


# Caracterización de la respuesta inmune celular durante la infección *In Vitro* por *Leishmania (Viannia) panamensis* en individuos no expuestos

Claudia M. Trujillo<sup>\*,\*\*</sup>  
Milena Zuluaga<sup>\*,\*\*</sup>  
David A. Agudelo<sup>\*</sup>  
Sara M. Robledo<sup>\*\*</sup>  
Iván D. Vélez<sup>\*\*</sup>  
Pablo J. Patiño<sup>\*</sup>

## Resumen

**Objetivo:** el presente trabajo pretende caracterizar la respuesta inmune desarrollada durante la infección con *Leishmania (Viannia) panamensis* en individuos no expuestos a esta infección. **Población del estudio y métodos:** las células mononucleares de sangre periférica de 16 individuos sanos, Montenegro negativos, se infectaron con promastigotes vivos de *L. (V.) panamensis*. Luego de diferentes tiempos pos-infección se analizó por citometría de flujo la expresión en membrana de CD69/CD3-CD4-CD8, CD28 y CD152 y la producción intracelular de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-13. **Resultados:** el mayor porcentaje de células CD69+ se obtuvo después de 48 horas pos-infección utilizando una proporción célula:parásito de 1:10. Se observó una mayor activación en células CD8+ comparadas con las CD4+ aunque los máximos niveles de activación celular se obtuvie-

ron en células CD3 negativas. Se observó un aumento en la expresión de CD152 hasta las 120 horas pos-infección. La producción de IL-4 e IL-13 intracelulares fue detectada en menos del 1% de las células infectadas. La mayor producción de IFN- $\gamma$  e IL-12 se detectó en un 4% y 3% de las células respectivamente, con una mayor respuesta a las 20 horas pos-infección. **Conclusiones:** en este estudio se observa como las CMSP de individuos sanos, sin contacto previo con *L. (V.) panamensis* proliferan, se activan, modifican la expresión de moléculas coestimuladoras y producen citoquinas luego de la infección con el parásito. Esta respuesta podría ser debida a un fenómeno de reactividad cruzada con otros antígenos o a la presencia de superantígenos en la suspensión de promastigotes utilizada. **Palabras clave:** *Leishmania*, Linfocitos T. 

\* Grupo de Inmunodeficiencias Primarias-IDP. Universidad de Antioquia

\*\* Programa de Estudio y Control en Enfermedades Tropicales-PECET. Universidad de Antioquia.

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, Proyecto N°115-04-436-95 y por la Fundación para la promoción de la investigación y la tecnología-Banco de la República, Proyecto N°1021.

Trabajo ganador del Segundo Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Oriente Antioqueño, junio de 2000

Correspondencia: Dra. Claudia Milena Trujillo V. Cra 50A #63-85 Prado Centro, Medellín. Teléfonos: 5 10 60 57 – 2 33 51 60 – 2 63 19 30. E-mail: cmtruji@catios.udea.edu.co

## Introducción

La Leishmaniasis es una infección endémica en 82 países (10 desarrollados y 72 subdesarrollados) en los cuales se calcula que existen 350 millones de personas en riesgo, con una incidencia anual de 600.000 casos (1). En Colombia, la especie del parásito más comúnmente encontrada es la *Leishmania (Viannia) panamensis*, la cual produce grandes pérdidas económicas por la incapacidad laboral y el costo del tratamiento (2). El Ministerio de Salud reporta alrededor de 6.500 casos anuales de Leishmaniasis (sin incluir cerca de 2.000 registrados por la dirección de sanidad del Ejército y el extenso subregistro en las zonas más apartadas del país) (2). Todos estos datos sumados a las serias consecuencias de esta infección, la cual, en su forma mucosa produce mutilaciones severas, hacen de la Leishmaniasis un problema prioritario de salud pública y demandan que los trabajos realizados se dirijan hacia el diseño y evaluación de estrategias de control alternativas para prevenir la infección.

En el modelo murino de infección por *Leishmania (L.) major*, una especie del parásito causante de úlceras cutáneas crónicas en Asia y Africa, se ha identificado que las células T CD4<sup>+</sup> son un factor determinante en el resultado de la infección. Las células T de ratones singénicos que desarrollan el perfil Th1 de citoquinas (IFN- $\gamma$ , IL-2, y TNF- $\beta$  principalmente) como por ejemplo la cepa C57BL/6, curan espontáneamente, mientras que aquellas que desarrollan el perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) como la cepa BALB/c, mueren meses después como consecuencia de la infección (3).

Adicionalmente se ha descrito la participación diferencial de señales coestimuladoras en la generación de estos subgrupos de células Th en el ratón, implicando a la vía coestimuladora CD28-B7 en la generación de un perfil Th2 (4).

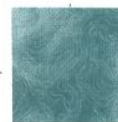
A pesar de todos estos hallazgos, existen muy pocos estudios relacionados con la caracterización de la respuesta inmune dirigida contra *Leishmania (Viannia) panamensis* en humanos.

Estos estudios son muy importantes teniendo en cuenta primero, que los parásitos del género *Leishmania*, a pesar de estar agrupados en el mismo género, presentan comportamientos muy variables y segundo, que muchas veces los fenómenos encontrados en el modelo murino no son extrapolables al humano (5,6). Es así como se conoce que a diferencia de lo que sucede en el caso de infección por *L. (L.) major*, ambas cepas de ratones, C57BL/6 y BALB/c, son resistentes a la infección por *L. (V.) panamensis* (7) y que sólo en el hámster, tras la inoculación con este parásito, se desarrollan úlceras leves que se autoresuelven en la mayoría de los casos. No obstante, la presentación clínica de la infección por *L. (V.) panamensis* en el humano presenta un espectro similar al producido por otras especies del parásito. Se han reportado que en las zonas endémicas se pueden presentar desde infecciones subclínicas hasta Leishmaniasis difusa, siendo la Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la forma más frecuente de presentación de la enfermedad (2).

Adicionalmente, en estudios previos se ha reportado que las células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos que no han tenido previo contacto con parásitos del género *Leishmania* pueden proliferar, activarse y producir citoquinas luego de la estimulación con promastigotes metacíclicos vivos (8-10). Por esta razón, en el presente trabajo se pretende caracterizar la respuesta inmune desarrollada durante la infección *in vitro* con *Leishmania (Viannia) panamensis* en individuos no expuestos haciendo énfasis en la producción de citoquinas y en la expresión de las moléculas de membrana esenciales para la respuesta del linfocito T CD4<sup>+</sup>, dos elementos que han demostrado ser claves durante el transcurso de la respuesta inmune contra el parásito.

La identificación de las moléculas responsables de este fenómeno durante la infección por *L. (V.) panamensis* y su cinética de producción es de extrema importancia pues permite realizar un acercamiento a los eventos de la inmunidad innata que se llevan a cabo durante el





transcurso de la infección y su importancia en el control de la Leishmaniasis. Adicionalmente, estos trabajos facilitan la realización de estudios posteriores en poblaciones susceptibles y resistentes a la infección con el objetivo de definir si estas moléculas son las responsables del fenotipo protector. De esta manera se podrían diseñar estrategias encaminadas a la manipulación inmunológica o farmacológica de la enfermedad buscando inducir el desarrollo de una respuesta inmune protectora en las personas en riesgo de infectarse con estos parásitos.

## Materiales y Métodos

### 1. Población del estudio

Se estudiaron 16 habitantes de áreas no endémicas para Leishmaniasis, sin historia clínica o evidencia física de lesiones compatibles con la enfermedad y con una prueba de Montenegro negativa. La prueba de Montenegro se realizó de acuerdo a procedimientos establecidos (11). Los individuos que decidieron voluntariamente ingresar al estudio firmaron previamente el consentimiento informado de acuerdo con los parámetros de la declaración de Helsinki, 1981.

### 2. Producción de los antígenos de *Leishmania*

Se usaron promastigotes de *L. (V.) panamensis*, cepa LS94 (MHOM/PA/71/LS94) cuya virulencia se mantuvo por medio de pases repetidos en la línea celular monocítica U937. Los parásitos se cultivaron en medio NNN modificado a 27°C. Los promastigotes en fase estacionaria de crecimiento se colectaron a los cinco días de crecimiento y se lavaron dos veces con RPMI-1640 (Irvine Scientific, Santana, California). Para la preparación del lisado total de parásitos (LTP), los promastigotes se resuspendieron en RPMI-1640 completo (suplementado con 1000 U/ml de penicilina, 1000 mg/ml de estreptomina, 1% de glutamina y 10% de suero bovino fetal, SBF, Sigma Chemical Co.) a una concentración de  $5 \times 10^5$  parásitos/ml. Posteriormente se lisaron por tres ciclos de

congelación a  $-70^\circ\text{C}$  y descongelación a  $37^\circ\text{C}$ . Para la obtención de promastigotes vivos en fase estacionaria de crecimiento (PV), los parásitos lavados se resuspendieron en RPMI completo a una concentración de  $100 \times 10^6$  parásitos/ml.

### 3. Determinación de la proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se obtuvieron CMSP a partir de sangre total heparinizada por la técnica de centrifugación sobre Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co.). Posteriormente las células fueron resuspendidas a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI completo (suplementado con 20% de plasma autólogo inactivado a  $56^\circ\text{C}/30$  min). A cada pozo de un microplato para cultivo se adicionaron 100 ml de esta suspensión celular para luego agregar 100 ml de RPMI completo (control negativo), LTP o PHA (Fitohemaglutinina A, 10mg/ml, Sigma Chemical Co.). Después de 5 días de cultivo (2 días para PHA), a  $37^\circ\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$ , se adicionó 1 mCi/pozo de [ $^3\text{H}$ ]-timidina, se incubó durante 18h adicionales y luego se determinó la proliferación celular por medio de la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]-timidina (Amersham pharmacia biotech Inc., Piscataway, NJ) en un contador de centelleo (*liquid scintillation counting*, LSC, Beckman Instruments Inc., Irvine, CA). Las muestras se procesaron por triplicado. Se calculó la media de las cuentas por minuto (cpm) de los triplicados menos la media de las cpm del control negativo (cpm netas). El índice de proliferación se calculó dividiendo las cpm netas sobre las cpm del control negativo (células estimuladas con el RPMI solamente).

### 4. Infección de las CMSP con PV

Los promastigotes vivos en fase estacionaria de crecimiento (PV) se adicionaron inmediatamente a las CMSP a diferentes proporciones célula:parásito. Luego se incubaron por 25 min. a  $37^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  y seguidamente se centrifugaron a 1600 rpm/5 min para eliminar los parásitos no adheridos a las células. Después



de descartar el sobrenadante, las células se resuspendieron nuevamente a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI completo (suplementado con 10% de plasma autólogo) y re-incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$  por los tiempos de incubación establecidos.

### 5. Análisis por citometría de flujo

Las células infectadas con PV se colectaron después de 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas de cultivo para ser analizadas por citometría de flujo. Con el fin de determinar el porcentaje de células T CD4+ o CD8+ activadas se realizó una tinción triple durante 30 min/ $4^\circ\text{C}$  con los anticuerpos anti-CD3 conjugado con FITC (Clon UCHT1, Pharmingen), anti-CD4 o anti-CD8 conjugado con CyChrome (Clon RPA-T4 ó SK1, Pharmingen) y anti-CD69 conjugado con PE (Clon FN50, Pharmingen) utilizándose a la concentración óptima según titulación previa. En experimentos paralelos se determinó el porcentaje de células que expresaba cada una de las moléculas coestimuladoras. Se realizó una tinción con el anticuerpo anti-CD28 o anti-CD152 conjugado con PE (Clonas CD28.2 ó BNI3, Pharmingen) según el procedimiento descrito previamente.

Para la detección de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-12 e IL-13 intracelular, las CMSP ( $1 \times 10^6$  células/tubo) se estimularon con PV por 6, 12, 20 y 48 h a  $37^\circ\text{C}$  en 5% de  $\text{CO}_2$ . Seis horas antes de cumplirse estos tiempos de incubación, se bloqueó la secreción de proteínas del retículo endoplásmico adicionando Monensina a una concentración de 3 mM. Las células se re-incubaron por las 6 h restantes a  $37^\circ\text{C}$  en 5%  $\text{CO}_2$ . Por cada muestra se realizó un control negativo para la expresión del marcador de activación celular CD69 y para la producción de citoquinas utilizando células incubadas sólo con Monensina por 6 h. Luego del lavado, fijación y permeabilización de las células (Solución cytofix/citoperm, Pharmingen) se realizó la tinción con los anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  conjugado con FITC (Clon 4S.B3), anti-IL-12 conjugado con FITC (Clon C11.5), anti-IL-4 marcado con PE (clon 8D4-8) o anti-IL-13 marcado con PE (Clon

JES10-5A2) incubando 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente las células se lavaron y se resuspendieron en el buffer de citometría, el cual consta de PBS Dulbecco (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), 1% SBF y 0.1% de Azida de Sodio. El análisis se realizó en un citómetro de flujo (Epics XL, Coulter, Miami, FL) equipado con un LASER de Argón que emite luz a 488 nm. En cada experimento se utilizaron controles de isotipos con el fin de medir uniones inespecíficas del AcMo a los mononucleares de sangre periférica.

### 6. Análisis estadístico

Los promedios de los grupos fueron comparados usando el test *t* de Student. También se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

## Resultados

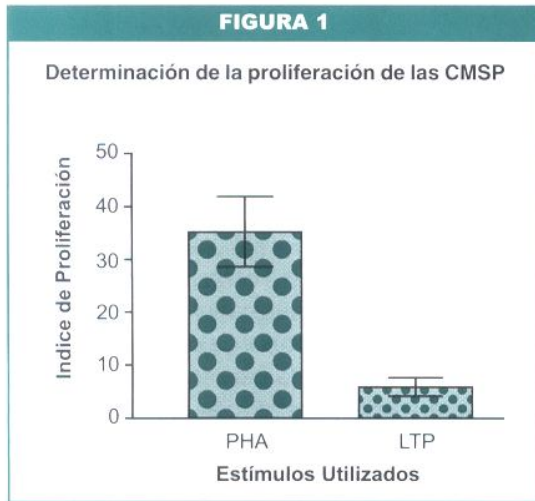
### 1. Determinación de la proliferación de las CMSP

Todos los individuos analizados respondieron al estímulo con LTP con índices de proliferación mayores de 3 en el 50% de los casos. Sin embargo, el índice de proliferación fue menor al observado con PHA con una diferencia estadísticamente significativa (Intervalos de confianza del 95%: 22.76 a 46.56 para PHA, 1.83 a 6.01 para LTP,  $p < 0.001$ , Figura 1).

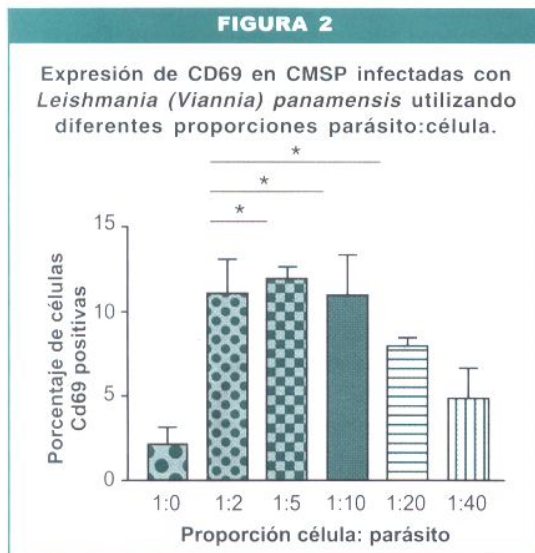
### 2. Expresión de CD69 en CMSP infectadas con LS94

La expresión de marcador de activación celular CD69 aumentó significativamente después de 24 horas de haber realizado la infección con promastigotes vivos de *L. (V.) panamensis* (Figura 2). El mayor porcentaje de células CD69 positivas se obtuvo utilizando proporciones célula:parásito entre 1:2 y 1:10 (Figura 2). La expresión de CD69 disminuyó al utilizar mayor cantidad de parásitos para realizar la infección observándose una curva dosis-respuesta característica (Figura 2).





Determinación del nivel de proliferación de las CMSP estimuladas con Fitohemaglutinina A (PHA 5mg/ml, 3 días) o el Lisado Total de Parásitos (LTP, 50.000 parásitos/pozo; 6 días) en individuos sanos con una prueba de Montenegro negativa (M-) (n=16). Las barras indican el promedio de los índices de proliferación mas el error estándar de la media. \* $p < 0.001$  para la diferencia de los promedios entre los dos estímulos.



Las CMSP de individuos sanos Montenegro negativos fueron estimuladas con promastigotes vivos de *Leishmania (Viannia) panamensis*, utilizando diferentes proporciones célula:parásito y 20 h pos-estímulo se evaluó el porcentaje de expresión de la molécula CD69 como marcador de activación por citometría de Flujo. Las barras indican el promedio de los resultados de tres experimentos diferentes mas el error estándar de la media. \* $p < 0.05$  para la diferencia de los promedios entre las proporciones célula:parásito que indican las líneas en la parte superior del gráfico.

La expresión de CD69 fue mayor a las 48 horas pos-infección (figura 3). Se observó además que la mayoría de las células activadas fueron células CD3 negativas y que se obtuvo una mayor activación (expresión de CD69) en las células CD8+ que en las células CD4+ (Figura 3). Esta diferencia en la expresión de CD69 entre las células CD4+ y CD8+ no fue debida a un incremento en la proporción total de linfocitos T CD8+ sobre los CD4+ pues el porcentaje de células positivas para estos marcadores no se modificó durante el transcurso de la infección ( $p > 0.05$ , Figura 4).

### 3. Cinética de expresión de las moléculas coestimuladoras CD28 y CD152 en CMSP estimuladas con LS94

La expresión de CD28 fue constitutiva en aproximadamente en el 60% de las células mononucleares y se mantuvo constante hasta las 72 horas pos-infección, momento en el cual sus niveles empezaron a decaer (Figura 5).

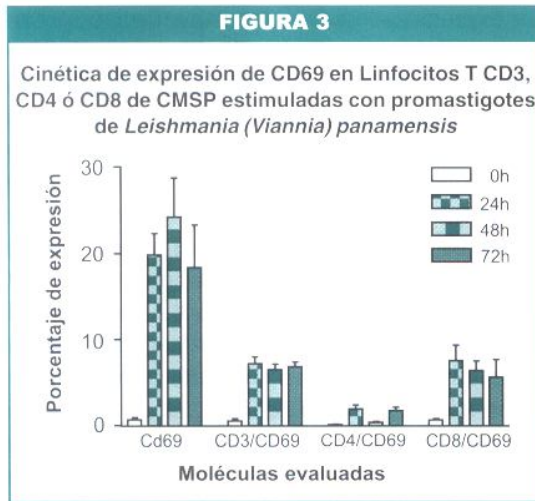
Por el contrario, la expresión de CD152 (CTLA-4) comenzó a las 24 horas pos-infección y continuó en incremento hasta alcanzar su máximo nivel a las 72 horas, para mantenerse en estos valores hasta las 144 horas pos-infección (Figura 5).

### 4. Cinética de producción de citoquinas en CMSP CD69 positivas, estimuladas con LS94

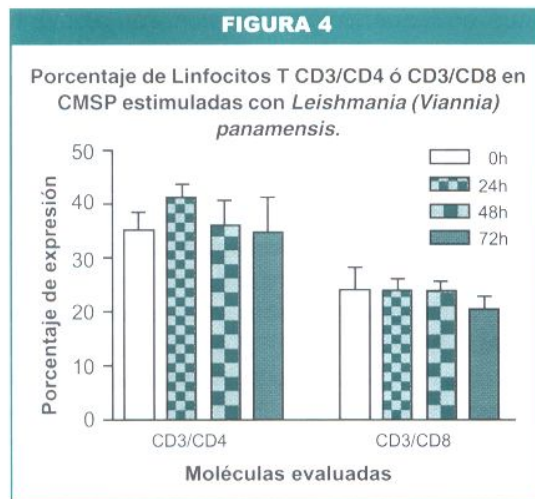
Se observó un incremento en el porcentaje de células activadas (CD69 positivas) que producía tanto IFN- $\gamma$  como IL-12 intracelular a las 20 horas con una leve disminución a las 48 horas pos-infección. La mayor producción de IFN- $\gamma$  e IL-12 se detectó en un 4 y 3% de las células respectivamente (Figura 6).

La producción de IL-4 en IL-13 se detectó en menos del 1% de las células en todos los tiempos evaluados, con un ligero incremento en la producción de IL-4 a las 20 horas pos-infección (Figura 6).





Las CMSP de individuos sanos Montenegro negativos fueron estimuladas con promastigotes vivos de *Leishmania (Viannia) panamensis* a una proporción parásito:célula de 10:1 y después de diferentes tiempos pos-infección se determinó el porcentaje de expresión del marcador de activación CD69 en CMSP totales (CD69), en linfocitos T (CD3/CD69), en células CD4 positivas (CD4/CD69) ó en células CD8 positivas (CD8/CD69) utilizando tinción de tres colores por citometría de flujo. Los barras indican el promedio de los resultados de tres experimentos diferentes mas el error estándar de la media. \* $p < 0.001$  para la diferencia de los promedios en estos tiempos al compararla con la expresión de estos marcadores a las 0 horas.



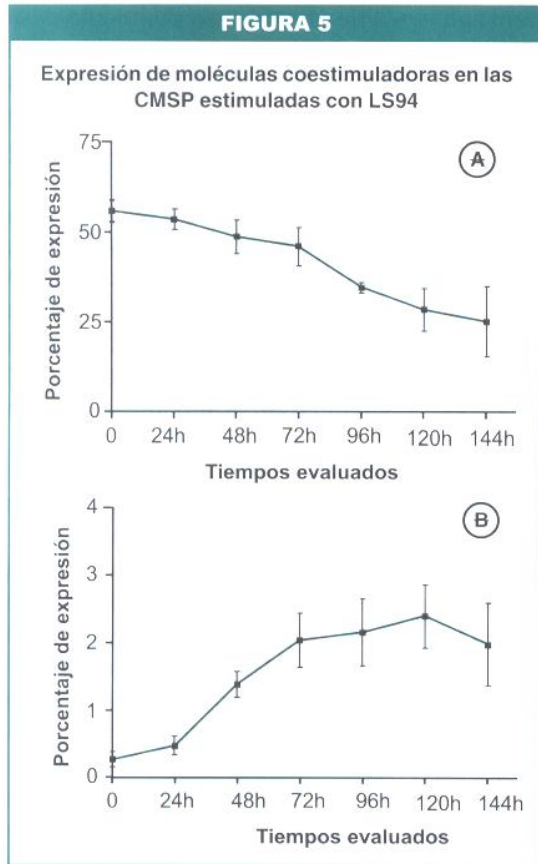
Las CMSP de individuos sanos Montenegro negativos fueron estimuladas con promastigotes vivos de *Leishmania (Viannia) panamensis* a una proporción parásito:célula de 10:1 y después de diferentes tiempos pos-infección se determinó el porcentaje de Linfocitos T CD4+ ó CD8+ utilizando tinción doble por citometría de flujo. Las barras indican el promedio de los resultados de tres experimentos diferentes mas el error estándar de la media.

## Discusión

La regulación de la respuesta inmune contra los parásitos del género *Leishmania* es un proceso complejo que depende tanto de la especie del parásito (aun entre organismos causantes de Leishmaniasis cutánea) así como del hospedero que sufre la infección (5-7).

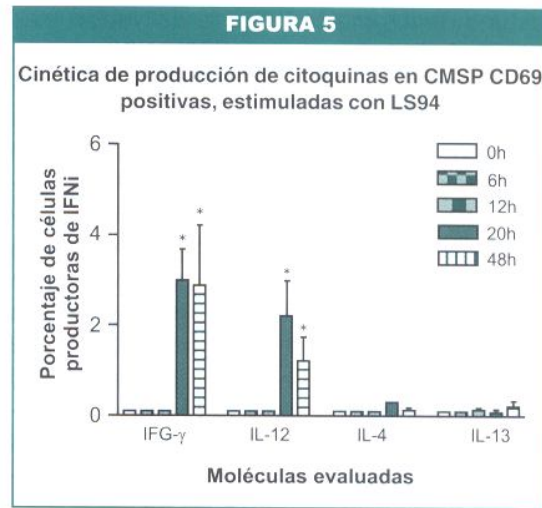
En el presente trabajo se caracterizaron algunos parámetros de la respuesta inmune celular durante la infección *in vitro* por *Leishmania (Viannia) panamensis* a partir de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de individuos no expuestos. Los resultados obtenidos permiten hacer varias anotaciones importantes:

Primero que todo es esencial resaltar la respuesta proliferativa, la activación y la producción de citoquinas en presencia de antígenos de *Leishmania* vista en las células de los individuos estudiados. En el estudio se incluyeron individuos sin previa exposición al parásito, un fenómeno evidenciado por una prueba de hipersensibilidad retardada específica para *Leishmania* (Prueba de Montenegro o Leishmanina) negativa. Desde su introducción en 1926, la Prueba de Montenegro (PM) ha sido ampliamente utilizada en los estudios epidemiológicos reportando una sensibilidad del 96-98% y una especificidad cercana al 100% (2,11). Sin embargo, son pocos los reportes donde se correlaciona los resultados de esta prueba con los observados con técnicas inmunológicas más recientes como la citometría de flujo, las cuales presentan una alta sensibilidad. En un estudio realizado en un área endémica para la infección por *L. (L.) major* donde se intentó correlacionar los resultados de la PM con la respuesta linfoproliferativa a antígenos específicos de *Leishmania*, se reportó una correlación positiva entre el diámetro de la induración en la piel en la PM y el índice de estimulación en la linfoproliferación (12). Esta correlación positiva también la hemos observado en nuestros ensayos al evaluar individuos con Leishmaniasis Cutánea Localizada e Individuos sanos con una prueba de Montenegro positiva cuyos índices de proliferación son mucho más elevados que los obtenidos en el grupo de individuos Montenegro negativos (Datos no mostrados). Sin embargo,



Las CMSP de individuos sanos Montenegro negativos fueron estimuladas con promastigotes vivos de *Leishmania (Viannia) panamensis* a una proporción parásito:célula de 10:1 y después de diferentes tiempos pos-infección se determinó el porcentaje de células que expresaban CD28 (A) o CD152 (B) por citometría de flujo. Los puntos indican el promedio de los resultados de cinco experimentos diferentes +/- el error estándar de la media. \* $p < 0.001$  para las diferencias de los promedios de estos tiempos comparado con los promedios de los demás tiempos pos-infección.

se confirma que en los individuos sin previa exposición al parásito puede presentarse una respuesta *in vitro* a promastigotes metacíclicos de *L. (V.) panamensis* y que esta respuesta no es debida a la utilización de una dosis excesiva de antígeno, pues aún a dosis bajas (proporción célula:parásito de 1:2) se presenta activación celular. Esta respuesta inespecífica puede ser debida a la presencia de superantígenos en la suspensión de promastigotes utilizada. Sin embargo, es poco probable que esta reactividad se deba a componentes mitogénicos



Las CMSP de individuos sanos Montenegro negativos fueron estimuladas con promastigotes vivos de *Leishmania (Viannia) panamensis* a una proporción parásito:célula de 10:1 y después de diferentes tiempos pos-infección se determinó el porcentaje de células CD69 (+) productoras de cada una de las citoquinas evaluadas utilizando tinción doble por citometría de flujo. Las barras indican el promedio de los resultados de tres experimentos diferentes mas el error estándar de la media.  $P < 0.05$  para las diferencia de los promedios en estos tiempos comparado con los promedios de la producción intracelular de esa citoquina a las 0,6 y 12 horas pos-infección.

(superantígenos) en las preparaciones de parásitos utilizadas puesto que la habilidad para responder a *L. (V.) panamensis* no se observó en todos los individuos evaluados. Se plantea entonces que esta activación celular en individuos no-expuestos a parásitos del *Leishmania* puede ser debida a que estas células reconocen y reaccionan contra antígenos presentes en la suspensión de promastigotes que son compartidos con otros microorganismos a los cuales estas personas han estado expuestas. Entre estos antígenos de reactividad cruzada podrían incluirse por ejemplo, las proteínas de choque térmico (HSPs) las cuales han demostrado estar presentes en muchas células (incluyendo a los parásitos del género *Leishmania*) presentando una alta homología inter-especie (13).

Por otro lado, *L. (V.) panamensis* induce la activación de las CMSP evaluada como la expresión del marcador CD69. El antígeno CD69



es uno de los marcadores de activación más tempranos expresado en los linfocitos T y B, células NK y monocitos después de la estimulación con una gran variedad de antígenos y mitógenos, asociándose con la elevación en los niveles de calcio intracelular y la activación de proteínas quinasas (14,15). Su expresión después de una estimulación mitogénica es transitoria, alcanzando su máximo nivel a las 12 horas y declinando luego de 36 horas (16). Después de la infección de las CMSP de individuos sanos con parásitos vivos de *L. (V.) panamensis* hemos observado que la expresión de CD69 se hace evidente desde las 8 horas pos-infección (Datos no mostrados) alcanzando su pico máximo a las 48 horas, momento en el cual sus niveles empiezan a declinar. Esta expresión es retardada al compararla con la cinética ya mencionada durante la estimulación mitogénica, sin embargo nuestros resultados son coherentes si se considera que los mitógenos inducen una activación policlonal inespecífica y mucho más acelerada que la estimulación a través del complejo HLA-péptido-TCR.

Algunos autores sugieren influencias en la distribución de CD69 en los subgrupos de linfocitos dependiendo del estímulo (14-17). Nuestro estudio demuestra una mayor activación en células T CD8+ comparadas con las CD4+ luego de la infección con el parásito, sugiriendo un papel importante de estas células en la respuesta inmune inicial contra *Leishmania*. Las publicaciones al respecto ofrecen resultados contradictorios. Mientras en un trabajo realizado en pacientes con Leishmaniasis cutánea causada por *L. (V.) braziliensis* se observó un incremento de la subpoblación de linfocitos T CD8+ con especificidad para el parásito después de un tratamiento leishmanicida efectivo sugiriendo un papel protector (18), en otros estudios se demostró la presencia de células T CD8+ citotóxicas específicas contra el parásito en pacientes con Leishmaniasis mucosa, una forma altamente destructiva de la enfermedad, más no en pacientes con Leishmaniasis cutánea (19-20). Es posible que las células T CD8+ específicas contra *Leishmania* puedan

participar en la defensa ya sea por medio de la producción de IFN- $\gamma$  o de su respuesta citotóxica, pero que su actividad exagerada pueda de otro lado conducir a la destrucción de tejidos.

Adicionalmente, llama la atención el hecho de que el mayor porcentaje de células activadas no son linfocitos T CD3 positivos. Este porcentaje puede representar monocitos activados que son la célula blanco de la infección por el parásito o células NK, las cuales han demostrado ser importantes en la respuesta inmune innata contra *Leishmania* (21-23).

Por otra parte evaluamos la expresión de CD28 y CTLA-4 (CD152) en las CMSP infectadas. La cinética de expresión de estas moléculas en el transcurso de la infección por *Leishmania* es similar a la reportada con otros antígenos (21). El CD28 es una glicoproteína que se expresa constitutivamente en aproximadamente el 70% de las células T humanas y cuyos niveles permanecen constantes después de un estímulo específico, disminuyendo levemente a las 96 horas. Por el contrario, CTLA-4 no se expresa constitutivamente en el linfocito T, sus niveles aumentan en el momento en que los niveles de CD28 se regulan negativamente (21). La cinética de expresión de estas moléculas sugiere papeles opuestos en la respuesta inmune atribuyéndosele a CD28 un papel coestimulador fundamental para la respuesta del linfocito T y a CTLA-4 una función reguladora negativa para la activación de esta misma célula (21). Así mismo se ha sugerido que CD28 es esencial para la generación de células productoras de IL-4 favoreciendo un perfil Th2 de respuesta inmune (4). Sería muy importante estudiar el nivel de expresión de estas moléculas en individuos susceptibles y resistentes a la infección por *Leishmania* con el propósito de determinar si su expresión en el linfocito T se correlaciona con el resultado de la infección.

Por último, evaluamos la producción de citoquinas intracelulares en las células activadas después del reto con el parásito. Observamos



niveles detectables de IFN- $\gamma$  e IL-12, sin embargo la expresión de IL-4 e IL-13 intracelulares fue muy baja, un dato que hemos confirmado en los sobrenadantes de los cultivos (Datos no mostrados). Este hallazgo confirma evidencias en el modelo murino que demuestran la importancia de la dos primeras citoquinas mencionadas en la inducción de una respuesta inmune efectiva contra el parásito (24-27).

Entonces, de acuerdo con los hallazgos discutidos anteriormente, en este estudio se muestra como las CMSP de individuos sin previa exposición al parásito pueden responder a la infección con *Leishmania (Viannia) panamensis in vitro* tal como se ha reportado para otras especies de *Leishmania*. Estos estudios permiten un mayor conocimiento de los eventos que desencadena la infección con el parásito en el humano, información de vital importancia para definir los efectos que produce en el organismo la aplicación de los extractos o antígenos del parásito utilizados como vacunas y precisar su eficacia real de una manera menos empírica a la realizada hasta el momento (28,29). Todavía tenemos mucho camino por recorrer en el estudio de la respuesta inmune durante la Leishmaniasis, sin embargo, estos hallazgos contribuyen al conocimiento de los eventos que desencadena la infección por *Leishmania* en el ser humano y permiten plantear trabajos posteriores que impliquen avances en la lucha por la eliminación de esta enfermedad tropical, uno de los objetivos. ☉

### Abstract

**Overview:** previous evidence suggests that cells from normal non-*Leishmania*-exposed individuals could respond *in vitro* to *Leishmania* stimulation. **Objective:** to characterize the human cellular immune response during *Leishmania (Viannia) panamensis in vitro* infection in unexposed individuals. **Study population and methods:** peripheral blood mononuclear cells from 16 healthy individuals having a negative Montenegro skin test (leishmanin) were infected with live metacyclic promastigotes from *L. (V) panamensis*. The

membrane expression of CD69/CD3-CD4-CD8, CD28 and CD152 was analyzed. In addition, intracellular production of IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 and IL-13 was studied after several times post-infection. **Results:** the greatest expression of CD69 using a cell:parasite ratio of 1:10 was obtained at 48 hours pos-infection. The activation level of CD8+ cells was greater than in CD4+ cells. However, CD3-negative cells presented the strongest activation levels after the infection. The membrane expression of CD28 did not change during the infection *in vitro* but CD152 expression increased until 120 hours post-infection. Intracellular production of IL-4 e IL-13 was detected in less than 1% of infected cells. Intracellular IFN- $\gamma$  and IL-12 was observed in 4% and 3% of infected cells respectively, with greater levels at 20 hours post-infection. **Conclusions:** it was observed that healthy donors with not previous evidence of exposure to *Leishmania* antigens presented proliferative response, cellular activation and cytokine production after *Leishmania* challenge suggesting a cross-reactivity with other antigens or the presence of classical mitogenic components of the promastigote preparation. **Key words:** *Leishmania*, T lymphocyte.

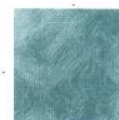
### Referencias

1. Desjeux P. Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. World Health Stat. Q. 1992; 45: 267-272.
2. Weigle K, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. 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. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Ann. Rev. Immunol. 1995; 13: 151-77.
4. Brown JA, Titus RG, Navabi N, Glimcher LH. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-



- regulating the Th2 response. *J. Infect. Dis.* 1996; 174: 1303-08.
5. **Murray HW, Squires KE, Mirrales CD, Stoeckle MY, Granger AM, Granelli-Piperno A, et al.** Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral Leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J. Immunol.* 1992; 148: 1858-63.
  6. **Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ, et al.** Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* 1996; 4: 263-273.
  7. **Guevara-Mendoza O, Une C, Franceschi Carreira P y Orn A.** Experimental infection of Balb/c mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN-g but not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. *Scand. J. Immunol.* 1997; 46: 35-40.
  8. **Castes M, Cabrera M, Trujillo D y Convit J.** T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human american cutaneous Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 1988; 26: 1207-1213.
  9. **Akuffo H, Maasho K y Howe R.** Natural and acquired resistance to Leishmania: cellular activation by *Leishmania aethiopica* of mononuclear cells from unexposed individuals is through the stimulation of natural killer (NK) cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94: 516-521.
  10. **Gaafar A, Kharazmi A, Ismail A, Kemp M, Hey A, Christensen CBV, et al.** Dichotomy of the T cell response to *Leishmania* antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis; absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 100: 239-245.
  11. **Weigle KA, Valderrama L, Arias AL, Santrich C y Saravia N.** Leishmanin skin test standarization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 44: 260-271.
  12. **Alvarado R, Enk C, Jaber K, Schnur L, Frankenburg S.** Delayed-type hypersensitivity and lymphocyte proliferation in response to *Leishmania major* infection in a group of children in Jerico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83: 189-92.
  13. **Skeiky YAW, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM y Reed SG.** Immune responses of *Leishmania* patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infec. Immun.* 1995; 63: 4105-4114.
  14. **Lanier LL, Buck DW, Rhodes L, Ding A, Evans E, Barney C y Phillips JH.** Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 antigen. *J. Exp. Med.* 1988; 167: 1572-85.
  15. **Testi R, Phillips JH, Lanier LL.** Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering: requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular  $[Ca^{++}]$  and stimulation of protein kinase. *J. Immunol.* 1989; 142: 1854-60.
  16. **Nakamura S, Sung SSJ, Bjorndahl JM, Fu SM.** Human T cell activation IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA-1. *J. Exp. Med.* 1989; 169: 677-89.
  17. **López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sánchez mateos P, Sánchez-Madrid F.** Molecular Cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal transmitting receptors. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 537-547.
  18. **Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG.** Leishmania-reactive CD4+





- and CD8 T<sup>+</sup> cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 1994; 62: 2614-18.
19. **Barral-Neto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG.** Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1995; 17: 21-28.
  20. **Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Neto M.** Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* 1997; 159:4467-73.
  21. **Lenschow DJ, Walulas TL, Bluestone JA.** CD28/B7 system of T cell coestimulation. *Ann. Rev. Immunol.* 1996; 14: 233-58.
  22. **Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H.** Indications of the protective role of Natural Killer cells in human cutaneous Leishmaniasis in a area of endemicity. *Infect. Immun.* 1998; 66: 2698-704.
  23. **Sharton TM, Scott P.** Natural Killer Cells are a source of interferon  $\gamma$  that drives differentiation of CD4<sup>+</sup> T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in Mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 567-77.
  24. **Trujillo CM, Patiño PJ.** Respuesta Inmune de células T en Leishmaniosis Cutánea. *IATREIA* 1998; 11: 65-69.
  25. **Heinzel FP.** Interleukin 12 and the regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell subset responses during murine Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 1994; 10: 190-193.
  26. **Scott P.** IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. *J. Immunol.* 1991; 147:3149-3155.
  27. **Swihart K, Fruth U, Messmer N, Hug K, Behin R, Huang S, et al.** Mice of genetically resistant background lacking the interferon- $\gamma$  receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* infection but mount a polarized T helper cell 1-type CD4<sup>+</sup> T cell response. *J. Exp. Med.* 1995; 181:961-71.
  28. **Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al.** Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 1997; 186: 1137-47.
  29. **De-Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, et al.** Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine.* 1999; 17: 1179-85.