

## Artículos Originales //

### **Expresión de TLR2, 4, 9 y presencia de células tipo NK CD56 positivas en lesiones de pacientes con diferentes formas de clínicas de leishmaniasis cutánea americana**

#### ***Expression of TLR2, 4, 9 and presence NK type CD56 positive cells lesions of patients with different clinical forms of American cutaneous leishmaniasis***

Nilka L. Díaz\*, Olga Zerpa & Félix J. Tapia

#### RESUMEN

La leishmaniasis cutánea americana (LCA) presenta varias manifestaciones clínicas e inmunitarias: La leishmaniasis cutánea localizada (LCL), cuya respuesta inmunitaria es tipo Th1, la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) con una respuesta Th2, y la leishmaniasis cutánea intermedia (LCI) cuya respuesta inmunitaria es exacerbada con un patrón mixto de citocinas. Se ha demostrado la importancia de los receptores tipo toll (TLR) en la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania* promoviendo la transcripción y síntesis de citocinas inflamatorias. El reconocimiento de componentes del parásito por los TLRs activa a macrófagos, células dendríticas y células NK. En este estudio, evaluamos la presencia TLR2, TLR4, TLR9 y células tipo NK (NK y NKT CD56+) en las lesiones de pacientes con LCL, LCI y LCD mediante inmunocitoquímica. Las lesiones de LCL y LCD mostraron una alta densidad de células TLR2 y TLR4+ con respecto a LCI, mientras que LCD mostró una mayor densidad de células TLR9+. Se observó también la expresión de TLR2 en los queratinocitos y el TLR9 se localizó en el interior de los macrófagos infectados asociado con los parásitos. La densidad de células CD56+ fue mayor en LCL en comparación con LCI y LCD. Los resultados demuestran la participación de los TLR2, 4 y 9 en la respuesta inmunitaria durante la LCA, mostrando evidencia del reconocimiento del parásito por TLR9 y una mayor densidad de células NK en LCL que se puede asociar a la respuesta Th1 que prevalece en estos pacientes.

**Palabras claves:** Leishmaniasis, TLR, células NK.

#### INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es causada por diferentes especies del parásito *Leishmania* y origina un grupo

#### SUMMARY

American cutaneous leishmaniasis (ACL) has several clinical and immunological manifestations: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) that produces a Th1 immune response, diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) that produces a Th2 response, and intermediate cutaneous leishmaniasis (ICL) that promotes an exacerbated immune response with a mixed pattern of cytokines. The importance of toll-like receptors (TLRs) to the immune response has been demonstrated against *Leishmania*, as these promote the transcription and synthesis of inflammatory cytokines. Parasite components are recognized by TLRs leading to the activation of macrophages, dendritic cells and NK cells. In this study, we evaluated the presence of TLR2, TLR4, TLR9 and NK/NKT CD56+ cells by immunocytochemistry in the lesions of patients with LCL, ICL and DCL. LCL and DCL lesions showed higher densities of TLR2 and TLR4 cells than ICL, while DCL showed an increase in TLR9 + cell density. The expression of TLR2 in keratinocytes was also observed, and TLR9 was located inside the infected macrophages in contact with the parasites. NK cell density was higher in LCL compared with ICL and DCL. These results demonstrate the participation of TLR2, 4 and 9 in the immune response during ACL, and show evidence of parasite recognition by TLR9 and increased CD56+ cell density in LCL associated with the Th1 response which prevails in these patients.

**Key words:** Leishmaniasis, TLR, NK cells.

heterogéneo de manifestaciones clínicas que van desde leishmaniasis cutánea a leishmaniasis visceral. La más común es la leishmaniasis cutánea, que en América, presenta formas clínicas con diferentes

Instituto de Biomedicina, Ministerio del Poder Popular Para la Salud-Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela

\*Autor de correspondencia: nilkadiaz@gmail.com

grados de severidad: Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), y formas crónicas como la leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la leishmaniasis cutánea intermedia (LCI) (Convit & Pinatdi, 1974; Convit *et al.*, 1993). Esta enfermedad tiene una alta morbilidad en términos de incapacidad y contribuye a incrementar la pobreza, siendo catalogada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida “Neglected Tropical Diseases (NTD)” (WHO Technical Report, 2010). En Venezuela la leishmaniasis es un problema de salud pública, que ha cobrado importancia en los últimos años. Según estadísticas del Instituto de Biomedicina, centro de referencia nacional, se reportaron 2.248 nuevos casos de leishmaniasis cutánea en el año 2009, con una tasa de incidencia de 7,94 casos por 100.000 habitantes (de Lima *et al.*, 2011).

La evolución clínica de la leishmaniasis cutánea depende de factores como la especie del parásito infectante y la respuesta inmunitaria del hospedador. La LCL es la forma más benigna de la enfermedad cuyas lesiones son localizadas, ulceradas y presentan una respuesta inmunitaria celular tipo Th1 capaz de controlar el crecimiento del parásito. La LCD es la forma más severa de la enfermedad, cuyos pacientes desarrollan múltiples lesiones no ulceradas en todo el cuerpo, con una respuesta inmunitaria tipo Th2 que favorecen el crecimiento del parásito y la producción de anticuerpos no protectores (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993). Las formas atípicas como LMC y LCI se caracterizan por una inmunidad celular exacerbada con un patrón mixto de citocinas Th1/Th2 (Díaz *et al.*, 2002, Díaz *et al.*, 2006).

Al inicio de la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania*, células de la inmunidad innata como polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, y células NK, son reclutadas al sitio de la infección. Las células dendríticas y los macrófagos identifican al parásito mediante receptores de reconocimiento de patógenos como receptores tipo Toll (TLR), los cuales son capaces de activar a estas células para inducir la respuesta inmunitaria específica mediante la producción de citocinas y la expresión de moléculas de coestimulación (Kiyoshi & Shizuo, 2005). En modelos experimentales se ha demostrado que TLR2, TLR4 y TLR9 son importantes para una respuesta inmunitaria eficiente contra *Leishmania*, debido a su capacidad de reconocer componentes del parásito e

inducir la producción de citocinas protectoras como IFN $\gamma$  (Becker *et al.*, 2003; De Veer *et al.*, 2003; Kropf *et al.*, 2004; Martínez-Salazar *et al.*, 2008; Whitaker *et al.*, 2008). El Lipofosfoglicano (LPG), un componente importante de la membrana plasmática de *Leishmania*, es reconocido por TLR2, activando la vía de señalización a través de la proteína adaptadora MyD88 (De Veer *et al.*, 2003). El TLR4 reconoce el complejo de proteoglicolípido P8 (P8 PGLC) de *L. pifanoi* (Whitaker *et al.*, 2008) y secuencias de DNA de *L. mexicana* pueden activar a macrófagos murinos a través de TLR9 (Martínez-Salazar *et al.*, 2008).

Las células NK humanas pueden ser activadas por el LPG a través de TLR2, aumentando la producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  (Becker *et al.*, 2003). Estas citocinas son capaces de activar macrófagos para eliminar a los parásitos *Leishmania* e inducen la diferenciación de Th1 (Scharton & Scott, 1993). En pacientes africanos, se ha indicado el rol protector de las células NK en leishmaniasis cutánea debido a su respuesta proliferativa frente al parásito que se asocia con la cura y protección (Maasho *et al.*, 1998). Sin embargo, datos controversiales demuestran que el contacto de células NK humanas con *L. major* no inducen la producción de IFN $\gamma$  e inhiben la proliferación de estas células (Lieke *et al.*, 2008).

En vista de la importancia que tienen los TLR en la respuesta inmunitaria y del posible papel protector de las células NK en esta la enfermedad, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de TLR2, TLR4, TLR9 y las células NK CD56+, en las lesiones de pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea en Venezuela. Los resultados mostraron una alta expresión de TLR2, TLR4 y TLR9 en las lesiones de pacientes con LCL y LCD, el TLR9 se localizó en asociación con el parásito adentro de los macrófagos infectados, evidenciándose la participación de estos receptores en la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania* y el reconocimiento del parásito por TLR9. La densidad de células CD56+ fue mayor en los pacientes con LCL y se puede asociar a la respuesta Th1 que prevalece en estos pacientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Pacientes*

En este trabajo se estudiaron las lesiones de pacientes con diferentes formas clínicas de

leishmaniasis cutánea LCL (n=20), LCI (n=5) y LCD (n=10), quienes acudieron a la consulta de Leishmaniasis y Epidemiología del Instituto de Biomedicina, adscrito al Ministerio del poder popular para la Salud y a la Universidad Central de Venezuela. Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo a criterios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos establecidos por Convit & Pinardi (1974). Entre estos criterios están la impresión clínica, la presencia del parásito en la biopsia y la medición de la respuesta inmunitaria adquirida mediante la prueba de leishmanina. Esta última consiste en la inyección intradérmica de 0.1 ml de antígeno de *Leishmania pifanoi* (MH00M/VE/57LL1), luego de 48 horas se mide la induración en el lugar de la inyección, se considera un diámetro mayor de 5 mm como una reacción positiva.

- **Criterio de exclusión:** El tratamiento médico para la leishmaniasis en el momento de la toma de muestra, la presencia de otras enfermedades de base (cardiopatías, diabetes, VIH, enfermedades autoinmunes) y embarazo.
- **Criterios de inclusión:** Pacientes con diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutánea LCL, LCI y LCD, en un rango etario de 18 a 50 años, que no presentaron ningún criterio de exclusión y que desearon participar en el estudio.
- **Consideraciones éticas:** Este trabajo cumplió con las normas del Código de Ética para la vida (Ministerio del poder popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación). Antes de iniciar el estudio, el proyecto fue aprobado por el Comité Ético del Instituto de Biomedicina, otorgando la certificación correspondiente. Los pacientes participantes en este estudio lo hicieron de manera voluntaria, luego de haber sido informados detalladamente a cerca del proyecto de investigación.

Luego de la firma del consentimiento informado por cada paciente, se obtuvo una biopsia de la lesión mediante la técnica escisión en forma de ojal. Las biopsias fueron utilizadas para la confirmación parasitológica del diagnóstico clínico, mediante histopatología y cultivo.

Luego de realizar los procedimientos para el diagnóstico, una porción de cada biopsia fue incluida en el medio de criopreservación Cryomatrix® (Shandon, EEUU), luego se congelaron y se

almacenaron en nitrógeno líquido hasta su posterior utilización para el estudio inmunohistológico.

#### *Inmunohistoquímica*

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó la prueba de inmunohistoquímica que consistió en lo siguiente:

A partir de las biopsias congeladas en nitrógeno líquido, se obtuvieron cortes seriados finos de 3-5µm de grosor en un criostato (Cryotome E ThermoShandon, EEUU), a -30°C. Con el fin de obtener una muestra representativa de cada biopsia, se realizaron cortes seriados en láminas porta objeto consecutivas, completando de 2 a 3 cortes por lámina a diferentes niveles de la muestra.

Sobre los cortes congelados se realizó el método indirecto de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de TLR2, TLR4, TLR9, CD14 y células CD56+. En todos los casos los cortes congelados fueron fijados durante 10 minutos con acetona, seguido de la hidratación con buffer fosfato salino (PBS) y el bloqueo con suero de cabra o conejo al 5% en PBS, continuando con la incubación durante 90 minutos con el anticuerpo primario específico para cada una de las moléculas a identificar. Luego se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinado, seguido de la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs Inc., EEUU) durante 15 minutos. Se realizaron lavados de 5 minutos con PBS entre cada una de las incubaciones mencionadas. Todo este procedimiento se llevó a cabo en cámaras húmedas (ShandonSequenza®) con el sistema de incubación coverplate (Shandoncoverplate™). Para realizar la reacción enzimática colorimétrica, se utilizó el sustrato para peroxidasa NovaRED (Vector Labs Inc., EEUU) durante 3 minutos. Luego se lavaron los cortes con agua destilada, se contrastaron con hematoxilina (Shandon, EEUU) y se deshidrataron con concentraciones crecientes de Etanol (70 y 99%) y dos cambios de Xilol, para luego montar los cubreobjetos con el medio de montaje DPX (BDH microscopical reagents).

Se cuantificaron las células en un microscopio óptico (Leica DSMS, Alemania), equipado con una cámara de video y monitor (Panasonic, Japón) calibrado para determinar el número de células/

mm<sup>2</sup>. Solo aquellas células con núcleo visible que presentaron una tinción roja fueron contadas como positivas. Para obtener una muestra representativa, se contó el número de células positivas en 20 campos de cada lámina a una magnificación de 400X.

#### Anticuerpos

Todos los anticuerpos usados fueron diluidos en buffer fosfato salino (PBS) (NaCl 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40mM), pH 7,2. Para la identificación de los receptores tipo toll se utilizaron anticuerpos policlonales con las siguientes especificidades: TLR2 (sc-10739), TLR4 (sc-10741), ambos IgG de cabra; TLR9 (sc-13215), IgG de conejo y CD14 (sc-9150), IgG de cabra. Todos provenientes de Santa Cruz Biotechnology Inc. California, USA utilizados a una concentración de 2 µg/mL. Para la identificación de células NK se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti CD56 (M0852DAKO, USA) a una concentración de 5 µg/mL. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos policlonales biotinados: caballo anti IgG de ratón, caballo anti IgG de cabra y conejo anti IgG de conejo (Vector Laboratories, Burlingame, USA) a una concentración de 15 µg/ml.

#### Análisis estadístico

Para analizar la distribución de los datos se realizó el test de normalidad Kalmogorov-Smirnov (KS test). Debido al tamaño de los grupos y a que todos los datos no tuvieron distribución normal, las diferencias entre los grupos de pacientes se determinaron mediante el test no paramétrico Mann-Whitney. Los datos fueron representados como células/mm<sup>2</sup> (mediana, rango y rango intercuartiles) y los valores de *P* menores a 0,05 fueron considerados como significativos. Datos clínicos como edad,

valores de leishmanina y tiempo de evolución fueron representados como media ± desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Instad 3.0 (GraphPad software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

#### RESULTADOS

La evaluación clínica mostró que los pacientes con LCL presentaron una o varias úlceras localizadas con borde infiltrado en las áreas expuestas, el promedio del período de evolución de estas lesiones fue 2,2 meses para el momento de la primera consulta médica. Se identificaron los pacientes con LCI por la presencia de lesiones simples o múltiples verrucosas, sarcoidales o placas vegetativas con un promedio de 6 ± 2,3 meses de evolución. Los pacientes con LCD presentaron una historia natural prolongada (118 ± 132 meses) de múltiples lesiones diseminadas como pápulas, placas y nódulos. El análisis histológico de biopsias confirmó el diagnóstico clínico de LCL, LCI y LCD con la presencia variable de parásitos *Leishmania* en LCL y LCI y elevado número de parásitos en LCD. La prueba intradérmica de *Leishmania* fue fuertemente positiva en los pacientes con LCL y los pacientes con LCI, mientras que en los pacientes con LCD fueron negativas (Tabla I).

Al realizar el estudio inmunohistológico, se observó en las lesiones de LCL una densidad promedio de células TLR2+ de 384, en un rango de 0-1487 células/mm<sup>2</sup>, similar a la observada en los pacientes con LCD (278, 0-1188 células/mm<sup>2</sup>). La expresión de TLR4 también fue similar en ambos grupos de pacientes. En los pacientes con LCL se observó una densidad de células TLR4+ de 350, 0-1225 células/mm<sup>2</sup> y en los pacientes con LCD de 300,0-1050 células/mm<sup>2</sup>, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. En los pacientes

**Tabla I. Evolución clínica y respuesta a la prueba de Leishmanina de los pacientes con diferentes formas clínicas leishmaniasis cutánea.**

| Tipo de lesión | Edad<br>(media ±DS) | Leishmanina (mm)<br>(media ±DS) | Tiempo de evolución (meses)<br>(media ±DS) |
|----------------|---------------------|---------------------------------|--|
| LCL (n=20)     | 34±16               | 21,2±8,3 *                      | 2,2±1,8 *                                  |
| LCI (n=5)      | 3620                | 15,3±4,8 *                      | 6±2,3 *                                    |
| LCD (n=10)     | 17±13               | 0,7±2,4                         | 118±132                                    |

\* *P*≤0,05 con respecto a LCD

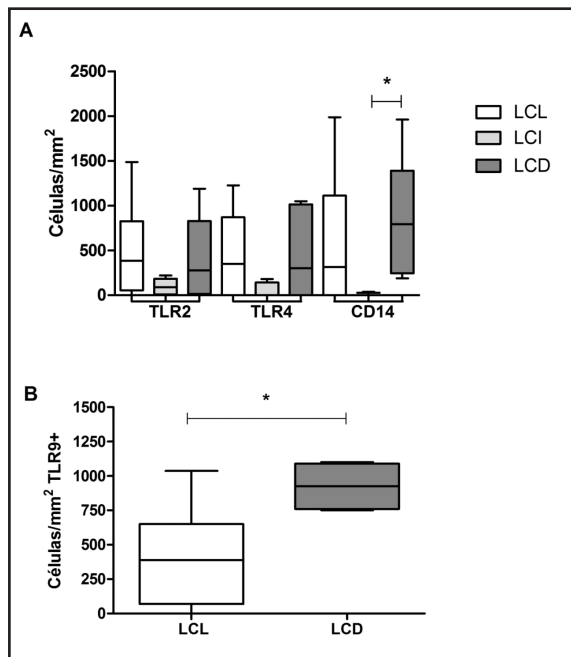
con LCI se observó una tendencia a presentar baja densidad de células TLR2+ y TLR4+ en el infiltrado celular. Sin embargo, al realizar la prueba de Mann-Witney no se observaron diferencias significativas con respecto a los otros grupos de pacientes. La expresión de CD14, correceptor de TLR4 y TLR2, también fue similar en los pacientes LCL (313,0-1987) y LCD (793,188-1962), mientras que los pacientes con LCI mostraron una menor densidad de células CD14+ (25, 0-38 células/mm<sup>2</sup>) ( $P=0,0119$ ) (Fig. 1A). Por otra parte, las células TLR9+ fueron mayores en los pacientes con LCD (926,750-1100 células/mm<sup>2</sup>) en comparación con LCL (388,0-1037 células/mm<sup>2</sup>) con una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0,0098$ ) (Fig. 1B).

En el 80% de los pacientes con LCL y el 100% de los pacientes con LCI y LCD, se observó expresión

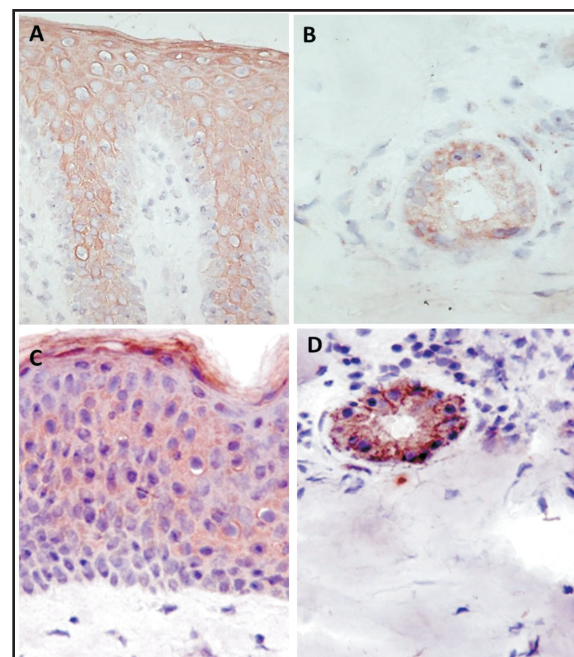
de TLR2 en la epidermis, con inmunoreactividad en los queratinocitos (Fig. 2A), y en glándulas sudoríparas (Fig. 2B). Se observó un patrón similar de en la expresión de CD14 (Fig. 2C y D). También se observó la expresión de TLR4 en la epidermis, pero en menor número de pacientes: 10% de los casos de LCL, 50% de los casos de LCI y 30% de los casos de LCD. Llama poderosamente la atención que en los todos pacientes con LCD se observaron abundante número de macrófagos con parásitos en su interior que presentan inmunoreactividad para TLR9 (Fig. 3).

En cuanto a las células tipo NK, se pudo evidenciar una mayor densidad de células CD56+ en las lesiones los pacientes con LCL (261, 36-562 células/mm<sup>2</sup>) con respecto a los pacientes con LCI (113, 73-513 células/mm<sup>2</sup>) ( $P= 0,04$ ) y LCD (50, 0-325 células/mm<sup>2</sup>) ( $P=0,0001$ ) (Fig 4). Se observó

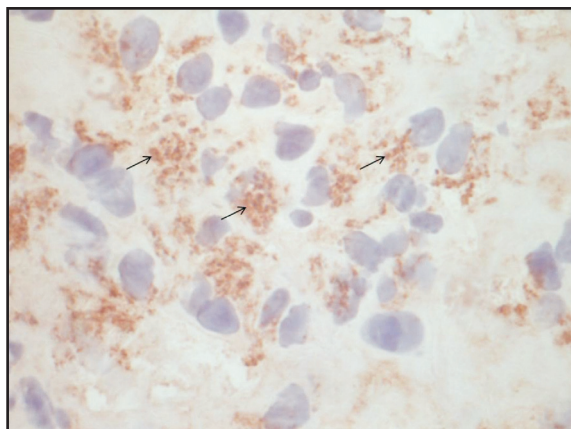
**Fig 1. Expresión de receptores tipo toll en lesiones de LCA. A) Densidad de células TLR2, TLR4 y CD14 positivas en las lesiones de diferentes formas clínicas de LCA. B) Densidad de células TLR9 positivas en las lesiones de diferentes formas clínicas de LCA. Datos representados como células positivas/mm<sup>2</sup> (mediana, rango inter-cuartiles y rango máximo-mínimo) de pacientes con LCL (n= 20), LCI (n= 5) and LCD (n=10). \* $P<0.05$  al comparar LCL con LCI y LCL con LCD mediante el test Mann-Witney.**



**Fig 2. Inmunolocalización de TLR2 y CD14 en lesiones de pacientes con LCA. A) Queratinocitos TLR2+ en los estratos espinoso y granuloso de la epidermis en un paciente con LCL. B) Conducto de glándula sudorípara TLR2+ en una lesión de LCD. C) Queratinocitos CD14+ en los estratos espinoso de la epidermis en un paciente con LCL. B) Conducto de glándula sudorípara CD14+ en una lesión de LCD. Magnificación original: 400x.**



**Fig 3. Inmunolocalización de TLR9 en una lesión de LCD. Expresión de TLR9 en macrófagos con amastigotes en su interior. Magnificación original: 1000x.**



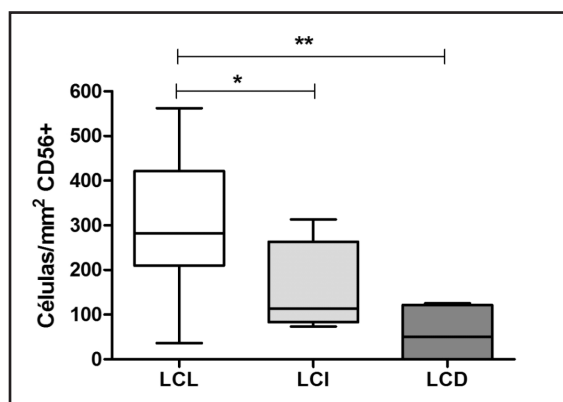
una disminución significativa de las células CD56+ en la lesión a medida que avanza el grado de severidad de la enfermedad.

## DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra que, en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea, la expresión de TLR4, TLR2 y TLR9 difiere en las formas clínicas. En los pacientes con LCL, la elevada expresión de TLR2 y TLR4, así como el correceptor CD14, se puede asociar la respuesta inmunitaria tipo Th1 característica de estos pacientes. TLR2 y TLR4 inducen la activación de NFκB, que promueve la transcripción y la síntesis de citocinas proinflamatorias. En modelos experimentales de leishmaniasis, se ha demostrado que la activación de TLR2 y TLR4 induce la respuesta Th1 caracterizada por la producción de IFN-γ y capaz de eliminar al parásito (Becker *et al.*, 2003; Kropf *et al.*, 2004; Whitaker *et al.*, 2008). La elevada expresión de CD14 en estos pacientes puede estar relacionada a su función como correceptor de TLR2 y TLR4. En estudios previos se ha demostrado la participación de CD14 en el reconocimiento de tripanosomatídeos (Gazzinelli & Denkers, 2006) y de *Leishmania* (Whitaker *et al.*, 2008) en asociación con TLR2 y TLR4.

Por otra parte, los pacientes con LCD desarrollan una respuesta inmunitaria específica muy débil, que se evidencia en el resultado negativo a la

**Fig 4. Células CD56 positivas en lesiones de LCA. Densidad de células CD56+ en lesiones de pacientes con diferentes formas clínicas. Datos representados como células/mm<sup>2</sup> (mediana, rango intercuartiles y rango máximo-mínimo) de pacientes con LCL (n= 20), LCI (n= 5) and LCD (n=10). \*P<0.05 al comparar LCL con LCI. \*\*P<0.001 = LCL con LCD mediante el test Mann-Witney.**



prueba intradérmica leishmanina. Las lesiones de estos pacientes se caracterizan por el predominio de citocinas Th2 con una elevada producción de TGFβ1 (Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, en este trabajo se evidenció en los pacientes con LCD una densidad de células TLR2, TLR4 y CD14 positivas similar a los pacientes con LCL y una elevada expresión de TLR9. Este resultado puede ser consecuencia del alto número de macrófagos infectados característicos en el granuloma de los pacientes con LCD (Convit & Pinatdi, 1974; Convit *et al.*, 1993). Recientemente, Tuon *et al.* (2012) demostraron que los macrófagos expresan TLR2, en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea americana, mientras que las células dendríticas CD1a positivas y las células NK no expresan el receptor (Tuon *et al.*, 2012). Otro estudio del mismo grupo de investigadores demostró también la expresión de TLR9 por macrófagos asociados al granuloma de pacientes con leishmaniasis cutánea americana (Tuon *et al.*, 2010).

Los pacientes con LCI mostraron una tendencia a presentar menor densidad de células TLR2 y TLR4 positivas con respecto a los otros grupos de pacientes. Posiblemente esto sea el reflejo de la escasa presencia de macrófagos en estas lesiones. Las lesiones de LCI se desarrollan después de una infección

primaria y se caracterizan por una exacerbada inmunidad mediada por células, presentando un granuloma con escasos macrófagos infectados y muchos linfocitos T activados con un patrón mixto de citocinas Th1/Th2 (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Díaz *et al.*, 2002). Posiblemente en LCI y en otras formas recidivantes de leishmaniasis predomina otro tipo de respuesta inmunitaria. Evidencias recientes demuestran que la respuesta Th17 está involucrada en la patogénesis de leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis dérmica post kala azar (Basellar *et al.*, 2009; Boaventura *et al.*, 2010; Katara *et al.*, 2012).

Por otra parte, la expresión de TLR2, TLR4 y del correceptor CD14 en los queratinocitos y glándulas sudoríparas confirma la participación de epidermis en la respuesta inmunitaria cutánea, donde los queratinocitos juegan un papel importante en la activación de células del sistema inmunitario. Los queratinocitos expresan TLR1, 2, 3, 4, 5, 9 y 10, cuya estimulación activa la producción de citocinas inflamatorias vía de NFκB. Es por esto que los TLR tienen especial importancia en enfermedades cutáneas como dermatitis atópica, psoriasis, acné, lepra, entre otras. En estas enfermedades existe una sobre regulación en la expresión de los TLRs, razón por la que han sido identificados como nuevos blancos terapéuticos (Hari *et al.*, 2010). En leishmaniasis estos receptores pueden contribuir a la persistencia del proceso inflamatorio de las lesiones.

En relación con los ligandos de *Leishmania* reconocidos por TLRs, se ha demostrado que el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* es reconocido por el TLR2 (Becker *et al.*, 2003; De Veer *et al.*, 2003). Además, TLR4 reconoce el complejo de proteoglicolípido P8 (P8 PGLC) de *L. pifanoi* en forma dependiente de CD14, induciendo la producción de quimiocinas y citocinas inflamatorias por los macrófagos (Whitaker *et al.*, 2008). En este estudio se pudo identificar el TLR9 asociado con los amastigotes de *Leishmania* en el interior de los macrófagos, sugiriendo que los parásitos también son reconocidos por TLR9. Esta hipótesis es apoyada por observaciones similares en ratones infectados con *L. mexicana* (datos no publicados) y por un estudio que demuestra que secuencias no metiladas CpG de DNA de *L. mexicana* pueden activar a macrófagos murinos a través de TLR9 (Martínez-Salazar *et al.*, 2008). En los pacientes con LCD pudimos observar una mayor expresión de los TLR9

debido a la gran cantidad de macrófagos infectados característicos de estas lesiones. Nuestros resultados coinciden con las observaciones de Tuon *et al.* (2010), quienes describen que TLR9 está asociado con el granuloma de pacientes con leishmaniasis cutánea y es expresado por los macrófagos (Tuon *et al.*, 2010). Por otra parte, modelos experimentales demuestran que el reconocimiento de DNA de *Leishmania major* por TLR9 induce activación de células dendríticas y la respuesta Th1 protectora (About Fakher *et al.*, 2009). Sin embargo, a infección en los pacientes con LCD, conduce una respuesta inmunitaria anérgica caracterizada por la escasa producción de citocinas inflamatorias (Díaz *et al.*, 2002).

En este estudio también se demuestra una mayor densidad de las células NK/NKT CD56+ en las lesiones de LCL, que puede estar relacionada con la respuesta Th1 descrita en estos pacientes (Díaz *et al.*, 2002). Por su parte, los pacientes LCD presentan escasas células CD56+, en concordancia con la escasa producción de citocinas Th1 (Díaz *et al.*, 2002). Estos resultados indican que las células NK/NKT participan en una respuesta inmunitaria protectora frente a *Leishmania* en estos pacientes. Varios estudios en modelos experimentales han demostrado el papel protector de estas células en leishmaniasis. En ratones deficientes de células NK el curso de la infección con *Leishmania* se agrava (Laurenti *et al.*, 1999) y la transferencia adoptiva de estas células mejora las lesiones en ratones infectados (Sanabria *et al.*, 2008). Este efecto protector en leishmaniasis se le atribuye a la producción de IFNγ por las células NK y su asociación con las células dendríticas en órganos linfoides durante etapas tempranas de la infección (Bajénoff *et al.*, 2006). En la lesión, las células NK activadas liberan IFNγ y TNFα y estimulan al macrófago para eliminar al parásito de una forma iNOS dependiente, a diferencia de infecciones virales, donde las células infectadas son susceptibles a citotoxicidad (Prajeeth *et al.*, 2011).

En conclusión, en este estudio se demuestra que en la lesión de pacientes con leishmaniasis cutánea americana la expresión de TLR4, TLR2 y TLR9 difiere en las diferentes formas clínicas. También se identificó el TLR9 asociado con los amastigotes de *Leishmania* en el interior del macrófago, sugiriendo que los parásitos son reconocidos por TLR9. Por otra parte la mayor densidad de las células CD56+ en lesiones de LCL puede estar relacionada con la

respuesta protectora Th1, característica de estos pacientes.

#### *Conflictos de intereses*

Los Autores manifestamos que no ha habido conflictos de intereses en la realización de este trabajo.

#### AGRADECIMIENTOS

A los pacientes que decidieron participar en este estudio y al personal de la Sección de Leishmaniasis del Instituto de Biomedicina por su apoyo en la recolección de las muestras y de los datos clínicos. Este estudio fue Financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela (Proyecto N°PG-09-7429-2008/1).

#### REFERENCIAS

- Abou Fakher F. H., Rachinel N., Klimczak M., Louis J. & Doyen N. (2009). TLR9-Dependent Activation of Dendritic Cells by DNA from *Leishmania major* Favors Th1 Cell Development and the Resolution of Lesions. *J. Immunol.* **183**: 1386-1396.
- Bajénoff M., Breart B., Huang A. Y., Qi H., Cazareth J., Braud V. M., *et al.* (2006). Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J. Exp. Med.* **203**: 619-631.
- Bacellar O., Faria D., Nascimento M., Cardoso T. M., Gollob K. J., Dutra W. O., *et al.* (2009). Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **200**: 75-78.
- Becker I., Salaiza N., Aguirre M., Delgado J., Carrillo-Carrasco N., Gutiérrez Kobeh L., *et al.* (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cellsthrough toll-like receptor-2. *Mol. Bioch. Parasitol.* **130**: 65-74.
- Boaventura V. S., Santos C. S., Cardoso C. R., de Andrade J., Dos Santos W. L., Clarêncio J., *et al.*, (2010). Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur. J. Immunol.* **40**: 2830-2836.
- Caceres-Dittmar G., Tapia F. J., Sanchez M. A., Yamamura M., Uyemura K., Modlin R. L., *et al.* (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **91**: 500-505.
- Convit J. & Pinaridi M. E. (1974). Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunopathological spectrum in South America. p.159-166. En: *Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas disease*. Ciba Foundation Symposium 20. Elsevier Excerpt Med. Amsterdam, North Holland.
- Convit J., Ulrich M., Fernández C. T., Tapia F. J., Cáceres-Dittmar G., Castés M., *et al.* (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 444-448.
- de Lima H., Borges R. H., Escobar J. & Convit J. (2011). Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela, bienio 2008-2009. *Bol. Mal. Salud Amb.* **51**: 215-224.
- De Veer M. J., Curtis J. M., Baldwin T. M., DiDonato J. A., Sexton A., McConville M. J., *et al.* (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* **33**: 2822-2831.
- Díaz N. L., Arveláez F. A., Zerpa O. & Tapia F. J. (2006). Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **31**: 114-117.
- Díaz N. L., Zerpa O., Ponce L. V., Convit J., Rondon A. J. & Tapia F. J. (2002). Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: Leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of lesion. *Exp. Dermatol.* **11**: 34-41.
- Gazzinelli R. T. & Denkers E. Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 895-906.



- Hari A., Flach T. L., Shi Y. & Mydlarski P. R. (2010). Toll-like receptors: role in dermatological disease. *Mediators Inflamm.* 437246. doi: 10.1155/2010/437246.
- Katara G. K., Ansari N. A., Singh A., Ramesh V. & Salotra P. (2012). Evidence for involvement of Th17 type responses in post kala azar dermal leishmaniasis (PKDL). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1703.
- Kiyoshi T. & Shizuo A. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Inter. Immunol.* **17**: 1–14.
- Kropf P., Freudenberg M. A., Modolell M., Price H. P., Herath S., Antoniazzi S., et al. (2004). Toll-Like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **72**: 1920–1928.
- Laurenti M. D., Gidlund M., Ura D. M., Sinhorini I. L., Corbett C. E & Goto H. (1999). The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**: 323–325.
- Lieke T., Nylén S., Eidsmo L., McMaster W. R., Mohammadi A. M., Khamesipour A., et al. (2008) *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **153**: 221-230.
- Maasho K., Sanchez F., Schurr E., Hailu A. & Akuffo H. (1998). Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect. Immun.* **66**: 2698-2704.
- Martínez-Salazar B., Berzunza-Cruz M. & Becker I. (2008). *Leishmania mexicana* DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression. *Gac. Med. Mex.* **144**: 99-104.
- Prajeeth C.K., Haerberlein S., Sebald H., Schleicher U. & Bogdan C.(2011). *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines, but not of NK cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* **79**: 2699-2708.
- Sanabria M. X., Vargas-Inchaustegui D. A., Xin L. & Soong L. (2008). Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. *Infect. Immun.* **76**: 5100-5109.
- Scharton T.M., & Scott P. (1993). Natural killer cells are a source of IFN- $\gamma$  that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* **178**: 567–578.
- Tuon F. F., Fernandes E. R., Duarte M.I. & Amato V. S. (2012). Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **54**: 159-63.
- Tuon F. F., Fernandes E. R., Pagliari C., Duarte M. I. & Amato V. S. (2010). The expression of TLR9 in human cutaneous leishmaniasis is associated with granuloma. *Parasite Immunol.* **32**: 769-772.
- Whitaker S. M., Colmenares M., Pestana K. G. & Mc Mahon-Pratt D. (2008). *Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* **76**: 2149-2156
- WHO (2010). *Control of the leishmaniasis*. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of the leishmaniasis. Techn. Report Series N° 949. Geneva, Switzerland.

Recibido el 27/05/2013  
Aceptado el 03/03/2014