

AFECTACIÓN DE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN UN CASO DE LEISHMANIASIS VISCERAL AUTÓCTONO DEL NOROESTE ARGENTINO

CECILIA PARODI^{1,2}, MARÍA F. GARCÍA BUSTOS¹, MARÍA C. MORA¹, FEDERICO RAMOS¹,
MARÍA M. DE ELIZALDE DE BRACCO², MIGUEL A. BASOMBRÍO¹, ALEJANDRA BARRIO³

¹Instituto de Patología Experimental (IPE), CONICET, Universidad Nacional de Salta, Salta, ²Laboratorio de Inmunología, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, ³Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

Resumen En el presente trabajo informamos la afectación de parámetros inmunológicos durante la etapa grave de la infección y luego de alcanzar la recuperación clínica en un paciente autóctono del Noroeste argentino con leishmaniasis visceral causada por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Detectamos concentraciones plasmáticas elevadas de interferón- γ , interleuquina 10, IgG y BAFF (*B-cell activating factor*) durante la enfermedad activa, que se normalizaron luego de la recuperación clínica. En relación al perfil de diferenciación y memoria de las células T, clasificamos las células según la expresión de CD27, CD28, CD45RO, CD57 y perforina. Encontramos un fenotipo altamente diferenciado analizando la población de linfocitos T CD8⁺, con porcentajes aumentados de células T de diferenciación tardía y efectoras terminales. Si bien el fenotipo T CD8⁺ persistió luego de la recuperación clínica, pudimos observar un claro aumento de células T de memoria central en ese punto de estudio, sugiriendo signos de una posible reversión hacia un perfil T menos avanzado. El compartimiento de células B CD19⁺ mostró cambios más leves en la composición de las subpoblaciones de memoria. Documentamos el compromiso global de parámetros inmunológicos en la etapa grave de la leishmaniasis visceral que tienden a revertir luego de la recuperación, sugiriendo posibles signos de reconstitución inmune acompañando a la mejoría clínica. Los parámetros evaluados podrían ser útiles como biomarcadores de la evolución clínica de la enfermedad.

Palabras clave: leishmaniasis visceral, diferenciación de linfocitos B, diferenciación de linfocitos T, citoquinas

Abstract *Alterations of immunological parameters in an autochthonous case of visceral leishmaniasis from the Northwest of Argentina.* We report the alterations of immunological parameters of a patient with visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* from the Northwest of Argentina during active disease and after achieving clinical recovery. We first demonstrated elevated amounts of IFN- γ , IL-10, B-cell activating factor (BAFF) and IgG in plasma during active disease, which returned to control values after recovery. In relation to T cell profile, we measured CD27, CD28, CD45RO, CD57 and perforin. We found a highly differentiated phenotype, preferentially in active disease and among CD8⁺ T cells, consisting in increased numbers of late differentiated and terminal effector cells. Although this highly differentiated CD8⁺ T cell phenotype persisted after recovery, a clear increase of central memory cells was recorded for both T subsets at that point, suggesting signs of reversion toward a less differentiated profile. The composition of the B cell compartment was slightly modified during active disease. Herein we document the global impact of severe visceral leishmaniasis on immunological parameters, which tend to revert upon clinical recovery, suggesting signs of immune restoration accompanying clinical improvement. The evaluated parameters could eventually be used as biomarkers of clinical evolution of visceral leishmaniasis.

Key words: visceral leishmaniasis, B-lymphocyte differentiation, T-lymphocyte differentiation, cytokines

La leishmaniasis visceral (LV) presenta un espectro clínico variable, que va desde infección asintomática hasta enfermedad clínica con desenlace fatal y es considerada la parasitosis con mayor mortalidad, después de

malaria¹. En el Noroeste de Argentina, la leishmaniasis tegumentaria americana es endémica, pero hasta hace cerca de una década no se había registrado ningún caso de leishmaniasis visceral. Desde 2008 hasta la actualidad, se ha confirmado la presencia de siete casos humanos², por lo que el posible avance de la LV en esta área geográfica actualmente representa un signo de alarma y motivo de preocupación para los sistemas de salud y para la comunidad. Nuestro grupo diagnosticó y documentó uno de estos casos humanos, causado por *Leishmania (Leishmania) infantum* en un paciente adulto³.

Recibido: 17-XII-2019

Aceptado: 3-IV-2020

Dirección postal: Cecilia Parodi, Instituto de Patología Experimental, CONICET, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, 4400 Salta, Argentina

e-mail: ceciliaparodi@conicet.gov.ar

El presente trabajo tiene como objetivo, valiéndonos de muestras de archivo del caso mencionado, determinar la afectación de distintos componentes del sistema inmune en etapas graves de la infección y analizar si la mejoría clínica se asocia a signos de una posible reconstitución inmune. Para esto, realizamos la determinación plasmática de citoquinas ya examinadas por otros grupos como parámetros inmunológicos asociados a enfermedad activa y curación^{4,5}, así como de otros parámetros plasmáticos relativos a inmunidad humoral. Por otra parte, analizamos el fenotipo de diferenciación y memoria de linfocitos T y B periféricos, antes de la administración del tratamiento, y luego de lograr la recuperación clínica.

Caso clínico

El paciente (varón, 44 años) presentaba deterioro progresivo del estado general de más de tres semanas, con fiebre, esplenomegalia y pérdida de peso. El diagnóstico de LV se determinó por el hallazgo de abundantes amastigotes en improntas de punción de médula ósea y la identificación de la especie responsable como *L. (L.) infantum* mediante secuenciación del gen citocromo b³. Se descartó infección por HIV, VHC y VHB. Se determinó pancitopenia pronunciada (glóbulos blancos, 1000/mm³; linfocitos, 530/mm³). Se recolectaron muestras de sangre periférica en ese punto y tres meses después de la administración de anfotericina B liposomal (3 mg/día, 7 días), momento en que se logró la recuperación clínica. Se guardaron alícuotas de plasma a -80 °C para ensayos de ELISA comercial de: interleuquina 10 (IL-10), interferón gamma (IFN- γ), factor activador de células B (BAFF), e inmunoglobulina G (IgG). Las células mononucleares periféricas criopreservadas a -140 °C se descongelaron para su análisis por citometría de flujo. Las mismas condiciones fueron aplicadas para un grupo control (GC, n = 12-16, resultados expresados en media \pm DS), compuesto por sujetos sanos. Se obtuvo consentimiento informado escrito del paciente y se siguieron los principios enunciados en la Declaración de Helsinki.

En la etapa grave de la enfermedad, determinamos niveles plasmáticos aumentados de IFN- γ , IL-10 e IgG junto con concentraciones marcadamente elevadas de BAFF en comparación con el GC, parámetros que se normalizaron luego de alcanzar la recuperación clínica (Tabla 1).

En el momento crítico de la infección observamos una relación T CD4/CD8 invertida, de 0.17, que aumentó a 0.83 luego de la recuperación clínica. Tomando en cuenta traba-

jos previos que indican que, durante infecciones crónicas, células T de diferenciación temprana y de memoria central confieren mejor inmunidad protectora que células altamente diferenciadas y efectoras terminales (asociadas a senescencia y agotamiento celular)⁶⁻⁸ investigamos la evolución de la diferenciación y memoria T en el paciente. Definimos el perfil de diferenciación de células T según la co-expresión de los receptores CD27 y CD28 como células de diferenciación temprana (CD27⁺CD28⁺); de diferenciación intermedia (CD27⁺CD28⁺/CD27⁺CD28⁻) y de diferenciación tardía (CD27⁻CD28⁻). El paciente con LV demostró un aumento de células T de diferenciación tardía, especialmente en la subpoblación T CD8⁺, que se mantuvo luego de la recuperación clínica (Fig. 1d). La subpoblación T CD4⁺ sufrió cambios menores, con predominio de células de diferenciación temprana tanto antes como después del tratamiento (Fig. 1b). La diferenciación terminal de las células T CD8⁺ se apoyó también en un aumento en la expresión del marcador de senescencia CD57 (pre-tratamiento, 69.1%; post-tratamiento, 68.3%; GC, 18.3 \pm 14.9%) y de la molécula perforina (pre-tratamiento, 36.7%; post-tratamiento, 40.4%; GC, 17.9 \pm 12.8%). Para analizar el fenotipo de memoria de los linfocitos T, clasificamos a las células como vírgenes (*naïve*, CD27⁺CD45RO⁻), de memoria central (CD27⁺CD45RO⁺), de memoria efectora (CD27⁻CD45RO⁺) y efectoras terminales (CD27⁻CD45RO⁻). En la Figura 1 se grafican células T CD4⁺ (Fig. 1a) y CD8⁺ (Fig. 1c) del paciente pre- y post- tratamiento, junto con los hallazgos en un sujeto sano, (análisis extensivos de células T de sujetos sanos, concordantes con este ejemplo fueron informados previamente por el grupo⁶). En la etapa grave de LV, el perfil de memoria T CD4⁺ estaba compuesto principalmente por células *naïve* y células de memoria efectora; mientras que en los linfocitos T CD8⁺ predominaban células de memoria efectora y efectoras terminales. Estos resultados, preferentemente sobre linfocitos T CD8⁺, apuntan a la predominancia de un fenotipo de memoria avanzado. A pesar de que el fenotipo maduro persiste luego de la recuperación, en esta etapa también se observa un claro aumento de células T de memoria central para ambas subpoblaciones.

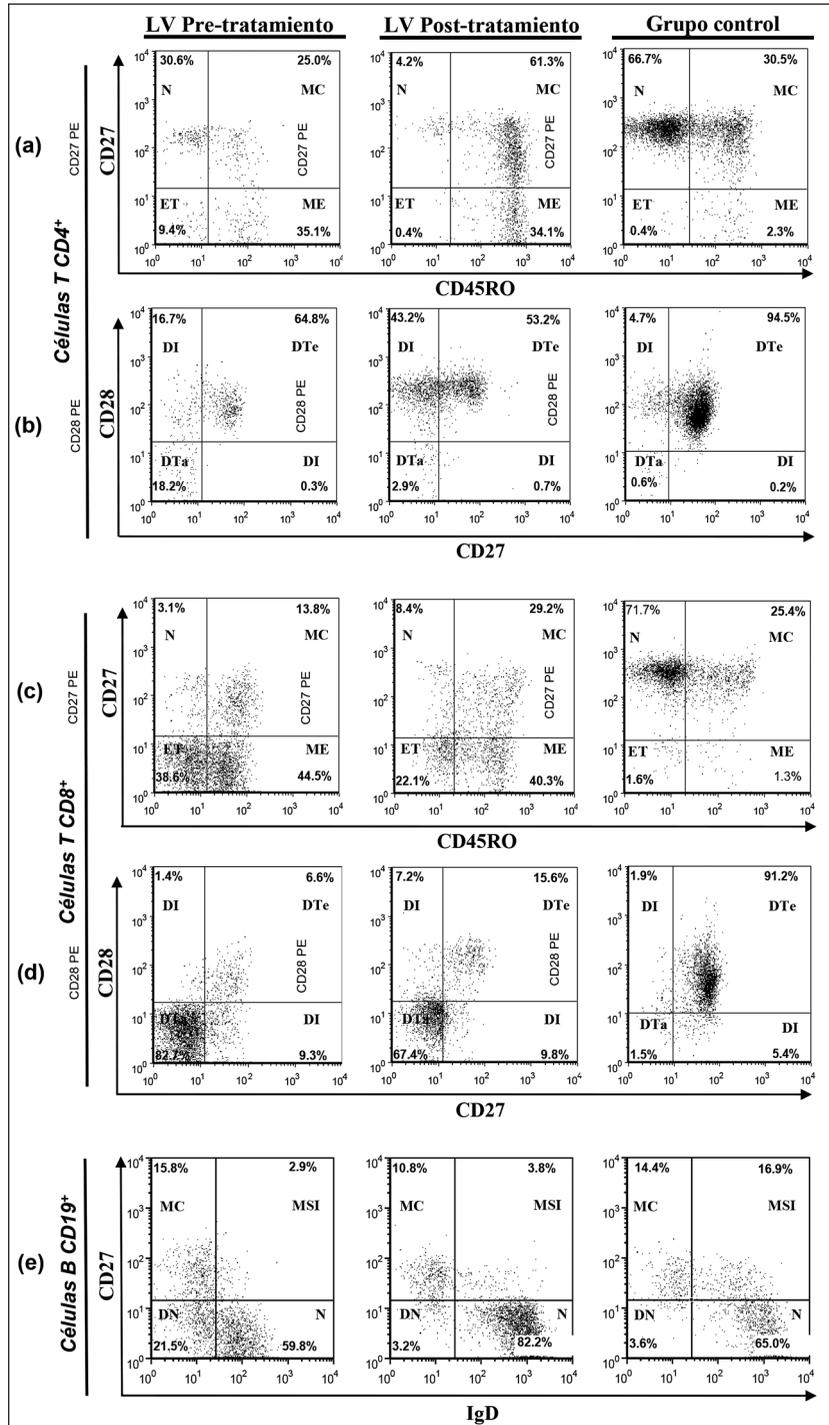
Por último, analizamos el perfil de memoria de los linfocitos B CD19⁺, caracterizamos las células como vírgenes (*naïve*, CD27⁺IgD⁺); de memoria sin cambio de isotipo (CD27⁺IgD⁻); de memoria clásicas (CD27⁻IgD⁻) y doble negativas (CD27⁻IgD⁺) (Fig. 1e). Encontramos predominancia de células B CD19⁺ *naïve* pre- y post-tratamiento, en concordancia con resultados obtenidos en el GC (62.2 \pm 11.6%). No obstante, en la Figura 1e se muestra un porcentaje aumentado de células B doble negativas en la etapa grave de LV en contraste con valores hallados en GC (6.9 \pm 2.3%), subpoblación que disminuye a valores cercanos a los del GC luego de la recuperación clínica.

TABLA 1.- Dosaje de citoquinas pro-inflamatorias y regulatorias y de parámetros relativos a la inmunidad humoral en un caso de leishmaniasis visceral

Parámetro (concentración plasmática)	Paciente con leishmaniasis visceral		Grupo control (sujetos sanos)
	Pre-tratamiento	Post-tratamiento	
IFN- γ (pg/ml)	18.7	< 6	6.3 \pm 0.9
IL-10 (pg/ml)	167.0	7.3	5.43 \pm 1.3
BAFF (pg/ml)	23405.8	2249.2	1280 \pm 416
IgG (mg/ml)	23.7	14.0	9.36 \pm 1.8

IFN- γ , interferón- γ ; IL-10, interleuquina-10; BAFF, B-cell activating factor; IgG, inmunoglobulina G

Fig. 1.– Perfil de diferenciación y memoria de linfocitos T y B periféricos en la etapa grave y luego de la recuperación clínica en un caso de leishmaniasis visceral (LV). Se muestran gráficas de puntos representativas de la co-expresión de CD27 CD45RO y de CD27 CD28 para linfocitos T CD4+ y CD8+ y de la co-expresión CD27 IgD para linfocitos B CD19+ antes de la administración del tratamiento, 3 meses después de la finalización del tratamiento y de un sujeto sano, representativo del grupo control. Los linfocitos se seleccionaron por sus características de tamaño y complejidad y luego se analizó la región correspondiente a células T CD4+ (a, b); células T CD8+ (c, d) y linfocitos B CD19+ (e). Perfil de memoria T: *naïve* (N, CD27+CD45RO-); memoria central (MC, CD27+CD45RO+); memoria efectora (ME, CD27-CD45RO+); células efectoras terminales (ET, CD27-CD45RO-). Perfil de diferenciación T: diferenciación temprana (DTe, CD27+CD28+); diferenciación intermedia (DI, CD27-CD28+/CD27+CD28-) y diferenciación tardía (DTa, CD27-CD28-). Perfil de memoria B: *naïve* (N, CD27-IgD+); de memoria sin cambio de isotipo (MSI, CD27+IgD+); de memoria clásicas (MC, CD27+IgD-) y doble negativas (DN, CD27-IgD-)



Discusión

En este trabajo describimos características inmunológicas de un paciente con LV del interior de Salta, zona geográfica que desde hace algunos años está sufriendo el avance de esta enfermedad. Nuestra intención fue evaluar el efecto de la infección en componentes del sistema inmune, por lo que comenzamos nuestro estudio analizando niveles plasmáticos de IFN- γ e IL-10, que aumentaron en la etapa crítica y disminuyeron luego de la recuperación, en concordancia con estudios previos^{4,5}, enfatizando su relación con la evolución clínica. La relación CD4/CD8 disminuida ilustra el fuerte efecto producido sobre el sistema inmune y su aumento acompañando la recuperación clínica sugiere una mejoría a nivel inmunológico. Este hallazgo también fue encontrado por Hailu et al⁹ en LV causada por *L. donovani*. La inversión de la relación CD4/CD8 también se asocia a un aumento de marcadores de senescencia y de agotamiento celular en infecciones como HIV¹⁰. En concordancia, encontramos un perfil altamente diferenciado, preferentemente analizando linfocitos T CD8⁺ y enfermedad activa. Recientemente demostramos que los pacientes con leishmaniasis mucosa, forma grave de la leishmaniasis tegumentaria, presentan un perfil altamente diferenciado de células T⁶, fenotipo que también se asoció a infecciones virales y parasitarias crónicas, como consecuencia de la activación inmune persistente por el antígeno^{7,8}. En el presente caso, con menor cronicidad, sugerimos que el antígeno es capaz de gatillar una rápida activación inmune. Por consiguiente, otros factores como la carga parasitaria y características de la cepa infectante podrían modular también el grado de diferenciación de células T. La recuperación clínica se acompañó por un claro aumento de células T CD4⁺ y CD8⁺ de memoria central. El aumento de esta subpoblación luego de la terapia fue descrito en la infección por *L. donovani*⁹ y la presencia de células T de memoria central se correlacionó con cargas virales disminuidas en la infección por HIV¹¹.

Los linfocitos B también sufren algunos cambios durante la infección por *L. (L.) infantum*, como la expansión de células B doble negativas CD27-IgD⁻ en la etapa crítica. La población de memoria CD27⁺ fue observada asociada a signos de agotamiento celular en malaria e infección por HIV^{12, 13}; en nuestro trabajo, se requeriría realizar un estudio más exhaustivo de dicha subpoblación B para definir que se trate de células de memoria y para determinar una posible asociación con signos de agotamiento. Además, en consonancia con el estudio de Goto et al¹⁴, relativo a LV causada por *L. donovani*, encontramos una concentración plasmática de BAFF marcadamente elevada, junto con aumento de IgG, parámetros que se normalizaron luego de la recuperación clínica. BAFF es un regulador crítico de selección y supervivencia de células B periféricas, que se encuentra muy aumentado en enfer-

medades autoinmunes y fue asociado también a gravedad y actividad clínica en malaria¹⁵.

Documentamos el compromiso global de parámetros inmunológicos en la etapa grave de la infección por *L. (L.) infantum* en un paciente adulto. Determinamos un profundo efecto del antígeno sobre el compartimento de células T periféricas junto con cambios sutiles en subpoblaciones B de memoria, parámetros que tienden a revertir luego de la recuperación clínica, sugiriendo posibles signos de reconstitución inmune. Nuestros resultados permiten conjeturar que los parámetros evaluados podrían ser útiles como indicadores asociados a la evolución clínica de la LV.

Agradecimientos: Agradecemos al Servicio de Enfermedades Infecciosas Hospital Señor del Milagro, Salta, Argentina, en especial a la Dra. Noemí Dávalo por su colaboración durante la fase clínica del estudio; al Dr. Jorge Diego Marco y al Dr. Alberto Gentile por su participación en el trabajo de campo.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2009; 9: 588-96.
2. Boletines Integrados de Vigilancia, Epidemiología y Análisis de situación de Salud, Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Nación. En: <https://www.argentina.gob.ar/salud/epidemiologia/boletines>; consultado diciembre 2019.
3. Barrio A, Parodi CM, Locatelli F, et al. *Leishmania infantum* and human visceral leishmaniasis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 354-5.
4. Khoshdel A, Alborzi A, Rosouli M, et al. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. *Braz J Infect Dis* 2009; 13: 44-6.
5. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 561-7.
6. Parodi C, García Bustos MF, Barrio A, et al. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms-co-infection with *Trypanosoma cruzi*. *Med Microbiol Immunol* 2016; 205: 353-69.
7. Appay V, Rowland-Jones SL. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. *Semin Immunol* 2004; 16: 205-12.
8. Albareda MC, Laucella SA, Alvarez MG, et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. *Int Immunol* 2006; 18: 465-71.
9. Hailu A, van Baarle D, Knol GJ, et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. *Clin Immunol* 2005; 117: 182-91.
10. Sainz T, Serrano-Villar S, Díaz L, et al. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS* 2013; 27: 1513-6.
11. Burgers WA, Riou C, Mlotshwa M, et al. Association of

- HIV-specific and total CD8+ T memory phenotypes in subtype C HIV-1 infection with viral set point. *J Immunol* 2009; 182: 4751-61.
12. Weiss GE, Crompton PD, Li S, et al. Atypical memory B cells are greatly expanded in individuals living in a malaria-endemic area. *J Immunol* 2009; 183: 2176-82.
 13. Moir S, Ho J, Malaspina A, et al. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med* 2008; 205: 1797-805.
 14. Goto Y, Omachi S, Sanjoba C, Matsumoto Y. Elevation of serum B-cell activating factor levels during visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 91: 912-4.
 15. Nduati E, Gwela A, Karanja H, et al. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. *J Infect Dis* 2011; 204: 962-70.

To read, write, and converse in due proportions, is, therefore, the business of a man of letters. For all these there is not often equal opportunity; excellence, therefore, is not often attainable; and most men fail in one or other of the ends proposed, and are full without readiness, or without exactness. Some deficiency must be forgiven all, because all are men; and more must be allowed to pass uncensured in the greater part of the world, because none can confer upon himself abilities, and few have the choice of situations proper for the improvement of those which nature has bestowed: it is, however, reasonable to have perfection in our eye; that we may always advance towards it, though we know it never can be reached.

Leer, escribir, conversar en las debidas proporciones, es, por lo tanto, incumbencia del hombre de letras. Para todo esto a menudo no hay igual oportunidad; la excelencia, por lo tanto, no siempre se obtiene, y la mayoría de los hombres falla en uno u otro de los fines propuestos, y están terminados sin disposición o sin exactitud. Alguna deficiencia debemos perdonarles a todos, porque todos son hombres; y más debemos dejar pasar sin censura en la mayor parte del mundo, porque nadie se puede conferir a sí mismo habilidades, y pocos pueden elegir situaciones apropiadas para mejorar aquellas que dota la naturaleza: es, sin embargo, razonable tener la perfección como nuestra meta; siempre debemos avanzar hacia ella, aunque sepamos que nunca se puede alcanzar.

Samuel Johnson (1709-1784)

No. 85. Study, composition, and converse equally necessary to intellectual accomplishment. *The Adventurer*, August 28, 1753. En: <http://www.johnsonessays.com/the-adventurer/no-85-study-composition-and-converse-equally-necessary-to-intellectual-accomplishment/>; consultado 23/4/2020.