

ARTÍCULO DE REFLEXIÓN/REFLECTION PAPER

APAGANDO GENES PARA ILUMINAR LA INTERACCIÓN ENTRE EL MACRÓFAGO Y *Leishmania*

Shutting Down Genes to Illuminate the Interaction Between the Macrophage and *Leishmania*

Carlos Arturo CLAVIJO-RAMÍREZ¹.

¹ Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Cra. 45 n°. 26-85, edificio 421, oficina 211. Bogotá, Colombia.

For correspondence. caclavijor@unal.edu.co

Received: 28th May 2015, Returned for revision: 23th July 2015, Accepted: 9th October 2015.

Associate Editor: María Consuelo Burbano Montenegro.

Citation / Citar este artículo como: Clavijo-Ramírez CA. Apagando genes para iluminar la interacción entre el macrófago y *Leishmania*. Acta biol. Colomb. 2016;21(1)Supl:S259-263. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1sup.50885>

RESUMEN

La enfermedad causada por los parásitos del género *Leishmania* representa un problema de salud pública de importancia a nivel nacional e internacional. El conocimiento actual de la interacción entre el macrófago humano y el parásito aún luce insuficiente para reflejarse en mejoras del tratamiento empleado. El presente manuscrito aspira a ser un texto de divulgación para el público general y trata de explicar la importancia de este tipo de investigación científica y la estrategia empleada por nuestro grupo de investigación, en la búsqueda de soluciones al flagelo representado por los diferentes tipos de Leishmaniasis.

Palabras clave: estrategia experimental, Leishmaniasis, silenciamiento genético, tratamiento.

ABSTRACT

The diseases caused by the parasite belonging to the genus *Leishmania* represent a public health challenge both at national and international levels. Current knowledge about macrophage-parasite interaction still remains insufficient in order to be translated into more effective patient treatments. The present manuscript aspires to be a communication to non-specialists and the general public, aiming to explain the importance of this type of basic science as well as the strategy followed by our research group, in the pursuit of solutions to the burden represented by Leishmaniasis.

Keywords: experimental strategy, gene silencing, Leishmaniasis, treatment.

INTRODUCCIÓN

El cuerpo del ser humano se compone de millones de unidades pequeñas llamadas células. Cada una de esas células tiene una organización y una composición compleja que le permite funcionar como una máquina, mucho más sofisticada que cualquiera de las máquinas que el ser humano mismo ha construido. Las células de nuestro cuerpo tienen diferentes especialidades asociadas con sus múltiples funciones. Por ejemplo, las neuronas de nuestro sistema nervioso, están especializadas en la transmisión de señales a lo largo y ancho de nuestro organismo. Las células de nuestra piel se especializan entre otras cosas, en proteger

los órganos internos y prevenir la entrada de organismos patógenos que pueden colonizar nuestro cuerpo causando enfermedades. Un subgrupo muy importante de células corresponde a aquellas que forman nuestro sistema de defensa. Ese sistema de defensa recibe el nombre de sistema inmunológico.

Dentro del sistema inmunológico a su vez existen diferentes especialidades cumplidas por diferentes tipos de células. Por ejemplo, hay un grupo de células encargadas de patrullar cada uno de los rincones de nuestro cuerpo, en busca de posibles patógenos (entidades capaces de generar enfermedades) y de células infectadas por virus e incluso de

restos de células muertas. Estos patrulleros los llamamos macrófagos, este nombre hace referencia a que pueden “comer” (fago) “cosas grandes” (macro) relativo a su propio tamaño. Estos macrófagos no solo sirven para recoger toda la “basura celular” y “chequear a los chicos sospechosos que hay en el vecindario celular”, que encuentran en su camino, sino que además procesan lo que “comen” y le dan “muestras gratis” a otras células del sistema inmunológico, ayudándolas en su función de control de enfermedades.

A pesar de que los macrófagos son muy importantes para detener posibles infecciones, en ciertos casos los macrófagos son el blanco de invasión por parte de patógenos. Un ejemplo es el caso de los parásitos del género *Leishmania*. La infección por este parásito causa la enfermedad llamada Leishmaniasis, que afecta a miles de personas en Colombia y en el mundo.

¿Cuál es el problema?

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos del género *Leishmania*. Tiene diferentes formas clínicas que reciben el nombre de: Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis mucocutánea, Leishmaniasis difusa y Leishmaniasis visceral (Herwaldt, 1999). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, se estima que hay alrededor de 1,3 millones de casos nuevos y de 20 a 30 mil muertes cada año (WHO, 2015). Por su parte el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública –SIVIGILA de Colombia, reportó que en el año 2014 se presentaron en el país 11120 casos de Leishmaniasis cutánea, 150 de Leishmaniasis mucosa y 45 de Leishmaniasis visceral. Para la semana 13 del año 2015, el número de casos reportados es: 1357, 12 y 31, respectivamente (SIVIGILA, 2015).

Las personas afectadas por Leishmaniasis cutánea sufren de lesiones en la piel en forma de úlceras que pueden sanar espontáneamente o dejar cicatrices de por vida. La Leishmaniasis mucocutánea afecta las mucosas de la boca, nariz y garganta, causando su destrucción parcial o total. Finalmente la Leishmaniasis visceral se caracteriza por fiebres esporádicas, pérdida de peso, incremento de tamaño de bazo e hígado. En este caso la enfermedad puede ser fatal si no es tratada oportunamente (Murray *et al.*, 2005).

El ciclo de infección inicia cuando los parásitos son transmitidos a través de la picadura de una mosquita hembra de los géneros *Lutzomyia* o *Phlebotomus*, infectada por *Leishmania* y que al alimentarse de sangre del humano, transmite los parásitos a la zona de la picadura (Bates, 2007). Los parásitos son capturados por células del sistema inmunológico incluyendo macrófagos (Ritter *et al.*, 2009; Ueno y Wilson, 2012). Probablemente la mayoría de los parásitos son eliminados por los macrófagos, pero dependiendo de varios factores es posible que algunos de los parásitos sobrevivan dentro de los macrófagos (Reithinger *et al.*, 2007). Como veremos más adelante en este documento, los parásitos poseen varios mecanismos

que les permiten sobrevivir dentro de macrófagos e infectar nuevos macrófagos (Van Assche *et al.*, 2011). Se cree que una respuesta inmunológica desfavorable del organismo frente a la presencia persistente de los parásitos, causa las lesiones características de la Leishmaniasis (Bogdan, 2008; Birnbaum y Craft, 2011).

Tratamiento

Los tratamientos disponibles para la Leishmaniasis se caracterizan por ser altamente tóxicos. Los medicamentos empleados en la actualidad incluyen Antimonio Pentavalente, pentamidina, anfotericina B, paromomicina y miltefosine. En su mayoría requiere de inyecciones intravenosas o intramusculares diarias durante 15 a 28 días. Los efectos secundarios asociados a los tratamientos pueden incluir, fatiga, dolores corporales, pancreatitis química e incluso insuficiencia renal. La mayoría de los tratamientos causan efectos secundarios moderados pero algunos son severos al punto de causar la detención del tratamiento (Amato *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2011; Rajasekaran y Chen, 2015). El problema se hace aún más grave si se considera la falta de acceso a los tratamientos existentes (Den Boer *et al.*, 2011). Estas características de los medicamentos y el hecho de que en ciertos casos existe falla terapéutica, es decir, luego del tratamiento completo la enfermedad persiste, hacen necesaria la búsqueda de mejores alternativas para el tratamiento de la Leishmaniasis (Croft y Olliaro, 2011).

¿Cómo podemos contribuir a la solución del problema?

En principio, la solución a todo problema requiere entender la naturaleza del mismo. El caso de la Leishmaniasis no es diferente; requiere que entendamos en qué consiste la enfermedad a diferentes niveles. Durante el proceso de infección podemos hablar de dos tipos celulares interactuando. Por una parte se encuentra el parásito (*Leishmania* spp.), y por otra las células que el parásito infecta, es decir, los macrófagos. Cualquier esperanza de poder darle solución al problema de la Leishmaniasis depende de nuestra comprensión de la interacción entre el parásito y el macrófago (Beattie *et al.*, 2008).

Hasta el momento existe una buena cantidad de información obtenida mediante el trabajo de muchos investigadores alrededor del mundo, referente a la interacción entre *Leishmania* y el macrófago humano (Ruiz y Becker, 2007; Huynh y Andrews, 2008; Liese *et al.*, 2008; Naderer y McConville, 2008; Stuart *et al.*, 2008; Tuon *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2009). A pesar de esta gran cantidad de información todavía estamos muy distantes de una comprensión suficiente para que se traduzca en la prevención de la enfermedad o en tratamientos efectivos con baja toxicidad (Palatnik-de-Sousa, 2008).

A continuación veremos algunos ejemplos de lo que conocemos de la interacción parásito macrófago.

Con ustedes: ¡el gran leishmanini!

Parodiando el nombre de Houdini, el gran mago e ilusionista de finales del siglo XIX e inicios del siglo XX, *Leishmania* parece haber “adquirido” a lo largo de su evolución una gama completa de “trucos” que le permiten “engañar” a su víctima, el macrófago (Kima, 2007; Osorio *et al.*, 2007; Arango-Duque y Descoteaux, 2015).

Uno de los trucos que despliega el parásito es el poder de disuasión del macrófago. Normalmente los macrófagos son células especializadas en capturar y eliminar agentes foráneos tales como bacterias y otros patógenos (Mosser y Edwards, 2008). La captura de estos agentes recibe el nombre técnico de fagocitosis porque semeja un proceso de alimentación (fago), en el que la célula abraza y engolfa al patógeno con su membrana plasmática y el patógeno termina dentro del macrófago en una especie de cápsula (denominada fagolisosoma), dentro de la cual el macrófago vierte una serie de proteínas que destruyen al patógeno. Esta reacción un tanto violenta pero necesaria del macrófago, es disparada por las moléculas que tiene en su superficie el patógeno. Son esas moléculas de superficie las que le permiten al macrófago detectar al patógeno y actuar de la manera apropiada. Sin embargo, en el caso de *Leishmania*, el parásito tiene una cubierta en su superficie que facilita que sea fagocitado por el macrófago, pero una vez dentro del macrófago esa misma cubierta retrasa el proceso que normalmente destruiría al parásito (Cunningham, 2002). En otras palabras, una vez dentro del macrófago el parásito engaña o disuade al macrófago, evitando así su destrucción.

Un segundo set de trucos en la “manga” de *Leishmania*, consiste en su capacidad para “doblegar la voluntad del macrófago”. Normalmente cuando captura patógenos, el macrófago alerta a otras células del sistema inmunológico enviando mensajes bioquímicos, para que contribuyan en el control de la posible infección. El tipo y la cantidad de mensajes enviados por los macrófagos, determinan en gran parte si el organismo será capaz o no de controlar una posible infección. Un llamado exagerado por parte del macrófago puede causar más daño que bien al tejido del propio organismo (Mosser y Edwards, 2008). *Leishmania* modifica el comportamiento del macrófago, causando en primer lugar que falle en su capacidad para destruir al parásito y en segundo lugar alterando el tipo de mensajes que envía a su entorno, exagerando la respuesta local del sistema inmunológico y por lo tanto causando daño en los lugares aledaños a la infección (Olivier y Gregory, 2008).

Aún tenemos mucho por entender a nivel celular, de los procesos que se llevan a cabo cuando interactúa el parásito con el macrófago. Nuestra estrategia a largo plazo para tratar de contribuir a la solución del problema de la Leishmaniasis, es la de entender en gran detalle esos procesos de interacción, con el fin de identificar posibles alternativas para ayudar al macrófago a contrarrestar al parásito.

A continuación explicaremos algunas de las estrategias experimentales que estamos empleando en nuestro grupo de investigación para entender esa interacción parásito macrófago.

¿Qué es lo que hacemos para tratar de contribuir a la solución?

Todo tipo de célula incluyendo el macrófago y el parásito, posee miles de proteínas diferentes necesarias para su funcionamiento. Las instrucciones necesarias para la síntesis de esas proteínas se encuentran en el material genético de la célula (ADN). No todas las instrucciones son leídas al mismo tiempo, es decir, las células expresan diferentes genes dentro de la gama que tienen a su disposición, a diferentes tiempos e incluso en diferentes cantidades. Las proteínas que posee una célula en un momento determinado, interactúan unas con otras formando redes y estas redes son necesarias para que la célula cumpla con todas sus funciones.

El trabajo de nosotros los biólogos celulares consiste en averiguar cómo funcionan las células. En este caso, tratamos de averiguar cómo funcionan simultáneamente el macrófago y el parásito. Una manera de averiguar cómo funciona una célula es dividiendo esa gran pregunta, en muchas preguntas pequeñas. Por ejemplo, ¿cuál es la función de una proteína que se encuentra en la célula?. Si deseamos saber cuáles funciones cumple una proteína dentro de la célula, podemos emplear la estrategia de eliminar la proteína de la célula y observar el comportamiento de la célula al compararlo con células que todavía posean la proteína. Para explicar este concepto emplearemos una analogía.

Imaginemos que deseamos averiguar cómo funciona un automóvil. Estamos familiarizados con el automóvil; sabemos que sirve para transporte, sabemos que tiene un gran número de partes y es fácil presumir que cada una de esas partes cumple una función para que el automóvil sirva para transporte.

Supongamos por un momento que no sabemos para qué sirven ninguna de las partes del automóvil, pero deseamos averiguarlo. Una estrategia para averiguar para qué sirve una parte, por ejemplo el timón, sería remover el timón del automóvil y observar el comportamiento del vehículo en ausencia del timón. En este experimento imaginario, pronto sería evidente para nosotros que el timón es importante para que el movimiento del vehículo siga una dirección determinada. Supongamos ahora, que queremos averiguar la función de esos objetos circulares que se encuentran en la parte inferior del vehículo (ruedas). Removemos una rueda a la vez y comparamos cómo se mueve el vehículo sin una rueda, respecto al vehículo con todas sus ruedas. De nuevo, eventualmente será evidente que cada una de las ruedas es necesaria para el movimiento del vehículo. Creo que para este entonces ya es clara la idea. Si deseamos conocer la función de un componente de un sistema complejo como lo es un automóvil o una célula, una estrategia es remover

selectivamente ese componente y observar el resultado al compararlo con contrapartes que todavía posean el componente de interés.

Esta es la estrategia que empleamos, para averiguar cuáles genes o cuáles proteínas son importantes para el proceso de infección del macrófago por parte del parásito. Eliminamos selectivamente proteínas particulares y observamos que pasa con el proceso de infección.

El nombre técnico de la metodología que empleamos es silenciamiento genético mediante ARN de interferencia. Consiste en la eliminación específica de la molécula intermediaria empleada durante la síntesis de proteínas, que recibe el nombre de ARN mensajero. Para esto, introducimos dentro del macrófago otra molécula de ARN (ARN de interferencia) con una secuencia complementaria al ARN mensajero y al ser reconocida por cierta maquinaria celular, es empleada para la destrucción selectiva del ARN mensajero que se quiere “silenciar”. La consecuencia de este procedimiento es la eliminación de ARN mensajeros específicos y la reducción de la cantidad de proteína codificada por dichos ARN mensajeros en la célula. De esta manera es posible remover proteínas específicas para evaluar su función en el proceso de infección por parte de *Leishmania*.

Cada vez que realizamos esta remoción de una proteína (es decir, silenciamos un gen) del macrófago tenemos en teoría tres posibles resultados desde el punto de vista de la infección al compararlo con macrófagos normales:

1. La infección es mayor. La interpretación en este caso es que el componente que removimos es importante para que el macrófago contrarreste al parásito.
2. La infección es menor. La interpretación en este caso es que el componente que removimos es importante para que el parásito prolifere dentro del macrófago.
3. La infección es igual. La interpretación en este caso es que el componente que removimos no parece tener importancia para el proceso de infección.

La identificación de cuáles componentes (proteínas, genes, etc.) son importantes para el proceso de infección es el primer paso para tratar de identificar los mecanismos que se presentan durante la infección. Este conocimiento nos permitirá identificar posibles estrategias de control de la infección y potencialmente el desarrollo de terapias más específicas y menos tóxicas para el control de esta enfermedad (Hartley *et al.*, 2013).

REFERENCIAS

- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):266-274.
- Arango-Duque G, Descoteaux A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr Opin Microbiol.* 2015;26:32-40. Doi:10.1016/j.mib.2015.04.007
- Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Inter J Parasitol.* 2007;37(10):1097-1106. Doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Beattie L, Evans KJ, Kaye P, Smith, DF. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunol.* 2008;30(4):255-266. Doi:10.1111/j.1365-3024.2008.01020.x
- Birnbaum R, Craft N. Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatologic Clinics.* 2011;9(1);89-102. Doi:10.1016/j.det.2010.08.014
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: Leishmaniasis as an example. *Cell Microbio.* 2008;10(6);1221-1234. Doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01146.x
- Croft SL, Olliaro. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 2011;7(10);1478-1483. Doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
- Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002;72(2):132-141. Doi:10.1006/exmp.2002.2418
- Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microb Infect.* 2011;17(10):1471-1477. Doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x
- Hartley M, Kohl K, Ronet C, Fasel N. The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(2):119-130. Doi:10.1111/1469-0691.12095
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185),1191-1199. Doi:10.1016/S0140-6736(98)10178-2
- Huynh C, Andrews NW. Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*. *Cell Microbiol.* 2008;10(2),293-300. Doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01095.x
- Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1087-1096. Doi:10.1016/j.ijpara.2007.04.007
- Lang T, Lecoer H, Prina E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol.* 2009;25(10):464-473. Doi:10.1016/j.pt.2009.07.006
- Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):377-387. Doi:10.1016/j.imbio.2007.12.005
- Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. Doi:10.1038/nri2788
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561-1577. Doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5

- Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008;10(2):301-308. Doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica.* 2011;118(2):87-96. Doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007
- Olivier M, Gregory DJ. Interactions Between *Leishmania* the Host Macrophage. In: Myler PJ, Fasel N, editors. *Leishmania: After The Genome.* Caister Academic Press; 2008. p. 239-262..
- Osorio Y Fortéa J, Prina E, De La Llave E, Lecoeur H, Lang T, Milon G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. *Immunol Rev.* 2007;219(1):66-74. Doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00559.x
- Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008;26(14):1709-1724. Doi:10.1016/j.vaccine.2008.01.023
- Rajasekaran R, Chen YPP. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov Today.* 2015;20(8):958-968. Doi:10.1016/j.drudis.2015.04.006
- Reithinger R, Dujardin J, Louzir H. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(6):581-596. Doi:10.1111/j.1600-0560.2011.01844.x
- Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites?. *Trends Parasitol.* 2009;25(11):505-510. Doi:10.1016/j.pt.2009.08.003
- Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007;29(12):671-678. Doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00991.x
- Sivigila. Vigilancia Rutinaria [Internet]. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2015. [cited Apr 28 2015]. Available from: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler R.E., McKerrow J, Tarleton R. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 2008;118(4):1301-1310. Doi:10.1172/JCI33945
- Tuon FF, Amato VS, Bacha HA, AlMusawi T, Duarte MI, Neto VA. Toll-like receptors and leishmaniasis. *Infect Immun.* 2008;76(3):866-872. Doi: 10.1128/IAI.01090-07
- Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* 2012;28(8):335-344. Doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002
- Van Assche T, Deschacht M, Inocência da Luz R A., Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(2):337-351. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011
- WHO. Statistical Profile-Colombia-2000-2012 [Internet]. [Cited Apr 28 2015]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

