

# INMUNOPATOLOGIA DE LA LESION CUTANEA EN LA LEISHMANIASIS CUTANEA AMERICANA

Dr. G. Cáceres-Dittmar\*  
Dr. F.J. Tapia\*\*

## INTRODUCCION

La Leishmaniasis Cutánea Americana (LCA) es una enfermedad espectral ocasionada por el parásito *Leishmania*, dependiendo de la especie del parásito y/o de la capacidad de respuesta inmune del individuo la LCA puede tener diferentes formas, leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD).<sup>5,6,7</sup> El espectro está claramente diferenciado a nivel histopatológico e inmunológico y el análisis de las lesiones suministra información fundamental de la respuesta inmune que ocurre in situ frente al parásito. En los últimos años nuestro laboratorio ha analizado esta respuesta desde tres aspectos. inmunofenotipos leucocitarios, interleucinas y compromiso epidérmico.

## INMUNOFENOTIPOS LEUCOCITARIOS

La relación entre las poblaciones de linfocitos T cooperadores-inducto

res y T supresores -citotóxicos (CD4+/CD8+) entre las distintas formas de la enfermedad muestra valores estadísticamente distintos. Las lesiones de la forma localizada de la enfermedad tienen un valor cercano a los valores normales ( $0,99 \pm 0,08$ ). Mientras la forma mucocutánea tiene el máximo valor ( $1,24 \pm 0,09$ ) y la forma difusa presenta los valores más bajos ( $0,77 \pm 0,04$ ). También se han observado diferencias en la subpoblación de linfocitos T CD4+ con respecto a la expresión de marcadores que indican el estado de actividad celular, tales como, producción de IL-2, receptor de IL-2 (CD25) y proporción de linfocitos T "vírgenes", linfocitos que no han visto antígeno, (CD4+ CD45RA+) y "memoria". linfocitos T previamente sensibilizados, (CD4+ CD45RO+1) En la forma difusa de la enfermedad la proporción de linfocitos productores de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 están significativamente disminuidos.<sup>15 14</sup> En la forma localizada se observa la mayor expresión del receptor de IL2, mientras en la forma mucocutánea y difusa se expresan valores más bajos (LCL=  $668 \pm 220$  cels/mm<sup>2</sup>; MCL=  $244 \pm 51$  cels/mm<sup>2</sup> DCL=  $391$  cels/mm<sup>2</sup>). La población de linfocitos T vírgenes es superior en la forma difusa ( $417$  cels/mm<sup>2</sup>),

siendo menor en las formas localizada ( $172 \pm 57$  cels/mm<sup>2</sup>) y mucocutánea ( $177 \pm 24$  cels/mm<sup>2</sup>). Contrariamente los linfocitos T memoria están en menor proporción en la forma difusa (LCD=  $1055$  cels/mm<sup>2</sup>; LCL=  $1364 \pm 452$  cels/mm<sup>2</sup>; MCL=  $1705 \pm 231$  cels/mm<sup>2</sup>).<sup>14</sup>

También hemos determinado en el granuloma la participación de linfocitos T que expresan los 2 tipos de receptor antigénico, el TCR1 o linfocitos T TB y el TCR 2 o linfocitos T a 3. Encontramos que el número de linfocitos T TB es significativamente mayor en los granulomas de la forma localizada ( $528 \pm 43$  cels/mm<sup>2</sup>), que en la forma difusa ( $367 \pm 53$  cels/mm<sup>2</sup>) y mucocutánea ( $265 \pm 29$  cels/mm<sup>2</sup>). Los linfocitos T a p se encuentran en valores significativamente mayores que los linfocitos TT8 en las tres formas de la enfermedad, con valores menores para la forma difusa.<sup>24</sup>

En los últimos años se han descrito moléculas muy importantes para el proceso de adhesión celular como son la familia de las integrinas que incluyen los antígenos asociados a la función linfocitaria (LFA-1 a LFA-1 (3), los cuales se unen a las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1. ICAM-2), y desencadenan

\* Biólogo. Doctorado en Ciencias. U.C.V.

\*\* Biólogo. Master of Philosophy, U. de Londres.

una serie de efectos coestimuladores para la activación de los linfocitos T.9,1°25'2° La molécula LFA-1 se expresa en todos los linfocitos, aunque en mayor grado en los linfocitos T memoria que en los T vírgenes.<sup>19</sup> Nuestros estudios señalan que en la LCA las dos subunidades del LFA se expresan diferencialmente con valores estadísticamente superiores para la subunidad beta. La mayor expresión de linfocitos T LFA-1 se observa en la forma localizada de la enfermedad. Mientras que la mayor expresión de LFA1- a está en los pacientes con LCD. Se ha demostrado que la subunidad citoplasmática beta es la más importante en el proceso de interacción celular.<sup>12</sup> por lo que estos resultados reflejan una mayor efectividad en la capacidad de interacción celular de la forma localizada.

### INTERLEUCINAS

Desde 1986, Mosmann y col.<sup>16</sup> evidenciaron en clones de linfocitos T CD4+ de ratón diferencias en el patrón de producción de citocinas. Los denominados TH1 que producen Interleucina-2 (IL-2) y gamma-interferón (INF Tr) y los TH2 que producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10. Además se ha observado una correlación entre resistencia y RNA mensajero (mRNA) de las citocinas asociadas a TH1 y susceptibilidad, y mRNA de las citocinas producidas por los TH2.<sup>11</sup> Recientemente, se ha demostrado que también existen diferencias en la producción de citocinas en los linfocitos T CD8+, por lo que se ha propuesto hablar de T1 y T2.<sup>2</sup>

Las diferencias demostradas en la caracterización de los inmunofenotipos leucocitarios entre las distintas formas de la leishmaniasis cutánea americana indican probables diferencias en las citocinas producidas por los diferentes tipos de lesiones. Por esta razón decidimos analizar el patrón de citocinas existentes en la LCA, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa reversa (RTPCR). La forma localizada presentó una mezcla de linfocitos T1 y T0, con

un predominio de INF- ti sobre IL-4, y bajos niveles de IL-5 e IL-10. La forma mucocutánea mostró una mezcla de T1 y T2, con altos niveles en la mayoría de las citocinas analizadas, lo que pudiera contribuir al daño tisular observado en estos pacientes. En la forma difusa existe un predominio de citocinas T2, con los niveles de IL-4 dominando sobre los de INF- ti.<sup>4</sup>

### COMPROMISO EPIDERMICO

La epidermis juega un papel fundamental en el inicio de los procesos inflamatorios a través de la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II), moléculas de adhesión y producción de citocinas, que son fundamentales para la atracción y retención de células inflamatorias.<sup>18,23,3</sup> Las células de Langerhans (CL) son las células presentadoras de antígeno más importantes en la epidermis, además están involucradas en la memoria inmunológica.<sup>21</sup> La posibilidad de que las CL fueran infectadas por *Leishmania* fue reportada hace mucho tiempo,<sup>8</sup> pero sólo recientemente se comprobó esta posibilidad *In vitro*.<sup>1</sup> También se ha demostrado que los queratinocitos tienen capacidad de presentación antigénica,<sup>17</sup> apoyando la importancia que tiene la epidermis en el desarrollo de una adecuada respuesta inmune.

En la LCA demostramos grandes diferencias en relación con las células epidérmicas. En la forma localizada encontramos el mayor número de células de Langerhans CD1a+ ( $527 \pm 156$  cels/mm<sup>2</sup>). La expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) se localiza en grupos de queratinocitos, como también ha sido demostrado en otros desórdenes cutáneos.<sup>13</sup> Por su parte, las moléculas HLA-DR (MHC-II) se expresan en las CL y algunos queratinocitos. En la forma mucocutánea se observó una ausencia de CL en el epitelio mucoso,<sup>14</sup> y exacerbada expresión de HLA-DR e ICAM-1. La forma difusa presenta valores variables

de CL que expresan MHC-11. Los queratinocitos no expresan HLA-DR ni ICAM-1. Evidenciándose en la epidermis de la forma difusa una marcada disminución en la expresión de las señales accesorias.

### CONCLUSIONES

Nuestros resultados evidencian que en las lesiones de pacientes con LCD existe una marcada disminución en las señales accesorias por parte de la epidermis, impidiendo la formación de un granuloma capaz de resolver la enfermedad. Además muchos de los linfocitos T del granuloma no están sensibilizados, y las citocinas existentes en estas lesiones contribuyen a la persistencia del parásito. En la leishmaniasis cutánea localizada la epidermis expresa una serie de señales accesorias que permiten la formación del granuloma, el cual se caracteriza por presentar mayor proporción de linfocitos T sensibilizados. La producción de citocinas en LCL favorece la destrucción del parásito por parte de los macrófagos. En la leishmaniasis mucocutánea se ha observado una gran hiperreactividad de estos pacientes a diferentes antígenos y el análisis inmunocitoquímico nos muestra una exacerbada expresión de moléculas de adhesión, ausencia de células de Langerhans y a nivel de granuloma gran cantidad de linfocitos activados. La producción de citocinas también es alta. La falla de un eficiente sistema de control de la respuesta inmune en estos pacientes puede estar ocasionando parte de la severa patología en ellos observada.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Blank C, Fuchs H, Rappersberger K, Röllinghoff M, Moll H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania* major. J Infect Dis. 1993; 167: 41825.
- 2.- Bloom BR, Salgame P, Diamond B. Revisiting and revising suppressor T cells. Immunol Today. 1992; 13: 131-6.

- 3.- Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, Oriol O, Kraal G, Tapia FJ. Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 1992; 99: 95S8S.
- 4.- Cáceres-Dittmar G, Tapia Fi, Sánchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol.* 1993; 91: 500-5.
- 5.- Convit J, Pinaridi ME, Rondón AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to and immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972; 66: 603-10.
- 6.- Convit J. Leprosy and leishmaniasis. Similar clinical immunological pathological models. *Ethiop Med.* 1974; 12: 187-95. Convit J, Pinaridi ME. Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunopathological spectrum in South America. In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease.* Amsterdam. Ciba Foundation Symposium 20. Elsevier. Excerpt Med, North Holland. 1974; pp. 159-66.
- 8.- Domp Martin A, Healy AT, Nacy CA, Hauser C, Meltzer MS. Leishmania major infects and replicates within epidermal Langerhans cells (abs). *J Invest Dermatol.* 1988; 91: 404.
- 9.- Dustin ML, Springer TA. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 on cultured endothelial cells. *J Cell Biol.* 1988; 107: 32131.
- 10.- Elices Mi, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G, Lobb R. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Ceell.* 1990; 60: 577584
- 11.- Heinzel FP, Sadick MI, Holaday BJ, Coffman RI, Locksley PM. Reciprocal expression of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. *J Exp Med.* 1989; 169: 59-72.
- 12.- Hibbs ML, Xu H, Stacker SA, Springer TA. Regulation of adhesion to ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin  $\alpha$  subunit. *Science.* 1991; 251: 1611-3.
- 13.- Lewis RE, Buchsbaum M, Whitaker D, Murphy GF. Intercellular adhesion molecule expression in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J Invest Dermatol.* 1989; 93: 672-7
- 14.- Martínez-Arends A, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Mosca W, Valecillos L, Convit J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cells markers. *Acta Trop.* 1991. 49: 271-80.
- 15.- Modlin RL, Tapia Fi, Bloom BR, Gallinoto ME, Castés M, Rondón AJ, Rea, TH, Convit J. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1985; 60: 241-8.
- 16.- Mosmann TR, Cherwinski H. Bond MW. Giedlhr MA. Coffman RL. Two types of murine helper T cell clones 1. Definition according to profiles of lymphokines activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986. 136. 2348-57
- 17.- Mutis T, De Bueger M, Bakker A, Ottenhoff THM. HLA Class II human keratinocytes present Mycobacterium leprae antigens to CD4+ Th1-like cells *Scand J Immunol.* 1993. 37- 4351
- 18.- Nickoloff BJ. Role of interferon- $\gamma$  in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch Dermatol.* 1988; 124: 1835-43
- 19.- Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Roles of adhesion molecules in T cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding, and costimulation. *Immunol Rev.* 1990; 114: 109-43.
- 20.- Shimizu Y, Newman W, Venkat Gopal T, Horgan KJ, Graber N, Beall LD, van Seventer GA, Shaw S. Four molecular pathways of T cells adhesion to endothelial cells: roles of LFA-1, VCAM-1 and ELAM-1 and changes in pathway hierarchy under different activation conditions. *J Cell Biol.* 1991; 113:1203-12.
- 21.- Streilen JW, Grammer SF. In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol.* 1989; 143: 3925-33.
- 22.- Tapia FJ, Rojas E, Kraal G, Mosca W. Convit J. Immunocytochemical analysis of Langerhans cells in murine cutaneous leishmaniasis. In: Thivolet J, Schmitt D (eds). *The Langerhans cells.* John Libbey Eurotext Ltd, London. 1988; pp. 479-90.
- 23.- Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Acuña L, Mosca W. Epidermal Langerhans cells in infectious diseases. *Histol Histopath.* 1989; 4. 499-508.
- 24.- Tapia Fi, 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 En imprenta.
- 25.- van Seventer GA, Newman W. Shimizu Y. Nutman TB. Tanaka Y, Horgan KJ. Verrkat Gopal T, Emris E. O'Sullivan D, Grey H, Shaw S. Analysis of T cells stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules of by CD3 monoclonal antibody. costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM1. but no ELAM-1. *J Exp Med.* 1991. 174 901-13