

INMUNOLOGÍA EN LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA: CONCEPTOS ACTUALES

IMMUNOLOGY IN LEISHMANIA INFECTION: CURRENT CONCEPTS

Ríos Yuil, José Manuel*; Sousa, Octavio[†]

*Médico Residente de Dermatología del Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Caja de Seguro Social.
Ciudad de Panamá, República de Panamá.

[†]Profesor Titular de la Sección de Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá y Director del Centro de Investigación y Diagnóstico de Enfermedades Parasitarias
Ciudad de Panamá, República de Panamá.

Recibido: 28 de octubre de 2010

Aceptado: 29 de junio de 2011

Ríos JM, Sousa O. Inmunología en la infección por Leishmania: conceptos actuales. Rev méd cient. 2010;23(1):19-31.

RESUMEN

La leishmaniasis es la enfermedad producida por parásitos del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*. Aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por *Leishmania* y alrededor de 350 millones viven en zonas de riesgo. El parásito puede existir en dos estadios morfológicos: el amastigote y el promastigote. Los amastigotes viven en vacuolas en el interior de células del hospedero principalmente en los monocitos y macrófagos. Los vectores de *Leishmania* pertenecen a los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). Al picar al ser humano, inyectan los promastigotes metacíclicos (forma infectante para el humano). Las principales moléculas de superficie del parásito son el lipofosfoglicano, la glicoproteína 63 y el fosfolípido de glicosilinositol. Existen dos formas clínicas principales de Leishmaniasis: cutánea (localizada, difusa y mucocutánea) y visceral. Múltiples componentes de las respuestas inmunes innata y adaptativa participan en la defensa del hospedero contra la *Leishmania*. La interacción del parásito con el sistema inmune es muy compleja y determina en gran manera la forma clínica de la enfermedad. La leishmaniasis mucocutánea (polo hiperérgico) y la leishmaniasis cutánea difusa (polo anérgico) son las manifestaciones polares de un espectro de manifestaciones clínicas que dependen de la respuesta inmunológica frente al parásito. En el centro del espectro se encuentra la leishmaniasis cutánea localizada. La *Leishmania* ha desarrollado numerosas estrategias para poder evadir la respuesta inmune, tales como la inhibición de la función de los macrófagos y la alteración de las vías de señalización intracelular.

Palabras clave: Leishmaniasis, glicoproteína gp63, evasión inmune.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the Kinetoplastid order, Trypanosomatidae family and *Leishmania* genus. Approximately 12 million people are infected with *Leishmania* and around 350 million live at risk zones. The parasite can exist in two morphological stages: the amastigote and the promastigote. The amastigotes live in intracellular vacuoles mainly in monocytes and macrophages. The *Leishmania* vectors belong to the *Phlebotomus* genus (Old World) and to the *Lutzomyia* genus (New World). When the vectors bite human beings, they inject the metacyclic promastigotes (infective form for humans). The main parasite surface molecules are lipophosphoglycan, glycoprotein 63 and glycosylinositol phospholipid. There are two main clinical forms of Leishmaniasis: cutaneous (localized, diffuse and mucocutaneous) and visceral. Multiple components of the innate and adaptive immune responses participate in the host's defense against *Leishmania*. The interaction between the parasite and the immune system is very complex and determines the clinical expression of the disease. Mucocutaneous leishmaniasis (hyperergic pole) and diffuse cutaneous leishmaniasis (anergic pole) are the polar manifestations of a spectrum of clinical manifestations that depend on the immune response against the parasite. Localized cutaneous leishmaniasis is in the center of the spectrum. *Leishmania* has developed numerous strategies to evade the immune response including the inhibition of macrophage function and the alteration of the intracellular signaling pathways.

Keywords: Leishmaniasis, glycoprotein gp63, immune evasion.



INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es la enfermedad producida por parásitos del género *Leishmania*. William Leishman y Charles Donovan fueron los primeros en demostrar la presencia del parásito en el bazo de un grupo de pacientes que se pensaba sufrían una enfermedad similar a la malaria y que posteriormente fue conocida como leishmaniasis visceral. Ellos hicieron este descubrimiento simultáneamente pero independientemente en 1903. Por esto, la especie descubierta fue denominada *Leishmania donovani* en honor a ellos.¹

La leishmaniasis es endémica en más de sesenta países incluyendo América Central, América del Sur, India, el Oriente Medio, el Norte de África y el Sur de Europa. Sin embargo, el 90 % de los casos de Leishmaniasis cutánea se presenta en 8 países: Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú. Por otra parte, el mayor número de casos de Leishmaniasis visceral se encuentra en India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil.²

Se estima que aproximadamente 12 millones de personas se encuentran infectadas por *Leishmania* y cada año se reportan alrededor de 2 millones de nuevos infectados. Aproximadamente, 350 millones de personas viven en zonas de riesgo.³

El tratamiento de la Leishmaniasis no es fácil y está limitado a unos cuantos medicamentos que no siempre son eficaces y se asocian a importantes efectos adversos. Se cree que en algunos casos que muestran curación clínica, el parásito no ha sido eliminado totalmente del cuerpo. Pero, ¿por qué la *Leishmania* es tan difícil de tratar? La respuesta probablemente está en las complejas interacciones que se dan entre el parásito y el sistema inmune del ser humano. El objetivo de esta revisión es analizar estas interacciones haciendo énfasis en los mecanismos que la *Leishmania* utiliza para evadir la respuesta inmunitaria.

GENERALIDADES DEL PARÁSITO

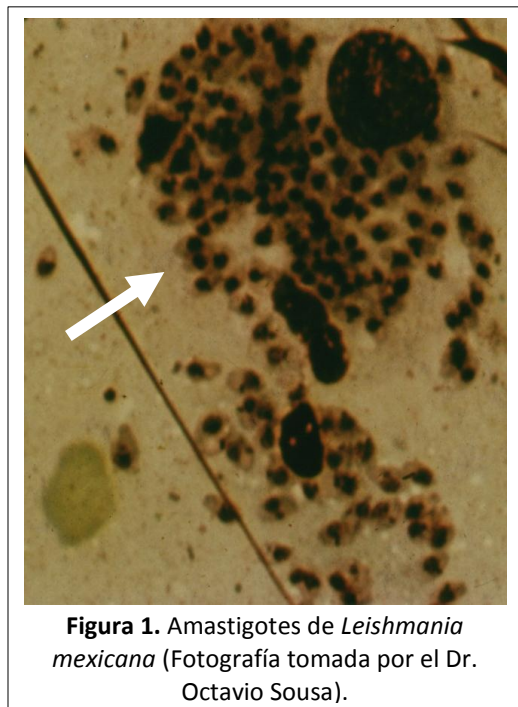
Taxonomía

La Leishmaniasis es causada por parásitos intracelulares del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y del género *Leishmania*. Su taxonomía es compleja y ha evolucionado a lo largo de los años. En el pasado, eran clasificadas según la localización geográfica y el aspecto clínico que producía la enfermedad. En la actualidad, las agrupaciones taxonómicas se basan en características bioquímicas y moleculares, por lo que ya no coinciden con los patrones clínicos específicos de la enfermedad. De esta manera, el género *Leishmania* se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*. Cada subgénero se divide en complejos. En el subgénero *Viannia* existen dos complejos: *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. En el complejo de la *L. braziliensis*, se encuentran las siguientes especies: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiense*, *L. lainsoni*, *L. shawi* y *L. naiffi*. En el complejo de la *L. guyanensis* se encuentran: *L. guyanensis* y *L. panamensis*. Además, en el subgénero *Viannia* existen dos especies híbridas: *L. braziliensis/L. panamensis* y *L. braziliensis/L. guyanensis*. En el subgénero *Leishmania* se encuentran cinco complejos: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. donovani* y *L. mexicana*. Los complejos de *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* están formados por una sola especie que le da nombre a su respectivo complejo. El complejo *L. donovani* está formado por 3 especies: *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. El complejo *L. mexicana* está formado por *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi*.⁴

Ciclo de Vida

El parásito puede existir en dos estadios morfológicos: el amastigote y el promastigote. El amastigote tiene forma redondeada, no tiene flagelo ni membrana ondulante, mide de 3 a 7

micras y es la forma intracelular que reside dentro de los macrófagos del hospedero (Ver Figura 1). El promastigote es la forma elongada y flagelada del parásito y mide de 10 a 20 micras. El cinetoplasto del promastigote se encuentra en la parte anterior de la célula por lo que el flagelo emerge directamente a ese nivel y no presenta membrana ondulante. Esta es la forma que reside en el vector.^{1,5}



Los amastigotes viven en vacuolas en el interior de células del hospedero principalmente en los monocitos y macrófagos. El vector se infecta cuando pica al ser humano parasitado. Los vectores de *Leishmania* pertenecen a la clase Insecta, orden Diptera, familia Psychosidae y sub-familia Phlebotominae, géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. En el Viejo Mundo, la leishmaniasis es transmitida por la picadura de miembros del género *Phlebotomus*; mientras que en el Nuevo Mundo es transmitida por la picadura de insectos del género *Lutzomyia*. El vector ingiere sangre humana con los macrófagos cargados de *Leishmania*. En el intestino medio del vector, el parásito sale de los macrófagos y se transforma en el promastigote procíclico que es

la forma extracelular que se divide activamente y que se encuentra adherida a la pared intestinal. Posteriormente, se transforma en el promastigote metacíclico que es la forma que no se multiplica ni se adhiere a la pared del intestino. De esta manera, es arrastrado hacia las piezas bucales del insecto. El insecto entonces se vuelve infectante para la próxima persona que sea picada. Este proceso demora entre 4 a 7 días, período que coincide con el tiempo aproximado en el cual el insecto necesita volver a alimentarse. Al picar al ser humano, le inyecta los promastigotes metacíclicos que rápidamente invaden a los macrófagos residentes y se transforman en amastigotes intracelulares. De esta manera, el ciclo continúa.¹⁻⁵

Principales moléculas de superficie

Los promastigotes procíclicos están cubiertos por un glicocáliz grueso de 7 nm de espesor. El glicocáliz de los promastigotes metacíclicos es aún más grueso con aproximadamente 17 nm de espesor; sin embargo, los amastigotes prácticamente no tienen glicocáliz. El glicocáliz está compuesto por glicoproteínas y otras sustancias glicosiladas que se encuentran ancladas a la membrana celular por una unión de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Una de las moléculas más importantes de la superficie de los promastigotes es el lipofosfoglicano (LPG). La estructura de LPG varía según las especies de *Leishmania* pero básicamente está compuesto por unidades repetitivas de un disacárido y un fosfato unidos a la membrana por el ancla de GPI. Las variaciones en las cadenas laterales que se unen a la estructura central de LPG son importantes entre las distintas especies de *Leishmania*. La *L. major* tiene una estructura altamente ramificada; mientras que el LPG de *L. donovani* prácticamente no tiene ramificaciones. El LPG juega un papel importante en la supervivencia del parásito y en la modulación de la respuesta inmunológica del hospedero.⁶

La glicoproteína 63 (gp63) o Leishmanolisina o proteasa mayor de superficie es una proteinasa de

superficie de 63 kDa. Se expresa en grandes cantidades (más de 500 mil copias) y está distribuida en todo el cuerpo del promastigote incluyendo el flagelo.⁷ A pesar de esto, es 10 veces menos frecuente que el LPG. La gp63 es una metaloproteínasa de zinc con un amplio rango de sustratos tales como caseína, gelatina, albúmina, hemoglobina y fibrinógeno.⁶ La gp63 se relaciona con la entrada del parásito al macrófago y favorece la fagocitosis y la sobrevivencia del amastigote dentro del macrófago. También, afecta la función del complemento aumentando la resistencia del parásito a la lisis mediada por complemento.⁷

La molécula más abundante en la superficie de los promastigotes es el fosfolípido de glicosilinositol (GIPL), un tipo de glicolípido con un ancla de GPI. El GIPL es 10 veces más abundante que el LPG; sin embargo, su tamaño pequeño lo mantiene cerca de la membrana celular y cubierto por las moléculas de LPG. Se cree que tiene un rol protector en la superficie del promastigote.⁶

FORMAS CLÍNICAS DE LA LEISHMANIASIS

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen de las propiedades del hospedero y de las propiedades del parásito. En el caso del parásito es importante la especie de *Leishmania* y su perfil isoenzimático. Existen dos formas clínicas principales de Leishmaniasis:

Leishmaniasis visceral (LV)

Se caracteriza por la aparición de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia e hipergammaglobulinemia entre 3 a 8 meses después de la picada del vector infectado. Puede existir hiperpigmentación de la piel por lo cual se le conoce como enfermedad negra o “kala azar”. Usualmente tiene un curso crónico y puede llevar a la muerte, generalmente por infecciones secundarias. Es causada principalmente por *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*; sin embargo, *L.*

amazonensis y *L. tropica* también la pueden producir.

Una variante es la leishmaniasis post-kala azar que es causada por *L. donovani* sensu stricto en la India y en África. Aparece un tiempo después de un cuadro resuelto de leishmaniasis visceral y se caracteriza por máculas, pápulas o nódulos que inician en una distribución peri-oral y luego se diseminan a otras áreas del cuerpo.²

Leishmaniasis cutánea (LC)

Existen tres formas clínicas principales de LC: LC localizada (LCL), LC difusa (LCD) y Leishmaniasis mucocutánea (LMC).

La LCL se caracteriza por la aparición de una o múltiples pápulas que aumentan de tamaño en áreas expuestas. Estas lesiones típicamente se ulceran (Ver Figura 2). Las lesiones se localizan principalmente en las extremidades inferiores. Típicamente cursan con linfadenopatía y lesiones satélites.¹ La lesión puede demorar entre 3 y 18 meses para curar en más del 90 % de los casos.² El período de incubación oscila entre 2 a 6 semanas. Las principales especies causales son miembros de los complejos *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major*.¹ Una variante de la LCL es la leishmaniasis recidivans, que se caracteriza por la aparición de lesiones tuberculoideas alrededor de las cicatrices de úlceras cutáneas curadas. Las lesiones tienen una cuenta baja de parásitos en la biopsia y tienden a ser rebeldes al tratamiento.²

La LCD es una forma anérgica de la enfermedad en la que ocurre diseminación de lesiones nodulares cargadas en parásitos en toda la piel. Raras veces afecta la cara, manos y pies. Ocurre con mayor frecuencia con especies del complejo *L. mexicana* y con *L. aethiopica*.²



Figura 2. Úlcera de Leishmaniasis cutánea localizada (Fotografía tomada por el Dr. José Manuel Ríos Yuil).

La LMC también se conoce como espundia y se caracteriza por inflamación granulomatosa de la mucosa de la nariz, cavidad oral y faringe. Puede existir destrucción del tabique nasal produciendo nariz de tapir y además la inflamación del paladar genera el signo conocido como la “cruz palatina de Escomel”. Las lesiones mucosas pueden aparecer simultáneamente con un cuadro de LC; sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan después. Inclusive pueden transcurrir años desde que la lesión cutánea ha cicatrizado. El período de incubación más frecuente es de 1 a 3 meses. Las especies más frecuentemente asociadas son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. amazonensis*.²

INMUNOLOGÍA CONTRA LA LEISHMANIASIS: EL MODELO DE LEISHMANIA MAJOR

La interacción de la *Leishmania* y el sistema inmune es muy compleja y varía según la especie de *Leishmania* y según las características del hospedero. La infección por *Leishmania major* es una de las más estudiadas y esta puede llegar eventualmente a generar una respuesta inmune protectora contra subsecuentes infecciones por la

misma especie; sin embargo, esto no ocurre con todas las especies de *Leishmania*.^{6, 8-9}

La interacción con el sistema inmunitario comienza desde el momento de la picadura del insecto. La introducción de las piezas bucales lacera los vasos sanguíneos de la unión dermo-epidérmica. Además, el insecto inyecta sustancias vasodilatadoras y la enzima hialuronidasa provocando la formación de una pequeña “piscina de sangre” con la que se alimenta. Inmediatamente, el sistema inmune innato interviene para detener este proceso mediante la activación del complemento, la liberación de cininas que producen vasoconstricción, la activación de la coagulación que produce trombosis de los vasos lacerados y la llegada de macrófagos residentes y de neutrófilos sanguíneos al sitio de la lesión. Esto en teoría podría limitar la capacidad del insecto para alimentarse y para transmitir la leishmaniasis. Sin embargo, la saliva del insecto contiene potentes sustancias vasodilatadoras: maxadilan (*Lutzomyia*) o adenosina (*Phlebotomus*), antiagregantes plaquetarios, apirasa y sustancias estimuladoras de la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂). Estos mecanismos utilizados por el insecto para favorecer su alimentación reducen la inflamación y facilitan la transmisión de la *Leishmania*. De hecho, en un estudio se demostró que las lesiones de ratones inoculados con promastigotes de *L. major* y saliva de flebótomo crecieron más grandes y más rápido que las lesiones de ratones inoculados exclusivamente con promastigotes de *L. major*.⁵

Una vez inoculados los promastigotes, se da la activación de la cascada del complemento que lisa aproximadamente al 90 % de los promastigotes metacíclicos inyectados; sin embargo, hay un 10 % que sobrevive. Esto ocurre porque el promastigote metacíclico es más resistente a la lisis por complemento que el promastigote procíclico debido a su grueso glicocálix. También, el parásito contiene cinasas que fosforilan a C3, C5 y C9 provocando su inactivación. Además, el LPG y la gp63 favorecen la

unión de C3bi a la superficie del parásito. De esta manera el parásito favorece su propia opsonización y posterior fagocitosis mediada por los receptores de complemento (CR). A su vez, la activación de complemento ha favorecido la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a que son potentes agentes quimiotácticos para neutrófilos (PMN) y monocitos.³ Además, se ha demostrado in vitro que *L. major* secreta un factor que es quimiotáctico para PMN denominado factor quimiotáctico de *Leishmania* (LCF).⁸ También los mastocitos juegan un papel importante en esta respuesta de quimioatracción de PMN. En presencia del parásito, los mastocitos liberan sus gránulos de TNF- α que es quimiotáctico para los PMN.⁹

A pesar de esta gran liberación de sustancias quimiotácticas, las primeras células en infectarse son las que ya están en el sitio al momento de darse la inoculación. Es por esto que los macrófagos residentes son los primeros en verse afectados. Estos fagocitan los parásitos que resistieron la lisis por complemento mediante el receptor CD11b/CD18 y mediante el receptor de manosa-fucosa que se une a los residuos de manosa del LPG.^{6,9} El LPG también puede interactuar con la proteína C reactiva y favorecer la fagocitosis a través del receptor de dicha proteína. Este mecanismo no provoca la activación del macrófago.⁶ La entrada por el receptor CD11b/CD18 es una ventaja para el parásito porque, a pesar de que los macrófagos son potentes células presentadoras de antígenos (CPA), la entrada a través de este receptor no provoca la activación del macrófago.³ Una vez en el interior del macrófago, los parásitos se transforman en amastigotes, inhiben además la producción de IL-12 por el macrófago y se dividen activamente. Eventualmente abandonan el macrófago para entrar en otro. Hasta este momento la infección no muestra ninguna manifestación clínicamente detectable.⁹

Los primeros fagocitos sanguíneos en llegar al sitio de la inoculación, en cuestión de horas, son los

PMN. Ellos fagocitan el parásito pero no son la célula hospedera definitiva del mismo. Además, liberan IL-8 favoreciendo la llegada de un mayor número de PMN⁸ y liberan quimiocinas como MIP-1 α/β y MIP-2 que atraen a los monocitos al sitio de inoculación.⁹ El PMN actúa entonces como una especie de “altavoz celular y molecular” que propaga la noticia de la infección a través de la sangre.

Dentro de los PMN, el parásito ha evolucionado para sobrevivir. Esto lo hace al evitar que se produzca el estallido respiratorio y al colocarse en el interior de los compartimientos no líticos de la célula. Otro aspecto a destacar, es que normalmente los PMN tienen un período de vida corto y mueren rápidamente por apoptosis; sin embargo, el parásito es capaz de retrasar la apoptosis de los PMN incluso hasta varios días. Por otro lado, en un estudio in vitro se demostró que el parásito puede acelerar la apoptosis de los PMN cuando son cultivados en presencia de macrófagos, probablemente a través de la interacción con la forma transmembrana del factor de necrosis tumoral (mTNF) de los macrófagos. De esta manera, el PMN es utilizado por el parásito como un refugio contra la lisis mediada por complemento hasta el momento en que ha llegado una buena provisión de monocitos/macrófagos, los cuales son las células hospederas definitivas, al sitio de la inoculación. Una vez presentes los macrófagos, se favorece la apoptosis de los PMN. Normalmente, la fagocitosis de PMN apoptóticos por parte de los macrófagos no genera una respuesta inflamatoria. De esta forma, el parásito utiliza a los PMN como un “caballo de Troya” para entrar a los macrófagos sin despertar una respuesta microbicida. Otro estudio sostiene que el PMN infectado no es fagocitado sino que libera al parásito para que éste penetre en el macrófago.⁸

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

leishmaniasis), 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 provocaba 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.^{8,10}

La llegada de las células dendríticas al sitio de inflamación marca el inicio de la respuesta adaptativa a la infección por *Leishmania*. Aproximadamente 6 semanas después de la inoculación, el número de células dendríticas que contienen CD11c en su membrana aumenta al igual que el número de células dendríticas parasitadas. La llegada de las células dendríticas se ha relacionado con el aumento de las concentraciones de IL-12, la migración de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ al compartimiento cutáneo, la muerte del parásito y la involución de la lesión clínica.⁹

Las primeras interacciones de las células dendríticas con los parásitos se dan a través de los receptores "Toll-like" (TLR). Todos los TLR, con excepción del TLR-3, señalizan a través de la proteína adaptadora MyD88, que es codificada por el gen de respuesta de diferenciación primaria mieloide. Estudios con ratones a los que se les ha suprimido el gen que sintetiza MyD88 han demostrado que la señalización a través de los TLR es un componente esencial de la respuesta inmune frente a *Leishmania*. De hecho, el TLR-4 y MyD88 contribuyen al control de la infección por *L. major* en ratones C57BL/6. Las células dendríticas de ratones que no poseen la proteína MyD88 se activan poco y producen menos IL-12p40 al ser infectadas por *L. braziliensis*. Esto se traduce clínicamente en lesiones más grandes y crónicas. En contraste, las células dendríticas que carecían de TLR-2 mostraban una activación más fuerte y mayor producción de IL-12 cuando entraban en contacto con el parásito. De esta manera, eran muy

eficientes para activar las células T CD4+ lo cual quedó evidenciado por los altos niveles de interferón gamma (IFN- γ) y por una mayor resistencia a la infección. De estos resultados se puede inferir que MyD88 es indispensable para generar una respuesta inmune contra el parásito; mientras que el rol del TLR-2 es regulador. Adicionalmente, los TLR también son importantes para la activación de las células NK (TLR9) y son necesarios para que el macrófago pueda destruir los amastigotes de *L. donovani* ante la estimulación con IFN- γ (TLR-2 y TLR-3).¹¹

Las células dendríticas también fagocitan los parásitos para realizar la presentación antigénica. Ellas fagocitan primordialmente amastigotes a través de un receptor distinto al utilizado por los macrófagos. Las células dendríticas utilizan los receptores CD16 y CD64. Esta fagocitosis favorece la activación de las células dendríticas y aumenta la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II) y de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas son las únicas células con capacidad de procesar el antígeno tanto por la vía del MHC-I como por la vía del MHC-II. Por esta razón, al migrar a los ganglios linfáticos pueden activar a los linfocitos T CD4+ y a los linfocitos T CD8+. En contraste, los macrófagos infectados sólo expresan bajas concentraciones de MHC-II y de moléculas coestimuladoras. Como se ha mencionado antes, esta diferencia en la capacidad para presentar antígenos entre las células dendríticas y los macrófagos podría ser explicada por el tipo de receptores que mediaron la fagocitosis de la *Leishmania* en cada tipo de CPA.⁹ Por otro lado, se ha considerado que la capacidad de la célula dendrítica de presentar un antígeno extracelular fagocitado mediante la vía del MHC-I depende de una vía especial que permite la translocación de proteínas desde la luz del fagosoma hacia el citosol y que depende de la proteína chaperona Sec61. A este mecanismo se le denomina transpresentación

antigénica y hace posible que las células dendríticas puedan activar a los linfocitos T CD8+. ¹²

Estudios in vitro han demostrado que las células dendríticas mieloides (mDC) y no las células de Langerhans pueden fagocitar promastigotes. Tanto las células dendríticas dérmicas como las células de Langerhans epidérmicas pueden migrar a los ganglios linfáticos, pero tienen diferentes capacidades para fagocitar promastigotes. Se considera que en la infección por *L. major*, las células dendríticas dérmicas son las principales transportadoras de antígenos del parásito al ganglio linfático debido a que su capacidad para fagocitar promastigotes es superior. ¹⁰ Una vez en el ganglio, las células dendríticas maduras activan a los linfocitos T y los estimulan para generar una respuesta tipo 1 mediante la secreción de grandes cantidades de IL-12. Además, la IL-1, IL-23 e IL-27 también contribuyen al desarrollo de la respuesta tipo 1. De esta manera se da la activación y proliferación de los linfocitos T colaboradores (LTh1) y de los linfocitos T citotóxicos (LTc1). ⁹

Los linfocitos Th1/Tc1 activados migran de regreso a la piel y allí interactúan con los macrófagos infectados. La secreción IFN- γ por los LTh1 activa a los macrófagos parasitados y los estimula a producir óxido nítrico (NO) mediante la inducción de la sintetasa inducible del NO (iNOS). Esta activación parece ser dependiente de la interacción entre CD40 y su ligando (CD154). El IFN- γ también regula los niveles de expresión de receptores de superficie como el receptor de manosa y el receptor CD11b/CD18 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. ¹³ La participación de los LTc1 se da por dos mecanismos: por acción directa de los mecanismos citotóxicos y por la producción de las citocinas activadoras de macrófagos (TNF- α e IFN- γ) que favorecen la muerte de los parásitos intracelulares. Los mecanismos citotóxicos de los LTc provocan la lisis

de los macrófagos infectados a través de la vía de la perforina/granzima o del CD95/CD95L o de ambas. ¹²

Es importante destacar que la respuesta tipo 1 es la que lleva hacia la curación. Si se induce una respuesta tipo 2, las citocinas secretadas por los linfocitos Th2 (IL-4, IL-10) activan a la arginasa 1 en los macrófagos con la consecuente degradación de la L-arginina en L-ornitina y urea. ¹⁴ La L-ornitina es transformada por la ornitina descarboxilasa en putrescina, una poliamina. Esto reduce la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO y aumenta la concentración de poliaminas, que son nutrientes esenciales para el crecimiento intracelular del parásito. Esto quiere decir que la respuesta Th2 no sólo está evitando la muerte del parásito sino que le asegura nutrientes para favorecer su crecimiento. ¹⁵

Los linfocitos T no son las únicas células que interactúan con las células dendríticas. Las células dendríticas activadas y las células asesinas naturales (NK) también tienen interacciones cooperativas importantes. La interacción entre las células dendríticas y las células NK resulta en la activación celular, maduración celular y producción de citocinas por ambos grupos celulares. Esto constituye otro puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. En un estudio se demostró que la adición de células NK a un cultivo de células dendríticas pre-infectadas con promastigotes de *L. amazonensis* promovió su activación y que estas células dendríticas activadas a su vez estimulan a las células NK principalmente a través de mecanismos de contacto celular. El IFN- γ producido por las células NK es también un componente importante de la respuesta inmune frente a *Leishmania*. ¹⁶

INFLUENCIA DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL CUADRO CLÍNICO

La respuesta inmune efectiva frente a la leishmaniasis cutánea se caracteriza por ser mediada por células, pero con participación de la inmunidad humoral. Esta respuesta inmune celular

puede ser evidenciada clínicamente mediante la prueba cutánea de Montenegro.¹⁷

La interacción entre el parásito y el sistema inmune del hospedero determina en gran manera la forma clínica de la enfermedad. De hecho, la leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis cutánea difusa han sido consideradas como las manifestaciones polares de un espectro de manifestaciones clínicas que dependen de la respuesta inmunológica frente al parásito. Esto, es muy similar a lo que ocurre con la enfermedad de Hansen.¹⁸

En el polo hiperérgico de la respuesta inmunológica se encuentra la LMC que se caracteriza por la presencia de escasos parásitos en la lesión, por un predominio de células T CD4+ sobre las CD8+, por una respuesta predominantemente Th1 y por una prueba de Montenegro intensamente positiva.¹⁸ En esta manifestación, la respuesta Th1 es mucho mayor que en la forma cutánea localizada de la enfermedad. Esto queda evidenciado por las concentraciones más elevadas de INF- γ y de IL-2 que se observan in situ en los pacientes con LMC.¹⁶ Los parásitos más relacionados con la respuesta hiperérgica son *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y la *L. (V.) peruviana*.¹⁸

En el polo anérgico se encuentra la LCD en la que hay gran cantidad de parásitos en las lesiones, predominio de células T CD8+, mayor respuesta Th2 y una prueba de Montenegro negativa. Los parásitos más relacionados con esta forma clínica son *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) pifanoi*.¹⁸

En el centro del espectro, se encuentra la 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. Además existen dos formas denominadas leishmaniasis cutánea diseminada borderline. Una es causada por *L. (V.) braziliensis* y representa un punto medio

entre la LCL y la LMC. La otra es causada por *L. (L.) amazonensis* y representa un punto medio entre la LCL y la LCD.¹⁸

MECANISMOS UTILIZADOS POR *LEISHMANIA* PARA EVADIR EL SISTEMA INMUNE

Anteriormente se mencionaron las múltiples estrategias que el sistema inmune utiliza para eliminar la infección por *Leishmania major*; sin embargo, esto no es igual en otras especies de *Leishmania*. Las diferentes especies de *Leishmania* utilizan diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune y unas lo hacen en mayor o en menor grado. Inclusive, *L. major*, en la que eventualmente se establece una buena respuesta inmunológica, tiene numerosos mecanismos para burlar al sistema inmune. A continuación, se mencionarán los principales:

a) Inhibición de las funciones del macrófago: normalmente, luego de la fagocitosis ocurre la fusión del endosoma con el lisosoma con la consecuente degradación del elemento fagocitado. Como los promastigotes de *Leishmania* son más vulnerables que los amastigotes a la degradación en el medio ácido e hidrolítico del lisosoma, el parásito ha desarrollado estrategias dirigidas a retrasar la fusión del endosoma y el lisosoma para tener suficiente tiempo para transformarse en amastigote. Este mecanismo parece ser dependiente del LPG que aparentemente media un cambio en la forma de las membranas llevando a la repulsión estérica entre el fagosoma y el lisosoma. Pero el parásito va más allá, luego de la fusión con el lisosoma puede neutralizar varias enzimas hidrolíticas mediante la actividad de la proteasa gp63 que actúa óptimamente en pH ácido.^{6,19} El LPG también podría proteger contra las enzimas lisosómicas debido a su carga intensamente negativa y a las unidades repetidas de galactosa-manosa. Además, dos moléculas de *Leishmania* denominadas peroxidoxinas (LcPxn1 y LcPxn2) y una superóxido dismutasa, aparentemente tienen la

capacidad de neutralizar las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. El parásito a su vez reduce la producción de estas especies reactivas por parte del macrófago.⁶

El parásito también limita la capacidad de los macrófagos de presentar antígenos. *L. donovani* inhibe la presentación antigénica mediante la represión del gen del MHC-II, tanto en su expresión basal y particularmente cuando hay estimulación por IFN- γ . *L. amazonensis* no disminuye la expresión del gen de MHC-II sino que interfiere con la unión del antígeno a las moléculas de MHC-II. *L. amazonensis* también endocitan las moléculas MHC-II y las degrada utilizando una cisteína proteasa. También se afecta la expresión de moléculas de coestimulación en el macrófago evitando que se den las señales de coestimulación (CD80/CD28 y CD40/CD154) que son tan necesarias para la eliminación del parásito. *L. donovani* impide la expresión de CD80 en los macrófagos que son estimulados con lipopolisacárido.⁶

El parásito también provoca una reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-12, entre otras. Se ha demostrado in vitro que los promastigotes de *L. donovani* y *L. major*, que los amastigotes de *L. mexicana* y que la porción fosfoglicano del LPG inhiben la producción de IL-12. La IL-12 es una citocina fundamental para la activación de los linfocitos T y la consecuente producción de INF- γ . Este INF- γ es a su vez importante para activar a los macrófagos y que logren tener una actividad microbicida.⁶

La *Leishmania* también es capaz de inducir la producción de moléculas inmunosupresoras como el factor transformante del crecimiento beta (TGF- β), la IL-10 y la PGE2. El TGF- β inhibe la acción microbicida de los macrófagos y la producción de INF- γ por las células NK. La IL-10 puede ser responsable de la supresión de la actividad microbicida de los macrófagos mediada por óxido nítrico, 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 y su producción de IL-1, TNF- α y especies reactivas de oxígeno.⁶

b) Alteración de las vías de señalización intracelular: la *Leishmania* altera múltiples vías de señalización intracelular. Altera la vía de señalización del calcio y la proteína quinasa C (PKC). El aumento de las concentraciones de calcio intracelular provoca la activación de la calcineurina, una serina/treonina fosfatasa. La fosfatasa ácida del parásito inactiva al trifostato de inositol (IP₃) y el LPG puede bloquear la unión del calcio y el diacilglicerol a la PKC provocando que disminuya la activación de la misma. La IL-10 también provoca inhibición de la PKC.⁶

La vía de señalización del transductor de la señal y activador de la transcripción (JAK2/STAT1), que es la vía de señalización del INF- γ , también es inhibida por el parásito en los macrófagos infectados. También altera la señalización a través de la vía de la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) 1/2 – Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Ambas vías son alteradas en un proceso aparentemente dependiente de PTP SHP-1 (tirosina fosfatasa que contiene dos dominios de homología a Src).⁶ La vía de señalización del INF- γ provoca normalmente el aumento de la transcripción de la iNOS con el consecuente aumento de óxido nítrico. Además, aumenta la síntesis de radicales libres de oxígeno. Si la respuesta inmune no estuviera alterada, el H₂O₂ y el NO destruirían al parásito; sin embargo, esto no ocurre porque se encuentra inhibida la vía de síntesis de éstos metabolitos reactivos.²⁰

Los supresores de la señalización de citocinas (SOCS) son proteínas celulares que regulan e inhiben las vías de señalización intracelular, especialmente la vía de JAK/STAT. Se ha demostrado que *L. donovani* aumenta la expresión de este grupo de proteínas como otro mecanismo

para inhibir la vía de JAK/STAT en el macrófago infectado.⁶

L. major, *L. mexicana*, *L. donovani* y *L. braziliensis* tienen un tercer mecanismo para inhibir la vía de JAK/STAT. Este mecanismo consiste en aumentar el catabolismo de STAT1 α por la vía del proteasoma en un proceso que depende de la vía de señalización de PKC α .⁶

VACUNACIÓN CONTRA LA LEISHMANIASIS

Todavía no se ha logrado elaborar una vacuna que cumpla con todos los requisitos necesarios para brindar protección específica y duradera. Se han utilizado diversos abordajes. La primera generación de vacunas estaba compuesta por parásitos enteros muertos y fueron probadas como vacunas profilácticas y terapéuticas. La utilidad terapéutica podría ser más importante en los países donde se presenta la enfermedad refractaria a los medicamentos. Varios estudios realizados en Sudamérica y en Sudán han demostrado la utilidad de estas vacunas como vacunas terapéuticas; sin embargo, los resultados como vacunas profilácticas son desalentadores.²¹ Un estudio realizado con promastigotes muertos en formalina combinados con adyuvantes reveló que la formulación era eficaz para la leishmaniasis cutánea.²²

La segunda generación de vacunas consiste en proteínas recombinantes, poli-proteínas, vacunas de ADN o células dendríticas cargadas con antígenos de *Leishmania*. Entre las moléculas estudiadas está la glicoproteína leishmanolisina (gp63); sin embargo las respuestas de los linfocitos T humanos a esta vacuna han sido decepcionantes. Otra proteína utilizada es la proteína gp46 o antígeno parasitario de superficie 2 (PSA-2). La inmunización de ratones con los polipéptidos nativos derivados de promastigotes los protegió de la infección; sin embargo, la vacunación con una proteína recombinante derivada de amastigotes o promastigotes no reveló eficacia terapéutica. Otro antígeno estudiado en ratones es el homólogo en

Leishmania del receptor de la cinasa C activada (LACK) que es expresado a lo largo de todo el ciclo de vida del parásito. Esta vacuna ha demostrado ser eficaz en el modelo de *L. major*; sin embargo, no protege contra leishmaniasis visceral.²¹

Hasta la fecha, sólo una vacuna de segunda generación, la Leish111f ha sido evaluada en estudios clínicos. La Leish-111f es una poliproteína compuesta de tres moléculas unidas: el homólogo en *L. major* del antioxidante eucariótico específico de tioles (TSA), la proteína 1 inducida por estrés de *L. major* (LmST11) y el factor de iniciación y elongación de *L. braziliensis* (LeIF). Los estudios de inmunización en ratones demostraron que la vacuna los protegía contra la infección por *L. major* y por *L. amazonensis*. También podría brindar una protección parcial contra la leishmaniasis visceral. Sin embargo, la vacuna no pudo prevenir el desarrollo de la enfermedad en un estudio fase III recientemente realizado en perros. Una versión mejorada de la vacuna, la Leish-110f ha sido probada en perros como una vacuna terapéutica en combinación con quimioterapia y ha demostrado reducir el número de muertos y aumentar la probabilidad de sobrevivida.²¹

Otro grupo de vacunas denominado vacunas bloqueadoras de la transmisión busca prevenir la transmisión desde un hospedero vertebrado infectado a uno sano. Para esto se utiliza una molécula blanco expresada en la superficie del patógeno durante la fase de desarrollo dentro del vector o una molécula expresada por el vector. Se han probado múltiples vacunas bloqueadoras basadas en el patógeno. El LPG y la gp63 han sido probados como vacunas bloqueadoras de la transmisión en ratones. Cuando el *Phlebotomus duboscqi*, que se ha alimentado previamente con sangre de ratones inmunizados con lisado de *L. major* o con un cóctel de LPG y gp63, se alimentó de un ratón infectado por *L. major* se dio un bloqueo de la transmisión. Sin embargo, este bloqueo se debió a la lesión de la capa epitelial del

intestino medio del vector probablemente por sustancias activas presentes en la sangre de los ratones pre-vacunados. Otro ejemplo es el de la vacuna Leishmune para leishmaniasis visceral canina. Esta vacuna mostró actividad de bloqueo de la transmisión de *Leishmania infantum chagasi* en la *Lutzomyia longipalpis*. Los anticuerpos producidos por los perros luego de la inmunización con Leishmune redujeron la infectividad de *L. longipalpis* en un 79.3 % y la carga parasitaria en 74.3 % aún 12 meses después de la inmunización.²³

Entre las vacunas bloqueadoras basadas en el vector podemos mencionar la que utiliza la proteína similar a galectin (PpGalec). Los *P. papatasi* alimentados artificialmente con una mezcla de sangre de ratón que contenía amastigotes de *L. major* y suero de ratones inmunizados con PpGalec mostraron una reducción del 86 % en los niveles de infección por *L. major* en el intestino medio del vector. Además, no se desarrollaron las formas metacíclicas infecciosas.²³

CONCLUSIÓN

La Leishmaniasis es una parasitosis de gran importancia a nivel mundial y que en los últimos años ha aumentado su frecuencia y distribución. Esto es probablemente debido a la epidemia de VIH/SIDA, al calentamiento global y a la continua invasión de los ambientes selváticos por el ser humano por motivos urbanísticos o para adquirir mayores terrenos de cultivo.

La *Leishmania* es un parásito sumamente exitoso que ha evolucionado para vivir en el interior de las células de su hospedero vertebrado. Aún resalta más el hecho de que la célula preferentemente parasitada es el macrófago, que es precisamente una de las células del sistema inmune que está especializada en la eliminación de este tipo de organismos.

A través de los años, la evolución le ha permitido a la *Leishmania* desarrollar numerosas estrategias

para lograr evadir los múltiples mecanismos que tiene el sistema inmune para eliminarla. No todas las especies de *Leishmania* utilizan los mismos mecanismos de evasión y, además, no todos los hospederos se defienden igual. Esto se traduce en las diferentes formas clínicas que diversas especies pueden producir. Por ejemplo, *L. major* produce una forma de leishmaniasis cutánea que eventualmente es autorresolutiva y que genera inmunidad contra infecciones posteriores; sin embargo, *L. amazonensis* tiene estrategias que le permiten evadir la respuesta inmune a tal grado que puede llegar a provocar la leishmaniasis cutánea difusa, una forma anérgica de la enfermedad.

La terapia actual contra la leishmaniasis no es del todo eficaz y tiene numerosos efectos adversos. Es por esto, que un estudio profundo de la respuesta inmune contra el parásito y de los mecanismos de evasión de la misma nos permitirá en el futuro desarrollar una vacuna que pueda prevenir la infección o que actúe como inmunomoduladora en los individuos ya infectados favoreciendo un aumento de la respuesta Th1 y la eliminación del parásito de las células del hospedero.

REFERENCIAS

1. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res. 2004 Jun;119 (6):238-58.
2. Pisopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Méd J 2006; 82: 649-57.
3. Von Stebut E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. Exp Dermatol. 2007 Apr;16 (4):340-6.
4. García LS. Diagnostic Medical Parasitology. Quinta Edición. Washington, D.C. Editorial ASM Press. 2007. 190-217 páginas.
5. De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 Oct;98 (7):861-70.

6. 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.
7. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. Clin Exp Immunol. 2008 Aug;153 (2):221-30.
8. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. J Biomed Biotechnol. 2010;2010: 1-8.
9. 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.
10. Soong L. Modulation of Dendritic cell function by *Leishmania* parasites. J Immunol. 2008 Apr 1;180 (7):4355-60.
11. Vargas-Inchaustegui DA, Tai W, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and Toll-Like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. Infect Immun. 2009 Jul;77 (7):2948-56.
12. Hernández-Ruiz J, Becker I. CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. Salud Publica Mex 2006; 48: 430-9.
13. Ota H, Takashima Y, Matsumoto Y, Hayashi Y, Matsumoto Y. Pretreatment of macrophages with the combination of IFN- γ and IL-12 induces resistance to *Leishmania major* at the early phase of infection. J Vet Med Sci. 2008 Jun; 70(6):589-93.
14. Choi BS, Kropf P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. Parasite Immunol. 2009 Apr; 31(4):199-209.
15. Wanasen N, Soong L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. Immunol Res. 2008;41 (1):15-25.
16. Sanabria MX, Vargas-Inchaustegui DA, Xin L, Soong L. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. Infect Immun. 2008 Nov;76 (11):5100-9.
17. 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.
18. Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004 May;99 (3):239-51.
19. Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, Almusawi T, Duarte MI, Amato Neto V. Toll-like receptors and leishmaniasis. Infect Immun. 2008 Mar;76 (3):866-72.
20. Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N. Immune response to kala-azar. Indian J Med Res 2006; 123: 245-66.
21. Kedzierski L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? J Glob Infect Dis. 2010; 2: 177-85.
22. Mutiso JM, Macharia JC, Mutisya RM, Taracha E. Subcutaneous immunization against *Leishmania major* – Infection in mice: efficacy of formalin-killed promastigotes combined with adjuvants. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2010; 52: 95-100.
23. Coutinho-Abreu I, Ramalho-Ortigao M. Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases – a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105: 1-12.