

1 Article

2 Caracterización hematológica, histopatológica y parasitológica 3 temprana y su asociación con el desenlace clínico en la 4 infección experimental con *Leishmania (Viannia) panamensis*

5 Malory Botero Cuadros^{1,2}, Natalia García Valencia¹, Erika Caro Gomez¹, José Robinson Ramírez Pineda^{1*}

6 1 Grupo Inmunomodulación (GIM)

7 2 Estudiante de pregrado de Microbiología y bioanálisis

8 * Correspondencia: jrobinson.ramirez@udea.edu.co

9 **Resumen** (1) Introducción: La leishmaniasis cutánea (LC) por *Leishmania (Viannia) panamensis*
10 (*L(V)p*) es una enfermedad tropical de gran importancia en Colombia cuya manifestación clínica
11 predominante corresponde a úlceras de gravedad muy diversa. Gracias a esfuerzos previos del
12 grupo de investigación, se logró establecer un modelo animal de LC que reproduce muchas de las
13 características de la enfermedad humana, incluyendo la variación en la severidad de las lesiones.
14 Con la intención de contribuir a un mejor entendimiento del origen de tal diversidad, se llevó a cabo
15 un estudio en ratones BALB/c, dirigido a evaluar cambios tempranos que pudieran correlacionarse
16 con el desenlace clínico. (2) Objetivo: Evaluar el perfil hematológico, histopatológico y
17 parasitológico inducido de manera temprana en respuesta a la infección con *L(V)p* y su relación con
18 la severidad del desenlace clínico. (3) Materiales y métodos: Se realizaron infecciones en ambas
19 orejas con 10⁵ promastigotes de *L(V)p* vía intradérmica. A una de las orejas se le hizo biopsia para
20 estudios histopatológicos y cuantificación de cargas parasitarias, mientras que a la otra oreja se le
21 realizó seguimiento semanalmente hasta la resolución clínica; adicionalmente se tomaron muestras
22 de sangre de la cola en 3 tiempos diferentes para realizarles un hemoleucograma. (4) Resultados:
23 Los ratones se clasificaron en dos grupos, moderados y graves, de acuerdo a la severidad de las
24 lesiones y al tiempo que tardaron en resolverse. Los moderados mostraron un aumento de los
25 neutrófilos en el *Onset* (2-3 semanas posinfección), con posterior disminución tras la *Consolidación*
26 de la lesión, mientras que los graves mostraron un patrón opuesto. Las cargas parasitarias no se
27 correlacionaron con la gravedad clínica. El análisis histopatológico grueso de las lesiones no
28 permitió establecer su asociación con algún perfil de severidad y fue no concluyente. (5) Conclusión:
29 El aumento de los neutrófilos en sangre en el *Onset* parece representar un factor que protege de
30 lesiones graves. Por otro lado, la ausencia de respuesta de neutrófilos en estos mismos tiempos y su
31 aumento cuando la lesión ya está consolidada se asocia con un patrón de cronicidad y mayor
32 gravedad de las lesiones. No se encontró relación entre la carga parasitaria y la severidad de las
33 lesiones.

34 **Palabras clave:** Leishmaniasis cutánea; BALB/c; infección intradérmica; modelo animal;
35 parasitología; manifestaciones clínicas, severidad de la lesión.

37 1. Introducción

38 La leishmaniasis es una enfermedad crónica desatendida causada por parásitos del género
39 *Leishmania* y transmitida por flebótomos de la familia *Psychodidae*. Se encuentra entre las
40 10 principales enfermedades tropicales a nivel mundial. Tradicionalmente se ha
41 clasificado como leishmaniasis del Viejo o Nuevo Mundo, según su ubicación geográfica.
42 La leishmaniasis del Viejo Mundo afecta a países de Asia, África y Europa, por especies
43 como *L. trópica*, *L. major*, *L. aethiopic*, *L. infantum* o *L. donovani*. Mientras que la

leishmaniasis del Nuevo Mundo ocurre en las Américas y es causada principalmente por *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* o *L. infantum chagasi* [1]. Gracias a esta diversidad de especies, la leishmaniasis presenta tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral, siendo la primera la más frecuente. El 85% de los casos de leishmaniasis cutánea se concentran en América, principalmente en Brasil, Perú y Colombia. En esta región se han identificado 15 de las 22 especies patógenas para el hombre, en su mayoría asociadas al subgénero *Viannia* [1,2,3,4]. En Colombia, la leishmaniasis es una enfermedad endémica en gran parte del territorio; para el año 2023 en el periodo epidemiológico III se reportaron 655 casos de los cuales 644 pertenecen a leishmaniasis cutánea (LC), con una incidencia de 61,15 casos por 100,000 habitantes en riesgo [5-6]. La especie más común en el país es *Leishmania (Viannia) panamensis (L(V)p)*, responsable de la mayoría de los casos cutáneos [7]. La LC se trata usualmente con antimoniales pentavalentes administrados de manera parenteral, pero presentan inconvenientes como su difícil administración, poca adherencia, toxicidad con sus consecuentes efectos adversos y, no en pocas ocasiones, falla en la eficacia. Actualmente no hay vacunas efectivas para prevenir la enfermedad. Por lo tanto, hay una gran necesidad de comprender de manera detallada los mecanismos fisiopatogénicos de la leishmaniasis para poder desarrollar medidas de intervención efectivas [8].

Desde el punto de vista fisiopatológico, no se comprende con exactitud por qué existen diferencias clínicas en la LC asociadas a cada especie de *Leishmania* y, aún más complejo, por qué una misma especie puede causar un espectro de presentación y gravedad en la enfermedad. Dicha variabilidad es atribuible a factores de virulencia propios de cada especie del parásito, a diferencias en la especie del vector y al tipo y magnitud de la respuesta inmune del hospedero [5]. La evidencia muestra que el espectro inmunológico desencadenado por la infección con especies de *Leishmania* dermatrópicas abarca un rango que se mueve entre dos tipos de respuestas extremas, y que conlleva a diferentes desenlaces clínicos. En un extremo se encuentra la LC difusa, que cursa con una pobre respuesta adaptativa celular de linfocitos T CD8+ y CD4+ y la consecuente incapacidad de activar los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Se trata de una presentación grave de la enfermedad, por fortuna, poco frecuente. En el otro extremo se encuentran las formas crónicas, en ocasiones mutilantes, que se presentan no solo en la piel sino que se extienden a algunas mucosas como las de la nariz, boca y garganta. Esta forma se caracteriza por una potente activación de linfocitos CD8+ y CD4+, con producción de interferón- γ (respuesta Th1), y por un control efectivo de la carga parasitaria, pero causando un daño colateral significativo al hospedero. En medio de dichos extremos hay varias formas clínicas más “benignas”, como la asintomática o la autoresolutiva, que se asocian con respuestas inmunes celulares suficientemente efectivas, pero además, reguladas, propiciando así un control efectivo de la multiplicación del parásito, pero sin provocar un daño inmunopatológico [9,10].

Como parásito intracelular, *Leishmania* se caracteriza por su gran complejidad a nivel inmunológico, con múltiples vías y células interviniendo en la respuesta efectora o en la evasión inmune. Se ha resaltado, por ejemplo, la importancia de los neutrófilos como moduladores claves de la respuesta innata. Los queratinocitos al ser las principales células de la epidermis reconocen el parásito a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), activan citoquinas y quimioquinas quienes median el reclutamiento de neutrófilos [10]. Se ha descrito que estas son las primeras células en ser reclutadas, las cuales pueden infectarse y tener un papel importante en la respuesta inflamatoria [10]. Estos se destacan por llegar rápidamente al sitio de infección e intentar controlar la infección a través de la activación de trampas extracelulares (NETs) y especies reactivas de oxígeno (ROS); a su vez, producen la quimioquina CCL3 para reclutar células dendríticas y modulan el microambiente en el sitio de infección permitiendo el inicio de

la respuesta inmune adaptativa. Se ha documentado en estudios con *L. major* que una respuesta oxidativa fuerte por parte de los neutrófilos tiene la capacidad de eliminar parásitos. Sin embargo, cuando los neutrófilos apoptóticos infectados son fagocitados por parte de los macrófagos, ocurre una transferencia de parásitos viables, actuando como “caballos de troya” y ayudando a la supervivencia de estos [11,5]. En conjunto, una extensa evidencia experimental demuestra la capacidad de los neutrófilos para modular el desarrollo de la enfermedad en las etapas tempranas de la infección hacia un perfil protector o agravante.

Dado que *L(V)p* es la especie más común en Colombia, el Grupo de Investigación Inmunomodulación (GIM) estableció recientemente un modelo animal experimental de LC utilizando esta especie. En este modelo, en el que se emplean ratones BALB/c infectados vía intradérmica en la oreja con 10^5 promastigotes, se evidenció el desarrollo de una enfermedad cutánea progresiva con lesiones ulcerativas típicas, de bordes indurados, con una gran similitud a las observadas en pacientes con LC por *L(V)p* [12]. La gran similitud en el patrón clínico, parasitológico, histopatológico e inmunológico observado entre los ratones y los humanos hace de este modelo una herramienta útil para investigar la patogénesis y la inmunidad a esta especie. Así, aprovechando este recurso, quisimos investigar algunos eventos tempranos, posteriores a la infección, que podrían influenciar en la progresión de la enfermedad. Analizamos entonces parámetros hematológicos, parasitológicos e histopatológicos con el objetivo de determinar si estas características guardan alguna relación con el desenlace clínico de la enfermedad en el modelo animal.

2. Materiales y métodos

2.1. Animales, parásitos e infección

Para llevar a cabo la investigación, se emplearon ratones BALB/c hembras y machos de 8 a 12 semanas de edad, adquiridos de Charles River Laboratory (Estados Unidos) y mantenidos en el bioterio SPF (libre de patógenos específicos murinos) de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia (UdeA). Se utilizó la cepa *L(V)p* UA-946 (MHOM/CO/93/UA-946) aislada originalmente del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET, UdeA, Medellín, Colombia), con la cual se ha establecido el modelo de LC [12]. Los promastigotes fueron cultivados en Medio Drosophila de Schneider (SDM, Sigma, EE. UU.) a 26°C y suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (Gibco, EE. UU.) inactivado por calor, 2 % de orina humana estéril y filtrada, 100 U/ml de penicilina (Gibco, EE. UU.) y 100 µg/ml estreptomina (Gibco, EE. UU.). El inóculo fue preparado en PBS con 10^5 promastigotes de *L(V)p* con los que los ratones fueron infectados en la oreja mediante inyección intradérmica utilizando jeringas con agujas ultrafinas (31G).

2.2. Seguimiento clínico

A partir de la primera semana posinfección, se inició el seguimiento de la lesión registrando semanalmente el área de la lesión, el score y obteniendo un registro fotográfico de cada animal, hasta observar la resolución clínica. El área se obtuvo al medir el diámetro de la lesión con un calibrador de Vernier para la aplicación de la fórmula $A = \pi (D1+D2/4)^2$. Y el score se obtuvo al realizar el promedio de la valoración de tres evaluadores, teniendo en cuenta que el score es una escala de estimación de gravedad donde se asigna un puntaje numérico según las características físicas de la lesión, de la siguiente manera: (0) animales sanos o que resolvieron clínicamente; (1) inflamación leve o nódulos pequeños no ulcerados; (2) nódulos que comienzan a ulcerarse o nódulos

grandes sin úlcera; (3) nódulos con úlcera activa con o sin costra o inicio de mutilación; (4) lesión con úlcera grande activa y abierta o lesiones con costra necrótica. Esta medida permite monitorear las lesiones durante todo el desarrollo clínico hasta la resolución, permitiendo calcular el área bajo la curva (AUC) como una medida de la gravedad de la enfermedad por cada ratón.

2.3. Cargas parasitarias

A los ratones infectados se les realizó una biopsia, abarcando toda el área de la lesión, fue tomada una semana después de la infección para determinar la carga parasitaria mediante el método de dilución limitante. El tejido fue macerado en 1 ml de medio Schneider suplementado y a partir de una dilución intermedia 1:10 se realizaron 12 diluciones seriadas 1:3 en platos de cultivo celular de 96 pozos. Los cultivos fueron incubados durante 4 semanas a 26°C, monitoreando semanalmente el crecimiento de los parásitos mediante observación en microscopio invertido. Para el cálculo de la carga parasitaria, se tuvo en cuenta la dilución máxima a la que crecieron los parásitos, las diluciones previas realizadas y el volumen en el que se homogeneizó el tejido, aplicando la siguiente fórmula: $\# \text{parásitos viables/tejido} = 3^n \times Fd$ (n =dilución máxima en la que se observó crecimiento parasitario; Fd = factor de dilución que toma en cuenta el volumen total del macerado, la dilución intermedia realizada y el volumen tomado para iniciar las diluciones seriadas). El número obtenido representa la cantidad de parásitos viables por órgano.

2.4. Histopatología

Para la caracterización histopatológica, se realizó una biopsia en *Onset* (momento en el que se presencia un nódulo inicial, aproximadamente 2 a 3 semanas posinfección) en una de las orejas infectadas utilizando un punch estéril desechable de 4 mm, tras la previa sedación del animal. Las muestras se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% tamponado, se almacenaron a 4°C y se realizaron montajes en parafina para cortes histológicos, seguidos de tinción con Hematoxilina/Eosina. Las placas se procesaron utilizando el software de imágenes NIS-elements Basic Research para la obtención de fotos, manteniendo siempre los mismos parámetros de calibración, usadas para un posterior análisis semicuantitativo del infiltrado celular. Para este análisis, se asignaron valores en una escala del 0 al 3, donde 0 representa la ausencia de infiltrado, 1 cuando el 25% del área total del corte es infiltrado, 2 cuando el 50% del área total del corte es infiltrado y 3 cuando el 75% o más del área total del corte es infiltrado. Esta escala se estableció considerando un conjunto de imágenes de todas las hembras analizadas, con el fin de determinar la densidad máxima y mínima del infiltrado.

2.5. Hematología

Se realizaron 3 sangrados a los ratones a lo largo del experimento: Un sangrado *Basal*, tomado una semana antes de la infección. Un sangrado en el *Onset*, aproximadamente 2 a 3 semanas posinfección. Y por último un sangrado en *Consolidación*, tomado al presenciar una úlcera definida indicando consolidación de la infección, aproximadamente a 5 semanas posinfección. Estos mismos tiempos se tomaron en cuenta para realizar sangrados en un grupo control de ratones no infectados con el fin de establecer los parámetros hematológicos normales en nuestro bioterio. Se tuvieron lapsos mínimos de 2 semanas entre cada uno para dar el tiempo necesario de recuperación, el cual ha sido recomendado en la literatura para no inducir sesgos en el análisis [13]. Las muestras fueron obtenidas del punto más distal de la cola, asegurando así una representación precisa de la sangre periférica [14]. Para la recolección, se utilizó sangre total que se depositó en tubos Eppendorf con EDTA, garantizando la preservación de la integridad de

191 las células sanguíneas. Se estableció una relación de 1:10 (anticoagulante:muestra) para
192 obtener un volumen final de 100 μ l. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al
193 Laboratorio de Veterinaria de la Universidad de Antioquia (UdeA) para su
194 procesamiento. Este proceso se llevó a cabo utilizando el hematógrafo veterinario URIT-
195 5180Vet, un analizador automatizado de hematología de 5 partes basado en el conteo de
196 impedancia. Se configuró el equipo para el análisis específico de muestras de ratón,
197 ajustando los parámetros según la necesidad de este estudio. Además del análisis
198 automatizado, se realizaron extendidos de sangre periférica, usados en la fase de
199 validación del método y para visualizar la morfología celular relevante. Esta estrategia
200 permitió una evaluación integral de los parámetros hematológicos, asegurando así la
201 fiabilidad de los resultados obtenidos.

202 2.5. Plan de análisis

203 Los datos fueron tabulados, graficados y analizados mediante GraphPad Prism 8.0
204 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA); su normalidad fue comprobada por
205 medio de la prueba de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre grupos, se utilizó la
206 prueba t de Student, Mann-Whitney, ANOVA de dos vías o análisis estadísticos de efectos
207 mixtos según corresponda, en cada figura se especifica el análisis empleado y la corrección
208 post hoc. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$;
209 **** $p < 0.0001$). Algunos gráficos se presentan mediante diagramas de cajas y bigotes,
210 donde los límites están contruidos según el método Tukey, indicando la mediana con
211 una línea, la media con una cruz y los valores atípicos con puntos. Para evaluar la
212 asociación de los parámetros tempranos con los desenlaces clínicos, se realizaron análisis
213 de correlación de Spearman, donde se cruzaron todas las variables hematológicas
214 obtenidas por el hemograma automatizado y la razón neutrófilos/linfocitos con los
215 criterios de gravedad establecidos: AUC (área bajo la curva del score, es la sumatoria de
216 todos los datos del score reunidos durante todo el desarrollo clínico) y Semanas en score
217 4 (número de semanas en score 4 de cada ratón). Además, se evaluó la pertinencia de la
218 regresión lineal simple de acuerdo con el comportamiento de los datos. Se consideraron
219 como relevantes aquellas combinaciones de variables donde se obtuvieron valores de p
220 (nivel de confianza) y de r (coeficiente de correlación) $p < 0.1$ y de $r > 0.25$ (valor absoluto),
221 respectivamente.

222 2.6. Consideraciones éticas

223 Para proceder con la experimentación, se llevó a cabo una revisión de los requisitos
224 estipulados en los artículos 87-93 y la Ley 84 de 1989, los cuales establecen las pautas para
225 una investigación adecuada con animales en Colombia. Además, el protocolo del proyecto
226 fue enviado para su evaluación al Comité de Ética para la Experimentación con Animales
227 (CEEA) de la Universidad de Antioquia, donde fue aprobado a través del Acta No. 151
228 del 11 de abril de 2023.

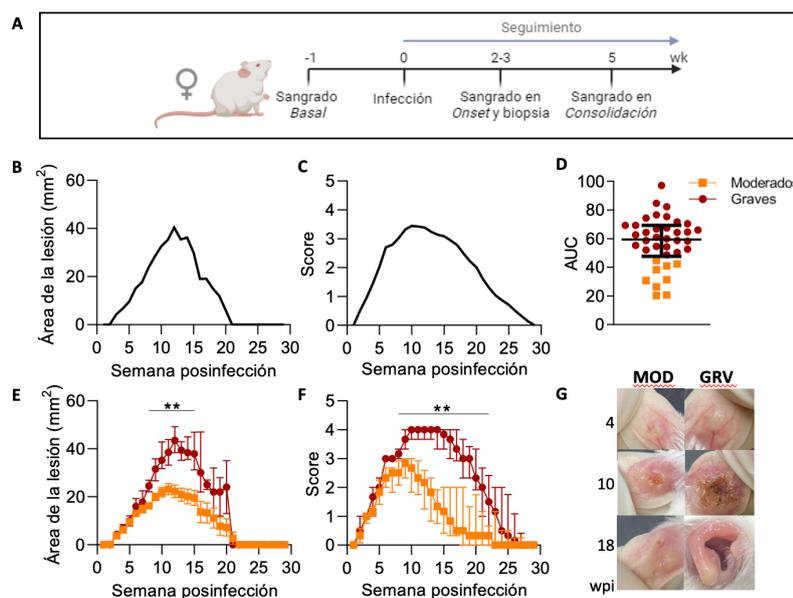
229 3. Resultados

230 3.1. Los ratones BALB/c infectados con *L(V)p* pueden clasificarse en animales con lesiones 231 moderadas y graves

232 El espectro clínico de la infección por *L(V)p* en humanos es amplio, incluyendo personas
233 con infecciones asintomáticas, otras con lesiones localizadas que se curan
234 espontáneamente, o que se cronifican llevando a inmunopatología y hasta mutilación.
235 Como se dijo previamente, nuestro modelo en ratones BALB/c reproduce este espectro
236 clínico, con animales con lesiones leves que se resolvían pronto, y otros que se volvían
237 crónicos, llevando a daño tisular y mutilación, y a una lenta resolución [12]. Para

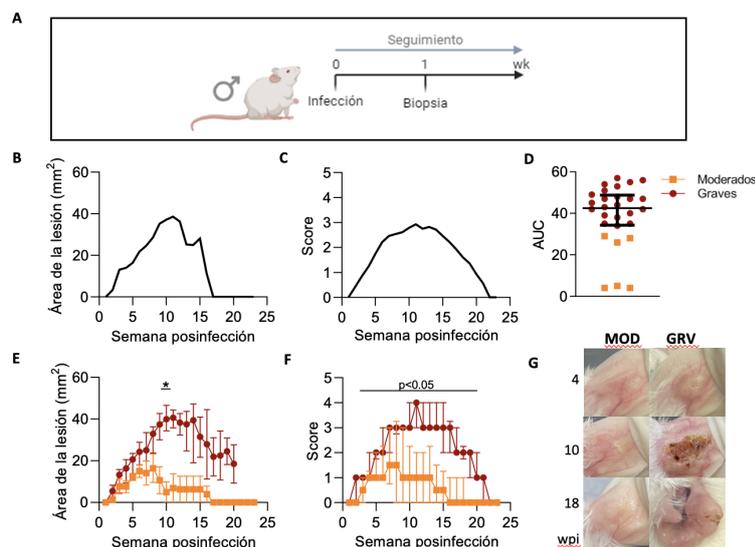
238 aprovechar el modelo e investigar posibles eventos tempranos asociados con la severidad
239 de la lesión, primero quisimos evaluar si pueden segregarse los ratones en aquellos con
240 lesiones más o menos graves. Para abordar esto, infectamos ratones con el mismo inóculo
241 y les realizamos un seguimiento detallado de la progresión de la infección, como fue
242 descrito en la metodología. Empleamos un mismo diseño experimental para machos y
243 hembras pero se tomaron diferentes muestras dependiendo de las intervenciones
244 necesarias para cada grupo (**Figura 1A,2A**). Se muestra el comportamiento general de las
245 lesiones de los ratones, donde se evidencia que el área de la lesión tiene un punto máximo
246 promedio de 40mm² aproximadamente entre la semana 10 a 15 posinfección y comienza
247 a descender rápidamente después de la semana 15 posinfección (**Figura 1B,2B**), esto se
248 debe a que esta medida permite obtener datos únicamente hasta que la lesión sea medible
249 (si se da la mutilación de la oreja, no se puede obtener el dato). Fue entonces necesario
250 tener otro tipo de medida que cubriera todo el desarrollo clínico, como lo fue el score
251 (**Figura 1C,2C**), el cual pudo ser obtenido así los ratones hubieran mutilado la oreja (como
252 se explicó previamente). Al graficar y realizar el análisis estadístico con las AUC se
253 observó que los ratones se segregaban en al menos dos grupos: una mayoría con un valor
254 por encima del rango intercuartil inferior (percentil 25) que correspondía a animales que
255 habían tenido úlceras severas que mutilaban la oreja total o parcialmente y una minoría
256 con valores dentro del rango intercuartil que correspondía a animales con lesiones leves
257 de resolución temprana. Clasificamos entonces en dos grupos en animales con lesiones
258 graves (GRV) y moderadas (MOD) (**Figura 1D,2D**). Cuando los grupos se grafican de
259 manera separada se notan diferencias estadísticamente significativas: para las hembras,
260 en el área de la lesión desde la semana 8 hasta la semana 15 posinfección (**Figura 1E**) y en
261 el score desde la semana 8 hasta la semana 22 posinfección (**Figura 1F**); en el caso de los
262 machos, se observan diferencias significativas en el área de la lesión en la semana 10
263 (**Figura 2E**) y en los datos del score desde la semana 2 a la 11 y de la semana 15 a la 21
264 posinfección (**Figura 2F**). De esta manera se hace evidente tanto en machos como en
265 hembras la diferencia en las magnitudes de la lesión de un grupo a otro, donde el grupo
266 de los graves dobla el área máxima de la lesión con respecto a los ratones moderados
267 (**Figura 1E,2E**).

268 Fotografías representativas de los momentos más relevantes durante el desarrollo clínico
269 documentan que mientras en la semana 4 posinfección ambos grupos presentan un
270 nódulo inicial comparable, en la semana 10 posinfección se observa la formación de una
271 úlcera mediana en los ratones moderados y una grande y necrótica en los ratones graves.
272 Así mismo, en la semana 18 posinfección se evidencia la resolución de la infección en los
273 moderados donde se preserva la integridad del tejido, pero una evidente mutilación de la
274 oreja en los ratones moderados (**Figura 1G,2G**).



275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285

Figura 1. 38 ratonas BALB/c hembras infectadas con *L(V)p* se clasifican en moderadas y graves: las ratonas fueron infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. (A) Esquema del diseño experimental. (B) Cinética del área de la lesión. (C) Cinética del score. (D) Gráfico AUC (área bajo la curva) del score de cada ratón donde se diferencian los animales con lesiones moderadas de aquellos que presentan lesiones graves (se grafican animales individuales con la mediana \pm rangos intercuartiles). (E) Cinética del área de la lesión, discriminando la clasificación de los grupos. (F) Cinética del score, discriminando la clasificación de los grupos. (G) Fotografías de las semanas 4, 10 y 18 posinfección de los grupos moderados (MOD) y graves (GRV). (E,F) Los resultados se expresan como la mediana \pm SEM, se realizó un análisis estadístico de efectos mixtos, un test post-hoc con Sidak y corrección post-hoc Geisser-Greenhouse.



286
287
288
289
290
291
292
293
294
295

Figura 2. 29 ratones BALB/c machos infectados con *L(V)p* se clasifican en moderados y graves: los ratones fueron infectados de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. (A) Esquema del diseño experimental. (B) Cinética del área de la lesión. (C) Cinética del score. (D) Gráfico AUC (área bajo la curva del score) de cada ratón donde se diferencian los animales con lesiones grupos moderados de aquellos que presentan lesiones graves (se grafican animales individuales con la mediana \pm rangos intercuartiles). (E) Cinética del área de la lesión, discriminando la clasificación de los grupos. (F) Cinética del score, discriminando la clasificación de los grupos. (G) Fotografías de las semanas 4, 10 y 18 posinfección de los grupos moderados (MOD) y graves (GRV). (E,F) Los resultados se expresan como la mediana \pm SEM. (E) Se realizó un análisis estadístico de

efectos mixtos, un test post-hoc con Sidak y corrección post-hoc Geisser-Greenhouse. **(F)** Se realizó una ANOVA de dos vías con corrección post-hoc Geisser-Greenhouse.

3.2. *La infección en ambas orejas produce lesiones cutáneas consistentes y reproducibles*

Los resultados anteriores establecen que la infección de los ratones produce al menos dos grupos claramente diferenciables en cuanto a la severidad de la lesión, su duración y a la presencia de inmunopatología/mutilación. De gran interés sería entonces poder investigar que eventos tempranos después de la infección se asocian con uno u otro desenlace. En particular, los eventos in situ (como aquellos relacionados con el parásito, o con la respuesta inmune) serían de gran relevancia. Sin embargo, la obtención del tejido infectado implica la imposibilidad de seguimiento subsecuente de las lesiones y por ende su clasificación como moderado o grave. Llevamos entonces a cabo una serie de experimentos en los que se infectaron los animales en ambas orejas para determinar si el curso de la infección es similar a aquel observado cuando se infecta solo una.

El análisis de la cinética del área de la lesión y del score tanto en machos como en hembras reveló un comportamiento similar entre la oreja derecha e izquierda (**Figura 3A,B**), y del mismo modo, curvas similares a cuando la infección fue realizada en una sola oreja (**Figura 3C,D,E,F**). En las hembras infectadas solo en una oreja, se observó una caída de la curva, posiblemente debido a la pérdida de una parte del tejido, en la semana 14 posinfección (**Figura 3C**), por lo que no es posible continuar con la medición del área de la lesión, sin embargo, se puede corroborar en el score que las lesiones son similares hasta la resolución completa de la infección (**Figura 3E**). Es importante destacar que al comparar machos y hembras se encontraron algunas diferencias. Los machos presentaron lesiones más moderadas, con un área que no superó los 30 mm² (**Figura 3D**) y comenzaron la fase de resolución de forma más temprana, evidenciando un descenso en su curva antes de la semana 10 posinfección en la cinética del score (**Figura 3F**). Por el contrario, las hembras desarrollaron un área de lesión mayor (**Figura 3C**) con un score alto mantenido durante más semanas postinfección (**Figura 3E**). Este patrón de lesiones más pequeñas y heterogéneas en machos que en hembras es una observación consistente a lo largo del tiempo en nuestro laboratorio. En conjunto, nuestros resultados permiten concluir que es posible obtener tejido infectado de una de las dos orejas de un mismo ratón en tiempos tempranos para análisis in situ y continuar con el seguimiento clínico en la otra para clasificarlo como lesión moderada o severa. Así, a continuación procedimos a evaluar la asociación de eventos tempranos locales (por ejemplo, respuesta histopatológica o la carga parasitaria) y sistémicos (por ejemplo, parámetros hematológicos) con la gravedad clínica de la infección.

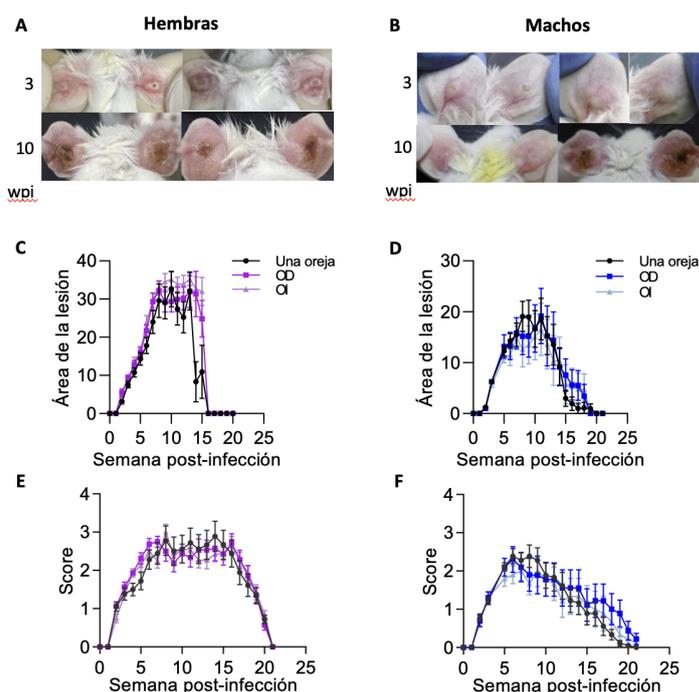


Figura 3. La infección en ambas orejas produce lesiones cutáneas consistentes y reproducibles: 34 ratones machos y hembras se infectaron con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p* en una o ambas orejas y se hizo el seguimiento clínico. Fotografías de lesiones representativas de las semanas 3 y 10 posinfección en ambas orejas de ratones hembras (A) y machos (B). Cinética del área de la lesión en hembras (C) y en machos (D). Cinética del score en hembras (E) y en machos (F). (C,D,E,F) Los resultados se expresan como la mediana \pm SEM (18 ratones infectados en una oreja y 16 en ambas orejas, tanto para machos como hembras), la comparación entre los grupos fue realizada mediante un análisis de efectos mixtos con corrección post-hoc de Tukey.

3.3. La carga parasitaria temprana no se asocia con la gravedad de la lesión cutánea

Experimentos previos del grupo han demostrado que 1 semana posinfección hay una gran variación entre ratones en las cargas parasitarias, lo cual indica que la sobrevivencia y proliferación temprana del parásito en las lesiones es variable y puede influir en el desenlace clínico. Por lo tanto, quisimos investigar si esta variación está relacionada con la gravedad de la lesión. La cuantificación de las cargas parasitarias no reveló diferencias entre los ratones moderados y graves (Figura 4A), adicionalmente el análisis de correlación reveló un patrón disperso que no muestra ninguna relación con la gravedad de la infección (Figura 4B), observándose que hay ratones con baja gravedad clínica y cargas parasitarias altas, y viceversa, lo que confirma la falta de relación entre ambas variables en el presente estudio.

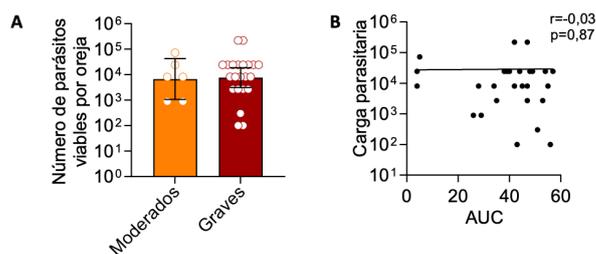


Figura 4. La carga parasitaria temprana no se asocia con la gravedad de la lesión cutánea: Se infectaron 29 ratones BALB/c machos con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p* en ambas orejas, se obtuvo tejido de una de las orejas 1 semana posinfección para el análisis de la carga parasitaria y

se continuo el seguimiento clínico para determinar la gravedad de la lesión. **(A)** Gráfico de barras con puntos individuales donde se compara la carga parasitaria de ratones moderados y graves, se muestra la media geométrica \pm 95% IC. Los datos fueron comparados con la prueba de Mann-Whitney, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. **(B)** Correlación de Spearman entre las cargas parasitarias y el AUC.

3.4. Evaluación histológica del infiltrado celular

Al momento del *Onset* se colectaron biopsias de oreja, a partir de las cuales se obtuvieron cortes histológicos, con el objetivo de evaluar cuantitativa y cualitativamente el infiltrado celular temprano y su posible relación con el desenlace clínico. Se tomaron imágenes de secciones de tejido teñidas con H/E que fueron evaluadas mediante una escala de infiltrado inflamatorio, pero no se observaron diferencias entre los grupos de ratones moderados y graves (**Figura suplementaria 1**). Al hacer un análisis detallado del rigor metodológico con el que se realizaron estos análisis, se encontró que las secciones se obtuvieron de regiones diferentes en el área abarcada por el nódulo inicial generado por la infección, lo que imposibilita una apropiada comparación entre ratones. Por lo tanto, los resultados de este análisis son no concluyentes.

3.5. La respuesta neutrofilica se asocia con la gravedad de las lesiones cutáneas

El que no hayamos encontrado relación entre la gravedad de la lesión y la carga parasitaria nos lleva a pensar que la severidad puede estar mediada por la respuesta inmunológica del hospedero. Quisimos entonces como una aproximación inicial, realizar un estudio hematológico de los ratones antes y después de la infección. Se evaluaron todos los parámetros típicos del eritrograma como el conteo de glóbulos rojos (RBC), concentración de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM), amplitud de distribución eritroide (RDW), y del plaquetograma, como el conteo de plaquetas (PLQ) y el volumen plaquetario medio (VPM) (**Figura 5A**). Se evaluó también el conteo de leucocitos totales (WBC), neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO) y eosinófilos (EOS) (**Figura 5B**), representados en una cinética tanto en porcentajes como en números absolutos.

Las diferencias más evidentes que obtuvimos fueron en el recuento de neutrófilos y linfocitos, mientras que los demás parámetros permanecen constantes o con mínimas variaciones (**Figura 5**). Los ratones de menor gravedad muestran un aumento en la frecuencia y el recuento de neutrófilos en las fases tempranas de la infección, regresando posteriormente a su estado basal. Esto sin que se presenten variaciones en el número absoluto de leucocitos totales. Por el contrario, en los ratones con lesiones más graves no se observa una respuesta inicial de neutrófilos en forma de aumento en su frecuencia o número, sino que esta ocurre cuando las lesiones ya se han consolidado.

De manera interesante, en este experimento se obtuvo un ratón con manifestaciones agudas de la lesión. Este ratón presentó únicamente un nódulo inicial incipiente y la resolución se dio rápidamente en la semana 6 post-infección. Los cambios hematológicos observados fueron similares a los de los ratones moderados, pero con una mayor magnitud, sugiriendo que este patrón, un aumento de los neutrófilos circulantes en el *Onset* podría estar relacionado con factores protectores (**Figura Suplementaria 2**). Sin embargo, no se observaron más ratones con este fenotipo, por lo que no es posible determinar si se trata de un hallazgo aislado o de un patrón real.

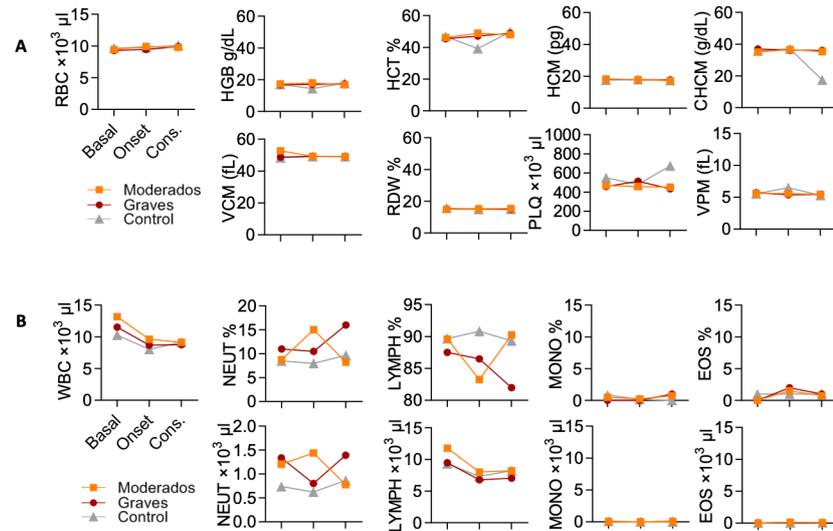


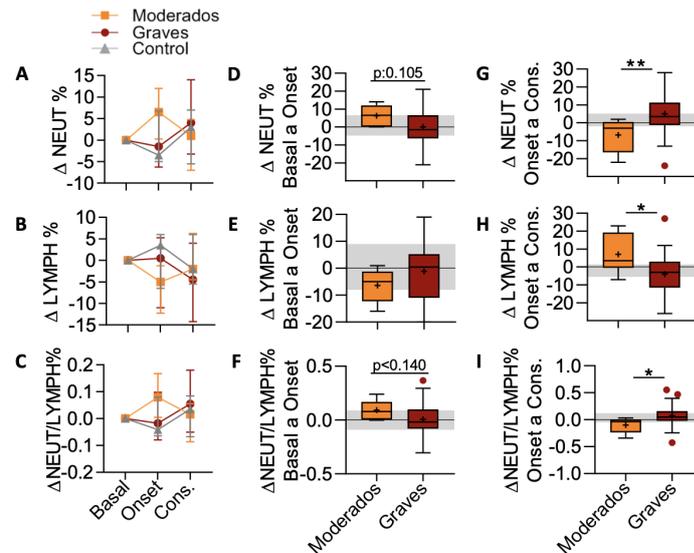
Figura 5. Cinética de los parámetros hematológicos evaluados en ratones moderados y graves: Se presentan los datos correspondientes a las 38 ratonas hembras infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. **(A)** Cinética de parámetros de eritrocitos y plaquetas. Conteo de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM), amplitud de distribución eritroide (RDW), conteo de plaquetas (PLQ), volumen plaquetario medio (VPM). **(B)** Cinética de parámetros de leucocitos. Conteo de leucocitos totales (WBC), neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO) y eosinófilos (EOS).

Adicionalmente, se hizo hincapié en el análisis de los parámetros de mayor interés, comparando los tiempos de sangrado para observar con mayor detalle sus diferencias. Se tomó el estado *Basal* como punto de referencia para calcular el cambio de los parámetros hematológicos en los tiempos posinfección evaluados en relación con el tiempo cero (delta). Es preciso enfatizar que para todos los momentos de muestreo hematológico (*Basal*, *Onset* y *Consolidación*) los tamaños de lesión o el score de los ratones de ambos grupos eran comparables y que fue solo posterior a la *Consolidación* que se separaron en moderados y graves (**Figura 1**). En conjunto estas comparaciones nos permitieron determinar cuál fue el curso normal de los parámetros y atribuir los cambios a la infección (**Figura 6A,B,C**).

Se evidencia que los neutrófilos (**Figura 6A**) y los linfocitos (**Figura 6B**) tienen, en promedio, comportamientos diferentes entre los grupos. En el *Onset*, los ratones moderados aumentan la frecuencia de neutrófilos, mientras que los ratones graves no presentan cambios y mantienen niveles similares a los controles. Para el tiempo de la *Consolidación*, en el grupo de los moderados se observa un porcentaje de neutrófilos cercano a los niveles del estado *Basal*, mientras que en los graves se observa un aumento (**Figura 6A**). En contraste, el porcentaje de linfocitos en el *Onset* muestra el fenómeno opuesto: los ratones moderados disminuyen con respecto a su estado *Basal*, mientras que los ratones graves presentan un leve aumento, posteriormente los ratones moderados exhiben frecuencias cercanas a su estado *Basal* en el tiempo de *Consolidación*, mientras que los ratones graves disminuyen (**Figura 6B**). Sin embargo, es de anotar que las variaciones observadas en los neutrófilos y los linfocitos responden a cambios en la proporción de neutrófilos (**Figura 6C**) y no a variaciones en el número absoluto de leucocitos totales (**Figura 5A**).

Adicionalmente, se compararon los deltas de la frecuencia de neutrófilos y linfocitos del estado *Basal* al *Onset* (**Figura 6D, E, F**) y del *Onset* a la *Consolidación* (**Figura 6G, H, I**). El

435 área sombreada indica el rango de las frecuencias observadas en los controles y representa
 436 la variabilidad normal observada en nuestro bioterio para estos parámetros. Este análisis
 437 se hizo con el fin de identificar los cambios entre la infección y el *Onset*, así como entre el
 438 *Onset* y la *Consolidación*. Nos permitió evidenciar que del *Onset* a la *Consolidación* se
 439 presentan diferencias estadísticamente significativas tanto en el delta de neutrófilos como
 440 de linfocitos, aunque con un patrón opuesto como se mencionó anteriormente (**Figura 6G,**
 441 **H, I**). El análisis de los datos en números absolutos reproduce un patrón similar al
 442 observado con los porcentajes (**Figura suplementaria 3**).



443
 444 **Figura 6.** Análisis del cambio de la frecuencia relativa de neutrófilos y linfocitos en sangre
 445 periférica: Se analizaron las 38 hembras infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5
 446 promastigotes de *L(V)p*. Cinética del cambio (delta) del porcentaje de (A) neutrófilos, (B) linfocitos y
 447 (C) de la razón de neutrófilos/linfocitos en el *Onset* y la *Consolidación* respecto al estado *Basal*. Delta
 448 del porcentaje de (D) neutrófilos, (E) linfocitos y (F) de la razón de neutrófilos/ linfocitos del estado
 449 *Basal* al *Onset*. Delta del porcentaje de (G) neutrófilos, (H) linfocitos e (I) de la razón de
 450 neutrófilos/linfocitos del *Onset* a la *Consolidación*. En (A,B,C) los resultados se expresan como la
 451 mediana \pm SEM. En (D,E,F,G,H,I) los resultados se presentan como cajas y bigotes, la comparación
 452 entre grupos se realizó con T-test.

453 Finalmente, se realizó un análisis de correlación para comparar los parámetros y cambios
 454 hematológicos de interés con el AUC del score, sin embargo, solo se obtuvieron unas
 455 pocas correlaciones débiles y con poca significancia estadística. Procedimos entonces a
 456 evaluar nuevos criterios de gravedad, donde encontramos que el número de semanas en
 457 score 4 arrojaba las mejores correlaciones. Un aumento en el porcentaje de neutrófilos en
 458 el *Onset* se correlaciona con un menor número de semanas en score 4 (**Figuras 7A,B,C**),
 459 siendo esta asociación estadísticamente significativa en caso del delta de la frecuencia de
 460 neutrófilos del estado *Basal* al *Onset* (**Figura 7A**). También, se evidenció que un aumento
 461 del *Onset* a la *Consolidación*, en la frecuencia relativa o absoluta de los neutrófilos se
 462 correlaciona con un mayor AUC del score y un mayor número de semanas en score 4
 463 (**Figuras 7D,E,F,G,H**). Adicionalmente se observó que, si la diferencia en el porcentaje de
 464 linfocitos del estado *Basal* al *Onset* aumenta, mayor será el número de semanas en score 4
 465 (**Figura 7I**). Aunque todas las correlaciones obtenidas son débiles, estas respaldan una
 466 aparente importancia de los neutrófilos en los tiempos tempranos posterior a la infección
 467 y sugieren su asociación con una menor o mayor gravedad de la lesión dependiendo del
 468 tiempo en el que ocurran.

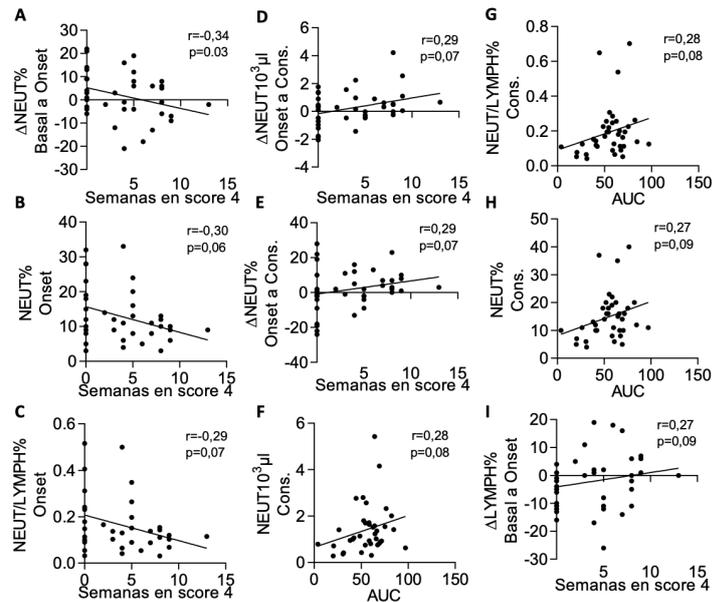


Figura 7. Correlación de varios parámetros hematológicos con la gravedad de la lesión: Se construyó una matriz de correlación utilizando los parámetros hematológicos descritos en la **Figura 5 y 6** con los parámetros de gravedad (AUC y Semanas en score 4). **(A)** Correlación del delta del porcentaje de neutrófilos del estado *Basal* al *Onset* con semanas en score 4. **(B)** Correlación del porcentaje de neutrófilos en *Onset* con semanas en score 4. **(C)** Correlación del porcentaje de la relación de neutrófilos sobre linfocitos en *Onset* con semanas en score 4. **(D)** Correlación del delta del número absoluto de neutrófilos del *Onset* a la *Consolidación* con semanas en score 4. **(E)** Correlación del delta del porcentaje de neutrófilos del *Onset* a la *Consolidación* con semanas en score 4. **(F)** Correlación del número absoluto de neutrófilos en *Consolidación* con AUC. **(G)** Correlación del porcentaje de la relación de neutrófilos sobre linfocitos en *Consolidación* con AUC. **(H)** Correlación del porcentaje de neutrófilos en *Consolidación* con AUC. **(I)** Correlación del delta del porcentaje de linfocitos del estado *Basal* al *Onset* con semanas en score 4. El análisis de correlación se realizó usando el método de Spearman con un intervalo de confianza del 95%, solo las correlaciones con valores de $p < 0.1$ y de $r > 0.25$ (en valor absoluto) fueron consideradas biológicamente relevantes.

4. Discusión

Aunque la leishmaniasis ha sido objeto de estudio para numerosos investigadores debido a su relevancia como enfermedad tropical, aún no se han esclarecido en su totalidad los factores tempranos que conducen a las diversas manifestaciones clínicas según las características del huésped afectado. En este artículo se presenta un análisis hematológico, histopatológico y parasitológico en las etapas tempranas de la infección en un modelo murino ulcerativo de la infección por *L(V)p* y su relación con el desenlace clínico de la enfermedad. La disponibilidad de esta información justifica una investigación más detallada para ampliar la comprensión de la respuesta inmune en los primeros tiempos de la infección y promover el control de esta. Nuestros hallazgos revelan dos patrones distintos en la respuesta de los neutrófilos circulantes: observamos que una respuesta temprana de los neutrófilos en el *Onset* de la enfermedad, seguida de un retorno a su número basal durante la fase de *Consolidación* de la úlcera, se asocia con manifestaciones clínicas moderadas. En contraste, la ausencia de una respuesta de los neutrófilos en la fase inicial, seguida de un aumento en su número una vez que la infección está consolidada, se relaciona con manifestaciones clínicas graves, a menudo acompañadas de una resolución mutilante de la enfermedad. Por otra parte, los análisis parasitológicos realizados una semana posinfección no muestran una relación de este aspecto, al menos en este tiempo, con la gravedad del desarrollo de las lesiones y los análisis histopatológicos preliminares realizados no fueron concluyentes en relación al desenlace clínico, sin embargo destacan la pertinencia de la herramienta de investigación propuesta

505 para este tipo de análisis *in situ* y recalcan la necesidad de futuras investigaciones con
506 metodologías más refinadas.

507
508 Los resultados observados en los perfiles hematológicos reiteran la complejidad de la
509 respuesta inmune durante la infección por *Leishmania* y subrayan la importancia de
510 considerar las diferentes trayectorias que pueden tomar los neutrófilos en función de la
511 gravedad de la enfermedad [15,16]. En este sentido, se ha reportado en la literatura un
512 papel importante de los neutrófilos en diferentes modelos animales de LC, los resultados
513 han sido discrepantes entre los estudios dependiendo de la especie infectante, el momento
514 de la enfermedad, el *background* genético e inmunológico del hospedero y diferencias en
515 las metodologías utilizadas. En las etapas tempranas es determinante el establecimiento
516 de una respuesta inicial eficiente, como la eliminación directa del parásito mediante
517 mecanismos microbicidas como especies reactivas del oxígeno (ROS), trampas
518 extracelulares de neutrófilos (NETs), producción de citoquinas como IL-12 y TNF- α y
519 quimioquinas como CCL2 y CCL3, cooperación con los macrófagos, reclutamiento y
520 activación de células dendríticas y células T [4], estos mecanismos pueden explicar el
521 “papel protector” del reclutamiento temprano de los neutrófilos observado en los ratones
522 con progreso moderado de la enfermedad. Sin embargo, es esencial que su aumento esté
523 regulado adecuadamente, investigaciones previas han postulado que el reclutamiento
524 persistente de neutrófilos en el sitio inflamatorio puede llevar al desarrollo de
525 leishmaniasis persistente: se han descrito mecanismos como la contribución
526 inmunopatológica mediante la liberación de gránulos, la producción de IL-1 β y la
527 limitación de respuestas efectoras, por ejemplo, con la sobreexpresión de arginasa y PD-
528 L1 [17,18]. Este comportamiento se observa en los ratones con infecciones graves, donde
529 la neutrofilia posterior al Onset y persistente puede estar ejerciendo estos mecanismos,
530 contribuyendo a una inflamación sostenida, resultando en la formación de úlceras
531 necróticas y mutilación del sitio afectado [19,20].

532
533 Es importante mencionar que, aunque la mayoría de los ratones con manifestaciones
534 graves presentan un patrón similar, existen algunas excepciones observadas al analizar
535 los datos de forma individual (datos no mostrados). En estos casos, algunos ratones con
536 manifestaciones graves no solo carecen de una respuesta efectiva de sus neutrófilos, sino
537 que también muestran una disminución de estos en *Onset* y un aumento significativo
538 durante la fase de *Consolidación*. Esto sugiere la posibilidad de una modulación alternativa
539 que conduce a la neutropenia en las etapas tempranas de la infección. Otra proporción de
540 ratones graves presenta un comportamiento de los neutrófilos que se asemeja al patrón
541 de los ratones moderados, observándose un aumento de estas células hacia el *Onset*. Esta
542 última observación está de acuerdo con algunos reportes de la literatura donde los
543 neutrófilos parecen tener un rol deletéreo en las etapas tempranas, asociado a fallas en sus
544 mecanismos efectoras donde los parásitos logran evadir el fagolisosoma para alojarse en
545 compartimientos no líticos de la célula, evasión de la fusión de los lisosomas e inhibición
546 de ROS, en este mismo sentido pueden impedir el reclutamiento oportuno de células
547 dendríticas al “secuestrar” rápidamente los parásitos sin eliminarlos, o actuando como
548 “caballos de Troya” (cuerpos apoptóticos de neutrófilos infectados que permiten la
549 entrada silenciosa del parásito a los macrófagos), mediante este mecanismo también se ha
550 reportado que el aclaramiento de estos cuerpos apoptóticos por parte de las células
551 dendríticas afecta su nivel de activación para una presentación antigénica y diferenciación
552 Th1 adecuada, también se ha descrito falla en la trans migración reversa de neutrófilos,
553 que permite un retorno de la homeostasis [11,18,21,17]. Es posible que los neutrófilos
554 aumentados en estos ratones estén presentando algunos de estos mecanismos ineficaces
555 que promueven un posterior desarrollo grave de la enfermedad. En este sentido, sería de
556 gran interés caracterizar los fenotipos de los neutrófilos infiltrantes en el *Onset* de la

557 enfermedad para determinar si hay diferencias entre ratones con diferentes desenlaces
558 clínicos.

559
560 En algunos modelos experimentales se han descrito dos olas de infiltración de neutrófilos
561 en el sitio de la infección: una ola temprana en las primeras horas-días, y una segunda ola
562 tardía asociada con la aparición y desarrollo de la enfermedad. Estudios realizados en
563 hámsteres infectados con *L(V)p* [22] han revelado que la primera oleada de neutrófilos,
564 que ocurre entre las 2 y 6 horas posteriores a la infección, se produce de manera moderada
565 y parece tener un impacto limitado en la gravedad de la lesión. Sin embargo, la segunda
566 oleada, que se presenta aproximadamente a los 19 días posinfección, muestra un aumento
567 significativo en el número de células, coincidiendo con el punto máximo de la úlcera y la
568 necrosis, lo que se asocia con una mayor gravedad de la enfermedad. Curiosamente, se
569 observa que el agotamiento de neutrófilos en esta segunda oleada está relacionado con
570 lesiones más benignas, debido a que la vida útil prolongada o la apoptosis retardada
571 contribuyen a la acumulación de neutrófilos y a la supervivencia del parásito. Factores
572 que parecen contribuir a este fenómeno es la disminución en la capacidad oxidativa anti-
573 *Leishmania* en la segunda oleada y un aumento en la expresión de proteasas, además de
574 una expresión diferencial de citoquinas: mientras que los neutrófilos de la primera oleada
575 expresan IL-6, GM-CSF y G-CSF, los de la segunda oleada solo muestra un aumento en la
576 expresión de TNF- α y TGF- β . Sin embargo, estas observaciones requieren de una mayor
577 exploración [22].

578
579 Aunque estos hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en nuestro estudio
580 es importante tener en cuenta que son modelos animales diferentes, y los tiempos de
581 análisis no fueron los mismos. El primer punto de cuantificación de neutrófilos en nuestro
582 estudio se realizó entre las 2 y 3 semanas posteriores a la infección, lo que no permite una
583 comparación directa con la primera oleada de infiltración observada en los hámsteres, sin
584 embargo, no podemos determinar si el punto evaluado en nuestro estudio hace parte de
585 un pico que tuvo su punto más alto en días anteriores, y pueda estar relacionado con la
586 primera ola descrita anteriormente. Por otro lado, el segundo punto de cuantificación de
587 neutrófilos, realizado en la semana 5 posinfección, podría ser más directamente
588 comparable con el estudio en mención, ya que se observa en el momento de consolidación
589 de las lesiones ulceradas y adicionalmente, en la fase más crónica y máximo punto de
590 ulceración de los ratones graves se observa una gran proporción de neutrófilos con
591 respecto a los ratones moderados (dato no mostrado). Teniendo esto en cuenta, se resalta
592 la importancia de realizar más estudios para determinar las dinámicas de los neutrófilos
593 en las etapas claves de la infección.

594 Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que la migración celular desde la sangre
595 hasta el sitio de la lesión ocurre aproximadamente en 6 horas, por lo que es razonable
596 pensar que la magnitud observada en los resultados hematológicos sería una buena
597 representación de la infiltración al sitio de la lesión. En este estudio se intentó una
598 aproximación a la caracterización del infiltrado inflamatorio temprano, aunque se
599 presentaron algunos inconvenientes técnicos mencionados en los resultados, donde
600 probablemente, se debió partir desde la zona más central de la lesión para obtener cortes
601 más estandarizados e imágenes informativas. No obstante, se propuso una escala
602 semicuantitativa de valoración, sin embargo, no se encontraron diferencias entre ambos
603 grupos de ratones, y al no poder caracterizar la composición celular específica no fue
604 posible asociar la información obtenida con los hallazgos hematológicos de los mismos
605 ratones. Sin embargo, cabe destacar la viabilidad y utilidad de la estrategia utilizada para
606 obtener tempranamente muestras de tejido de un ratón y poder seguir su curso clínico
607 hasta la resolución de la enfermedad y en este sentido, es de gran interés para futuros
608 estudios realizar un análisis que permita conocer la composición específica del infiltrado

en los tiempos de interés, utilizando metodologías como inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o citometría de flujo [23,24].

Otro resultado interesante de este estudio es que la carga parasitaria evaluada una semana después de la infección no se correlacionó con el desenlace clínico. Según estudios previos del grupo, el momento cuando se realizó la biopsia de las orejas para ejecutar el conteo de los parásitos corresponde a una fase temprana asintomática, en la cual los parásitos viables se encuentran en reducido número. Consideramos este punto un buen tiempo para revisar si el inóculo efectivo influencia el desenlace clínico, pues a pesar del reducido número de parásitos, este número es muy variable entre los ratones, los cuales han sido inoculados con la misma cantidad de parásitos. Esto sucede porque la gran mayoría de parásitos muere, de manera diferencial entre los ratones, tras la infección. Posteriormente a estas semanas posinfección tempranas, se presenta una fase activa de multiplicación en la que las cargas parasitarias se estabilizan (alrededor de 10^9 parásitos viables/oreja) [12]. El hecho de que no se haya encontrado, de forma preliminar, ninguna correlación entre la carga parasitaria temprana (variable entre cada hospedero) y el desenlace clínico sugiere un rol relevante de la biología del hospedero en la conducción de la gravedad de la enfermedad, más que simplemente las diferencias en el inóculo efectivo que sobrevive y multiplica en las semanas posinfección iniciales. No obstante, es necesario realizar experimentos confirmatorios tanto en hembras como en machos y con un nivel de cuantificación de los parásitos viables más fino para concluir definitivamente este hallazgo, además de evaluar otros tiempos tempranos relevantes. En conclusión, sigue teniendo mayor respaldo que la gravedad de la enfermedad dependa de otros factores, tales como la respuesta inmune.

5. Conclusión

Los resultados de este estudio preliminar subrayan la complejidad de la respuesta inmune en la leishmaniasis y la importancia de las olas de neutrófilos en la progresión de la enfermedad. Se observó que la respuesta temprana de neutrófilos se asocia con manifestaciones clínicas moderadas, mientras que una respuesta tardía se correlaciona con formas más graves de la enfermedad. La carga parasitaria inicial no mostró relación con la gravedad de las lesiones, sugiriendo que los aspectos inmunológicos del hospedero juegan un papel crucial en la progresión de la infección. Estos hallazgos destacan la necesidad de estudiar de forma más precisa la cinética de neutrófilos y su impacto en la interacción parásito-huésped en diferentes etapas de la enfermedad.

Material Suplementario:

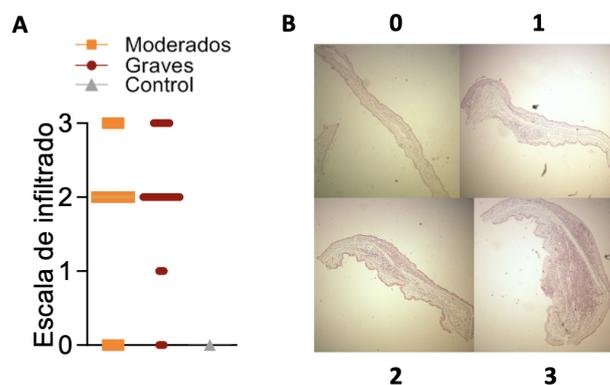


Figura suplementaria 1. Escala del infiltrado celular: Se evaluaron 38 ratones BALB/c hembras infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. (A) Resultado de la

aplicación de la escala para evaluar el infiltrado celular de los ratones moderados, graves y controles. Los datos fueron comparados con Mann-Whitney y no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. **(B)** Fotografías representativas de los criterios que definen la escala de valoración usada.

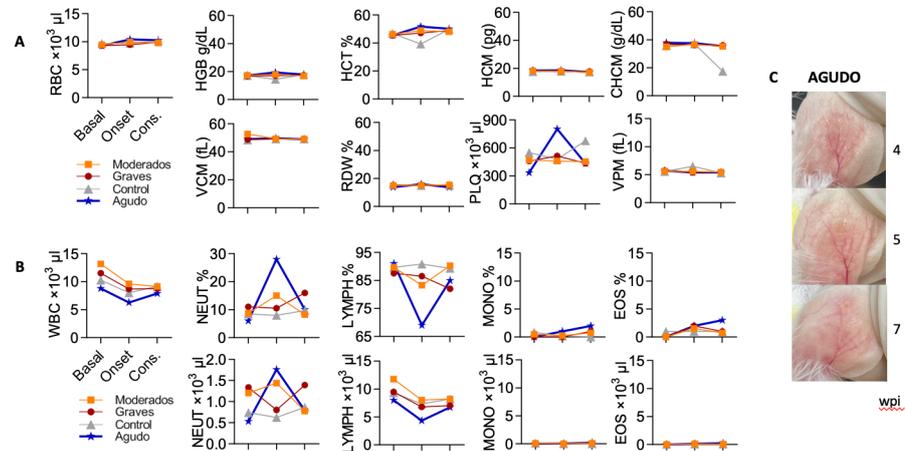


Figura suplementaria 2. Cinética de los parámetros hematológicos evaluados en ratones moderados, graves y agudo: Se presentan los datos correspondientes a las ratonas hembras infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. **(A)** Cinética de parámetros de eritrocitos y plaquetas. Conteo de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), volumen corpuscular medio (VCM), amplitud de distribución eritroide (RDW), conteo de plaquetas (PLQ), volumen plaquetario medio (VPM). **(B)** Cinética de parámetros de leucocitos. Conteo de leucocitos totales (WBC), neutrófilos (NEUT), linfocitos (LYMPH), monocitos (MONO) y eosinófilos (EOS). **(C)** Representación fotográfica de los tiempos más relevantes de la infección en el ratón agudo. En la semana 4 posinfección aún no presenta ninguna manifestación de la enfermedad, en la semana 5 posinfección manifiesta un nódulo incipiente y en la semana 7 posinfección ya ha resuelto completamente la enfermedad.

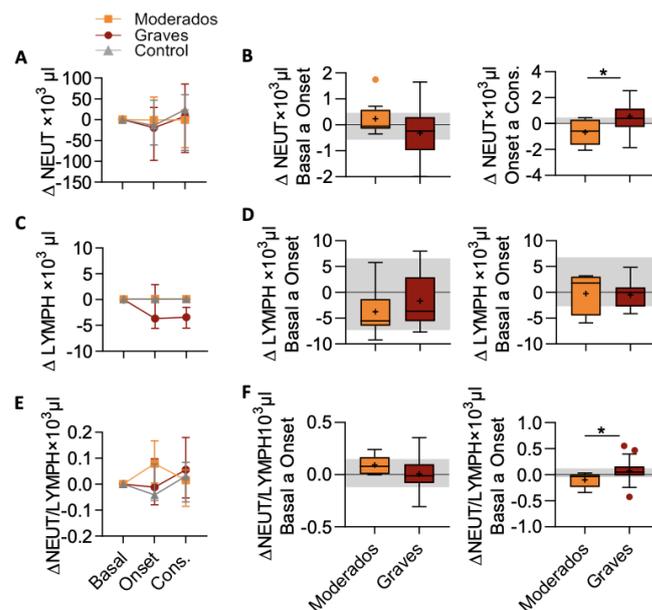


Figura suplementaria 3. Análisis del cambio del número absoluto de neutrófilos y linfocitos respecto a sus niveles basales en respuesta a la infección: Se analizaron 38 ratones BALB/c hembras infectadas de forma intradérmica con un inóculo de 10^5 promastigotes de *L(V)p*. Cinética del cambio (delta) de la frecuencia relativa en el Onset y la Consolidación respecto al estado Basal de (A)

neutrófilos, (B) linfocitos y (C) de la razón de neutrófilos/linfocitos. Delta de la frecuencia relativa del estado Basal al Onset de (D) neutrófilos, (E) linfocitos y (F) de la razón de neutrófilos/linfocitos. Delta de la frecuencia relativa del Onset a la Consolidación de (G) neutrófilos, (H) linfocitos e (I) de la razón de neutrófilos/linfocitos. En (A,B,C) los resultados se expresan como la mediana \pm SEM. En (D,E,F,G,H,I) los resultados se presentan como cajas y bigotes, para (D,E,H) el análisis estadístico fue con Mann-Whitney y para (G,F,I) la comparación entre grupos se realizó con T-test.

Contribuciones de los autores: Diseño y dirección del estudio, supervisión y administración del proyecto: JR.R; Planeación del experimento y metodología: JR.R, EC.G, NM.D, MB.C; Investigación y escritura: MB.C; Análisis, interpretación, revisión y edición: JR.R, EC.G, NM.D, MB.C.

Agradecimientos: Gracias al Grupo Inmunomodulación por la financiación, el apoyo de instalaciones y materiales; gracias a Julio Cesar Jaramillo y David Bautista Erazo por el apoyo académico e instrucciones con software de análisis; al profesor de histología Juan Felipe Zapata Martínez y al Dr. MVZ, MMc. Santiago Duque Patólogo Veterinario por el apoyo en la comprensión y revisión de placas de histopatología; al Laboratorio de Veterinaria de la Universidad de Antioquia por los servicios prestados; y a los profesores de la Escuela de Microbiología involucrados en mi formación.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Referencias

- Abadías-Granado, I; Diago A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis, *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2021, *volume 112*, Pages 601- 618. Doi: 10.1016/j.ad.2021.02.008.
- Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en la Región de las Américas. Washington, D.C, *OPS* 2023. Doi: 10.37774/9789275327340.
- Aronson, N; Herwaldt, BL. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), *Am J Trop Med Hyg* 2017, Pages 24-45. Doi: 10.4269/ajtmh.16-84256.
- Gonzales, K; Diaz, R. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis*, (July 22, 2015; April 26, 2016; May 11, 2016). Doi: 10.1590/S1678-9946201860008.
- Torres-Guerrero, E; Quintanilla-Cedillo, MR. Leishmaniasis: a review, *F1000 Research* 2017. Doi: 10.12688/f1000research.11120.1.
- Gomez Gomez, L. Informe de evento Leishmaniasis Periodo epidemiológico III de 2023, *Instituto Nacional de Salud*. www.ins.gov.co
- Robledo, SM; Puerta, JA. Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia, *Biomedica* 2006, *vol.26 suppl.1*, Pages 188-193. 0120-4157.
- Landeros, LD; Echeverria, LP. Alternative treatment of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Rev Mex* 2024, *vol.68*, Pages 96-102. Doi: 10.24245/drm/bmu.v68i1.9480
- Chang, KP; Reed, SG. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity, *Acta Tropica* 2003. *Volume 85*, Issue 3, Pages 375-390. Doi: 10.1016/S0001-706X(02)00238-3.
- Scott, P., Novais, F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis, *Nat Rev Immunol* 2016, *volume 16*, Pages 581–592. Doi: 10.1038/nri.2016.72.
- Passelli, K; Billion, O. The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by *Leishmania* Infection, *Front. Immunol* 2021, *volume 12*. Doi: 10.3389/fimmu.2021.649348
- Gomez, A; Garcia-Valencia, N. A Mouse Model of Ulcerative Cutaneous Leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) panamensis* to Investigate Infection, Pathogenesis, Immunity, and Therapeutics, *Front. Microbiol* 2022, *volume 13*. Doi: 10.3389/fmicb.2022.907631
- Charles Rivers laboratories. Hematology of the Mouse: https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/BALBcMouseClinicalPathologyData.pdf (2012).
- Abatan, O; Welch, K. Evaluation of Saphenous Venipuncture and Modified Tail-clip Blood Collection in Mice, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2008, *volume 13*, Pages 8–15. PMC2654012
- Herrero-Cervera, A; Soehnlein, O. Neutrophils in chronic inflammatory diseases, *Cellular & Molecular Immunology* 2022, *volume 19*, Pages 177-191. Doi: 10.1038/s41423-021-00832-3
- Carlsen, E; Jie, Z. Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance, *J Innate Immun* 2015, *volume 7*, Pages 154-363. Doi: 10.1159/000373923

-
- 719 17. Dey, N; Senaratne, S. Early reduction in PD-L1 expression predicts faster treatment response in human cutaneous
720 leishmaniasis, *The Journal of Clinical Investigation* 2021. Doi: 10.1172/JCI142765
- 721 18. Araujo-Carreira, JC; Machado, AV. The Role of Neutrophils in the Interaction with Leishmania: Far beyond a Simple Trojan
722 Horse?, *Open Journal of Animal Sciences* 2021, volume 11. Doi: 10.4236/ojas.2021.113029
- 723 19. Carlsen, ED; Liang, Y. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis, *Clin Exp Immunol* 2015, Pages 109-
724 118. Doi: 10.1111/cei.12674
- 725 20. Bhattacharya, P; Dey, R. Essential Role of Neutrophils in the Protective Immune Response Induced by a Live Attenuated
726 Leishmania Vaccine, *J Immunol* 2020. Pages 3333-3347. Doi: 10.4049/jimmunol.2000829
- 727 21. Ikeogu, N; Akaluka, G. Leishmania Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development, *Micororganisms* 2020.
728 Doi: 10.3390/microorganisms8081201
- 729 22. Peniche, A; Bonilla, D. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental
730 American cutaneous leishmaniasis, *PLoS One* 2017. Doi: 10.1371/journal.pone.0179084
- 731 23. Neira, LF; Mantilla, JC. Monitoring Cutaneous Leishmaniasis Lesions in Mice Undergoing Topical Miltefosine Treatment,
732 *Scientia Pharmaceutica* 2023. Doi: 10.3390/scipharm91040054
- 733 24. Navard, S; Rezvan, H. Therapeutic effects of mesenchymal stem cells on cutaneous leishmaniasis lesions caused by
734 *Leishmania major*, *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2020, volume 23, Pages 243-250. Doi: 10.1016/j.jgar.2020.09.005