

Inmunidad humoral y celular en la leishmaniasis cutánea

Fabiola Montoya, Marcos Restrepo, María Eugenia Gómez

Se estudiaron 51 pacientes con lesiones cutáneas de leishmaniasis comprobada parasitológicamente. Cada uno de ellos fue evaluado inmunológicamente con: población de linfocitos T y B, pruebas de hipersensibilidad retardada con fitohemaglutinina, candidina, tuberculina y leishmanina, título de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta, cuantificación de IgG, IgA e IgM, dosificación de complemento sérico total y fracciones C3 y C4 y prueba cualitativa del nitroazul de tetrazolium (NBT).

Se encontró que los pacientes tenían una depresión parcial de las células T y de su función en la inflamación no específica. Esta inmunodepresión no alcanzó a bajar la hipersensibilidad cutánea tardía al antígeno de Leishmania. No se encontró alteración en la inmunidad mediada por anticuerpos ni en el sistema del complemento. La óxido-reducción intracelular evaluada por el NBT estuvo aumentada.

INTRODUCCION

La leishmaniasis cutánea es una infección causada por varias especies del género *Leishmania*, que invaden y crecen dentro de los macrófagos de los huéspedes mamíferos. En Colombia se han identificado dos especies: *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*, que tienen varias subespecies y comprometen principalmente la piel y, algunas de ellas, las mucosas. La evolución clínica de la enfermedad es crónica, persistiendo las lesiones durante meses o años; en algunos casos puede ocurrir una diseminación linfática y en otros,

por el contrario, evolucionar hacia la curación espontánea (1). La presencia de los parásitos dentro de los macrófagos sugiere que la inmunidad celular juega un papel importante en la defensa del huésped, aunque el parásito tiene la propiedad de evadirla acción destructiva de las células fagocíticas del huésped (2, 3). La inmunidad humoral también participa en la respuesta inmune, pues es posible detectar anticuerpos (4). El presente trabajo trata de identificar algunas de las principales variaciones de la inmunidad humoral y celular en **pacientes con leishmaniasis cutánea.**

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 51 pacientes con lesiones cutáneas de leishmaniasis comprobada parasitológicamente. A cada uno de ellos se le realizaron los siguientes exámenes de laboratorio:

Frotis. En el reborde de la lesión se hizo una incisión con bisturí para raspar el tejido y obtener los histiocitos con los parásitos. Una vez seca la preparación se tiñó con colorante de Wright. La lectura se hizo con objetivo de 100X y se buscaron las formas de amastigotes (5).

Cultivos. Material obtenido de la misma incisión se sembró en la fase líquida del medio de Novy, Neal y Nicolle, conocido comúnmente como medio de las 3N. Después de seis días se buscaron los promastigotes al microscopio (1).

Biopsia. Utilizando un sacabocado para biopsia de 4 mm se tomó del reborde de la lesión un fragmento de tejido, se procesó por las técnicas comunes de histopatología y con coloración de hematoxilina-eosina. Allí se buscaron los amastigotes y el tipo de reacción inflamatoria.

Prueba de Montenegro. Se inyectó por vía intradérmica 0.1 ml de antígeno, compuesto por una

Drs. Fabiola Montoya, Marcos Restrepo y María Eugenia Gómez: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Laboratorio Departamental de Salud Pública, Medellín.

Solicitud de separatas a la Dra. Montoya.

suspensión de dos millones de promastigotes por ml. Se utilizó una cepa de *L. braziliensis*. La lectura se hizo determinando el área de induración a las 48 horas; 5 mm o más indicaban que la prueba de hipersensibilidad tardía era positiva (6).

Inmunofluorescencia indirecta. Siguiendo la técnica de Restrepo y Gómez (7) se utilizó como antígeno, promastigotes de cultivo de *L. braziliensis*. El suero se diluyó progresivamente y los anticuerpos del paciente se identificaron con un conjugado fluorescente antihumano, determinando que títulos por encima de 1:8 se consideraron significativos.

Recuento de linfocitos T. De la sangre total se separaron los linfocitos por medio de gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque (8). A los receptores de los linfocitos T se fijan los eritrocitos de camero sensibilizados previamente con 2-aminoetilhidrobromuro (AET) y luego se hace el recuento de las rosetas T (9).

Recuento de linfocitos B. Los linfocitos, separados de la sangre en la misma forma, se colocaron con eritrocitos de ratón, que al formar rosetas identificaban la población de linfocitos B (10,11).

Pruebas de hipersensibilidad retardada. Para averiguar la respuesta inflamatoria mediada por células, además de la prueba de Montenegro, se aplicaron intradermoreacciones con fitohemaglutinina (PHA), candidina y tuberculina (PPD). La lectura se hizo para las dos primeras pruebas a las 24 horas y para la tuberculina a las 72 horas (12).

Cuantificación IgG, IgA e IgM. Se cuantificaron los niveles séricos de estas tres inmunoglobulinas, siguiendo la técnica de Mancini de la inmunodifusión radial (13).

Dosificación de complemento sérico total. Con la técnica del 50% de hemólisis adaptada para suero humano por Restrepo y Bustamante (14), se determinaron las unidades CH50 por ml de suero.

Cuantificación de los componentes C3 y C4. Empleando la misma técnica de inmunodifusión radial de Mancini, se determinaron los niveles séricos de estos dos componentes del complemento (13).

Prueba de NBT. La reacción cualitativa de la reducción de nitroazul de tetrazolium, se hizo con

leucocitos polimorfonucleares del paciente, detectando las células con depósito de formazán que indica la transformación del colorante por la reducción (15).

RESULTADOS

La distribución por edad y sexo de grupos de pacientes estudiados se observa en la Tabla 1. El 80.4% fueron del sexo masculino; de éstos se resalta que la edad más afectada estuvo entre 20 y 39 años, grupos etáreos que comprendieron 54.9% del total de los pacientes. Entre los hombres con la enfermedad se encontró que 23.5% eran agricultores que por motivo de su trabajo entraban a las áreas donde habitan los vectores infectados. El oficio que siguió en frecuencia fue de minero con 17.7%. El resto de individuos infectados estuvo conformado por personas con actividades diferentes, que no tenían un riesgo especial por causa de su trabajo, pero que ocasionalmente ingresaron a zonas boscosas en donde adquirieron la infección, como: estudiantes, choferes, soldados, etc. En las mujeres la infección fue mucho menor, siendo afectadas principalmente las que tenían una edad entre 10 y 19 años, quienes en algunas ocasiones llegaban hasta los sitios donde existe el vector. Es importante anotar que en algunas regiones las casas están cercanas a las zonas boscosas, lo cual hace que el vector pueda transmitir la infección en el área peridomiciliaria; esto explica

Tabla 1. *Leishmaniasis cutánea, distribución por edad y sexo.*

Edad	Sexo				Total
	Masculino		Femenino		
	No.	%	No.	%	
<10	1	1.9	3	5.7	4
10-19	6	11.3	6	11.7	12
20-29	20	37.7	2	3.8	22
30-39	6	11.3	0	0	6
40-49	3	5.7	0	0	3
>50	6	11.3	0	0	6
Total	42	79.2	11	21.2	53

Tabla 2. *Leishmaniasis cutánea, inmunidad celular*

Prueba	T. evolución (meses)			Número de lesiones			
	<1	1-2	>2	1	2	3	Múltiples
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
Linfocitos %	35	32	34	33	34	33	32
Linfocitos T %	37	42	41	41	40	40	43
Fitohemaglut. mm	11	12	12	12	15	10	11
Candidina mm	7	5	5	5	10	6	5
Tuberculina	11	3	2	4	5	3	1
Montenegro mm	9	10	13	12	11	11	11

por qué los menores de edad, amas de casa y otras personas pueden adquirir la enfermedad sin entrar necesariamente al bosque.

En cuanto a localización anatómica las lesiones predominan en las extremidades superiores e inferiores y la cara sigue en frecuencia. En 15 pacientes (29.4%) se logró palpar las cadenas de linfadenitis que indicaban una diseminación de tipo linfático.

El tiempo de evolución de la enfermedad varió entre 15 días y ocho meses, siendo la más común alrededor de dos meses. Un poco más de la mitad, 52.9%, presentaron una sola lesión y 19.6% tuvieron más de tres, es decir, múltiples.

Al analizar los resultados de las pruebas de inmunidad celular (Tabla 2) llama la atención la disminución de linfocitos T, ya que en personas normales siempre se encuentran entre 60 y 75%; en cambio en los pacientes con leishmaniasis cutánea la media varió entre 37 y 43%. No se encontraron diferencias significativas ni con el tiempo de evolución ni con el número de lesiones. La fitohemaglutinina que normalmente presenta reacciones con induración mayor de 24 mm, en nuestros pacientes aparece con una media de 12 mm. Los demás hallazgos que aparecen en el cuadro no muestran cambios significativos en relación con individuos normales.

La inmunidad humoral (Tabla 3) no presenta alteraciones significativas en relación con los individuos normales. Igual ocurre con los resultados del complemento sérico. Por el contrario, la

Tabla 3. *Leishmaniasis cutánea, inmunidad humoral.*

Prueba	T. evolución (meses)			Número de lesiones			
	<1	1-2	>2	1	2	3	Múltiples
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
Linfocitos B %	6	7	7	7	8	5	6
Ig G (mg/dl)	1900	1857	1802	1715	1643	1604	2098
Ig A (mg/dl)	92	161	183	121	225	176	222
Ig M (mg/dl)	200	238	162	201	216	186	210
Ac. I.F.	1:32	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32	1:128

prueba del NBT, que tiene una normalidad de 1 a 14%, aparece moderadamente elevada en los pacientes con leishmaniasis (Tabla 4).

Tabla 4. *Leishmaniasis cutánea, complemento sérico y prueba de NBT.*

Prueba	T. evolución (meses)			Número de lesiones			
	<1	1-2	>2	1	2	3	Múltiples
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
C' Total (Unidades CH ₅₀)	267	200	194	221	178	221	170
C3 (mgs %)	172	136	144	227	119	139	143
C4 (mgs %)	33	36	36	51	24	33	42
NBT (1 - 14%)	21	24	21	23	24	21	21

DISCUSION

La respuesta de la inmunidad celular del hombre contra la infección por leishmania puede comportarse en una de dos formas (16): a) con una reacción de hipersensibilidad tardía, como ocurre normalmente en las infecciones por *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. tropical*, y b) con la ausencia de la reacción de hipersensibilidad cutánea, es decir, con un estado de anergia, como ocurre en infecciones por *L. mexicana*, *L. Donovan* y *L. aethiops*.

La respuesta de hipersensibilidad en los pacientes estudiados por nosotros está incluida en el primer grupo, evidenciado por la buena respuesta al antígeno de Montenegro, no obstante la disminu-

ción en la respuesta de otras pruebas de hipersensibilidad, principalmente fitohemaglutinina. La disminución de los linfocitos T está estrechamente correlacionada con la baja respuesta a la fitohemaglutinina. Como indican estos resultados, existe una inmunodepresión no muy intensa, pues alcanza a dar una respuesta de inmunidad por células contra antígenos específicos del género.

En la inmunidad humoral no se encontraron alteraciones significativas, aunque los títulos anti-leishmania no fueron elevados.

SUMMARY

Fifty one patients with histologically documented cutaneous leishmaniasis were studied and are the subject of this report. Each one of them underwent the following work-up: T and B cell population, delayed hypersensitivity skin testing to four different antigens, anti-leishmania antibodies, quantitative determination of IgG, IgA, IgM, total serum complement, C₃ and C₄, and qualitative nitroblue tetrazolium test. It was found that the patients had diminished T cells and impaired non-specific inflammation; this abnormality was not enough to involve the delayed cutaneous hypersensitivity to the leishmania antigen. No abnormality was found in humoral immunity nor in the complement system.

REFERENCIAS

1. **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis humanas. Ed. CIB, Medellín, Colombia 1984.
2. **Berman JD, Dwyer DM, Wylor DJ.** Multiplication of *Leishmania* in human macrophages in vitro. *Infection-Immunity* 1979; **26**:375-379.
3. **Regina CC, Dorea SG, Coutinho PC, et al.** Quantification of Leishmania-specific T cells in human American cutaneous leishmaniasis (*L. braziliensis braziliensis*) by limiting dilution analysis, clin: *Exper Immunol* 1988; **71**:26.
4. **Heyneman D.** Immunology of Leishmaniasis. *Bull Wild Hlth Org* 1971; **44**:499-514.
5. **Restrepo M, Velásquez JP, Cortés A, Cárdenas V, Robledo M.** Leishmaniasis tegumentaria americana. *Tribuna Med* 1975; **52**:A13-A16.
6. **Restrepo M.** La reacción de Montenegro en la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Bol Of Sanit Panam* 1980; **89**:130-137.
7. **Restrepo M, Gómez ME.** La reacción de inmunofluorescencia indirecta en el diagnóstico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Biomedica* 1983; **3**:15-21.
8. **Boyum A.** Separation of leucocyte from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; **21**:31-50.
9. **Brown G, Greaves MF.** Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Europ J Immunol* 1973; **52**:1026.
10. **Knam E, Mishell RI.** Fc and complement receptor. En: Selected methods in celular immunology. Ed. Mishell BB and Shiigi SM. WH Freeman and Co. San Francisco, USA 1980.
11. **Stathopoulos G, Elliott EV.** Formation of mouse or sheep red blood-cell rosettes by lymphocytes from normal and leukaemia individuals. *Lancet* 1974; **9**:600-601.
12. **Spitler LE.** Delayed hypersensitivity skin testing. En: Rose NR, Friedman H. Manual of clinical immunology. 2nd Ed: *Am Soc Microbiol*. Washington, 1980.
13. **Mancini G, Carbonara AO, Heremans JF.** Immunochemical quantitation of antigens by simple radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; **2**:235-254.
14. **Restrepo M, Bustamante A.** Complemento sérico en individuos normales. *Antioquia Med* 1972; **22**:617-624.
15. **Restrepo M, Agudelo C, Molina J, Aristizábal.** Aplicación diagnóstica del nitroazul de tetrazolium. *Acta Med Colomb* 1977:159-165.