

## **Células inflamatorias en la secreción nasal y citocinas proinflamatorias Th1, Th2, Th17 y reguladoras en el suero de pacientes con leishmaniasis cutánea Americana** *Inflammatory cells in the nasal secretion and serum pro-inflammatory Th1, Th2, Th17 and regulatory cytokines from American cutaneous leishmaniasis patients*

Dennis A. Lugo<sup>1</sup>, Orquídea L. Rodríguez<sup>1</sup>, Wilmen Galindo<sup>1</sup>, María E. Ortega<sup>1</sup>, Ángel Cardozo<sup>2</sup>, Arlet Ferrer<sup>2</sup>, Rosaura Benítez<sup>2</sup>, Aura M. Suarez<sup>2</sup>, Dorila Delgado<sup>2</sup>, Iraida Mendoza<sup>2</sup>, José Carrero<sup>2</sup>, Elizabeth Giganti<sup>2</sup>, Alexis Castrillo<sup>2</sup>, Olga Zerpa<sup>1</sup> & Maira Cabrera\*<sup>1</sup>

### RESUMEN

En la forma mucocutánea (LCM) y cutánea (LCL) de la leishmaniasis, se genera una respuesta inflamatoria cuyos mediadores (células y citocinas) se han involucrado en la severidad de las úlceras y en el daño tisular observado en estos pacientes, particularmente en los LCM. Por ello, nos propusimos identificar los grupos celulares predominantes en la secreción nasal de pacientes con LCL y LCM, y relacionarlos con citocinas proinflamatorias y reguladoras. Evaluamos en pacientes LCL (n=20), LCM (n=14) y 20 individuos sanos: a) La cuantificación de tipos de leucocitos en "frotis" de secreción nasal, úlceras cutáneas y sangre periférica teñidos con Giemsa empleando microscopía óptica, b) Concentraciones séricas de IL-8, IL-4 e IL-10 por citometría de flujo (CBA array) e IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 por ELISA. El grupo celular predominante en la secreción nasal de pacientes con LCM fueron los neutrófilos (80,7%) y escasos eosinófilos (0,6%), comparados con los LCL y controles, en los que no se observaron estas células. Mientras que los "frotis" de las úlceras de los LCL presentaron 45,3% de neutrófilos y 43% de linfocitos. En contraste, en sangre periférica, de los pacientes se observó un incremento de neutrófilos y linfocitos junto a una frecuencia significativa de monocitos (LCM: 5,3; LCL: 6,3%) y eosinófilos (LCM: 8,2%; LCL: 5,2%). Todo esto sugiere la participación de los neutrófilos en la inmunopatogénesis en la LCM. Adicionalmente, se demostró una mayor ( $P=0,03$ ) concentración sérica de IL-8 en los pacientes con LCL (18,5pg/mL) y LCM (18,2pg/mL) respecto a los individuos sanos, sugiriendo que esta citocina promueve el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección en los LCM, mientras que en los LCL contribuyen junto con los linfocitos T CD4+ de la subpoblación Th1 y productores de IFN- $\gamma$ , en la activación de mecanismos leishmanicidas.

**Palabras clave:** leishmaniasis, células polimorfonucleares, citocinas, secreción nasal.

### SUMMARY

*In mucocutaneous (MCL) and cutaneous (LCL) leishmaniasis, the inflammatory mediators (cytokines and cells) have been associated with ulcers severity and tissue damage observed in these patients, particularly in MCL. Therefore, we decided to identify the predominant cell groups in the nasal secretion of LCL and MCL patients, and related pro-inflammatory and regulatory cytokines. It was evaluated in LCL (n = 20), MCL patients (n = 14) and 20 healthy volunteers: a) Differential leukocyte count by optical microscopy performed in: smear of a runny nose, skin ulcers and peripheral blood dyed with Giemsa, b) serum levels of IL-8, IL-4 and IL-10 using cytometric bead array (CBA) assay and IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 by ELISA. In MCL patients, neutrophils (80.7%) were the most abundant cellular group in nose secretion, followed by a small amount of eosinophils (0.6%) compared to the LCL and controls, where no such cells were observed. In contrast, in peripheral blood from ACL patients were observed an abundant amount of neutrophils and lymphocytes together with a significant frequency of monocytes (MCL:5.3%; LCL: 6.3%) and eosinophils (MCL:8.2%; LCL:5.2%). While the smear from skin ulcers of LCL patients showed 45.3% of neutrophils and 43% lymphocytes. All of these indicate that neutrophils might play a role in the MCL immunopathogenesis. Moreover, an increased serum levels of IL-8 ( $P=0.03$ ) were found in LCL (18.5pg/mL) and MCL (18.2pg/mL) patients, suggesting that this cytokine promotes the recruitment of neutrophils to the infection site in MCL; while in LCL patients may contribute with CD4 + Th1 (IFN- $\gamma$ ) cells in the activation of leishmanicida mechanisms.*

**Key words:** leishmaniasis, polymorphonuclear cells, cytokines, nasal secretion.

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina "Jacinto Convit". Universidad Central de Venezuela - Ministerio del Poder Popular para la Salud (UCV-MPPS). San Nicolás a Providencia. Parroquia San José. Caracas 1010A, Venezuela.

<sup>2</sup> Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales. Ministerio del Poder Popular para la Salud. Venezuela.

\*Autor de correspondencia: mairacab@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis cutánea Americana (LCA) es una enfermedad causada por la infección con protozoarios del género *Leishmania*. Dependiendo de la especie del parásito involucrado y de la respuesta inmunológica de los individuos infectados (WHO, 2000; Murray *et al.*, 2005), esta enfermedad se puede manifestar en diferentes formas clínicas que afectan la piel o las superficies mucosas, estas son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), mucocutánea (LCM) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Convit *et al.*, 1993).

En la forma localizada y mucocutánea de la leishmaniasis, se establece una respuesta inflamatoria cuyos mediadores (células y citocinas) han sido implicados en la resolución y severidad de esta enfermedad (Cabrera *et al.*, 2003; Tapia *et al.*, 2009; Kaye & Scott, 2011).

En la primera línea de defensa contra esta parasitosis están involucrados los neutrófilos junto con los macrófagos (Kolaczowska & Kubes, 2013) y el establecimiento de la infección, el desarrollo de la enfermedad clínica o la resolución de la misma dependerá de la capacidad activación de esta célula fagocítica, (Tapia *et al.*, 2009). Por otra parte, la fagocitosis de patógenos como *Leishmania* spp. por parte de los neutrófilos y los macrófagos, genera un microambiente de citocinas y quimiocinas, tales como la Interleucina (IL)-1, IL-6, Interferón (IFN)- $\gamma$ , Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$  y CXCL8 (IL-8) que contribuyen con el reclutamiento y activación de las mismas así como de otras células, como monocitos y células dendríticas (DCs) (Scapini *et al.*, 2000; Bennouna *et al.*, 2003; Nathan *et al.*, 2006), además de influir en la polarización de la respuesta dependiente de los linfocitos T cooperadores (Th, por sus siglas en inglés) (Bennouna *et al.*, 2003; Antonelli *et al.*, 2005; Nathan *et al.*, 2006; MacFarlane *et al.*, 2008).

Un patrón de respuesta de linfocitos CD4+ Th de tipo 1 (Th1) se ha descrito en modelos murinos resistentes a *Leishmania* spp. (Scott *et al.*, 1988; Heinzl *et al.*, 1989) y en pacientes que presentan LCL (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Castes *et al.*, 1996), produciéndose concentraciones adecuadas de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, que conlleva a la eliminación de los parásitos por parte de los macrófagos mediante

la producción de óxido nítrico (Caceres-Dittmar *et al.*, 1993; Castes *et al.*, 1996; De Trez *et al.*, 2009). Mientras que, los pacientes con LCM secretan citocinas del patrón Th1 y Th2 (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993), observándose una elevada producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y óxido nítrico, en ausencia de una adecuada regulación por parte de IL-10 y TGF- $\beta$  y baja carga parasitaria (Castes *et al.*, 1996; Ribeiro de Jesús *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2005). Recientemente, se ha descrito la presencia de células IL-17+ en lesiones tisulares de estos pacientes (LCM) (Boaventura *et al.*, 2010). Todos estos hallazgos sugieren que el daño tisular que presentan los pacientes con LCM en sus mucosas, es debido a una exacerbada respuesta inflamatoria (Cabrera *et al.*, 2003; Faria *et al.*, 2005; Kolaczowska *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Por lo que nos propusimos evaluar a través de métodos no invasivos los tipos celulares predominantes, en la secreción nasal de los pacientes con las formas cutánea localizada y mucocutánea de la leishmaniasis y relacionarlos con citocinas séricas proinflamatorias y reguladoras con el fin de evidenciar en el proceso inflamatorio que se establece en esta secreción; lo cual sería de valor diagnóstico y pronóstico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Población de estudio*

El estudio comprendió un total de 34 pacientes con LCA (LCL, n=20; LCM, n=14), con rango de edades comprendidos entre 18 y 60 años, los cuales fueron evaluados en la Sección clínica de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” y en los diferentes Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales de Venezuela. Los pacientes fueron diagnosticados siguiendo los criterios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos establecidos por Convit (1974). Ninguno de los pacientes se encontraba bajo algún tipo de tratamiento al momento de realizar el estudio.

Como controles se incluyeron un total de 20 individuos voluntarios sanos, con un rango de edades comprendidos entre 18 y 60 años. Todos provenientes de diferentes zonas endémicas de Venezuela y fueron negativos a la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada (Prueba de Montenegro o Leishmanina).

### *Determinación de los grupos celulares presentes en sangre periférica, secreción nasal y lesión*

Se tomaron muestras de 5 mL de sangre periférica por venopunción a cada uno de los pacientes y controles, posteriormente se extendió una gota de esta muestra sobre una lámina portaobjeto. Para el conteo celular en la secreción nasal se introdujo un hisopo impregnado con solución salina en las fosas nasales de los pacientes con LCL, LCM y voluntarios sanos y se realizó un frotis sobre una lámina portaobjeto. A los pacientes con LCL se les realizó también un frotis por aposición de la lesión en piel sobre una lámina portaobjeto. Todas las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con metanol. Posteriormente, mediante una tinción de Giemsa, se cuantificó el porcentaje de neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos presentes en cada muestra, por conteo directo empleando un microscopio óptico (Olympus CH30) a 400X.

### *Determinación de citocinas*

Las concentraciones de IL-4, IL-8 e IL-10 en el suero de los pacientes e individuos sanos fueron determinadas por citometría de flujo (FACSCanto (BD Biosciences), mediante un kit comercial ("CBA: Cytometric bead array" BD Bioscience, USA), siguiendo el procedimiento del fabricante con una curva patrón para cada citocina (0 a 5000 pg/mL). Los datos obtenidos se analizaron con el software BD™ Cytometric Bead Array (CBA) para obtener la concentraciones en pg/mL.

Las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 se determinaron mediante ELISA de captura comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, MN, USA). Las concentraciones de cada citocina se obtuvieron a partir de una curva patrón construida con recombinante de cada citocina suministradas por los kits (Human TNF- $\alpha$  DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 pg/mL; Human IFN- $\gamma$  DuoSet®, sensibilidad: 15,6 - 1000 pg/mL; Human IL-17A/F Heterodimer, sensibilidad: 156 - 10000 pg/mL, (R&D Systems, MN, USA). Los resultados fueron expresados en pg/mL.

### *Análisis estadístico*

Las diferencias entre los grupos de pacientes para cada parámetro evaluado fueron establecidas

mediante el test de Mann-Whitney U debido a que los datos no tenían una distribución normal. Las comparaciones fueron consideradas significativas cuando  $P < 0,05$ . Para los análisis se usó el programa Prism 5 para Windows, versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. 2007).

### *Consideraciones éticas*

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biomedicina, Ministerio del Popular para la Salud y Universidad Central de Venezuela. Los individuos incluidos en el estudio, fueron debidamente informados e invitados a participar en el mismo. Ellos firmaron un consentimiento informado.

## RESULTADOS

### *Frotis de la secreción nasal y sangre periférica*

En los frotis de la secreción nasal de los pacientes con lesiones mucocutáneas se observaron un 80,7 % de neutrófilos y muy escasos eosinófilos ( $0,6\% \pm 1,4$ ), mientras que las células mononucleares (linfocitos y monocitos) estuvieron ausentes. En contraste, no se observó ningún grupo celular en la secreción nasal de los individuos sanos y los pacientes con LCL (Tabla I).

En las lesiones de los pacientes con LCL, predominaron los neutrófilos ( $45,3\% \pm 12,0$ ) seguido por los linfocitos ( $43,0\% \pm 12,2$ ), mientras que los monocitos ( $9,3\% \pm 5,3$ ) y los eosinófilos ( $2,5\% \pm 1,5$ ) fueron los grupos minoritarios.

En sangre periférica (Tabla II) los neutrófilos y los linfocitos constituyeron los grupos celulares predominantes en los pacientes LCL, LCM e individuos

**Tabla I. Porcentaje de grupos celulares presentes en muestras de secreción nasal de pacientes con LCA.**

	Neutrófilos (% $\pm$ desviación estándar)	Eosinófilos (%)
Controles	0,0	0,0
LCL	0,0	0,0
LCM	80,7 $\pm$ 40,1	0,6 $\pm$ 1,4

No se observaron linfocitos ni monocitos

**Tabla II. Porcentaje de grupos celulares en sangre periférica de pacientes con LCA.**

	Neutrófilos (% ± desviación estándar)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)
Controles	55,4 ± 9,6	37,3 ± 7,3	3,5 ± 1,6*	3,8 ± 5,4**
LCL	53,7 ± 10,1	34,7 ± 7,7	6,3 ± 3,5	5,2 ± 4,3
LCM	53,5 ± 8,3	33,1 ± 8,2	5,3 ± 2,0	8,2 ± 5,0***

\* $P < 0,001$  Controles vs. LCL & LCM\*\* $P = 0,015$  Controles vs LCL\*\*\* $P = 0,037$  LCM vs LCL & Controles

sanos, sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Adicionalmente, se evidenció una mayor ( $P < 0,05$ ) proporción de monocitos en la sangre periférica de los pacientes LCL ( $6,3\% \pm 3,5$ ) y LCM ( $5,3\% \pm 2,0$ ) comparado con los individuos sanos ( $3,5\% \pm 1,6$ ); más aún, el mayor porcentaje ( $P < 0,05$ ) de eosinófilos fue evidenciado en los pacientes con LCM ( $8,2\% \pm 5,0$ ) aunque en los pacientes con LCL, evidenciamos un incremento ( $5,2\% \pm 4,3$ ) en estas células ( $P < 0,015$ ) respecto a los controles ( $3,8\% \pm 5,4$ ).

#### Citocinas séricas

Las concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-8, TNF- $\alpha$ ), citocinas del patrón Th1 (IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) y reguladoras (IL-10) en los sueros de los pacientes evaluados se presentan en la Fig. 1, evidenciamos mayor concentración de IL-8 en los pacientes LCL ( $18,5 \pm 8,7$   $\mu\text{g/mL}$ ) y LCM ( $18,2 \pm 12,3$   $\mu\text{g/mL}$ ) en comparación con los controles ( $10,1 \pm 3,9$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $P < 0,05$ ). Asimismo se observó un leve aumento de TNF- $\alpha$  en los pacientes LCM ( $64,4 \pm 67,0$   $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que en los pacientes LCL ( $68,2 \pm 15,8$   $\mu\text{g/mL}$ ) los valores de IFN- $\gamma$  fueron significativamente mayores en comparación con los evidenciados en LCM ( $45,6 \pm 7,2$   $\mu\text{g/mL}$ ) e individuos sanos ( $48,4 \pm 9,5$   $\mu\text{g/mL}$ ). No encontramos diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles cuando comparamos las concentraciones de IL-4 e IL-10, sin embargo, se aprecia que los valores de IL-4 tienden a ser menores en los pacientes mucocutáneos ( $7,5 \pm 2,0$   $\mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, observamos un leve aumento de IL-17 en los individuos con LCL ( $272,4 \pm 90,6$   $\mu\text{g/mL}$ ) respecto a lo detectado en los pacientes LCM ( $223,7 \pm 47,7$   $\mu\text{g/mL}$ ) e individuos sanos ( $181,9 \pm 50,6$   $\mu\text{g/mL}$ ).

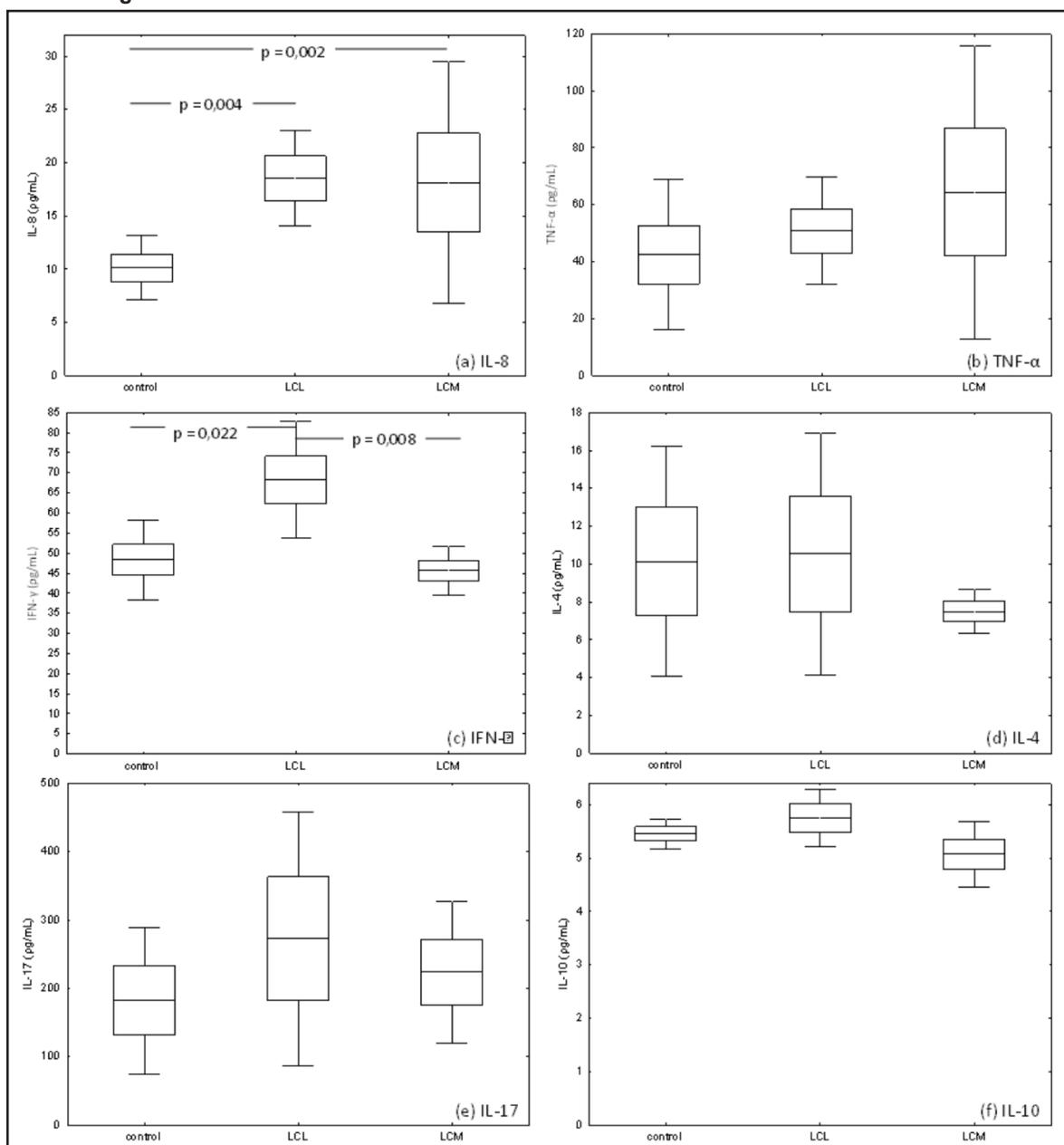
#### DISCUSIÓN

Diversas investigaciones han indicado que el daño tisular que se observa en los pacientes con LCA, particularmente en los LCM, se debe a la respuesta inflamatoria que se suscita en las lesiones, las cuales en la mayoría de los casos (90%) se presentan en la mucosa nasal (Castes *et al.*, 1996; Bacellar *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2007). En el presente trabajo pudimos evidenciar en muestras de secreción nasal de pacientes con LCM la respuesta inflamatoria que se establece en las lesiones, aspecto muy importante ya que esto podría permitir la detección temprana de este proceso y prevenir daños irreversibles en el tabique nasal y zonas adyacentes.

Esta respuesta evidenciada en los pacientes con LCM estuvo constituida principalmente por un alto porcentaje de neutrófilos seguido de un número de eosinófilos bajo, comparado con los LCL y controles, en los que no se observó ningún grupo celular en su fluido nasal. Lo cual pudiese indicar una migración de neutrófilos desde el torrente sanguíneo hacia las mucosas, en las cuales estas células podrían desempeñar un papel importante en la inmunopatogénesis de esta forma de la enfermedad. Los neutrófilos además de su capacidad para fagocitar y destruir a los microorganismos incluyendo a *Leishmania* spp., son fundamentales en el inicio del proceso inflamatorio, se ha descrito que ejecutan importantes funciones inmunoreguladoras en diferentes infecciones (Scapini *et al.*, 2000; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Por lo cual, una inapropiada o excesiva activación de este grupo celular puede generar como resultado daño tisular (Kalaczowska *et al.*, 2013).

Por otra parte, se conoce que los monocitos juegan un papel muy importante en el proceso de

**Fig. 1. Concentraciones séricas de citocinas de pacientes con LCA y controles sanos. (a) y (b) Citocinas proinflamatorias: IL-8 y TNF- $\alpha$ . (c) Citocina Th1: IFN- $\gamma$ . (d) Citocina Th2: IL-4. (e) Citocina Th17: IL-17. (f) Citocina reguladora: IL-10.**



activación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T y B. Esto se debe a que los mismos son los precursores inmediatos de los macrófagos y las células dendríticas inflamatorias, ambas células presentadoras de antígenos profesionales, que en conjunto con la expresión de moléculas HLA-DR/ péptidos y moléculas co-estimuladoras proporcionan

las primeras señales de activación a los linfocitos T (Geissmann, 2007; Maroof *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2011; Kaye & Scott, 2011). En este estudio se evidenció un aumento en el porcentaje de monocitos en la sangre periférica en los paciente con ambas formas de leishmaniasis evaluadas, también se observó un mayor porcentaje de monocitos y linfocitos en las

lesiones de los pacientes LCL comparados con los encontrados en sangre periférica, evidenciándose el proceso inflamatorio que se produce en la lesión.

Los eosinófilos han sido asociados con la respuesta inmune frente a infecciones con helmintos (Blanchard & Rothenberg, 2009). Por el contrario, éstos no han sido involucrados en la respuesta inmune en infecciones con protozoarios. Sin embargo, existen evidencias experimentales que involucran a estas células durante la infección con *Leishmania*. En ese sentido, se ha observado la quimiotaxis *in vitro* de eosinófilos hacia promastigotes de *L. amazonensis* (de Oliveira *et al.*, 2010). Otros estudios *in vivo* han mostrado el reclutamiento de estas células hacia los sitios de infección con *L. amazonensis* y *L. major* (Saito *et al.*, 1996). También, se ha evidenciado que los eosinófilos tienen actividad microbicida contra *L. mexicana* y *L. donovani*, mediante la ingestión y digestión de los mismos en el interior de la vacuola fagocítica. Por otra parte, se ha descrito que la fijación de los parásitos a la superficie de los eosinófilos induce la liberación de sus gránulos a la superficie de la *Leishmania* y causando su destrucción. (Pearson *et al.*, 1987; Pimenta *et al.*, 1987). Más aún, en pacientes infectados con *L. braziliensis* se ha observado una alta proporción de neutrófilos y eosinófilos en el infiltrado celular de linfadenopatías en fase temprana, comparado con los pacientes que presentan úlceras en piel y en la fase tardía de las linfadenopatías (Bomfim *et al.*, 2007). En nuestro estudio, encontramos en los pacientes con LCM un mayor porcentaje de eosinófilos en sangre periférica comparado con lo observado en los pacientes LCL y controles. En contraste, estas células estaban presentes muy escasamente en la secreción nasal de los pacientes LCM y en las lesiones cutáneas de los LCL, lo que nos hace suponer que estas células quizás no están participando en el proceso inmunopatológico presente en las lesiones de estos individuos. Queda para futuros estudios evaluar la participación de estas células en la infección por *Leishmania* spp.

Por otra parte, la IL-8, quimiocina producida por una variedad de células, incluyendo las células epiteliales nasales, fibroblastos nasales, queratinocitos entre otras (Jacobi *et al.*, 1998; Charmoy *et al.*, 2010) es importante en el reclutamiento de los neutrófilos (Van Zandbergen *et al.*, 2002), no así para los eosinófilos en las vías respiratorias superiores (Bochenska-Marciniak *et al.*, 2003). Más aún, se

ha demostrado que es producida por monocitos humanos infectados con *Leishmania major* y tiene actividad quimiotáctica para neutrófilos y monocitos (Badolato *et al.*, 1996).

En este trabajo se detectaron concentraciones significativas de IL-8 en el suero de los pacientes con leishmaniasis, lo que podría explicar la presencia de neutrófilos en la mucosa de los sujetos con LCM y en la lesión de los pacientes LCL. Esta quimiocina, podría estar actuando en conjunto con citocinas como IL-17 y TNF- $\alpha$ , las cuales también han sido asociadas con la quimiotaxis de los neutrófilos (Charmoy *et al.*, 2010), aunque nuestro estudio no reflejó diferencias significativas en las concentraciones de estas dos últimas citocinas, se observó un leve aumento de ambas en los sueros de los pacientes con lesiones cutáneas o mucocutáneas.

Por otro lado, con relación a la IL-4 e IL-10, tampoco se observaron cambios significativos en las concentraciones séricas de ambas citocinas, las cuales promueven el desarrollo de un patrón de respuesta inmunitaria de tipo Th2 (Garside *et al.*, 1995; Oliveira *et al.*, 2014), que actúan como factor de crecimiento/diferenciación de los linfocitos B, eosinófilos e inhiben las funciones de los macrófagos (Mossman & Coffman, 1989).

Múltiples estudios han demostrado que una respuesta de tipo Th1, con una alta producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , una deficiente regulación de IFN- $\gamma$  y una alteración en la producción de la IL-10 o su receptor (rIL-10) generan una respuesta inflamatoria exacerbada que es responsable de la progresión y cronicidad de la lesión en mucosa (Bacellar *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005), otros estudios también han demostrado que pacientes mucocutáneos producen más TNF- $\alpha$  y menos IL-10 en comparación con los LCL (Castes *et al.*, 1993; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000), indicando que el problema de la regulación de TNF- $\alpha$  y otras citocinas proinflamatorias es debido a la baja expresión de receptores para IL-10 en las células de las lesiones de la mucosa (Faria *et al.*, 2005), además, como ya hemos señalado, nuestros resultados sugieren que el daño tisular presente en los pacientes con LCM pudiese estar promovido en parte por la permanente presencia de los neutrófilos atraídos hacia la mucosa por la alta concentración de IL-8.

Adicionalmente, evidenciamos un incremento en la concentración de IFN- $\gamma$  en los pacientes LCL, junto con un leve aumento de IL-17. Otros autores afirman que la acción conjunta de las citocinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  está asociada con el proceso de inflamación que se desarrolla en las lesiones (Castes *et al.*, 1996; Bacellar *et al.*, 2002), mientras que la IL 17 también se ha implicado en la defensa contra varios agentes intracelulares (Weaver *et al.*, 2007; Korn *et al.*, 2009), ya que contribuye en la producción de diversos mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  (Korn *et al.*, 2009) junto con el reclutamiento de los neutrófilos por parte de la IL-8, probablemente hacia las lesiones cutáneas, contribuyendo junto con los linfocitos T CD4+ del patrón Th1, en la activación de mecanismos leishmanicidas dando como resultado la resolución de la lesión.

El estudio de factores asociados a esta respuesta en la mucosa nasal, a través de métodos no invasivos, como el estudio con muestras de fluidos y secreción nasal puede aportar importante información de los mecanismos inmunopatológicos asociados, al igual que estudios realizados con biopsias y/o citologías, que pudiese tener valor diagnóstico y pronóstico. En conclusión, los pacientes con LCM mostraron la presencia de células inflamatorias (neutrófilos y eosinófilos) en su secreción nasal a diferencia de los pacientes con LCL e individuos sanos en lo que no se evidenció ningún grupo celular, que en conjunto con una alta producción de IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-17 sérico, pudiesen estar influyendo en la inmunopatogénesis de esta enfermedad.

#### Conflicto de intereses

Los autores del trabajo declaramos que para y durante la realización de este trabajo no se presentó ningún conflicto de intereses.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los pacientes, voluntarios sanos, personal médico y técnico pertenecientes a los Servicios de Dermatología Sanitaria Regionales por la cooperación en el desarrollo de este trabajo. Este trabajo fue financiado por la Universidad Central de Venezuela a través del CDCH N°PG-09-8736-2013/1.

#### REFERENCIAS

- Antonelli L. R. V., Dutra W. O., Almeida R. P., Bacellar O., Carvalho E. M. & Gollob K. J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* **101**: 226-230.
- Badolato R., Sacks D. L., Savoia D. & Musso T. (1996). *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp. Parasitol.* **82**: 21-26.
- Bacellar O., Lessa H., Schriefer A., Machado P., Jesus A. R. de, Dutra W. O., *et al.* (2002). Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. *Infect. Immun.* **70**: 6734-6740.
- Bennouna S., Bliss S. K., Curiel T. J. & Denkers E. Y. (2003). Cross-talk in the innate immune system: Neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.* **171**: 6052-6058.
- Boaventura V. S., Santos C. S., Cardoso C. R., de Andrade J., Dos Santos W. L. C., 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.
- Bocheńska-Marciniak M., Kupczyk M., Górski P. & Kuna P. (2003). The effect of recombinant interleukin-8 on eosinophils' and neutrophils' migration in vivo and *in vitro*. *Allergy.* **58**: 795-801.
- Bomfim G., Andrade B. B., Santos S., Clarencio J., Barral-Netto M. & Barral A. (2007). Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**: 854-859.
- Blanchard C. & Rothenberg M. E. (2009). Biology of the eosinophils. *Adv. Immunol.* **101**: 81-121.
- Convit J. (1974). Leishmaniasis. Similar clinical-immunological-pathological models. *Ethiop. Med. J.* **12**: 187-195.

- 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.
- Cabrera M., Rodríguez O., Monsalve I., Tovar R. & Hagel I. (2003). Variations in the serum levels of soluble CD23, nitric oxide and IgE across the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **88**: 145-151.
- Caceres-Dittmar G., Tapia F. J., Sánchez 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.
- Castés M., Cabrera M., Trujillo D., Rodas A., Scott D. & Blackwell J. (1996). Cytokine profile in human American cutaneous leishmaniasis. New dimensions in Parasitology. *Acta Parasitol. Turçica.* **20**: 45-57.
- Castés M., Trujillo D., Rojas M. E., Fernandez C. T., Araya L., Cabrera M., *et al.* (1993). Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* **26**: 233-238.
- Charmoy M., Auderset F., Allenbach C. & Tacchini-Cottier F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed Biotechnol.* **2010**: 719361.
- De Trez C., Magez S., Akira S., Ryffel B., Carlier Y. & Muraille E. (2009). iNOS-Producing Inflammatory Dendritic Cells Constitute the Major Infected Cell Type during the Chronic *Leishmania major* Infection Phase of C57BL/6 Resistant Mice. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000494.
- de Oliveira C. F., de Souza C. da S., Mendes V. G., Abreu-Silva A. L., Goncalves S. C. & Calabrese K. S. (2010). Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J. Infect. Dis.* **201**: 1933-1940.
- Diaz N. L., Arvelaez F. A., Zerpa O. & Tapia F. J. (2005). Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **31**: 114-117.
- Faria D. R., Gollob K. J., Barbosa J., Schriefer A., Machado P. R. L., Lessa H., *et al.* (2005). Decreased In Situ Expression of Interleukin-10 Receptor Is Correlated with the Exacerbated Inflammatory and Cytotoxic Responses Observed in Mucosal Leishmaniasis. *Infect Immun.* **73**: 7853-7859.
- Garside P. & Mowat A. M. (1995). Polarization of Th-cell responses: a phylogenetic consequence of nonspecific immune defence? *Immunol. Today.* **16**: 220-223.
- Geissmann F. (2007). The origin of the dendritic cells. *Nat. Immunol.* **8**: 558-560.
- Grimaldi G. Jr., Soares M. J. & Moriearty P. L. (1984). Tissue eosinophilia and *Leishmania mexicana mexicana* eosinophil interactions in murine cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **6**: 397-408.
- Heinzel F. P., Sadick M. D., Holaday B. J., Coffman R. L. & Locksley R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon-gamma or interleukin-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for the expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* **169**: 59-72.
- Jacobi H. H., Poulsen L. K., Reimert C. M., Skov P. S., Ulfgren A.-K., Jones I., *et al.* (1998). IL-8 and the Activation of Eosinophils and Neutrophils following Nasal Allergen Challenge. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **116**: 53-59.
- Jain S., Chodisetti S. B. & Agrewala J. N. (2011). CD40 Signaling Synergizes with TLR-2 in the BCR Independent Activation of Resting B Cells. *PLoS. ONE.* **6**:e20651.
- Kaye P. & Scott P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 604-615.
- Kolaczowska E. & Kubes P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 159-175.

- Korn T., Bettelli E., Oukka M. & Kuchroo V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**: 485-517.
- Maroof A., Beattie L., Kirby A., Coles M. & Kaye P. M. (2009). Dendritic Cells Matured by Inflammation Induce CD86-Dependent Priming of Naive CD8+ T Cells in the Absence of Their Cognate Peptide Antigen. *J. Immunol.* **183**: 7095-103.
- McFarlane E., Perez C., Charmoy M., Allenbach C., Carter K. C., Alexander J., et al. (2008). Neutrophils Contribute to Development of a Protective Immune Response during onset of Infection with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **76**: 532-541.
- Miranda M., Andrade H., Castro T., Oliveira A., Scherifer A., Machado P., et al. (2007). Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* **73**: 843-847.
- Mosmann T. R. & Coffman R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.
- Murray H. W., Berman J. D., Davies C. R. & Saravia N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet.* **366**: 1561-1577.
- Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 173-182.
- Oliveira W. N., Ribeiro L. E., Schrieffer A., Machado P., Carvalho E. M. & Bacellar O. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* **66**: 127-132.
- Pearson R. D., Uydess I. L., Chapman S. W., Steigbigel R. T. (1987). Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **81**: 735-739.
- Pimenta P. F., Dos Santos M. A. & De Souza W. (1987). Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J. Submicrosc. Cytol.* **19**: 387-395.

Recibido el 09/09/2014  
Aceptado el 27/11/2014