29-43.
- Gibellini, D., Zauli, G., Re, M.C., Milani, D., Furlini, G., Caramelli, E., Capitani, S. y La Placa, M. (1994) Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein sequentially up regulates IL-6 and TGF-beta 1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. *Br. J. Haematol.* **88**:261-267.
- Gimble, J.M., Duh, E., Ostrove, J.M., Gendelman, H.E., Max, E.E. y Rabson, A.B. (1988) Activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by herpes simplex virus type 1 is associated with induction of a nuclear factor that binds to the NF-kappa B/core enhancer sequence. *J. Virol.* **62**:4104-4112.
- Gomes, C.M., Ávila, L.R., Pinto, S.A., Duarte, F.B., Pereira, L.I., Abrahamsohn, I.A., Dorta, M.L., Vieira, L.Q., Ribeiro-Dias, F. y Oliveira, M.A. (2014) *Leishmania braziliensis* amastigotes

- stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol.* **36**:225-231.
- Gomes-Silva, A., de Cássia, R., Dos Santos, R., Amato, V.S., da Silva, M., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G. y Da-Cruz, A.M. (2007) Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* **149**:440-444.
- Gómez-Gonzalo, M., Carretero, M., Rullas, J., Lara-Pezzi, E., Aramburu, J., Berkhout, B., Alcamí, J. y López-Cabrera, M. (2001) The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-kappaB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J. Biol. Chem.* **276**:35435-35443.
- Gorelik, L., Constant, S. y Flavell, R.A. (2002) Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* **195**:1499-1505.
- Goto, T., Nakai, M. y Ikuta, K. (1998) The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron.* **29**:123-138.
- Grandvaux, N., Servant, M.J., tenOever, B., Sen, G.C., Balachandran, S., Barber, G.N., Lin, R. y Hiscott, J. (2002) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J. Virol.* **76**:5532-5539.
- Granowitz, E.V., Saget, M.Z., Wang, C.A., Dinarello, P.R. y Skolnik, E. (1995) Interleukin 1 induces HIV-1 expression in chronically infected U1 cells: blockade by interleukin 1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein type 1. *Mol. Med.* **1**:667-677.
- Gregory, D.J., Godbout, M., Contreras, I., Forget, G. y Olivier, M. (2008) A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur. J. Immunol.* **38**:1071-1081.
- Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S. y Nabel, G.J. (1989) Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* **339**:70-73.
- Griffin, G.E., Leung, K., Folks, T.M., Kunkel, S. y Nabel, G.J. (1991) Induction of NF-kappa B during monocyte differentiation is associated with activation of HIV-gene expression. *Res. Virol.* **142**:233-238.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E. y Picker, L.J. (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* **12**:289-295.
- Guan, M., Zhang, R., Wu, B. y Henderson, E.E. (1996) Infection of primary CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by Epstein-Barr virus enhances human immunodeficiency virus expression. *J. Virol.* **70**:7341-7346.
- Guerra, J.A., Prestes, S.R., Silveira, H., Coelho, L.I., Gama, P., Moura, A., Amato, V., Barbosa, M. y Ferreira, L.C. (2011) Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**:e980.
- Guiguet, R.T., Sawadogo, O.S., Bories, C., Traore, K.L., Nezien, D., Nikiema, L., Pratloug, F., Marty, P., Houin, R. y Deniau, M. (2003) *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**:168-169.
- Guimaraes, L.H., Saldanha, M., Menezes, T., Moreno, L., Torres, A., Costa, R., Passos, S., Badaró, R., Arruda, S. y Carvalho, L.P. (2015) A potential role for mononuclear phagocytes in cutaneous ulcer development in HIV-*Leishmania braziliensis* coinfection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**:1219-1223.

- Guizani-Tabbane, L., Ben-Aissa, K., Belghith, M., Sassi, A. y Dellagi, K. (2004) *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect. Immun.* **72**:2582-2589.
- Gurunathan, S., Prussin, C., Sacks, D.L. y Seder, R.A. (1998) Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat. Med.* **4**:1409-1415.
- Gusella, G.L., Teixeira, A., Aberg, J., Uversky, V.N. y Mosoian, A. (2016) Prothymosin- α Variants elicit anti-HIV-1 response via TLR4 dependent and independent Pathways. *PLoS One* **11**:e0156486.
- Guy, R.A. y Belosevic, M. (1993) Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. *Infect. Immun.* **61**:1553-1558.
- Hailu, A., Pater, J.M., Kager, P.A. y van der Poll, T. (2004) Increased expression of HIV co-receptor CXCR4 on CD4⁺ T-cells in patients with active visceral leishmaniasis. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**:56-58.
- Halder, J.P., Ghose, S., Saha, K.C. y Ghose, A.C. (1983) Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post kala-azar dermal leishmaniasis. *Infection and Immunity* **42**:702-707.
- Han, Y., He, T., Huang, D.R., Pardo, C.A. y Ransohoff, R.M. (2002) TNF-alpha mediates SDF-1 alpha-induced NF-kappa B activation and cytotoxic effects in primary astrocytes. *J. Clin. Invest.* **108**:425-435.
- Han, Y., Wang, J., He, T. y Ransohoff, R.M. (2001) TNF-alpha down-regulates CXCR4 expression in primary murine astrocytes. *Brain Res.* **888**:1-10.
- Handman, E., Schnur, L.F., Spithill, T.W. y Mitchell, G.H. (1986) Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* **137**:3608-3613.
- Harada, S., Koyanagi, Y. y Yamamoto, N. (1985) Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* **229**:563-566.
- Hartup, J., Li, X. y Hamilton, T. (2008) Interleukin 1alpha-induced NFkappaB activation and chemokine mRNA stabilization diverge at IRAK1. *J. Biol. Chem.* **283**:15689-15693.
- Harvey, A.K., Hrubey, P.S. y Chandrasekhar, S. (1991) Transforming growth factor-beta inhibition of interleukin-1 activity involves down-regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes. *Exp. Cell Res.* **195**:376-385.
- Hatzigeorgiou, D.E., He, S., Sobel, J., Grabstein, K.H., Hafner, A. y Ho, J. (1993) IL-6 down-modulates the cytokine enhanced antileishmanial activity in human macrophages. *J. Immunol.* **151**:3682-3692.
- Hawn, T.R., Ozinsky, A., Underhill, D., Buckner, F.S., Akira, S., Aderem, A. (2002) *Leishmania major* activates IL-1 alpha expression in macrophages through a MyD88-dependent pathway. *Microbes Infect.* **4**:763-771.
- Hazlett, L.D., Jiang, X. y McClellan, S.A. (2014) IL-10 function, regulation, and in bacterial keratitis. *J. Ocular Pharmacol. Therapeutics* **30**:373-380.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L. y Locksley, R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* **169**:59-72.
- Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E. y Gatley, M.K. (1993) Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**:1505-1509.
- Herbein, G. y Gordon, S. (1997) 55- and 75-kilodalton tumor necrosis factor receptors mediate distinct actions in regard to human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *J. Virol.* **71**:4150-4156.
- Herbein, G. y Khan, K.A. (2008) Is HIV infection a TNF receptor signalling-driven disease? *Trends Immunol.* **29**:61-67.

- Herbein, G., Montaner, L.J. y Gordon, S. (1996) Tumor necrosis factor alpha inhibits entry of human immunodeficiency virus type 1 into primary human macrophages: a selective role for the 75-kilodalton receptor. *J. Virol.* **70**:7388-7397.
- Hermoso, T., Fishelson, Z., Becker, S.I., Hirschberg, K. y Jaffe C.L. (1991) Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J.* **10**:4061-4067.
- Hidalgo-Estévez, A.M., Punzón, C., Sanchez-Duffhues, G., Muñoz, E. y Fresno, M. (2008) HIV-1-Tat potentiates CXCL12/Stromal Cell-Derived Factor 1-induced downregulation of membrane CXCR4 in T lymphocytes through Protein kinase C zeta. *Mol. Immunol.* **46**:106-115.
- Himmelrich, H., Launois, P., Maillard, I., Biedermann, T., Tacchini-Cottier, F., Locksley, R.M., Rocken, M. y Louis, J.A. (2000) In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. *J. Immunol.* **164**:4819-4825.
- Hirano, F., Komura, K., Fukawa, E. y Makino, I. (2003) Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced RANTES chemokine expression via activation of NF-kappaB and p38 MAP kinase: roles of TNF-alpha in alcoholic liver diseases. *J. Hepatol.* **38**:483-489.
- Hong, M., Wakim, V., Salomao, S., Camargo, L., Casseb, J. y Duarte, A. (1998) IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4 secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are related to CD4+ T cells and clinical status in Brazilian HIV-1-infected subjects. *Rev. Inst. Med. Trop.* **40**:351-354.
- Horbul, J.E., Schmechel, S.C., Miller, B.R., Rice, S.A. y Southern, P.J. (2011) Herpes simplex virus-induced epithelial damage and susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection in human cervical organ culture. *PLoS One* **6**:e22638.
- Horn, F., Henze, C. y Heidrich, K. (2000) Interleukin-6 signal transduction and lymphocyte function *Immunobiol* **202**: 151-167.
- Hornung, F., Scala, G. y Lenardo, M.J. (2000) TNF-alpha-induced secretion of C-C chemokines modulates C-C chemokine receptor 5 expression on peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* **164**:6180-6187.
- Hoshino, Y., Tse, D.B., Rochford, G., Prabhakar, S., Hoshino, S., Chitkara, N., Kuwabara, K., Ching, E., Raju, B., Gold, J.A., Borkowsky, W., Rom, W.N., Pine, R. y Weiden, M. (2004) *Mycobacterium tuberculosis*-induced CXCR4 and chemokine expression leads to preferential X4 HIV-1 replication in human macrophages. *J. Immunol.* **172**:6251-6258.
- Hotez, P.J., Remme, J.H., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C. y Breman, J.G. (2004) Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin. Infect. Dis.* **38**:871-878.
- Hotter, D., Sauter, D. y Kirchhoff, F. (2013) Emerging role of the host restriction factor tetherin in viral immune sensing. *J. Mol. Biol.* **425**:4956-4964.
- Huang, F.P., Xu, D., Esfandiari, E.O., Sands, W., Wei, X.Q. y Liew, F.Y. (1998) Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J. Immunol.* **160**:4143-4147.
- Huerta, L., López-Balderas, N., Rivera-Toledo, E., Sandoval, G., Icazbalceta, G., Villarreal, C., Lamoyi, E. y Larralde, C. (2009) HIV-Envelope-Dependent Cell-Cell Fusion: Quantitative Studies. *Scientific World J.* **9**:746-763.
- Imami, N., Antonopoulos, C., Hardy, G., Gazzard, B. y Gotch, F. (1999) Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1- infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**:1499-1458.

- Imami, N., Westrop, S.J., Grageda, N. y Herasimtschuk, A.A. (2013) Long-term non-progression and broad HIV-1-specific proliferative T-cell responses. *Front. Immunol.* **4**:58.
- Islamuddin, M., Chouhan, G., Want, M.Y., Ozbak, H.A., Hemeg, H.A. y Afrin, F. (2016) Immunotherapeutic potential of eugenol emulsion in experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**:e0005011.
- Jain, S.K., Sahu, R., Walker, L.A. y Tekwani, B.L. (2012) A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *J. Visualized Exp.* **70**:e4054.
- Jayakumar, A., Donovan, M.J., Tripathi, V., Ramalho-Ortigao, M. y McDowell, M.A. (2008) *Leishmania major* infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. *Infect. Immun.* **76**:2138-2148.
- Jelicic, K., Cimbrow, R., Nawaz, F., Huang da, W., Zheng, X., Yang, J., Lempicki, R.A., Pascuccio, M., Van Ryk, D., Schwing, C., Hiatt, J., Okwara, N., Wei, D., Roby, G., David, A., Hwang, I.Y., Kehrl, J.H., Arthos, J., Cicala, C. y Fauci, A.S. (2013) The HIV-1 envelope protein gp120 impairs B cell proliferation by inducing TGF- β 1 production and FcRL4 expression. *Nat. Immunol.* **14**:1256-1265.
- Ji, J., Sun, J. y Soong, L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* **71**:4278-4288.
- Jin, J., Samuvel, D.J., Zhang, X., Li, Y., Lu, Z., Lopes-Virella, M.F. y Huang, Y. (2011) Coactivation of TLR4 and TLR2/6 coordinates an additive augmentation on IL-6 gene transcription via p38MAPK pathway in U937 mononuclear cells. *Mol. Immunol.* **49**:423-432.
- Jinquan, T., Quan, S., Jacobi, H.H., Madsen, H.O., Glue, C., Skov, P.S., Malling, H.J. y Poulsen, L.K. (2000) CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1alpha-induced chemotaxis in CD4⁺ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* **99**:402-410.
- Joshi, D.D., Sharma, M. y Bhandari, S. (2006) Visceral leishmaniasis in Nepal during 1980-2006. *J. Commun. Dis.* **38**:139-148.
- Jost, S. y Altfeld, M. (2013) Control of human viral infections by natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* **31**:163-194.
- Juffermans, N.P., Verbon, A., Olszyna, D.P., van Deventer, S.J., Speelman, P. y van Der Poll, T. (2002) Thalidomide suppresses Up-regulation of human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4⁺ T cells in humans. *J. Infect. Dis.* **181**:1813-1816.
- Karam, M.C., Merckbawi, R., El-Kouba, J.E., Bazzi, S.I. y Bodman-Smith, K.B. (2013) In *Leishmania major*-induced inflammation, interleukin-13 reduces hyperalgesia, down-regulates IL-1 β and up-regulates IL-6 in an IL-4 independent mechanism. *Exp. Parasitol.* **134**:200-205.
- Kariminia, A., Bourreau, E., Pascalis, H., Couppié, P., Sainte-Marie, D., Tacchini-Cottier, F. y Launois, P. (2005) Transforming growth factor beta 1 production by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with *Leishmania guyanensis*. *Infect. Immun.* **73**:5908-5914.
- Karpus, W.J., Lukacs, N.W., Kennedy, K.J., Smith, W.H., Hurst, S.D. y Barrett, T.A. (1997) Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J. Immunol.* **158**:4129-4136.
- Karsten, V., Gordon, S., Kirn, A. y Herbein, G. (1996) HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor- α . *Immunol.* **88**:55-60.

- Kazazi, F., Mathijs, J.M., Chang, J., Malafiej, P., Lopez, A., Dowton, D., Sorrell, T.C., Vadas, M.A. y Cunningham, A.L. (1992) Recombinant interleukin 4 stimulates human immunodeficiency virus production by infected monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* **73**:941-949.
- Kedzierska, K., Azzam, R., Ellery, P., Mak, J., Jaworoski, A. y Crow, S.W. (2003) Defective phagocytosis by human monocyte/ macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J. Clin. Virol.* **26**:247-263.
- Kedzierska, K. y Crowe, S.M. (2002) The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr. Med. Chem.* **9**:1893-1903.
- Kedzierski, L. y Evans, K.J. (2014) Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitol.* **141**:1-19.
- Kekow, J., Wachsmann, W., McCutchan, J.A., Cronin, M., Carson, D.A. y Lotz, M. (1990) Transforming growth factor β and non-cytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**:8321-8325.
- Kevric, I., Cappel, M.A. y Keeling, J.H. (2015) New World and Old World *Leishmania* Infections: A practical review. *Dermatol. Clin.* **33**:579-593.
- Killick-Kendrick, R. (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* **17**:279-289.
- Kim, S., Sunwoo, J.B., Yang, L., Choi, T., Song, Y.J., French, A.R., Vlahiotis, A., Piccirillo, J.F., Cella, M., Colonna, M., Mohanakumar, T., Hsu, K.C., Dupont, B. y Yokoyama, W.M. (2008) HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**:3053-3058.
- Kinter, A., Poli, G., Fox, L., Hardy, E. y Fauci, A. (1995) HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines. *J. Immunol.* **154**:2448-2459.
- Kinter, A.L., Ostrowski, M., Goletti, D., Oliva, A., Weissman, D., Gantt, K., Hardy, E., Jackson, R., Ehler, L. y Fauci, A.S. (1996) HIV replication in CD4⁺ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:14076-14081.
- Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B. y Solbach, W. (1996) IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **184**:1127-1136.
- Kostka, S.L., Knop, J., Konur, A., Udey, M.C. y von Stebut, E. (2006) Distinct roles for IL-1 receptor type I signaling in early versus established *Leishmania major* infections. *J. Invest. Dermatol.* **126**:1582-1589.
- Koutsoni, O., Barhoumi, M., Guizani, I. y Dotsika, E. (2014) *Leishmania* eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. *PLoS One* **9**:e97319.
- Kronenberg, K., Brosch, S., Butsch, F., Tada, Y., Shibagaki, N., Udey, M.C. y Von Stebut, E. (2010) Vaccination with TAT-antigen fusion protein induces protective, CD8(+) T cell-mediated immunity against *Leishmania major*. *J. Invest. Dermatol.* **130**:2602-2610.
- Kropf, P., Fuentes, J.M., Fähnrich, E., Arpa, L., Herath, S., Weber, V., Soler, G., Celada, A., Modolell, M. y Müller, I. (2005) Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis *in vivo*. *Faseb J.* **19**:1000-1002.
- Kubar, J., Marty, P., Lelievre, A., Quaranta, J.F., Staccini, P., Caroli-Bosc, C. y Le Fichoux, Y. (1998) Visceral leishmaniasis in HIV-positive patients: primary infection, reactivation and latent infection. Impact of the CD4⁺ T-lymphocyte counts. *AIDS* **12**:2147-2153.

- Kubiczkova, L., Sedlarikova, L., Hajek, R. y Sevcikova, S. (2012) TGF- β an excellent servant but a bad master. *J. Trans. Med.* **10**:183-207.
- Laguna, F., Videla, S., Jiménez-Mejías, M.E., Sirera, G., Torre-Cisneros, J., Ribera, E., Prados, D., Clotet, B., Sust, M., López-Vélez, R. y Alvar, J. (2003) Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:464-468.
- Larder, B.A., Darby, G. y Richman, D.D. (1989) HIV with reduced sensitivity to Zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**:1731-1734.
- Laurenti, M.D., Gidlund, M., Ura, D.M., Sinhorini, I.L., Corbett, C.E. y Goto, H. (1999) The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**:323-325.
- Laurenti, M.D., Sotto, M.N., Corbett, C.E., Ribeiro da Matta, V.L. y Duarte, M.I. (1990) Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int. J. Exp. Path.* **71**:791-797.
- Lazarski, C.A., Ford, J., Katzman, S.D., Rosenberg, A.F. y Fowell, D.J. (2013) IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PLoS One* **8**:e71949.
- Lazdins, J., Klimkait, T., Alteri, E., Walker, M., Woods-Cook, K., Cox, D., Bilbe, G., Shipman, R. Cerletti, N. y McMaster, G. (1991) TGF- β : upregulator of HIV replication in macrophages. *Res. Virol.* **142**:239-245.
- Lebman, D.A. y Edmiston, J.S. (1999) The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* **1**:1297-1304.
- Lehmann, M.H., Masanetz, S., Kramer, S. y Erfle, V. (2006) HIV-1 Nef upregulates CCL2/MCP-1 expression in astrocytes in a myristoylation- and calmodulin-dependent manner. *J. Cell Sci.* **119**:4520-4530.
- Li, J., Hunter, C.A. y Farrell, J.P. (1999) Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J. Immunol.* **162**:974-979.
- Li, J.C., Lee, D.C., Cheung, B.K. y Lau, A.S. (2005) Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett.* **579**:3055-3062.
- Li, H. y Lin, X. (2008) Positive and negative signaling components involved in TNFalpha-induced NF-kappaB activation. *Cytokine* **41**:1-8.
- Li-Weber, M., Giaisi, M., Baumann, S., Pálfi, K. y Krammer, P.H. (2004) NF-kappa B synergizes with NF-AT and NF-IL6 in activation of the IL-4 gene in T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**:1111-1118.
- Liese, J., Schleicher, U. y Bogdan C. (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiol.* **213**:377-387.
- Liew, F.Y. y O'Donnell, C.A. (1993) Immunology of leishmaniasis. *Advances in Parasitology* **32**:161-259.
- Lifson, J.D., Reyes, G.R., McGrath, G.S., Stein, B.S. y Engleman, E.G. (1986) AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **232**:1123-1127.
- Lindoso, J.A. (2011) Visceral Leishmaniasis-HIV co-infection: emerging in South America. In: 7th European congress on tropical medicine and international health. Barcelona, Spain: Wiley Blackwell.

- Lindoso, J.A., Barbosa, R.N., Posada-Vergara, M.P., Duarte, M.I., Oyafuso, L.K., Amato, V.S. y Goto, H. (2009) Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br. J. Dermatol.* **160**:311-318.
- Lindoso, J.A., Cota, G.F., da Cruz, A.M., Goto, H., Maia-Elkhoury, A.N., Romero, G.A., Sousa-Gomes, M.L., Santos-Oliveira, J.R. y Rabello, A. (2014) Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLOS Neg. Trop. Dis.* **8**:e3136.
- Liu, R., Paxton, W.A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S.R., Horuk, R., MacDonald, M.E., Stuhlmann, H., Koup, R.A. y Landau, N.R. (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**:367-377.
- Liu, R., Zhao, X., Gurney, T.A. y Landau, N.R. (1998) Functional analysis of the proximal CCR5 promoter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**:1509-1519.
- Lo, S.K., Bovis, L., Matura, R., Zhu, B., He, S., Lum, H., Turco, S.J. y Ho, J.L. (1998) *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J. Immunol.* **160**:1857-1865.
- Lodge, R., Ouellet, M., Barat, C., Andreani, G., Kumar, P. y Tremblay, M.J. (2012) HIV-1 promotes intake of *Leishmania* parasites by enhancing phosphatidylserine-mediated, CD91/LRP-1- dependent phagocytosis in human macrophages. *PLoS ONE* **7**:e32761.
- Lopez-Velez, R., Perez-Molina, J.A., Guerrero, A., Baquero, F., Villarrubia, J., Escribano, L., Bellas, C., Perez-Corral, F. y Alvar, J. (1998) Clinicoepidemiologic characteristics, prognostic factors, and survival analysis of patients coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania* in an area of Madrid, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **58**:436-443.
- Lu, D.Y., Tang, C.H., Yeh, W.L., Wong, K.L., Lin, C.P., Chen, Y.H., Lai, C.H., Chen, Y.F., Leung, Y.M. y Fu, W.M. (2009) SDF-1 α up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia. *Eur. J. Pharmacol.* **613**:146-154.
- Lu, T. y Stark, G.R. (2004) Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer. *Cell Cycle* **3**:1114-1117.
- Lupi, O., Bartlett, B.L., Haugen, R.N., Dy, L.C., Sethi, A., Klaus, S.N., Machado, A., Pinto, J., Bravo, F. y Tyring, S.K. (2009) Tropical dermatology: tropical diseases caused by protozoa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **60**:897-925.
- Lyons, S., Veeken, H. y Long, J. (2003) Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop. Med. Int. Health* **8**:733-739.
- Ma, X. y Montaner, L.J. (2000) Proinflammatory response and IL-12 expression in HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* **68**:383-390.
- Maas, J.J., Gange, S.J., Schuitemaker, G., Coutinho, R.A., van Leeuwen, R. y Margolick, J.B. (2000) Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study. *AIDS* **16**:1155-1161.
- Maggi, E., Mazzetti, M., Ravina, A., Annunziato, F., de Carli, M., Piccinni, M., Manetti, R., Carbonari, M., Pesce, A. y del Prete, G.A. (1994) Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* **265**:244-248.
- Makuta, Y., Sonoda, Y., Yamamoto, D., Funakoshi-Tago, M., Aizu-Yokota, E., Takebe, Y. y Kasahara, T. (2003) Interleukin-10-induced CCR5 expression in macrophage like HL-60 cells: involvement of Erk1/2 and STAT-3. *Biol. Pharm. Bull.* **26**:1076-1081.

- Mansfield, J.M. y Olivier, M. (2002) Immune evasión by parasites. In *Immunology of Infectious Diseases*, eds Kaufmann, S.H.E., Sher, A. y Ahmed, R. pp. 379-392. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Mannheimer, S.B., Hariprashad, J., Stoeckle, M.Y. y Murray, H.W. (1996) Induction of macrophage antiprotozoal activity by monocyte chemotactic and activating factor. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **14**:59-61.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C. y Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **11**:519-531.
- Marini, E., Tiberio, L., Caracciolo, S., Tosti, G., Guzman, C. A., Schiaffonati, L., Fiorentini, S., Caruso, A. (2008) HIV-1 matrix protein p17 binds to monocytes and selectively stimulates MCP-1 secretion: role of transcriptional factor AP-1. *Cell Microbiol.* **10**:655-666.
- Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C. y Teixeira, M.M. (2013) Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets* **17**:1439-1460.
- Marsden, V., Donaghy, H., Bertram, K.M., Harman, A.N., Nasr, N., Keoshkerian, E., Merten, S., Lloyd, A.R. y Cunningham, A.L. (2015) Herpes simplex virus type 2-infected dendritic cells produce TNF- α , which enhances CCR5 expression and stimulates HIV production from adjacent infected cells. *J. Immunol.* **194**:4438-4445.
- Marshall, J., Chehimi, J., Gri, G., Kostman, J., Montaner, L. y Trinchieri, G. (1999) The interleukin-12-mediated pathway of immune events is dysfunctional in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Blood* **94**:1003-1011.
- Martinez, P., de la Vega, E., Laguna, F., Soriano, V., Puente, S., Moreno, V., Sentchordi, M.J., Garcia-Aguado, C. y González-Lahoz, J. (1993) Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *AIDS* **7**:227-230.
- Mary, C., Auriault, V., Faugère, B. y Dessein, A.J. (1999) Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. *Infect. Immun.* **67**:5559-5566.
- Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S. y Quilici, M. (1992). Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**:764-771.
- Massagué, J. (2012) TGF β signalling in context. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **13**:616-630.
- Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, G.C. y Oppenheim, J.J. (1989) Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* **169**:1485-1490.
- Maurer, M. y von Stebut, E. (2004) Macrophage inflammatory protein-1. *J. Biochem. Cell Biol.* **36**:1882-1886.
- Maynard, C.L. y Weaver, C.T. (2008) Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* **226**:219-233.
- McElrath, M.J. y Haynes, B.F. (2010) Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity* **33**:542-554.
- McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T. y Cua, D.J. (2007) TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* **8**:1390-1397.
- Medrano, F.J., Hernández-Quero, J., Jiménez, E., Pineda, J.A., Rivero, A., Sanchez-Quijano, A., Vélez, I.D., Vicianá, P., Castillo, R., Reyes, M.J., Carvajal, F., Leal, M. y Lissen, E. (1992) Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain? *AIDS* **6**:1499-1503.
- Medrano, F.J., Leal, M., Arienti, D., Rey, C., Zagliani, A., Torres, Y., Sánchez-Quijano, Lissen, E. y Clerici, M. (1998a) Tumor necrosis factor β leishmaniasis and soluble APO-1/Fas

- independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. *AIDS Research and Human Retrovirology* **14**:833-844.
- Medrano, F.J., Rey, C., Leal, M., Cañavate, C., Rubio, A., Sánchez-Quijano, A., Alvar, J. y Lissen, E. (1998b) Dynamics of serum cytokines in patients with visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection. *Clin. Exp. Immunol.* **114**:403-407.
- Menten, P., Wuyts, A. y von Damme, J. (2002) Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**:455-481.
- Meroni, L., Trabattoni, D., Balotta, C., Riva, C., Gori, A., Moroni, M., Villa, M., Clerici, M. y Galli, M. (1996) Evidence for type 2 cytokine production and lymphocyte activation in the early phases of HIV-1 infection. *AIDS* **10**:23-30.
- Meurs, E.F., McMillan, N., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. y Southern, P.J. (1995) Human PKR transfected into murine cells stimulates expression of genes under control of the HIV-1 or HTLV-ILTR. *Virology* **214**:653-659.
- Meyaard, L., Hovenkamp, E., Keet, I., Hooibrink, B., de Jong, I., Otto, S. y Miedema, F. (1996) Single cell analysis of IL-4 and IFN-gamma production by T cells from HIV-infected individuals: decreased IFN-gamma in the presence of preserved IL-4 production. *J. Immunol.* **157**:2712-2718.
- Meyaard, L., Otto, S.A., Keet, I.P., van Lier, R.A. y Miedema, F. (1994) Changes in cytokine secretion patterns of CD4⁺ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood* **84**:4262-4268.
- Micchelli, L., Thomas, D., Boitnott, K. y Torbenson M. (2008) Hepatic giant cells in hepatitis C virus (HCV) mono-infection and HCV/HIV co-infection. *J. Clin. Pathol.* **61**:1058-1061.
- Miedema, F., Meyaard, L., Koot, M., Klein, M.R., Roos, M.T., Groenink, M., Fouchier, R.A., Van't Wout, A.B., Tersmette, M., Schellekens, P.T. y Schuitemaker, H. (1994) Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* **140**:35-72.
- Milano, S. Di Bella, J., D'Agostino, P., Barbera, C., Caruso, R., La Rosa, M., Ferlazzo, V., Vitale, G., La Russa, C., Gambino, G., Chifari, N., Mansueto, S. y Ciliari, E. (2002) IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Clin. Exp. Immunol.* **127**:360-365.
- Miles, S.A., Conrad, S.M., Alves, R.G., Jeronimo, S.M. y Mosser, D.M. (2005) A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *J. Exp. Med.* **201**:747-754.
- Miyazaki, Y., Yokozeki, H., Awad, S., Igawa, K., Minatohara, K., Satoh, T., Katayama, I. y Nishioka, K. (2000) Glucocorticoids augment the chemically induced production and gene expression of interleukin-1alpha through NF-kappaB and AP-1 activation in murine epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.* **115**:746-752.
- Mock, D.J., Hollenbaugh, J.A., Daddacha, W., Overstreet, M.G., Lazarski, C.A., Fowell, D.J. y Kim, B. (2012) *Leishmania* induces survival, proliferation and elevated cellular dNTP levels in human monocytes promoting acceleration of HIV co-infection. *PLoS Pathogens* **8**:e1002635.
- Molina, R., Gradoni, L. y Alvar, J. (2003) HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**:29-45.
- Moll, H. (1997) The role of chemokines and accessory cells in the immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Behring Inst. Mitt.* **99**:73-78.
- Moreno, J., Cañavate, C., Chamizo, C., Laguna, F. y Alvar, J. (2000) HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **94**:328-332.

- Moreno, M.E., Lugo, D.A., Belizario, D., Galindo, W., Guevara, J.S. y Rangel, O.Z. (2014) Co-infección *Leishmania*/VIH: clínica y epidemiología en Venezuela. Período 2000-2013. *Dermatol. Venez.* **51**:1-6.
- Moriuchi, H., Moriuchi, M., Combadiere, C., Murphy, P.M. y Fauci, A.S. (1996) CD8⁺ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:15341-15345.
- Moskowitz, N.H., Brown, D.R. y Reiner, S.L. (1997) Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infect. Immun.* **65**:2448-2450.
- Moss, J.A. (2013) HIV/AIDS review. *Radiol. Technol.* **84**:247-267.
- MPPS. (2011) Base de Datos y Referencias para una Estrategia Basada en Evidencia. ASAP. Caracas, Venezuela.
- Muller, I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J. y Milon, G. (1991) Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int. Immunol.* **3**:587-597.
- Mummididi, S., Ahuja, S.S., Gonzalez, E., Anderson, S.A., Santiago, E.N., Stephan, K.T., Craig, F.E., O'Connell, P., Tryon, V., Clark, R.A., Dolan, M.J. y Ahuja, S.K. (1998) Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat. Med.* **4**:786-793.
- Muraille, E., De Trez, C., Pajak, B., Torrentera, F.A., De Baetselier, P., Leo, O. y Carlier, Y. (2003) Amastigote load and cell surface phenotype of infected cells from lesions and lymph nodes of susceptible and resistant mice infected with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **71**:2704-2715.
- Murphy, T.L., Cleveland, M.G., Kulesza, P., Magram, J. y Murphy, K.M. (1995) Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell Biol.* **15**:5258-52567.
- Murray, H.W. (2008) Accelerated control of visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect. Immun.* **76**:4088-4091.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. y Saravia, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* **366**:1561-1577.
- Murray, H.W., Luster, A.D., Zheng, H. y Ma, X. (2016) Gamma interferon-regulated chemokines in *Leishmania donovani* infection in the liver. *Infect. Immun.* **85**:e00824-16.
- Muskus, C.E. y Villa, M.M. (2002) Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomédica* **22**:167-177.
- Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Fujisawa, T., Ohta, K., Yamamoto, K., Morita, Y. y Hirai, K. (2000) Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J. Immunol.* **164**:5935-5943.
- Naif, H., Ho-Shon, M., Chang, J. y Cunningham, A.L. (1994) Molecular mechanisms of IL-4 effect on HIV expression in promonocytic cell lines and primary human monocytes. *J. Leuk. Biol.* **56**:335-339.
- Naif, H., Li, S., Ho-Shon, M., Mathijs, J.M., Williamson, P. y Cunningham, A.L. (1997) The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-4 and IL-13 on HIV replication. *J. Immunol.* **158**:501-511.
- Nardacci, R., Perfettini, J.L., Grieco, L., Thieffry, D., Kroemer, G. y Piacentini, M. (2015) Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: an overview. *Cell Death Dis.* **6**:e1846.
- Nascimento, M.S., Albuquerque, T.D., Do-Valle-Matta, M.A., Caldas, I.S., Diniz, L.F., Talvani, A., Bahia, M.T., Andrade, C.M., Galvão, L.M., Câmara, A.C. y Guedes, P.M. (2013)

- Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **153**:202-208.
- Nashed, B.F., Maekawa, Y., Takashima, M., Zhang, T., Ishii, K., Dainichi, T., Ishikawa, H., Sakai, T., Hisaeda, H. y Himeno, K. (2000) Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. *Microbes Infect.* **2**:1435-1443.
- Nashleanas, M. y Scott, P. (2000) Activated T cells induce macrophages to produce NO and control *Leishmania major* in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Infect. Immun.* **68**:1428-1434.
- Navas, A., Vargas, D.A., Freudzon, M., McMahon-Pratt, D., Saravia, N.G. y Gómez, M.A. (2014) Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infect. Immun.* **82**:2872-2880.
- Nazli, A., Kafka, J.K., Ferreira, V.H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B.J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M.F., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Mossman, K.L., Ashkar, A.A., Kovacs, C., Bowdish, D.M., Snider, D.P., Kaul, R. y Kaushic, C. (2013) HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. *J. Immunol.* **191**:4246-4258.
- Neil, S.J., Zang, T. y Bieniasz, P.D. (2008) Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**:425-430.
- Nigro, L., Cacopardo, B., Preiser, W., Braner, J., Cinatl, J., Palermo, F., Russo, R., Doerr, H.W. y Nunnari, A. (1999) *In vitro* production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from subjects coinfecting with human immunodeficiency virus and *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**:142-145.
- Nigro, L., Rizzo, M.L., Vancheri, C., La Rosa, R., Mastruzzo, C., Tomaselli, V., Ragusa, A., Manuele, R. y Cacopardo, B. (2007) CCR5 and CCR3 expression on T CD3⁺ lymphocytes from HIV/*Leishmania* co-infected subjects. *Med. Microbiol. Immunol.* **196**:253-255.
- Noben-Trauth, N., Paul, W.E. y Sacks, D.L. (1999) IL-4- and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains. *J. Immunol.* **162**:6132-6140.
- Novak, R.M., Holzer, T.J., Kennedy, M.M., Heynen, C.A. y Dawson, G. (1990) The effect of interleukin 4 (BSF-1) on infection of peripheral blood monocyte-derived macrophages with HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**:973-976.
- Nylen, S., Maasho, K., Soderstrom, K., Ilg, T. y Akuffo, H. (2003) Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* **131**:457-467.
- Odemis, V., Moepps, B., Gierschik, P. y Engele, J. (2002) Interleukin-6 and cAMP induce stromal cell-derived factor-1 chemotaxis in astroglia by up-regulating CXCR4 cell surface expression. Implications for brain inflammation. *J. Biol. Chem.* **277**:39801-39808.
- Oliveira, W.N., Ribeiro, L.E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E.M. y Bacellar, O. (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* **66**:127-132.
- Olivier, M. (1996) Modulation of host cell intracellular Ca²⁺. *Parasitol. Today* **12**:145-150.
- Olivier, M., Badaró, R., Medrano, F.J. y Moreno, J. (2003) The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals Trop. Med. Parasitol.* **97**:S79-S98.

- Olivier, M., Baimbridge, K.G. y Reiner, N.E. (1992) Inhibition of N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine-induced stimulus-response coupling in monocytes infected with *Leishmania*: evidence for a defect in agonist-induced calcium release. *J. Immunol.* **148**:1188-1196.
- Orsini, M., Canela, J.R., Disch, J., Maciel, F., Greco, D., Toledo, A. y Rabello, A. (2012) High frequency of asymptomatic *Leishmania* spp. infection among HIV-infected patients living in endemic areas for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **106**:283-288.
- Orzalli, M.H., DeLuca, N.A. y Knipe, D.M. (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**:3008-3017.
- Pahl, H.L. y Baeuerle, P.A. (1995) Expression of influenza virus hemagglutinin activates transcription factor NF-kappa B. *J. Virol.* **69**:1480-1484.
- Paredes, R., Muñoz, J., Diaz, I., Domingo, P., Gurgui, M. y Clotet, B. (2003) Leishmaniasis in HIV infection. *J. Postgrad. Med.* **49**:39.
- Park, A.Y., Hondowicz, B.D. y Scott, P. (2000) IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* **165**:896-902.
- Park, A.Y. y Scott, P. (2001) Il-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scand. J. Immunol.* **53**:529-532.
- Pasquereau, S., Kumar, A., Herbein, G. (2017) Targeting TNF and TNF receptor pathway in HIV-1 infection: from immune activation to viral reservoirs. *Viruses* **9**:1-17.
- Patterson, B.K., Czerniewski, M., Andersson, J., Sullivan, Y., Su, F., Jiyamapa, D., Burki, Z. y Landay, A. (1999) Regulation of CCR5 and CXCR4 expression by type 1 and type 2 cytokines: CCR5 expression is downregulated by IL-10 in CD4-positive lymphocytes. *Clin. Immunol.* **91**:254-262.
- Pavli, A. y Maltezos, H.C. (2010) Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *Int. J. Infect. Dis.* **14**:e1032-1039.
- Pereira, R.M., Teixeira, K.L., Barreto-de-Souza, V., Calegari-Silva, T.C., De-Melo, L.D., Soares, D.C., Bou-Habib, D.C., Silva, A.M., Saraiva, E.M. y Lopes, U.G. (2010) Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. *FASEB J.* **2**:617-626.
- Pestkoi, S., Krause, C.D., Sarkar, D. y Walter, M.R. (2004) Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Ann. Rev. Immunol.* **22**:929-979.
- Pfeffer, L.M. (2011) The role of nuclear factor kB in the interferon response. *J. Interferon Cytokine Res.* **31**:553-559.
- Poli, G., Bressler, P., Kinter, A., Duh, E., Timmer, W.C., Rabson, A., Justement, J.S., Stanley, S. y Fauci, A.S. (1990) Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Exp. Med.* **172**:151-158.
- Poli, G. y Fauci, A. (1992) The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**:191-197.
- Poli, G., Kinter, A. y Fauci, A. (1994) Interleukin 1 induces expression of the human immunodeficiency virus alone and in synergy with interleukin 6 in chronically infected U1 cells: inhibition of inductive effects by the interleukin 1 receptor antagonist. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**:108-112.
- Poli, G., Kinter, A.L., Justement, J.S., Bressler, P., Kehrl, J.H. y Fauci, A.S. (1991) Transforming growth factor β suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J. Exp. Med.* **173**:589-597.

- Privé, C. y Descoteaux, A. (2000) *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. *Eur. J. Immunol.* **30**:2235-2244.
- Puri, A., Riley, J.L., Kim, D., Ritchey, D.W., Hug, P., Jernigan, K., Rose, P., Blumenthal, R. y Carroll, R.G. (2000) Influenza virus upregulates CXCR4 expression in CD4⁺ cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:19-25.
- Qadoumi, M., Becker, I., Donhauser, N., Rollinghoff, M. y Bogdan, C. (2002) Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **70**:4638-4642.
- Quaranta, M.G., Tritarelli, E., Giordani, L. y Viora, M. (2002) HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4(+) T cell activation. *Exp. Cell Res.* **275**:243-254.
- Racoosin, E.L. y Beverley, S.M. (1997) *Leishmania major*: promastigotes induce expression of a subset of chemokine genes in murine macrophages. *Exp. Parasitol.* **85**:283-295.
- Ramos, J.C., Sin, S.H., Staudt, M.R., Roy, D., Vahrson, W., Dezube, B.J., Harrington, W. y Dittmer, D.P. (2012) Nuclear factor kappa B pathway associated biomarkers in AIDS defining malignancies. *Int. J. Cancer* **130**:2728-2733.
- Reinhard, K., Huber, M., Lohoff, M. y Visekruna, A. (2012) The role of NF-κB activation during protection against *Leishmania* infection. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**:230-235.
- Reynes, J., Portales, P., Segondy, M., Baillat, V., Andre, P., Avinens, O., Picot, M.C., Clot, J., Eliaou, J.F. y Corbeau, P. (2001) CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression. *AIDS* **15**:1627-1633.
- Reynes, J., Portales, P., Segondy, M., Baillat, V., Andre, P., Avinens, O., Picot, M.C., Clot, J., Eliaou, J.F. y Corbeau, P. (2001) CD4 T cell Surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression. *AIDS* **15**:1627-1633.
- Ritter, U. y Moll, H. (2000) Monocyte chemotactic protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-γ and is antagonized by IL-4. *Eur. J. Immunol.* **30**:3111-3120.
- Ritter, U., Moll, H., Laskay, T., Bröcker, E., Velazco, O., Becker, I. y Gillitzer, R. (1996) Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **173**:699-709.
- Rizzardi, G., Marriott, J., Cookson, S., Lazzarin, A., Dalglish, A. y Barcellini, W. (1998) Tumour necrosis factor (TNF) and TNF related molecules in HIV-1⁺ individuals: relationship with *in vitro* Th1/Th2-type response. *Clin. Exp. Immunol.* **114**:61-65.
- Rodrigues, M.Z., Grassi, M.F., Mehta, S., Zhang, X.Q., Gois, L.L., Schooley, R.T. y Badaro, R. (2011) Th1/Th2 cytokine profile in patients coinfecting with HIV and *Leishmania* in Brazil. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**:1765-1769.
- Rodriguez, B., Sethi, A.K., Cheruvu, V.K., Mackay, W., Bosch, R.J., Kitahata, M., Boswell, S.L., Mathews, W.C., Bangsberg, D.R., Martin, J., Whalen, C.C., Sieg, S., Yadavalli, S., Deeks, S.G. y Lederman, M.M. (2006) Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* **296**:1498-1506.
- Roff, S.R., Noon-Song, E.N. y Yamamoto, J.K. (2014) The significance of interferon-γ in HIV-1 pathogenesis, therapy, and prophylaxis. *Front. Immunol.* **4**:498-509.
- Romero, R. **Microbiología y Parasitología humana** (3^{era} ed.). Madrid: Ed. Médica Panamericana, 2007.

- Russo, R., Laguna, F., López-Vélez, R., Medrano, F.J., Rosenthal, E., Cacopardo, B. y Nigro, L. (2003) Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **97**:99-105.
- Ryan, J.R., Smithyman, A.M., Rajasekariarajah, G.H., Hochberg, L., Stiteler, J.M. y Martin, S.K. (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1037-1043.
- Sadeghi, H., Weiss, L., Kazatchkine, M. y Haeffner-Cavaillon, N. (1995) Antiretroviral therapy suppresses the constitutive production of interleukin-1 associated with human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **172**:547-550.
- Sadick, M.D., Heinzl, F.P., Holaday, B.J., Pu, R.T., Dawkins, R.S. y Locksley, R.M. (1990) Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J. Exp. Med.* **171**:115-127.
- Saha, A., Biswas, A., Srivastav, S., Mukherjee, M., Das, P.K. y Ukil, A. (2014) Prostaglandin E2 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* **193**:2330-2339.
- Sakuishi, K., Oki, S., Araki, M., Porcelli, S.A., Miyake, S. y Yamamura, T. (2007) Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J. Immunol.* **179**:3452-3462.
- Salhi, A., Rodrigues, V., Santoro, F., Dessein, H., Romano, A., Castellano, L.R., Sertorio, M., Rafati, S., Chevillard, C., Prata, A., Alcaïs, A., Argiro, L. y Dessein, A. (2008) Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J. Immunol.* **180**:6139-6148.
- Sandborg, C.I., Imfeld, K.L., Zaldivar, F., Berman, M.A. (1994) HIV type 1 induction of interleukin 1 and 6 production by human thymic cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1221-1229.
- Santiago, H.C., Oliveira, C.F., Santiago, L., Ferraz, F.O., de Souza, D.G., de-Freitas, L.A., Afonso, L.C., Teixeira, M.M., Gazzinelli, R.T. y Vieira, L.Q. (2004) Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **72**:4918-4923.
- Santos-Oliveira, J.R., Regis, E.G., Giacoia-Gripp, C.B., Valverde, J.G., Alexandrino-de-Oliveira, P., Lindoso, J.Â., Goto, H., Oliveira-Neto, M.P., Guerra, J.O., Grinsztejn, B., Jerônimo, S.B., Morgado, M.G. y Da-Cruz, A.M. (2013) Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J. Infect. Dis.* **208**:57-66.
- Sato, N., Ahuja, S.K., Quinones, M., Kosteki, V., Reddick, R.L., Melby, P.C., Kuziel, W.A. y Ahuja, S.S. (2000) CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J. Exp. Med.* **192**:205-218.
- Sato, N., Kuziel, W.A., Melby, P.C., Reddick, R.L., Kosteki, V., Zhao, W., Maeda, N., Ahuja, S.K. y Ahuja, S.S. (1999) Defects in the generation of IFN-gamma are overcome to control infection with *Leishmania donovani* in CC chemokine receptor (CCR) 5-, macrophage inflammatory protein-1 alpha-, or CCR2-deficient mice. *J. Immunol.* **163**:5519-5525.
- Sattentau, Q. (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:815-826.

- Scharton-Kersten, T., Afonso, L.C., Wysocka, M., Trinchieri, G. y Scott, P. (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J. Immunol.* **154**:5320-5330.
- Scheller, C. y Jassoy, C. (2001) Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection *in vitro*. *Virology* **30**:48-55
- Schenkel, K., Rijal, S., Koirala, S., Vanlerberghe, V., Van der Stuyft, P., Gramiccia, M. y Boelaert, M. (2006) Visceral leishmaniasis in southeastern Nepal: a cross-sectional survey on *Leishmania donovani* infection and its risk factors. *Trop. Med. Int. Health* **11**:1792-1799.
- Schlaepfer, E., Audige, A., Joller, H. y Speck, R.F. (2006) TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. *J. Immunol.* **176**:2888-2895.
- Schofield, L., Novakovic, S., Gerold, P., Schwarz, R.T., McConville, M.J. y Tachado, S.D. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J. Immunol.* **156**:1886-1896.
- Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B., Baldwin, A.S. (1999) Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* **274**:31868-31874.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T. y Hume, D.A. (2004) Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukocyte Biol.* **75**:163-189.
- Scott, P. (1989) The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* **68**:369-372.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L. y Sher, A. (1989) Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* **112**:161-182.
- Secchiero, P., Zella, D., Capitani, S., Gallo, R.C. y Zauli, G. (1999) Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXCR4-chemokine receptor 4 in resting CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **162**:2427-2431.
- Serarslan, G. y Atik, E. (2005) Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Mol. Cell Biochem.* **280**:147-149.
- Sharma, V., Knobloch, T.J. y Benjamin, D. (1995) Differential expression of cytokine genes in HIV-1 tat transfected T and B cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**:704-713.
- Sharma, U. y Singh S. (2009) Immunology of leishmaniasis. *Indian J. Exp. Biol.* **47**:412-423.
- Shatrov, V.A., Ratter, F., Gruber, A., Dröge, W. y Lehmann, V. (1996) HIV type 1 glycoprotein 120 amplifies tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation in Jurkat cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:1209-1216.
- Shebl, F.M., Yu, K., Landgren, O., Goedert, J.J. y Rabkin, C.S. (2012) Increased levels of circulating cytokines with HIV-related immunosuppression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**:809-815.
- Shen, H.M. y Pervaiz, S. (2006) TNF receptor superfamily-induced cell death: redox-dependent execution. *FASEB J.* **20**:1589-1598.
- Shukla, R., Kumar, A. y Kimmel, P. (1993) Transforming growth factor beta increases the expression of HIV-1 gene in transfected human mesangial cells. *Kidney Int.* **44**:1022-1026.
- Singh, V.K., Balaraman, S., Tewary, P. y Madhubala, R. (2004) *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**:1086-1095.

- Singh, S.P., Reddy, D.C., Rai, M. y Sundar, S. (2006) Serious underreporting of visceral leishmaniasis through passive case reporting in Bihar, India. *Trop. Med. Int. Health* **11**:899-905.
- Sinha, P.K., van Griensven, J., Pandey, K., Kumar, N., Verma, N., Mahajan, R., Kumar, P., Kumar, R., Das, P., Miltra, G., Flevaud, L., Ferreyra, C., Remartinez, D., Pece, M. y Palma, P. (2011) Liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-coinfected patients: 2-year treatment outcomes in Bihar, India. *Clin. Infect. Dis.* **53**:e91-98.
- Skeiky, Y.A., Kennedy, M., Kaufman, D., Borges, M.M., Guderian, J.A., Scholler, J.K., Ovendale, P.J., Picha, K.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Campos-Neto, A. y Reed, S.G. (1998) LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J. Immunol.* **161**: 6171-6179.
- Soares, D.C., Calegari-Silva, T.C., Lopes, U.G., Teixeira, V.L., de Palmer Paixão, I.C., Cirne-Santos, C., Bou-Habib, D.C. y Saraiva, E.M. (2012) Dolabelladienetriol, a compound from *Dictyota paffii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**:e1787.
- Sobirk, S.K., Mörgelin, M., Egesten, A., Bates, P., Shannon, O. y Collin, M. (2013) Human chemokines as antimicrobial peptides with direct parasitocidal effect on *Leishmania mexicana* in vitro. *PLoS One* **8**:e58129.
- Song, R., Liu, S. y Leong, K.W. (2007) Effects of MIP-1 α , MIP-3 α , and MIP-3 β on the induction of HIV Gag-specific immune response with DNA vaccines. *Mol Ther.* **15**:1007-1015.
- Sozzani, S., Ghezzi, S., Iannolo, G., Luini, W., Borsatti, A., Polentarutti, N., Sica, A., Locati, M., Mackay, C., Wells, T.N., Biswas, P., Vicenzi, E., Poli, G. y Mantovani, A. (1998) Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J. Exp. Med.* **187**:439-444.
- Speth, C., Joebstl, B., Barcova, M. y Dierich, M.P. (2000) HIV-1 envelope protein gp41 modulates expression of interleukin-10 and chemokine receptors on monocytes, astrocytes and neurones. *AIDS* **14**:629-636.
- Stacey, A.R., Norris, P.J., Qin, L., Haygreen, E.A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., Self, S.G. y Borrow, P. (2009) Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* **83**:3719-3733.
- Stebbing, J., Gazzard, B. y Douek, D.C. (2004) Where does HIV live? *N. Engl. J. Med.* **350**:1872-1880.
- Steigerwald, M. y Moll, H. (2005) *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. *Infect. Immun.* **73**:2564-2567.
- Sun, J., Barbeau, B., Sato, S., Boivin, G., Goyette, N. y Tremblay, M.J. (2002) Syncytium formation and HIV-1 replication are both accentuated by purified influenza and virus-associated neuraminidase. *J. Biol. Chem.* **277**:9825-9833.
- Sun, J., Barbeau, B., Sato, S. y Tremblay, M.J. (2001) Neuraminidase from a bacterial source enhances both HIV-1-mediated syncytium formation and the virus binding/entry process. *Virology* **284**:26-36.
- Sundquist, W.I. y Kräusslich, H.G. (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**:a006924.
- Sutherst, R.W. (2004) Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:136-173.

- Suzuki, Y., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., Murakami, T., Misawa, N., Maeda, N., Kimura, T., Shida, H., Hoxie, J.A., O'Brien, W.A. y Yamamoto, N. (1999) Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine-induced CD4(+) T-helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J. Virol.* **73**:316-324.
- Swaminathan, G., Pascual, D., Rival, G., Perales-Linares, R., Martín-García, J. y Navas-Martin, S. (2014) Hepatitis C virus core protein enhances HIV-1 replication in human macrophages through TLR2, JNK, and MEK1/2-dependent upregulation of TNF- α and IL-6. *FEBS Lett.* **588**:3501-3510.
- Sylwester, A., Murphy, S., Shutt, D. y Soll, D.R. (1997) HIV-induced T cell syncytia are self-perpetuating and the primary cause of T cell death in culture. *J. Immunol.* **158**:3996-4007.
- Szabó, J., Beck, Z., Csomán, E., Liu, X., Andrikó, I., Kiss, J., Bácsi, A., Ebbesen, P. y Tóth, F.D. (1999) Differential patterns of interaction between HIV type 1 and HTLV type I in monocyte-derived macrophages cultured *in vitro*: implications for *in vivo* coinfection with HIV type 1 and HTLV type I. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**:1653-1666.
- Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U. y Murphy, K.M. (1997) Regulation of the Interleukin (IL)-12R β 2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells. *J. Exp. Med.* **185**:817-824.
- Tachado, S.D., Gerold, P., McConville, M.J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R.T. y Schofield, L. (1996) Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **156**:1897-1907.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M. y Schofield, L. (1997) Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: Activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:4022-4027.
- Takatsu, K. (2011) Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **87**:463-485.
- Takatsu, K., Takaki, S. y Hitoshi, Y. (1994) Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv. Immunol.* **57**:145-190.
- Takeshita, S., Breen, E., Ivashchenko, M., Nishanian, P., Kishimoto, T., Vredevoe, D. y Martínez-Maza, O. (1995) Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 human monocytic cell line. *Cell Immunol.* **165**:234-242.
- Tanaka, M., Hirabayashi, Y., Gatanaga, H., Aizawa, S., Hachiya, A., Takahashi, Y., Tashiro, E., Kohsaka, T., Oyamada, M., Ida, S. y Oka, S. (1999) Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4⁺ CD8⁻ T cells. *Scand. J. Immunol.* **50**:550-554.
- Tedla, N., Palladinetti, P., Kelly, M., Kumar, R.K., DiGirolamo, N., Chattopadhyay, U., Cooke, B., Truskett, P., Dwyer, J., Wakefield, D. y Lloyd, A. (1996) Chemokines and T lymphocyte recruitment to lymph nodes in HIV infection. *Am. J. Pathol.* **148**:1367-1373.
- Toossi, Z., Johnson, J.L., Kanost, R.A., Wu, M., Luzze, H., Peters, P., Okwera, A., Joloba, M., Mugenyi, P., Mugerwa, R.D., Aung, H., Ellner, J.J. y Hirsch, C.S. (2001) Increased replication of HIV-1 at sites of *Mycobacterium tuberculosis* infection: potential mechanisms of viral activation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **28**:1-8.
- Torres, G., García, V., Sánchez, E., Segarra, A., Patterson, B.K. y Meléndez-Guerrero, L.M. (2001) Expression of the HIV-1 co-receptors CCR5 and CXCR4 on placental macrophages and the effect of IL-10 on their expression. *Placenta Suppl.* **A**:S29-S33.

- Tremblay, M., Olivier, M. y Bernier, R. (1996) *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol. Today* **12**:257-261.
- Trinchieri, G. (1997) Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Curr. Opin. Immunol.* **9**:17-23.
- Trinchieri, G. y Scott, P. (1999) Interleukin-12: basic principles and clinical applications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **238**:57-78.
- Tripathi, P., Singh, V. y Naik, S. (2007) Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**:229-242.
- Tsagozis, P., Karagouni, E. y Dotsika, E. (2003) CD8⁺ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **25**:569-579.
- Turco, S.J. (1999) Adversarial relationship between the *Leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol.* **21**:597-600.
- UNAIDS. (2016) Global AIDS Update 2016.
- UNAIDS. (2012) Global report: UNAIDS Report on Global AIDS Epidemic.
- Valencia-Pacheco, G., Loría-Cervera, E.N., Sosa, E.I., Canché-Pool, E.B., Vargas, A., Melby, P.C. y Andrade, F.J. (2014) *In situ* cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ) and chemokines (MCP-1, MIP-1 α) gene expression in human *Leishmania mexicana* infection. *Cytokine* **69**:56-61.
- Valentin, A., Lu, W., Rosati, M., Schneider, R., Albert, J., Karlsson, A. y Pavlakis, G.N. (1998) Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:8886-8891.
- Vallejo, A., Abad-Fernández, M., Moreno, S., Moreno, A., Pérez-Elías, M.J., Dronda, F. y Casado, J.L. (2015) High levels of CD4⁺ CTLA-4⁺ Treg cells and CCR5 density in HIV-1-infected patients with visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**:267-275.
- Velde, A.A., Huijbens, R.J., Heije, K., de Vries, J.E. y Figdor, C.G. (1990) Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* **76**:1392-1397.
- Vester, B., Müller, K., Solbach, W. y Laskay, T. (1999) Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **67**:3155-3159.
- Vicenzi, E., Alfano, M., Ghezzi, S., Gatti, A., Veglia, F., Lazzarin, A., Sozzani, S., Mantovani, A. y Poli, G. (2000) Divergent regulation of HIV-1 replication in PBMC of infected individuals by CC chemokines: suppression by RANTES, MIP-1 α , and MCP-3, and enhancement by MCP-1. *J. Leukoc. Biol.* **68**:405-412.
- Victoriano, A.F. y Okamoto, T. (2012) Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel antiviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**:125-138.
- Vita, C., Drakopoulou, E., Ylisastigui, L., Bakri, Y., Vizzavona, J., Martin, L., Parmentier, M., Gluckman, J.C. y Benjouad, A. (2002) Synthesis and characterization of biologically functional biotinylated RANTES. *J. Immunol. Methods* **266**:53-65.
- Vitoriano-Souza, J., Moreira, N., Menezes-Souza, D., Roatt, B.M., de Oliveira, R.D., Siqueira-Mathias, F.A., de Oliveira, J.M., Giunchetti, R.C., de Sá, R.G., Corrêa-Oliveira, R., Carneiro, C.M. y Reis, A.B. (2013) Dogs immunized with LBSap vaccine displayed high levels of IL-12 and IL-10 cytokines and CCL4, CCL5 and CXCL8 chemokines in the dermis. *Mol. Immunol.* **56**:540-548.
- Vivarini, A.C., Pereira, R.M., Barreto-de-Souza, V., Temerozo, J.R., Soares, D.C., Saraiva, E.M., Saliba, A.M., Bou-Habib, D.C. y Lopes, U.G. (2015) HIV-1 Tat protein enhances the intracellular growth of *Leishmania amazonensis* via the ds-RNA induced protein PKR. *Sci. Rep.* **5**:16777-16788.

- Vivarini, A.C., Pereira, R.M., Teixeira, K.L., Calegari-Silva, T.C., Bellio, M., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Gomes, C.M., Soares, R.P., Silva, A.M., Silveira, F.T. y Lopes, U.G. (2011) Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB J.* **12**:4162-4173.
- Von Stebut, E., Ehrchen, J.M., Belkaid, Y., Kostka, S.L., Molle, K., Knop, J., Sunderkotter, C. y Udey, M.C. (2003) Interleukin- 1 promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible mice. *J. Exp. Med.* **198**:191-199.
- Vyakarnam, A., McKeating, J., Meager, A. y Beverley, P. (1990) Tumour necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. *AIDS* **4**:21-27.
- Wagner, H.M., Beuscher, H.U., Rollinghoff, M. y Solbach, W. (1991) Interferon- γ inhibits the efficacy of interleukin 1 to generate a Th2-cell biased immune response induced by *Leishmania major*. *Immunobiol.* **182**:292-306.
- Wahl, S.M., Greenwell-Wild, T., Peng, G., Hale-Donze, H., Doherty, T.M., Mizel, D. y Orenstein, J.M. (1998) *Mycobacterium avium* complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12574-12579.
- Wang, J., Crawford, K., Yuan, M., Wang, H., Gorry, P.R. y Gabuzda, D. (2002) Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines. *J. Infect. Dis.* **185**:885-897.
- Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G. y Norcross, M.A. (1999) Inhibition of CCR5 expression by IL-12 through induction of beta-chemokines in human T lymphocytes. *J. Immunol.* **163**:5763-5769.
- Wang, J., Roderiquez, G., Oravec, T. y Norcross, M.A. (1998) Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J. Virol.* **72**:7642-7647.
- Wang, Y., Wang, X., Li, J., Zhou, Y. y Ho, W. (2013) RIG-I activation inhibits HIV replication in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **94**:337-341.
- Wang, Z.E., Reiner, S.L., Zheng, S., Dalton, D.K. y Locksley, R.M. (1994) CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **179**:1367-1371.
- Watanabe, Y., Hamaguchi-Tsuru, E., Morimoto, N., Nishio, Y., Yagyu, K., Konishi, Y., Tominaga, M., Miyazaki, J., Furuya, M. y Tominaga, A. (2004) IL-5-Induced eosinophils suppress the growth of *Leishmania amazonensis* *in vivo* and kill promastigotes *in vitro* in response to either IL-4 or IFN- γ . *DNA Cell Biol.* **23**:412-418.
- Weiss, J.M., Nath, A., Major, E.O. y Berman, J.W. (1999) HIV-1 Tat induces monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte transmigration across a model of the human blood-brain barrier and up-regulates CCR5 expression on human monocytes. *J. Immunol.* **163**:2953-2959.
- Weissman, D., Poli, G. y Fauci, A.S. (1994) Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1199-1206.
- Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Röllinghoff, M., Bogdan, C. y Körner, H. (2001) Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J. Immunol.* **166**:4012-4019.
- WHO. (1995) Report on the consultative meeting on *Leishmania*/HIV coinfection, vol. WHO/LEISH/95.35. World Health Organization, Geneva, Switzerland. p. 1-14.

- WHO. (2000) *Leishmania*/HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: a retrospective analysis of 965 cases. Geneva: World Health Organization p.14.
- WHO. (2007) Report of the fifth consultative meeting on *Leishmania*/HIV coinfection: Addis Ababa, Ethiopia.
- WHO. (2014) Leishmaniasis. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>. (Consulta: 24 de julio de 2015).
- Wolday, D., Akuffo, H., Britton, S., Hathaway, A. y Sander, B. (1994) HIV-1 inhibits *Leishmania*-induced cell proliferation but not production of interleukin-6 and tumour necrosis factor alpha. *Scand. J. Immunol.* **39**:380-386.
- Wolday, D., Akuffo, H., Demissie, A. y Britton, S. (1999) Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4⁺ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect. Immunol.* **67**:5258-5264.
- Wolday, D., Akuffo, H., Fessahaye, G., Valantine, A. y Britton, S. (1998) Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **39**:29-34.
- Wolday, D., Berhe, N., Britton, S., Akuffo, H. (2000) HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *AIDS* **14**:921-929.
- Wong, C.K., Ip, W.K. y Lam, C.W. (2003) Interleukin-3, -5, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor-induced adhesion molecule expression on eosinophils by p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**:133-147.
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C. y Chen, Z.J. (2013) Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* **339**:826-830.
- Xu, C., Zhao, H., Chen, H. y Yao, Q. (2015) CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**:4953-4964.
- Yang, L., Cohn, L., Zhang, D.H., Homer, R., Ray, A. y Ray, P. (1998) Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J. Exp. Med.* **188**:1739-1750.
- Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E.M., Belkaid, Y. y Piccirillo, C.A. (2006) CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J. Exp. Med.* **203**:2451-2460.
- Zaph, C. y Scott, P. (2003) Interleukin-12 regulates chemokine gene expression during the early immune response to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **71**:1587-1589.
- Zavala, F., Rimaniol, A.C., Boussin, F., Dormont, D., Bach, J.F. y Descamps-Latscha, B. (1995) HIV predominantly induces IL-1 receptor antagonist over IL-1 synthesis in human primary monocytes. *J. Immunol.* **155**:2784-2793.
- Zeledón, R., Soto, R. y González, G. (1982) Experimental superimposed infection of the hamster with *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis*. *Acta Tropica* **39**:367-372.
- Zhang, Y., Nakata, K., Weiden, M. y Rom, W.N. (1995) *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication by transcriptional activation at the long terminal repeat. *J. Clin. Invest.* **95**:2324-2331.
- Zhao, C., Cantin, R., Breton, M., Papadopoulou, B y Tremblay, M.J. (2005) DC-SIGN- mediated transfer of HIV-1 is compromised by the ability of *Leishmania infantum* to exploit DC-SIGN as a ligand. *J. Infect. Dis.* **191**:1665-1669.

- Zhao, C., Papadopolou, B. y Tremblay, M.J. (2004a) *Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network. *Clin. Immunol.* **113**:81-88.
- Zhao, C., Papadopolou, B. y Tremblay, M.J. (2004b) *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured *ex vivo* by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *J. Immunol.* **172**:3086-3093.
- Zhao, C., Thibault, S., Messier, N., Ouellette, M., Papadopolou, B. y Tremblay, M.J. (2006) In primary human monocyte-derived macrophages exposed to Human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake? *J. Gen. Virol.* **87**:1295-1302.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el-Hassan, I.M. y el-Hassan, A.M. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **3**:87-98.
- Zink, M.C., Coleman, G.D., Mankowski, J.L., Adams, R.J., Tarwater, P.M., Fox, K. y Clements, J.E. (2001) Increased macrophage chemoattractant protein-1 in cerebrospinal fluid precedes and predicts simian immunodeficiency virus encephalitis. *J. Infect. Dis.* **184**:1015-1021.
- Zoetewij, J.P., Golding, H., Mostowski, H. y Blauvelt, A. (1998) Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J. Immunol.* **161**:3219-3223.
- ¹ https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HIV_Virion-en.png
(Consulta: 20 de junio de 2015).
- ² <http://www.wynman.com/baylor.html>
(Consulta: 25 de julio de 2015).
- ³ <http://leishmaniasisusmp.blogspot.com/2010/05/tipos-de-leishmaniasis.html>
(Consulta: 25 de julio de 2015).
- ⁴ <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
(Consulta: 25 de julio de 2015).
- ⁵ http://www.unicef.org/infoby country/burkinafaso_statistics.html#89
(Consulta: 9 de agosto de 2015).
- ⁶ <http://fivephoton.com/pdfs/NF-kb%20ELISA%20Protocol.pdf>
(Consulta: 3 de noviembre de 2016).
- ⁷ <http://fivephoton.com/pdfs/NUCLEAR%20PROTEIN%20ISOLATION%20KIT.pdf>
(Consulta: 24 de diciembre de 2016).
- ⁸ <https://www.qiagen.com/us/shop/protein-and-cell-assays/multi-analyte-elisarray-kits/>
(Consulta: 24 de diciembre de 2016).