

---

# Respuesta inmune de células T en leishmaniosis cutánea

CLAUDIA M. TRUJILLO  
PABLO PATIÑO

El papel de las subpoblaciones de células TCD4<sup>+</sup>, Th1 y Th2, ha sido bien estudiado en la infección por *Leishmania major* en el modelo murino experimental. Las cepas singénicas de ratones que desarrollan el fenotipo Th1 (células que secretan principalmente IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$ ) son resistentes a la infección por este protozoo. En contraste, las que desarrollan el fenotipo Th2 (células que secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) son susceptibles a ella. Los estudios recientes indican que la IL-4 es una señal esencial en la estimulación primaria y maduración de las células Th2, mientras que IL-12 permite la maduración de las células Th1. Adicionalmente, IL-4 e IFN- $\gamma$  ejercen efectos reguladores opuestos sobre las células Th1 y Th2 respectivamente. Por otra parte, varios estudios han establecido claramente que la subpoblación de linfocitos TCD8<sup>+</sup> también contribuye a la resolución de la enfermedad y la resistencia contra la reinfección en leishmaniosis cutánea. En los humanos, aunque la respuesta inmune dirigida contra el parásito es menos polarizada que en el ratón, se ha evidenciado una clara tendencia hacia la producción del fenotipo Th1 en las formas menos severas de la enfermedad. La identificación de subpoblaciones de células T

humanas que se correlacionen con susceptibilidad o resistencia a la infección podría ayudar al desarrollo de ensayos *in vitro* para identificar antígenos de *Leishmania* que estimulen una respuesta inmune protectora y que puedan evaluarse como candidatos en el desarrollo de una vacuna capaz de controlar la infección.

**PALABRAS CLAVE**  
LEISHMANIOSIS CUTÁNEA  
CÉLULAS T CD4<sup>+</sup>  
CÉLULAS Th1  
CÉLULAS Th2

**L**a entidad clínica conocida como Leishmaniosis, un problema de salud pública mundial, es una infección causada por protozoos parásitos del género *Leishmania* (1). En el ciclo de vida característico

---

LICENCIADA CLAUDIA MILENA TRUJILLO VARGAS, Bacterióloga, Estudiante de Maestría en Medicina Tropical, Corporación Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia; DOCTOR PABLO JAVIER PATIÑO GRAJALES, MD, Msc, PhD.<sup>1</sup> Profesor, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

---

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Carrera 51D N° 62-29 Piso 2. Teléfono: 5106057, Fax: 2633509, email: ppatino@carios.udea.edu.co. Medellín, Antioquia.

de estos parásitos, el vector hembra infectado (insectos flebotómicos) transmite los promastigotes, que son la forma flagelada del parásito, al hospedero mamífero cuando se alimenta de su sangre. Los promastigotes entran a las células del sistema fagocítico-mononuclear y allí se transforman en amastigotes, forma oval no flagelada del parásito, que sobreviven y se replican activamente dentro de la vacuola parasitófora causando lisis de la célula; una vez libres pueden diseminarse y parasitar otras células no infectadas. Las células infectadas son ingeridas nuevamente por el vector al alimentarse de la sangre del mamífero que pica para así iniciar un nuevo ciclo en el vector.

La enfermedad se divide tradicionalmente en dos síndromes: Leishmaniosis cutánea y Leishmaniosis visceral. Entre las diferentes formas de infección cutánea por *Leishmania* en el humano encontramos la Leishmaniosis cutánea localizada, la cutánea difusa y la mucocutánea. Adicionalmente, existe una gran cantidad de individuos que a pesar de haber desarrollado una respuesta inmune específica contra el parásito evidenciada por una reacción positiva de hipersensibilidad retardada (Prueba de Montenegro) no desarrollan ningún tipo de manifestación clínica (2). Este amplio espectro de manifestaciones clínicas permite suponer que en una población dada, individuos infectados con una misma especie del parásito presenten diferentes patrones de susceptibilidad a la infección y ha llevado a muchos investigadores a estudiar los posibles eventos determinantes de esta susceptibilidad o resistencia (3-6).

En el microambiente celular existen muchos factores que determinan la posibilidad de que un agente infeccioso tenga acceso a su hospedero y perpetúe en él su ciclo biológico.

Estos factores forman parte de las condiciones socio-ecológicas en las cuales se encuentra inmersa la población y de las características biológicas del parásito o el hospedero; todos estos elementos se interrelacionan para dar como resultado

final diferencias en los patrones de susceptibilidad o resistencia a una determinada infección.

Además de las condiciones ambientales que favorecen la transmisión de la infección y el desarrollo de la enfermedad, el parásito está dotado de diversos mecanismos que le permiten sobrevivir dentro de las células del hospedero. Uno de los mecanismos implicados en la supervivencia del promastigote luego de ser inoculado en el tejido del hospedero es la elongación del glicoconjugado más importante de la superficie del parásito, el lipofosfoglicano o LPG. Esta elongación permite la inserción del complejo de ataque de membrana generado por la activación del complemento lejos de la membrana celular del parásito protegiendo a las formas metacíclicas o infectivas de la lisis mediada por complemento (7). Adicionalmente, esta molécula junto con otros ligandos como la glicoproteína gp63 de la superficie del parásito, median la unión y posterior entrada del promastigote al macrófago. Por ejemplo, el LPG es aceptor de algunas moléculas del complemento tales como C3b y C3bi, lo que implica a CR1 y CR3 que son receptores para estas fracciones del complemento en la superficie del macrófago, como receptores también para las formas metacíclicas del parásito (3). Esta interacción del parásito con moléculas de la superficie del macrófago parece ser muy importante para la modulación de una respuesta inmune específica; por ejemplo, recientemente se ha reportado que la producción de IL-12, una citocina crucial para la iniciación de la inmunidad mediada por células, es inhibida por la unión de ligandos a CR3 (8).

Ya dentro de las células del hospedero el amastigote necesita protegerse de las moléculas antimicrobianas tóxicas tales como las especies reactivas del oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) o el óxido nítrico presentes en la vacuola parasitófora. Glicoinositolfosfolípidos de la superficie de *L. major* y la molécula KMP-11 asociada a LPG se han implicado en la regulación negativa de la actividad de la

sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) en macrófagos murinos infectados (7). Adicionalmente, el parásito secreta gran cantidad de enzimas y productos que inhiben la acción de los radicales de oxígeno y el peróxido de hidrógeno. Todos estos mecanismos hacen posible la persistencia y replicación del parásito dentro de las células infectadas.

Simultáneamente con estos mecanismos de respuesta inmune inespecífica del hospedero, el macrófago infectado empieza a procesar los antígenos parasitarios para presentarlos en su superficie en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o II a los linfocitos TCD8<sup>+</sup> o TCD4<sup>+</sup>, respectivamente, para que de esta manera se establezca una respuesta inmune específica.

Con respecto a esta respuesta, se distinguen dos grupos principales de células TCD4<sup>+</sup> con base en su patrón de producción de citocinas (9). Las células Th1, que secretan principalmente interleucina 2 (IL-2), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ), han mostrado que juegan un papel muy importante en la respuesta inmune mediada por células contra patógenos intracelulares. Por su parte, las células Th2 secretan principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y están implicadas en la respuesta inmune humoral contra patógenos extracelulares (9). Se ha estudiado bien el papel de estos subgrupos de células TCD4<sup>+</sup> en la infección por *Leishmania major* en el modelo murino experimental (10). De manera interesante, diferentes cepas singénicas de ratones infectados con este parásito reproducen un espectro similar de la infección al visto en el humano que puede ser atribuido a la expansión diferencial de las células Th1 o Th2. Las citocinas producidas por las células Th1 están asociadas con resistencia a la infección.

Las cepas de ratones que desarrollan este fenotipo, como por ejemplo los ratones C57BL/6,

C3HeB/FeJ, B10.D2 y CBA/J, después de la infección desarrollan lesiones localizadas que se autorresuelven y que confieren resistencia a la reinfección (10). En contraste, las citocinas producidas por las células Th2 se han asociado con susceptibilidad a la infección. La cepa de ratones BALB/c desarrolla este fenotipo después de la infección dando como resultado una enfermedad visceral diseminada que finaliza en muchos casos con la muerte del animal entre las doce y catorce semanas (10).

Estas evidencias experimentales hacen que el entendimiento de los mecanismos de diferenciación de las células Th sea fundamental para la manipulación terapéutica del fenotipo de citocinas o el diseño de vacunas en la enfermedad.

Estudios recientes indican que la IL-4 parece ser esencial en la estimulación primaria y la maduración de las células Th2, mientras que la IL-12 permite la maduración de las células Th1 (11). Adicionalmente, IL-4 e IFN- $\gamma$  ejercen efectos reguladores opuestos en las células Th1 y Th2 respectivamente (12).

La IL-12 es una citocina heterodimérica producida por macrófagos, células dendríticas y células B. Esta citocina aumenta la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y las células T y tiene efecto estimulador en la citotoxicidad de las células NK (13). La IL-12 parece conferir protección contra *Leishmania* suprimiendo la producción de IL-4 y la diferenciación Th2 (14). Adicionalmente, se ha mostrado que la IL-12 es crucial en el control y la curación de las infecciones por *L. major* ya que el tratamiento con anti-IL-12 de ratones resistentes a la infección los vuelve susceptibles (15). Además, la IL-12 usada sola o en combinación con antígenos de *Leishmania* estimula el desarrollo de una respuesta tipo Th1 en ratones BALB/c susceptibles (16). En contraste, la IL-12 sola es incapaz de prevenir la progresión de la enfermedad en estos ratones.

nes cuando el tratamiento se inicia luego de la primera semana de infección (15). Estas observaciones reflejan el papel fundamental de la IL-12 en el desarrollo de resistencia a la enfermedad y sugieren la evaluación de esta citocina en inmunoterapia específica teniendo en cuenta su inhabilidad para conferir protección cuando la infección ya se ha establecido completamente.

De otro lado, se ha demostrado que, a diferencia de los ratones C57BL/6, los BALB/c presentan una gran producción de IL-4 durante la fase temprana de la infección y se piensa que esta citocina es responsable de la expansión de células Th2 en dichos ratones; la neutralización de esta citocina con anticuerpos específicos o receptor de IL-4 soluble confiere protección. Se han postulado algunas poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> específicas (NK 1.1<sup>+</sup>) como responsables de la producción de IL-4 después de la infección con *L. major* (17); el mecanismo responsable de su producción temprana parece ser la ausencia en la producción de IL-12 o la supresión de las funciones efectoras de esta citocina por parte de otras citocinas tales como TGF- $\beta$  e IL-10 cuya expresión está aumentada en las células de ratones BALB/c (13,18). Sin embargo, la fuente celular inicial de producción de IL-4 y el mecanismo de regulación positiva no se conocen con exactitud (13,14).

Otra de las citocinas implicadas en la protección contra microorganismos intracelulares es el IFN- $\gamma$  que es capaz de aumentar la transcripción de iNOS y la liberación de Óxido Nítrico en macrófagos murinos estimulados (19). El IFN- $\gamma$  juega un papel importante en el desarrollo de células Th1 en ratones resistentes ya que el tratamiento con anti-IFN- $\gamma$  o la eliminación del gen del IFN- $\gamma$  o de su receptor (IFN- $\gamma$ R) dan como resultado el desarrollo de úlceras cutáneas severas y la visceralización del parásito (20). Sin embargo, El IFN- $\gamma$  no es suficiente como un mediador soluble de la activación de las células T para inducir protección en ratones

BALB/c susceptibles ya que, a diferencia de la IL-12, ni la dosis única ni la liberación sostenida de IFN- $\gamma$  hasta por 6 semanas en estos ratones es capaz de revertir el curso progresivo de la enfermedad (21). Entonces la carencia en la producción temprana de IFN- $\gamma$  no parece ser la razón del fenotipo Th2 debido tal vez a que IFN- $\gamma$  no inhibe la transcripción de IL-4 (10).

Por otra parte, además de diferenciarse por su patrón de linfocinas producidas, las células Th1 y Th2 posiblemente también puedan diferenciarse por la expresión de ciertos marcadores sobre su superficie. Al respecto, una de las moléculas implicadas es el CD30, miembro de la superfamilia del receptor para TNF y que es un marcador de activación de los linfocitos T. Un estudio con clones de células T humanas reveló que CD30 era expresada preferencialmente en clones de células Th2. Adicionalmente, la activación de Th2 y Th0 pero no de Th1 dio como resultado la liberación de cantidades detectables de sCD30 en los sobrenadantes de los cultivos (22).

Una molécula que recientemente ha sido implicada como marcador de las células Th1 es la subunidad  $\beta 2$  del IL-12R. Hasta ahora dos subunidades de IL-12R han sido identificadas: IL-12R $\beta 1$  e IL-12R $\beta 2$ . Esta última, a diferencia de la  $\beta 1$ , contiene residuos de tirosina en su dominio citoplasmático y parece ser el componente de señalización de IL-12R. Estudios *in vitro* revelaron que la expresión de RNAm para IL-12R $\beta 1$  era similar tanto en células Th1 como en células Th2 humanas mientras que el RNAm para IL-12R $\beta 2$  se expresaba sólo en células Th1 y su producción era estimulada por la presencia de IL-12 (23). La expresión de este receptor no sólo es un indicador de la presencia de células Th1 sino que además puede permitir la modulación positiva de esta población celular; por lo tanto, la posibilidad de estimular la expresión *in vivo* de estas moléculas de superficie podría tener implicaciones en la manipulación terapéutica de la

Leishmaniosis suministrando otra herramienta para el control de la enfermedad.

Por otra parte, la respuesta de células TCD8<sup>+</sup> también puede ser discriminada según su perfil de producción de citocinas en patrones que se asemejan a células Th1 o Th2 (24). Un cuerpo creciente de evidencias ha establecido claramente que la subpoblación de linfocitos TCD8<sup>+</sup> también contribuye a la resolución de la enfermedad y a la resistencia contra la reinfección en Leishmaniosis cutánea. La eliminación de las células TCD8<sup>+</sup> evita la respuesta curativa inducida en ratones BALB/c después de tratamiento con anti-IL-4. Además, la habilidad de las células T de ratones BALB/c curados para secretar IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  se redujo significativamente después de eliminar las células TCD8<sup>+</sup> (25). En humanos, la efectividad del tratamiento en pacientes con leishmaniosis cutánea causada por *L. braziliensis* se ha asociado con un aumento en el porcentaje de células TCD8<sup>+</sup> en cultivos estimulados con antígeno (4). Esto sugiere que cualquier antígeno candidato para una vacuna en Leishmaniosis deberá inducir una respuesta de células TCD8<sup>+</sup> en asociación con las células T TCD4<sup>+</sup>, de manera que pueda provocar una respuesta inmune efectiva para controlar la infección.

A pesar de que se tiene una gran cantidad de información sobre la respuesta inmune en Leishmaniosis cutánea en el modelo murino, son pocos los trabajos que se han realizado en la caracterización de la respuesta inmune de linfocitos TCD4<sup>+</sup> dirigida contra el parásito en el ser humano y su relación con las diferentes formas de presentación clínica de la enfermedad. Los resultados de varios estudios sugieren que aunque la producción de citocinas en las diferentes formas de presentación clínica de la infección es menos polarizada que en el ratón, existe una clara tendencia hacia la producción de citocinas propias del perfil Th1 en las formas menos severas de la enfermedad (5,6). Sin embargo, existen muchos interrogantes en cuanto

al fenotipo de respuesta de linfocitos TCD4<sup>+</sup> y células TCD8<sup>+</sup> en los individuos resistentes a la infección (personas con prueba de Montenegro positiva que no desarrollan ninguna manifestación clínica). La información resultante de estas investigaciones podría permitir identificar subpoblaciones de células T reactivas para *Leishmania* en individuos susceptibles y resistentes a la infección. Además, estos resultados podrían ayudar al desarrollo de ensayos *in vitro* para identificar antígenos de *Leishmania* que estimulen una respuesta inmune protectora y que puedan evaluarse como candidatos en el desarrollo de una vacuna capaz de controlar la infección.

## SUMMARY

### IMMUNE RESPONSE OF T CELLS IN CUTANEOUS LEISHMANIOSIS

The role of TCD4<sup>+</sup> cell subsets, Th1 and Th2, has been studied in the infection by *Leishmania major* in the murine model. The development of the Th1 phenotype in inbred strains of mice (cells that mainly secrete IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\beta$ ) are associated with resistance to *L. major* infection. In contrast, Th2 phenotype (cells that mainly secrete IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13) are associated with susceptibility to the infection. Recent data suggest that IL-4 appears to be essential for the priming and maturation of Th2 cells while IL-12 enhances the maturation of Th1 cells. In addition, IL-4 and IFN- $\gamma$  exert opposite regulatory effects on Th1 and Th2 cells, respectively. Recent findings have clearly established that the CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations also contribute to the resolution of the disease and resistance against infection. In humans, although the specific immune response against the parasite is less polarized than in mice, there is a clear tendency to the development of the Th1 phenotype in the mild forms of cutaneous infection.

Identification of specific *Leishmania*-reactive

T cell subpopulations in susceptible and resistant individuals should lead to the development of appropriate *in vitro* assays that could be used for the identification of *Leishmania* antigens against which a protective immune response is elicited to test as potential vaccine candidates.

## BIBLIOGRAFÍA

1. DESJEUX P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Quarterly* 1992; 45: 267.
2. WEIGLE K, SANTRICH C, MARTÍNEZ F, *et al.* Epidemiology of cutaneous Leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. *J Infect Dis* 1993; 168: 699-708.
3. ROBLEDO S, WOZENCRAFT A, VALENCIA AZ, SARAVIA N. Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility *in vitro* with clinical phenotype. *J Immunol* 1994; 152: 1265-1276.
4. DA-CRUZ AM, SILVA FC, BERTHO A, COUTINHO SG. *Leishmania*-reactive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells associated with cure of human cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun* 1994; 62: 2614-2618.
5. TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, SÁNCHEZ MA, FERNÁNDEZ AE, CONVIT J. The cutaneous lesion in American Leishmaniasis: Leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res* 1993; 26: 239-247.
6. CÁCERES-DITTMAR G, TAPIA FJ, SÁNCHEZ MA, YAMAMURA M, UYEMURA K, MODLIN RL, *et al.* Determination of the cytokine profile in American cutaneous Leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 500-505.
7. BOGDAN C, GESSNER A, SOLBACH W, RÖLLINGHOFF M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 517-525.
8. MARTH T, KELSALL BL. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med* 1997; 185: 1987-1995.
9. ROMAGNANI S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18: 263-266.
10. REINER SL, LOCKSLEY RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* 1995; 13: 151-177.
11. HEINZEL FP. Interleukin 12 and the regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell subset responses during murine Leishmaniasis. *Parasitol Today* 1994; 10: 190-193.
12. SALGAME P, ABRAMS JS, CLAYBERGER C, GOLDSTEIN H, CONVIT J, MODLIN RL, *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254: 279-281.
13. SHARTON-KERSTEN T, AFONSO LCC, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, SCOTT P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental Leishmaniasis. *J Immunol* 1995; 154: 5320-5330.
14. LAUNOIS P, SWIHART KG, MILON G, LOUIS JA. Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* 1997; 158: 3317-3324.
15. SYPEK JP, CHUNG CL, MAYOR SEH, SUBRAMANYAM JM, GOLDMAN SJ, SIEBURTH DS, *et al.* Resolution of cutaneous Leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993; 177: 1797-1802.
16. AFONSO LCC, SHARTON TM, VIEIRA LQ, WYSOCKA M, TRINCHIERI G, SCOTT P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 1994; 263: 235-237.
17. LAUNOIS P, OHTKI T, SWIHART K, *et al.* In susceptible mice, *Leishmania major* induces very rapid interleukin-4 production by CD4<sup>+</sup> T cells which are NK 1.1<sup>+</sup>. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3298-3307.
18. REINER SL, ZHENG S, WANG Z-E, STIWRING L, LOCKSLEY RM. *Leishmania* promastigotes evade interleukin-12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4<sup>+</sup> T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 1994; 179: 447-456.
19. DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141: 2407-2412.
20. SWIHART K, FRUTH U, MESSMER N, HUG K, BEHIN R, HUANG S, *et al.* Mice from genetically resistant background lacking the interferon- $\gamma$  receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4<sup>+</sup> T cell response. *J Exp Med* 1995; 181: 961-971.
21. SCOTT P. INF- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol* 1991; 147: 3149-3155.
22. DEL PRETE G, DE CARLI M, ALMERIGOGNA F, DANIEL CK, D'ELIOS MM, ZANCOUGH G, *et al.* Preferential expression of CD30 by human CD4<sup>+</sup> T cells producing Th2-type cytokines. *FASEB J* 1995; 9: 81-86.
23. ROGGE L, BARBERIS-MAINO L, BIFFI M, PASSIN N, PRESKY DH, GUBLER U, *et al.* Selective expression of an Interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 1997; 185: 825-831.
24. ERARD F, LE GROS G. Th2-like CD8 T cells: Their role in protection against infectious diseases. *Parasitol Today* 1994; 10: 313-315.
25. MULLER I, KROPF P, ETGES RJ, LOUIS JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: Role of the CD8<sup>+</sup> T cells. *Infect Immun* 1993; 61: 3730-3738.