

Estudio de la virulencia de la cepa causante del brote de leishmaniosis humana en Bosque Sur-Madrid

Alicia Mas Zubiri. Abel Martínez Rodrigo.

Grado en Veterinaria. UCM. Facultad de Veterinaria UCM.
alimas9224@gmail.com

Tutores

Francisco Javier Carrión Herrero. Gustavo Domínguez-Bernal.

Facultad de Veterinaria UCM. Dpto. Sanidad Animal. Grupo InBaVet
fjcarri@vet.ucm.es

Resumen: La leishmaniosis visceral es una enfermedad tropical olvidada o desatendida, no despierta el interés de la industria farmacéutica⁽¹⁾. El responsable de esta zoonosis es *Leishmania infantum*, un protozoo cuya transmisión tiene lugar a través de la picadura de un insecto díptero conocido como flebótomo, que actúa como vehículo de la enfermedad entre animales y personas. En España, además de los casos de leishmaniosis canina y felina, en los últimos tres años se ha generado una gran alarma social como consecuencia de un brote de leishmaniosis humana en Madrid (Parque Bosque Sur), originado por una cepa que está provocando la enfermedad incluso en personas inmunocompetentes⁽²⁾. Con el fin de determinar sus causas, estamos analizando la virulencia del aislado de *L.infantum* responsable de dicho brote. Por medio de ensayos de infección *in vitro*, hemos caracterizado el impacto de la virulencia parasitaria sobre la funcionalidad efectora de las células diana del parásito: células dendríticas y macrófagos. Los resultados, indican cómo el aislado parasitario no sólo es capaz de infectar un elevado porcentaje de células dendríticas, y con una elevada carga parasitaria por célula, sino que además puede mermar la síntesis de óxido nítrico (defensa celular) y potenciar la infección a través de un aumento de la actividad arginasa en los macrófagos infectados. Estos datos tienen una enorme relevancia en el contexto del diseño de medidas de control de la leishmaniosis, desde un punto de vista preventivo, vacunal y terapéutico.

Palabras clave: *Leishmania*. Macrófago. Célula dendrítica.

INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son un grupo de enfermedades englobadas por la OMS en la lista de enfermedades tropicales desatendidas u olvidadas. Son aquellas que no

despiertan el interés político ni farmacéutico, al afectar especialmente a poblaciones marginales de zonas tropicales ⁽¹⁾.

A pesar del enorme impacto que tienen en países del Tercer Mundo, cada año aparecen 1,3 millones de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 defunciones ⁽³⁾. Todavía no existe ningún método profiláctico completamente eficaz, pero existen evidencias experimentales que demuestran la posibilidad de diseñar estrategias vacunales.

Las leishmaniosis son consecuencia de la infección con algunas de las más de 20 especies del género *Leishmania*. Estas zoonosis tienen gran importancia tanto a nivel veterinario como en salud pública, al ser capaz de infectar tanto a personas como animales, siendo estos últimos los reservorios principales de la enfermedad. La transmisión se produce fundamentalmente por la picadura de un díptero perteneciente a los géneros *Phlebotomus* o *Lutzomyia*. Las especies animales afectadas son cánidos domésticos y silvestres, félidos, roedores y lagomorfos. Este parásito presenta un ciclo dimórfico pudiendo aparecer en fase intracelular (amastigote) dentro de macrófagos y células dendríticas, y en fase extracelular flagelada (promastigote) en el interior del vector.

Estas enfermedades son endémicas en más de 80 países de todo el mundo. En el caso de la Cuenca Mediterránea, se distribuye la especie *Leishmania infantum*. En España, esta especie es responsable tanto de los casos de leishmaniosis humana, como de los casos de leishmaniosis en perros y gatos, que representan un grave problema veterinario y facilitan la transmisión a los seres humanos. En el caso de la leishmaniosis canina, suelen presentarse de forma simultánea síntomas no sólo cutáneos (alopecias, ulceraciones, onicogriposis...), sino también viscerales (hepato-esplenomegalia y glomerulonefritis).

Existen tres cuadros clínicos principales, que vienen determinados por la especie de parásito implicada y la susceptibilidad del hospedador ⁽³⁾.

- Leishmaniosis visceral, la forma más grave, con fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia, fallo renal crónico y anemia.
- Leishmaniosis mucocutánea, destrucción masiva y desfigurativa de mucosas, especialmente a nivel nasal y bucal.
- Leishmaniosis cutánea, llagas o úlceras en las partes corporales expuestas a la picadura del mosquito, como la cara y las extremidades.

Leishmania infantum es un parásito intracelular obligado cuyas principales células diana son macrófagos y células dendríticas que son presentadoras de antígeno, por lo que una vez infectadas, presentan el parásito a los linfocitos T colaboradores vírgenes (Th0). Se genera una respuesta mixta Th1/Th2 de forma que en función de la

población linfocitaria predominante se determina la resistencia o susceptibilidad inmunitaria.

Cuando hay un predominio de linfocitos de tipo Th1, se producen citoquinas que favorecen la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS) que utilizando como sustrato la L-arginina, conduce a la síntesis de un compuesto letal para el parásito, el óxido nítrico. Así, se establece un fenotipo resistente frente a la infección, basado en la respuesta inmunitaria de tipo celular. Por el contrario, si predominan los linfocitos de tipo Th2, las células infectadas producen citoquinas diferentes a las anteriores, con la consiguiente activación de la enzima arginasa. Esta enzima compite con la iNOS por el mismo sustrato, para producir unos compuestos (poliaminas) que estimulan la multiplicación parasitaria y determina un fenotipo de susceptibilidad a la infección⁽⁴⁾. Además, el desequilibrio inmunitario hacia un perfil de tipo Th2 favorece la continua activación de los linfocitos B productores de anticuerpos (totalmente ineficaces ante un parásito intracelular) y la consiguiente formación de inmunocomplejos que al precipitar desencadenan gran parte de los signos clínicos.

Detectado en Bosquesur el mayor brote de leishmaniosis en humana

Aunque la leishmaniosis afecta tradicionalmente a personas inmunodeprimidas, actualmente en España el riesgo de sufrir esta enfermedad ha aumentado, incluso en personas inmunocompetentes.

Según describe el Informe del Estado de Salud de la Población de la Comunidad de Madrid 2010⁽⁵⁾, en los últimos tres años se ha generado una gran alarma social como consecuencia de un brote de leishmaniosis humana en la localidad madrileña de Fuenlabrada relacionado con la creación de un parque en un terreno anteriormente utilizado como escombrera. El hábitat del flebótomo requiere la presencia de humedad y materia orgánica en descomposición, por lo que la localización del parque favorecía en gran medida la proliferación del insecto vector. Esto, unido a la gran afluencia de gente paseando por el parque y de animales, cuyo papel reservorio hasta ahora era desconocido, han podido ser los desencadenantes del brote.

El aumento significativo del número de casos en personas sanas, obligó a las autoridades a investigar el papel de los perros como reservorios, sin llegar a ningún resultado que justificará la creciente incidencia. Estudios posteriores determinaron que un 30% de las liebres de la zona estaban infectadas con la cepa de *L. infantum* responsable de la enfermedad en las personas afectadas, lo que ha puesto de manifiesto el importante papel de las mismas como reservorio. Sin embargo, aún hoy no se conocen con detalle las razones que han permitido al parásito infectar a personas inmunocompetentes.

En este contexto, y con el objetivo de estudiar un posible incremento de la virulencia del parásito, hemos realizado ensayos de infección ex vivo, utilizando el aislado de *L. infantum* responsable del brote de BosqueSur. Así, hemos contribuido a la

caracterización de la funcionalidad efectora de células dendríticas y macrófagos infectados experimentalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Parásitos

Los parásitos de *L. infantum* que hemos utilizado corresponden a las siguientes cepas:

- Cepa MCAN/ES/96/BCN/150, MON-1, aislada de un perro leishmaniósico.
- Cepa SUR (todavía sin catalogar), aislada de flebotomos capturados en el último brote de leishmaniosis de BosqueSur.

En todos los casos, los promastigotes fueron cultivados a 26°C en medio Schneider.

Células dendríticas y macrófagos

Los ratones utilizados se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de acuerdo a las condiciones estándar aprobadas por el comité ético de la UCM siguiendo a nivel europeo la Directiva del Consejo 86/609/CEE y a nivel nacional el R. D. 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. A partir de dos ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad (Harlan Interfauna Ibérica S.A.) se obtuvieron las células precursoras procedentes de médula ósea, siguiendo un método previamente descrito⁽⁶⁾. Se mantuvieron en cultivo en presencia de los correspondientes factores crecimiento para obtener la diferenciación a células dendríticas y macrófagos después de 8 días de cultivo.

Infección ex vivo y estimación de la funcionalidad de las células presentadoras

Las células dendríticas y los macrófagos procedentes de médula ósea, fueron infectadas con las correspondientes cepas de *L. infantum* (cepa MCAN/ES/96/BCN/150 y cepa SUR) a una proporción de 10 parásitos por célula, siguiendo un método ya descrito⁽⁷⁾. Después de 4h de infección se retiraron los parásitos que no habían sido capaces de infectar las células. Posteriormente, se mantuvieron los cultivos celulares durante 24 h en placas multipocillo-Labtek, donde finalmente se fijan, tiñen y montan las preparaciones para su observación microscópica. De esta manera se ha podido determinar el [porcentaje de células infectadas y la intensidad de infección](#) (nº amastigotes por célula infectada). Por otro lado, las muestras se trasladaron a placas de fondo plano de 96 pocillos en duplicados de 200 µl y se midió la absorbancia a 540 nm. En el lector 2001 de microplacas. Así, se midieron los niveles de [nitritos](#) (como

estimación indirecta de la actividad de la iNOS) y de la actividad arginasa tras la infección, siguiendo un método ya publicado⁽⁴⁾.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Tras los ensayos de infección *ex vivo*, hemos determinado el porcentaje de células infectadas y la intensidad de infección de la cepa BCN y la cepa SUR, a los tiempos 0 (T0) y 24 h (T24) de infección. En el caso de la cepa BCN, los porcentajes de infección que obtuvimos a T0-24 fueron del 57 y 58% respectivamente y la intensidad de infección por célula para los mismos tiempos fueron 2,47 y 2,48. Se puede apreciar que no hay un cambio significativo en la infección en ambos tiempos. Para la cepa SUR los porcentajes de infección a T0-24 fueron del 64% y 76% respectivamente y la intensidad de infección del 2,46 y 3,94. A diferencia de la cepa anterior en este caso se produce un aumento marcado de la infectividad. En este contexto, la infección con la cepa SUR conduce a un fenotipo celular encaminado a la supervivencia parasitaria, como demuestran el aumento de la actividad arginasa y la disminución de la síntesis de nitritos, en comparación a la cepa BCN (Fig. 1).

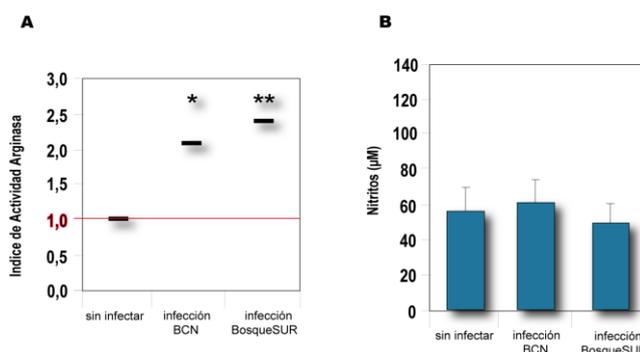


Figura 1. A) Índices de la actividad arginasa en relación a la actividad basal celular (línea roja). B) Niveles de producción de nitritos. Se muestran los valores promedio (trazos) y las desviaciones estándar. *P<0,05, **P<0,01 diferencias significativas relativas al nivel basal.

El estudio comparativo de dichos resultados indica que ha existido un aumento de la virulencia del parásito, que podría relacionarse con la capacidad de infección en personas inmunocompetentes, sin embargo son necesarios más estudios que nos permitan entender mejor los mecanismos y causas de este incremento en la virulencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bethony J.M., Cole R. N., Guo X., Loukas A., Petri W., Valenzuela J. G., Hotez P.J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol Rev.* 2011; 239 (1):

237-270.

2. Jimenez M., González E., Iriso A., Molina R. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniosis in Madrid, Spain. *Parasitol Res.* 2013; 112 (7): 2453-2459.
3. Gallego M. Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis. *Rev. sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2004, 23 (2), 661-676.
4. Muleme H. M., Reguera R.M., Berard A., Beverley S., Uzonna J.E. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *J Immunol.* 2009 Dec 15;183(12):8068-76.
5. Aguado M., Espinosa P., Romero-Matía A., Tardíob J.C., Córdoba S., Borbujoa J. Brote de leishmaniosis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermosifiliogr.* 2013; 104 (4): 334-342
6. Carrión J, Nieto A, Soto M, Alonso C. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Leishmania infantum* nucleosomal histones confers protection against cutaneous leishmaniosis in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2007 May;9(6):735-43.
7. Cunha J, Carrillo E, Sánchez C, Cruz I, Moreno J, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2013 Apr 26;6:122.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.