

## LA RESPUESTA HUMORAL EN LEISHMANIASIS AMERICANA

Dr. Marian Ulrico, Ph.D\*

La respuesta inmunológica en la leishmaniasis americana se caracteriza por la producción de anticuerpos específicos contra el parásito y por el desarrollo, en la mayoría de los casos, de reactividad mediada por linfocitos timo-dependientes sensibilizados. En este capítulo se hará referencia a las características de la respuesta de anticuerpos a través del espectro clínico de la enfermedad y a las aplicaciones de su estudio en el diagnóstico, seguimiento y patogénesis de la enfermedad.

Los pacientes con cualquiera de las formas clínicas de leishmaniasis americana desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la enfermedad, la cual se mantiene durante el curso de la infección y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría si no de todos los parásitos. Esta respuesta refleja, en primer lugar, la carga parasitaria presente en las lesiones.<sup>1,5</sup> Por lo tanto, los títulos de anticuerpos son más elevados en leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y en leishmaniasis visceral (LV), al compararlos con los títulos

en formas cutáneas localizadas (LCL) o muco-cutáneas (LMC) con una carga parasitaria relativamente baja. Los altos títulos de anticuerpos contra *Leishmania donovani* han permitido el desarrollo de pruebas sencillas de aglutinación directa para el diagnóstico de la enfermedad visceral<sup>6</sup>

Adicionalmente, la cronicidad de la infección contribuye al desarrollo y mantenimiento de niveles relativamente altos de anticuerpos.<sup>14</sup> En un estudio publicado recientemente, hemos reportado pruebas positivas para anticuerpos en 92% de los sueros de casos LCL, 88% de los LMC y 89% de los LCD (Tabla) utilizando un inmunoensayo enzimático o prueba de ELISA con promastigotes formalinizados.<sup>3</sup> Algunos de los pacientes del grupo LCD eran clínicamente inactivos después de tratamiento prolongado con quimioterapia e inmunoterapia, que probablemente explique el resultado negativo en dos de ellos. Hubo un 6% de pruebas positivas en sueros de controles normales en esta serie de evaluaciones.

Las pruebas serológicas son casi siempre fuertemente positivas en las formas viscerales de la

enfermedad, aún en niños pequeños, pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otras situaciones caracterizadas por respuestas inmunológicas comprometidas. En contraste con la inmunidad mediada por células, de aparición tardía en la LV, la positividad serológica se manifiesta temprano en el curso de la enfermedad y ofrece un apoyo muy significativo al diagnóstico clínico.

Estudios inmunológicos relativamente recientes sugieren que se podría esperar una relación inversa entre los niveles de anticuerpos contra *Leishmania* y las manifestaciones de inmunidad mediada por células (IMC), reflejo del predominio de una respuesta inmunológica del tipo T1, que favorece la IMC, o del tipo T2, que favorece la síntesis de anticuerpos. No hemos observado esta relación inversa en la LCL,<sup>3</sup> enfermedad en la cual ambas manifestaciones de la respuesta inmunológica son relativamente fuertes. En cambio, esta relación ocurre en la LMC, al analizarla en términos del número de áreas del sistema respiratorio comprometidas en el proceso. Con un compromiso más extenso y más severo, los niveles de anticuerpos son más elevados (ver Tabla) y la hipersensibilidad retardada (prue-

\* Jefe Sección de Inmunología II, Instituto de Biomedicina, San José, Caracas.

**TABLA**  
**NIVELES DE ANTICUERPOS**  
**EN LEISHMANIASIS CUTANEA AMERICANA**

Grupo	Número	Promedio, valor de ELISA
LCL	130	0,77 ± 0,02*
LMC	59	0,82 ± 0,05
1 área**	41	0,69 ± 0,05
2-3 áreas	18	1,13 ± 0,09
3-4 áreas	15	1,21 ± 0,09
LCD	18	0,65 ± 0,05
Controles sanos	33	0,24 ± 0,02

\* Densidad óptica ± error estandard  
\*\* Areas afectadas del sistema respiratorio superior

ba de leishmanina o Montenegro) se hace más débil,<sup>3</sup> o incluso negativa.<sup>10</sup> Se ha postulado que este compromiso severo de la IMC puede ser consecuencia de un estado de desnutrición asociado con la dificultad en alimentarse adecuadamente por las mismas lesiones a nivel de boca y faringe.<sup>10</sup>

La sensibilidad de las pruebas para detectar anticuerpos anti-Leishmania se aumenta considerablemente con el uso de inmunoensayos enzimáticos (pruebas de ELISA) y estos ensayos permiten cuantificar la reactividad. La inmunofluorescencia indirecta, ampliamente usada durante muchos años, es laboriosa y relativamente subjetiva, pero la negativización de la prueba demuestra buena correlación con la curación clínica. Además de la característica de sensibilidad, el factor de especificidad es de gran importancia en la interpretación de las pruebas serológicas. La infección por *Trypanosoma cruzi* ocurre en muchas áreas de América que también son endémicas para la leishmaniasis, y estos dos miembros de la Familia Trypanosomatidae inducen un alto nivel de reactividad cruzada en pruebas serológicas con extractos antigénicos crudos. El procedimiento del Western blot, aunque no es de uso rutinario, permite aclarar las dudas que puedan surgir en estos casos.<sup>4</sup>

El estudio de la clase o isotipo de anticuerpos presentes durante el curso de infección es de interés en la selección de pruebas de alta sensibilidad. Labrada et al,<sup>7</sup> demostraron anticuerpos de la clase IgM contra *Leishmania* en pacientes cuyas lesiones eran de corta evolución (dos meses o menos); en el suero de pacientes con lesiones de evolución más larga, predominaba anticuerpos específicos de la clase IgG.

Hoy en día se ha demostrado el predominio de anticuerpos del isotipo IgG4 y de la clase IgE en muchas infecciones parasitarias y en procesos alérgicos crónicos; este isotipo está asociado con una respuesta del Tipo 2, en la cual la interleuquina-4 juega un papel muy importante en la actividad cooperadora con linfocitos B en la síntesis de anticuerpos.<sup>12</sup> Aparentemente no se ha evaluado este fenómeno detalladamente en la leishmaniasis humana, pero sería de gran interés, en vista de las conclusiones preliminares que asocian las formas resistentes de la leishmaniasis con una respuesta del Tipo 1 y 0, en las formas progresivas se ha reportado una respuesta predominantemente del Tipo 2.<sup>2</sup> En un modelo murino de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis cutánea, la respuesta temprana fue similar en ambos

grupos (alta frecuencia de clones productores de IL-4, respuesta Tipo 2), pero la respuesta Tipo 1 predominaba en las etapas tardías en los ratones resistentes; la respuesta Tipo 2 persistía en los ratones susceptibles." Estas observaciones apoyan la posible utilidad de medir diferentes clases e isotipos de inmunoglobulinas en estudios prospectivos relacionados al posible desarrollo de recaídas, reinfecciones o formas resistentes de leishmaniasis humana.

Llama la atención que los altos niveles de anticuerpos en LV y LCD usualmente no están asociados con reacciones cutáneas de hipersensibilidad inmediata, tipo Arthus o anafilaxis, frente a la leishmanina. No está claro si esto se debe a la naturaleza del antígeno utilizado, pero parece poco probable. Más bien sugiere que los anticuerpos predominantes no fijan el complemento, que es un paso necesario para el desarrollo de las reacciones de Arthus, y no sean de la clase IgE, requerida para las reacciones de anafilaxia. En este sentido, es de interés que Lynch et al,<sup>8</sup> reportaron muy escasa IgE contra amastigotes de *Leishmania* en leishmaniasis cutánea americana; igualmente interesante es el hecho que la IgG4 no fija el complemento. Por lo tanto, esta área de investigación amerita investigaciones adicionales.

Además de su utilidad en el diagnóstico de la leishmaniasis, especialmente en formas muco-cutáneas atípicas y en infección visceral, la medición de anticuerpos ofrece una herramienta valiosa para el seguimiento de los pacientes tratados. Se ha observado un descenso muy significativo en los niveles de anticuerpos contra *Leishmania* después del tratamiento de LCL con quimioterapia o con inmunoterapia.<sup>13</sup> Estudios longitudinales permitirán aclarar si la persistencia de niveles significativos de anticuerpos después de la curación clínica en una minoría de estos pacientes está asociado con recaídas o con el desarrollo de complicaciones muco-cutáneas posteriores.

La determinación de niveles de anticuerpos anti-Leishmania también ha sido de mucha utilidad en la evaluación de la eficacia terapéutica en los pacientes con LMC y con LCD, en los cuales la evaluación clínica se dificulta mucho por lo inaccesible o la gran extensión de las lesiones (Fernández et al., datos no publicados).

Actualmente se considera que los anticuerpos circulantes no juegan un papel importante en las reacciones inmunológicas protectoras frente a las infecciones con Leishmania. A pesar de la gran susceptibilidad de los promastigotes de cultivo al efecto lítico de anticuerpos más complemento, las formas metacíclicas son relativamente resistentes a este efecto. De todas maneras, los anticuerpos contra Leishmania y el complemento aparentemente juegan un papel de gran importancia en la fagocitosis de los amastigotes a través de receptores en la superficie de los fagocitos para las inmunoglobulinas (receptores FcR) y para el complemento C3 (receptor CR3). Este mecanismo de fagocitosis indudablemente constituye una manera como la infección se mantiene durante cierto tiempo en el huésped, con la penetración de amastigotes en nuevas células hospedadoras, pero también puede contribuir a la eliminación eventual del parásito, al ponerlo en contacto con los mecanismos anti-parasitarios de las células del sistema macrófago.

Además de la utilidad de los estudios serológicos en el diagnóstico de la enfermedad y el seguimiento de los pacientes, la gran especificidad de la respuesta de anticuerpos ha proporcionado una herramienta para otros estudios relacionados con la enfermedad. Lynch et al,<sup>9</sup> han descrito la detección de amastigotes en biopsias cutáneas, mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-Leishmania. Ulrich et al,<sup>16</sup> han utilizado sueros humanos policlonales, absorbidos para eliminar los anticuerpos heterólogos, en una prueba sencilla y económica para clasificar

las leishmanias aisladas de lesiones cutáneas del Nuevo Mundo. Identificación de proteínas o epítopes inmunodominantes mediante las pruebas del Western blot y mediante su reactividad con anticuerpos monoclonales de alta especificidad podría contribuir en gran medida al desarrollo de vacunas; ya se han utilizado varios monoclonales para estudiar la penetración de amastigotes en las células macrófagas, ensayos de protección mediados por anticuerpos in vivo y otros aspectos asociados con la patogénesis de la enfermedad.

En resumen, a pesar de la poca evidencia que los anticuerpos específicos desempeñan un papel protector significativo en la leishmaniasis, otros aspectos como su utilidad en el diagnóstico, seguimiento y estudios de los mecanismos de patogénesis constituyen un aporte valioso al conocimiento inmunológico de la enfermedad.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Badaro KR, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Texeira RL, Johnson WD Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1986; 154: 1003-11.
- 2.- Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, 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. *Int Exp Immunol.* 1993; 91: 500-5.
- 3.- Convit J; Ulrich M. Fernández CT, Tapia FJ. Cáceres-Dittmar G, Castés , Rondón AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1993; 87: 444-8 en prensa).
- 4.- Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G antibody reactivity with Trypanosoma cruzi and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1990; 43: 650-6.
- 5.- Gutiérrez Y, Salinas FG, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology immune response, clinical presentation, and evolution in Leishmania braziliensis infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 43: 281-9.
- 6.- Harith AE, Holk AH, Kager PA, Leeuwenburg J, Mugaí R, Kiugu S, Laarman JJ. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82: 583-6.
- 7.- Labrada M, Weigle K. Valderrama L, Saravia N. Evaluación de la respuesta de isotipos de inmunoglobulina específica a Leishmania en leishmaniasis tegumentaria americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989; 84: 409-16.
- 8.- Lynch NR, Malavé C, Turner KJ. Infante B. IgE antibody against surface antigens of Leishmania promastigotes in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1986; 8: 109-16.
- 9.- Lynch NR, Malavé C, Infante RB, Modlin RL, Convit J. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis using monoclonal antibodies. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80: 6-9.
- 10.- Marsden PD. Mucosa] leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1986. 80: 859-76.
- 11.- Morris L, Trout AB, Handman E, Kelso A. Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN- $\gamma$  secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 1992; 149: 2715-21.
- 12.- Nüsslein H, Spiegelberg HL. Human interleukin-4 induces both IgE and IgG4 secretion in vitro. *J Clin Lab Anal.* 1990; 4: 414.
- 13.- Rodríguez V, Centeno M, Ulrich M. La respuesta serológica en la leishmaniasis cutánea americana en relación con inmunoterapia y quimioterapia. En la prensa. *Bol Soc Venezolana de Microbiol.*
- 14.- Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguin AF, Navas C, Palma G, Weigle KA. The relationship of Leishmania braziliensis subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1989. 159: 725-35.
- 15.- Ulrich M, Trujillo Ortiz D, Convit J. The effect of fresh serum on the leptomastigotes of Leishmania. 1. Preliminary report. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1968; 62: 825-30.
- 16.- Ulrich M, Centeno M, Mattout Z, Convit J. Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1988; 39: 179-84.