



**FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID**

TRABAJO FIN DE GRADO

INMUNOPARASITOLOGÍA DE *LEISHMANIA*

Autor: García-Trevijano Cabetas, Macarena

DNI: 05321790G

Tutor: Escario García-Trevijano, José Antonio.

Convocatoria: Febrero 2017

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción y antecedentes	3
3. Objetivos	4
4. Metodología	4
5. Resultados y discusión	
5.1 Moléculas de superficie	5
5.2 <i>Leishmania</i> : del vector al hospedador vertebrado	6
5.3 Interacción parásito-hospedador vertebrado	7
5.4 Influencia de la respuesta inmune en el cuadro clínico	16
6. Conclusiones	19
7. Bibliografía consultada más relevante	20

1. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el tripanosomátido intracelular *Leishmania*, frente a la que no existe un arsenal adecuado de fármacos para su tratamiento. De las enfermedades causadas por protozoos parásitos, es la que produce más muertes tras la malaria. Las primeras referencias descritas de leishmaniasis en humanos se encuentran en el “Papiro de Ebers” (1600 a.c). Además, a través de estudios paleontológicos, fueron descubiertas momias con lesiones características de la enfermedad. Esta convivencia a lo largo de los años ha permitido una adaptación gradual parásito/hospedador dirigida a un equilibrio en la relación. Así, *Leishmania* ha desarrollado mecanismos para sobrevivir y colonizar el entorno, mientras que el hospedador busca estrategias para evitar el asentamiento y preservar la salud. Las interacciones que se producen entre el parásito y el sistema inmune del hospedador son muy complejas y determinan en gran medida la forma clínica de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La leishmaniasis es el nombre genérico que engloba a un grupo de enfermedades parasitarias que afectan al hombre y a otros mamíferos, y que están producidas por protozoos flagelados del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*. Constituye un serio problema de salud pública en el contexto mundial, pues aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por *Leishmania* y alrededor de 350 millones viven en zonas de riesgo. Los vectores de la enfermedad son insectos hembra de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomya* (Nuevo Mundo).

El ciclo de vida de *Leishmania* es digenético, alternando entre la forma promastigote, flagelada y extracelular, que se multiplica y desarrolla en el tracto digestivo del vector, y la forma amastigote, aflagelada e intracelular, que se replica en los macrófagos del hospedador vertebrado. Los promastigotes experimentan un proceso de metaciclogénesis en el tracto digestivo del vector, transformándose en formas altamente infectivas para el hospedador vertebrado. Los promastigotes metacíclicos, inoculados por la picadura del insecto vector, son fagocitados por células retículoendoteliales del huésped, y se diferencian en amastigotes, los cuales se replican dentro de los

macrófagos hasta romper la célula, liberándose al torrente sanguíneo para invadir diferentes tejidos donde serán fagocitados nuevamente por los macrófagos. El ciclo se completa cuando el insecto vector ingiere macrófagos infectados o amastigotes liberados a sangre, al alimentarse de la sangre del hospedador, donde los amastigotes se transforman en promastigotes que podrán ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado.

Hay varios fármacos antileishmania, pero el fármaco de elección aún está fuera de nuestro alcance, ya que los fármacos disponibles no son del todo eficaces y muchos presentan graves efectos adversos. La dificultad para tratar esta enfermedad reside en las complejas interacciones que se dan entre el parásito y el sistema inmune. *Leishmania* es un parásito adaptado a su hospedador que a lo largo de los años ha ido desarrollando numerosas estrategias para lograr evadir los múltiples mecanismos que tiene el sistema inmune para eliminarla. Estos mecanismos de evasión son diversos, y diferentes para las distintas especies de *Leishmania* y, además, no todos los hospedadores presentan la misma respuesta. Esto se traduce en las diferentes formas clínicas que diversas especies pueden producir.

3. OBJETIVOS

En este trabajo se realiza una revisión de las interacciones a nivel molecular que se establecen entre el sistema inmunitario del hospedador y el parásito, haciendo hincapié en las estrategias de evasión desarrolladas por este último para garantizarse su supervivencia.

4. METODOLOGÍA

Para poder desarrollar este objetivo, se ha realizado una revisión bibliográfica de diversos artículos obtenidos en PubMed, Scielo, Medscape, Science Direct y Google Académico, los cuales presentan una antigüedad no superior a los 10 años desde 2016.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Moléculas de superficie

Las diferentes formas que presenta *Leishmania* a lo largo de su ciclo de vida, además de distinguirse por su morfología y su localización, presentan un mosaico molecular en su superficie muy diverso.

Los promastigotes están recubiertos por un glicocálix de 7 nm de grosor en el caso de los procíclicos, y de 17 nm en el caso de los metacíclicos, mientras que en las formas amastigotes es casi inexistente. Esta cubierta presenta estructuras glicosiladas, principalmente glicoproteínas y glicolípidos, que están ancladas a la membrana por una unión glicosilfosfatidilinositol (puentes GPI), y una familia de glicolípidos GPI libres, llamados glicoinositolfosfolípidos (GIPLs). La molécula de superficie predominante en los promastigotes es el lipofosfoglicano (LPG). Su estructura varía en las diferentes especies, pero básicamente está compuesto por unidades repetitivas de un disacárido y un fosfato unidos a la membrana por un puente GPI. Las variaciones en las cadenas laterales que se unen a la estructura central de LPG son importantes entre las distintas especies de *Leishmania*. El LPG juega un papel importante en la supervivencia del parásito y en la modulación de la respuesta inmunológica del hospedador. Quizás una de las moléculas más importantes es la glicoproteína 63 (gp63) o leishmanolisina o proteasa mayor de superficie. Es una metaloproteasa de zinc que se relaciona con la entrada del parásito al macrófago, pues favorece su fagocitosis, y la supervivencia del amastigote dentro del macrófago. También afecta a la función del complemento aumentando la resistencia del parásito a la lisis mediada por complemento. Los glicolípidos GPI libres, GIPLs, son las moléculas numéricamente más abundantes. Al ser de pequeño tamaño, se mantienen cerca de la membrana celular y cubiertos por las moléculas de LPG, por lo que no se tiene claro que intervengan en la interacción con el hospedador. Dado que tienen una larga vida media, se cree que tienen un rol protector en la superficie del promastigote.

La forma amastigote expresa niveles bajos de LPG y de gp63. Sin embargo, la cantidad de GIPLs no disminuye cuando los promastigotes se diferencian a amastigotes. Por ello, son los componentes de membrana más abundantes en la superficie de los amastigotes.

Es probable que haya más moléculas de superficie que intervengan en la modulación de la respuesta inmune del hospedador. Concretamente, los amastigotes expresan algunas metaloproteasas capaces de incorporar lípidos de membrana procedentes del hospedador. Además, algunas moléculas secretadas intervienen en la capacidad de infección y de evasión del sistema inmune, como son los lipofosfoglicanos y las fosfatasas ácidas. Otras proteínas secretadas, como las cisteín-peptidasas, están implicadas en la invasión y alteración de la señalización intracelular en los macrófagos, siendo necesarias para la supervivencia de los amastigotes en el interior de los mismos.

5.2 *Leishmania*: del vector al hospedador vertebrado

Leishmania debe poder sobrevivir en el intestino medio del vector para luego ser capaz de infectar al hospedador. Para ello, el parásito cuenta con LPG y gp63 en su superficie, que le protegen de las enzimas hidrolíticas del intestino del insecto. Además, el LPG establece uniones con lectinas del epitelio del intestino que permiten a los promastigotes procíclicos permanecer adheridos al mismo y así evitar ser excretados. Cuando los promastigotes se diferencian a la forma metacíclica, las moléculas de LPG sufren una serie de modificaciones que las hacen menos afines a las lectinas; así, los promastigotes metacíclicos se separan del epitelio intestinal y pueden migrar a la faringe desde donde serán transmitidos al huésped vertebrado. Durante la metaciclologénesis, el proceso de apoptosis permite eliminar los parásitos no aptos para la posterior infección. Este es un ejemplo claro de coevolución y adaptación del parásito a su hospedador, pues este proceso de apoptosis evita el consumo innecesario de nutrientes del vector, así como el crecimiento incontrolado de parásitos que conllevaría la muerte del vector. Además, se ha descrito que la presencia de parásitos apoptóticos en el inóculo media el silenciamiento de las células del hospedador (evita la activación de mecanismos antimicrobianos), ya que inducen la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la IL-10, y por otro lado la disminución en la expresión de la citoquina proinflamatoria: factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

La interacción parásito-hospedador vertebrado comienza en el momento de la picadura del insecto. Son insectos helmínticos, por lo que la introducción de las piezas bucales corta los vasos sanguíneos de la unión dermo-epidérmica. Además, el insecto inyecta sustancias vasodilatadoras y la enzima hialuronidasa, provocando la formación de pequeños charcos de sangre de donde se alimentan directamente por aspiración. El sistema inmune innato interviene con el fin de detener este proceso y de reorganizar el tejido dañado, mediante la activación del complemento, la activación de la coagulación y la llegada de macrófagos residentes y de neutrófilos sanguíneos al sitio de la lesión. Esto en teoría limitaría la capacidad del insecto para alimentarse y para transmitir la leishmaniasis. Sin embargo, la saliva del insecto contiene sustancias que favorecen su alimentación, reduciendo la inflamación y facilitando la transmisión de *Leishmania*, entre las que cabe destacar potentes sustancias vasodilatadoras: maxadilan (*Lutzomyia*) o adenosina (*Phlebotomus*), antiagregantes plaquetarios, apirasa y sustancias estimuladoras de la producción de prostaglandina E2.

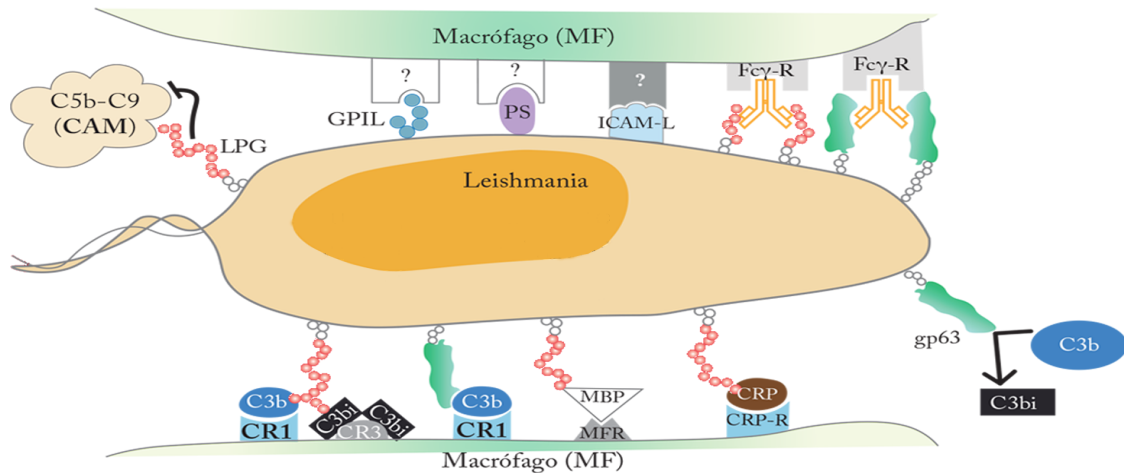
5.3 Interacción parásito-hospedador vertebrado

Tras la inoculación de los promastigotes metacíclicos se produce un reconocimiento de moléculas de superficie, como gp63 y LPG, y la activación de la cascada del complemento. El complemento lisa aproximadamente a un 90% de dichos promastigotes, con lo que se reduce la probabilidad de establecer una infección inicial. Sin embargo, hay un 10% que sobrevive utilizando diferentes mecanismos destinados a evadir la lisis mediada por el complemento hasta ser endocitados por los macrófagos. Estos mecanismos han sido desarrollados por las formas metacíclicas, que son las formas especializadas en la transmisión al hospedador, dotándolas de resistencia a la lisis, mecanismos de los que carecen los promastigotes procíclicos. Entre estas estrategias desarrolladas destacaría el engrosamiento de su glicocálix, que les confiere resistencia. Además, la diferente resistencia al complemento depende del LPG ramificado de la superficie del parásito; el LPG de los promastigotes metacíclicos es más largo y parece que previene la unión de las subunidades C5b-C9 del complejo del complemento, que forman el complejo de ataque a la membrana (CAM), cuya función es la lisis celular. Además, se ha propuesto que una proteína quinasa de la superficie de *L.major* podría fosforilar algunos miembros del complemento e inactivar así la cascada.

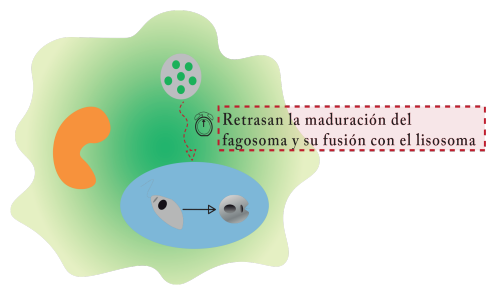
Posteriormente utilizan este mismo sistema del complemento como mecanismo para atraer células fagocitarias y lograr su rápido ingreso en las mismas. Por un lado, la activación del complemento favorece la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a, que son potentes agentes quimiotácticos para neutrófilos (PMN) y monocitos. También los mastocitos juegan un papel quimiotáctico de PMN, al liberar sus gránulos de TNF- α . Además, se ha demostrado *in vitro* que *L.major* secreta un factor propio, denominado factor quimiotáctico de *Leishmania* (LCF), que es quimiotáctico para PMN. A pesar de esta gran liberación de sustancias quimiotácticas, las primeras células en infectarse son los macrófagos residentes, que están en el sitio cuando se da la inoculación. Por otro lado, la activación del complemento da lugar a un aumento en el número de opsoninas que se fijan a la superficie del parásito, asegurando así que sean fagocitados por las células fagocitarias que posean receptores de complemento CR1 y CR3, como mecanismos fundamentales. La opsonización de los promastigotes metacíclicos con C3b y C3bi permite su interacción con CR1 y CR3 respectivamente. Sin embargo, dado que C3b es rápidamente convertido a C3bi por la gp63, el receptor CR3 es más importante y la interacción con CR1 es transitoria. La unión a través de CR3 en lugar de CR1 supone una ventaja para el parásito, ya que no provoca la activación del estallido oxidativo durante la fagocitosis. Es decir, *Leishmania* no sólo evita la activación del complejo lítico del complemento, sino que utiliza la proteína C3 para invadir al macrófago de forma silenciosa y favorecer su supervivencia en el interior del mismo. Además, el parásito previene la activación de dichas células de manera activa, mediante la inhibición de la secreción de IL-12 (Th1).

Los promastigotes también pueden adherirse al macrófago a través del receptor de manosa-fucosa, que se une a los residuos de manosa del LPG. El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva y favorecer la fagocitosis a través del receptor de dicha proteína, sin provocar la activación del macrófago. Además, la gp63 y el LPG interaccionan con el receptor de fibronectina y con CR4, respectivamente, aunque el papel del LPG en la adhesión e internalización parece ser minoritario. Recientemente se han identificado otras moléculas de superficie relacionadas con la interacción inicial *Leishmania*-macrófago, aunque no se tienen claros los receptores del macrófago para dichas moléculas. Un estudio reciente ha reportado que la mayor infectividad de los promastigotes metacíclicos se debe en parte a la elevada exposición de fosfatidilserina

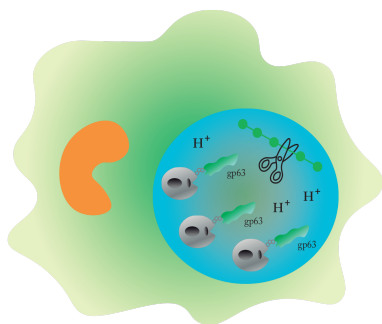
(PS) en su membrana pues, de forma similar a lo que ocurre en las células apoptóticas, la externalización de PS es uno de los procesos que requiere el parásito para infectar al macrófago y para inhibir su respuesta microbicida. Los amastigotes también pueden ser internalizados a través de un receptor Fc, tras ser opsonizados por anticuerpos específicos. El gran número de receptores implicados sugiere un grado de redundancia en las interacciones parásito-macrófago, aunque parece que son necesarias varias interacciones para que tenga lugar la internalización.



Tras su unión a los macrófagos, los promastigotes de *Leishmania* son endocitados en un fagosoma conocido como “vacuola parasitófora”, cuyo ambiente es relativamente benigno, donde empieza su diferenciación en amastigotes. Al contrario que los amastigotes, los promastigotes son vulnerables a la degradación en el medio ácido e hidrolítico del fagolisosoma, por lo que *Leishmania* ha desarrollado estrategias que retrasan la maduración del fagosoma y su fusión con el lisosoma. El mecanismo no se conoce del todo,

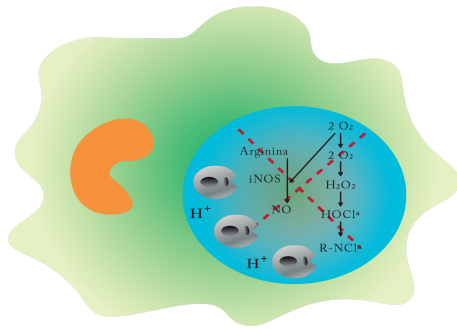


pero se ha demostrado que depende de la presencia de calcio y de la inhibición de la proteína quinasa C (PKC). Además, el LPG media un cambio en la forma de las membranas llevando a la repulsión estérica entre el fagosoma y el lisosoma. Asimismo, tras la fusión, el parásito es capaz de neutralizar varias enzimas hidrolíticas mediante la actividad de la proteasa gp63 que actúa óptimamente en pH ácido. El LPG también podría



La actividad proteasa de la gp63, que actúa óptimamente a pH ácido, **neutraliza varias enzimas hidrolíticas**. El LPG también protege de los enzimas por su carga intensamente negativa y las unidades repetidas de galactosa-manosa.

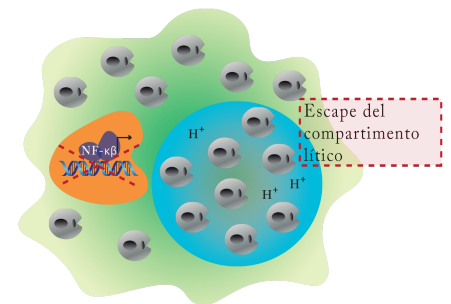
proteger contra las enzimas del lisosoma debido a su carga intensamente negativa y a las unidades repetidas de galactosa-manosa.



El parásito **disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (IROs) y de nitrógeno**, ya que posee dos moléculas denominadas peroxidoxinas (LcPxn1 y LcPxn2) y una superóxido dismutasa.

Por otro lado, el parásito es capaz de disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (IROs) y de nitrógeno, que son las moléculas microbicidas más importantes del macrófago, así como de neutralizarlas, ya que posee dos moléculas denominadas peroxidoxinas (LcPxn1 y LcPxn2) y una superóxido dismutasa.

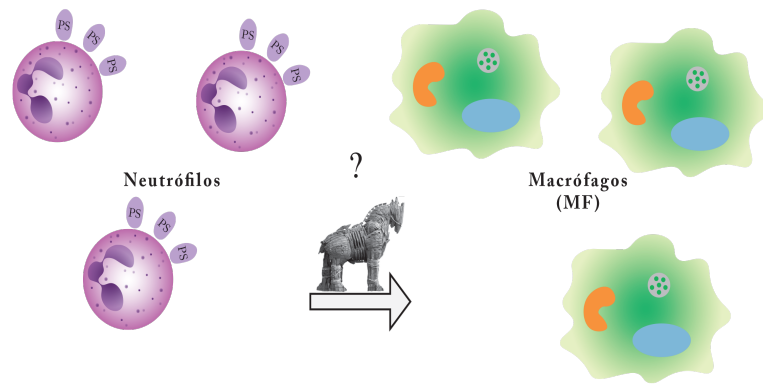
Además, *Leishmania* altera múltiples vías de señalización en el interior de los macrófagos, entre las que cabe destacar la disminución de la actividad de la PKC dependiente de calcio, para bloquear la activación del factor de transcripción NF- κ B, e impedir así que se exprese el enzima óxido nítrico sintasa. Utilizando todas estas estrategias, los amastigotes son capaces de replicarse activamente dentro de las células infectadas, y cuando éstas se lisan, los amastigotes liberados infectan otras células vecinas.



Alteran vías de señalización celular para bloquear la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Los neutrófilos son las primeras células sanguíneas en ser movilizadas y en llegar al sitio del daño tisular y entrada del parásito. Una de las funciones clásicas que se atribuye a los neutrófilos es su capacidad de fagocitar microorganismos y destruirlos, a través del estallido oxidativo, un mecanismo dependiente de oxígeno que genera IROs, especies altamente tóxicas para el patógeno. Sin embargo, determinados patógenos incluyendo *Leishmania* son capaces de sobrevivir transitoriamente dentro de los neutrófilos. Para ello ha desarrollado mecanismos de protección que evitan el estallido oxidativo, dan lugar al escape de los compartimentos líticos del neutrófilo e interfieren en la vía de señalización del interferón gamma (IFN- γ) (Th1). Además, el parásito aumenta la vida media del neutrófilo, pues tiene la capacidad de retrasar su apoptosis hasta varios días. Este mecanismo permite al parásito utilizar al neutrófilo como un refugio contra la lisis mediada por complemento hasta el momento en que ha llegado una buena provisión de macrófagos, que son las células hospedadoras definitivas, al

sitio de la inoculación. En presencia de macrófagos, el parásito puede acelerar la apoptosis de los neutrófilos mediante la exposición de PS en la superficie, probablemente a través de la interacción



con la forma transmembrana del factor de necrosis tumoral (mTNF) de los macrófagos. Así, los neutrófilos actuarían como un “Caballo de Troya” que contendría los parásitos intactos, permitiendo a éstos entrar en el macrófago sin despertar una respuesta microbicida. Sin embargo, aún se desconoce cómo es la transferencia de parásitos entre neutrófilos y macrófagos; otro estudio sostiene que el PMN infectado no es fagocitado, sino que libera al parásito para que éste penetre en el macrófago. En los estudios con ratones, el papel de la interacción de los PMN con los macrófagos parece ser paradójico. En los ratones BALB/c (susceptibles a la infección por *Leishmania*), la interacción favorece la liberación de PGE2 y TGF- β por los macrófagos, facilitando el crecimiento de los parásitos. Sin embargo, en los ratones C57BL/6, que desarrollan una buena respuesta inmunológica contra *Leishmania*, la interacción provoca la secreción de TNF e IL-12 por los macrófagos con la consecuente destrucción de los parásitos. Este papel paradójico de los PMN debe ser estudiado más a fondo.

Además de su función fagocítica, los neutrófilos contribuyen en la iniciación de la inflamación, pues secretan factores que favorecen el reclutamiento y/o activación de otras células inflamatorias: liberan citoquinas y quimioquinas, como IL-8, MIP-1 α/β y MIP-2, que favorecen y dirigen la llegada de un mayor número de células inmunitarias al sitio de la infección. La secreción de citoquinas y quimioquinas por parte de los neutrófilos modula el microambiente del sitio de la lesión e influye en la determinación del tipo y magnitud de la respuesta inmune específica frente a *Leishmania*.

Una forma que tiene el parásito de persistir en el hospedador vertebrado durante un largo período de tiempo es infectando células denominadas blancos seguros, es decir, que tienen una reducida actividad antimicrobiana, como son los fibroblastos y hepatocitos.

Las células dendríticas (CDs) identifican al parásito mediante receptores de reconocimiento de patógenos como receptores tipo Toll (TLR), lo que induce la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-alfa, IL-6 e IL-1). Una de las citoquinas claves en una respuesta curativa es la IL-12. Como todos los TLR, con excepción del TLR-3, esta citoquina señala a través de la proteína adaptadora MyD88. De este modo, en ratones deficitarios en MyD88, no se produce o se produce en menor cantidad IL-12 al ser infectados por *Leishmania spp.*, lo que hace que no sean eficientes para activar a las células T CD4+ y que, por tanto, los niveles de IFN- γ sean bajos, y se produzcan lesiones más grandes y crónicas. De estos resultados se puede inferir que MyD88 es indispensable para generar una respuesta inmune eficaz contra el parásito, de forma que su papel es similar al que se ha demostrado en otras infecciones parasitarias, como *Trypanosoma cruzi*. Además, los TLR, también son importantes para la activación de las células asesinas naturales (NK), que secretan IFN- γ , promoviendo que se produzca el estallido respiratorio en los macrófagos.

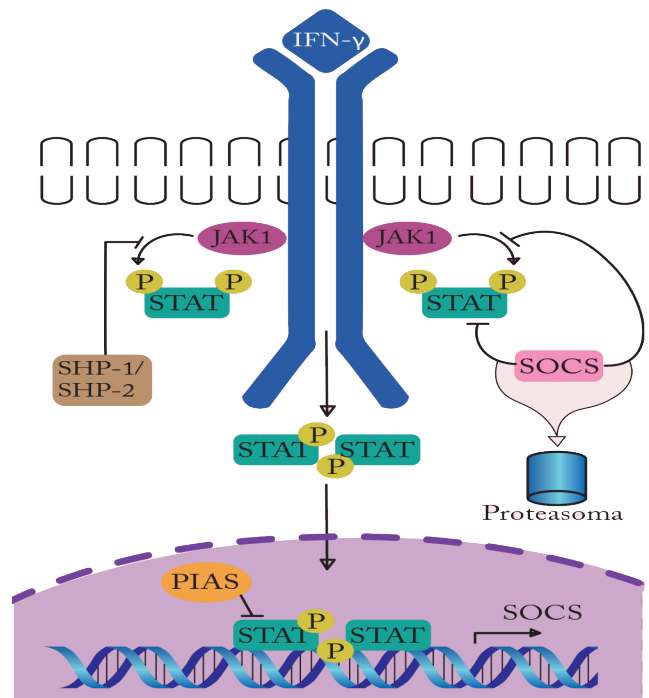
La llegada de las CDs al sitio de inflamación marca el inicio de la respuesta adaptativa, pues son potentes células presentadoras de antígeno que tienen un papel importante como puente entre la respuesta innata y la adaptativa a través de la activación de las células T. Las CDs inmaduras fagocitan al parásito a través de los receptores Fc γ RI y Fc γ RIII. Las señales generadas durante este periodo, propician la migración y maduración de las CDs, aumentando la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH-I) y clase II (CMH-II) y de moléculas coestimuladoras, principalmente B7.

Una vez en el tejido linfoide, la CD, ya madura, interactúa principalmente con las células Th (CD4+), debido a la alta expresión de moléculas CMH-II y de moléculas coestimuladoras. Los linfocitos CD4+ se decantarán hacia una respuesta Th1, que es la respuesta protectora, si se secretan cantidades suficientes de IL-12, que a su vez activa la secreción de IFN- γ y TNF-alfa, citoquinas cruciales para activar el macrófago infectado y hacerle capaz de destruir al parásito. Si, por el contrario, la respuesta se decanta hacia una respuesta Th2, se producen grandes cantidades de anticuerpos, que no solo no son protectores, sino que facilitan la fagocitosis del parásito por más macrófagos y, por tanto, la diseminación de la enfermedad. Además, la regulación hacia

la respuesta Th2, provoca la secreción de citoquinas como IL-10 y TGF- β , que inhiben la producción de IL-12 e IFN- γ y por tanto la producción de óxido nítrico (NO). Por otro lado, las CDs al ser capaces de procesar el antígeno tanto por la vía del CMH-I como por la vía del CMH -II, pueden activar a los linfocitos T CD8+. La capacidad que tiene de presentar un antígeno extracelular fagocitado mediante la vía del CMH -I y por tanto de activar a los linfocitos T CD8+, se conoce como presentación cruzada. Este mecanismo depende de una vía especial que permite translocar proteínas desde la luz del fagosoma hacia el citosol y que depende de la proteína chaperona Sec61. Esta acción presentadora también es interferida por el parásito a través de diversos mecanismos. Por ejemplo, *L.donovani* inhibe la presentación antigénica mediante la represión del gen del CMH -II, en su expresión basal y particularmente cuando hay estimulación por IFN- γ . *L.amazonensis* actúa interfiriendo en la unión del péptido a las moléculas de CMH -II o degradando las moléculas de CMH-II por medio de cisteín-proteasas. Otra vía de interferencia de la respuesta inmune es la inhibición de la expresión de moléculas de coestimulación (B7/CD28 y CD40/CD40L) que son necesarias para la activación correcta de los linfocitos T.

Si se favorece el desarrollo de una respuesta tipo 1, tiene lugar la activación y proliferación de los linfocitos T colaboradores (LTh1) y de los linfocitos T citotóxicos (LTc1), los cuales migran de regreso a la piel y allí interactúan con los macrófagos infectados. Los macrófagos, tras una apropiada activación mediante la secreción de IFN- γ por los LTh1, sirven como células efectoras matando al parásito intracelular, pues el IFN- γ los activa y estimula a producir óxido nítrico (NO) mediante la inducción de la sintasa inducible del NO (iNOS). Esta activación parece ser dependiente de la interacción entre CD40 y su ligando, CD40L. El IFN- γ también regula los niveles de expresión de receptores de superficie como el receptor de manosa y el CR3, que son los receptores que el macrófago utiliza para la internalización del parásito. Además, el TNF- α y la IL-12 sinergizan con el IFN- γ para activar la iNOS. El parásito responde inhibiendo la vía de señalización del IFN- γ (vía JAK/STAT) a través de diferentes mecanismos. La tirosina fosfatasa SHP-1 actúa mediante la defosforilación de diferentes quinasas de la cascada. Otra vía de regulación negativa es llevada a cabo por proteínas que pertenecen a las familias SOCS (supresor de señalización de citoquinas) y PIAS (proteína inhibidora de STAT activada). Las proteínas SOCS, cuya expresión es inducida por diferentes citoquinas, como el propio IFN- γ , pueden actuar en varios

puntos, a través de la inhibición directa de la JAK cinasa o al promover la poliubiquitinación y la degradación de las JAK mediadas por proteasomas. Las proteínas PIAS pueden formar complejos con las proteínas STAT que dan por resultado la disminución de la unión de STAT al DNA o al reclutamiento de correpresores transcripcionales que pueden bloquear la transcripción mediada por STAT.

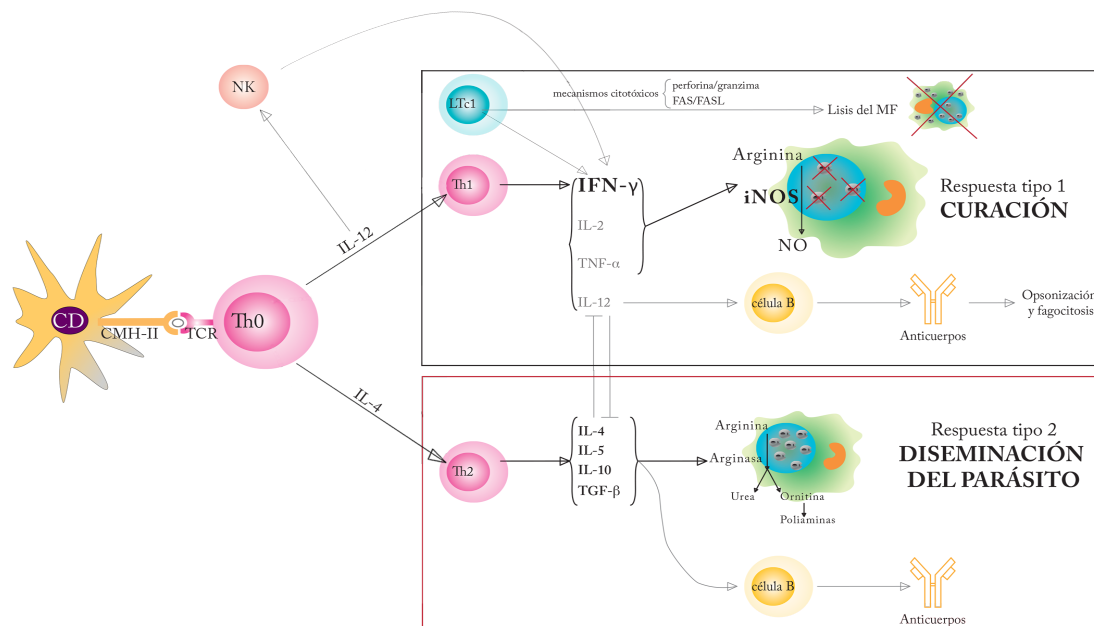


La participación de los LTc1 se da por dos mecanismos: por acción directa de los mecanismos citotóxicos, que lisan los macrófagos infectados a través de la vía de la perforina/granzima y/o del FAS/FASL, y por la producción de las citoquinas activadoras de macrófagos (TNF- α e IFN- γ) que favorecen la muerte de los parásitos intracelulares.

Esta respuesta Th1 del hospedador, que es la que generalmente lleva hacia la curación, intenta ser regulada por parte del parásito, provocando una reducción en la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α) y de las implicadas en la activación de linfocitos Th1 (IL-12), entre otras, así como induciendo la producción de citoquinas inmunosupresoras como el TGF- β , la IL-10 y la PGE2. El TGF- β inhibe la acción microbicida de los macrófagos y la producción de IFN- γ por las células NK. La IL-10 puede ser responsable de la supresión de la actividad microbicida de los macrófagos mediada por NO, de la disminución de la producción de IL-1, TNF- α e IL-12 y de la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras. La PGE2 inhibe la proliferación de los macrófagos, así como la producción de IL-1, TNF- α e IROs.

De esta manera, en ciertas ocasiones, por factores dependientes tanto del parásito como del hospedador, el primero es capaz de inducir una respuesta Th2, induciendo así la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10, que activan a los macrófagos por la vía alternativa mediante la inducción de la arginasa 1. Este enzima degrada la L-arginina en L-ornitina y urea; la L-ornitina es transformada por la ornitina descarboxilasa en putrescina, que es

una poliamina. Así, esta respuesta Th2 no sólo evita la muerte del parásito al disminuir la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO, sino que además le asegura la presencia de poliaminas, que son nutrientes esenciales para su crecimiento intracelular.



En ratones de experimentación, se ha demostrado que para que se desarrolle una respuesta protectora de tipo 1 frente a la infección por *L.major*, es necesario que las CDs internalicen a los amastigotes a través de los receptores FcγRI y FcγRIII. Esto induce la producción de IL-12 y la activación de células Th1/Tc1, que son necesarias para que los macrófagos destruyan de forma eficiente al parásito. Sin embargo, la internalización de *L.major* por los macrófagos a través de los receptores Fc induce la producción de la citoquina reguladora IL-10, lo que lleva a la persistencia del parásito. Por ello, el balance entre los mecanismos anti y pro-inflamatorios en los macrófagos y CDs inducidos por CR3 y FcγR es crítico en el desarrollo de la enfermedad. Las CDs activadas y las NK también tienen interacciones cooperativas importantes, que resultan en la activación celular, maduración celular y producción de citoquinas por ambos grupos celulares. Se cree que la activación de las CDs mieloides, mCDs, mediada por TLR-9, es la que se requiere para que se produzca la activación de las células NK y se desarrolle una respuesta protectora de tipo Th1 frente a *Leishmania*.

5.4 Influencia de la respuesta inmune en el cuadro clínico.

Las distintas manifestaciones clínicas con que puede presentarse la leishmaniasis en humanos dependen de la respuesta inmune generada, que a su vez depende de las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada, así como del perfil isoenzimático y de la especie de *Leishmania* responsable de la infección. Cada especie de *Leishmania* presenta diferente tropismo por determinadas partes del organismo infectado. Existen dos formas clínicas principales de leishmaniasis: leishmaniasis visceral (LV) y leishmaniasis cutánea (LC).

-Leishmaniasis visceral (LV)



Es la forma más grave de leishmaniasis y resulta de la replicación del parásito en macrófagos en el sistema fagocito mononuclear. El período de incubación es de 3 a 8 semanas, y los síntomas incluyen fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia e hipergammaglobulinemia. Usualmente tiene un curso crónico y puede llevar a la muerte si no se trata, o incluso con tratamiento. La muerte generalmente se debe a infecciones bacterianas secundarias en estados de la enfermedad avanzados. Puede existir hiperpigmentación de la piel, por lo cual se le conoce como enfermedad negra o “kala azar”. Es causada principalmente por *L.donovani* en el este de África y en la India, y por *L.infantum/chagasi* en Europa, norte de África y Latinoamérica.

Una variante de la LV es la leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL), que es causada por *L.donovani* “sensu estricto” en la India y en África. Aparece un tiempo después de un cuadro resuelto de LV y se caracteriza por complicaciones cutáneas como máculas, pápulas o nódulos que inician con una distribución peri-oral y luego se diseminan a otras áreas del cuerpo.

La respuesta inmune protectora depende de la activación de la respuesta Th1, a través de la producción de IL-12, con la consecuente producción de IFN- γ que induce la

destrucción del parásito por parte de los macrófagos a través de la producción de NO e IROs. Estudios de infecciones con especies de *Leishmania* que se asocian a LV muestran un desequilibrio en la producción de citoquinas en respuesta a la infección. Están aumentados los niveles de IL-10 y de TGF- β , de forma que queda bloqueada la respuesta Th1, y los niveles de IFN- γ y de IL-12 son muy bajos. Por tanto, está disminuida la proliferación y secreción de IFN- γ por los linfocitos, y los macrófagos no responden destruyendo al parásito. La baja proliferación de linfocitos y la ausencia de producción de IFN- γ son factores predictivos de la progresión de la enfermedad a una LV fulminante. A pesar de que los pacientes tienen respuestas negativas al test de Montenegro, tras un tratamiento efectivo, se ve una respuesta positiva al test, que indicaría una respuesta celular a la infección. Además, se ha observado *in vitro* una respuesta proliferativa vigorosa por parte de linfocitos de pacientes ya curados, y con una secreción elevada de IFN- γ y de IL-12. La curación de los pacientes va seguida de una fuerte inmunidad protectora.

-Leishmaniasis cutánea (LC)

Es la forma más común y se debe a la replicación de macrófagos infectados en la dermis. La respuesta inmune frente a la LC se caracteriza por ser de tipo celular, pero con una importante participación de la inmunidad humoral. Esta respuesta inmune celular puede ser evidenciada clínicamente mediante la prueba cutánea de Montenegro. Existen tres formas clínicas principales de LC, que dependen de la respuesta inmunológica.



La leishmaniasis mucocutánea (LMC) se caracteriza por una respuesta de tipo Th1 excesiva (respuesta hipérgica), evidenciada por una prueba de Montenegro intensamente positiva. La presencia de parásitos en la lesión es escasa, y hay predominio de células T CD4+ sobre las CD8+. En esta manifestación, la respuesta Th1 es mucho mayor que en la forma cutánea localizada de la enfermedad, lo que justifica las concentraciones más elevadas de IFN- γ y de IL-2 que se observan *in situ* en los pacientes con LMC. Es una afección de las selvas tropicales amazónicas también conocida como “espundia” que cursa con una

inflamación granulomatosa de la mucosa de la nariz, cavidad oral y faringe. Estas lesiones causan dificultad para comer, además de aumentar el riesgo de infecciones secundarias que pueden llevar a la muerte. Las lesiones de las mucosas pueden aparecer simultáneamente con un cuadro de LC; sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan después. El período de incubación suele ser de 1 a 3 meses, aunque pueden transcurrir años desde que la lesión cutánea ha cicatrizado. Las especies más frecuentemente asociadas pertenecen al subgénero *Vianna*, y se localizan en Sudamérica: *L.(V) braziliensis*, *L.(V) amazonensis*, *L.(V) panamensis*, y *L.(V) guyanensis*.

En el polo anérgico de la respuesta inmune se encuentra la LC difusa (LCD). Aparecen lesiones nodulares diseminadas cargadas de parásitos que se extienden por toda la piel por una respuesta inmune celular muy pobre. Hay predominio de células T CD8+, mayor respuesta Th2 y una prueba de Montenegro negativa. Ocurre con mayor frecuencia con especies del complejo *L.mexicana* y con *L.aethiopica*.



En el centro del espectro, se encuentra la LC localizada (LCL), en la que hay un mayor número de linfocitos T CD8+ que de linfocitos T CD4+; sin embargo, ambos tipos están aumentados. La respuesta Th1 es mayor que la Th2, pero es más controlada que en el caso de la LMC. La prueba de Montenegro es positiva. Se caracteriza por la aparición de una o múltiples pápulas que aumentan de tamaño en áreas expuestas y suelen ulcerar. Típicamente cursan con linfadenopatía y lesiones satélites. El período de incubación oscila entre 2 a 6 semanas y la curación de la lesión puede tardar entre 3 y 18 meses en más del 90 % de los casos. Las principales especies asociadas a esta manifestación clínica son *L.mexicana*, *L.(Viannia) braziliensis*, o *L.panamensis* en Sudamérica, y *L.major* o *L.tropica* en los otros países.

6. CONCLUSIONES

- Las moléculas de superficie del parásito juegan un papel importante en su supervivencia y en la modulación de la Respuesta Inmune del hospedador.
- El proceso de autoapoptosis en el vector es un proceso de selección positiva de los parásitos más aptos para consolidar la infección.
- El parásito promueve su fagocitosis, secretando sustancias quimiotácticas, y favoreciendo la instauración de un proceso inflamatorio.
- Como las células del hospedador, el parásito también cuenta con mecanismos de inhibición del CAM.
- El parásito inhibe los mecanismos de eliminación de patógenos en las células fagocíticas e interfiere en la presentación antigénica.
- Una respuesta inmune distinta (Th1, Th2), lleva a manifestaciones clínicas diferentes (LV, LMC, LCL, LCD).

7. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA MÁS RELEVANTE

1. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, TacchiniCottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010: 1-8
2. David, C. V. and Craft, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 2009 Nov; 22: 491–502.
3. Diaz, Nilka L; Zerpa, Olga; Tapia, Félix J. Expresión de TLR2, 4, 9 y presencia de células tipo NK CD56 positivas en lesiones de pacientes con diferentes formas de clínicas de leishmaniasis cutánea americana. *Bol Mal Salud Amb, Maracay*, 2014 Jun; 54 (1): 20-28
4. El-Hani CN, Borges VM, Wanderley JLM, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012; 2:96.
5. Hernández-Ruiz J, Becker I. CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. *Salud Publica Mex* 2006; 48: 430-9.
6. Nogueira MF, Goto H, Sotto MN, Cucé LC. Cytokine profile in Montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008 Nov-Dec;50 (6):333-7.
7. Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005 Apr;18 (2):293-305
8. Phillip Scott, Ph.D. Leishmania - A Parasitized Parasite. *N Engl J Med*, 2011 May; 364:1773-1774
9. Pisopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad Méd J* 2006; 82: 649-57.
10. Soong L. Modulation of Dendritic cell function by Leishmania parasites. *J Immunol*. 2008 Apr 1;180 (7):4355-60.
11. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Nov;51(2):229-42.
12. Von Stebut E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Exp Dermatol*. 2007 Apr; 16 (4):340-6.
13. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007 Mar-Apr;17 (2):115-22.
14. Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. *Cell Mol Life Sci*. 2010 May; 67(10):1653-9.
15. Yuil, J. M. R., & Sousa, O. Inmunología en la infección por Leishmania: conceptos actuales. *Rev méd cient* 2010; 23 (1): 11-23