

# Cuantificación de niveles de INF- $\gamma$ – IL-13 y células T CD4+, CD8+ en pacientes con leishmaniasis tegumentaria con falla terapéutica

Quantifying levels of INF- $\gamma$  - IL-13 and CD4 + T cells, CD8 + in patients with therapeutic failure leishmaniasis

Amilcar Flores León<sup>1,a</sup>, Ernesto Rojas Cabrera<sup>2,b</sup>, Marisol Córdova Rojas<sup>2,c</sup>, Mary Cruz Torrico<sup>1,c</sup>, David Paz<sup>3,d</sup>

## Resumen

**Objetivos:** se realiza un estudio del estatus inmunológico, cuantificando el perfil de citoquinas Th1 (INF- $\gamma$ ) y Th2 (IL-13) y células T CD3+, CD4+ y CD8+ como variables que puedan brindar información sobre el vínculo y/o asociación a la falla terapéutica. **Métodos:** se cuantificó los niveles de INF- $\gamma$ , IL-13, CD4 + y CD8+ en tres grupos de estudio: a) Pacientes con LT y falla terapéutica (RESISTENTES), b) Pacientes tratados que respondieron al tratamiento de forma exitosa (SENSIBLES) c) Pacientes sanos (GRUPO CONTROL). **Resultados:** los resultados indican, que la respuesta específica inmune de los pacientes Resistentes y Sensibles esta polarizada hacia la respuesta TH1 y los valores de los Linfocitos T CD4+ y CD8+ estaban por debajo de los valores normales en los tres grupos de estudio. Los niveles de producción de INF- $\gamma$  fue mayor que la IL-13, siendo mas pronunciada en pacientes Resistentes que Sensibles en respuesta al Ag de Leishmania, la tipificación de las cepas que fueron aisladas de los pacientes resistentes, identificaron a: Leishmania brasiliensis y Leishmania guayanensis. **Conclusiones:** en relación a la falla terapéutica de los pacientes resistentes, estarían también involucrados los factores relacionados al parásito y otros factores extrínsecos al huésped.

**Palabras claves:** leishmaniasis cutánea; fracaso del tratamiento; citocinas; recuento de linfocito CD4; interferones.

## Abstract

**Objectives:** is a study of the immune status, quantifying the Th1 cytokine profile (INF- $\gamma$ ) and Th2 (IL-13) and CD3 + T cells, CD4 + and CD8 + as variables that can provide information on the link and / or association therapeutic failure. **Methods:** we quantified the levels of INF- $\gamma$ , IL-13, CD4 + and CD8 + in three study groups: a) patients with LT and therapeutic failure (RESISTANT), b) Treated patients who responded to treatment successfully (SENSITIVE ) c) healthy patients (CONTROL GROUP). **Results:** the results indicate that the specific immune response of resistant and sensitive patients is polarized toward the TH1 response and values of CD4 + T lymphocytes and CD8 + were below normal values in the three groups. The levels of INF- $\gamma$  production was higher than IL-13, being more pronounced in patients resistant to sensitive in response to Leishmania Ag, the typing of the strains that were isolated from patients resistant identified: Leishmania brasiliensis and guayanensis Leishmania. **Conclusions:** regarding treatment failure resistant patients, would also be involved factors related to the parasite and other extrinsic factors to the host.

**Keywords:** leishmaniasis, cutaneous; treatment failure; cytokines; CD4 lymphocyte count; interferons.

La leishmaniasis es una enfermedad que constituye una zoonosis endémica de las regiones tropicales y sub tropicales del mundo, causado por un parásito intra-macrófito del género Leishmania. Los parásitos se transmiten por la picadura de mosquitos hembras que se alimentan de sangre, causando diversas manifestaciones de la enfermedad en humanos, que va desde la forma cutánea benigna (auto curación) pasando por las formas diseminadas y difusas, hasta la forma más severa de la enfermedad como es la leishmaniasis visceral.

Existe tres formas clínicas dominantes de la enfermedad: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis Mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). Esta enfermedad es la causa de la morbi-mortalidad en varios países del mundo<sup>1-3</sup>. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la considera como la cuarta enfermedad más importante de las regiones tropicales. Casi 350 millones de personas viven en áreas endémicas y se calcula que 12 millones de individuos están infectados con el parásito, de los cuales 1,5 millones son casos

notificados en fechas recientes<sup>4</sup>.

En Bolivia la leishmaniasis es endémica en 7 de sus 9 departamentos, siendo la Leishmaniasis cutánea la forma clínica predominante, causada en la mayoría de los casos por *Leishmania braziliensis* (más del 85% de los casos), seguida de *L. (Leishmania) amazonensis* y *L. lainsoni* y algunos casos recientes por *L. guyanensis*<sup>5-7</sup>. Los dos departamentos sin casos notificados son Oruro y Potosí, por la altitud a la que se encuentran, límite geográfico para el hábitat del vector transmisor.

Varios factores, como los relacionados al parásito, especies de vectores, respuesta inmune del paciente, genética y factores ambientales tienen influencia sobre el éxito del parásito para producir la infección<sup>2</sup>.

La Leishmania es un parásito intracelular obligado que sobrevive y se replica predominantemente en macrófagos<sup>3,8</sup>. Por lo general, la infección por leishmania induce una reacción inmunitaria muy compleja cuyo espectro va desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específicos a través de células y anticuerpos, esta respuesta inmunitaria varía de acuerdo a diferentes factores. Como ser la especie de Leishmania que interviene en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad<sup>4</sup>.

El control de la infección y cura esta asociado con una polarización en la respuesta Th1, mientras que la no cura esta atribuido a una dominante respuesta Th2. Sin embargo, la regulación de la respuesta inmune frente a leishmania es com-

<sup>1</sup>Laboratorios de Investigación Médica (LABIMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBIMED), Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia.

<sup>3</sup>Hospital Dermatológico de Jorochito. Santa Cruz, Bolivia.

<sup>4</sup>Biólogo; <sup>5</sup>Médico especialista en medicina tropical; <sup>6</sup>Bioquímico; <sup>7</sup>Médico

\*Correspondencia a: Amilcar Flores León.

Correo electrónico: leonamilcar@hotmail.com

Recibido el 15 de mayo de 2013. Aceptado el 5 de junio de 2013

pleja y el dominio de la respuesta Th2 no explica completamente la no cura o formas reactivas de la enfermedad<sup>2,9</sup>.

En modelos experimentales (murinos) el resultado de la enfermedad depende del desarrollo de la respuesta inmune mediada por células y es fuertemente influenciada por la expansión de subconjuntos específicas de células T. En ratones resistentes a la infección (C57BL/6, CBA, y C3H/He), e infectados con *L. mayor* la autocuración de la lesión, esta asociada con la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) (respuesta TH1). Por el contrario, la infección con el mismo parásito en ratones susceptibles a la enfermedad (BALB/c), desarrolla la lesión que no se autocura, con producción de altos niveles de IL-4, IL-10 y otras citoquinas relacionadas a la respuesta TH-2<sup>10-12</sup>.

La IL-13 es un importante componente para la generación y mantenimiento de la respuesta inmune frente a la infección con *L. mayor*, sin embargo la sobreexpresión de IL-13 promueve la susceptibilidad en ratones resistentes a la infección<sup>11</sup>. En la Leishmaniasis se ha observado la activación de clones específicos de LT CD8<sup>+</sup> en respuesta a antígenos de leishmania que inducen una inmunidad protectora y un cambio en la respuesta temprana de Th1 a TH2. En seres humanos se piensa que linfocitos T CD8<sup>+</sup> juegan un papel crucial en la infección, se ha notificado un elevado número de células T CD8<sup>+</sup> en lesiones y sangre periférica durante la fase aguda de la infección y el proceso de eliminación de *Leishmania mayor* y *Leishmania mexicana*.

Al no existir estudios a nivel inmunológico sobre pacientes con leishmaniasis cutánea y fracaso terapéutico a medicamentos de primera línea, el equipo de investigadores realizó un estudio del estatus inmunológico, cuantificando el perfil de citoquinas Th1 (INF- $\gamma$ ) y Th2 (IL-13), CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> como variables que puedan brindar información sobre el vínculo y/o asociación a la falla terapéutica.

## Materiales y métodos

### Área de estudio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Investigación Médica (LABIMED) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBISMED) de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Simón, previa aprobación por el comité ético/científico de dicha Institución.

### Pacientes

Pacientes con antecedentes de Leishmaniasis, que acudieron al Centro de Salud de Tacopaya en el municipio de Villa Tunari- Cochabamba y Hospital Dermatológico del municipio de Jorochito de Santa Cruz, fueron reclutados previo consentimiento informado escrito.

### Grupos de estudio

Pacientes que han cursado la infección por leishmania fueron clasificados en tres grupos de estudio: Pacientes Resistentes al tratamiento, Pacientes Sensibles al tratamiento y Pacientes Sanos que viven en zonas endémicas (Grupo Control).

Los criterios de inclusión para estos grupos de estudio fueron los siguientes:

a) **Resistentes:** Grupo de pacientes (n=10) que presentan fracaso terapéutico, frente a medicamentos de primera línea (20mg/kg/peso), que al mes de administrar la última dosis del medicamento, al examen clínico se observa actividad en la lesión (úlceras, inflamación y bordes elevados) al Examen Parasitológico Directo (EPD) y Cultivo resultan ser positivos

b) **Sensibles:** Grupo de pacientes (n=10) con leishmaniasis tegumentaria confirmada que respondieron exitosamente al tratamiento específico con medicamentos de primera línea y que después del tratamiento muestran una lesión cicatrizada con una historia de infección no mayor a un año.

c) **Sanos:** Grupo de pacientes (n=10) que viven en la zona endémica sin antecedentes de leishmaniasis.

Pacientes con enfermedades crónicas, lesiones tegumentarias mixtas o sobre infectadas con otras patologías fueron descartados del estudio (criterios de exclusión).

### Antígenos y Mitógenos empleados

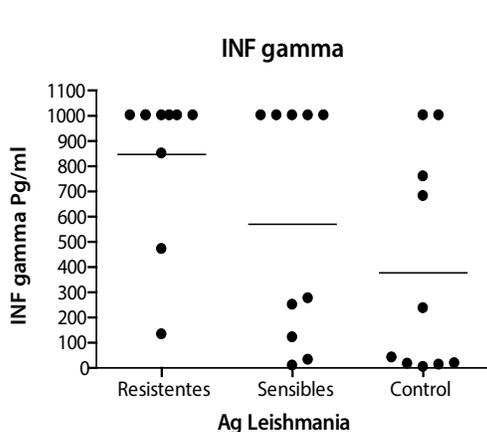
La obtención del antígeno soluble de Leishmania (ASL) fue a partir de Promastigotes de *Leishmania sp* en fase estacionaria de crecimiento, los cuales fueron lavados tres veces con fosfato buffer salino (PBS), y resuspendidos a una concentración de 10 millones de parásitos/mL. Posteriormente la suspensión fue sometida a shock térmico por ocho ciclos cortos de congelamiento y descongelamiento (nitrógeno líquido / baño maría a 36 °C) luego fue centrifugado a 9000 rpm por 30 minutos. La suspensión fue almacenada a -70 °C hasta su uso. La concentración de proteínas antigénicas fue determinada por el método de Bradford. *Staphylococcal Enterotoxina B* (SEB) (Sigma Aldrich) Mitógeno, empleado como control positivo en el cultivo celular, este tiene la capacidad de activar a las células T no específicas (súper antígeno).

### Recolección de muestras de sangre, aislamiento de células mono nucleares de sangre periférica y cultivo in vitro

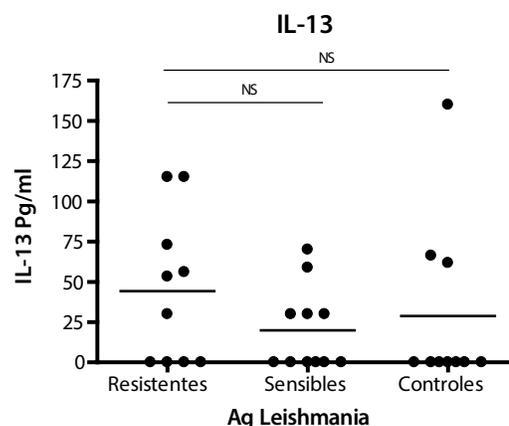
Sangre periférica (10 ml) fueron colectados en tubos heparinizados libres de endotoxinas. El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se realizó por centrifugación sobre un gradiente de densidad Nycopret (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway). PBMC (2x10<sup>6</sup> cels/mL) fueron cultivados por 6 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa, en RPMI 1640 con suero bovino fetal al 10% (SBF), 100 U penicilina/ml y 100  $\mu$ g de streptomocina (*Cambridge Bio Science*), para medir la producción de citoquinas en las diferentes condiciones: síntesis espontánea (control negativo de proliferación), en presencia de 20  $\mu$ l ASL (1 millón/ml) y 20  $\mu$ l SEB (10ng/mL) control positivo de proliferación. Posterior al cultivo, las células fueron centrifugadas y sobrenadantes fueron conservados a -70 °C para el análisis de citoquinas Th1 y Th2.

### Determinación de citoquinas

La INF- $\gamma$  y IL-13 fueron empleados como marcadores de respuesta Th1/Th2 respectivamente. Niveles de estas citoqui-



**Figura 1.** Producción de IFN- $\gamma$ : en presencia de Ag solubles de leishmania (ASL) por PBMC de pacientes con falla terapéutica (Resistentes  $n=10$ ) pacientes tratados exitosamente (Sensibles  $n=10$ ) y pacientes Controles ( $n=10$ ). Células fueron cultivadas por 6 días en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ASL. La medición de IFN- $\gamma$  se realizó por ELISA, los resultados son expresados como  $\pm$  SEMpg/ml y las diferencias estadísticas entre grupos son mostrados como: \*;  $p<0.05$  y \*\* $p<0.005$  (Mann Whitney U Test).



**Figura 2.** Producción de IL-13: en presencia de ASL por PBMC de pacientes con falla terapéutica (Resistentes  $n=10$ ), pacientes tratados exitosamente (Sensibles  $n=10$ ) y pacientes Controles ( $n=10$ ). Células fueron cultivadas por 6 días en presencia de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ASL. Los resultados de la medición de niveles de citoquinas por ELISA son expresados como  $\pm$  SEMpg/ml y las diferencias entre grupos son mostrados como: \*;  $p<0.05$  y \*\* $p<0.005$  (Mann Whitney U Test).

nas fueron medidos en los sobrenadantes del cultivo celular, con un ELISA (*sandwich enzyme linked immunosorbent assay*) para lo cual se empleó kits comerciales: Kit de IFN- $\gamma$  (R&D Systems, INC, Minneapolis, EEUU); Kit de IL-13 (ultrasensible de R&D Systems, INC, Minneapolis EEUU). El ensayo fue calibrado para detectar IFN- $\gamma$  e IL-13 dentro de un rango de 1000 a  $>8$  pg/mL y 4000 a  $>32$  pg/mL respectivamente.

#### Recuento de linfocitos T CD4+ y CD8+

PBMCs de los cultivos celulares de los 3 grupos de estudio, fueron separadas por centrifugación. Estas células (50  $\mu\text{l}$ ) fueron puestas en contacto con microesferas y anticuerpos monoclonales conjugados CD4+ y CD8+ en solución tamponada. Una vez fijadas las células se procedió a realizar la lectura por citometría de flujo, (10 000 eventos por muestra) usando el equipo FACSCount Becton Dickinson. El recuento absoluto de linfocitos T CD4+ y CD8+ se realizó con el Kit BD FACS Count Reagents (Cat. No 340167 BD Biociences) siguiendo

las especificaciones del kit.

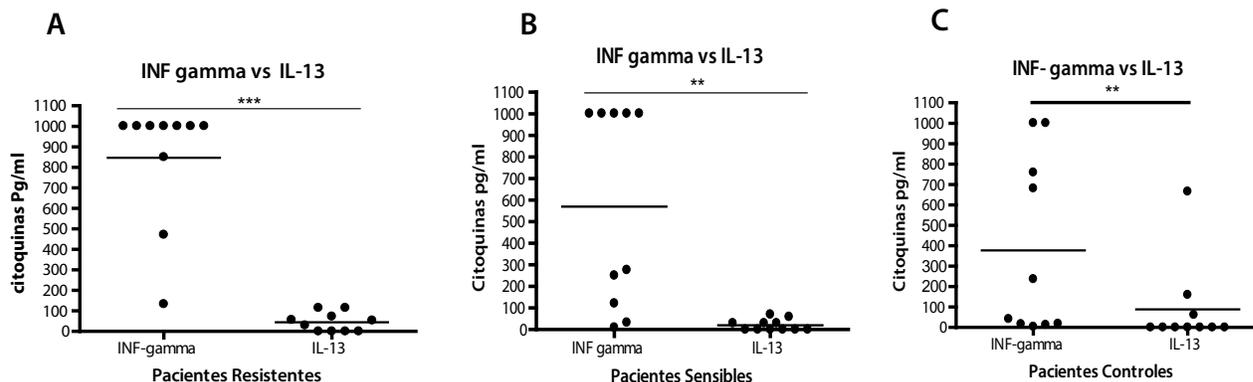
#### Expresión de resultados y análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como medias aritméticas  $\pm$  SEM. Comparación de concentraciones de citoquinas entre grupos de pacientes Resistentes, Sensibles y Controles así como el análisis de células CD4+ y CD8+, fueron desarrollados con Mann Whitney test. El análisis estadístico fue conducido usando Graph Pad Prism software (GraphPad Prism 4 San Diego, CA, EEUU).

#### Resultados

Niveles de IFN- $\gamma$  producidos por PBMC de pacientes Resistentes indican su nivel de activación de la respuesta Th1, la cual está más activada en comparación con pacientes sensibles y controles.

La concentración de IFN- $\gamma$  fue empleada como marcador



**Figura 3.** Producción de IFN- $\gamma$  e IL-13 en respuesta a ASL (50  $\mu\text{g/ml}$ ) por PBMC de pacientes con falla terapéutica (Resistentes  $n=10$ ), pacientes tratados exitosamente (Sensibles  $n=10$ ) y pacientes Controles ( $n=10$ ). Los resultados de la medición de niveles de citoquinas por ELISA son expresados como  $\pm$  SEMpg/ml y las diferencias entre grupos son mostrados como: \*;  $p<0.05$  y \*\* $p<0.005$  (Mann Whitney U Test).

**Tabla 1.** Características generales del grupo estudio y grupo control (n=108).

Parámetro Inmunológico	Resistentes (n=9) X±DE	Sensibles (n=11) X±DE	Controles (n=3) X±DE	Valor normales de referencia
Células CD4+ (nº de cel.)	161,6 ± 94,83 (NS)	154,3 ± 123,5	319 ± 240,8	597 a 1500
Células CD8+ (nº de cel.)	212,3 ± 175 (NS)	261,4 ± 151,1	335 ± 104,1	300 a 800
Relación CD4+/CD8+ (nº de cel.)	0,760	0,590	0,95	1,8

de la respuesta Th1. Estos niveles de citoquinas fueron medidos en sobrenadantes de cultivo celular por ELISA.

La **figura 1** muestra que PBMC estimuladas con Ag soluble de *Leishmania* sp. (ASL), de pacientes Resistentes producen mayor INF- $\gamma$  que pacientes Sensibles y Controles (846,2 ± 95,24; 569,6 ± 146,1 y 377,4 ± 136,6 pg/ml respectivamente), estos valores muestran los diferentes niveles de producción de INF- $\gamma$  entre los grupos de estudio, donde se observa una diferencia no significativa entre pacientes Resistentes y Sensibles y hallándose diferencia estadísticamente significativa de producción de citoquinas Th1 al comparar con el grupo Control ( $p < 0,05$ ).

En general, los niveles de INF- $\gamma$  producidos por PBMC de pacientes Resistentes indican su nivel de activación de la respuesta Th1, la cual está más activada en comparación con los pacientes Sensibles y Controles, si bien esta mayor producción de INF- $\gamma$ , refleja una respuesta activa y específica frente a *leishmania*, esta no explica del porque ocurrió la falla terapéutica.

**Bajos niveles de IL-13 producidos por PBMC de pacientes Resistentes indican una polarización de la respuesta inmune hacia el tipo TH1.**

Niveles de IL-13 fue empleada como marcador de la respuesta TH2. Estos niveles de citoquinas fueron medidos en sobrenadantes de cultivo celular por ELISA

La **figura 2**, muestra la estimulación de PBMC de los grupos Resistentes, Sensibles y Controles, con ASL (Antígeno soluble de *leishmania*), los resultados muestran que los tres grupos de estudio producen bajos niveles de IL-13 y/o hasta no detectables, estas diferencias, no son significativas en términos estadísticos (44,26 ± 14,58; 19,91 ± 7,8 y 28,81 ± 16,84 pg/ml respectivamente). Lo cual indica que las PBMC de los tres grupos de estudio no producen una respuesta Th2 en respuesta al ASL.

La **figura 3** muestra la comparación de los niveles de producción de INF- $\gamma$  e IL-13 por PBMC de los tres grupos de estudio, estimuladas con ASL. La **figura 3a** muestra los niveles de producción de INF- $\gamma$  (846,2 ± 95,24 pg/ml) e IL-13 (44,26 ± 14,58 pg/ml) por PBMC de pacientes Resistentes, donde se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de producción de INF- $\gamma$  e IL-13 ( $p = 0,005$ ). Este mismo comportamiento se observó en pacientes Sensibles (**figura 3b**) donde los niveles de INF- $\gamma$  fueron superiores a los niveles de IL-13 producidos (569,6 ± 146,1; 19,91 ± 7,8 pg/ml respectivamente), diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,05$ ). La **figura 3c** muestra una mayor producción de INF- $\gamma$  que IL-13 por PBMC de pacientes controles estimulados con ASL (377,4 ± 136,6; 28,81 ± 16,84 pg/ml respectivamente) diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,05$ ).

Estos resultados confirman que la respuesta inmune de pacientes Resistentes y Sensibles está polarizada a favor de una respuesta Th1 siendo más pronunciada esta diferencia en pacientes Resistentes y que los niveles detectados de IL-13 corresponden a niveles basales normales.

**Células T CD4+ y CD8+ se encuentran por debajo de los valores normales de referencia en pacientes Resistentes y sensibles, lo cual es un indicador de una inmunodeficiencia del sistema inmune.**

Se observó inmunodeficiencia celular en pacientes Resistentes y Sensibles, caracterizada por la disminución de los linfocitos CD4+ (células T Helper), CD8+ (células T supresoras/citotóxicas) y la relación CD4/CD8, en comparación con los valores normales de referencia. Por otro lado se observó que los linfocitos T CD4+ y CD8+ se encuentran próximos a los valores normales de referencia en los pacientes sanos (controles), estos datos muestran que los pacientes resistentes y sensibles presentan algún grado de inmunodeficiencia de su sistema inmune.

## Discusión

El objetivo de la investigación fue valorar si el patrón de citoquinas producidas por PBMC de pacientes con *leishmaniasis* cutánea, está asociada a la respuesta clínica del tratamiento con antimoniales entre pacientes con falla terapéutica (Resistentes) y pacientes que respondieron al tratamiento específico (Sensibles). Conjuntamente al perfil de citoquinas, evaluamos y comparamos linfocitos T CD4+ y CD8+ y su grado de implicancia en el proceso de la falla terapéutica.

El desarrollo de la inmunidad protectora contra diferentes formas de *leishmaniasis* humana es usualmente asociado con la producción de INF- $\gamma$  que son inducidos por células T específicas para *leishmania*. Esta respuesta no siempre indica protección porque esta infección está asociada a una respuesta de tipo Th2, la cual conduce a la persistencia de la enfermedad como la forma crónica de *leishmania* cutánea no curada o *leishmaniasis* mucosa donde niveles de INF- $\gamma$  permanecen elevados<sup>10</sup>.

En este estudio Antígeno soluble de *leishmania* sp., fue empleado para estimular PBMC de pacientes de los tres grupos de estudio y valorar los niveles de INF- $\gamma$ , los sobrenadantes. Los resultados indican que todos los grupos de estudio mostraron altos niveles de producción de INF- $\gamma$ , siendo el grupo de pacientes resistentes que mostraron mayor producción, inducido por células T (fig. 1). Aunque la correlación de INF- $\gamma$  con la protección no está aceptada universalmente, existe evidencia que INF- $\gamma$  es la principal citoquina de la respuesta TH1 y está implicada en la inmunidad protectora contra *leishmaniasis*<sup>10</sup>. Respecto a la producción de INF- $\gamma$  en pacientes con-

troles, muestran niveles de INF- $\gamma$  detectados en respuesta al antígeno soluble de leishmania, sin embargo algunos autores mencionan, que existen otros factores asociados que inducen la producción, como la pre-exposición a organismos con antígenos que ocasionan reacciones cruzadas (ie. *Mycobacterium sp.*)<sup>10</sup>. Sin embargo, la producción de INF- $\gamma$  por células T no relacionadas a leishmania de personas sanas no está claro<sup>10,13</sup>.

Con respecto a IL-13, diferentes estudios en modelos murinos de leishmaniasis cutánea muestra ser importante en la susceptibilidad y asociación de la respuesta relacionada a la no cura en *L. mayor* y *L. mexicana* y que además contribuiría a producir la enfermedad. IL-13 reduce la respuesta de INF- $\gamma$ , así como la activación de macrófagos desencadenando el éxito de la infección<sup>14</sup>.

Nuestros datos muestran que niveles de IL-13 detectados en pacientes resistentes son relativamente más altos (diferencia estadísticamente no significativa) y que estos decrecen en pacientes Sensibles (fig.2), otros autores coinciden con los resultados, donde pacientes con previo tratamiento fallido muestran elevados niveles de IL-13 mRNAs detectados y decrece significativamente en pacientes que respondieron al tratamiento<sup>15</sup>.

En general, encontramos que niveles de INF- $\gamma$  decrecen significativamente en pacientes que respondieron al tratamiento (Sensibles) pero no en pacientes con falla terapéutica (Resistentes). Entonces basados en nuestros datos es difícil señalar una preferencia a la respuesta Th2 como único elemento causante de la resistencia al tratamiento en leishmania Tegumentaria, parecería que ambas citoquinas Th1 y Th2 contribuyen a esta patología.

Con respecto a la medición de Linfocitos T CD4+ (células T Helper), CD8+ (células T supresoras/citotóxicas) en pacientes resistentes y sensibles al tratamiento, se pudo observar que los valores están por debajo de los estándares normales de referencia (tabla 1), contrariamente los valores de CD4+ y CD8+ de pacientes sanos (controles) se encuentran próximos a los valores normales de referencia. Estos datos sugieren que leishmania podría modular la respuesta inmune para favorecer la infección. Sin embargo algunos autores indican que pacientes infectados con *L. braziliensis* presenta una mayor proporción de células T CD4+, en comparación de células T CD8+, durante la infección activa y en el proceso de curación<sup>15,16</sup>, contrariamente a los resultados reportados en nuestro estudio donde ambos CD+ en pacientes resistentes y

sensibles, se encuentran con valores inferiores a los estándares normales.

Maurer et al<sup>15</sup>, indica que una corta permanencia del paciente (menor a 72 meses) en áreas endémicas para la transmisión de la enfermedad, es un factor de riesgo para la falla del tratamiento, indicando que la inmunidad protectora se incrementa con el tiempo de residencia en áreas donde la enfermedad es endémica. Porque la intensa producción de INF- $\gamma$  resulta en no control del parásito, más bien en la destrucción del tejido. En base a lo mencionado podríamos decir que nuestra población con falla terapéutica, tienen antecedentes de ser personas migrantes en las zonas endémicas para esta enfermedad ingresando solo por periodos cortos de tiempo (datos no mostrados) por lo que podríamos pensar que este factor también podría condicionar el fracaso terapéutico en estos pacientes, además podrían intervenir otros factores como: Infecciones tratadas tempranamente (menor a 5 semanas antes del inicio de la infección), múltiples lesiones, edad, y especies de parásitos<sup>17</sup>.

En conclusión, la respuesta específica inmune de pacientes Resistentes y Sensibles está polarizada hacia TH1 sin embargo esta polarización no explica del porque existe falla o fracaso terapéutico. Valores de linfocitos T CD4+, CD8+ indican una inmunodeficiencia en ambos grupos de estudio, indicando que el parásito modula la respuesta inmune el huésped ya que pacientes sanos muestran valores de CD4+ y CD8+ cercanos a los valores normales de referencia. Estudios de Biología Molecular, demostró una predominancia de la cepa *L. braziliensis* (datos no mostrados).

Los resultados no explican en su totalidad porque ocurrió la falla terapéutica, hipotéticamente se estaría pensando en factores relacionados a la cepa del parásito, tiempo de permanencia de los pacientes en las regiones endémicas para la enfermedad.

**Agradecimientos:** Agradecemos a la Agencia de Cooperación Sueca (ASDI), y a la DICyT (Dirección de Ciencias y Tecnología) - Proyecto Concursable FC25 por hacer posible la ejecución de este trabajo de investigación.

**Conflictos de interés:** los autores declaramos que no existe conflicto de intereses.

## Referencias bibliográficas

1. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 2): 143-53.
2. Muller I, Hailu A, Choi BS, Abebe T, Fuentes JM, Munder M, et al. Age-related alteration of arginase activity impacts on severity of leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2(5): e235.
3. Nogueira MF, Goto H, Sotto MN, Cuce LC. Cytokine profile in Montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008; 50(6): 333-7.
4. Hernández-Ruiz J, Becker I. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Pública de México* 2006; 48(5): 430-9.
5. Rojas E, Parrado R, Delgado R, Reithinger R, García AL. Leishmaniasis in Chapare, Bolivia. *Emerg Infect Dis* 2009; 15(4): 678-80.
6. García AL, Parrado R, Rojas E, Delgado R, Du-jardin JC, Reithinger R. Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(5): 704-11.
7. Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78(2): 210-1.
8. Charmoy M, Megnekou R, Allenbach C, Zweifel C, Perez C, Monnat K, et al. Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. *J Leukoc Biol* 2007; 82(2): 288-99.
9. Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch

in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008; 21(5): 483-8.

10. Alimohammadian MH, Jones SL, Darabi H, Riazirad F, Ajdary S, Shabani A, et al. Assessment of interferon-gamma levels and leishmanin skin test results in persons recovered for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(1): 70-5.

11. Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, McKenzie AN. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2000; 164(3): 1458-62.

12. Ponte-Sucre, A. Modulación de la expresión del asa de regulación Hierro libre-Óxido nítrico

sisteta de células dendríticas por quelantes de Hierro. *Archivos Venezolanos de farmacología y Terapéutica* 2006; 25 (1): 11-17.

13. Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2010; 130(5): 1329-36.

14. Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Lozano C, Valderrama L, Saravia NG, McMahon-Pratt D. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. *Eur J Immunol* 2010; 40(10): 2816-29.

15. Maurer-Cecchini A, Decuypere S, Chappuis F,

Alexandrenne C, De Doncker S, Boelaert M, et al. Immunological determinants of clinical outcome in Peruvian patients with tegumentary leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Infect Immun* 2009; 77(5): 2022-9.

16. Wanasen N, Xin L, Soong L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *Int J Parasitol* 2008; 38(3-4): 417-29.

17. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 223-31.