

Citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- β) en pacientes con leishmaniasis cutánea Americana

Maira Cabrera González^{1*}, Guillermo Terán-Ángel¹, Orquídea Rodríguez², Franca Puccio³, Olga Zerpa⁴ & Jacinto Convit^{4,5}

La leishmaniasis cutánea Americana (LCA) presenta un espectro clínico e inmunológico, donde las formas intermedias se asocian con respuestas celulares exacerbadas frente a *Leishmania* spp., que pueden reflejar defectos de inmunoregulación. Debido a que la IL-10 y el TGF- β son algunos de los factores importantes en modular la respuesta inmunitaria, nos propusimos establecer si existen alteraciones en su producción entre las diferentes manifestaciones de la leishmaniasis cutánea. Se estudiaron individuos con leishmaniasis cutánea: localizada (LCL n=20), mucocutánea (LCM n=14), intermedia (LCI n=20), difusa (LCD n=12) y 22 voluntarios sanos. La IL-10 se determinó por citometría de flujo y el TGF- β por ELISA en muestras de plasma y en sobrenadantes de cultivos linfocitarios de pacientes y controles, estimulados "in vitro" con *L. braziliensis*. Se evidenció una baja producción de IL-10 en los pacientes con LCI respecto a los LCM y LCD. Mientras que en plasma, no se observaron variaciones en la concentración de esta citocina entre los diferentes grupos. En contraste, el TGF- β estuvo incrementado significativamente en concentración y frecuencia de individuos respondedores en todos los grupos de pacientes respecto a los controles, siendo más elevado en los pacientes LCM asociado con un Odds Ratio muy elevado (87). Luego de estimulación con *L. braziliensis*, los pacientes con LCM continúan mostrando una mayor producción de TGF- β que los pacientes con LCI y LCD. En general, nuestros resultados sugieren que la IL-10 y el TGF- β pudiesen estar mediando supresión en los pacientes con LCD y una inadecuada inmunoregulación en los pacientes con LCI por el escaso nivel de estas. En los pacientes LCM, ambas citocinas fallan en modular la respuesta exacerbada presente en ellos. Otros mecanismos de regulación deben de ser investigados en futuros estudios.

Palabras clave: IL-10, TGF- β , leishmaniasis cutánea Americana.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis cutánea Americana (LCA) es producida por la infección con protozoarios del género *Leishmania*. La misma presenta un espectro de formas clínicas que poseen entre sí características distintivas bien establecidas (Convit, 1974; Convit *et al.*, 1993). En un extremo del espectro se sitúa la forma inmunocompetente (leishmaniasis cutánea localizada,

LCL), con un patrón de respuesta CD4+ Th1, en el cual se producen niveles adecuados de interferón- γ (IFN- γ), linfotóxina (Lt), factor de necrosis tumoral - α (TNF- α) e interleucina-2 (IL-2) que conducen a la eliminación efectiva de los parásitos (Cáceres-Dittmar *et al.* 1993, Castés *et al.* 1996). Al otro extremo del espectro, se ubica la forma anérgica leishmaniasis cutánea difusa, (LCD); en donde el patrón de respuesta que se establece es de tipo Th2, predominando la producción de IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 entre otras citocinas, que conducen a la inhibición de los mecanismos leishmanicidas en los macrófagos y en consecuencia el parásito se disemina (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993, Bomfim *et al.*, 1996, Castés *et al.*, 1996). Entre estas formas polares hay manifestaciones intermedias en las cuales se ubica la leishmaniasis mucocutánea (LCM) y la leishmaniasis cutánea intermedia (LCI), en esta última

¹ Laboratorio de Inmunoparasitología,

² Biología Celular,

³ Inmunopatología y

⁴ Sección de Leishmaniasis,

⁵ Dirección, Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

*Autor de correspondencia: mairacab@gmail.com

no hay compromiso mucoso y las lesiones pueden ser simples o múltiples, de desarrollo atípico, placas o múltiples úlceras (Zerpa *et al.*, 1999, Díaz *et al.* 2002). De estas formas intermedias, la LCM ha sido la más estudiada, en estos pacientes se evidencia una elevada producción de IFN- γ , TNF- α y óxido nítrico (Castés *et al.*, 1988, 1993; Cabrera *et al.*, 2003), y una baja carga parasitaria, lo cual ha permitido sugerir que el daño tisular que presentan estos pacientes es mediado por la exacerbada respuesta inflamatoria que se desarrolla. Esto, puede ser reflejo de un defecto en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune. En ese sentido, la IL-10 y el TGF- β son reconocidas citocinas moduladoras de la respuesta inmune; en leishmaniasis las células recién infectadas, y las células T reguladoras CD4+CD25+ FoxP3+, liberan estas citocinas, modulando la respuesta hacia un patrón Th2, lo que inhibe: activación de los macrófagos, la presentación antigénica, la expansión / proliferación clonal de los linfocitos T y la liberación de citocinas pro-inflamatorias (Barral *et al.*, 1995; Rocha *et al.*, 1999; Shevach, 2002). Muchos de estos reportes en humanos, son derivados de estudios aislados con alguna u otra de las formas clínicas que componen el espectro de la LCA, generándose en algunos casos, resultados contrastantes. Hasta la fecha no existe un estudio en el cual se documente la variación de estas citocinas en forma simultánea en las manifestaciones polares del espectro así como en la LCM y LCI.

En el presente trabajo nos propusimos evaluar las variaciones de IL-10 y el TGF- β en pacientes con LCA, a fin de establecer si existen alteraciones en la producción de estas citocinas en las diferentes formas clínicas de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS:

Población bajo estudio

Pacientes: El estudio comprendió un total de 66 pacientes con LCA con un promedio de $31,83 \pm 18,64$ años de edad, los cuales fueron evaluados en la sección clínica de leishmaniasis del Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela. Se incluyeron los siguientes grupos de pacientes: LCL (n=20), LCI (n=20), LCM (n=14) y LCD (n=12). Ellos fueron diagnosticados siguiendo criterios clínicos, epidemiológicos e histopatológicos establecidos por Convit (1974). Los pacientes con LCL tenían una evolución de la enfermedad de menos de 4 meses. Ninguno de los pacientes se encontraba bajo

algún tipo de tratamiento al momento de realizar el estudio. Todos los pacientes o los representantes legales de los menores de edad aceptaron voluntariamente su participación en el estudio.

Individuos voluntarios sanos: Un total de 22 individuos sanos fue estudiado (edad promedio: $33,72 \pm 18,13$ años). Todos provenían de diferentes zonas endémicas de nuestro país y eran negativos a la prueba de Montenegro o leishmanina.

Antígenos

En este estudio se utilizó un antígeno crudo de *Leishmania (V) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903). Los promastigotes en la fase estacionaria de crecimiento fueron autoclavados y almacenados a 4°C.

Aislamiento y activación de las células mononucleares

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), fueron aisladas de 20 mL de sangre venosa heparinizada de pacientes con LCA y sujetos controles. El aislamiento y el cultivo in vitro de las PBMC de los diferentes grupos se realizó según lo descrito en un estudio previo (Cabrera *et al.*, 2000). Las células fueron dispensadas por triplicado para cada condición experimental, en placas fondo plano estériles de 96 pozos a una concentración de 2×10^5 células/pozo y se estimularon con antígeno crudo de *Leishmania (V) braziliensis (L.b.)* (2×10^5 parásitos/pozo) o solo medio RPMI 1640 (Gibco, USA). Las placas fueron incubadas a 37°C 5% CO₂. Después de 6 días, se colectaron 100 μ L/pozo de sobrenadante y se almacenó a -70°C para posterior evaluación de citocinas.

ELISA de TGF- β

La concentración de TGF- β en el plasma y en los sobrenadantes de los cultivos celulares estimulados con *L.b.*, fue determinada mediante el uso de una ELISA de captura comercial, siguiendo las recomendaciones del fabricante (TGF- β DuoSet, R&D Systems, USA). La concentración de TGF- β fue determinada mediante una curva patrón realizada con TGF- β recombinante suministrado por el kit (0 a 2000 pg/mL) por lo que los resultados fueron expresados en pg/mL. Para los sobrenadantes se sustrajo la concentración de TGF- β determinada en los pozos controles sin estimulación de los estimulados.

Determinación de IL-10

La concentración de IL-10 en el plasma y en los sobrenadantes de las células de pacientes y controles estimuladas con *L.b.*, fueron determinadas por citometría de flujo mediante un kit comercial ("CBA:cytometric bead array" BD Biosciences, USA) siguiendo el procedimiento del fabricante. Inicialmente se realizó una curva patrón mediante la dilución seriada (0 a 5000 pg/mL) del estándar de IL-10. Posteriormente, se mezclaron tanto las muestras (plasma o sobrenadantes diluidos 1:2) como el estándar con las perlas de captura (10 μ L), las cuales estaban cubiertas con un anticuerpo contra IL-10. Se adicionaron 50 μ L de reactivo de detección PE (anti-IL10 conjugado a PE) y se incubó en oscuridad por 3 horas a temperatura ambiente. La fluorescencia producida se midió en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences) y se analizó con el software BD™ Cytometric Bead Array (CBA) para obtener la concentración de IL-10 en pg/mL. En el caso de los sobrenadantes, se procedió a sustraer la concentración de IL-10 obtenida para los pozos controles de los estimulados con *L.b.*.

Análisis estadístico

Los distintos análisis estadísticos fueron realizados mediante el uso del software: GraphPad INSTAT-3™, versión 3.02 (GraphPad Software, San Diego, CA). Debido a que los datos no se distribuyeron en forma normal, se compararon los diferentes grupos estudiados mediante el uso del test no-paramétrico de "Mann-Whitney".

Se estableció la proporción de individuos respondedores para cada citocina en base a un valor "cut-off", el cual se fijó en base a la respuesta observada en el grupo de voluntarios sanos. La respuesta positiva era considerada por encima del valor del percentil 95 en cada caso. Las diferencias en la proporción de respondedores /no respondedores fue analizada mediante el test de chi-cuadrado con la corrección de "Yates" (χ^2). En cada caso se calculó el "Odds ratio" o razón de probabilidades (OR), el cual constituye un cociente entre la probabilidad o proporción de veces de que un evento suceda y la probabilidad de que no suceda. En otras palabras, es un cociente que nos refleja el grado de asociación, en términos de susceptibilidad, entre una citocina y alguna de las manifestaciones de la LCA.

Consideraciones Éticas

Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética del Instituto de Biomedicina, UCV.

RESULTADOS

Concentración plasmática de IL-10 y TGF- β

En la Tabla I se presenta la concentración de IL-10 y TGF- β estimada para los distintos grupos de pacientes con LCA e individuos voluntarios sanos en muestras de plasma. Se evidenció un incremento significativo en la concentración de TGF- β entre los diferentes grupos de pacientes respecto a los controles ($0.0001 < P < 0.001$ por el test de Mann Whitney). Siendo más elevados en los pacientes con LCM respecto a los LCL y LCI. En contraste, no se observaron variaciones significativas entre los grupos en la concentración de IL-10.

Como puede evidenciarse en la Fig. 1, en todos los grupos de pacientes se encontró un porcentaje significativo de respondedores por TGF- β , asociados con OR significativos: LCL: OR=8.073; LCI: OR=9,9; LCM: OR=87 LCD: OR=19,12.

Concentración in vitro de IL-10 y TGF- β

En general, luego de estimulación con *L. braziliensis* (Tabla II), se observó una incrementada concentración de TGF- β en los cultivos celulares de los pacientes con LCL respecto a los demás grupos; sin embargo esto no fue significativo por la elevada desviación estándar que presentaron estos datos (promedio \pm desviación estándar: $1681,2 \pm 3034,2$). Por otra parte, los pacientes con LCM desarrollaron una respuesta de TGF- β , similar a la mostrada en plasma; las PBMC de estos pacientes produjeron una concentración significativa de esta citocina comparado

Tabla I. Concentración plasmática de IL-10 y TGF- β en pacientes con LCA. Se expresa el valor promedio \pm desviación estándar (mediana).

	IL-10	TGF- β
Controles	21,8 \pm 2,8 (21,5)	13,8 \pm 7,9 (14,0) *
LCL	23,7 \pm 5,8 (22,0)	28,9 \pm 20,7 (24,0)
LCI	22,6 \pm 4,1 (23,0)	34,0 \pm 21,8 (28,0)
LCM	20,5 \pm 5,8 (19,5)	44,7 \pm 17,6 (46,0)
LCD	22,6 \pm 4,7 (21,0)	41,6 \pm 24,8 (37,0)

* $0.0001 < P < 0.001$ por diferencias entre controles vs. LCL, LCI, LCM & LCD para TGF- β .

Fig. 1. Porcentaje de individuos respondedores estimados por la concentración plasmática de IL-10 y TGF-β.

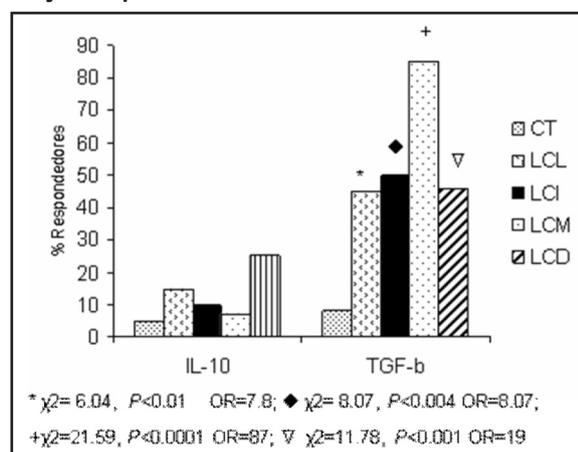


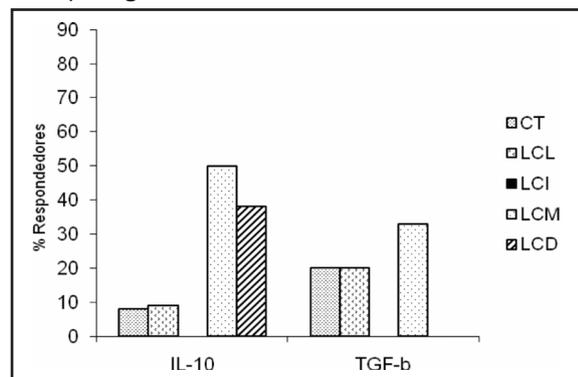
Tabla II. Concentración de IL-10 y TGF-β en los sobrenadantes de linfocitos estimulados con *L. braziliensis*. Se expresa el valor promedio ± desviación estándar (mediana).

	IL-10	TGF-β
Controles	0,33±1,15 (0,0)	380,6±489,64 (141)
LCL	0,27±0,65 (0,0)	1681,2±3034,2 (2357,7)
LCI	0,08±0,29 (0,0)*	105±167,49 (0,0)
LCM	10,8±18,9 (2,0)	793,14±681,35+(752,67)+
LCD	2,0±2,39 (1,0)	14,25±27,83 (0,5)

* $P<0.05$ por diferencias entre LCI vs. LCM & LCD para IL-10.

+ $P<0.05$ por diferencias entre LCM vs. LCI & LCD para TGF-β.

Fig. 2. Porcentaje de individuos respondedores estimados por la producción *in vitro* de IL-10 y TGF-β luego de estimulación con *L. braziliensis*.



No hubo diferencias significativas entre los grupos.

con los pacientes LCI y LCD ($P<0,05$). Notablemente, la producción de IL-10 fue escasa en los cultivos de los pacientes con LCI respecto a los LCM y LCD ($P<0,05$). No se observaron variaciones significativas en el porcentaje de individuos respondedores por la producción de IL-10 y TGF-β, en los cultivos celulares en presencia de *L.b.* (Fig. 2). Sin embargo fue muy interesante evidenciar que entre el grupo de pacientes con LCI no hubo respondedores frente al parásito al considerar ambas citocinas.

DISCUSIÓN

La respuesta inmunológica mediada por células, particularmente la activación de las células CD4+ Th1, es la clave en la resolución de las infecciones con *Leishmania* spp., ya que éstas activan a los macrófagos para la eliminación de los parásitos. Por ende, un defecto en el desarrollo de esta respuesta a nivel de activación o regulación repercute negativamente en la recuperación del paciente con leishmaniasis (Pirmez *et al.*, 1993; Rocha *et al.*, 1999). Sin embargo, Esta respuesta Th1 debe darse en forma moderada, puesto que en exceso puede mediar inmunopatología causante de daños tisulares. Diferentes investigaciones han mostrado que en los pacientes del área intermedia del espectro de la LCA, particularmente en los pacientes LCM, existe una exacerbación de la respuesta CD4+Th1 (elevada producción de IFN-γ y TNF-α), que se ha sugerido, es la responsable del daño en los tejidos y mutilación que se observa en estos individuos (Castés *et al.*, 1996; Bacellar *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2003). Por otra parte, en los pacientes con LCI, también del área intermedia del espectro, se han reportado coincidencias con las respuestas de los pacientes con LCM tales como elevada reactividad a la prueba de Montenegro y la presencia de un patrón mixto de citocinas Th1 y Th2 en sus lesiones (Díaz *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2006). Sin embargo, éstos no desarrollan lesiones en las mucosas. Hasta la fecha no existen reportes de estudios *in vitro* de la respuesta de citocinas luego de estimulación de PBMC de estos pacientes con antígenos de *Leishmania* spp.

Por otra parte, los estudios previos en citocinas reguladoras (TGF-β y la IL-10) no se han realizado simultáneamente en todas las formas clínicas que comprende el espectro de la LCA, y algunos de ellos proporcionan información contrastante por lo cual decidimos evaluar las variaciones de estas citocinas a

lo largo de las distintas manifestaciones clínicas del espectro de la LCA para tratar de dilucidar su papel en esta enfermedad.

En ese sentido, se conoce que la IL-10 es una de las citocinas más importantes en modular la respuesta inmune en pacientes con infecciones crónicas incluyendo leishmaniasis (Rocha *et al.*, 1999); principalmente por su capacidad en inhibir la síntesis de IFN- γ y por ende la activación de los macrófagos. Diferentes estudios han demostrado que la IL-10 es capaz de inhibir la respuesta inmunológica de tipo Th1 y Th2 tanto en modelos experimentales como en enfermedades infecciosas en humanos. Previos estudios han evidenciado que la inhabilidad en producir IFN- γ observada en los pacientes con leishmaniasis visceral en su fase aguda y en los pacientes con leishmaniasis cutánea en la fase inicial de la infección, puede ser restaurada al neutralizar la IL-10 mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra la misma (Carvalho *et al.*, 1994; Rocha *et al.*, 1999; Bourreau *et al.*, 2009). Otro estudio mostró que la adición de IL-10 recombinante a cultivos celulares de pacientes con leishmaniasis visceral curados, suprime la respuesta de los linfocitos T (Bacellar *et al.*, 2000).

En el presente estudio, estimamos esta citocina mediante el método de "CBA Array" (BD Biosciences), el cual ha sido utilizado satisfactoriamente en otras investigaciones, utilizando muestras de suero de pacientes con Kala azar, PKDL (Ansari *et al.*, 2006) y malaria (Lyke *et al.*, 2004). En nuestro estudio no detectamos variación en la concentración plasmática de la IL-10 entre los diferentes grupos de pacientes y los individuos controles. Sin embargo, luego de estimulación con el antígeno de *L. braziliensis*, las PBMC de los pacientes con LCI mostraron una baja producción de IL-10 comparado con la respuesta desarrollada por los pacientes con LCM y LCD. Si bien, se ha encontrado en las lesiones de pacientes LCM un predominio de ARN mensajeros para la IL-10 (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993; Pirmez *et al.*, 1993), lo cual apoya nuestras observaciones, existen reportes contrarios (Bacellar *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2006). Bacellar *et al.* (2002), evidenciaron una disminución en la producción de esta citocina en los pacientes con LCM respecto a los LCL. Similarmente, luego de la curación clínica de pacientes con LCM se ha demostrado que la producción *in vitro* de esta citocina sigue siendo menor en los pacientes mucocutáneos que en los LCL (Gómez-Silva *et al.*, 2007). Otros

investigadores observaron un mayor porcentaje de células positivas para IL-10 en las lesiones de los pacientes con LCI respecto a las lesiones de los sujetos con LCL; este estudio no incluyó pacientes LCM (Díaz *et al.*, 2002, 2006). Por otra parte, otra investigación sugiere que el defecto en la regulación de la respuesta inflamatoria exacerbada característica de los pacientes con LCM no es a nivel de una defectuosa producción de IL-10 sino en sus receptores; ellos no encontraron diferencias en el porcentaje de células positivas para la IL-10 en los pacientes con LCM respecto a los LCL, pero demuestran la disminución de la expresión del receptor para esta citocina en los primeros (Faria *et al.*, 2005).

Contrario a lo reportado por Castellano *et al.* (2009), los pacientes con LCL evaluados en nuestro estudio, no mostraron una producción importante de IL-10 en ninguna de las condiciones en que fue evaluada ("*in vivo*" e "*in vitro*"). Ésto podría ser consecuencia de la migración de las células T reguladoras (principales fuentes de IL-10 y TGF- β) desde la periferia hacia las lesiones, puesto que se ha reportado que estas células y los transcritos de Foxp3+ son abundantes en las lesiones de estos pacientes (Campanelli *et al.*, 2006; Bourreau *et al.*, 2009). Más aún se ha especulado que estas células pudiesen estar regulando a las células efectoras en el sitio de la lesión.

El TGF- β es otra citocina importante en la modulación de la respuesta inmune en leishmaniasis experimental (Barral-Netto *et al.*, 1992; Barral *et al.*, 1993). Por una parte se ha señalado que la producción de TGF- β es inducida por el parásito y constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmunológica del hospedador al suprimir a los linfocitos T CD4+ Th1 (Barral-Netto *et al.*, 1996). Recientemente se ha develado como una molécula importante en la iniciación de la respuesta inflamatoria y en la diferenciación de las células T CD4+ Th17 (Wahl, 2007).

En el presente estudio, encontramos que la concentración plasmática de TGF- β estuvo incrementada significativamente en todos los grupos de pacientes con LCA (LCL, LCI, LCM y LCD) respecto a los controles, asociados con OR significativos. Sin embargo, la asociación más fuerte fue con los pacientes con LCM (OR=87). Esto concuerda con estudios previos, en los cuales macrófagos aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea producen TGF- β

al infectarlos con *L. amazonensis*, *L. donovani* o *L. braziliensis* (Barral-Netto *et al.* 1996). En las lesiones de los pacientes con LCA se ha encontrado un número variable de parásitos estando muy incrementados en la forma difusa de la enfermedad, lo cual podría explicar en parte la alta producción de TGF- β . No lo es así para los pacientes con LCM, cuyas lesiones a *L. bergan* un escaso número de parásitos (Convit *et al.*, 1993). Sin embargo estos mostraron una mayor concentración de TGF- β en plasma comparado con los pacientes LCI, LCL y en los sobrenadantes comparado nuevamente con los LCI y LCD. Otros estudios, también han reportado la presencia de TGF- β en las lesiones de pacientes con LCL, LCI y LCM (Barral-Netto *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2006).

Este TGF- β no parece estar regulando la respuesta inflamatoria que se observa en estos pacientes particularmente en los LCM. Quizás por no estar biológicamente activo, ya que se conoce que esta citocina es secretada como un complejo latente que requiere del clivaje proteolítico o de su modificación estructural para que su afinidad por su receptor sea óptima (Wahl, 2007). También, sus receptores podrían no expresarse adecuadamente en los linfocitos T. Otra posibilidad es que esta citocina en conjunción con la IL-6 pudiese estar dando lugar a la diferenciación de linfocitos Th17, muy involucrados en la respuesta inflamatoria crónica.

Notoriamente, las PBMC de los pacientes con LCI mostraron una disminución o ausencia en la producción de citocinas reguladoras (TGF- β e IL-10) luego de estimulación con *L. braziliensis*. Todo esto indica que la poca o ausente producción de estas citocinas no es suficiente para regular la respuesta inmunológica que se establece en estos pacientes y la misma se hace crónica.

En conclusión, las citocinas reguladoras (IL-10 y TGF- β) pareciesen tener un significado distinto a lo largo del espectro de la LCA. El hallazgo más interesante de este estudio fue que en el área intermedia del espectro, la respuesta a estas citocinas fue diferente. Los pacientes con LCI mostraron disminución o ausencia de ambas citocinas lo cual podría relacionarse con la cronicidad de la enfermedad que experimentan estos pacientes. En contraste, los pacientes con LCM, mostraron respuestas significativas de ambas citocinas, lo cual no se traduce en regulación o modulación de la respuesta inflamatoria

que se evidencia en estos pacientes. Esto, nos hace especular que quizás sean otros factores los implicados en esta respuesta inflamatoria incontrolada. Para dilucidar esto, es necesaria la realización de futuras investigaciones orientadas en la determinación de factores recientemente vinculados con la génesis de enfermedades inflamatorias crónicas y relacionadas con el TGF- β . La determinación de citocinas IL-17, IL-9 e IL-22, asociadas con las subpoblaciones de linfocitos T recientemente descritas: Th17, Th9 y Th22 (Annunziato *et al.*, 2007; Annunziato & Romagnani 2009; Eyerich *et al.*, 2009; Vedlhoen *et al.*, 2008) constituyen buenos candidatos para este propósito.

AGRADECIMIENTOS:

Trabajo financiado por el proyecto individual CDCH-UCV N° 09.00.5701.2004.

Regulatory cytokines (IL-10 and TGF- β) in American cutaneous leishmaniasis patients

SUMMARY

American cutaneous Leishmaniasis shows a clinical and immunological spectrum, where intermediate forms are associated with exacerbated cell responses against *Leishmania* spp., which may reflect defective immunoregulation. Since IL-10 and TGF- β modulate the immune response, we aimed to establish whether there are changes in its production between the different manifestations of cutaneous leishmaniasis. We studied individuals with cutaneous leishmaniasis: localized (LCL n = 20), mucocutaneous (MCL n = 14), intermediate (ICL n = 14), diffuse (LCD n = 12) and twenty two healthy subjects. The IL-10 was determined by flow cytometry and TGF- β by ELISA in plasma and in supernatants of lymphocyte cultures from patients and controls stimulated in vitro with *L. braziliensis*. The results showed a low production of IL-10 in patients with intermediate or chronic leishmaniasis compared to MCL and DCL patients. There were no changes in plasma concentration of this cytokine among the different groups. In contrast, the TGF- β was significantly increased in concentration and frequency of respondents in all groups of patients compared to controls, being higher in MCL patients associated with an elevated odds ratio (87). After stimulation with *L. braziliensis*, the MCL patients continue to show increased production of TGF- β compared to ICL and LCD patients. Overall, our results suggest that IL-10 and TGF- β could be mediating suppression in DCL

patients and an inadequate or defective regulation in ICL patients by the low level of these cytokines. In MCL patients, both cytokines fail to modulate their exacerbated response. Other regulatory mechanisms must be investigated in future studies

Key words: IL-10, TGF- β , American cutaneous leishmaniasis

REFERENCIAS

- Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., *et al.* (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J. Exp. Med.* **204**: 1849-1861.
- Annunziato F. & Rogmagnani S. (2009). Heterogeneity of human effector CD4+T cells. *Arthritis Res. Ther.* **11**: 257-264.
- Ansari N. A., Saluja S. & Salotra P. (2006). Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10 and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin. Immunol.* **119**: 339-345.
- Bacellar O., D'Oliveira A., Jeronimo Jr. S., & Carvalho E. M. (2000). IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* **12**: 1228-1231.
- Bacellar O., Lessa A., Schriefer A., Machado P., Ribeiro A., Dutra W., *et al.* (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. *Infect Immun.* **70**: 6734-6740.
- Barral A., Barral-Netto M., Yong E. C., Brownell C. E., Twardzik D. R. & Reed S. G. (1993). Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 3442-3446.
- Barral A., Teixeira M., Reis P., Vinhas V., Costa J., Lessa H., *et al.* (1995). Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* **147**: 947-954.
- Barral-Netto M., Barral A., Brownell C. E., Skeiky Y. A. W., Ellingsworth L. R., Twardzik D. R., *et al.* (1992) Transforming growth factor in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science.* **57**: 545-548.
- Barral-Netto M., Brodskyn C., Bomfim G. & Barral A. (1996). Cytokine regulation in human American cutaneous Leishmaniasis. pp. 153-167. En: *Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. Tapia F. J., Cáceres-Dittmar G., Sánchez M. (eds), R. G. Landes Company, Austin TX, USA.
- Bomfim G., Nascimento C., Costa J., Carvalho E. M., Barral-Netto M. & Barral A. (1996) Variations of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* **84**: 188-194.
- Bourreau E., Rounet C., Darcissac E., Lise M. C., Sainte Marie D., Clity E., *et al.* (2009). Intralesional regulatory T-Cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun.* **77**: 1465-1474.
- Cabrera M., Blackwell J. M., Castés M., Trujillo D., Convit J. & Shaw M. A. (2000). Immunotherapy with live BCG plus heat killed *Leishmania* induces a T helper 1-like response in American cutaneous leishmaniasis patients. *Parasite Immunology.* **22**: 73-79.
- 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 Tropica.* **88**: 145-151.
- Cáceres Dittmar G., Tapia F. J., Sánchez M. A., Yamamura K., Uyemura R. L., Modlin R., *et al.* (1993). Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.* **91**: 500-505.
- Campanelli A. P., Roselino A. M., Cavassani, Pereira M. S., Mortara R. A., Brodskyn C. I., *et al.* (2006). CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J. Infect. Dis.* **193**: 1313-1322.
- Carvalho E. M., Bacellar O., Brownell C., Regis T., Coffman R. L. & Reed S. G. (1994). Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* **152**: 5949-5956.

- Castellano L. R., Correia D., Argiro L., Dessein H., Prata A., Dessein A., *et al.* (2009). Th1/Th2 responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure with strong interferon gamma production. *Hum. Immunol.* **70**: 383-390.
- Castés M., Cabrera M., Trujillo D., & Convit J. (1988). T cell sub-populations, expresión of interleukin-2 receptor, and interferon in human American leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **57**: 279-286.
- Castés M., Trujillo D., Rojas M. E., Fernández C. T., Araya L., Cabrera M., *et al.* (1993). Serum levels of tumor necrosis factor in American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* **26**: 233-238.
- Castés M., Cabrera M., Trujillo D., Rodas A., Scott D., Blackwell J. M., *et al.* (1996). Cytokine profile in human american cutaneous leishmaniasis. New dimensions in Parasitology. *Acta Parasitologica Turçica.* **20 (Suppl. 1)**: 45-57.
- 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-Ditmar G., Castés M., *et al.* (1993). The immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 444-448.
- Díaz N., Zerpa O., Ponce L. V., Convit J., Rondon A. & Tapia F. J. (2002). Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp. Der.* **11**: 34-41.
- Díaz N. L., Arvelález F. A., Zerpa O. & Tapia F. J. (2006). Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* **31**: 114-117.
- Eyerich S., Eyerich K., Pennino D., Carbone T., Nasorri F., Pallotta S., *et al.* (2009). Th22 cells represents a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* **119**: 3573-3585.
- Faria D. R., Gollob K. J., Barboza J. Jr., 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.
- Gómez-Silva A, Bittar RC, dos Santos R, Amato VS, da Silva M. (2007). Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* **149**: 440-444.
- Lyke K. E., Burges R., Cissoko Y., Sangare L., Dao M., Diarra I., *et al.* (2004). Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12 (p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun.* **72**: 5630-5637.
- Pirmez C., Yamamura M., Uyemura K., Paez Oliveira M., Conceicao-Silva F. & Modlin R. L. (1993). Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* **91**: 1390-1395.
- Rocha P. N., Almeida R. P., Bacellar O., de Jesús A. R., Fihlo D. C., Fihlo A. C. *et al.* (1999). Down regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* **180**: 1731-1734.
- Shevach EM. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more question than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2389-2400.
- Veldhoen M., Uyttenhove C., van Snick J., Helmbly H., Westendorf A., Buer J., *et al.* (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an Interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **9**: 1341-1346.
- Wahl S. M. (2007). Transforming growth factor- β : innately bipolar. *Curr Opin Immunol.* **19**: 55-62.
- Zerpa O., Díaz N. L., Cabrera M., Rodríguez N., Ulrich M., Tapia F J. & Convit J. (1999). *Leishmaniasis cutánea Intermedia: aspectos Clínicos, inmunológicos, y parasitológicos.* XIV Congreso Ibero Latinoamericano de Dermatología, Málaga, España.

Recibido el 06/05/2010
Aceptado el 29/09/2010