

Linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en la leishmaniasis cutánea

Joselín Hernández-Ruiz, M en C,⁽¹⁾ Ingeborg Becker, Dra en Inmunol.⁽¹⁾

Hernández-Ruiz J, Becker I.
Linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en la leishmaniasis cutánea
Salud Publica Mex 2006;48:430-439.

Resumen

Objetivo. Examinar la bibliografía relacionada con la participación de los linfocitos T CD8⁺ en la reacción inmunitaria a especies de *Leishmania* causantes de leishmaniasis cutánea. En esta enfermedad se ha resaltado la intervención de macrófagos, células dendríticas, NK y células T CD4⁺; sin embargo, es poco lo que se conoce de las células T CD8⁺. Los trabajos en modelos murinos señalan que la participación de las células CD8⁺ sucede a través de la producción de IFN-gamma, aunque su capacidad citotóxica puede desempeñar una función importante, como lo demuestran los hallazgos en seres humanos. La forma como se activan las células citotóxicas CD8⁺ es un enigma. Es posible que las células dendríticas realicen esa labor a través de mecanismos que incluyen transpresentación de antígenos. Comprender la contribución de este subtipo celular en la respuesta inmunitaria a *Leishmania* aportará novedosos conocimientos sobre la fisiopatogenia de la leishmaniasis, lo cual hará posible desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para esta parasitosis.

Palabras clave: leishmaniasis cutánea; linfocitos T CD8⁺; reacción inmunitaria; citotoxicidad; apoptosis

Hernández-Ruiz J, Becker I.
CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis.
Salud Publica Mex 2006;48:430-439.

Abstract

Objective. Review of the literature on the role of CD8⁺ T cell in the immune response against *Leishmania* species that cause cutaneous leishmaniasis. The role of macrophages, dendritic cells, CD4 T cells and NK cells has been extensively analyzed in leishmaniasis, yet very little knowledge has been gained on CD8⁺ T cells in this disease. Murine models of leishmaniasis suggest that CD8⁺ T cells participate through IFN γ production, yet their cytotoxic capacity may also play a crucial role, as has been found in human disease. It is an enigma what mechanisms underlie the CD8⁺ T cell activation. It is possible that dendritic cells activate CD8⁺ T cells through mechanisms that include antigen transpresentation. A better understanding of CD8⁺ T cells in the immune response against *Leishmania* will undoubtedly provide new insights into the physiopathogenesis of the disease that could lead to new therapeutic approaches against leishmaniasis.

Keywords: cutaneous leishmaniasis; T CD8⁺ lymphocytes; immune response; cytotoxicity; apoptosis

La leishmaniasis es una zoonosis parasitaria multifacética secundaria a la infección por un protozoo del género *Leishmania* que puede afectar a los seres humanos y otras especies de mamíferos.¹ La Organización Mundial de la Salud la considera la cuarta

enfermedad más importante en el trópico.² 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 fecha reciente.^{2,3}

(1) Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México.

Aunque se han realizado progresos en el diagnóstico y se ha desarrollado una variedad de inmunoterapias y quimioterapias para el tratamiento de esta enfermedad, en los últimos años se ha observado un incremento de la incidencia de leishmaniasis en América Latina y existen nuevos informes en zonas no endémicas que constituyen un problema creciente.⁴ La ausencia de medidas de control de la enfermedad, además del surgimiento de resistencia a los fármacos Pentostam y Glucantime,^{5-7,3} sumado al alto costo que supone la institución de medidas de control de los vectores que transmiten estos parásitos y el riesgo ecológico que ello conlleva, exigen esfuerzos dirigidos a desarrollar un conocimiento más profundo de la relación hospedero-parásito para idear posibles conductas de control.

La forma promastigote del parásito se transmite por la saliva de dípteros del género *Lutzomyia* para el nuevo mundo y *Phlebotomus* para el viejo mundo, los cuales inoculan los parásitos al picar la piel de los mamíferos. En el hospedero vertebrado, las especies de *Leishmania* son parásitos intracelulares obligados y viven y se multiplican dentro de un compartimiento fagolisosómico de macrófagos. Para sobrevivir en este espacio ácido, la forma amastigote debe: a) resistir la digestión por múltiples hidrolasas y peptidasas activas, b) asegurar la consecución de nutrientes y c) eludir el sistema inmunitario.⁸ De acuerdo con la especie, el parásito o el macrófago parasitado pueden extenderse y llevar la infección a distintos órganos, lo que induce varias entidades clínicas (cutánea localizada, cutánea difusa, mucocutánea y visceral).¹

La leishmaniasis cutánea es el resultado de la multiplicación de *Leishmania* en los fagocitos de la piel. Se debe sobre todo a los miembros del complejo *L. mexicana*: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) venezuelensis* y los del complejo de *L. braziliensis*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) guyanensis* en el nuevo mundo, y *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopicum* en el viejo mundo.⁹

La leishmaniasis cutánea por *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. aethiopicum* puede presentarse en forma bipolar y las consecuencias son las formas cutánea localizada (LCL) y cutánea difusa (LCD). La primera se considera la forma benigna y se caracteriza por una ulceración pequeña y única (según sea el número de picaduras del vector) que tiende a la curación espontánea; el polo opuesto lo representan los pacientes con LCD, en la cual el parásito se disemina por vía linfática y crea múltiples nódulos;¹⁰ es la forma más grave y progresiva de la anormalidad. Al parecer, el contraste de los cuadros clínicos radica en diferencias de la respuesta inmunitaria precipitada en el hospedero. *L. bra-*

ziliensis también puede ocasionar una LCL, con úlceras que no siempre son pequeñas y únicas y puede, de forma adicional, causar una tercera forma de leishmaniasis denominada mucocutánea (LMC), la cual provoca lesiones metastásicas graves en las membranas mucosas del rostro.

Reacción inmunitaria en la leishmaniasis

El traumatismo secundario a la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que supone la migración de diferentes células, en especial macrófagos y linfocitos, hacia el sitio de la lesión con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Por lo general, la infección por *Leishmania* induce una reacción inmunitaria muy compleja que varía de acuerdo con los diferentes factores. Según sean la especie de *Leishmania* que interviene en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y su cronicidad, se observa un espectro de respuestas inmunitarias, desde mecanismos de inmunidad innata hasta mecanismos de inmunidad específica a través de células y anticuerpos. La respuesta de las células T se ha evidenciado a través de reacciones de hipersensibilidad tardía y proliferación de linfocitos *in vitro* en presencia de antígenos de *Leishmania*. En términos generales, se ha identificado una intensa reacción mediada por células T para la forma LCL y ausencia de ella en la forma LCD,¹¹ aunque ambos padecimientos desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la infección y se mantiene durante el curso del trastorno y desaparece sólo después de la eliminación de la mayoría de los parásitos.

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y según sean el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células T CD4⁺ y CD8⁺ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes.^{12,13} Las citocinas de tipo Th1, como IFN-gamma y TNF-alfa, participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos IgG1 e IgG3 en seres humanos (IgG2a en ratones), mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata.¹⁴

En la leishmaniasis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la cura-

ción, en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección.¹⁵ Tal vez por esa razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y curación o susceptibilidad y patogenia (figura 1). Por otro lado, en la LMC se ha descrito el patrón de citocinas como una mezcla de los tipos Th1 y Th2 con buenos niveles séricos de IL-2, IFN-gamma, TNF-alfa e IL-5.¹¹ Se ha señalado que el padecimiento se presenta en realidad por una sobreactivación de la respuesta inmunitaria al presentar bajos niveles de IL-10 y que la curación depende más de la relación entre las citocinas producidas y menos de la mera presencia o ausencia de citocinas en particular.¹¹

En este sentido, la participación de las células de la reacción inmunitaria innata, como células dendríticas (DC), NK y macrófagos, es motivo de ardua investigación. Se sabe que la producción de IFN-gamma, IL-12, IL-10 y TGF- β por estas células en respuesta a *Leishmania* puede modificar en grado notable la respuesta inmunitaria.¹⁶

Linfocitos T citotóxicos CD8⁺

Los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ cumplen un papel central en la defensa inmunitaria, en particular contra cé-

lulas infectadas por virus, bacterias y protozoos;¹⁷ además, se han relacionado con la eliminación de algunas células tumorales y células con MHC I incompatible en trasplantes. De manera adicional, las células T CD8⁺ participan en la patogenia de una amplia variedad de enfermedades.¹⁸ Su función efectora se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas. Para lograr su función citotóxica, las células T CD8⁺ emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina, la cual es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que resulta en el colapso del potencial de membrana; sin embargo, su papel más importante tal vez sea servir de paso a otras moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas; una de ellas, la granzima B, activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas. La expresión en membrana de FasL/CD95L media el otro mecanismo citotóxico e induce la trimerización de su receptor Fas/CD95 en las células blanco para inducir apoptosis a través de la activación de la caspasa 8.¹⁹

Aunque en menor magnitud de lo que ocurre con los linfocitos T CD4⁺, otro mecanismo de participación de las células T CD8⁺ es la liberación de citocinas, como IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10.²⁰ El patrón de citocinas, así como las diferencias en la capacidad migratoria, han

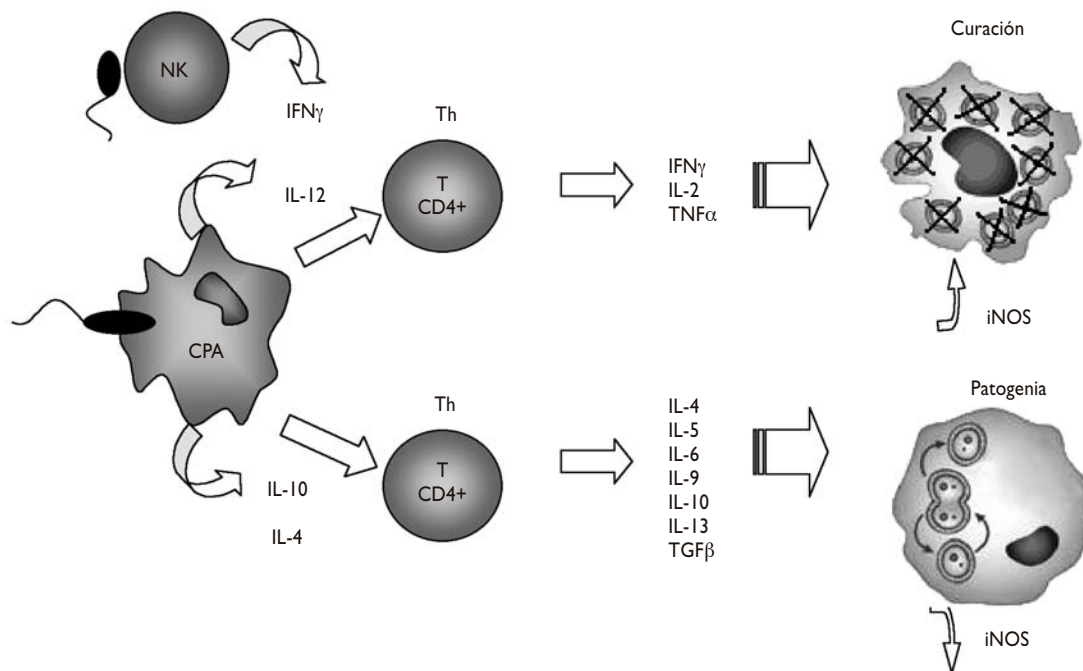


FIGURA 1. REACCIÓN INMUNITARIA A LEISHMANIA. EL MODELO MURINO DE LA INFECCIÓN SEÑALA QUE LA SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA AL PATÓGENO DEPENDEN DEL PATRÓN DE CITOCINAS EXPRESADO POR LOS LINFOCITOS T

señalado la existencia de dos tipos de linfocitos T CD8+: Tc1 y Tc2, tal y como se ha observado en los linfocitos T CD4+ Th1 y Th2.²¹ Además, se reconoce la existencia de linfocitos T CD8+ supresores, los cuales intervienen en la regulación de la reacción inmunitaria.²²

La respuesta específica de las células T CD8+ contra un patógeno se inicia a través del reconocimiento de antígenos presentados de modo adecuado por moléculas MHC I y señales derivadas de coestimulación, sobre todo a través de CD40.^{23,24} Cada una de estas células tiene más de 15 divisiones para producir una progenie de más de 104 en siete días de estimulación antigénica.²⁵ Pese a ello, esta respuesta no es del todo independiente de otros tipos celulares. Las células T CD4+ y las DC se han referido en una adecuada respuesta de las células T CD8+, aunque su participación no se ha entendido por completo.²⁶ Si bien sólo las CPA especializadas pueden efectuar una adecuada coestimulación a la célula T CD8+, en la mayoría de los casos el blanco final no son siempre estas mismas CPA.²⁴ De esta manera, es preciso un mecanismo que permita activar a las células T CD8+ para inducir su expansión clonal, el desarrollo de su función efectora y la generación de memoria. Para ello se ha señalado que existe un proceso regulado de cooperación entre las células T CD8+, CD4+ y DC.

El modelo planteado hasta el momento sobre la participación de DC en la activación de células T CD8+ señala que las DC capturan el antígeno por varias vías y pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Con posterioridad lo procesan y presentan a través de MHC II a las células T CD4+, las cuales sobrerregulan la expresión de CD40L y, mediante la interacción con CD40, activan o inducen a las DC para estimular la respuesta de células T CD8+ vírgenes que reconocen el antígeno MHC I en las DC (figura 2).²⁷⁻²⁹

Es posible que algunas células apoptóticas posean CD40L y de esta manera puedan activar de forma directa a las DC sin la presencia de células CD4+. De esta forma, las DC tendrían la capacidad de activar las células T CD8+ específicas para los antígenos presentados. Estas células apoptóticas pueden provenir de células T CD40L+ recién activadas que sufren apoptosis una vez que han ejercido su función efectora en un tejido inflamado, o también bajo infección con virus proapoptóticos como el VIH.³⁰ Por el contrario, si estas células apoptóticas son CD40L- y no existe otra célula que provea esta señal, la DC se halla en un estado semi-maduro, en el cual la presentación de antígeno crea estados de tolerancia como delección clonal, anergia o

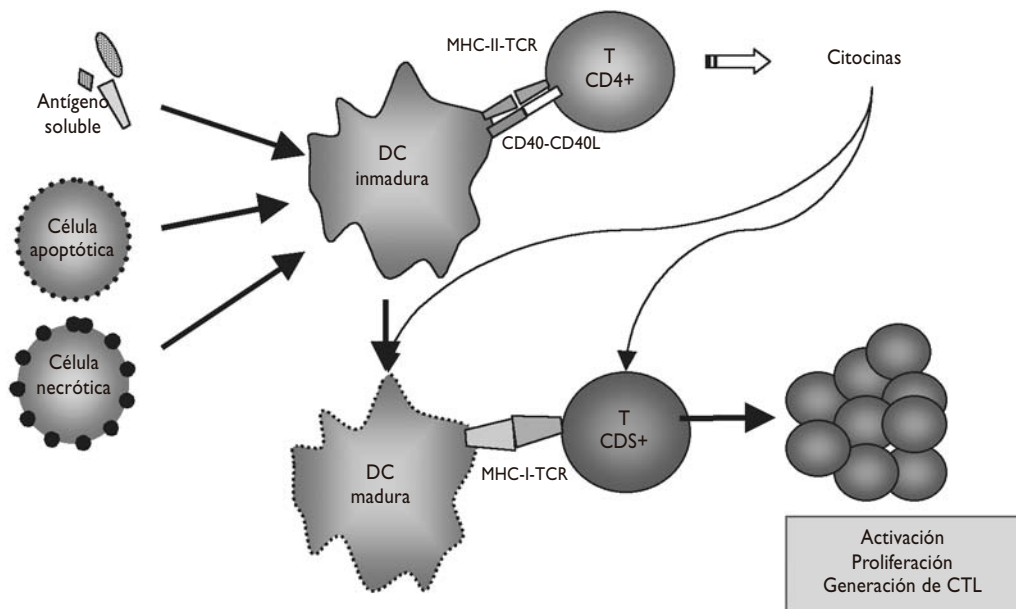


FIGURA 2. INTERACCIÓN DC-CD4-CD8. PARA LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ SE REQUIERE EL CONCIERTO COORDINADO DE ESTOS TRES TIPOS CELULARES

células regulatorias.³¹ Este mecanismo participa en la tolerancia hacia autoantígenos y quizá también en la baja respuesta hacia antígenos de parásitos que evaden la reacción inmunitaria y regulan en sentido negativo la respuesta de los linfocitos T CD8⁺.¹⁷

Participación de las células CD8⁺ en la leishmaniasis

Algunas evidencias sugieren un papel importante de las células T CD8⁺ en la respuesta inmunitaria a los parásitos, por acción directa de mecanismos citotóxicos o a través de la producción de IFN-gamma y TNF-alfa, que son citocinas activadoras de macrófagos y favorecen por tanto la muerte de parásitos intracelulares.^{17,32-34}

En la leishmaniasis, la activación de células T CD8⁺ se ha relacionado con la remisión. De modo inicial se pensó que su participación se restringía a la reinfección, ya que los ratones C57BL/6 (de cepa resistente) deficientes en microglobulina $\beta 2$ o CD8 mantienen su capacidad para resolver la infección,³⁵ al igual que los ratones tratados con anticuerpos anti-CD8.³⁶ Sin embargo, cuando se inocula el parásito en dosis bajas (~100 promastigotes) y por vía intradérmica, como en la infección natural, se requieren las células CD8⁺ para el control de la infección primaria con *L. major*³⁷ y su función parece intervenir en un cambio de respuesta temprana, de Th2 a Th1.³⁸ En todo caso, se reconoce que la infección por cualquier vía lleva a la activación de clonas específicas de linfocitos T CD8⁺³⁹ y, de manera notable, en respuesta a antígenos de *Leishmania* que inducen inmunidad protectora.^{40,41}

En los seres humanos se piensa que los linfocitos T CD8⁺ juegan un papel crucial en la infección. Se ha notificado un elevado número de células T CD8⁺ en lesiones y sangre periférica durante la fase aguda de la infección y el proceso de eliminación de *L. major*⁴²⁻⁴⁵ y *L. mexicana*.⁴⁶ Los pacientes infectados con *L. braziliensis* presentan una mayor proporción de células T CD4⁺, en comparación con las CD8⁺, durante la infección activa y en el proceso curativo esta relación cambia hasta casi llegar al equilibrio al incrementarse el número de linfocitos T CD8⁺.⁴³ En otro estudio se reconoció que las lesiones de individuos con LCL también infectados con *L. braziliensis* exhiben un gran porcentaje de linfocitos T en apoptosis, y con mayor frecuencia en linfocitos T CD8⁺ que en linfocitos T CD4⁺. Por el contrario, las lesiones de personas con curación espontánea mostraron muy bajo porcentaje de células T CD8⁺ en apoptosis.⁴⁷ De manera adicional, se descri-

bió un alto porcentaje de linfocitos T CD8⁺ reactivos a *Leishmania* en los infiltrados inflamatorios y bajo porcentaje en sangre.⁴⁴ De modo conjunto, estos hallazgos demuestran que los linfocitos T CD8⁺ participan de forma activa y promueven la curación. Sin embargo, en el caso de la infección por *L. braziliensis*, la cronicidad de la infección parece definirse por la exacerbación de la respuesta celular.^{48,49} Al parecer, los linfocitos T CD8⁺ participan en la regulación de la reacción al correlacionar la elevada frecuencia de linfocitos T CD8⁺CD69⁺ con el tamaño reducido de la lesión generada por el test de Montenegro.⁵⁰

Experimentos recientes realizados con células mononucleares de sangre periférica humana han demostrado que la infección por *L. major* se correlaciona con la producción de IFN γ apoyado por IL-12, lo cual precipita una respuesta Th1. IL-10 se presenta en baja cantidad y al parecer regula la producción de IFN γ .^{45,51,52} El porcentaje de células T CD8⁺ no se altera luego de siete días de exposición a *Leishmania*, si bien la proliferación celular así como la producción de IFN γ disminuyen en gran proporción cuando se bloquea la presentación de antígeno por HLA-I.⁵² Esto señalaría que la activación de linfocitos T CD8⁺ es vital en la producción de IFN γ . Este modelo también demuestra la participación de los linfocitos T CD8⁺, aunque falta por confirmar su proliferación frente a antígenos de *Leishmania* y determinar los mecanismos efectores que desarrollan.

La información disponible describe la activación de clonas específicas de linfocitos T CD8⁺ y evidencia su participación en las respuestas que conducen a la curación, sea en ratones o en seres humanos. Si se piensa en la capacidad heterogénea de los linfocitos T CD8⁺, es posible que también intervengan en la cronicidad de la infección, no sólo al exacerbar el daño en el tejido, como en el caso de la LMC por *L. braziliensis*, sino al originar citocinas inhibitoras como IL-10 o TGF β (figura 5), que podrían generar un estado anérgico ante grandes cantidades de antígeno, como se ha sugerido en el caso de la LCD.⁸⁵ Se han descrito varios subtipos de linfocitos T que expresan el marcador CD8⁺ y cuentan con características inhibitoras dependientes e independientes de anticuerpo,²² si bien estos subtipos de linfocitos T CD8⁺ aún no se han estudiado en la leishmaniasis, pero es plausible esperar que desempeñen un papel sustancial. Existen comunicaciones que describen algunos procesos desempeñados por células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. Estos procesos son complejos y están relacionados con la contención de respuestas patogénicas generadas por exacerbación de la respuesta celular a través de IFN γ .

Vías de activación de las células T CD8+ en la leishmaniasis

Uno de los puntos de discusión sobre la participación de las células CD8+ en la leishmaniasis se sitúa en la forma de activación de este subtipo celular. Dado que es necesaria la presentación de antígenos por la vía de MHC I para la activación de linfocitos T CD8+, se ha pensado que esta vía interviene en la infección por *Leishmania*. El macrófago es la célula hospedera por excelencia y es allí donde la *Leishmania* se desarrolla y prolifera. Sin embargo, existe la duda sobre la vía de presentación de antígenos del parásito.

Leishmania se alberga dentro de la célula hospedera en un compartimiento fagolisosómico denominado vacuola parasitófora (VP).^{53,54} Aunque se desconoce si el contenido de la luz de la VP puede salir al citosol para degradarse y transportarse al retículo endoplásmico, y acoplarse a moléculas de MHC I, se ha descrito en DC y macrófagos una vía que permite la translocación de proteínas desde la luz del fagosoma al citosol, que depende de la proteína chaperona Sec61 (figura 3).⁵⁵⁻⁵⁷ Este fenómeno se denominó transpresentación y depende de la fusión del fagosoma naciente con el RE.⁵⁸ A últimas fechas se sugirió este sistema de presentación como mecanismo de procesamiento de antígenos de bacterias albergados en macrófagos que permitiría la activación específica de linfocitos T CD4+ y T CD8+.⁵⁹ Esta vía haría posible el paso de antígenos de *Leishmania* a través de la membrana de la VP para que luego los procesara el proteasoma. Hasta el momento, esto es controversial ya que un informe describe que los macrófagos infectados con *Leishmania* transfectada con el gen de OVA o la galactosidasa β son incapaces de presentar estos antígenos a líneas de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno.⁶⁰

Por otro lado, se ha descrito que una línea de linfocitos T CD8+ específicos contra el antígeno de superficie de *Leishmania* GP46/M-2 es capaz de reconocer macrófagos infectados con *L. amazonensis*, lo que sugiere que este antígeno se procesa en el citosol, ya que el efecto puede bloquearse con brefeldina A o inhibidores del proteasoma.⁶¹ Al parecer, sólo los antígenos externos de *Leishmania* pueden alcanzar el citosol del macrófago. Es posible que sean moléculas que el parásito secreta y no productos de la degradación fagolisosómica.

Otra vía de transpresentación de antígenos exógenos implica la fagocitosis de cuerpos apoptóticos de células infectadas por parte de las DC (figura 4). Luego de fagocitar cuerpos apoptóticos, las DC adquieren la capacidad de presentar los antígenos que se

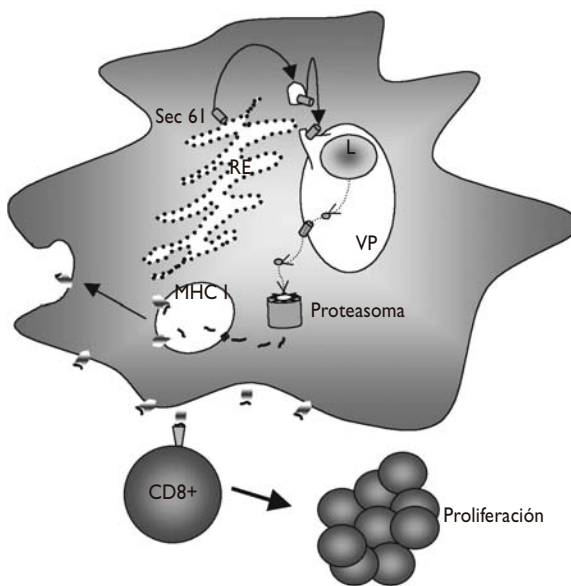


FIGURA 3. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS DE LEISHMANIA MEDIANTE MHC I (MECANISMO DIRECTO). TRANSPRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EXÓGENOS A TRAVÉS DE SEC61

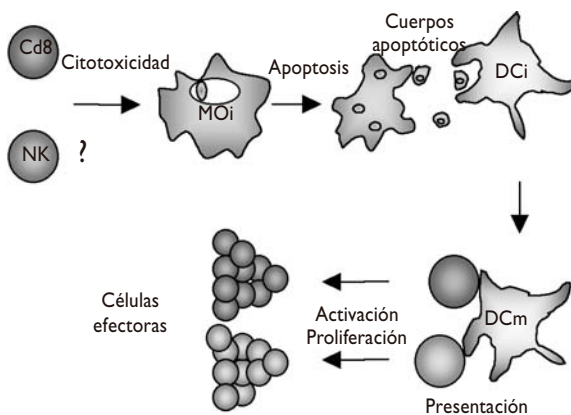


FIGURA 4. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS DE LEISHMANIA MEDIANTE MHC I (MECANISMO INDIRECTO). FAGOCITOSIS DE CUERPOS APOPTÓTICOS

hallan en dichas células, algo que es detectable dos a cuatro horas después de la fagocitosis.^{62,63} Los antígenos deben ingresar al citosol para interceptar la vía convencional de MHC I, lo cual puede suceder por el mecanismo descrito en la figura 3. Este proceso se identificó en la infección por *M. tuberculosis*, en la cual se

demostró que las DC pueden fagocitar apoptosomas de macrófagos infectados y presentar antígenos de *Mycobacterium* vía MHC I y CD1b.⁶⁴ Se ha discutido además que la vacuna de *M. bovis*, BCG, no induce la apoptosis en los macrófagos y tal vez ésta sea la causa de la baja eficiencia de la vacunación con BCG.^{65,66} Dada la similitud de esta infección con la leishmaniasis, es posible que este mecanismo también forme parte de la respuesta inmunitaria de esta última anomalía. De igual modo, se sabe que son las células dendríticas, y no los macrófagos, las que tienen la capacidad de migrar a nódulos linfoides y presentar antígenos de manera eficiente.⁶⁷

En lesiones de pacientes con la forma LCD se ha identificado un gran número de macrófagos parasitados, mientras que en sujetos con LCL el número de macrófagos disminuye. Ensayos preliminares del laboratorio de los autores señalan que los macrófagos en las lesiones de individuos con LCL se encuentran en apoptosis (resultados aún no publicados), lo cual concuerda con la idea de transpresentación de antígenos a través de apoptosomas. Es posible que la presentación cruzada de antígenos por esta vía determine un patrón de citocinas más favorable con la resolución de la infección. En tal caso, el fenómeno de inhibición de la apoptosis de macrófagos infectados con *Leishmania*^{68,69}

constituiría un mecanismo del parásito para evitar la alerta inmunitaria además de garantizar la supervivencia de la célula hospedera.

Función efectora de las células T CD8⁺

Se ha asumido que la principal función protectora de los linfocitos T CD8⁺ es contribuir a la producción de IFN γ .¹⁶ Sin embargo, se desconoce si el IFN γ que liberan los linfocitos CD8⁺ activados se requiere para controlar la infección por *Leishmania*. Dado que *Leishmania* es un parásito intracelular, es plausible pensar que la respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ podría coadyuvar a controlar la infección a través de la lisis de macrófagos infectados por la vía de granzima/perforina o Fas/FasL,^{48,49,60,61,70-72} o ambas, (figura 5).

La participación de granzima y perforina en el fenómeno citotóxico está en duda debido a los informes contradictorios sobre el tema. Por un lado, el mecanismo citotóxico de granzima/perforina no parece tener una participación relevante en el modelo murino, dado que ratones C57BL/6 deficientes en granzima A o B, o ambas, resuelven la infección por *L. major* de igual forma que los ratones silvestres, tanto en el curso de la infección como en la producción y polarización de citocinas,^{73,74} aunque se había señalado que las células T

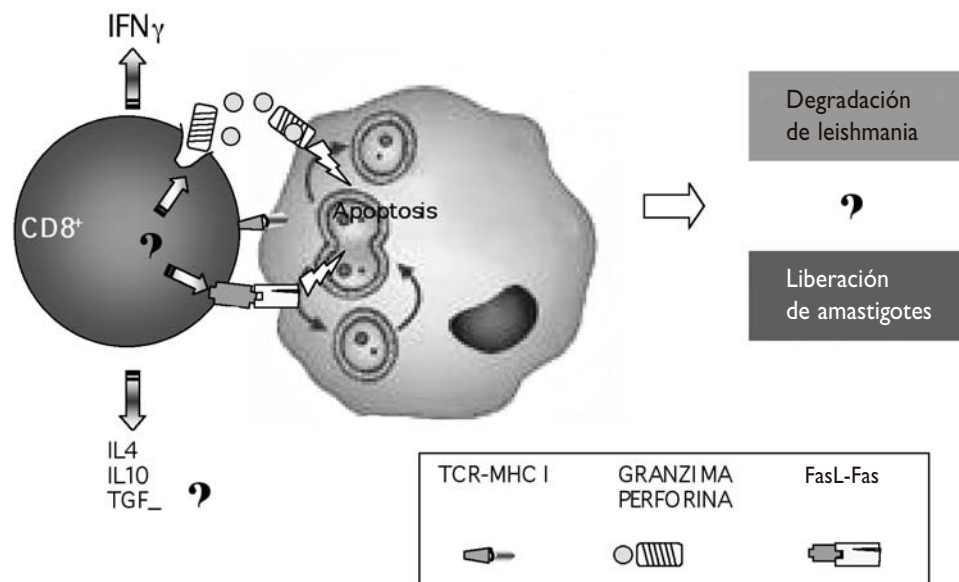


FIGURA 5. POSIBLES MECANISMOS EFECTORES DE LOS LINFOCITOS T CD8⁺ EN LA LEISHMANIASIS. SE SEÑALAN TRES INTERROGANTES QUE HACEN REFERENCIA AL MECANISMO DE CITOTOXICIDAD, EL DESTINO DE LOS PARÁSITOS INTRACELULARES Y LA POSIBILIDAD DE PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INHIBIDORAS

activadas en la infección entre la cepa susceptible BALB/c y la resistente C57BL/6 no sólo diferían en el patrón de citocinas sino también en la expresión de granzima A.^{75,76} Por otro lado, el mecanismo de Fas/FasL tal vez intervenga de forma activa, y en paralelo con la activación de los macrófagos, en la resolución de la infección. Se ha demostrado que los ratones C57BL/6 deficientes en Fas y FasL acusan un comportamiento susceptible, a pesar de activar una reacción Th1 con producción de óxido nítrico.^{73,77,78} Además, constituye una paradoja para el modelo de Th1/Th2 en susceptibilidad y resistencia, ya que se pensó que la capacidad para resolver la infección recaía en la posibilidad de activar a los macrófagos. Este hallazgo señala que no es suficiente esta activación y tal vez es necesario eliminar los macrófagos infectados que ya no responden a la activación.

En la leishmaniasis humana son pocos los estudios enfocados en evaluar la citotoxicidad mediada por células y éstos han relacionado la citotoxicidad con daño tisular, no tanto con protección, ya que se ha identificado en pacientes con LMC y no en LC por *L. braziliensis*.^{48,49} También se ha descrito que es posible generar linfocitos T CD8⁺ específicos de *Leishmania* a partir de células T vírgenes estimuladas con macrófagos infectados con *L. amazonensis* y éstos son capaces de lisar macrófagos autólogos infectados.⁷⁹ En las lesiones de pacientes con LC infectados con *L. major* se detectó sobreexpresión de FasL en macrófagos y linfocitos T activados, en nexo con expresión de Fas; empero, se vinculó con la formación de la úlcera, ya que se encontró un buen número de queratinocitos en apoptosis.⁸⁰ También se ha informado una correlación entre la citotoxicidad *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de pacientes con LC contra macrófagos infectados con *L. major* y la liberación de granzima B.⁷² Toda la evidencia señala la participación de la citotoxicidad en la reacción inmunitaria específica y parece relacionarse con la curación. Aún falta determinar la forma en que los linfocitos T CD8⁺ participan en la LCD, en particular si tienen capacidad citotóxica, y si producen algún tipo de citocina distinto del IFN γ . También es necesario confirmar si los linfocitos T CD8 destruyen macrófagos infectados a través de granzima/perforina o Fas/FasL, o ambas, en ensayos de neutralización y si esta citotoxicidad sobre macrófagos infectados ayuda a controlar la infección. El estudio del papel de la citotoxicidad en la respuesta a *M. tuberculosis* ha revelado que la apoptosis de los macrófagos infectados a través de la liberación de gránulos líticos genera un decremento de la viabilidad de los parásitos.⁸¹

Comentarios y perspectivas

Aún falta definir si la citotoxicidad no sólo elimina a los macrófagos infectados, sino también los parásitos intracelulares (figura 5). Una de las primeras notificaciones que analiza la participación de los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta a *Leishmania* señaló que la citotoxicidad sobre macrófagos infectados no afecta la viabilidad de los parásitos. Sin embargo, el método utilizado para evaluar la viabilidad sólo permite señalar que los parásitos pueden sobrevivir sin las células hospederas.⁷⁰ Una posible vía de degradación de los parásitos intracelulares incluye a la granzulina, la cual se ha vinculado de forma directa con el control de *M. tuberculosis*.⁸¹⁻⁸⁷

La degradación de material de *Leishmania* en episodios apoptóticos no sólo puede tener un papel en el control del número de parásitos, sino también representar una oportunidad para procesar antígenos de difícil obtención debido a la inhibición que causa el parásito sobre la célula hospedera. Pese a ello, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos que permiten activar clonas específicas de linfocitos T CD8⁺. Dado que dicha activación parece estar relacionada con la resolución de la infección, es posible pensar en el diseño de vacunas que activen este tipo de respuesta y contribuyan de esa manera al control de la infección. Hoy en día se acepta que los linfocitos T CD8⁺ participan de modo positivo en el control de la infección por *Leishmania* a través de dos mecanismos, la liberación de IFN γ y la citotoxicidad. Definir la importancia de estos dos mecanismos y la forma en que se activan ayudará a plantear mejores medidas en el diseño y la vigilancia de las vacunas.

Referencias

1. Mauël J. Macrophage-parasite interactions in *Leishmania* infections. *J Leukoc Biol* 1990;47:187-193.
2. Vieira L. pH and volume homeostasis in tripanosomatids: current views and perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1998;1376:221-241.
3. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003;1(4):563-570.
4. Olliaro PL, Bryceson A. Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. *Parasitol Today* 1993;9:323-328.
5. Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67:49-57.
6. Montoya F, Restrepo M, Gómez M. Inmunidad humoral y celular en la leishmaniasis cutánea. *Acta Med Colomb* 1990;15:18-29.
7. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10(6):307-315.

8. Russell DG, Xu S, Chakraborty P. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* 1992;10:1193-1210.
9. Berman J. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis* 1997;24:684-703.
10. Velasco O. Leishmaniasis cutánea en voluntarios humanos. México: Memoria del Congreso Mexicano de Dermatología, 1970.
11. Agudelo S, Robledo S. Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp. *IATREIA* 2000;13:167-178.
12. Scott P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991;147:149-155.
13. Rossi-Bergmann B, Müller I, Godinho EB. Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniasis. *Infect Immun* 1993;61:266-269.
14. Cox F, Liew FY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 1992;13:445-448.
15. Kemp M, Hansen MB, Theander TG. Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from non-exposed individuals. *Infect Immun* 1992;60:246-251.
16. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002;2:845-858.
17. Harty J, Tvinnereim A, White D. CD8+ T cell effectors mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:275-308.
18. Kägi D, Ledermann B, Bürki K, Zinkernagel RM, Hengartner H. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;14:207-232.
19. Trapani J, Smyth M. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.
20. Wooland D, Dutton R. Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol* 2003;15:336-342.
21. Cerwenka A, Carter L, Reome J, et al. *In vivo* persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol* 1998;161:97-105.
22. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114:1198-1208.
23. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 2002;297:2060-2063.
24. Schoenberger S, Toes R, van der Voort E, Offringa R, Melief CJM. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nat* 1998;393:480-483.
25. Doherty P. The numbers game for virus-specific CD8+ T cells. *Science* 1998;280:227-233.
26. Melief C. Regulation of T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 2003;33:2645-2654.
27. Ridge J, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and T-killer cell. *Nat* 1998;393:474-478.
28. Hernandez J, Aung S, Marquardt K, Sherman L. Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8+ T cells responding to self-antigens. *J Exp Med* 2002;196:323-332.
29. Smith C, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, et al. Cognate CD4+ T cell licensing of dendritic cells in CD8+ T cell immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1143-1148.
30. Propato A, Cutrona G, Francavilla V. Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat Med* 2001;7:807-813.
31. Accapezzato D, Francavilla V, Propato A, Paroli M, Barnaba V. Mechanisms inducing or controlling CD8+ T cell responses against self- or non-self-antigens. *Ann NY Acad Sci* 2003;987:99-106.
32. Roger PM, Bermudez LE. Infection of mice with *Mycobacterium avium* primes CD8+ lymphocytes for apoptosis upon exposure to macrophages. *Clin Immunol* 2001;99:378-386.
33. Fong T, Mosmann TR. Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990;144:744-752.
34. Müller I, Kropf P, Etges RJ, Louis JA. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect Immun* 1993;61:3730-3738.
35. Huber M, Timms E, Mak E, Rölinghoff M, Lohoff M. Effective and long lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:3968-3970.
36. Titus R. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimental induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1987;17:1429-1433.
37. Belkaid Y. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 2002;168:3992-4000.
38. Uzonna J, Joyce K, Scout P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by Interferon γ -producing CD8+ T cells. *J Exp Med* 2004;199:1559-1566.
39. Conceição F, Perlaza B, Louis J, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class-I restricted cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol* 1994;24:2813-2817.
40. Pinheiro R, Fonseca E, Correia J, et al. TGF- β -associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 2005;10:1016.
41. Farajnia S, Mahboudi F, Ajdari S, Reiner NE, Karimnia A, Alimohammadian MH. Mononuclear cells from patients recovered from cutaneous leishmaniasis respond to *Leishmania major* amastigote class I nucleases with a predominant Th1-like response. *Clin Exp Immunol* 2005;139:498-505.
42. Da-Cruz AM, Conceicao-Silva F, Bertho AL, et al. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1994;62:2614-2618.
43. Da-Cruz A, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto M, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:251-256.
44. Da-Cruz A, Bertho A, Oliveira-Neto M, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from american tegumentary leishmaniasis lesions. *Brit J Dermatol* 2005;153:537-543.
45. Gaafar A, Veress B, Permin H, Krarazmi A, Theander TG, El-Hassan AM. Characterization of the local and systemic immune response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Immunol* 1999;91:314-320.
46. Salaiza N, Volkow P, Perez R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999;4:801-811.
47. Bertho A, Santiago M, Da-Cruz A, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:317-325.
48. Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1995;17:21-28.
49. Brodskyn C, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1997;159:4467-4473.
50. Antonelli L, Dutra W, Almeida R, Bacella O, Carvalho E, Gollob K. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 2005;10:1016.

51. Roger K, Titus R. The human cytokine response to *Leishmania major* early after exposure to the parasite *in vitro*. *J Parasitol* 2004;90:557-563.
52. Roger K, Titus R. Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naïve humans. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:568-576.
53. Antoine J, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol* 1998;6:392-401.
54. Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* 2002;115:2303-2316.
55. Kovacovics-Bankowski M, Rock K. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 1995;267:243-246.
56. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1999;1:362-368.
57. Houde M, Bertholet S, Gagnon E, Brunet S, Goyette G, Laplante A, et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nat* 2003;425:402-406.
58. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nat* 2003;425:397-402.
59. Kaufmann S, Schaible U. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. *Curr Opin Immunol* 2005;17:79-87.
60. Lopez J, Lebowitz J, Beverly S, Rammensee HG, Overath P. *Leishmania mexicana* promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes *in vivo* that do not recognize infected macrophages. *Eur J Immunol* 1993;23:217-223.
61. Kima P, Ruddle N, McMahon-Pratt D. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8 T cells. *J Immunol* 1997;159:1828-1834.
62. Fonteneau J, Kavanagh D, Lirvall M, Sanders C, Cover TL, Bhardwaj N, et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 2003;102:4448-4455.
63. Guermonprez P, Amigorena S. Pathways for antigen cross presentation. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26:257-271.
64. Schaible U, Winau F, Sieling P, Fischer K, Collins HL, Hagens K, et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CDI in tuberculosis. *Nat Med* 2003;9:1039-1046.
65. Kaufmann S. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001;1:20-30.
66. Winau F, Kaufmann S, Schaible U. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. *Cell Microbiol* 2004;6:599-607.
67. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
68. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol* 1994;152:2930-2937.
69. Moore KJ, Turco SJ, Matlashewski G. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *J Leukoc Biol* 1994;55:91-98.
70. Smith L, Rodrigues M, Russel D. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J Exp Med* 1991;174:499-505.
71. Conceição F, Paes M, Modlin R, Tschopp J, Pirmez C. Is necrosis/apoptosis correlated with the evolution of cutaneous lesions in the American tegumentary leishmaniasis? *Immunol Immunopathol* 1998;93:101-110.
72. Boussoffara T, Louzir H, Salah B, Dellagi K. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 2004;189:1265-1273.
73. Conceição F, Hahne M, Schroter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1998;28:237-245.
74. Eisert V, Münster U, Simon M, Moll H. The course of *Leishmania major* infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. *Immunobiology* 2002;205:314-320.
75. Moll H, Müller C, Gillitzer R, Fuchs H, Rölinghoff M, Simon MM, et al. Expression of T-cell-associated serine proteinase I during murine *Leishmania major* infection correlates with susceptibility to disease. *Infect Immun* 1991;59:4701-4708.
76. Frischholz S, Rölinghoff M, Moll H. Cutaneous leishmaniasis: coordinate expression of granzyme A and lymphokines by CD4+ T cells from susceptible mice. *Immunobiology* 1994;82:255-261.
77. Alexander C, Kaye P, Engwerda C. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. *Eur J Immunol* 2001;31:1199-1210.
78. Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ, Liew FY. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol* 1998;160:4143-4147.
79. Russo DM, Chakrabarti P, Higgins AY. *Leishmania*: naïve human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8+ cytotoxic effectors. *Exp Parasitol* 1999;93:161-170.
80. Eidsmo L, Nylan S, Khamesipour A, Hedblad MA, Chiodi F, Akuffo H. The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 2005;166:1099-1108.
81. Stenger S. Cytolytic T cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Infect Dis* 2001;33:483-487.
82. Kumar J, Okada S, Clayberger C, Krensky AM. Granulysin: a novel antimicrobial. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10:321-329.
83. Hailu A, Frommel D. Leishmaniasis. In: Kloos H, Zein ZA, eds. The ecology of health and disease in Ethiopia. Boulder, San Francisco, Oxford: Westview press, 1993:375-388.
84. Convit J, Ulrich M, Fernandez C, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993;87:444-448.
85. Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez A, et al. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop Med Int Health* 1999;4:801-811.
86. Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 2005;174:7147-7153.
87. Karimnia A, Bourreau E, Pascalis H, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, et al. Transforming growth factor beta 1 production by CD4+ CD25+ regulatory T cells in peripheral blood mononuclear cells from healthy subjects stimulated with *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 2005;73:5908-5914.