

Los neutrófilos en la evolución parasitológica y clínica de la leishmaniasis

The neutrophils in the parasitological and clinical evolution of leishmaniasis

Alex Giovanni Peniche Trujillo*

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial, cuyo agente etiológico es un protozoo de vida obligatoriamente intracelular, que afecta a más de 12 millones de personas en el mundo. En Colombia se considera como una enfermedad endémica, distribuida en las aéreas de bosque tropical y de selva húmeda. El papel del neutrófilo en el desarrollo de la patogénesis y evolución clínica de la leishmaniasis ha sido poco estudiado hasta ahora, pues la investigación inmunológica tradicional ha relegado el estudio de esta célula frente a otros componentes del sistema inmune. Información reciente indica que los neutrófilos de hospederos susceptibles tienen una baja capacidad leishmanicida, asociándose su presencia con una mayor carga parasitaria durante la fase aguda de la infección. La presente revisión tiene por objetivo presentar los hallazgos más recientes de la biología del neutrófilo relacionados con su participación en la infección y respuesta inmune contra leishmania, que permita redefinir el papel del neutrófilo en estas y otras patologías de origen infeccioso.

Palabras clave: neutrófilo, leishmaniasis, leishmania, respuesta inmune innata, inmunomodulación, modelos animales.

Abstract

Leishmaniasis is a vector-borne disease, whose etiologic agent is an obligatory intracellular protozoan affects more than 12 million people worldwide. In Colombia, this disease is considered endemic because it is found in the tropical forests areas and the humid jungle. The role of neutrophils in the development of the pathogenesis and clinical development of leishmaniasis has been rarely studied so far, because the immunological research has traditionally neglected the study of this cell compared to other components of the immune system. However, recent data shows that neutrophils of susceptible animals have a low leishmanicidal capacity and its presence has been associated with an increased parasite load during the acute phase of infection. This review aims to present the latest findings on the biology of neutrophils related to their involvement in infection and immune response against leishmania, with which to redefine the role of neutrophils in these and other pathologies of infectious origin.

Key words: neutrophil, leishmaniasis, leishmania, innate immune response, immunomodulation, animal models.

* Magíster en Ciencias Básicas Médicas. Research Fellow. Infectious Diseases, Department of Medicine. University of Texas, Health Science Center at San Antonio – USA. Correos electrónicos: alpeniche@areandina.edu.co alexpeniche@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa de origen protozoario, que a nivel global afecta 12 millones de personas en 88 países de los cinco continentes (OMS, 2008). En Colombia se considera como una enfermedad endémica, dado que se distribuye a todo lo largo del territorio nacional de bosque tropical e interandino y de selva húmeda por debajo de los 1.750 M.S.N.M (King, 2004). Al término del año 2007, el Sistema de Vigilancia en Salud Pública ubicó esta patología como la cuarta enfermedad infecciosa de mayor impacto en la población, luego de la malaria, la varicela y el dengue clásico; dado que afectó a 5.637 habitantes (SIVIGILA, 2007) y un poco más de 5.000 efectivos del Ejército Nacional (Mendivelso, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (2008) indica que la leishmaniasis tiene un fuerte vínculo con la pobreza, categorizándola como una de las “enfermedades más olvidadas” (most neglected diseases). La pobreza se ha asociado con una nutrición deficiente, lo que genera un debilitamiento del sistema inmunológico y por ende incrementa la probabilidad de contraer otras enfermedades infecciosas o una mayor severidad de la patología infecciosa (revisado por Alvar *et al.*, 2006). Así mismo, la pobreza limita el acceso al sistema de salud, ocasionando demoras en el diagnóstico y tratamiento adecuados que detengan la progresión de la infección (revisado por Alvar *et al.*, 2006).

En Colombia y en el continente la presentación clínica más frecuente es la cutánea, seguida de la patología visceral y mucocutánea (SIVIGILA, 2007; OMS, 2008). La forma cutánea se caracteriza por la presencia de úlceras en las áreas típicamente descubiertas como los brazos, orejas, cara y piernas (Figura 1), que tienden a curarse espontáneamente mostrando la típica cicatriz radiada. En pacientes que presentan un estado inmunológico debilitado puede presentarse la patología mucocutánea, en la que a partir de la infección dérmica se originan lesiones metastásicas en tejidos mucosos como nariz, boca, garganta y tejidos circundantes que suelen ser difíciles de tratar con la terapia convencional. Como su nombre lo indica, en la patología visceral las manifestaciones clínicas

se presentan en la cavidad abdominal con un incremento sustancial en el tamaño del hígado y bazo, y pérdida de peso, llegando a ser fatal si no se suministra el tratamiento médico indicado.



Figura 1. Lesión ulcerada típica de la leishmaniasis cutánea. Paciente pediátrico del municipio de Florián Santander (Foto tomada por Leidy Castillo, Estudiante del programa de Enfermería, Fundación Universitaria del Área Andina).

La investigación inmunológica tradicional de la patología de las enfermedades parasitarias ha relegado el estudio de esta célula frente a otros componentes del sistema inmunológico como macrófagos y linfocitos, al considerar que los neutrófilos solo están presentes durante los primeros días de la etapa infecciosa, y por tanto tendrían un papel secundario en el estudio de la terapéutica de estas enfermedades. Sin embargo, publicaciones recientes inducen a reexaminar esta creencia al evidenciar que los neutrófilos de los hospederos susceptibles presentan una menor capacidad leishmanicida que los hospederos resistentes (Aga *et al.*, 2002; Cunningham, 2002); de manera

que se convertirían en una fuente de infección para los macrófagos, considerada su célula hospedera final (Laskay *et al.*, 2003).

Igualmente, la aproximación multidisciplinaria para estas enfermedades de corte inmunopatológico, ha introducido nuevos conceptos e ideas a través de los cuales mejorar el conocimiento de la patogénesis en la leishmaniasis. Actualmente se ha observado que el contenido tóxico del neutrófilo utilizado para eliminar los microorganismos invasores, también puede favorecer el desarrollo de la ulceración y retrasar la cicatrización de las lesiones no-infecciosas (Dovi *et al.*, 2004).

La presente revisión tiene por objetivo presentar los hallazgos más recientes de la biología del neutrófilo relacionados con su participación en la infección y respuesta inmune contra leishmania, con el cual redefinir el papel del neutrófilo en patologías de origen infeccioso.

EL CICLO DE INFECCIÓN

Todas las especies que dan origen a las diferentes patologías de la leishmaniasis pertenecen taxonómicamente al género *Leishmania* (Familia Kinetoplastea, Honigberg, 1963): los cuales se caracterizan por ser parásitos intracelulares obligados que se desarrollan como promastigotes (estadio flagelado) en el vector (géneros *Lutzomya* y *Phlebotomus*) y como amastigotes aflagelados en los hospederos vertebrados (principalmente mamíferos) (Bates *et al.*, 2004). La transmisión de los parásitos de *Leishmania* al vertebrado se realiza durante la alimentación del vector sobre el hospedero, cuando los promastigotes infectivos (metacíclicos) son regurgitados y transportados por la saliva del vector a la dermis del hospedero vertebrado (Figura 2). Posteriormente, los parásitos son internalizados por las células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos y dendríticas en el fagolisosoma, en el que liberan factores microbicidas como radicales de

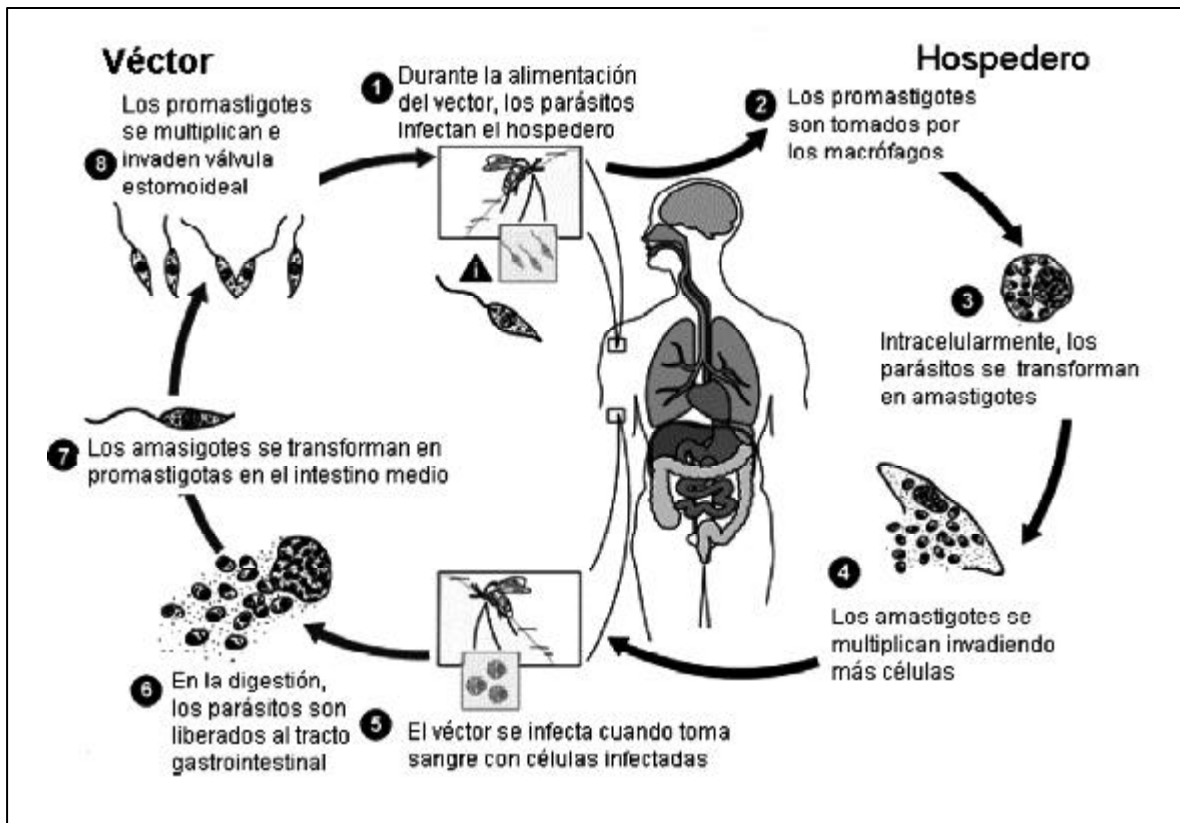


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* (modificado de www.dcd.gov)

oxígeno y nitrógeno, entre otros (revisado Vannier-Santos *et al.* 2002).

EL NEUTRÓFILO, CÉLULA POLIMORFONUCLEAR Y GRANULOCÍTICA

El núcleo del neutrófilo está dividido en tres lóbulos, por lo que clasifican como células “polimorfonucleares” junto a los eosinófilos y basófilos. Son los leucocitos más abundantes en la sangre, con valores entre $2,5$ y $7,5 \times 10^9$ células por litro. La médula ósea de un adulto saludable produce en promedio 10^{11} neutrófilos por día, los cuales pueden elevarse a 10^{12} ; lo cual se ha utilizado en la práctica médica como un indicador de exposición a un agente infeccioso.

Cuando se produce una lesión o estímulo infeccioso (inflamatorio), el rompimiento de los vasos sanguíneos induce a que las plaquetas se adosen a los extremos de los vasos y del tejido circundante, con lo cual se inicia la metabolización fibrinógeno a fibrina (forma de bastón), formando redes que detienen la pérdida de sangre. Por otra parte las plaquetas liberan factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor - PDGF) que junto a citoquinas inflamatorias (IL1, 8, TNF α) liberadas por las células afectadas, estimulan la migración de neutrófilos que fagocitan los fragmentos de tejido dañado y material extraño (incluyendo microorganismos invasores). Inmunológicamente, los neutrófilos son considerados la primera línea de defensa del sistema inmune contra infecciones bacterianas, fúngicas y protozoarias, predominando durante los primeros tres días posteriores a la herida o infección. Luego de 76 horas de haberse producido el estímulo inflamatorio, los macrófagos migran en abundantes cantidades al sitio afectado. Estas células mononucleares resultan fundamentales tanto para cerrar el proceso inmunológico de defensa celular y presentación de antígenos, como el de cicatrización, dado que liberan grandes cantidades de TGF β que induce la migración de fibroblastos y keratinocitos, los cuales depositan y organizan los componentes de la nueva matriz extracelular (Diegelmann & Evans 2004).

Otra de las características morfológicas más evidentes de los neutrófilos es la presencia de gránulos citoplasmáticos que se clasifican según su aparición durante la diferenciación mieloide (Revisado por Faurischou *et al.*, 2003). Los gránulos azurófilos son ricos en péptidos antimicrobianos como la mieloperoxidasa, elastasa del neutrófilo, proteinasa-3, defensasá entre otras, los cuales tienen actividad degenerativa directa o indirecta (a través del H₂O₂ para formar HOCl) sobre las membranas de los microorganismos. Los gránulos específicos principalmente contienen péptidos antimicrobianos como leucolisina, estomatina y receptores de actividad inmunomoduladora como receptor de formil-metionil-leucil-fenilalanina (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptor - fMLPR). Los gránulos de gelatinasa son los más pequeños y más fácilmente exocitados que los demás; se componen mayoritariamente de enzimas que degradan la matriz extracelular como la gelatinasa y lisozima, que cumplen un papel esencial al facilitar la diapédesis migración de los neutrófilos a través de los tejidos, así como también de moléculas quelantes de hierro como la proteína natural de resistencia asociada a macrófago (natural resistance-associated macrophage protein - Nramp1). Por consiguiente, la masiva liberación de gránulos a la matriz extracelular durante la activación celular induce un daño tisular severo, que en la patología macroscópica se refleja con la presencia de exudado celular o pus en el tejido afectado.

Como parte de la respuesta frente a un estímulo inflamatorio y/o infeccioso, el neutrófilo también libera moléculas de comunicación celular llamadas citoquinas y quemoquinas como IL-12, IFN γ , IL-4, IL-10 y TGF β , que pueden mantener la respuesta inflamatoria en el tejido y participar en la diferenciación de los linfocitos TCD4⁺ hacia Th1 o Th2 (revisado por Kobayashi, 2008). Además, son una fuente importante de antígenos para las células dendríticas y macrófagos luego de que han fagocitado los microorganismos invasores (Appelberg, 2007). De esta manera el estudio de los neutrófilos aporta información valiosa para conocer la articulación inmunológica entre las respuestas inmunes innata y adquirida.

Como todas las membranas celulares, los neutrófilos tienen proteínas integradas que son uti-

lizadas para identificar agentes infecciosos o percibir señales inmunológicas de otras células o tejidos presentes en el ambiente extracelular (Revisado por Seely *et al.*, 2003). Entre los receptores que facilitan el reconocimiento y fagocitación de agentes infecciosos se encuentran los llamados Receptores de Opsoninas (Fc R-I, -II y -III), de complemento (C5a y C3b), de anticuerpos (IgM e IgG), receptores TLR (Toll Like Receptor) 1, 2, 4, 5, 6 y 11, PAF (platelet activating factor), leucotriene B-4 y lectinas de unión a manosa, entre otros. Por otra parte, los neutrófilos cuentan con receptores de citoquinas proinflamatorias como IL1R, IL-8R, IL-18R que inducen la activación celular; G-CSFR (granulocyte colony-stimulating factor receptor) y GM-CSFR (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor) y CXCR4, que estimulan factores anti-apoptóticos y extienden su sobrevivencia en los tejidos infectados, mientras que los receptores de TNF α R y FasL promueven su muerte por apoptosis (Martin *et al.*, 2003; McGettrick *et al.*, 2006).

La visión clásica de los neutrófilos como células que sólo actúan durante la respuesta inmune innata, de actividad fagocítica que se acumulan rápida y por pocos días en el sitio de infección, está siendo ampliada por nuevos resultados provenientes del estudio inmunomolecular del desarrollo de las infecciones crónicas (entre ellas la leishmaniasis), donde la presencia del neutrófilo y sus productos desempeñan un rol inmunomodulador significativo durante la respuesta inmune adaptativa al interactuar con macrófagos y linfocitos.

EL NEUTRÓFILO Y LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA

Como se mencionó anteriormente, en el estudio del desarrollo de enfermedades infecciosas crónicas en décadas pasadas, se reporta escasa información sobre los neutrófilos apareciendo generalmente al margen de los hallazgos en macrófagos. Esta carencia de información resulta comprensible al advertir que las primeras manifestaciones cutáneas en humanos solo aparecen luego de dos o más semanas p.i., presentándose como una pápula o nódulo pequeño que usualmente es indoloro (Sanchez *et al.*, 1992). A nivel crónico, se ha re-

portado la presencia de neutrófilos en lesiones de \approx 8 meses de evolución de LCA por *L. panamensis* de la costa pacífica colombiana (Palma & Saravia, 1997) y por el subgénero *Viannia* en Brasil (Ridley & Ridley, 1983; Morgado *et al.*, 2008), los cuales mostraron una asociación positiva entre el infiltrado neutrofilico y la presencia de parásitos en la dermis reticular (Ridley & Ridley, 1983; Palma & Saravia, 1997).

Acorde a los registros actualmente disponibles, el primer reporte sobre una escasa actividad leishmanicida del neutrófilo lo realiza Chang (1981) y posteriormente Laufs y col. (2002), indicando que si bien los neutrófilos humanos fagocitan con gran habilidad, los promastigotes de *Leishmania donovani* y *L. major* son ineficaces en la eliminación de parásitos fagocitados *in vitro*, pues luego de 16 horas de cultivo el 80% de los neutrófilos permanece infectado (Chang, 1981; Laufs *et al.*, 2002). Posteriormente, Thorne & Blackwell (1983) reportan que esta susceptibilidad a la infección en humanos también se presenta con otras especies de *Leishmania* y con otros parásitos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma brucei*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia sp.*, *Salmonella typhimurium*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium leprae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus somnus* y *Plasmodium berguei* (Revisado por Laskay *et al.*, 2008).

También se ha observado en humanos que los neutrófilos infiltran hacia los centros necróticos de la lesión, originados por la destrucción de células parasitadas (principalmente macrófagos) (Ridley & Ridely, 1983; Pompeu *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1998; de Moura *et al.*, 2005). Este hallazgo permitió a Ridey & Ridley (1983) formular una explicación para el proceso de ulceración, en el que el incremento del infiltrado inflamatorio y la expansión de los centros necróticos hacia la epidermis, son los responsables del rompimiento superficial y posterior ulceración de la lesión.

En el trabajo rutinario de cultivo en medios axénicos de cultivo para *Leishmania*, se ha identificado la presencia de dos morfologías diferentes durante la fase estacionaria de crecimiento *in vitro*

denominadas “elongadas” y “redondeadas” (da Silva and Sacks, 1987). Al microscopio electrónico y de citometría de flujo, se observa que los parásitos redondeados presentan mitocondrias hinchadas, degradación nuclear, y presencia de Anexina-V en la membrana celular, indicando una muerte celular por apoptosis. La separación específica de estas formas redondeadas y posterior cultivo reveló que son incapaces de multiplicarse, confirmando el razonamiento de que son parásitos apoptóticos (van Zandbergen *et al.*, 2006). En contraste, las formas alargadas presentan alta motilidad y gran capacidad de división celular, y una baja sobrevivencia en el neutrófilo (van Zandbergen *et al.*, 2006); la cual se incrementa cuando la infección se realiza conjuntamente con las formas redondeadas. Esta observación indica que las formas redondeadas o apoptóticas asisten a las formas elongadas en la inactivación de los mecanismos microbicidas de las células hospedero.

Entre los mecanismos propuestos de resistencia de *Leishmania* a la degradación de las especies reactivas del oxígeno se ha registrado la presencia de fosfatasa ácida de unión a membrana y de liberación extracelular en las formas redondeadas, en la que 1 nmol logra inhibir en un 90% la producción de radicales en el neutrófilo inducida por la activación artificial con fMLP (Remaley *et al.*, 1984; Saha *et al.*, 1985). Así mismo reducir la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IL1 y 12 e incrementar las anti-inflamatorias como TGF β e IL-10 (van Zandbergen *et al.*, 2006). Lo cual indica que las formas redondeadas proveen a las formas alargadas de un ambiente favorable (o de supervivencia), principalmente mediado por el TGF β , con una fagocitación “silenciosa” (o no-inflamatoria) de los parásitos que facilitaría el establecimiento de la infección en las células fagocíticas.

ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN EN MODELOS ANIMALES

La utilización de modelos animales resulta indispensable para adquirir información detallada del papel que cumple el neutrófilo en control parasitario y actividad inmunomodulatoria en el estableci-

miento y desarrollo de la infección, dado que permite controlar un mayor número de variables que en los estudios con humanos.

El estudio experimental de la leishmaniasis cutánea del viejo mundo ha establecido con éxito los modelos biológicos de resistencia y susceptibilidad a la enfermedad, realizando un gran aporte a la comprensión de los factores inmunológicos y parasitológicos asociados a cada presentación clínica. Las cepas de ratones resistentes (C57BL/6, 129/sv y C3H/He) a la infección con *L. major* muestran un control eficaz de la replicación parasitaria, tanto en el sitio de inoculación como en nódulo linfático, sin diseminación a otros órganos o tejidos; con lesiones suelen ser patológicamente leves, con tendencia a la auto-resolución luego de 5 a 6 semanas p.i. (Beil *et al.*, 1992). Por el contrario, los ratones susceptibles (BALB/c) a *L. major* presentan una abundante replicación tanto en el sitio de inoculación como en nódulos linfáticos, con diseminación a otros órganos y tejidos, principalmente el bazo y el hígado; generando lo que se ha denominado un estado de enfermedad progresivo (Beil *et al.*, 1992); en el modelo susceptible las lesiones cutáneas suelen ser severas, con inflamación permanente, que no curan espontáneamente (Beil *et al.*, 1992; Donnelly *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Muraille *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005).

La comparación de la evolución de la lesión entre los ratones resistentes (C57Bl/6) y susceptibles (BALB/c) a la infección con *L. major* ha revelado diferencias en el tipo y cinética de las células infiltrantes en el sitio de infección. En el ratón resistente los neutrófilos son la primera célula reclutada y la más abundante, representando el 80% del infiltrado durante el primer día p.i.; al segundo día p.i. se observa una reducción de los neutrófilos hasta un 20% en el infiltrado, que al tercer día p.i. continúa reduciendo por debajo del 10% de las células del infiltrado hasta los 12 días p.i. Adicionalmente, las células mononucleares incrementan su participación conforme evoluciona la lesión, representando más del 80% a partir del tercer día p.i. hasta el día 12 p.i. (Beil *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 2008).

En contraste, el ratón susceptible durante el primer día p.i. muestra una infiltración por neutrófilos del 90% al 60% en la lesión, que a partir del segundo día p.i. disminuye, pero por encima del 50% del infiltrado celular, hasta el día 12 p.i. De manera complementaria, las células mononucleares conforman menos del 50% restante del infiltrado hasta el día 12 p.i. (Beil *et al.*, 1992). Por otra parte, el análisis histopatológico de las lesiones del modelo susceptible ha mostrado una asociación entre el reclutamiento de neutrófilos posterior a la etapa aguda de la infección (1-2 días p.i.) y el incremento en la cantidad de células parasitadas y presencia de parásitos extracelulares en la lesión; sin importar la especie de *Leishmania* con que se infecte (Ridley & Ridley, 1983; Pompeu *et al.*, 1991; Beil *et al.*, 1992; Donnelly *et al.*, 1998; Lemos de Souza *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005; de Moura *et al.*, 2005).

El contraste observado en la cinética del infiltrado entre los modelos de susceptibilidad y resistencia a *L. major* durante la etapa aguda de la infección, se extiende a las etapas sub-crónica y crónica de la infección. La evaluación del infiltrado a los 21 días p.i. en el grupo susceptible mostró una fuerte infiltración por neutrófilos, que coincidió con el incremento en el tamaño de la lesión; en comparación el grupo resistente no mostró cambios histopatológicos o clínicos respecto a la primera semana p.i., con un infiltrado compuesto principalmente por macrófagos (Donnelly *et al.*, 1998). De igual manera a los 40 días p.i., el infiltrado de neutrófilos en la lesión de los ratones susceptibles fue tres veces mayor a la observada en los ratones resistentes (Muraille *et al.*, 2003).

Diferencias similares se han obtenido de otros estudios que evaluaron otras especies de *Leishmania*, como *L. amazonensis* y *L. braziliensis* en el modelo murino de susceptibilidad y resistencia, en el que los grupos susceptibles (CBA, BALB/c) presentan un incremento notorio en la población de neutrófilos respecto al grupo resistente (C57Bl/6, C3H) (Pompeu *et al.*, 1991; Donnelly *et al.*, 1998; Lemos de Souza *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2005; de Moura *et al.*, 2005). Incluso se observó que la co-inoculación de parásitos (*L.V. braziliensis*) y glándulas salivales del vector (*Lutzomyia*) induce un mayor infiltrado polimorfonuclear y carga parasitaria que en

los animales control (sin glándulas salivales); en el grupo co-inoculado con glándulas salivales el infiltrado de neutrófilos fue significativamente permanente en la lesión en comparación con el control (Donnelly *et al.*, 1998). Por tanto se ha sugerido que la magnitud y duración del infiltrado neutrofilico tiene una influencia significativa en la evolución de la infección.

EL NEUTRÓFILO EN EL CONTROL PARASITARIO EN LA LEISHMANIASIS

Puesto que la observación microscópica de la lesión del hospedero susceptible (BALB/c) a la leishmaniasis ha mostrado una asociación entre patología y el incremento y la permanencia de los neutrófilos en el infiltrado, se han desarrollado experimentos con animales neutropénicos para estudiar la evolución clínica y parasitológica de la infección. La inducción de la neutropenia comúnmente se ha realizado utilizando el anticuerpo monoclonal RB6-8C5 (IgG2b de rata), que se une específicamente a los neutrófilos maduros, induciendo la eliminación selectiva del sistema circulatorio (Rogers & Unanue, 1993).

El período durante el cual se ha inducido la neutropenia corresponde a la etapa aguda de la infección, en el que el anticuerpo se suministra desde tres días pre-infección hasta tres días p.i. o hasta el final del período de observación. Para realizar las infecciones se han empleado especies de *Leishmania* del viejo mundo, entre ellas *L. major* en leishmaniasis cutánea y *L. donovani* y *L. infantum* en leishmaniasis visceral (Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Smelt *et al.*, 2000; Rousseau *et al.*, 2001; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

No obstante los estudios realizados en leishmaniasis cutánea han utilizado el mismo modelo experimental para inducir neutropenia (ratón susceptible BALB/c *L. major*, neutropénico mediante RB6-8C5) se presenta evidencia contradictoria sobre el rol protector del neutrófilo en la patología y control parasitario de la leishmaniasis. Los trabajos de Tacchini-Cottier *y col.* (2000), Ribeiro-Gomes *y col.* (2004) y Peters *y col.* (2008) sugieren que el neutrófilo tiene un rol virulento, al observarse en el grupo

neutropénico una reducción de más de dos veces la carga parasitaria y un menor tamaño de lesión respecto al grupo control (no inhibido). De manera similar, utilizando el modelo hámster-*L. (V.) panamensis* también se observó que durante la fase sub-aguda, los neutrófilos promueven el incremento de hasta 6,5 veces la carga parasitaria y con mayor severidad de la lesión cutánea (Peniche *et al.*, 2006).

Por el contrario, los trabajos realizados por Lima *y col.* (1998) y Chen *y col.* (2005) sugieren que los neutrófilos cumplen un rol protector, al observarse un incremento de más de seis veces en la carga parasitaria y el tamaño de lesión en el grupo neutropénico respecto al grupo control. Asimismo, el estudio de la leishmaniasis visceral (*L. infantum*) mostró un rol protector del neutrófilo, al presentarse diez veces más carga parasitaria en bazo e hígado de los animales neutropénicos respecto al grupo control (Rousseau *et al.*, 2001).

Por otra parte, la inducción de neutropenia en los ratones resistentes C57Bl/6 apoya el rol protector de los neutrófilos durante la etapa aguda de la infección con *L. major* y *L. donovani*; pues se observó que los grupos neutropénicos tuvieron un incremento de más de tres veces la carga parasitaria frente al grupo control (Lima *et al.*, 1998; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000; Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). En adición, la infección de animales neutropénicos C3H (resistente) con *L. major* no produjo diferencias clínicas ni parasitológicas frente al grupo control (Chen *et al.*, 2005). Similarmente, la infección *in vitro* de macrófagos y neutrófilos de BALB/c con *L. major* mostró un incremento de siete veces la carga parasitaria en comparación a la infección de solo macrófagos como grupo control; en contraste, la infección de macrófagos y neutrófilos de C57Bl/6 presentó una reducción de tres veces la carga parasitaria en comparación a la infección de solo macrófagos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

Al utilizar la misma aproximación en un sistema *in vivo* se observó la misma correlación dentro del modelo sensible y resistente, de manera que el grupo BALB/c co-inoculado con *L. major* y neutrófilos presentó 15 veces mayor carga parasitaria que el grupo inoculado solo con parásitos; por el contra-

rio, en el grupo C57Bl/6 co-inoculado con *L. major* y neutrófilos, se presentó una reducción de siete veces la carga parasitaria en comparación con el grupo inoculado solo con parásitos (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004).

Con el mismo propósito, se infectó macrófagos de BALB/c en presencia de neutrófilos de C57Bl/6, con lo que se obtuvo una reducción de cuatro veces la carga parasitaria en comparación con la infección de solo macrófagos como control; sin embargo, la infección de macrófagos de C57Bl/6 con neutrófilos de BALB/c también redujo la carga parasitaria respecto a la infección de solo macrófagos, aunque en una medida muy inferior lo observado en la infección de macrófagos y neutrófilos de C57Bl/6 (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004). Estos experimentos indican la presencia de mediadores en los neutrófilos de los ratones BALB/c y C57Bl/6 que estimulan en menor o mayor medida respectivamente, los mecanismos microbicidas en los macrófagos y por ende eliminación oportuna del parásito.

Los estudios *in vitro* sobre la biología de la infección del neutrófilo con *L. major* apoyan la presunción de que los neutrófilos de individuos o cepas de animales susceptibles desempeñan un papel perjudicial, al facilitar el establecimiento de la infección actuando como “Caballos de Troya” (Laskay *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, el neutrófilo tiene una vida entre 6 y 10 horas luego de que sale a circulación desde la médula ósea. La muerte del neutrófilo se da por apoptosis o “muerte celular programada”, la cual se observa microscópicamente con encogimiento celular, condensación de la cromatina y pérdida típica forma multilobulada del núcleo de los neutrófilos (Figura 3) (Payne *et al.*, 1994; Savill and Haslett 1995; Squier *et al.*, 1995; Moulding *et al.*, 1998); molecularmente, se observa una modificación de las moléculas de la membrana, al reducirse los receptores de fagocitosis, incrementarse la expresión de fosfatidilserina y exteriorización de los fosfolípidos de la membrana que en las células viables se encuentran interiorizados (Dransfield *et al.*, 1994; Homburg *et al.*, 1995).

Entre los factores que evitan que el neutrófilo entre en apoptosis se han descrito agentes

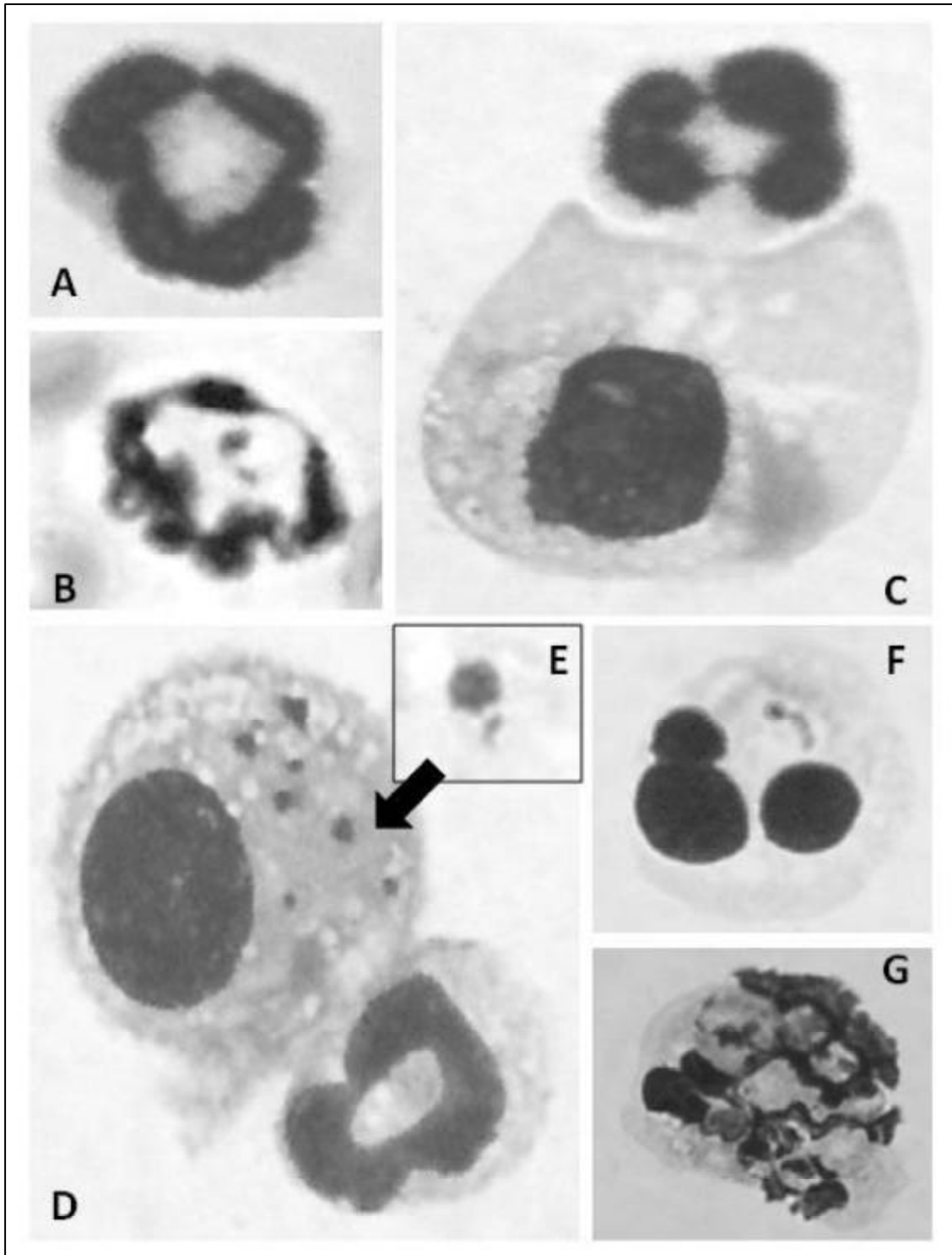


Figura 3. Células de hámsteres infectados con *L. (V.) panamensis* (aumento 400X, tinción Giemsa de improntas de lesión dérmica). **A.** neutrófilo no infectado. **B.** neutrófilo infectado. **C.** macrófago en proceso de fagocitación de un neutrófilo. **D.** macrófago infectado; la flecha señala un amastigote. **E.** neutrófilo apoptótico. **G.** neutrófilo necrótico. (Fotos tomadas por Alex Peniche).

proinflamatorios que se liberan en respuesta a la infección, como G-CSF, GM-CSF, IFN α , IL8, IL15 y lipopolisacárido (LPS), que incrementan la expresión de genes anti-apoptóticos como secuencia de leucemia de célula mielóide 1 (myeloid cell leukemia sequence 1 - Mcl-1) con capacidad de interrumpir los mecanismos efectores de la vía de las caspasas (Moulding *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* han evidenciado que los parásitos fagocitados evaden los mecanismos microbicidas del neutrófilo (Muller *et al.*, 2001; Laufs *et al.*, 2002) y retrasan la apoptosis del neutrófilo hasta 42 horas p.i. (van Zandbergen *et al.*, 2004), con lo cual estimulan el reclutamiento de macrófagos (Muller *et al.*, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004) y retrasan la apoptosis del neutrófilo. De manera que luego de 72 hrs p.i. los macrófagos fagocitan neutrófilos apoptóticos con parásitos viables, que fácilmente se multiplicarán y establecerán la infección, pues el macrófago ha sido engañado por las señales de "muerte estéril" por apoptosis que presenta el neutrófilo infectado (Laskay *et al.*, 2003).

EL NEUTRÓFILO Y LOS MEDIADORES INMUNORREGULATORIOS

Recientemente se ha publicado que existen diferencias a nivel de moléculas de membrana y activación celular entre los neutrófilos de los ratones resistentes y susceptibles a la infección con *L. major*. En el ratón susceptible BALB/c la infección induce una alta transcripción de IL-12p40, que paradójicamente no es secretada en su forma biológicamente activa (IL-12p70) de manera que forma homodímeros de IL-12p40 (Charmoy *et al.*, 2007) que suprimen la activación de los linfocitos Th1 (Schmitt & Ullrich, 2000). En cambio en el ratón resistente C57BL/6, los neutrófilos liberan grandes cantidades de IL-12p40 (Charmoy *et al.*, 2007), constituyéndose en la primera célula del infiltrado en promover la activación del macrófago a través de esta molécula de señalización celular. Del mismo modo, los neutrófilos de C57BL/6 presentan mayores niveles de ARN mensajero para TLR2, TLR7 y TLR9 en comparación con BALB/c (Charmoy *et al.*, 2007), a través de los cuales se reciben estímulos infecciosos extra (TLR2) e intracelulares (TLR 7 y 9) que conllevan a la activación celular y a una

mayor producción de citoquinas como IL-12 (Shoda *et al.*, 2001).

Tradicionalmente se ha otorgado un rol inmunopatogénico a los mediadores celulares como las citoquinas y otras moléculas efectoras. Ribeiro-Gomes *et al.* (2004) encontraron que los ratones BALB/c infectados con *L. major* presentan niveles altos de TGF β y bajos de TNF α y elastasa del neutrófilo, en comparación con los ratones C57BL/6 resistentes. El bloqueo de TNF α y la elastasa del neutrófilo (pro-inflamatorios) en ratones C57BL/6, produce un incremento significativo de la carga parasitaria. Mientras el bloqueo de TGF β y PGE $_2$ (anti-inflamatorios) en los ratones susceptibles BALB/c, redujo significativamente la carga parasitaria. Trabajos previos han probado que los neutrófilos producen durante la reacción inflamatoria una buena parte de estos factores proinflamatorios (TNF α y elastasa del neutrófilo) que promueven la liberación de diferentes especies reactivas del oxígeno en los macrófagos (Ishihara *et al.*, 1999), lo que restaura la actividad leishmanicida del macrófago inactivado por el TGF β (Speer *et al.*, 1984; Goossens *et al.*, 1995).

Los trabajos publicados sobre la leishmaniasis murina han destacado la importancia de las citoquinas IL12 e IL4 en la orientación de los linfocitos T CD4 $^+$ hacia una respuesta Th1 (protectora) o Th2 (exacerbadora) respectivamente (Sypek *et al.*, 1993; Heinzl *et al.*, 1993; Mattner *et al.*, 1996; Guler *et al.*, 1996). Por otra parte, los trabajos realizados con otros protozoos intracelulares como *Candida albicans* (Romani *et al.*, 1997) y *Toxoplasma gondii* (Scharton-Kersten *et al.*, 1997) en el modelo BALB/c, han examinado la influencia de las citoquinas producidas por los neutrófilos en el desarrollo de la respuesta linfocitaria. En estos estudios el desarrollo de una respuesta Th2 se asoció a la IL-10 producida por los neutrófilos en la etapa temprana de la infección; de igual manera, el desarrollo de la respuesta Th1 fue explicada por la liberación de IL-12 de los neutrófilos.

En consecuencia con el paradigma murino Th1/Th2, el trabajo de Tacchini-Cottier *et al.* (2000) comparó la expresión de citoquinas *in situ* de los grupos inhibidos y normales de ratones BALB/c

infectados con *L. major*, en el cual se reportó una reducción pronunciada, pero no significativa, de IL4 en el grupo BALB/c inhibido, que aparentemente estaría contribuyendo con la resolución parcial de la lesión. De manera que el balance de los factores pro y anti inflamatorios en el modelo resistente, en contraste con el susceptible, se muestra como un factor vital para la activación celular y resolución de la infección.

CONCLUSIÓN

Los resultados compilados en esta revisión señalan que los neutrófilos tienen un rol crítico en proceso de establecimiento de la infección por *Leishmania*; ya sea mediando la contención en los hospederos resistentes, o por el contrario, facilitando un acceso “seguro” a los macrófagos de los hospederos susceptibles. De otro lado, también indican que la influencia inmunológica de los neutrófilos va más allá de lo que tradicionalmente se ha descrito en la Respuesta Inmune Innata, con la liberación de mediadores celulares (citoquinas y quemoquinas) que promueven o limitan la activación de macrófagos y linfocitos, componentes de la Respuesta Inmune Adquirida.

AGRADECIMIENTOS

A Leidy Castillo, estudiante del programa de Enfermería de la Fundación Universitaria del Área Andina, por suministrar la foto de una paciente con leishmaniasis cutánea tomada durante las visitas de vigilancia epidemiológica en el Municipio de Florian-Santander.

REFERENCIAS

- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22(12): 552-557.
- Appelberg, R. (2007). Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* Feb;15(2): 87-92.
- Bates, P.A., Rogers, M.E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med.* 4(6):601-609.
- Beil, W.J., Meinardus-Hager, G., Neugebauer, D.C., Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 52(2): 135-142.
- Chang, K.P. (1981). Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 30(2): 322-333.
- Charmoy, M., Megnekou, R., Allenbach, C., Zweifel, C., Perez, C., Monnat, K., et al. (2007). *Leishmania major* induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol.* 82(2): 288-299.
- Chen, L., Zhang, Z.H., Watanabe, T., Yamashita, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., et al. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int.* 54(2): 109-118.
- Chen, L., Zhang, Z.H., Watanabe, T., Yamashita, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., et al. (2005). The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. *Parasitol Int.* 54(2): 109-118.
- Colombia. SIVIGILA. (2007). Sistema de vigilancia en salud pública, Ministerio de la Protección Social. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica No. 52.
- Da Silva, R., Sacks, D.L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun.* 55(11): 2802-2806.
- De Moura, T.R. Novais, F.O., Oliveira, F., Clarencio, J., Noronha, A., Barral, A., et al. (2005). Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 73(9): 5827-5834.
- Dovi, J.V., Szpadarska, A.M., DiPietro, L.A. (2004). Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost.* 92(2): 275-280.

- Diegelmann, R.F., Evans, M.C. (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 1; 9: 283-289.
- Donnelly, K.B., Lima, H.C., Titus, R.G. (1998). Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *J Parasitol.* 84(1): 97-103.
- Dransfield, I., Buckle, A.M., Savill, J.S., McDowall, A., Haslett, C., Hogg, N. (1994). Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol.* 153(3): 1254-1263.
- Faurschou, M., Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 5(14): 1317-1327.
- Homburg, C.H., de Haas, M., von dem Borne, A.E., Verhoeven, A.J., Reutelingsperger, C.P., Roos, D. (1995). Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood.* 85(2): 532-540.
- Honigberg, B.M. (1963). Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool.* 10: 20-63.
- King, R.J., Campbell-Lendrum, D.H., Davies, C.R. (2004). Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 10(4): 598-607.
- Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci.* 13: 2400-2407.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C. et al. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun.* 70(2): 826-835.
- Lemos-de-Souza, V., Ascensão-Souza, J., Correia-Silva, T.M., Sampaio-Tavares-Veras, P., Rodrigues-de-Freitas L.A. (2000). Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. *Microbes Infect.* 2(15): 1807-1815.
- Lima, G.M., Vallochi, A.L., Silva, U.R., Bevilacqua, E.M., Kiffer, M.M., Abrahamsohn, I.A. (1998). The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous Leishmaniasis. *Immunol Lett.* 64(2-3): 145-151.
- Martin, C., Burdon, P.C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Williams, T.J., Rankin, S.M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 2003 Oct;19(4): 583-593.
- McGettrick, H.M., Lord, J.M., Wang, K.Q., Rainger, G.E., Buckley, C.D., Nash, G.B. (2006). Chemokine- and adhesion-dependent survival of neutrophils after transmigration through cytokine-stimulated endothelium. *J Leukoc Biol.* 79(4): 779-788.
- Mendivelso, N. (2008). Leishmaniasis, una enfermedad que viene con la guerra. Periódico *El Tiempo*. Publicado el 25 de mayo de 2008. Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-3570188>
- Morgado, F.N., Schubach, A., Rosalino, C.M., Quintella, L.P., Santos, G., Salgueiro, M., Conceição-Silva, F. (2008). Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol.* 158(1): 50-58.
- Moulding, D.A., Quayle, J.A., Hart, C.A., Edwards, S.W. (1998). Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood.* 92(7): 2495-2502.
- Muraille, E., De Trez, C., Pajak, B., Torrentera, F.A., De Baetselier, P., Leo, O., 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(5): 2704-2715.
- Organización Mundial de la Salud (2008). Report of the consultative meeting on cutaneous Leishmaniasis. Neglected Tropical Diseases. Innovative and Intensified Disease Management.

- Leishmaniasis Control Programme. WHO/HTM/NTD/IDM/2008.7
- Palma, G.I., Saravia, N.G. (1997). In situ characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. *Am J Dermatopathol.* 19(6): 585-590.
- Payne, C.M., Glasser, L., Tischler, M.E., Wyckoff, D., Cromey, D., Fiederlein, R., Bohnert, O. (1994). Programmed cell death of the normal human neutrophil: an in vitro model of senescence. *Microsc Res Tech.* 28(4): 327-344.
- Peniche, A.G., Osorio, E.Y., Melby, P.C., Travi, B.L. (2006). Neutrophil infiltration is associated with initial parasite control but subsequently contributes to tissue damage in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Am J Trop Med Hyg* 75(5): 148.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., et al. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 15; 321(5891): 970-974.
- Pompeu, M.L., Freitas, L.A., Santos, M.L., Khouri, M., Barral-Netto, M. (1991). Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop.* 48(3): 185-193.
- Remaley, A.T., Kuhns, D.B., Basford, R.E., Glew, R.H., Kaplan, S.S. (1984). Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production. *J Biol Chem.* 259(18): 11173-11175.
- Ribeiro-Gomes, F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-De-Souza, M.C., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A.C. et al. (2004). Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 172(7): 4454-4462.
- Ridley, D.S, Ridley, M.J. (1983). The evolution of the lesion in cutaneous leishmaniasis. *J Pathol.* 141(1): 83-96.
- Rogers, H.W., Unanue, E.R. (1993). Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun.* 61(12): 5090-5096.
- Rousseau, D., Demartino, S., Ferrua, B., Michiels, J.F., Anjuere, F., Fragaki, K., et al. (2001). In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol.* 1: 17.
- Saha, A.K., Das, S., Glew, R.H., Gottlieb, M. (1985). Resistance of leishmanial phosphatases to inactivation by oxygen metabolites. *J Clin Microbiol.* 22(3): 329-332.
- Sanchez, J.L., Diniega, B.M., Small, J.W., Miller, R.N., Andujar, J.M., Weina, P.J., et al. (1992). Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. *Am J Trop Med Hyg.* 47(1): 47-54.
- Savill, J., Haslett, C. (1995). Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol.* 6(6): 385-393.
- Schmitt, D.A., Ullrich, S.E. (2000). Exposure to ultraviolet radiation causes dendritic cells/macrophages to secrete immune-suppressive IL-12p40 homodimers. *J Immunol.* 165(6): 3162-3167.
- Seely, A.J., Pascual, J.L., Christou, N.V. (2003). Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* 7(4):291-307.
- Shoda, L. K., Kegerreis, K. A., Suarez, C. E., Mwangi, W., Knowles, D. P., Brown, W. C. (2001). Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-, and NO production by bovine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 70, 103-112.
- Smelt, S.C., Cotterell, S.E., Engwerda, C.R., Kaye, P.M. (2000). B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol.* 164(7): 3681-3688.
- Squier, M.K., Sehnert, A.J., Cohen, J.J. (1995). Apoptosis in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 57(1): 2-10.
- Tacchini-Cottier, F., Zweifel, C., Belkaid, Y., Mukankundiye, C., Vasei, M., Launois, P., et al. (2000). An Immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4+ Th2

- response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* 165(5): 2628-2636.
- Teixeira, M.J., Fernandes, J.D., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Pompeu, M.L., Santana da Silva, J., et al. (2005). Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun.* 73(2): 1191-1195.
- Thorne, K.J., Blackwell, J.M. (1983). Cell-mediated killing of protozoa. *Adv Parasitol.* 22: 43-151.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., et al. (2006). *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(37): 13837-13842.
- Vannier-Santos, M.A., Martiny, A., de Souza, W. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 8(4): 297-318.