AAP6133
TESIS
ED2001
A7

UNIVERSIDAD CATÓLICA ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE HUMANIDADES Y EDUCACIÓN
ESCUELA DE EDUCACIÓN
ESPECIALIDAD CIENCIAS BIOLÓGICAS

UCAB Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA CENTRAL - SALA P. PLAZA SJ
PLANTA BAJA - REFERENCIA
Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA
Caracas

ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA INDUCIBLE Y PATRÓN DE CITOCINAS EN LESIONES DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA AMERICANA

Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas

UCAB Universidad Católica Andrés Bello
BIBLIOTECA CENTRAL - SALA P. PLAZA SJ
PLANTA BAJA - REFERENCIA

Autor: Faráh Adriana Arveláez Pérez
Tutor: Felix J. Tapia
Cotutora: Nilka L. Díaz

Caracas, Octubre 2001

En mi carácter de Tutor del trabajo Especial de Grado titulado: **Óxido Nítrico Sintetasa Inducible y patrón de citocinas en lesiones de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana,** realizado por Faráh Adriana Arveláez Pérez, para optar al Título de Licenciado en Educación, Mención Ciencias Biológicas, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a su defensa oral y evaluación por parte del Jurado examinador designado.

En Caracas, a los 15 días del mes de Octubre del 2001

Dr: Felix J. Tapia

C.I.: 3.661.973

A Mamá Rosario (mi inspiración). Aunque no te veo sé que estás conmigo... de no haber sido por ti y por el recuerdo de tus sabias palabras, no hubiera podido culminar este logro. Gracias por nunca hacerme sentir sola. Te quiero y extraño mucho... Adriana (Tu nieta)

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felix Tapia, por sus consejos, sus regaños oportunos y su amabilidad al permitirme trabajar en su laboratorio y compartir sus experiencias. No olvidaré nunca más como se hace una bibliografía se lo prometo.

A Nilka (mi jefesita) por su paciencia, dedicación, sabiduría y amistad. Gracias mil por siempre estar allí y comprender mis angustias o mis debilidades en el trabajo de laboratorio. Eres una persona a la que admiro mucho...

A Richard, Alicia, Mónica, e Iraima por acompañarme en los malos y buenos ratos, por regalarme una sonrisa cuando hacía falta, dedicarme unas cuantas palabras o conversaciones que reconfortan, y darme consejos que hacen sentir a las personas importantes.

A Orquidea por regalarme una sonrisa cada vez que entraba la laboratorio, por pincharme y examinar mis alergias gratis.

A mi hermana Maryam por regañarme cada vez que era preciso, por gastar su celular en llamadas para mí tratando de ubicarme por toda Caracas y sobre todo por ser mi incondicional amiga.

A Paolo por tenerme paciencia y comprender que esta etapa de la carrera no es nada fácil por lo que me ayudaste en muchos momentos importantes.

A mis compañeros de clase por compartir conmigo el estrés y siempre estar pendientes los unos de los otros.

A Gilberto por ser tan especial, por tenerme paciencia, por quererme tanto, por dedicarme parte de su vida y por hacerme sentir un ser fuera de lo común para ti. Te quiero muchísimo...

A mis amigas de infancia Lubba, y Anmar por verme llorar un par de veces y hacerme reir, por llamar y que no les conteste pero seguir intentando y por considerar nuestra amistad por encima de muchas cosas

A mi Padre, a mi Madre y a mi Hermano, los seres mas importantes en mi mundo, gracias por soportarme literalmente en estos días y cuidarme como lo han hecho hasta ahora, sin ustedes no sería lo que soy, ni podría ser lo que seré, los amo...

RESUMEN

La leishmaniasis cutánea americana incluye a un espectro de manifestaciones clínicas, afectando a individuos inmunológicamente respondedores con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) e individuos no respondedores con leishmaniasis cutánea difusa (LCD), cuya respuesta inmune celular es principalmente Th1 y Th2 respectivamente. Las formas intermedias de esta enfermedad se caracterizan por una respuesta inmune celular exagerada, en ocasiones con un compromiso mucocutáneo (LMC) y la leishmaniasis cutánea crónica, usualmente referida a la leishmaniasis cutánea intermedia (LCI). Se ha demostrado que el óxido nítrico (ON) juega un papel importante como mecanismo efector en la eliminación del parásito *Leishmania*. Su producción se lleva a cabo, mediante la acción de citocinas, por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). En el presente trabajo, evaluamos el perfil de citocinas Th1 (IFN-γ, IL-12), Th2 (IL-4, IL-10) y Th3 (TGF-β1), así como la expresión de la iNOS en lesiones de LCL (n=20), LCI (n=10) y LCD (n=3) empleando el sistema de avidina-biotina inmunoperoxidasa sobre cortes congelados. Los resultados muestran que en los pacientes con LCL la densidad de células productoras de IFN-γ (1151 $\pm$78 cel/mm^2) e IL-12 (1326$\pm$77 cel/mm^2) fue mayor ($p \leq 0,05$) que en el resto de los pacientes. Mientras que en los pacientes con LCI y LCD las células IL-4+ (1064$\pm$105 cel/mm^2), IL-10+ (1120$\pm$126 cel/mm^2) y principalmente TGF-β1(998$\pm$134 cel/mm^2) mostraron una mayor densidad ($p \leq 0,05$) que en los pacientes con LCL. Por otra parte se observaron niveles similares en la expresión de iNOS en ambos grupos de pacientes con tendencia a aumentar en los pacientes con LCL. En lo pacientes con LCD no se observaron células IL-12+ y la expresión de IFN-γ e iNOS se observó notablemente disminuida. Los resultados sugieren que las lesiones de LCI están caracterizadas por una mezcla de citocinas Th1/Th2 y un aumento en la producción de citocinas Th3, diferente Al predominio de una respuesta Th1 y Th2 asociados con las lesiones de LCL y LCD respectivamente.

INDICE

INTRODUCCIÓN **3**

LEISHMANIASIS CUTÁNEA 3
EPIDEMIOLOGÍA 5
CLÌNICA 6
RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR 7
ÓXIDO NÍTRICO 9

OBJETIVOS **13**

OBJETIVO GENERAL 13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13

MATERIALES Y MÉTODOS **14**

1. OBTENCIÓN DE BIOPSIAS: 14
2. PROCESO DE INMUNOTINCIÓN: 14
3. ANTICUERPOS: 15
4. CUANTIFICACIÓN CELULAR: 16
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: 16

RESULTADOS **17**

EXPRESIÒN DE LAS CITOCINAS EN LESIONES DE PACIENTES CON LCA 17
EXPRESION DE LA ENZIMA iNOS LESIONES DE LCA 22

DISCUSIÓN **25**

CONCLUSIÓN **34**

BIBLIOGRAFÍA **35**

INTRODUCCIÓN

LEISHMANIASIS CUTÁNEA

La leishmaniasis es una enfermedad producida por un protozoo del género *Leishmania*. Este género pertenece al Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida y Familia Trypanosomatidae. Los que se ubican dentro del orden Kinetoplastida son organismos elongados o esféricos que poseen un único flagelo en la parte anterior de su cuerpo, y tienen además una estructura denominada kinetoplasto que se comunica con una única y extensa mitocondria (Mendoza-León y col. 1996).

Los parásitos de *Leishmania* se presentan bajo formas morfológicamente diferentes: promastigotes y paramastigotes en el vector (mosquitos flebótomos del género Phlebotomus en el Viejo Mundo y el género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo); y amastigotes presentes en los fagolisosomas de macrófagos u otras células presentadoras de antígenos de mamíferos hospedadores. Las formas son identificadas por la disposición del flagelo, siendo entonces los amastigotes organismos esféricos con un flagelo no externo, los promastigotes tienen un kinetoplasto antinuclear y un flagelo emergente de la parte anterior de su cuerpo y los paramastigotes se caracterizan por tener un kinetoplasto paranuclear y un flagelo emergente de la parte anterior del cuerpo (Mendoza-León y col., 1996).

Estos parásitos son transmitidos por la picadura de los flebótomos, los cuales pueden inocular, a través de su proboscis, cerca de 10-200 promastigotes dentro de la epidermis. La mayoría de los promastigotes son destruidos por leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos, pero algunos se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos dérmicos, donde se trasforman en amastigotes y se mueven hacia la vacuolas parasitóforas o fagolisosomas donde pueden resistir la destrucción y multiplicarse, luego los macrófagos estallan y reinfectan otras células (Mendoza-León y col., 1996) (figura 1).

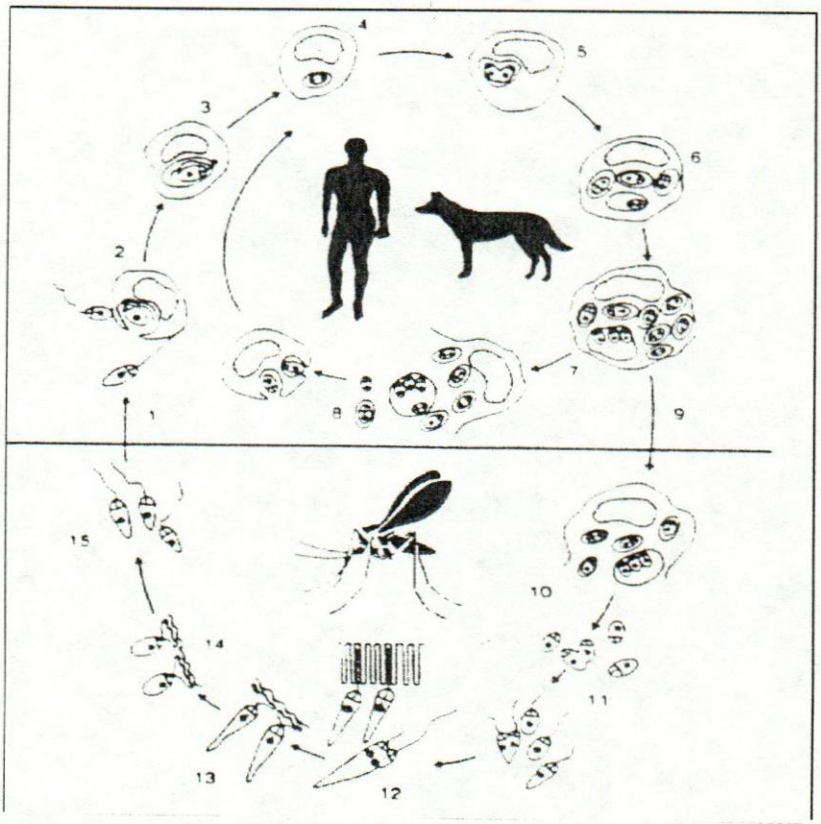


Figura 1. Ciclo de *Leishmania spp.* en los hospedadores vertebrados e invertebrados. (Tomado de Alvar, J. La Leishmaniasis: de la biología al control. Editorial Junta de Castilla y León; España 1997:19).

La leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo, es causada por varias formas de *Leishmania: Leishmania tropica, Leishmania major* y *Leishmania aethiopica.* (Heyneman y McKerrow,1993). La leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo también es conocida como leishmaniasis cutánea americana (LCA), es producida por un grupo de especies relacionadas genéticamente, cada una de las cuales tiene manifestaciones características y áreas endémicas. Todas estas especies pueden causar simples lesiones cutáneas. Las lesiones mucosas son en su mayoría características del subgénero *Viannia,* particularmente *L.(V). brasiliensis* y *L.(V). guyanensis* y *L. (L). amazonesis.* Un tipo de leishmaniasis, la leishmaniasis cutánea difusa es producida por *L.(L). mexicana* en los Estados Unidos, México, América Central y las regiones del Caribe y por *L.(L). amazonesis* y *L.(L) venezuelensis* en América del Sur (Weigle y Saravia, 1996).

EPIDEMIOLOGÍA

La leishmaniasis es considerada como un problema de salud pública, alrededor de 350 millones de hombres, mujeres y niños en 88 países alrededor del mundo están en riesgo de contraer la infección y 12 millones de personas ya están afectadas por esta enfermedad. Sin embargo, esta cifra puede ser superior debido al alto subregistro de casos que existen (Mendoza-León y col., 1996).

La OMS para el año 1999 había estimado una incidencia global anual de 1.5 a 2 millones de casos nuevos por año, en países como Tunicia (norte de África), Turquía (Asia menor), Siria y el noroeste de Brasil con la siguiente distribución:

- 1-1,5 millones de casos de Leishmaniasis cutánea (LC)
- 500.000 casos de Leishmaniasis visceral (LV) (OMS.,1999).

En Venezuela para el año 1999, el Instituto de Biomedicina (MSDS-UCV) había registrado que en los últimos años había una tendencia a la disminución en el número de casos con Leishmaniasis cutánea. Por ejemplo en 1995 se reportaron 2261 casos mientras que en 1998 se registraron sólo un total de 1700 casos (hasta el mes de agosto de ese año). En el año 2001 el Instituto de Biomedicina indicó que el total de casos reportados al finalizar del año 1999 fue de 2653 lo que muestra entonces que hubo un incremento en el número de casos registrados, incremento este que podría explicarse por el período de lluvias que se ha presentado en nuestro país en los últimos años.

Por otro parte el MSDS indicó que para finales del año 2000 el total de casos registrados era 2528, de los cuales el 97% (2449 pacientes) corresponde a pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL), el 1% (29 pacientes) corresponde a pacientes con leishmaniasis cutánea intermedia (LCI) y 0% (6 pacientes) corresponde a pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

CLÌNICA

En la LCA, existe un espectro clínico, histológico e inmunológico, caracterizado por un polo resistente y un polo susceptible. En el polo resistente se encuentran pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que se caracteriza por la aparición de lesiones localizadas y pocos parásitos, estos pacientes responden en forma positiva al tratamiento y en ocasiones curan de forma espontánea. En el polo susceptible se encuentran pacientes que presentan la enfermedad conocida como Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), los cuales se caracterizan por la aparición de numerosas lesiones diseminadas por todo el cuerpo y gran cantidad de parásitos. En la zona central del espectro se distinguen pacientes con leishmaniasis intermedia (LCI) y leishmaniasis mucocutánea (LCM) (Díaz y col.), que comprende formas crónicas atípicas como lúpicas, verrugosas y mucocutáneas, en donde hay una respuesta inmunitaria celular exacerbada y los pacientes pueden o no responder en forma positiva al tratamiento (Convit., 1993).

Histológicamente, los granulomas que se presentan en LCL, están compuestos de una prominente infiltración de linfocitos y un número variable de células epiteliales (Ridley, 1980). En el caso de LCD las lesiones contienen numerosos macrófagos indiferenciados cargados con parásitos y presentan pocos linfocitos y células plasmáticas (Convit y col., 1974). Con respecto a la LCI y LMC, el granuloma se observa como una mezcla de linfocitos y macrófagos, con pocos parásitos y moderados cambios epiteliales, presentan gran número de linfocitos T CD4+, y pocas células de Langerhans (Convit y col., 1972 y 1993, Díaz y col).

RESPUESTA INMUNITARIA CELULAR

El sistema inmunitario cutáneo está compuesto por células inmunocompetentes (células de Langerhans epidérmicas, queratinocitos y linfocitos T); la unidad perivascular dérmica (células endoteliales, pericitos vasculares, linfocitos T, mastocitos y dendrocitos dérmicos); y citocinas interactuantes y quimiocinas (Tapia, y col., 1988).

Los procesos de inmunoregulación en piel ocurren en tres fases: reclutamiento, retención/proliferación y recirculación. La fase de reclutamiento involucra la extravasación de leucocitos a través de la unidad perivascular dérmica, y la subsecuente migración de estas células hacia la epidermis. La fase de retención/proliferación comprende la interacción entre células de Langerhans, queratinocitos, linfocitos T epidermotrópicos y citocinas, y la subsecuente proliferación de linfocitos T y formación de un granuloma o infiltrado dérmico. La fase de recirculación es activada después de la eliminación del insulto antigénico, e involucra la bajorregulación de señales accesorias provenientes de las células de Langerhans y los queratinocitos. Los procesos de inmunoregulación pueden ser afectados por factores como la naturaleza del antígeno, las células presentadoras de antígeno epidérmicas, los linfocitos T efectores y las citocinas. En relación con el patrón de citocinas producido, la respuesta inmunitaria puede ser del tipo Th1 o Th2 (Tapia, y col., 1988).

La comprensión de la epidermis como un sitio de regulación de la respuesta inmunitaria en piel, ha permitido evaluar su participación en varios procesos patológicos (Tapia, y col., 1988).

La respuesta inmunológica en la LCA se ha caracterizado por la producción de anticuerpos específicos contra el parásito y por el desarrollo, en la mayoría de los casos, de reactividad, mediada por linfocitos timo-dependientes sensibilizados. Los pacientes con cualquiera de las formas clínicas de LCA desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la enfermedad, la cual se mantiene durante el curso de la infección y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos. Estudios realizados han demostrado que la cronicidad de la infección contribuye al desarrollo y mantenimiento de niveles relativamente altos de anticuerpos (Ulrich, 1993).

La relación entre las poblaciones de linfocitos T cooperadores-inductores y T supresores-citotóxicos (CD4+/CD8+) entre las distintas formas de la enfermedad muestran valores estadísticamente distintos (Cáceres-Dittmar y Tapia, 1993).

Estudios anteriores han demostrado que existen subpoblaciones de linfocitos T CD4+ denominadas Th1 y Th2, que se caracterizan por producir diferentes patrones de citocinas, los clones de Th1 producen interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IFN-y) y los clones Th2 secretan interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) (Scott y col., 1985; Heinzel y col., 1989; Liew., 1989; Scott, 1990).

Actualmente algunas investigaciones sostienen que además existe una subpoblación de linfocitos Th3, los cuales se caracterizan por la producción de una citocina supresora conocida como el factor-β transformador del crecimiento (TGF-β), (Pozo y col. 1998). Esta citocina es potencialmente importante porque antagoniza muchas respuestas de los linfocitos, así como también puede inhibir la activación de los macrófagos, pudiendo entonces facilitar la proliferación de la infección (Abbas y col. 1995).

La producción de citocinas tipo Th1 inducen la activación de macrófagos los cuales cumplen la función de eliminar a los parásitos *Leishmania* por la vía de la síntesis de derivados reactivos del nitrógeno o del oxígeno (Lohoff y col. 1998), esto corresponde al tipo de respuesta que se presenta en los pacientes que se encuentran en el polo resistente de la enfermedad, de igual forma se ha encontrado que aquellos pacientes que se encuentran en el polo susceptible tienen una respuesta tipo Th2 que bajorregulan la activación de macrófagos. Se ha demostrado que la respuesta inmunológica del tipo Th1 favorece la inmunidad mediada por células, mientras que la respuesta del tipo Th2 favorece la síntesis de anticuerpos, por lo que se espera entonces que en las formas susceptibles de la enfermedad, con respectivas manifestaciones clínicas crónicas, presenten títulos de anticuerpo mayor a la forma resistente. Con respecto a la forma intermedia o LMC se puede decir que existe presencia de respuesta inmunológica pero exagerada y no adecuada para el control de la enfermedad (Castés y col., 1993; Castés y col., 1994; Cabrera, 1998).

Con todo lo anterior se entiende que los pacientes con LCL tiene un patrón de respuesta inmunológica Th1, los pacientes con LCD un patrón Th2 y los pacientes con LMC muestran una mezcla de citocinas de Th1 y de Th2.

Como se ha descrito anteriormente la respuesta Th1 se caracteriza por presentar un patrón de citocinas que inducen la respuesta de inmunidad celular estimulando la defensa del huésped por fagocitos (hipersensibilidad tardía y activación macrofágica). El tipo de respuesta Th2 se caracteriza por presentar un patrón de citocinas, las cuales están asociadas con la producción de anticuerpos para la inmunidad humoral, estimulando la defensa del huésped independientemente de los fagocitos (Convit y col., 1993; Ulrich, 1993).

Se ha demostrado que la generación de resistencia o susceptibilidad a la infección de *L. major* es muy dependiente de la producción de citocinas Th1 y Th2 y se requiere de ciertos niveles de IFN-γ para lograr la cura de la infección y la producción de IL-4 para inducir susceptibilidad (Fiorentino y col., 1989).

ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico (ON) juega un papel importante como mecanismo efector en la eliminación del parásito (Fernández y col., 2000). El mismo es un radical libre en estado gaseoso cuyas funciones biológicas, en general, se pueden dividir en dos grandes categorías. Primero, el ON actúa como un mensajero intercelular al regular el tono vascular, la activación de las plaquetas, las respuestas inmunes como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Segundo, sintetizado en grandes cantidades por macrófagos activados, es una molécula citotóxica implicada en la eliminación de bacterias, virus y protozoos, así como de células tumorales. El ON es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y del oxígeno molecular en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintetasa (NOS) como consecuencia de la oxidación, al ceder 5 electrones, el nitrógeno guanino de L-arginina. (Pozo y col., 1998) (figura 2).

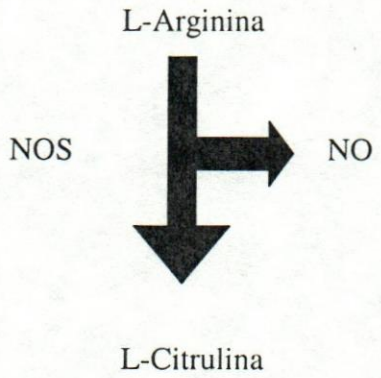


Figura 2. Mecanismo de síntesis de NO a partir de NOS.

Existen al menos dos tipos de NOS. La forma calcio-dependiente está presente constitutivamente en una gran variedad de tejidos y produce concentraciones fisiológicas de ON. La forma calcio-independiente es inducible, (por lo que recibe el nombre de óxido nítrico sintetasa inducible, iNOS), que es estimulada por diversas citocinas como IFN-γ, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), factor inhibidor de migración (MIF) y lipopolisacárido bacteriano (LPS) en diversos tipos celulares; macrófagos, hepatocitos, neutrófilos y células endoteliales. Una vez activadas estas células producen, por tiempo prolongado, una gran cantidad de ON para combatir agentes infecciosos y probablemente tumores (Pozo y col., 1998).

La expresión de la iNOS se han observado en enfermedades inflamatorias crónicas de riñón, corazón, piel entre otros, en donde se han establecido relaciones con los macrófagos, pero en la mayoría de los casos se ha identificado asociado con las células epiteliales que se encuentran alrededor del foco inflamatorio. Se ha demostrado que existe una relación estrecha entre la aparición de la iNOS y el tipo de respuesta Th1 pudiendo coincidir esto con la capacidad de los pacientes que se encuentran en el polo resistente de la enfermedad para destruir al parásito (Kroncke y col., 1998).

La producción de IFN-γ conduce a la activación de macrófagos y la eliminación de los parásitos por la vía del óxido nítrico, siendo esto posiblemente la razón por la cual el mecanismo de eliminación del parásito sea mucho más eficiente en los pacientes que

posean este patrón de citocinas (figura 3), mientras que la IL-4 e IL-10 bajorregulan a los macrófagos, inhibiendo la producción de óxido nítrico que traería como consecuencia la multiplicación de los parásitos con la respectiva propagación de las lesiones (Fernández y col., 2000).

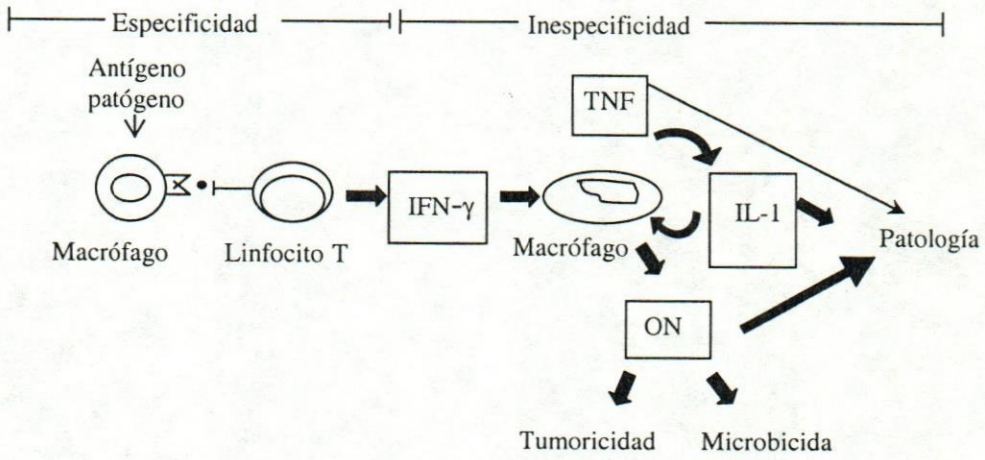


Figura 3. Especificidad e inespecificidad del mecanismo efector del óxido nítrico: La infección por un antígeno patógeno permite la expansión monoclonal de linfocitos T, una vez que los macrófagos les han presentado este antígeno, luego los linfocitos T secretan citocinas como IFN-γ, que estimula a los macrófagos a que producir otras citocinas como TNF-α e IL-1 que en conjunto pueden inducir a los macrófagos a eliminar células tumorales u organismos patógenos (Liew y Cox., 1989).

Estudios anteriores han demostrado que la vía de la síntesis de ON es la más eficiente que tienen los macrófagos en cuanto ha eliminación del parásito de *Leishmania* se refiere en modelos murinos.

En la leishmaniasis cutánea experimental el papel del NO como mecanismo principal de eliminación de los parásitos está bien documentado, sin embargo en la leishmaniasis cutánea humana ha sido controversial su participación. Esto se ha debido a la dificultad en estimar concentraciones de NO por diferencias en los métodos de medición, estado de madurez de los macrófagos, la purificación de los mismos, entre otros, que dificultan su estudio in vivo en las lesiones de pacientes infectados con las distintas formas clínicas de la enfermedad (Dugas y col., 1995).

Tomando en cuenta todas las evidencias sobre el mecanismo de eliminación del parásito, se hace necesario, correlacionar el patrón de citocinas y los niveles de óxido nítrico sintetasa inducible en las lesiones de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Americana, para la mejor compresión de la inmunopatología de esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el patrón de citocinas en lesiones de pacientes con Leishmaniasis cutánea localizada, intermedia y difusa, relacionándolas con la producción de óxido nítrico sintetasa inducible.

Objetivos específicos

1. Estudiar el patrón de citocinas tipo Th1 (IFN-γ, Il-12), Th2 (IL-4, IL-10) y Th3 (TGF- β1), en las lesiones de pacientes con diferentes formas clínicas de Leishmaniasis Cutáneo Americana, utilizando procedimientos inmunocitoquímicos.
2. Evaluar la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en lesiones de pacientes que presenten las formas clínicas, utilizando procedimientos inmunocitoquímicos.
3. Determinar el tipo de correlación existente entre la expresión del patrón de citocinas y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible en las lesiones de pacientes con las diferentes formas clínicas de leishmaniasis cutáneo americana

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de biopsias:

Los pacientes serán evaluados en la consulta de Leishmaniasis del Servicio de Dermatología del Instituto de Biomedicina, se les tomará una biopsia y luego serán incluidas en un medio de criopreservación Cryomatrix TM (Shandon, EEUU), para ser congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido, luego se les realizarán cortes de 4 μm de espesor en un criostato a -30^0C, a los que se les aplicará el estudio inmunocitoquímico. Estos pacientes corresponden al periodo comprendido entre el año 2000-2001

2. Proceso de Inmunotinción:

Fijación de los cortes histológicos en acetona durante 5 min.

Inmersión de los cortes en cubetas con PBS durante 5 min.

Incubación con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Lavado los cortes con PBS durante 5 min.

Incubación de los cortes con el anticuerpo secundario durante 30 min. a temperatura ambiente.

Lavado de los cortes con PBS durante 5 min.

Incubación con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa durante 15 min. a temperatura ambiente: en 1 ml PBS agregar:

10 μl Avidina

10 μl de Biotina + Peroxidasa, luego agitar con el vortex.

Lavado de los cortes con PBS durante 5 min.

Revelado de los cortes durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Solución de revelado: en 5 ml de agua destilada agregar de los productos Vector NovaRED para peroxidasa (sk4800):

3 gotas de reactivo 1 agitar

2 gotas de reactivo 2 agitar

2 gotas de reactivo 3 agitar

2 gotas de peróxido de hidrógeno

Lavado de los cortes con agua destilada.

Contraste con hematoxilina de mayer por 5 min.

Lavado con agua destilada por 5 min.

Deshidratación de las muestras con: Alcohol al 70 % por 2 min.

Alcohol al 99% por 2 min.

Xilol 1 por 2 min.

Xilol 2 por 2 min.

Montaje en láminas con DPX o entellan.

3. Anticuerpos:

3.1 Primarios:

a. **Interleucina 4 (IL-4):** Anticuerpo monoclonal IgG de ratón. Dilución 1/100, R & D System, EEUU.

b. **Interferón γ (IFN– γ):** Anticuerpo policlonal IgG de cabra. Dilución 1/100, R & D System, EEUU.

c. **Interleucina 10 (IL-10):** Anticuerpo monoclonal IgG de ratón. Dilución 1/20, R & D System, EEUU.

d. **Interleucina 12 (IL-**12): Anticuerpo policlonal IgG de cabra. Dilución 1/100, R & D System, EEUU.

e. **Factor transformador del crecimiento (TGF-β1):** Anticuerpo monoclonal IgG de ratón. Dilución 1/100, R & D System, EEUU.

f. **Oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS):** Anticuerpo policlonal de conejo. Dilución 1/500, Serotek, Reino Unido.

3.2 Secundarios:

a. **IgG de cabra:** Anticuerpo policlonal biotinado anti IgG de cabra producido en caballo. Dilución 1/30. Vector, EEUU.

b. **IgG de ratón:** Anticuerpo policlonal biotinado anti IgG de ratón producido en caballo. Dilución 1/30. Vector, EEUU

c. **IgG de conejo:** Anticuerpo policlonal biotinado anti IgG de conejo producido en cabra. Dilución 1/30. Vector, EEUU.

4. Cuantificación celular:

El contaje de células, se realizó bajo un microscopio óptico (Nikon 235788), equipado con una retícula milimetrada (Carl Zeiss, Alemania), calibrada para determinar el número de células/mm^2 presentes en la epidermis o en la dermis. Aquellas células con núcleo visible que presentaron una tinción roja para marcaje simple fueron contadas como positivas. Con la finalidad de obtener una muestra representativa de las lesiones, se contaron 10 campos por cada corte utilizando un aumento de 40X.

5. Análisis estadístico:

Los resultados de la caracterización inmunocitoquímica fueron expresados como la media $\pm$ SEM (error estándar de la media). Las medias fueron calculadas en base a los valores individuales de cada paciente.

La comparación entre los grupos se realizó aplicando el test de Mann-Whitney y el análisis de correlación no paramétrico de Spearman por medio de un programa computarizado (GraphPad sotfware, San Diego, California, EEUU)

RESULTADOS

EXPRESIÒN DE LAS CITOCINAS EN LESIONES DE PACIENTES CON LCA

Las células productoras de IFN-γ en los pacientes con LCL mostraron una densidad de 1.151±78 cel/mm^2 representando un 29% de las células en el granuloma, observándose un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto a los pacientes con LCI (791±146 cel/mm^2). En las células productoras de IL-12, también se observó una mayor densidad ($p \angle 0,05$) en los pacientes con LCL (1.326±77 cel/mm^2), (tabla 1, figura 4). Igualmente en los pacientes con LCL ($r = 0.7364$ y $p = 0.0001$) y LCI ($r = 0.8810$ y $p = 0.0072$) se estableció una correlación positiva estadísticamente significativa entre las citocinas IFN-γ e IL-12. De los tres pacientes con LCD estudiados sólo en uno se pudo cuantificar las citocinas, observándose pocas células IFN-γ positivas (31 cel/mm^2) y ausencia de células IL-12 positivas (tabla 1, figura 5).

El 60% de los pacintes con LCL presentó inmunoreactividad para IFN-γ y el 80% para IL-12 en los queratinocitos. Mientras que el 40% de los pacientes con LCI presentaron queratinocitos IFN-γ positivos y el 60% presentó queratinocitos IL-12 positivos (tabla 2). Los queratinocitos IFN-γ e IL-12 positivos representan un 11% y un 19% respectivamente del total de las células epidérmicas. Mientras que en los pacientes con LCI los queratinocitos IFN-γ e IL-12 positivos representan un 4% y un 13% respectivamente de las células epidérmicas (tabla 4).

Un bajo porcentaje de pacientes con LCL mostraron células dendríticas epidérmicas INF-γ (5%) e IL-12 (30%) positivas y LCI (10%), mientras que en los pacientes con LCD no se observó reactividad en la epidermis para estas citocinas (tabla 3). Se observó una baja densidad de las células dendríticas epidérmicas IFN-γ positivas tanto en los pacientes con LCL (9 cel/mm^2) como en los pacientes con LCI (5 cel/mm^2). De igual forma se observó una baja densidad de las células dendríticas epidérmicas IL-12 positivas en LCL (21 cel/mm^2) y en LCI (17 cel/mm^2) (tabla 5).

Tabla 1. *Poblaciones celulares productoras de IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4, y TGF-β1 en pacientes con LCL y LCI*

	Cel/mm^2 ± SEM (%) en lesiones de LCL	Cel/mm^2 ± SEM (%) en lesiones de LCI	Cel/mm^2 en lesiones de LCD	P
IFN-γ	(1151±78) 29 %	(791±146) 20%	31	≤ 0,05
IL-12	(1326±77) 33%	(831± 155) 21%	0	≤ 0,05
IL-10	(495±51) 12%	(1120±126) 28%	68	≤ 0,05
IL-4	(501±66) 13%	(1064±105) 27%	109	≤ 0,05
TGF-β1	(636±105) 16%	(998±134) 25%	300	≤ 0,05

Figura 4. Densidad de células productoras de citocinas Th1 en los pacientes con LCL y LCI

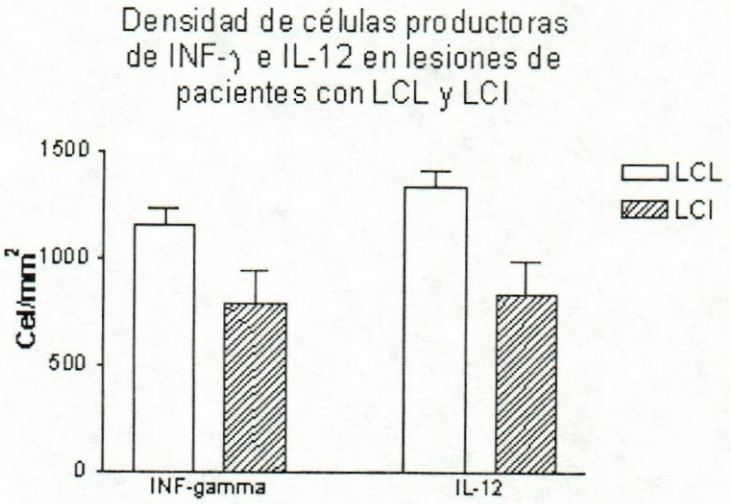


Tabla 2. *Porcentaje de pacientes con LCL y LCI con queratinocitos INF-γ, IL-12, IL-10, IL-4, y TGF-β1 positivos*

	% de Pacientes con LCL	% de Pacientes con LCI
IFN-γ	60	40
IL-12	80	60
IL-10	50	70
IL-4	55	50
TGF-β1	0	0

Tabla 3. *Porcentaje de pacientes con LCL y LCI con Células Dendríticas epidérmicas IFN-γ, IL-12, IL-10, IL- 4, y TGF-β1 positivas*

	% de Pacientes con LCL	% de Pacientes con LCI
IFN-γ	5	10
IL-12	30	10
IL-10	30	60
IL-4	20	20
TGF-β1	0	0

Tabla 4. *Porcentaje de Queratinocitos INF-γ, IL-12, IL-10, IL-4, y TGF-β1 positivos en pacientes con LCL y LCI*

	% de Queratinocitos + en LCL	% de Queratinocitos + en LCI
IFN-γ	11	4
IL-12	19	13
IL-10	5	7
IL-4	6	26
TGF-β1	0	0

Tabla 5. *Densidad de Células Dendríticas productoras de IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-4, y TGF-β1 en pacientes con LCL y LCI.*

	Células dendríticas + en LCL (Cel/mm^2)	Células dendríticas + en LCI (Cel/mm^2)
IFN-γ	9	5
IL-12	21	17
IL-10	22	109
IL-4	0	11
TGF-β1	0	0

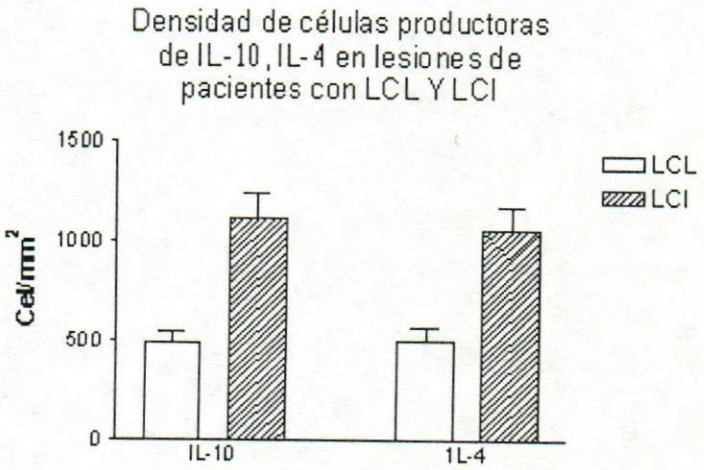
Las células productoras de IL-10 en los pacientes con LCL mostraron una menor densidad (495±51 cel/mm^2) ($p<0,05$) con respecto a los pacientes con LCI (1.120±126 cel/mm^2). De igual forma se observó una menor ($p<0,05$) densidad de células IL-4 positivas (501±66 cel/mm^2) en los pacientes con LCL en comparación con los pacientes LCI (1.064±105 cel/mm^2) (figura 6 y 7, tabla 1). En LCD se observó un predomino en la expresión de IL-4 (109 cel/mm^2) e IL-10 (68 cel/mm^2) con respecto a INF-γ e IL-12 (tabla 1).

El 55% de los pacientes con LCL presentaron pocos queratinocitos IL-4 positivos representando el 6% de las células epidérmicas. Sin embargo en el 50% de los pacientes con LCI se observó una mayor población de queratinocitos IL-4 positivos (26%).

En el caso de IL-10, el 70% de los pacientes con LCL presentaron queratinocitos positivos representados por un 5% de las células epidérmicas y el 50% de los pacientes con LCI presentaron pocos queratinocitos IL-10 positivos (7%) (tablas 2 y 4).

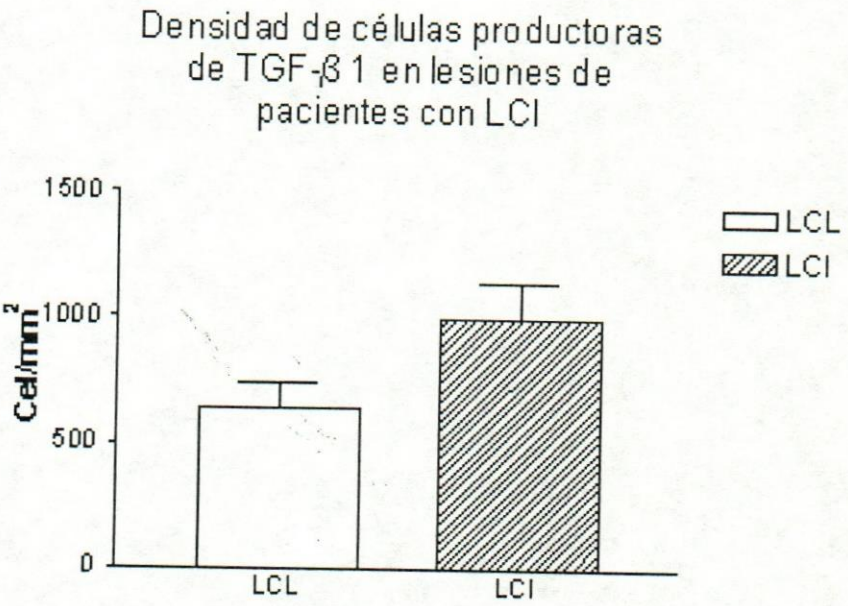
Con respecto a las poblaciones de células dendríticas se observó que el 20% de los pacientes con LCI presentaron pocas células dendríticas epidérmicas IL-4 positivas (11 cel/mm^2), a diferencia de los pacientes con LCL donde estuvieron ausentes. El 30% de los pacientes con LCL presentaron baja densidad de células dendríticas epidérmicas IL-10 positivas (22 cel/mm^2), mientras que el 60% de los pacientes con LCI presentaron una mayor densidad de las mismas (109 cel-mm^2) (tabla 3). En LCD no se observó inmunoreactividad en la epidermis para IL-10 e IL-4.

Figura 6. Densidad de células productoras de citocinas Th2 en pacientes con LCL y LCI



Las células productoras de TGF-β1 en los pacientes con LCL mostraron una menor densidad (636±105 cel/mm^2) ($p<0,05$) con respecto a los pacientes con LCI (998±134 cel/mm^2) (tabla 1, figura 8 y 9). No se observaron células dendríticas epidérmicas o queratinocitos positivos en ambos grupos de pacientes, a diferencia de los pacientes con LCD en los que se encontraron algunos queratinocitos positivos y células positivas para la expresión de TGF–β1 (300 cel/mm^2) en el granuloma.

Figura 8. Densidad de células productoras de citocinas Th3 en pacientes con LCL y LCI



EXPRESION DE LA ENZIMA iNOS LESIONES DE LCA

En los pacientes con LCL y LCI no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de iNOS, sin embargo existe una tendencia a la disminución en la expresión de esta enzima en los pacientes con LCI (tabla 6). En el caso de los pacientes con LCD se observaron pocas células iNOS positivas en el granuloma (63 cel/mm^2) (figura 10). En estos pacientes no se observó inmunoreactividad en la epidermis, mientras que en el 90% de los pacientes con LCL y en el 80% con LCI se pudo observar

queratinocitos iNOS positivos representando un 34% y 15% del total de las células epidérmicas respectivamente (tabla 7, 9 y figura 11).

El 10% de los pacientes con LCL y LCI mostró escasas células dendríticas epidérmicas positivas para iNOS (17 cel/mm^2 y 12 cel/mm^2 respectivamente) (tabla 8 y 10).

El análisis de correlación pudo determinar que en los pacientes con LCL existe una correlación positiva y significativa entre la expresión de iNOS y la expresión de IL-12 ($r = 0.7619$ y $p = 0.0062$) (figura 12), a diferencia de IFN-γ en donde no se pudo determinar ningún tipo de correlación con respecto a la expresión de iNOS, así como tampoco se observó correlación alguna entre la expresión de iNOS y la expresión de las citocinas tipo Th2 y Th3 estudiadas.

Al realizar el análisis de correlación en los pacientes con LCI se determinó que existe una correlación positiva significativa entre la expresión de iNOS y la expresión de IFN-γ ($r = 0.8810$ y $p = 0.0368$), e IL-12 ($r = 0.7619$ y $p = 0.0368$) (figura 8). En los pacientes con LCL no se observó correlación entre la expresión de iNOS y la expresión de la citocinas tipo Th2 y Th3 estudiadas.

Tabla 6. Expresión de iNOS en pacientes con LCL y LCI

	Cel/mm^2 ± SEM (%) en lesiones de LCL	**Cel/mm^2 ± SEM (%) en lesiones de LCI**	**Cel/mm^2 en lesiones de LCD**	**P**
INOS	(1373±77 cel/mm^2) 34%	(1222±190 cel/mm^2) 31%	63	No es significativa

Tabla 7. *Porcentaje de pacientes con LCL y LCI con queratinocitos iNOS positivos*

	% de Pacientes con LCL	**% de Pacientes con LCI**
INOS	90	80

Tabla 8. *Porcentaje de pacientes con LCL y LCI con Células Dendríticas*

	% de Pacientes con LCL	% de Pacientes con LCI
INOS	10	10

Tabla 9. *Porcentaje de Queratinocitos iNOS positivos en pacientes con LCL y LCI*

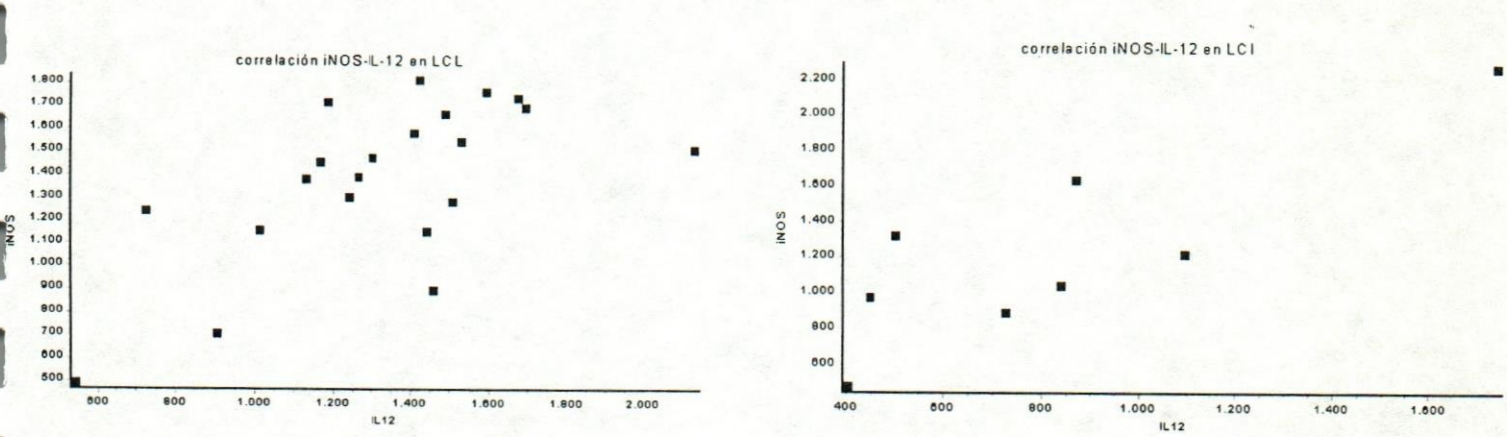
	% de CD + en LCL	% de CD + en LCI
INOS	34	15

Tabla 10. *Población de Células Dendríticas productoras de iNOS en pacientes con LCL y LCI*

	Células dendríticas + en LCL (Cel/mm^2)	Células dendríticas + en LCI (Cel/mm^2)
INOS	17	12

Figura 12. Análisis de correlación entre iNOS e IL-12 en los pacientes con LCL (a) y en LCI (b)

(a) (b)



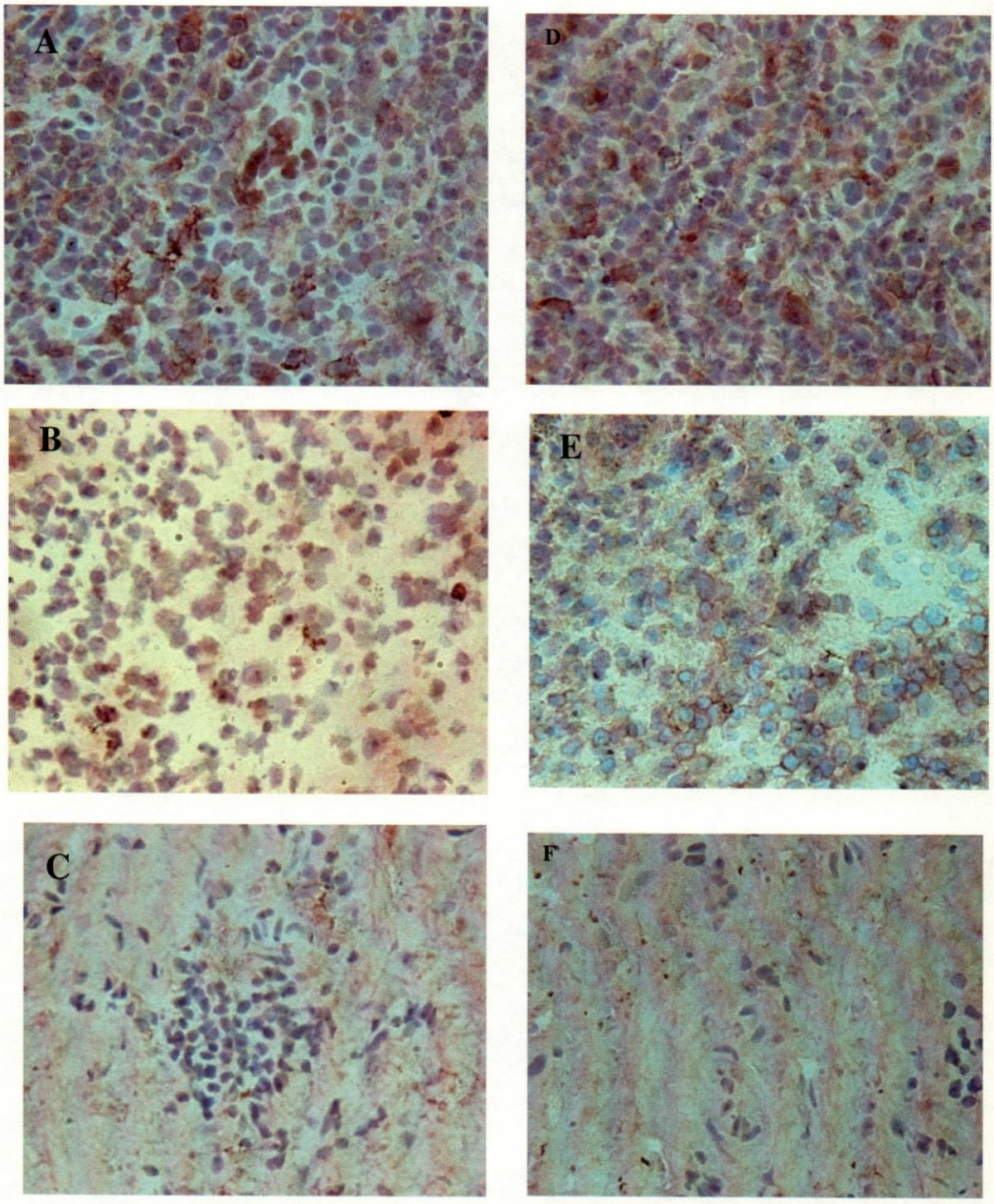


Figura 5. Expresión de las IFN-γ en lesiones de LCL (A), LCI (B) y LCD (C) y de IL-12 en lesiones LCL (D), LCI (E) y LCD (F). 40X

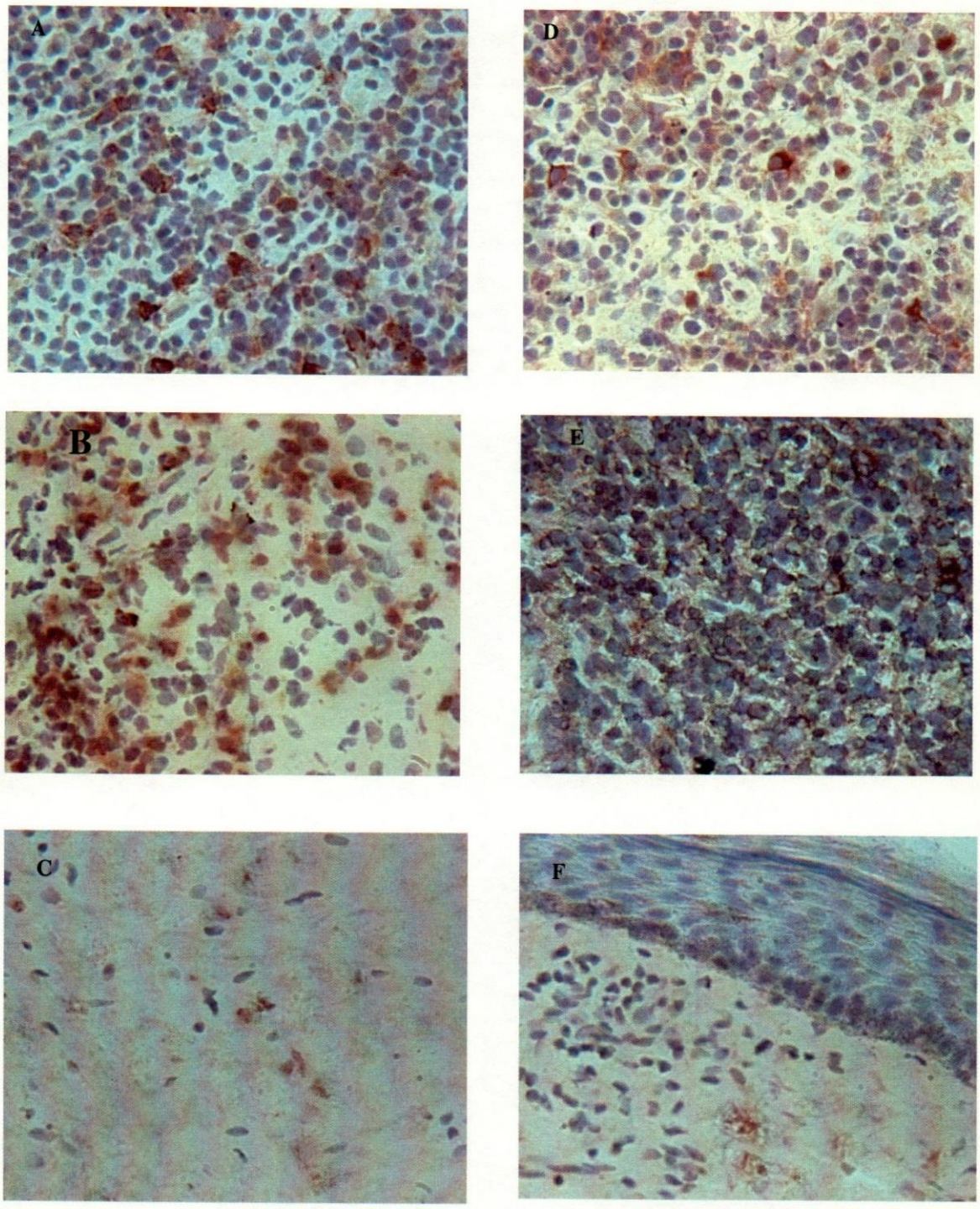


Figura 7. Expresión de IL-4 en lesiones de LCL (A), LCI (B) y LCD (C) y de IL-10 en lesiones LCL (D), LCI (E) y LCD (F). 40X

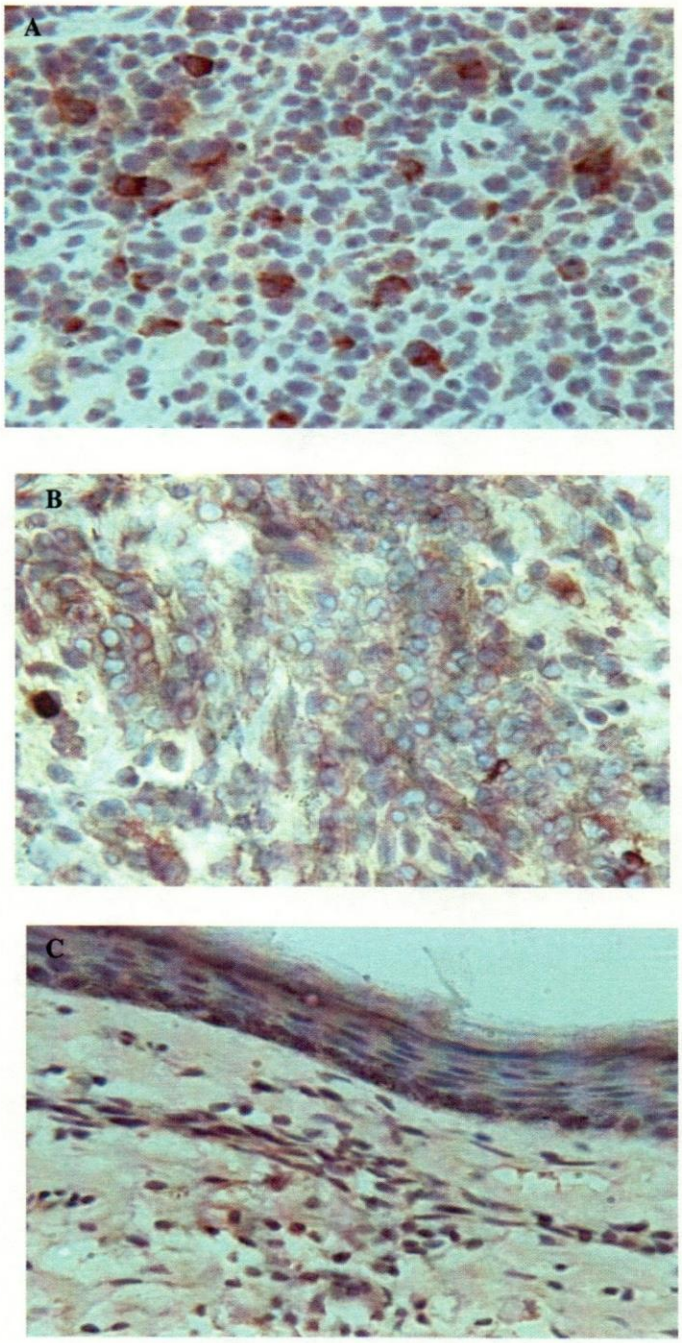


Figura 9. Expresión de TGF-β1 en lesiones de LCL (A), LCI (B) y LCD (C)

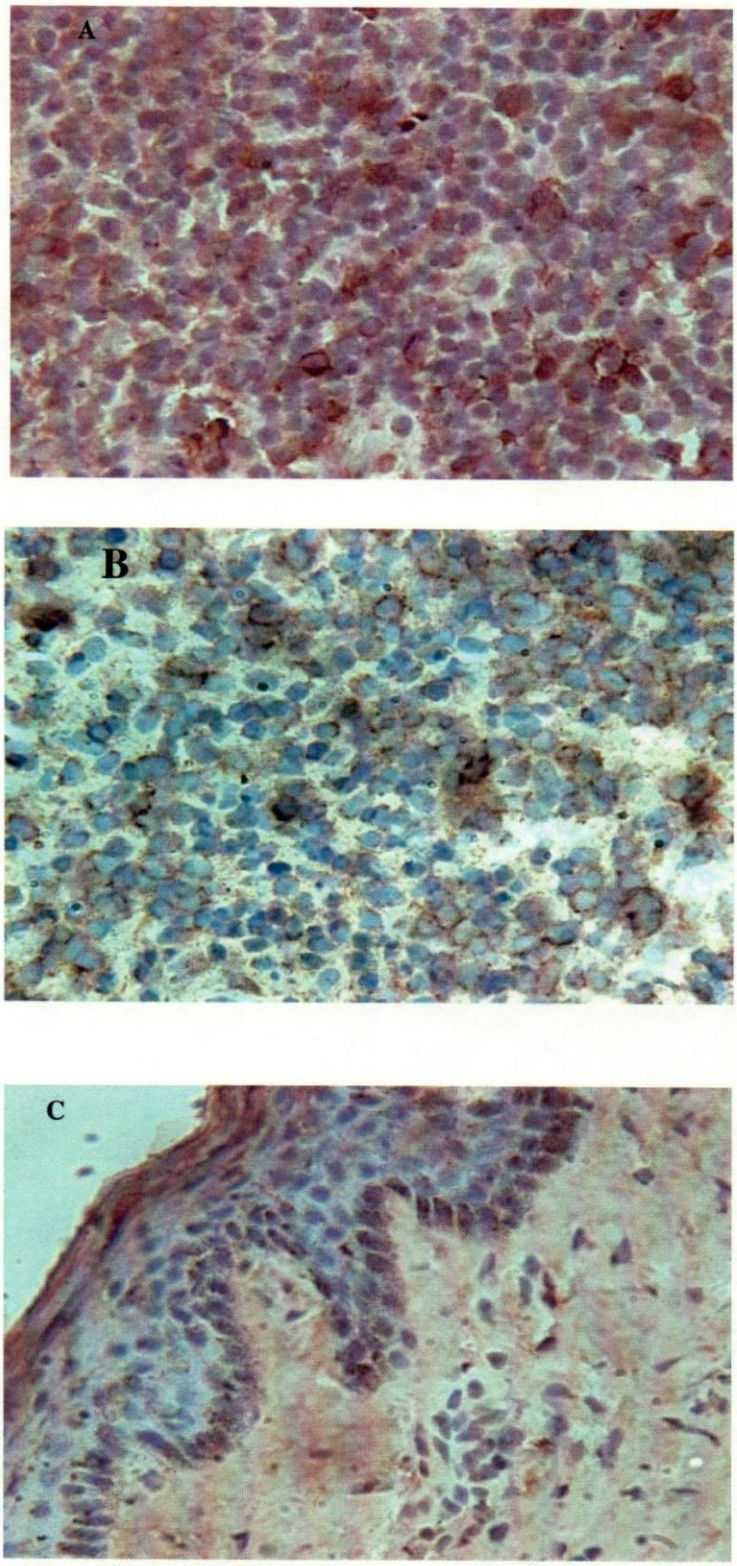


Figura 10. Expresión de iNOS en lesiones de LCL (A), LCI (B) y LCD (C)

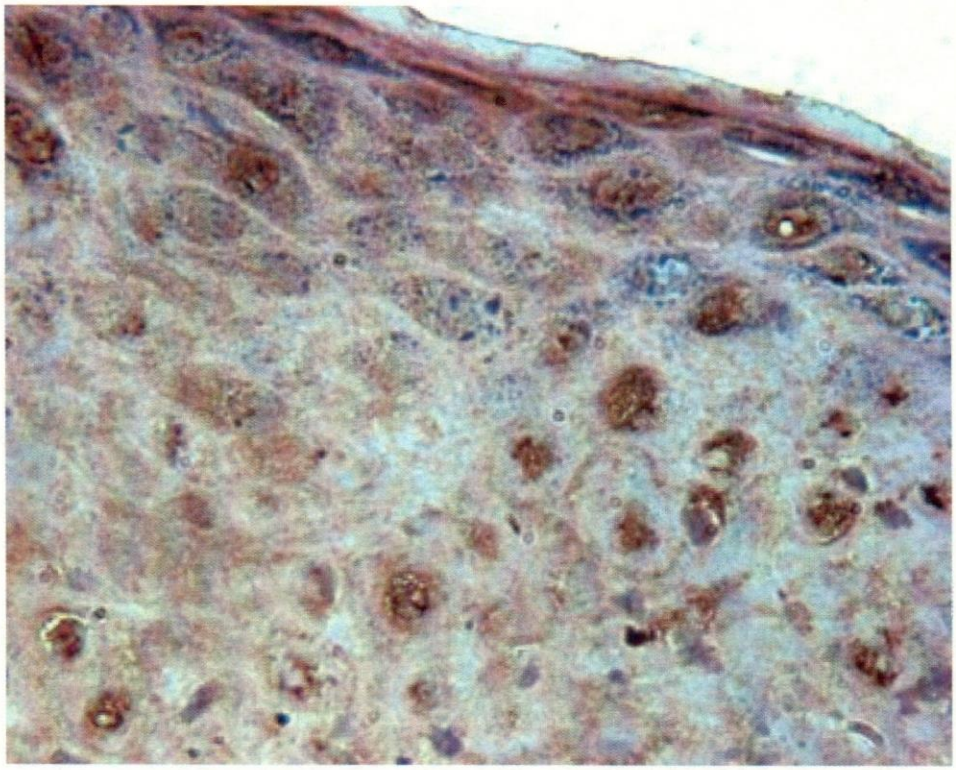


Figura 11. Queratinocitos iNOS + en lesión de LCI

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que los pacientes con LCL tienen una respuesta inmunitaria tipo Th1 caracterizada por el predominio de citocinas IL-12 e IFN-γ, lo cual conduce a la curación de las lesiones en estos pacientes, ya sea espontaneamente o luego de una terapia apropiada (Castés y col., 1983; Castés y col., 1984; Castés y col., 1987). Los pacientes con LCD tienen una respuesta tipo Th2 caracterizada por el predominio de IL-4 e IL-10, que conducen a que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección, permitiendo la diseminación del parásito por toda la superficie cutánea (Castés y col., 1987; Castés y col., 1996). Los resultados también demuestran que en los pacientes con LCI existe una mezcla de citocinas Th1 y Th2 con un predominio de las citocinas tipo Th2, esta situación puede ser la responsable de la no resolución de la enfermedad en estos pacientes, ya que cuando ambos tipos de citocinas se producen es posible que las citocinas tipo Th2 predominen sobre las tipo Th1 (Castés y col, 1983; Castés y col, 1984; Castés y col., 1987; Díaz y col.,)

La correlación positiva que existe entre IFN-γ e IL-12 demuestra la relación que existe ente estas dos citocinas predominantes en la respuesta Th1. Se ha demostrado que la IL-12 induce la transcripción de IFN-γ por las células NK y estimula la diferenciación de linfocitos T CD4+ nativos al subgrupo Th1 (Abbas y col., 1995). Recientemente se han estudiado los estudiado los posibles efectos de IL-12 sobre los macrófagos y su modulación por IFN-γ, demostrando que la expresión de IFN-γ produce un incremento en la expresión de los sitios de unión de IL-12 en la superficie del macrófago y que IL-12 posee una actividad autoregulatoria sobre los macrófagos aunque esta puede ser reforzada por IFN-γ (Jones y col., 1998; Grohmann y col., 2001).

Varios investigadores coinciden en que la expresión de IL-12 afecta la función presentadora de antígeno de las células dendríticas en varias formas, incluyendo la producción autocrina y el incremento en la expresión superficial del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y las moléculas coestimuladoras. La producción temprana de IL-12 por las células presentadoras de antígeno es uno de los los eventos importantes de la

iniciación de la respuesta inmunitaria (Macatonia y col., 1995; Grohmann y col., 1998; Galon y col., 1999). Por otro lado Will y col. (1992) sostienen que la presencia de parásitos en la piel induce la producción local de IFN-γ, promoviendo la expresión de ICAM-1 y HLA-DR por los queratinocitos y la migración de linfocitos T epidermotrópicos. Además, las células de Langerhans, como potentes células estimuladoras de linfocitos T *Leishmania*-específicos, promueven una respuesta efectiva tipo Th1. Una vez que el parásito es eliminado, las señales accesorias epidérmicas son bajorreguladas, proceso que induce la cura de la inmunopatología cutánea causante de la lesión. Esto pudiese explicar, por una parte, que la mayoría de los pacientes con LCL mostraron queratinocitos IL-12+ e IFN-γ+, lo que corresponde con la fase de retención/proliferación de los procesos de inmunoregulación que ocurren en la piel (Tapia, y col., 1994). Y por otra parte, la ausencia de inmunoreactividad en la epidermis de los pacientes con LCD donde existe un predominio en la producción de citocinas tipo Th2 que favorecen la inmunidad humoral (Convit y col, 1993). La ausencia de células dendríticas epidérmicas pudiera causar una transducción inadecuada y deficiente de las señales necesarias para cumplir la fase efectora de la respuesta inmunitaria (Tapia, y col., 1988).

Como se mencionó anteriormente las citocinas IL-4 e IL-10, se observaron en mayor proporción en los pacientes con LCI demostrando una mezcla de citocinas Th1 y Th2 con predominio de citocinas Th2. Giaconini y col (2001), sugieren que la expresión de IL-10 produce una inhibición en la síntesis de IL-12 por las células mononucleares humanas. En este trabajo se observó una disminución significativa en la expresión de IL-12 en los pacientes con LCI. Por otra parte previas investigaciones sustentan que una de las funciones principales de la citocina IL-10 es inhibir la actividad macrofágica en la producción de citocinas tipo Th1. Otra de las funciones de la IL-10 es inhibir las funciones accesorias de los macrófagos en la activación del linfocito T (Abbas y col., 1995). La secreción de IL-10 bajorregula las señales accesorias de las células presentadoras de antígeno y la producción de citocinas Th1, previniendo la acción efectora del IFN-γ (Romagnani,1992).

Himmelrich H. y col. (2000), demostraron que la ausencia de IL-4 durante la etapa temprana de la infección con *Leishmania*, permite el aumento de los niveles de IL-12 y el

desarrollo de una respuesta tipo Th1, pero que al aumentar la expresión de IL-4 los niveles de IL-12 comienza a decrecer y predomina entonces una respuesta tipo Th2. Aunque en el presente trabajo no se estudio la evolución de las lesiones de los pacientes con LCL, LCI y LCD, se observó una mayor proporción de las células IL-4+ en el granuloma con respecto a las células IL-12 positivas en los pacientes con LCI. Al comparar la expresión de las citocinas Th1 y Th2 en el granuloma de los pacientes con LCD se observó que hubo un predominio mucho mayor de células IL-4 positivas sobre las células IL-10 positivas y una total ausencia de células IL-12 positivas que favorece el predominio de una respuesta tipo Th2.

Okragly y col. (1994), han descrito que TGF-β1 posee una actividad proinflamatoria y una actividad antinflamatoria, así como también inhibe la proliferación de linfocitos T y B y la maduración y activación de los macrófagos. También se ha observado que esta citocina juega un papel muy importante en la respuesta inmunitaria que se desarrolla contra patógenos intracelulares, promoviendo el desarrollo de la infección. Esto pudiese explicar porque en los pacientes con LCI y LCD se observó una mayor producción de células TGF-β1+ en la lesión en comparación con los pacientes con LCL.

TGF-β1 tiene efectos reguladores sobre un gran espectro celular, es una citocina multifuncional que posee mecanismos paracrinos y autocrinos, con actividad estimuladora e inhibidora de la replicación celular, además de intervenir en la migración celular. Todos estos eventos son esenciales en la reparación tisular. Algunas investigaciones han permitido demostrar que en ratones TGF-β1 "knockout" se desarrolla un síndrome inflamatorio severo caracterizado por la migración masiva del infiltrado leucocitario a los órganos vitales que conduce a la muerte del animal, lo cual pudiese explicar la producción de células TGF-β1+ en las lesiones de los pacientes con LCL, ya que esta citocina frena la activación macrofágica una vez controlada la infección parasitaria (Okragly y col., 1994).

Por otro lado, Cottrez y Groux describieron que existe una correlación positiva y significativa entre la producción de IL-10 y TGF-β1 explicando así, el control de los linfocitos T sobre al activación de los sitios inflamatorios crónicos y agudos. En la presente

investigación no se observó ningún tipo de correlación entre estas dos citocinas a pesar del aumento significativo de las mismas en los pacientes con LCI y LCD.

El mecanismo de defensa contra el parásito más efectivo lo realizan los macrófagos activados por citocinas que estimulan la producción de iNOS y con ella la producción de ON. Las citocinas que intervienen en la destrucción del parásito intracelular son esencialmente las tipo Th1 en especial IFN-γ, la cual es producida por los linfocitos T y activa al macrófago para la producción del TNF-α, el cual estimula a su vez al macrófago a sintetizar ON destruyendo al parásito. (Cox y Liew, 1989; Kroncke y col., 1998; Jones D. y col 1998). Esto pudiese explicar la correlación positiva entre la producción de iNOS y la producción de citocinas Th1 en los pacientes, y la tendencia a la disminución en la expresión de iNOS en los pacientes con LCI, debido a la menor expresión de las citocinas tipo Th1. Además, explica la capacidad de los pacientes con LCL para destruir al parásito y controlar la infección (Kroncke y col., 1998). Mientras que en los pacientes con LCD los niveles de las citocinas Th1 e iNOS se observaron muy por debajo de la expresión de las citocinas Th2 favoreciendo la supervivencia del parásito. Los resultados obtenidos en LCD coinciden con Jones y col., (1998) quien describe que IL-4 no sólo es un componente importante en el desarrollo de la respuesta Th2 sino que suprime la producción de iNOS debido a la inhibición macrofágica lo que imposibilita al macrófago para destruir al parásito facilitando el desarrollo de la enfermedad.

La producciónde iNOS ha sido observada predominantemente en células de origen epitelial, no se conoce aún la razón pero se cree que en estos casos, el ON sirve de barrera contra el insulto antigénico o bajorregula la reacción local inflamatoria para inducir apoptosis en el infiltrado de células inmunes como macrófagos, neutrófilos o células T (Kroncke y col., 1997). Esto explica entonces el aumento en la inmunoreactividad epidérmica observado en los pacientes con LCL con respecto a los pacientes con LCD y LCI.

CONCLUSIÓN

- Los pacientes con LCL tienen una respuesta inmunitaria tipo Th1 caracterizada por el predominio de citocinas IFN-γ e IL-12
- Los pacientes con LCI tienen una mezcla de citocinas Th1 y Th2, con un predominio de las citocinas tipo Th2, IL-10 e IL-4.
- Los pacientes con LCD tienen una respuesta tipo Th2 caracterizada por el predominio de IL-4 e IL-10.
- En los pacientes con LCI y LCD existe un predominio de la citocina TGF-β1, que inhibe la actividad macrofágica permitiendo el desarrollo de la infección.
- Las citocinas IFN-γ e IL-12 estimulan la expresión de iNOS que permite la producción de ON, lo cual facilita la muerte del parásito intracelular en los pacientes con LCL. En los pacientes con LCI se observó una tendencia a la disminución en la expresión de iNOS debido a la disminución en la expresión de las citocinas IFN-γ e IL-12. En LCD tanto la expresión de las citocinas IFN-γ e IL-12 como la expresión de iNOS se observó notablemente disminuida en comparación con la expresión de las citocinas Th1, lo que permite la sobrevivencia del parásito.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS A. K. Inmunología celular y molecular. Interamericana. Mcgraw-Hill. Segunda edición. 1995, Madrid. Pag. 517.
2. ALVAR J. La Leishmaniasis: de la biología al control. Editorial Junta de Castilla y León, España 1997.
3. CABRERA M. T cell responses associated with immunoterapy of American cutaneous Leishmaniasis. Tesis para el grado del Doctor of Philosophy at the Faculty of Medicine, University of London, 1994.
4. CASTÉS M., TRUJILLO D., CALGENO M., CABRERA M. and CONVIT J. Response Th1/Th2 in human American Cutaneous Leishmaniasis: Its relevance for the design of vaccine. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998, 88: 42-43.
5. CASTÉS, M. Th1 and Th2 responses in human cutaneous leishmaniasis: relation to the outcome of infection and implications for immunotherapy and vaccine development. En "Molecular and immune mechanims in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis", edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres -Dittmar and Mart ín Sánchez. R. G. Londres, Austin, Texas. 1996, 203-221,.
6. CASTÉS M., TRUJILLO D., ROJAS M. E., FERNÁNDEZ C. T., ARAYA L., CABRERA M. BLACKWELL J.M., CONVIT J. Serum leves of tumor necrosis factor in patients with American Cutaneous Leishmaniasis. Biol Res. 1993, 26: 233-238.
7. CASTÉS M., CABRERA M., TRUJILLO D. and CONVIT, J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor and production of interleukin-2 and interferon-γ in human American cutaneous leishmaniasis. J. Clin. Microbiol.1987, 26: 1207-1213.
8. CASTÉS M., AGNELLI A. and RONDÓN A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol.1984, 57:279 -286,.
9. CASTÉS M., AGNELLI A., VERDE O. and RONDÓN A. J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin.Immunol.Immunopathol.1983; 27:176-186,

10. CÁCERES-DITTMAR G., TAPIA F.J. Inmunopatología de la lesión cutánea en la leishmaniasis cutáneo americana. Dermatol. Ven. 1993, 31, Supl 28-30
11. CONVIT J. Leprosy and Leishmaniasis. Similar clinical-inmunological-inmunopathologycal models. Ethiop. Med. J. 1974; 12: 187-195.
12. CONVIT J., ULRICH M., FERNÁNDEZ C. T., TAPIA, F. J., CÁCERES-DITTMAR G., CASTÉS M., RONDON A.J. The clinical and inmunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1993, 87: 444-448.
13. CONVIT J., PINARDI M. E., RONDÓN A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of de host. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1972, 44: 603-610.
14. COTTREZ F., GROUX H. Regulation of TGF-β1 response during T cell activation is modulated by IL-10. J Inmunol. 2001; 162: 773-8.
15. DIAZ N. L., ZERPA O., PONCE L. V., CONVIT J. RONDON A. J., TAPIA F. J. Intermediate or chornic cutaneous leishmanisis: Leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. Exp. Dermatol. (aceptado para publicación).
16. DUGAS B., MOSSALAYI M.D., DAMAIS Ch., KOLLO J. Nitric Oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. Inmunol Today. 1995; 16: 574-580.
17. FIORENTINO D.F., BOND M.W., MOSMANN T.R. Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med. 1989; 170: 2081-95.
18. GALON J., SUDARSHAN S., FINBLOOM D., O`SHEA J. J. IL-12 induces IFN regulatory factor-1 (IRF-1) gene expression in human NK and T cells. J. Inmunol. 1999; 162:7256.
19. GIACOMINI E., IONA E., FERRONI L., MIETTINEN M., FATTORINI L., OREFICI G., JULKUNEN I., COCCIA E. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Micobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response.J. Inmunol. 2001; 166: 7033-7041.
20. GROHMANN U., BELLADONA M., VACCA C., BIANCHI R., FALLARINO F., ORABONA C., FIORETTI M., PUCCETTI P. Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN-γ. J Inmunol. 2001; 167:221-227.

21. HEINZEL F., SADICK M., HOLADAY B., COFFMAN R. LOCKSLEY R. Reciprocal expression of IFN–γ or IL-4 during the resolution of progression of murine leishmaniasis. J.Exp.Med. 1989; 169: 59-72.

22. HEYNEMAN D., McKERROW J. Enfermedades parasitarias: de Inmunología Básica y Clínica. Editorial Manual Moderno, Séptima Edición. México 1993. 80-88.

23. HIMMELRICH H., LAUNOIS P., MASILLARD I., BIEDERMANN F., LOCKSLEY R., ROCKEN M., LOUIS J. In BALB/c mice, IL-4 production during the initial phase of infection with *Leishmania major* is necessary and sufficient to instruct Th2 cell development resulting in progressive disease. J. Inmunol. 2000; 164: 4819-4825.

24. JONES D., MERLE M., SCOTT P. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. Frontiers Biosci. 1998; 3:1171-1180.

25. KRONCKE K.-D., FEHSEL K., KOLB-BACHOFEN V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. Clin Exp Inmunol. 1998; 113: 147-156.

26. KRONCKE K.-D., FEHSEL K., KOLB-BACHOFEN V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection. How, why, when where? NO. Biol Chem. 1997; 1: 107-20.

27. LIEW, F.Y. Functional heterogeneity of CD4+ T-cells in leishmaniasis. Inmunol. Today. 1989; 10:40

28. LOHOFF M. GESSNER A., BOGDAN C., ROLLINGHOFF M. The Th1/Th2 Paradigm and Experimental Murine Leishmaniasis. Int. Arch Allergy Inmunol. 1998; 115: 191-202.

29. LOWENSTEIN CH., DINERMAN J.L., SYNER S.H. Nitric Oxide: a phisiologic messenger. Am. Intern. Med. 1994; 120: 227.

30. MACATONIA S., HOSKEN N. A., LITTON M., VIEIRA P., HSIEH C. S., CULPEPPER J. A. WYSOCKA M., TRINCHIERI G., MURPHY M., O´GARRA A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. J. Inmunol.. 1995; 154:5071.

31. MENDOZA-LEÓN A., SHAW J., TAPIA, F. J. A guide for the Cutaneous Lesihmaniasis Connoisseur. En Molecular and Inmune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis, edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres-Dittmar and Martín A. Sánchez. R.G. Landes Company.Austin, Texas, 1996

32. OKRAGLY A., BALWIT J., HAAK-FRENDSCHO M. Transforming growth factor beta-1 (TGF-β1): A biological paradox. Promega Notes Magazine. 1994, 47:10

33. POZO D., BITZER-QUINTERO O.K., OSUNA C. Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema nervioso. Arch Neurocien. 1998; 3: 84-94.

34. RIDLEY, D. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1979; 73: 151.

35. ROMAGNANI S. Induction of Th1 and Th2 response: A key role for the "natural" immune response? Immunol. Today. 1992; 13: 379-381.

36. SCOTT P, JAMES S., SHER, A. The respiratory burst is not required for killing of intracellular targets by a lymphokine-activated macrophage cell line. Eur. J. Immunol. 1985, 15: 553-561

37. SCOTT P., CASPAR P., SHER A. Protection againg *Leishmania major* in BALB/c mice by adaptive trasnfer of a T cell clone recognizing a low molecular weight antigen released by promastigotes. J. Immunol. 1990; 144: 1075-79.

38. STITES, D. P., TERR A. I. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. Séptima edición. 1993. México. Pag. 1055

39. TAPIA F. J., ROJAS E., KRAAL G., MOSCA W., CONVIT J. Inmunocytochemical analysis of Langerhans cells in murine cutaneous leishmaniasis. En The Langerhans Cell. eds. J. Thivolet, D. Schmitt. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. Paris. 1988; 151-161.

40. TAPIA F. J., CÁCERES-DITTMAR G., SANCHEZ M. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. Inmunol. Today. 1994; 15: 160-165.

41. TAPIA F. J., CÁCERES-DITTMAR G., SANCHEZ M., FERNANDEZ C. T., RONDON A. J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. Exp. Dermatol. 1994; 3: 17-22.

42. FERNÁNDEZ M., FIGUEIRA E., DÍAZ N. J., RAMIREZ, R., MONSALVE I., TAPIA F. J. Óxido nítrico en inmunidad celular en ratones susceptibles y resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*. Medicina. 2000, Vol. 60- SUPL III: 91

43. ULRICH M. La respuesta humoral en leishmaniasis americana. Dermatol Ven. 1993, 31, Supl. 2: 31-33.

44. WEIGLE K., SARAVIA N. Natural History, Clinical Evolution, and the Host-Parasite Interaction in New World Cutaneous Leishmaniasis. Clin. Dermatol. 1996; 14:433-450.

45. WILL, A., BLANK, C., RÖLLINGHOFF, M., MOLL, H. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. Eur. J. Immunol. 1992; 22: 1341-1347.