

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS



**Evaluación de la respuesta inmune celular en pacientes
con leishmaniasis muco-cutánea**

Tesis de grado para optar el título de Magíster Scientiarum
Mención: Parasitología

Postulante: Rianed Velásquez Arias
Tutores: Washington Cuña, Ph.D
Celeste Rodríguez, Ph.D

LA PAZ - BOLIVIA
2006

DEDICATORIA

**A mis queridos Padres, Marcelino y Severina
por su amor y comprensión.**

**A mis queridos hermanos Rolando, Freddy y
Alexander por su cariño y apoyo constante.**

**Al Dr. Washington por ser paciente y
enseñarme.**

AGRADECIMIENTOS

- A la Agencia de Cooperación Francesa - Institut de Recherche pour le Développement (IRD), por la beca brindada durante el desarrollo de la maestría gestión 2002-2003.
- Al Laboratorio de Inmunoparasitología-IBBA, Facultad de Medicina-UMSA, por la acogida durante la realización de la tesis.
- Al Dr. Washington Cuña y Dra. Celeste Rodríguez, por la dirección, apoyo y colaboración constante durante la realización y culminación del trabajo de tesis “Muchas Gracias”.
- Al Dr. Alberto Giménez, por su gran apoyo y colaboración brindada en la Maestría.
- A los docentes de la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas, gestión 2002-2003 por las enseñanzas impartidas.
- A las personas que nos colaboraron e hicieron posible la realización y culminación del trabajo de tesis.
- A la Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos ULRA-UMSS por su colaboración y apoyo. Lic. Mirtha Rivero, José Zubieta.
- A mis compañeras y amigas Ingrid y Janeth, por su amistad y trabajo compartido.
- A Laura, Martha, Esther, Fernando, Ana Rosa y Ana Gabriela por los momentos compartidos y su amistad brindada.
- A Celia Mendoza, Claudia Saavedra y Flia ¡muchas gracias! por su acogida y amistad.
- Hilda C., Verónica L., Juana Y., Rocío por su amistad, comprensión y momentos compartidos.
- A mis sobrinitos Mauricio, Brandon, Cesar, Gabriel y Jhenny por su cariño y momentos gratos compartidos.
- A mi querida familia, que siempre me apoya. En especial a mi tía Juana.
- A todos mis amigos (as) por su amistad.

RESUMEN

EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EN PACIENTES CON LEISHMANIASIS MUCO-CUTANEA

por

Rianed Velásquez Arias

Leishmania (Viannia) braziliensis es un protozooario parasítico, causante de la forma más común de leishmaniasis tegumentaria, denominada leishmaniasis cutánea. Una fracción de pacientes con LC desarrollan la enfermedad mucosa o leishmaniasis mucocutánea. Esta forma clínica se caracteriza por una respuesta inmune celular exacerbada, sin embargo los mecanismos asociados con la patología no han sido totalmente esclarecidos. Para mejorar la comprensión de estos mecanismos, se utilizó un sistema in vitro en el cual las células mononucleares periféricas de pacientes y donadores sanos fueron cultivadas en presencia de un antígeno total soluble de promastigotes de *L. (V.) braziliensis*. En este sistema, solamente un porcentaje de células de pacientes (77%) proliferó en respuesta al estímulo policlonal con PMA-I, en comparación con las células de donadores sanos. Esta incapacidad se reflejó también en la ausencia de proliferación de estas células luego de incubación con el antígeno de *Leishmania*. Tanto las células de donadores sanos como las células de pacientes produjeron IFN- γ luego de la estimulación policlonal e incubación con el antígeno de *Leishmania*. Sin embargo, la producción de esta citoquina por células de pacientes fue significativamente superior luego del estímulo antigénico. Igualmente, el estímulo con PMA-I causó la liberación de IL-4 e IL-13 en ambas poblaciones celulares, pero sólo un 30% de células de donadores y un 44% de células pacientes produjeron IL-13 en los cultivos con el antígeno. Una producción específica de GM-CSF se observó en un 33% de los cultivos de células de pacientes en respuesta al antígeno. Linfocitos CD4 y CD8 predominaron en los cultivos celulares de donadores sanos y pacientes, respectivamente. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren una respuesta celular específica selectiva de los pacientes, con los eventos claves afectando solamente la proliferación de células, pero no la producción de citoquinas.

ÍNDICE GENERAL

	Pags.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIACIONES	ix
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- OBJETIVOS	5
2.1.- Objetivo general	5
2.2.- Objetivos Específicos	5
3.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
3.1.- ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS	6
3.1.1.- Fuente de infección y Modo de transmisión: Ciclo biológico.....	6
3.1.2.- Agente etiológico	7
3.1.3.- Vector	9
3.1.4.-Distribución geográfica.....	10
3.1.5.- Control de la enfermedad	11
3.1.6.- Clínica	12
3.1.7.- Histopatología.....	12
3.1.8.- Patogénesis	13
3.1.9.- Leishmaniasis mucocutánea (LM).....	14
3.2.- INMUNOLOGIA	16
3.2.1.- Activación celular	16
3.2.2.- Citoquinas.....	18
IL-4.....	18

IL-13.....	19
IL-6.....	21
GM-CSF	22
IL-1 β	23
IFN- γ	24
TNF- α	25
3.3.- LEISHMANIASIS.....	26
3.3.1.-Respuesta inmune celular.....	26
3.3.2.- Linfocitos T CD4.....	28
3.3.3.- Linfocitos T CD8.....	30
3.3.4.- Citoquinas en leishmaniasis	32
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
4.1.- Células	38
4.2.- Antígeno	38
4.3.- Anticuerpo	38
4.4.- Cultivo de células mononucleares periféricas	39
4.5.- Test de proliferación celular	39
4.6.- Separación de sub-poblaciones CD4 y CD8.....	39
4.7.- Dosificación de citoquinas.....	40
4.8.- Análisis estadístico.....	40
5.- RESULTADOS	41
5.1.- Examen clínico y diagnóstico celular y parasitológico	41
5.2.- Respuesta linfoproliferativa de CMP inducida por PMA-I o antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> (ALb).....	41
5.3.- Perfil de citoquinas liberadas por CMP de donadores sanos y pacientes con LM.....	43
5.4.- Análisis fenotípico de sub-poblaciones de linfocitos T.....	49
6.- DISCUSION Y CONCLUSIÓN.....	51

7.- BIBLIOGRAFÍA 57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación CD4/CD8 en Células Mononucleares Periféricas de donadores sanos y
pacientes con LM^{*} 50

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo biológico de las leishmanias : reservorios silvestres y domésticos	6
Figura 2.- Ciclo de vida de especies de <i>Leishmania</i>	8
Figura 3.- Distribución geográfica de la leishmaniasis.....	11
Figura 4.- Paciente con leishmaniasis mucocutánea.....	15
Figura 5.- Polarización de las respuestas Th1 y Th2 por células CD4 ⁺ Th y rol de citoquinas anti-inflamatorias en la diferenciación de células T. Líneas sólidas representan rutas estimuladoras y líneas punteadas indican rutas inhibitoras. APC: Células presentadoras de antígeno; Th0: Células Th precursoras	18
Figura 6.- Respuesta linfoproliferativa de CMP estimuladas con PMA-I o ALb. Los resultados representan la media ± DS de los porcentajes de reducción	42
Figura 7.- Respuesta linfoproliferativa de CMP de nueve pacientes estimuladas con PMA-I o ALb (A) y CMP de siete pacientes estimuladas con PMA.I (B). Los resultados representan la media ± DS de los porcentajes de reducción	43
Figura 8.- Producción de IFN-γ de 10 donadores sanos (A) y 9 pacientes con LM (B) en sobrenadantes de cultivo de CMP incubadas en presencia de PMA-I y ALb. Los resultados representan los valores individuales de producción de cada paciente	44
Figura 9.- Comparación de la producción de IFN- γ de donadores sanos y pacientes con LM luego de estimulación con ALb. Los resultados representan la media ± DS de los niveles de IFN-γ en sobrenadantes de CMP	45

- Figura 10.-** Producción de IL-4 e IL-13 por CMP de 10 donadores sanos luego de incubación con RPMI, PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de IL-4 e IL-13 en sobrenadantes de CMP 46
- Figura 11.-** Producción de IL-4 e IL-13 por CMP de 9 pacientes con LM luego de estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de cultivo 46
- Figura 12.-** ALb indujo la producción de IL-13 en células T respondedoras de 3 donadores sanos y 4 pacientes con LM. Los resultados representan la media \pm DS de la concentración de IL-13 en sobrenadantes de cultivo..... 47
- Figura 13.-** Producción TNF- α , IL-1 β , IL-6 y GM-CSF por CMP de donadores sanos luego de la estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de CMP 48
- Figura 14.-** Producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y GM-CSF por CMP de pacientes luego de estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de cultivo..... 49

LISTA DE ABREVIACIONES

ALb: Antígeno de *Leishmania braziliensis*

BSF-1: Factor 1 de estimulación de células B

CD: Diferenciación celular

CR1: Receptor del complemento 1

CR2: Receptor del complemento 2

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: Células presentadoras de antígeno

CD40 L: Ligando de células de diferenciación 40

CRP: Proteínas C-reactivas

CMP : Células mononucleares periféricas

DTHR: Respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado

DC: Células dendríticas

EDTA: Etilendiaminotetraacético

eTh: Células Th efectoras

GM-CSF: Factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocitos

Gp 130: Glicoproteína 130

H₂O₂: Peroxido de hidrógeno

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular

IL-1ra: Interleuquina primera

IL-2: Interleuquina -2

IFN- γ : Interferon gamma

IL-4: Interleuquina -4

IL-4R: Receptor de IL-4

IL-5 : Interleuquina -5

IL-10: Interleuquina -10

ICE: Enzima convertasa IL-1 β

kDNA: Adenosin desoxiribonucleico del kinetoplasto

kDa: Kilo daltons

kb: Kilo bases

LM: Leishmaniasis mucocutánea

LC: Leishmaniasis cutánea

LCL: Leishmaniasis cutánea localizada

LV: Leishmaniasis visceral

LPS: Lipopolisacáridos

LPG: Lipofosfoglicano

LACK: Antígeno de *Leishmania* homólogo del receptor de kinasa C activada

LAK: Células “killer” activadas por linfoquinas

mRNA: Acido ribonucleico mensajero

MIP-1 α : proteína inflamatoria de macrófagos 1 alpha

NF- κ B: Factor nuclear kappa B

NO: oxido nítrico

NRAMP1: Resistencia natural asociada a la proteína 1 del macrófago

NK: Natural killer

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pIL-1 β : Precursor de interleuquina 1beta

PAF: Factor activador de plaquetas

PBS: Tampón fosfato salino

PMA-I: Forbol miristato acetato - Ionomicina

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

RCT: Receptor de células T

SFB: Suero fetal bovino

Th1: T helper 1

Th2: T helper 2

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alpha

TGF- β : Factor transformación de crecimiento beta

TNF- β : Factor de necrosis tumoral beta

Th0: Células Th precursoras

TSS: Síndrome de shock toxico

VCAM-1: Molécula vascular de adhesión celular

1.- INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis, comprende un grupo de enfermedades causadas por varias especies de parásitos intracelulares obligatorios del género *Leishmania*, la enfermedad depende de la especie que inicia la infección, del estado de salud y de la naturaleza genética del individuo infectado (Grimaldi and Tesh, 1993).

Principalmente, tres formas clínicas son descritas: leishmaniasis muco-cutánea (LM), leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis visceral (LV). La LM es causada exclusivamente por *Leishmania (Viannia) braziliensis* y se caracteriza por involucrar la septa nasal, pero puede también afectar la orofaringe, la laringe y la tráquea, causando varias complicaciones que pueden llevar a la severa destrucción del tejido de las vías aéreas (Amato et al., 2003).

Los agentes etiológicos de la leishmaniasis son transmitidos a los huéspedes vertebrados por la picadura del vector flebotomino, del género *Phlebotomus* (viejo mundo) y del género *Lutzomyia* (nuevo mundo) (Gonzalez et al., 1999). El vector flebotomino infecta a los mamíferos por inoculación de promastigotes dentro de las heridas hemorrágicas creadas en la piel mientras se alimenta de la sangre (Domínguez et al., 2002). Los promastigotes son internalizados por células fagocíticas (principalmente macrófagos) y sufren transformación a la forma amastigote dentro la vacuola parasitofora. Los amastigotes mantienen el parasitismo en el huésped vertebrado por replicación en la vacuola parasitofora y eventualmente llevan a la destrucción de la célula huésped (Coutinho et al., 1996; Terabe et al., 2000). Así, la sintomatología clínica resulta de la replicación del parásito dentro de los macrófagos de la dermis, mucosa naso-orofaringe y el sistema fagocítico mononuclear del huésped (Pearson and Sousa, 1996; Herwaldt, 1999), e histológicamente las lesiones están caracterizadas por necrosis, placas de nódulos infiltrados en tejido, placas granulomatosas, úlceras en el epitelio septal. Así mismo, el cartílago nasal septal presenta células inflamatorias que parecen estar invadiendo el cartílago, en algunos pacientes se observan intensas reacciones inflamatorias que pueden aparecer a tempranos días del tratamiento

(Marsden, 1986). También, se observan infiltración de células del plasma, linfocitos, fibroblastos, macrófagos con amastigotes intracelulares (Esterre, et al., 1994).

Estudios extensivos en modelos murinos, han sido realizados para esclarecer la mayoría de los mecanismos inmuno-genéticos involucrados en la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad (Lima et al., 1998). En pruebas con *L. major*, la mayoría de las cepas de ratones son resistentes a la enfermedad, desarrollan una respuesta celular CD4 de tipo “T helper 1” (Th1) y este mecanismo es mediado por múltiples citoquinas. Esta respuesta es iniciada por la interleuquina (IL)-12 y conducida por el interferon (IFN)- γ que estimula al macrófago infectado para controlar la replicación del parásito (Reiner and Locksley, 1995; Murray et al., 2000). Por otra parte, ratones BALB/c (la cepa de ratones susceptibles prototipo) presentan un desarrollo progresivo de la lesión resultando en la muerte y este resultado se relaciona a una exacerbada respuesta celular CD4 Th2 con la producción de citoquinas como IL-4 e IL-5 (Himmelrich et al., 2000). El cambio de una respuesta de tipo Th2 a Th1 parece ser requerido para un fenotipo protector. En humanos, una clara diferencia entre protección y resistencia no es observada, aunque hay evidencias indirectas del rol de citoquinas de tipo Th2 en formas de LC, LM y LV (Zwingenberger et al., 1990; Pirmez et al., 1993; Kharazmi et al., 1999).

Contrariamente de *L. major*, menos trabajos experimentales fueron realizados con *L. braziliensis* agente causal de LM. Este hecho, se debe a que *L. braziliensis* no desarrolla fácilmente in vitro y que la conversión del estadio metacíclico bajo condiciones de cultivo estándar es ineficiente y se requiere gran cantidad de inóculo parasitario para la infección (Lima et al., 1999). Sin embargo, en un estudio reciente de Moura et al. (2005), han demostrado que ratones BALB/c infectados con *L. braziliensis* en la dermis de la oreja desarrollan lesiones ulceradas que cicatrizan espontáneamente; la regresión de la lesión se debe al desarrollo de una respuesta Th1 y este modelo experimental sería útil para el estudio de mecanismos relacionados con inmunidad a la reinfección y persistencia del parásito asociada con leishmaniasis mucocutánea.

La leishmaniasis mucocutánea (LM) esta ampliamente distribuida en Sud América, aunque el 90% de los casos nuevos son reportados anualmente de Brasil, Bolivia y Perú (Piñero et al., 1999).

La leishmaniasis mucocutánea fue descrita por primera vez en Bolivia en el año 1876 por el Dr. Manuel Antonio Vaca Diez y se la comienza a estudiar durante la guerra del Acre, cuando se observaron muchos casos de leishmaniasis, denominados en esa época como espundia (Escomel, 1911).

En Bolivia la enfermedad de la leishmaniasis afecta a los habitantes de cinco de los nueve departamentos (La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Beni, Pando) (David et al., 1992), principalmente en las regiones de colonización donde se realizan importantes proyectos estratégicos de desarrollo con migraciones poblacionales masivas hacia las zonas del trópico y los yungas. Así, la leishmaniasis constituye un problema mayor de salud pública en Bolivia.

Desjeux et al., (1974), determinaron que el agente causal de la LC y LM en Bolivia es *Leishmania (viannia) braziliensis*. Adicionalmente, Martínez et al., (1998) encontraron altas incidencias de LC causadas por *Leishmania amazonensis* en regiones sub-andinas de La Paz.

La mayoría de los trabajos realizados en Bolivia han estado enfocados a la determinación de las especies de parásitos y la incidencia epidemiológica, principalmente; investigaciones sobre la respuesta inmunológica en pacientes con leishmaniasis son escasos.

Con el presente trabajo se pretende mejorar el entendimiento de los mecanismos de respuesta inmune celular en pacientes con LM, en presencia de antígeno de *Leishmania* y PMA e Isonomicina, con vistas a la implementación de nuevas estrategias de tratamiento en individuos que sufren de esta enfermedad. Además, establecer una asociación entre el tipo de respuesta inmune celular desencadenada y la forma clínica de leishmaniasis, ya que por tratarse de un parásito intracelular obligatorio, este tipo de respuesta inmune condiciona el

desarrollo de una inmunidad de resistencia o susceptibilidad frente al parásito. El trabajo se basa sobre la hipótesis de que la diversidad de respuesta inmune celular frente a *Leishmania* involucra células T CD4 (Th1 o Th2), CD8 y múltiples citoquinas que determinan el curso de la enfermedad en pacientes con LM.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo principal

- Evaluar la respuesta inmune celular en pacientes con LM.

2.2.- Objetivos específicos

- Evaluar la proliferación celular de células de donadores sanos y pacientes con LM
- Analizar el perfil de citoquinas inducidas por antígenos de *L. braziliensis*, Forbol Miristato Acetato-Ionomicina (PMA-I).
- Determinar sub-poblaciones de linfocitos T (CD4, CD8) involucrados en la respuesta inmune en pacientes con LM.

3.1.2.- Agente etiológico

El agente etiológico es un protozooario dimórfico (Figura 2) que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, del genero *Leishmania* (orden kinetoplastida). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, respuesta inmune inducida, tipo de enfermedad y distribución geográfica (Grimaldi and Tesh, 1993).

Las especies de *Leishmania* incluyen patógenos humanos cuyo ciclo de vida digenético, involucra la transmisión de un promastigote flagelado extracelular del intestino de un vector hematófago a un huésped mamífero. Los promastigotes inoculados son fagocitados por macrófagos; una vez en el interior de los macrófagos del huésped vertebrado pierden su flagelo, las *Leishmanias* se presentan en forma de amastigote, tienen una forma ovalada o redondeada, inmóvil, midiendo entre 2 a 5 micras de diámetro (Kalter, 1989). El núcleo es central y cercano al kinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene DNA extracelular (kDNA), (Spithill and Grumont, 1984). Los amastigotes están adaptados a la temperatura corporal y al medio ácido de los fagolisosomas de los macrófagos donde ellos residen (Alexander et al., 1999). La multiplicación ocurre por división simple, los amastigotes son eventualmente liberados y van a infectar otros fagocitos mononucleares (Hepburn, 2000). En el tubo digestivo de la hembra del huésped invertebrado o en algunos medios de cultivo artificiales, el parásito se presenta en forma de promastigote extracelular, alargado, de aproximadamente 20 micras de longitud. En la parte anterior del parásito se origina un flagelo, casi de igual tamaño al cuerpo (mastigos = látigo). Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando estos toman sus alimentos (Handman, 2001)

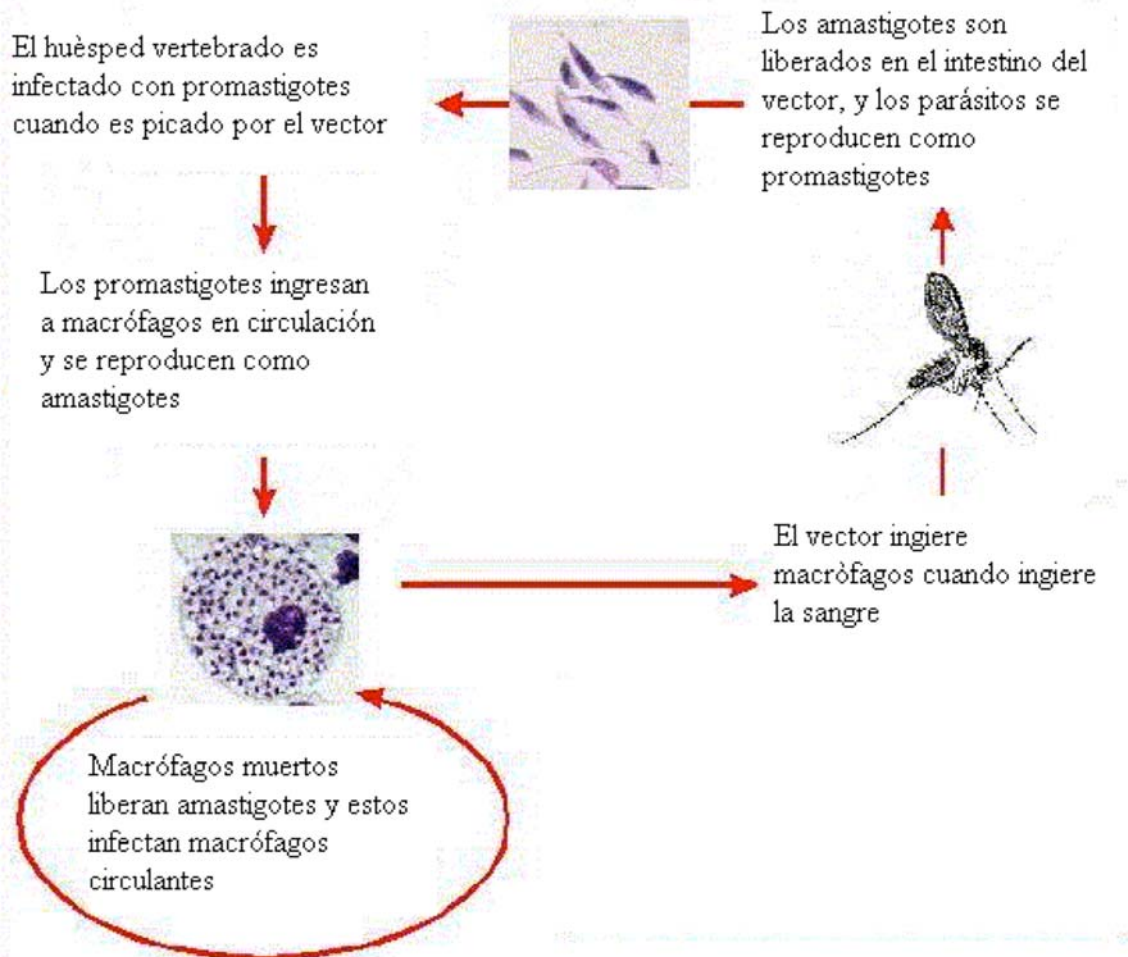


Fig 2.- Ciclo de vida de especies de *Leishmania*

En cuanto a la virulencia del parásito se reconoce en la actualidad lo siguiente: i) la infectividad varía incluso entre clones de una misma especie de *Leishmania*, ii) los amastigotes son generalmente más infectivos que los promastigotes, iii) los promastigotes móviles activos de la fase estacionaria de crecimiento son más infectivos que la forma delgada y grande de la fase de crecimiento logarítmica, iv) los promastigotes frecuentemente pierden la infectividad después de largos períodos de cultivo *in vitro*, v) los cambios en la virulencia que son observados en las diferentes fases de crecimiento o

después de cultivos prolongados se desarrollan paralelamente a cambios bioquímicos y antigénicos del parásito y vi) durante el proceso de diferenciación del promastigote metacíclico a amastigote hay un incremento en la expresión de ciertos genes que probablemente preadapta al parásito para sobrevivir en el medio hostil de los fagolisosomas del macrófago (Grimaldi and Tesh, 1993; Pinto-da-Silva et al., 2002).

3.1.3.- Vector

La leishmaniasis es transmitida por el genero *Phlebotomus* en el viejo mundo (Europa, Asia y África), y por el genero *Lutzomyia* en el nuevo mundo (América). Su hábitat se encuentra de preferencia en lugares húmedos, oscuros y donde hay vegetación abundante. De esta manera, cuando el ser humano vive en zonas donde existe el vector o ingresa a estas áreas por causa de trabajo, corre el riesgo de ser picado por el vector y enfermarse de leishmaniasis (Torrez et al., 1998).

El flebotomíno hembra ingiere macrófagos infectados con amastigotes cuando se alimenta con sangre de un reservorio mamífero infectado. Dentro de las primeras 24 horas después de la ingestión, los amastigotes se transforman en promastigotes multiplicándose y diferenciándose en el intestino del vector (Ampuero, 2000). El ciclo de vida es completado aproximadamente 1 semana después, los promastigotes metacíclicos migran a la probóscide y son inoculados cuando el vector ingiere su siguiente alimento (Añez et al., 2003), a la vez, la saliva del vector es inoculada en la piel del huésped. Esta saliva contiene compuestos vasodilatadores y anti-plaquetas que incrementan la hemorragia en el lugar donde se alimenta el flebotomino (Charlab et al., 1999). Sin embargo, algunos factores presentes en la saliva de los vectores protegen de la exacerbación de la enfermedad (Kamhawi et al., 2000; Valenzuela et al., 2001). En el viejo mundo cada vector tiende a transmitir solo una especie de *Leishmania*, en contraste con los vectores de la leishmaniasis del nuevo mundo que soportan infecciones de varias especies de *Leishmania* (Ampuero, 2000).

3.1.4.- Distribución geográfica

La leishmaniasis aflige a la población mas pobre del mundo (Figura 3), es endémica en África, Asia, Europa y América (Davies et al., 2003), aparte de ser una de las enfermedades mas ampliamente distribuidas geográficamente y ecológicamente en las regiones de los países tropicales y subtropicales en todos los continentes excepto en Australia (Terabe et al., 2000; WHO “Leishmaniasis Control home page”: <http://www.who.int/ctd/html/leis.html>). Además, la leishmaniasis esta expandiéndose a diferentes áreas no endémicas del mundo debido a la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (WHO, 1998).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha declarado como una de las seis enfermedades parasitarias mas serias del mundo para el hombre (<http://www.who.org>). Según la OMS, 12 millones de personas en 88 países (16 desarrollados y 72 en vías de desarrollo) están actualmente afectadas por las diferentes formas de la enfermedad, cada año se reportan 1.5 millones de nuevos casos, de los cuales, mas del 90% ocurre en Afganistán, Algeria, Iran, Iraq, Arabia Saudita y Siria (en el viejo mundo) y Brasil y Perú (en el nuevo mundo), otras 350 millones de personas están en riesgo de contraer la infección (Ashford et al., 1992; WHO “Leishmaniasis Control home page”: <http://www.who.int/ctd/html/leis.html>).

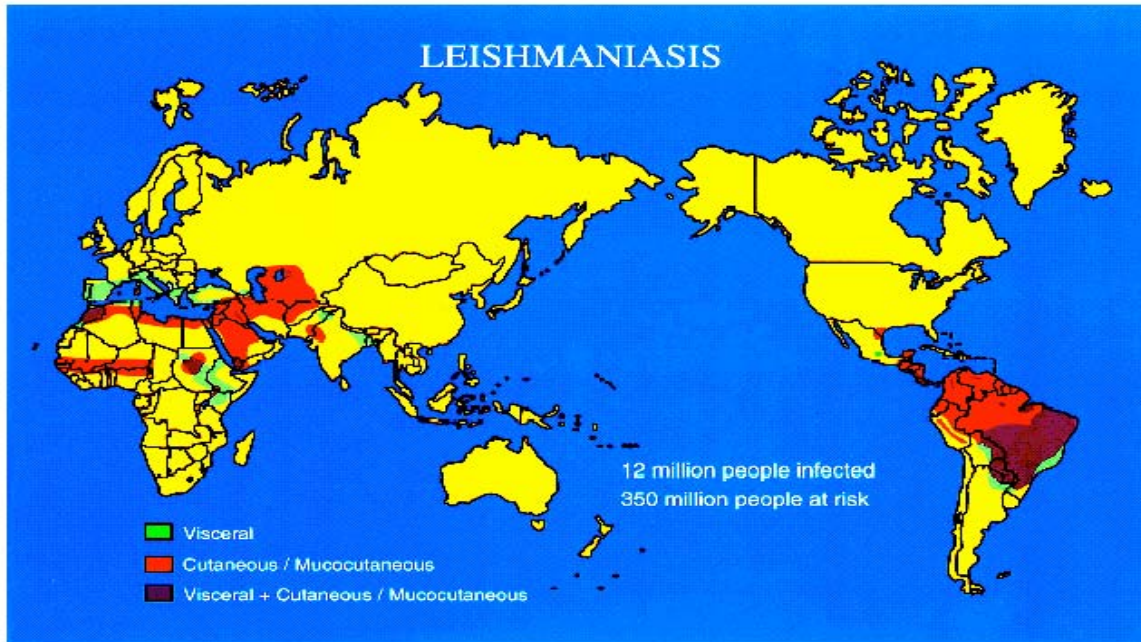


FIG. 1. World map highlighting areas where cutaneous, visceral, and mucocutaneous leishmaniasis is endemic.

Fig 3. Distribución geográfica de la leishmaniasis (Clinical Microbiology Reviews, Vol. 14, p. 229, 2001).

3.1.5.- Control de la enfermedad

Actualmente, la principal medida de control es la quimioterapia, con antimoniales pentavalentes y pentostam como primera línea de tratamiento, o en caso de falla la anfotericina B y pentamidina; pero debido al alto costo, evidencia de resistencia y toxicidad generada, el uso de una vacuna sería una excelente alternativa para el control de esta enfermedad (Grogl et al., 1992; WHO, 1990; Handman, 2001; Melby, 2002).

Sin embargo, hasta la fecha no existe una vacuna contra ninguna forma clínica de la leishmaniasis; pero una nueva alternativa de vacunación contra parásitos, es la vacunación genética, la utilización de la vacuna con DNA ha demostrado una respuesta protectora contra varios patógenos (Donnelly et al., 1997; Tighe et al., 1998). Inmunización de ratones BALB/c (susceptibles) con librerías de expresión genética de *Leishmania major*, inducen preferentemente una respuesta de tipo Th1 asociada con IFN- γ y óxido nítrico (NO) la

respuesta inmune que confiere una protección frente a patógenos intracelulares como *Leishmania* (Piedrafita et al., 1999).

3.1.6.- Clínica

La enfermedad de la leishmaniasis, presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, histopatológicas e inmunológicas, que pueden ser observadas en la leishmaniasis tegumentaria, variando desde una infección que puede ser restringida a la piel (LC) (causada principalmente por *L. major*, *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* en el viejo mundo y *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana* en el nuevo mundo), limitada a las membranas mucosas (LM) (causada por *Leishmania braziliensis*) o disipada a través del sistema retículoendotelial (LV) (agente etiológico *Leishmania donovani* y *Leishmania chagasi*), la cual puede ser fatal si no se aplica un tratamiento (Gradoni et al., 2003).

3.1.7.- Histopatología

Histopatológicamente la leishmaniasis cutánea se caracteriza por una infiltración inflamatoria difusa de células mononucleares en la dermis, compuesta por células del plasma, linfocitos y macrófagos que pueden o no presentar amastigotes (Barral-Netto et al., 1995). El análisis in situ de población de células y producción de citoquinas ha sido bien estudiado en LCL, pero no en LM. Sin embargo, una aproximación histopatológica en la LM revela eventos celulares, como la diferenciación de macrófagos in situ, infiltración de células del plasma, reconstrucción de la matriz extra-celular y cambios vasculares, también se observan linfocitos, fibroblastos, macrófagos con amastigotes intracelulares (Esterre, et al., 1994). Así mismo, se caracteriza la necrosis, placas de nódulos infiltrados en tejido, placas granulomatosas, úlceras en el epitelio septal (Marsden, 1986)

3.1.8.- Patogénesis

En el intestino del vector el parásito sufre modificaciones bioquímicas de su cubierta de glicolípidos; esta importante transformación protege al parásito de la lisis rápida por vía del sistema de complemento en mamíferos cuando entra al huésped. Una vez que el parásito ha ingresado al huésped mamífero a través de la picadura del vector, es incorporado vía fagocitosis mediada por receptores de células dendríticas o macrófagos de la piel (células de Langherans) (Reiner and Locksley, 1995). El parásito usa los receptores del complemento del huésped CR1, CR3 (Da Silva et al., 1989; Robledo et al., 1994) para ganar acceso al ambiente hostil de los fagolisosomas, donde, a pesar de un pH de 4.5-5.0 y proteinasas activadas, prospera. Macrófagos activados y linfocitos T son reclutados al sitio de la infección.

La patología resulta de la infección substancial con *Leishmania* y factores genéticos del huésped. Varios de estos factores han sido identificados usando aproximaciones genéticas en humanos y ratones; por ejemplo el estudio de la susceptibilidad a *Leishmania donovani*, *Salmonella tiphymurium* y *Mycobacterium bovis*, controlada por un mismo gen del cromosoma 1 en ratones (Blackwell, 1996). Este gen, que codifica para la resistencia natural asociada a la proteína 1 del macrófago (NRAMP1) fue clonado en ratones (Vidal et al., 1993) y en humanos (Cellier et al., 1994). Aunque no se ha demostrado un rol para este gen en la leishmaniasis humana (Blackwell et al, 1997), un estudio en África muestra que humanos con alelos específicos para el gen NRAMP1 fueron significativamente más propensos a tener tuberculosis (Bellamy et al., 1998).

La patogénesis de leishmaniasis mucosa permanece aún como un enigma. Solamente un pequeño porcentaje de individuos desarrollan esta complicación desfigurativa después de una previa curación de la infección cutánea. La genética del huésped ha sido implicada en la patogénesis de la enfermedad mucosa en un estudio con una población venezolana. Cabrera et al., (1995), encontró que alelos particulares que codifican citoquinas como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α y TNF- β están asociados con el incremento significativo del riesgo relativo (3.5 y 7.5 respectivamente) de desarrollar la enfermedad mucosa; la sobre-

expresión del TNF- α fue asociada con la enfermedad, observación que concuerda bien con otros reportes de altas concentraciones de TNF- α en leishmaniasis (Da-Cruz et al., 1996).

Para una enfermedad en la cual la inmunidad mediada por células juega un rol crucial, no resulta sorprendente que el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) este íntimamente involucrado (Roberts et al., 2000). Se demostró una asociación entre diferentes susceptibilidades y el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en ratones con leishmaniasis visceral (Blackwell et al., 1980). Igualmente, un rol para el CMH en leishmaniasis cutánea ha sido descrito en humanos (Lara et al., 1991) y apoyado por un estudio de ligamiento genético en ratones (Roberts et al., 1997).

3.1.9.- Leishmaniasis muco-cutánea

Las lesiones cutáneas empiezan en el sitio de entrada del parásito como una pequeña pápula que evoluciona a nódulo que ulcera en el centro o las lesiones pueden tomar aspectos de pápulas, nódulos, úlceras o placas infiltradas. Las lesiones mucosas secundarias pueden aparecer cuando aún existen las manifestaciones cutáneas o cuando estas ya han cicatrizado, que es lo más frecuente. (Barral-Netto et al., 1995).

La *Leishmania* (V) *braziliensis*, es responsable de la leishmaniasis mucocutánea en el nuevo mundo (Sampaio and Traub-Cseko, 2003). La complicación en las zonas mucosas, probablemente se deba a la difusión hematógena de la lesión primaria, este hecho ocurre solamente en una fracción de los pacientes (3 a 5%) con LC debida a *L. braziliensis*, estos pacientes desarrollan lesiones secundarias destructivas de las mucosas, al mismo tiempo de iniciada la ulceración o varios meses después (Castes et al., 1984; Marsden, 1986; Da-Cruz et al., 2002), incluso se describe la aparición de lesiones mucosas 20 a 30 años después de la resolución de la lesión primaria, cuya cicatriz puede ser observada en la piel (Ampuero, 2000). En aproximadamente un tercio de los pacientes, la enfermedad se manifiesta primeramente en las mucosas, sin presentar antecedentes de lesiones en la piel. En estos casos es posible que la infección primaria haya sido inaparente, o que se haya manifestado como una lesión mínima pasando desapercibida para el propio paciente (Grevelink and

Lerner, 1996). Las lesiones mucosas se instalan de preferencia en las vías aéreas superiores, comprometiendo las estructuras anatómicas mas ventiladas por el pasaje del aire inspirado. Es muy frecuente que las lesiones mucosas comiencen a nivel del tabique nasal cartilaginoso (Figura 4), pero pueden también comenzar en otras partes de las vías aéreas superiores. Se ha reportado un caso de comienzo en la laringe, donde las manifestaciones clínicas comenzaron por una alteración de la voz (Weiss, 1943).

Las lesiones mucosas se extienden con mayor rapidez que las cutáneas, pueden cubrir toda la mucosa nasal, faringe, laringe, llegar a la tráquea y hasta los bronquios en aproximadamente 2 años (Ampuero, 2000).

La LM, es también caracterizada por la exacerbada inmunidad mediada por células T y por la severa destrucción de las cavidades oral, nasofaringea y resistencia a terapias antimoniales (Bacellar et al., 2002).



Fig. 4: Paciente con Leishmaniasis mucosa

3.2.- INMUNOLOGIA

3.2.1.- Activación celular

La activación de macrófagos representa uno de los primeros eventos en la resistencia innata a la infección intracelular. Patógenos intracelulares, fagocitados por macrófagos o actuando a través de moléculas de superficie y toxinas secretadas, activan estas células para producir una serie de citoquinas pro-inflamatorias que además contribuyen a la activación de células fagocíticas y la activación de varias manifestaciones de la respuesta inflamatoria (Trinchieri, 1997). Algunas de las citoquinas liberadas por los macrófagos y otras células inflamatorias en respuesta a la presencia de patógenos tienen una actividad directamente anti-patogénica o contribuyen a la activación de células efectoras de inmunidad innata tales como las células fagocíticas y células “natural killer” (NK) (Scott and Trinchieri, 1995). En la mayoría de las infecciones primarias, sin embargo, la eliminación completa de los patógenos es mediada por la inmunidad adaptativa específica para antígenos, mediada por células T y células B, que solamente llegan a ser completamente funcionales varios días después de la infección cuando los clones de células T se han expandido a un número importante (Trinchieri, 1997).

Un paso crucial de la respuesta inmune celular, es el reconocimiento de proteínas antigénicas por células T (Guery & Adorini, 1995). Sin embargo, los receptores específicos de las células T (RCT) no interactúan directamente con estas moléculas. Cuando un agente extraño (patógeno) ingresa al organismo debe ser primeramente procesado por células presentadoras de antígeno (CPA), que se encargan de capturarlo, endocitarlo, procesarlo y transportar los fragmentos antigénicos a los órganos linfoides para su presentación a linfocitos T (células T CD4⁺ y CD8⁺). Las principales CPA son: células dendríticas (DC), macrófagos, células B (Guery & Adorini, 1995) y recientemente se ha determinado que células NK también tienen la capacidad de estimular la respuesta de linfocitos CD4 luego de procesar antígenos derivados de las células blanco destruidas (Hanna et al, 2004). Las CPA fragmentan los antígenos en péptidos para ser acoplados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o clase II. De esta forma el complejo CMH-péptido se expresa en la superficie de las CPA para ser reconocido por receptores de células

T CD8⁺, en el caso del complejo CMH clase I-péptido o receptores de células T CD4⁺, en el caso del complejo CMH clase II-péptido (Hart, 1997). A su vez, la activación de células T vírgenes requiere dos tipos de señalización provenientes de las CPA. La primera señal se origina a partir del acoplamiento entre el RCT y el CMH que porta el péptido apropiado. La segunda señalización co-estimuladora, es dada por las moléculas accesorias B7.1, B7.2 y CD40 expresadas en las CPA, que se acoplan a los ligandos CD28 y CD40L expresados en células T (Manickasingham and Reis e Sousa, 2000).

La combinación de estas dos señalizaciones induce la síntesis y secreción de citoquinas como la IL-2, IL-12, expresión del receptor de IL-2, desarrollo clonal y diferenciación de células progenitoras Th en células Th efectoras (eTh) (June, 1991; Bianchi et al., 1999). Además, la producción de IL-12 por las CPA es inducida por la interacción entre CD40 en las CPA y la expresión de ligando CD40 en células T después de la activación. La unión del ligando CD40 es el estímulo mas potente en la regulación de moléculas co-estimuladoras y citoquinas tales como IL-12, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e IL-1 β (Bianchi et al., 1999).

Las citoquinas presentes durante la activación de células T CD4 influyen en la capacidad de células Th para diferenciarse en células Th1, que producen IL-2, IFN- γ , que favorecen la activación de macrófagos, producción de anticuerpos de opsonización y la respuesta inmune mediada por células frente a patógenos intracelulares, o células Th2 que producen una variedad de citoquinas anti-inflamatorias, que incluyen IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-10, las cuales favorecen la inmunidad humoral y alergia contra patógenos extracelulares (Abbas et al., 1996).

A la vez, ambas subpoblaciones celulares Th1 y Th2 producen pequeñas cantidades de TNF- α , factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) e IL-3 y existe una inhibición mutua entre las citoquinas polarizadas del tipo Th1 y Th2; la regulación de la activación de células T por las citoquinas anti-inflamatorias es un elemento de control crucial en este proceso (Opal and DePalo, 2000). (Figura 5).

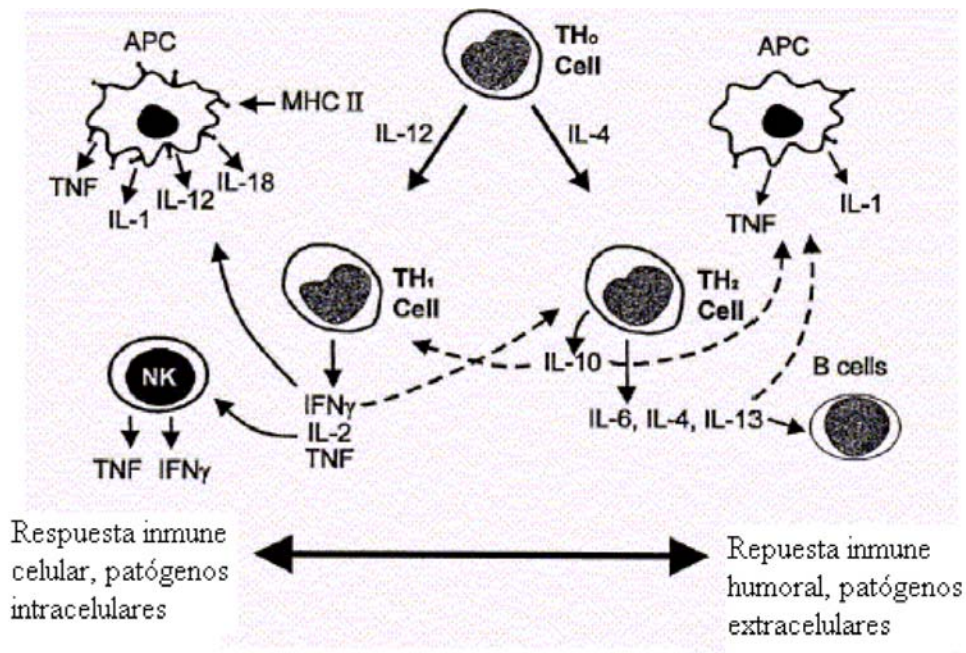


Fig. 5.- Polarización de las respuestas Th1 y Th2 por células CD4⁺ Th y rol de citoquinas anti-inflamatorias en la diferenciación de células T. Líneas sólidas representan rutas estimuladoras y líneas punteadas indican rutas inhibitorias. APC: Células presentadoras de antígeno; Th0: Células Th precursoras. (Opal and DePalo, 2000. Chest. 117: 1162-1172).

3.2.2.- Citoquinas

Es de conocimiento que las citoquinas, son mediadores solubles sintetizados durante la respuesta inmune frente a diferentes patógenos (Santiago et al., 2000). La progresión o la defensa exitosa del huésped frente a la enfermedad de leishmaniasis, involucra un complejo de mecanismos dependientes de células CD4⁺ Th1 o Th2 y múltiples citoquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-13) o inflamatorias (TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , IL-6 e IL-1 β) (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998).

IL-4

La IL-4 originalmente designada como factor 1 de estimulación de células B (BSF-1) (Ohara et al., 1985), es una glicoproteína monomérica de 129aa, con peso molecular

aproximado de 15-19 kDa, el gen que codifica la IL-4 esta situada en el cromosoma 11 del ratón y en el brazo largo del cromosoma 5 en humanos (D'Eustachio et al., 1988; Le Beau et al., 1989; Takahashi et al., 1989).

Esta citoquina pleiotrópica, secretada principalmente por células T CD4, se liga a receptores de alta afinidad expresados en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (Paul, 1991). En Células T, la IL-4 promueve la diferenciación de células T vírgenes en células Th2 secretoras de IL-4 y regula negativamente la producción del IFN- γ por células CD4 Th1 (Swain et al., 1990)

La IL-4 dirige la respuesta Th2, media el reclutamiento y activación de células mastocito, estimula la producción de anticuerpos IgE vía diferenciación de células B en células secretoras de IgE (Kurt-Jones et al., 1987; Greenbaum et al., 1988; Fernandez-Botran et al., 1988; Finkelman et al., 1990). También, la IL-4 tiene marcados efectos inhibitorios en la expresión y liberación de citoquinas pro-inflamatorias y es capaz de bloquear o suprimir las citoquinas derivadas de monocitos incluyendo IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8, proteína inflamatoria de macrófagos 1 alpha (MIP-1 α) (Brown and Hural, 1997).

Además, se ha demostrado que la IL-4 suprime la actividad citotóxica de los macrófagos, destrucción de parásitos intracelulares y producción del oxido nítrico derivado de los macrófagos (Wirth et al., 1989; Vannier et al., 1992). Los efectos inmunológicos de la IL-4 en infecciones bacterianas son complejos e incompletamente comprendidos; la IL-4 ha sido mostrada en la eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* del tejido pulmonar en modelos experimentales (Jain-Vora et al., 1998), sin embargo actúa como un factor de crecimiento para *Staphylococcus aureus*, resultando en una infección sistémica, incrementando la letalidad de la sepsis bacteriana (Hultgren et al., 1998).

IL-13

La IL-13 es una proteína monomérica no glicosilada de 132aa, con un peso molecular de 10 kDa, la secuencia nucleotídica de su gen de 4.3 kb de DNA está situada en el cromosoma 11

del ratón mientras que en humanos, el gen de la IL-13 fue secuenciado en un segmento de DNA de 4.6 kb y se mapeo en el cromosoma 5 (McKenzie et al., 1993).

Las IL-13 e IL-4 comparten un receptor celular común (receptor IL-4 tipo 1), lo cual se considera en relación con muchos de los efectos similares entre estas dos citoquinas anti-inflamatorias; IL-13 e IL-4 solamente comparten de 20 a 25% de homología para los aminoácidos primarios, pero la mayoría de las regiones α -hélices que son esenciales para su actividad son altamente homólogas (de Waal Malefyt et al., 1993). Es una citoquina derivada de células T, regula el crecimiento y diferenciación de células B, e inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α por macrófagos y células Th1 (Janeway et al., 2001)

Las principales funciones diferenciales entre IL-4 e IL-13 consisten en sus efectos sobre las células T. La IL-4 es un mediador dominante en la diferenciación de células Th2, en su proliferación y actividad mientras que la IL-13 tiene efectos mínimos sobre la función de células T (Zurawski and de Vries, 1994). Esta citoquina puede regular negativamente la producción de TNF, IL-1, IL-8 y la MIP-1 α por monocitos y tiene efectos profundos en la expresión de moléculas de superficie en monocitos y macrófagos (de Waal Malefyt et al., 1993). A su vez, la IL-13 regula positivamente la expresión de moléculas de superficie como las β 2-integrinas, antígenos del CMH-II y regula negativamente la expresión del receptor Fc γ y CD14, inhibe la activación de NF- κ B en macrófagos y protege contra la letalidad inducida por LPS en animales de experimentación (Mijatovic et al., 1997; Muchamuel et al., 1997).

También, la IL-13 suprime el daño pulmonar inflamatorio después de la deposición del complejo inmune IgG (Lentsch et al., 1999). En un estudio sobre el efecto de la administración exógena de citoquinas anti-inflamatorias en pulmones de ratas después de la deposición del complejo inmune IgG, la mayor actividad inhibitoria fue observada para la IL-13 e IL-10, seguidas por la IL-4 e IL-6 (Opal and DePalo, 2000).

IL-6

La IL-6 es un polipeptido monomérico de 184aa, con dos sitios potenciales de N-glicosilación y cuatro residuos de cisteína cuyos pesos moleculares varían entre 22 y 27 kDa, el gen esta situado en el cromosoma 6 (Kishimoto, 1989). La comparación de la secuencia del cDNA de la IL-6 humana con la murina, muestra una homología del 65% en el nivel del DNA y el 42% a nivel de proteína (Tanabe et al., 1988). La IL-6 es una citoquina multifuncional con un rol central en la defensa del huésped (Kishimoto, 1989), con funciones diversas como: elevación de la temperatura ajustada en el hipotálamo, estimulación de la expresión de proteínas C-reativas (CRP), fibrinogeno e induce la respuesta de fase aguda hepática a la infección y daño (Fey and Gauldie, 1990), diferenciación y/o activación de macrófagos y células T, crecimiento y diferenciación terminal de células B, apoyo en la formación de colonias multipotenciales por células troncales hematopoyéticas y diferenciación neural (Terry et al., 2000).

La IL-6 no se expresa constitutivamente, pero es altamente inducible en respuesta a estímulos inflamatorios como la IL-1, Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF- α , productos bacterianos tales como la endotoxina e infección viral (Kishimoto, 1989). Glucocorticoides producidos como parte de la respuesta inflamatoria actúan para incrementar algunos efectos de la IL-6, como por ejemplo la síntesis de proteínas de la fase aguda, pero regulan negativamente la expresión de IL-6 y proveen una vía de retroalimentación negativa en la respuesta inflamatoria in vivo (Terry et al., 2000). La IL-6 es producida por macrófagos/monocitos, fibroblastos, células endoteliales, adipositos, células T, hepatocitos, mixomas cardiacos, mielomas, astrogliomas y glioblastomas (Hirano et al., 1990; Hirano, 1992; Kishimoto et al., 1992).

La IL-6 es un mediador esencial de la respuesta de fase aguda. En ratones knockout, la respuesta de anticuerpos dependiente de células T es drásticamente comprimida en respuesta a la infección localizada y tejido dañado, con deterioro de la respuesta a ciertas infecciones virales; también se observó una deficiencia de la estimulación de macrófagos (Fattori et al., 1994).

La producción incontrolada de IL-6 esta implicada en la patología de diferentes enfermedades. Altos niveles de IL-6 en ratones transgénicos resulta en una plasmocitosis fatal (Suematsu et al., 1989) y ha sido implicada en múltiples mielomas humanos y sarcoma de kaposi (Miles et al., 1990). Niveles incrementados de IL-6 son también un rasgo de enfermedades tales como la artritis crónica juvenil, artritis reumática, osteoporosis y psoriasis (Grossman et al., 1989; Poli et al., 1994).

Sin embargo, estudios realizados en un modelo experimental de síndrome de shock toxico (TSS) han evidenciado que la IL-6 tiene un rol protector, atenuando la respuesta inflamatoria aguda (Barton et al., 1996).

Igualmente, evidencias generadas en ratones knockout han demostrado a la IL-6 como otro miembro de la familia de ligandos de la subunidad de la señal de transducción (gp 130) del receptor, que actúa predominantemente como una citoquina anti-inflamatoria, controlando los niveles de TNF- α , MIP-2, GM-CSF, IFN- γ (Xing et al., 1998) y promoviendo la síntesis del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra) y la liberación del receptor TNF soluble (Tilg et al., 1994). Adicionalmente, la IL-6 esta asociada con la síntesis de glucocorticoides, los cuales pueden suprimir varias funciones inmunes, incluyendo la producción de citoquinas y respuestas de células T (Imura and Fukata, 1994; Kunicka et al., 1993; Schleimer et al., 1984).

GM-CSF

El GM-CSF es una citoquina miembro de la familia de glicoproteínas de 144 y 141aa y peso molecular de entre 23 y 29kDa (Gasson, 1991). Los GM-CSF murino y humano están codificados por genes que son altamente homólogos, ambos genes son de aproximadamente 2.5 kbp de longitud, consisten de 4 exones separados por tres secuencias intermedias. En el ratón el gen del GM-CSF ha sido localizado en el cromosoma 11 y el gen GM-CSF humano ha sido mapeado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q21-q32) (Gasson, 1991).

GM-CSF actúa como un potente factor de crecimiento in vitro e in vivo, estimula la proliferación, diferenciación y maduración de células progenitoras del sistema mieloide

como también la modulación de las actividades funcionales de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, granulocitos y macrófagos maduros (Tomonaga et al., 1986; Park et al., 1992).

Esta citoquina puede ser sintetizada en respuesta a señales de activación por una variedad de tipos celulares como: células T activadas, macrófagos, células endoteliales, mastocitos y fibroblastos (Gasson, 1991). En el caso de células T y macrófagos son directamente activadas por estímulos inmunes e inflamatorios, mientras que la producción del GM-CSF por células endoteliales y fibroblastos es inducida por monoquinas como la IL-1 y TNF (Munker et al., 1986)

La presencia del GM-CSF esta involucrada en los procesos patológicos, en el caso de la expresión autocrina en células mieloides de leucemia tiene un rol en la neoplasia como también, en ciertos tumores sólidos y artropatías inflamatorias (Gasson, 1991).

IL-1 β

La IL-1 β es un polipéptido monomérico de 153 aminoácidos (aa) sintetizado inicialmente como un precursor (pIL-1 β) de 31 kDa, que posteriormente es clivado proteolíticamente para generar una molécula activa de 17.5 kDa (Mosley et al., 1987). En monocitos humanos estimulados, el procesamiento requiere una proteasa específica llamada enzima convertasa IL-1 β (ICE) que cliva el pIL-1 β en sitio 1 (Asp²⁷-Gly²⁸) y sitio 2 (Asp¹¹⁶-Ala¹¹⁷) para producir moléculas de 28 y 17.5 kDa (Howard et al., 1991).

La IL-1 β es un miembro de la familia IL-1 que esta situado en el brazo largo del cromosoma 2 próximo a los genes de la IL-1 α y de la IL-1ra. Esta citoquina tiene secuencias homologas con la IL-1ra y comparte aproximadamente el 26% de los aa (Dinarello, 1996).

La IL-1 β tiene un rol esencial en las diferentes enfermedades inflamatorias y en la patogénesis del shock séptico (Ferrari et al., 1997). En macrófagos y células microgliales, la endotoxina bacteriana LPS es el estimulante mejor caracterizado en la liberación de IL-1 β ,

causa una rápida acumulación de pIL-1 β seguida por una lenta liberación de la forma madura (Giri et al., 1985).

IFN- γ

El IFN- γ es una glicoproteína homodimérica de 149 aa y 34 kDa de peso molecular, la producción es restringida a células CD4 Th1 activadas, células T CD8 y células NK; la secreción del IFN- γ es restringida a la disponibilidad de citoquinas tales como la IL-12, IL-1 β y posiblemente TNF- α (Mogensen and Virelizier, 1987; Ijzermans and Marquet, 1989; D'Andrea et al., 1993).

Inicialmente fue caracterizada por su capacidad de brindar resistencia a células infectadas por virus, una propiedad compartida con las proteínas IFN- α e IFN- β , ambas secretadas por células infectadas por virus. Además de la actividad anti-viral IFN- γ ejerce otros efectos biológicos: 1) es un elemento esencial en la activación de macrófagos; 2) poderoso inductor del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH-II) y 3) factor importante en la producción y función de anticuerpos (Dijkmans and Billiau, 1988).

IFN- γ también ha mostrado efectos anti-protozoarios e inmunomodulatorios en proliferación celular y apoptosis, como también en la estimulación y represión de una variedad de genes (Piliard et al, 1988). La actividad anti-protozoarios de IFN- γ frente a *Toxoplasma* y *Chlamydia*, resulta de la actividad indolamina 2,3-dioxigenasa, una enzima inducida por IFN- γ (Sen and Lengyel, 1992).

En monocitos/macrófagos, las actividades del IFN- γ incluyen: incremento en la expresión del CMH-I y CMH-II, producción de IL-1, producción del factor activador de plaquetas (PAF), producción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y protección de monocitos contra la lisis mediada por células "killer" activadas por linfoquinas (LAK); regula negativamente la expresión del mRNA de IL-8 que es regulado positivamente por la IL-2, induce la producción del óxido nítrico (NO) y regula positivamente la expresión de la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 pero no de la molécula vascular de adhesión celular (VCAM)-1 o E-Selectina en células endoteliales (Thornhill et al., 1993).

La producción del IFN- γ es un paso crítico para la estimulación de la resistencia a varios patógenos (Bach et al., 1997), por lo tanto, juega un rol clave en la defensa del huésped. La mayor fuente de esta citoquina son las células NK y células CD4 Th1 (Mosmann et al., 1986; Manetti et al., 1993; Seder and Paul, 1994). Las células NK producen IFN- γ cuando son estimuladas por citoquinas de CPA (IL-12). Las células T helper que han sido conducidas a la vía Th1 por el antígeno expresan receptores para las IL-12 e IL-18 y tienen la capacidad de producir IFN- γ directamente en respuesta al estímulo de estas citoquinas (Yang, et al.2001).

De esta forma, las células T polarizadas (Th1) producen IFN- γ en respuesta a IL-12 e IL-18, sin necesidad del acoplamiento al RCT. Esto significa que existen dos vías de activación distinta, responsables de la producción del IFN- γ por células T. Una es la vía dependiente del RCT y otra es la vía inducida por las citoquinas, la cual no es dependiente del antígeno (Yoshimoto et al., 1998; Yang et al., 1999). El estudio de Yang et al., (2001), muestra que el sinergismo entre IL-12 e IL-18 involucraría la inducción de la proteína inducible asociada con el daño del DNA y parada del crecimiento (GADD45 β), la cual puede mantener la activación de las kinasas MEKK4 y p38 MAPK, necesarias para la inducción de IFN- γ a través de las citoquinas pero no a través de RCT.

TNF- α

La familia del TNF incluye dos proteínas relacionadas estructural y funcionalmente, el TNF- α o caquectina y TNF- β o linfotóxina (Ruddle and Waksman, 1968). El TNF- α , es una citoquina trimerica, polipeptídica no glicosilada de 157 aa y peso molecular de 17 kDa, es producida principalmente por macrófagos activados (monocitos), linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, células NK, células LAK, astrocitos, células endoteliales y células del músculo liso (Vilcek and Lee, 1991).

Los genes del TNF- α y TNF- β son copias simples, estrechamente ligados con el grupo de genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos y cromosoma 17 en ratones (Vilcek and Lee, 1991).

El TNF- α ejerce un amplio rango de actividades biológicas que son definidas como: necrosis de tumores in vivo y efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales in vitro (Aggarwal et al., 1985), actividad angiogénica (Frater-Schroeder et al.; 1987; Leibovich et al., 1987), estimulación in vivo de la proliferación de fibroblastos normales (Sugarman et al., 1985; Fransen et al., 1986; Vilcek et al., 1986), inducción de la liberación de factores de crecimiento incluyendo IL-1, GM-CSF, interferon β 2 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Kohase et al., 1986; Munker et al., 1986; Hajjar et al., 1987; Le et al., 1987) y estimulación de actividad colagenasa y producción de prostaglandina E2 por células sinoviales (Dayer et al., 1985). Adicionalmente, el TNF- α tiene actividad proinflamatoria e inmunoestimulante y es un importante mediador de la resistencia del huésped frente a agentes infecciosos (Old, 1985; Havell, 1987).

El TNF- α y el IFN- γ conjuntamente promueven la activación de macrófagos y son cruciales para la actividad anti-leishmanicida y anti-micobacteriana. Sin embargo, el potente cóctel inflamatorio y otras citoquinas asociadas (IL-1) parecen proveer señales mezcladas al cuerpo que provocan una respuesta inmune exagerada y agresiva frente a la infección asociada con formas severas de la enfermedad, esto hace que los mecanismos efectores de la respuesta inmune sean los causantes de la enfermedad más que el patógeno (Blackwell, 1999).

3.3.- LEISHMANIASIS

3.3.1.- Respuesta inmune celular

Una vez inoculados dentro de la piel, los flagelados promastigotes de *Leishmania* escapan de la respuesta inmune del huésped vertebrado penetrando en los macrófagos, principalmente por el polo flagelar; hay evidencias que sugieren que no hay un direccionamiento de los promastigotes por medio del flagelo, por el contrario el macrófago parece dirigirse hacia el parásito (Ampuero, 2000).

La proteína sérica C3 del complemento activada a través de la vía clásica se deposita en la superficie del protozoario, reconociéndose así ciertos receptores de membrana del macrófago (Domínguez et al., 2002). Otras moléculas abundantes en la superficie del parásito como lipofosfoglicano (LPG) o glicoproteína 63 (Gp63), se unen a estos receptores (Davies et al., 1990). Una vez fijados los promastigotes al macrófago, son englobados en una vacuola parasitófora que se une a lisosomas que contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir las *Leishmanias*, sin embargo, estas se diferencian y se transforman en amastigotes que resisten esta agresión y se multiplican dentro de estas vacuolas hasta que los macrófagos infectados ya no puedan contener más *Leishmanias* y la célula muere, liberando amastigotes que van a infectar otras células (Alexander et al., 1999). Al ser destruidos por los macrófagos, se generan antígenos de *Leishmania* que son expresados en la membrana del macrófago y presentados a los linfocitos Th en el contexto de los antígenos de clase II del CMH (Antoine et al., 1991; Russell et al., 1992; Locksley et al., 1993; Wang et al., 1993; Lang et al., 1994).

La actividad leishmanicida es debida al incremento de la capacidad de los macrófagos de producir oxígeno tóxico y óxido nítrico (NO) en respuesta al IFN- γ (Liew et al., 1999). La *Leishmania* induce la producción del TNF- α , el cual potencia la acción del IFN- γ y promueve la activación del macrófago, y el factor de transformación de crecimiento- β (TGF- β), asociado a la desactivación del macrófago e inhibición del IFN- γ (Gomes-Pereira et al., 2004). Adicionalmente, el IFN- γ puede ser producido muy tempranamente por las células “natural killer” (NK) y el TGF- β puede ser transportado por las plaquetas, siendo el primer marcador en arribar al sitio inflamatorio (Nakanishi, 2001). La sobrevivencia inicial de la *Leishmania* dentro del macrófago puede depender críticamente de estas citoquinas antagónicas que predominan en el micro-ambiente de la infección. La recuperación y la resistencia a la enfermedad en la leishmaniasis está fuertemente asociada a la efectividad de la respuesta de las células T (Castes et al., 1983; Carvalho et al., 1992).

3.3.2.- Linfocitos T CD4

La inmunidad protectora contra la *Leishmania* ha sido asociada predominantemente a los linfocitos T CD4+. Mosmann et al., (1986), presentaron evidencias de que células T CD4 pueden ser divididas en dos sub-poblaciones de células funcionalmente distintas de acuerdo al patrón de producción de citoquinas en: células Th1 y células Th2. La primera evidencia del desarrollo de células Th1 y Th2 y sus efectos en el curso de la enfermedad de la Leishmaniasis in vivo, fue obtenida en un modelo murino de infección con la especie *L. major*. (Reiner and Locksley, 1995).

En leishmaniasis murina, la respuesta inmune asociada puede ser predominantemente mediada por células Th1 que secretan citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , e IL-12 o por células Th2 que secretan citoquinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 (Heinzel et al., 1989; Chatelain et al., 1992).

De esta forma, las sub-poblaciones de linfocitos Th1 y Th2, son distinguidas por las citoquinas que secretan: células Th1 producen activadores de la inmunidad mediada por células, mientras que las células Th2 secretan citoquinas que promueven la respuesta inmune humoral (Gor et al., 2003).

La infección experimental de ratones con promastigotes de *Leishmania major* es, probablemente, el modelo mejor estudiado de una enfermedad infecciosa crónica que involucra la activación de células CD4⁺ Th1 y Th2 (Rogers et al., 2002).

La mayoría de los ratones controlan la infección en asociación con el desarrollo de una respuesta Th1 que asegura la producción del IFN- γ , esta citoquina es la principal activadora de los macrófagos y es requerida para la curación de la leishmaniasis (Belosevic et al., 1989; Wang et al., 1994). Las cepas de ratones C57BL/6, C3H y CBA, desarrollan una LC limitada cuando son infectados con *L. major*. En estos ratones la resolución de la infección es mediada por células Th1 que producen IFN- γ , el cual induce la producción de NO en células fagocíticas que albergan *L. major* (principalmente macrófagos) y lleva a la

destrucción del parásito. Por lo tanto, la infección con *L. major* en estas cepas de ratones asemeja el desarrollo de la LC en humanos (Rogers et al., 2002; Hondwicz and Scott, 2002). Por el contrario, la cepa de ratones susceptibles BALB/c, desarrolla una respuesta de tipo Th2 luego de la infección con *L. major*, las células T CD4 V β 4V α 8 de estos ratones producen mRNA de la IL-4 en respuesta al antígeno de *Leishmania* homólogo del receptor de kinasa C activada (LACK) y la IL-4 regula negativamente la expresión de la subunidad β 2 del receptor de la IL-12 en células CD4 Th1. Como resultado, las células no responden a la IL-12, la producción del IFN- γ y el NO son inhibidas y por lo tanto los parásitos albergados por los macrófagos no son destruidos (Launois et al., 1998; Higes and Muller, 1998).

Sin embargo, trabajos realizados por Dekrey et al., (1998) en ratones BALB/c, evidencian la resistencia de esta cepa a la infección con *Leishmania braziliensis*, como consecuencia de niveles superiores de síntesis de IFN- γ , en comparación con los niveles de IL-4, lo cual sugiere que el desarrollo de las infecciones con *Leishmania* depende tanto de la cepa de ratones como de la especie del parásito.

Contrariamente al modelo experimental de infecciones con *Leishmania major*, en la leishmaniasis humana no se presenta una respuesta inmune claramente polarizada del tipo Th1 y Th2, (Coutinho et al., 1996). Estudios inmunológicos en humanos han demostrado una mayor intensidad en la expresión de IFN- γ en lesiones cutáneas localizadas en comparación con lesiones diseminadas mientras que la frecuencia de células productoras de TNF- α fue similar en ambos casos clínicos (Vieira et al., 2002). También se ha sugerido que la LM puede representar una reacción de hipersensibilidad polarizada a la infección por *Leishmania* (Azulay and Azulay Jr, 1995) y otros estudios han revelado una mezcla de citoquinas de tipo 1 y tipo 2 en las lesiones con una regulación positiva de los niveles de mRNA para el IFN- γ , TNF α , IL-4 e IL-10 (Caceres-Dittmar et al., 1993; Díaz et al., 2003).

La respuesta inmune mediada por células T y la hipersensibilidad a antígenos de *Leishmania*, están presentes en lesiones cutáneas leves como también en lesiones mucosas severas. No obstante, la magnitud de las respuestas de células T tienden a ser más intensas

en pacientes con LM que en pacientes con LC (Bittencourt and Barral, 1991; Barral-Netto et al., 1992), sugiriendo, que los pacientes con LM presentan una exacerbada hipersensibilidad a antígenos del parásito, la cual conduce a la agravación de la lesión. Por el contrario, la respuesta inmune mediada por células como generalmente se observa en LC puede tener un efecto beneficioso, llevando las lesiones leves y susceptibles a la terapia (Liew et al., 1999).

El modelo murino no ha sido muy utilizado para lograr un mejor entendimiento de la respuesta inmune frente a *L. braziliensis* mediada por células T, debido a que los ratones son naturalmente resistentes a esta especie de parásito; la mayoría de los estudios sobre la respuesta inmune en LC y LM causadas por *L. braziliensis*, derivan de estudios en pacientes (Carvalho et al., 1985; Saravia et al., 1989; Da-Cruz et al., 1994).

Así, las células CD4 Th1 han mostrado jugar un rol importante en la protección frente a la mayoría de las infecciones por *Leishmania* en modelos experimentales (Scott, 1991; Swihart et al., 1995). Sin embargo, en la leishmaniasis cutánea humana, una dicotomía funcional en células T CD4 no ha sido definitivamente documentada.

3.3.3.- Linfocitos T CD8

Existen evidencias de la participación de las células T CD8+ citotóxicas en el control de la infección por *Leishmania* (Farell et al., 1989; Muller, 1992; Gurunathan et al., 2000). Estudios en modelos de leishmaniasis indican que células T CD8 son vitales para la resistencia primaria pero no son requeridas para el mantenimiento de periodos largos de control de una infección primaria con *L. major* (Huber et al., 1998).

La importancia de células T CD8 en la protección del huésped frente a patógenos intracelulares es bien reconocida (Stäger et al., 2000; Yoshida et al., 2001; Carvalho et al., 2002). Además, la preparación de células T CD8 es fundamental para la vacunación exitosa contra la leishmaniasis (Gurunathan et al., 2000). La vacunación con DNA induce la producción de células T CD8+ que sintetizan IFN-gamma y son importantes en la protección. Investigaciones recientes también han enfocado como los anticuerpos y el

complemento puede regular la inmunidad mediada por células T CD8. La activación del complemento mediada por inmuno complejos es un paso crucial en la generación de linfocitos T CD8 dependiente de la IL-4, luego de la vacunación contra leishmaniasis visceral (Stäger et al., 2003).

Por otra parte, existen evidencias de que las células T CD8 juegan un rol importante en los mecanismos responsables de la curación y resistencia a la infección causada por *Leishmania*, a través de la producción de IFN- γ y activación de macrófagos, o por un efecto citolítico de linfocitos T citotóxicos sobre los macrófagos parasitados o por una combinación de ambos efectos (Muller et al., 1994; Gurunathan et al., 1997; Kima et al., 1997). Además, se observó que células T CD8 específicas de antígenos de *Leishmania donovani* producen IFN- γ y son la población celular predominante en una respuesta inmune secundaria después de la re-infección con parásitos de *L. donovani* (Murray et al., 1992).

El estado protector se correlaciona con la presencia de IFN- γ , principalmente producido por los linfocitos T CD8, una característica frecuentemente más asociada a la activación del sistema inmune mediado por DNA (Rafati et al., 2002). También se ha demostrado, que la presencia de IL-12 al tiempo de la inmunización, activa eficazmente a células T CD8 citotóxicas específicas de *Leishmania major* como también una respuesta potente de células CD4 Th1 (Russo et al., 1999).

En otros trabajos se ha evidenciado que células T CD8+ y NK de personas que nunca han estado expuestas a *Leishmania*, producen IFN- γ en respuesta a estimulación con antígenos LACK (Maasho et al., 2000; Bourreau et al., 2002). Aunque el rol preciso de estas células no ha sido esclarecido, las mismas han sido asociadas con la protección contra la leishmaniasis en ratones y con la curación de LC en humanos (Da Cruz et al., 1994; Maasho, 1998)

Durante la fase aguda de una respuesta inmune, las células T CD8+ pueden sufrir una masiva proliferación y expansión (Butz and Bevan, 1998; Muralis-Krishna et al., 1998), resultando en una gran población de células T CD8+ efectoras que expresan perforina

intracelular, actividad citolítica y capacidad de secreción de citoquinas como IFN- γ y GM-CSF (Aruga et al., 1997). Estudios realizados en humanos han demostrado un mayor porcentaje de células T CD8+ con relación a células T CD4+, en lesiones de pacientes con LM en comparación con pacientes con LC (Castes and Tapia, 1998). Igualmente, la presencia de células T CD8+ citotóxicas ha sido demostrada en sangre periférica de pacientes con LM, pero no así en la circulación de pacientes con LC (Brodszyn et al., 1997).

3.3.4.- Citoquinas en leishmaniasis

Las citoquinas son mediadores solubles sintetizados durante la respuesta inmune frente a diferentes patógenos (Santiago et al., 2000), son liberadas durante el reconocimiento innato de agentes infecciosos y juegan un rol esencialmente regulador en la determinación de la subsecuente respuesta inmune adaptativa (Teixeira et al., 2000).

La defensa exitosa del huésped frente a la leishmaniasis, involucra un complejo de mecanismos dependientes de células Th1 y múltiples citoquinas (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998).

Estudios realizados en ratones susceptibles BALB/c reportan principalmente citoquinas de tipo Th2, en particular IL-4, como patrón establecido en las primeras horas después de la infección con *L. major* (Launois et al., 1995). Contrariamente, estudios posteriores realizados en el modelo experimental de *L. major*, documentan que durante los primeros días de infección, tanto ratones susceptibles como resistentes presentaron una población de células en los nódulos linfáticos conteniendo mRNA para citoquinas de tipo Th1 (IL-2, IFN- γ) y de tipo Th2 (IL-4, IL-10) (Reiner et al., 1994). Sin embargo, los ratones resistentes suprimieron los transcritos para IL-2, IL-4 e IL-10, mientras que en los ratones susceptibles el mRNA para IL-4 continuó expresándose a niveles elevados. Un factor determinante en el desarrollo de un fenotipo Th1 o Th2 es el entorno temprano de citoquinas, en este contexto la IL-12 es una de las citoquinas que contribuye significativamente al establecimiento del fenotipo Th1 tanto in vitro (Hsieh et al., 1993; Manetti et al., 1993) como in vivo (Heinzel et al., 1993; Sypek et al., 1993).

Contrariamente a los efectos beneficiosos de la IL-12, la IL-4 es la mayor responsable de la progresión de la enfermedad en ratones infectados con *L. major*, una respuesta temprana a antígenos LACK en ratones susceptibles BALB/c conduce a la producción de IL-4, que regula negativamente los receptores de IL-12 y conduce, últimamente, a la muerte de los ratones (Etges and Muller, 1998; Launois et al., 1998; Solbach and Laskay, 2000).

En células T CD4, la IL-4 promueve la diferenciación de células T vírgenes en células Th2 secretoras de IL-4 que suprimen la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTHR) y median la susceptibilidad frente a patógenos intracelulares (Sadick et al., 1990; Yamamura et al., 1991; Racke et al., 1994; Reiner and Locksley, 1995; O'Garra, 1998).

Se han reportado datos contradictorios concernientes a los efectos de IL-4 en la diferenciación de células Th in vivo. La mayoría de los experimentos muestran que la IL-4 induce la diferenciación de células Th2 y suprime el desarrollo de células Th1. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, la IL-4 instruye el desarrollo de células Th1 (Louis et al., 2003). Este hecho se demostró cuando la IL-4 estuvo disponible durante el periodo inicial de activación de células dendríticas por *L. major*, la IL-4 no solamente incrementó la producción de IL-12 por estas células, sino que también promovió el desarrollo de un fenotipo funcional de células dendríticas (DC)-1. De esta forma, IL-4 instruye una respuesta Th1 efectiva cuando la exposición a la IL-4 es restringida al periodo de activación de CD por estímulos innatos (Biedermann et al., 2001). Por el contrario, cuando la acción de IL-4 fue extendida a la fase de interacción de CPA y células T, la IL-4 tuvo un efecto directo sobre los linfocitos T e indujo la diferenciación de células Th2 y una progresión de la infección por *L. major* en ratones BALB/c resistentes, deficientes en células T CD4+ que expresan el receptor $V_{\beta}4V_{\alpha}8$ (Launois et al., 1997).

Otra citoquina capaz de inducir la supresión de IL-12 en células T CD4+ específicas y dirigir hacia una respuesta de tipo 2 y la progresión de la infección es la IL-13 (Bourreau et al., 2001), que comparte funciones biológicas con la IL-4. Ambas inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12 por monocitos/macrófagos, así regulan negativamente la respuesta inflamatoria (Hart et al.,

1989; de Waal Malefyt et al., 1993). De forma similar a la IL-4, la IL-13 inhibe la síntesis de óxido nítrico (NO) en células humanas (Saura et al., 1996). Esta citoquina es un factor que regula negativamente la función de los macrófagos, particularmente la producción de IL-12, por lo tanto, la inducción de IL-13 podría ser, en parte, un mecanismo usado por el parásito para evadir el sistema inmune. Pero como las células T humanas expresan un receptor de IL-13 funcional (Gauchat et al., 1997), podría tener algún efecto directo en la maduración de células T, mediante la inhibición de la producción de IFN- γ , como ha sido sugerido (Bourreau et al., 2001).

Según Bourreau et al., (2001), la IL-13 es el mediador central para el mantenimiento del desarrollo de una respuesta Th2 en leishmaniasis humana, por promover células específicas que no responden a la IL-12. Adicionalmente, el hecho de que ratones deficientes en IL-4/IL-13 presenten una fuerte resistencia a la infección por *Leishmania major*, es un argumento en favor de una acción combinada de estas citoquinas para producir una respuesta intensa de tipo Th2 e inhibir la diferenciación de células Th1 y la destrucción parasitaria (Matthews et al., 2000).

Estos estudios ponen en evidencia el rol complejo e integrado de IL-4 e IL-13 en el desarrollo de respuesta de células Th2, indicando que IL-13 es un componente mediador importante de la susceptibilidad frente a *L. major*. Por otra parte, esta investigación complementa estudios anteriores, de Mohrs et al., (1999) en el cual se observa una alteración de la función de IL-4 e IL-13 en ratones deficientes en la cadena alfa del receptor de IL-4 (IL-4R - / -) y el estudio de Noben-Trauth et al., (1999) en el que la infección con *L. major* es parcialmente y eficientemente controlada en ratones deficientes en IL-4 y ratones IL-4R α - / -, respectivamente. Por otra parte, los resultados sugieren que en ausencia de IL-4, la IL-13 podría reemplazar las funciones de la IL-4, e interferir con la activación de macrófagos infectados por el IFN- γ .

Además de los factores solubles mencionados, varias otras citoquinas tienen efectos marcados en la infección con *L. major* en ratones. Por ejemplo, el TNF- α tiene un rol crucial en la resolución de la infección con *Leishmania*, ya que puede incrementar la

actividad leishmanicida de los macrófagos, estimular la producción de NO y promover la eliminación de los parásitos intracelulares (Green et al., 1990; Liew et al, 1990).

El TNF- α tiene una función en la diferenciación de células Th1, también está involucrado en la activación de macrófagos inducida por citoquinas y formación de granulomas, actividades vinculadas con el control de la extensión y diseminación de las infecciones con patógenos intracelulares (Kindler et al., 1989). Estudios realizados en ratones BALB/c revelan que TNF- α endógeno es crucial en la adquisición inicial de resistencia y resolución de la infección visceral en un modelo experimental con *Leishmania donovani*, y que no es requerida la formación de granulomas (Tumang et al., 1994).

Aunque las citoquinas IFN- γ y TNF- α median la resistencia a infecciones con *Leishmania*, las mismas estarían asociadas con el daño tisular observado en leishmaniasis tegumentaria. Niveles altos de IFN- γ y TNF- α han sido observados en leishmaniasis cutánea y mucosa, en una fase tardía de la enfermedad. (Ribeiro-de-Jesus et al., 1998). Igualmente, niveles elevados de IFN- γ y TNF- α , entre otras citoquinas, han sido reportados en lesiones asociadas con leishmaniasis cutánea localizada y leishmaniasis mucocutánea (Pirmez et al., 1993). Sin embargo, el estudio de Da Cruz et al., (1996) en el cual los títulos de TNF- α en suero de pacientes con LM disminuyeron significativamente al final del tratamiento, a niveles comparables al de los pacientes con LC y donadores sanos, sugieren la participación del TNF- α en la patología de la leishmaniasis.

También Faria et al (2005), demostró una expresión elevada de citoquinas inflamatorias IFN- γ , moléculas citotóxicas (granzima A), y una baja expresión del receptor de IL-10 en lesiones de pacientes con LM, sugiriendo que la hiperactivación in situ, probablemente se deba a la regulación negativa del receptor de IL-10 en lesiones de LM, y el estudio de Gaze et al., (2006) determinó que TNF- α es producido tanto por las células T CD4⁺ como por monocitos CD14⁺ en pacientes con LM.

Numerosos estudios han reportado asociaciones alélicas entre el locus polimórfico del TNF- α dentro del locus del CMH en humanos y susceptibilidades a formas severas de infección

(McGuire et al., 1994; Cabrera et al., 1995; Khoo et al., 1997; Blackwell et al., 1997; Roy et al., 1997), enfermedades autoinmunes (Brinkman et al., 1997; Kirk et al., 1997) o alérgicas (Moffatt and Cookson, 1997). Otros estudios han demostrado tales asociaciones alélicas entre LM causada por *L. braziliensis* y dos polimorfismos diferentes, definidos como: 1) alto riesgo relativo de LM en homocigotos para el alelo 2 del polimorfismo en el intron 2 del gen de TNF- β (linfotóxina) y 2) una frecuencia significativamente más elevada del alelo 2 (simplemente una copia), una variante de la región promotora del gen de TNF- α , en pacientes con LM en comparación con controles de la misma área endémica (Cabrera et al., 1995). Estos resultados sugieren que la susceptibilidad a LM podría estar directamente asociada con polimorfismos reguladores que afectan la producción de TNF- α . Por el contrario, en leishmaniasis visceral la susceptibilidad a la enfermedad está asociada con altos niveles de TNF- α pero no está ligada al polimorfismo en el gen del TNF- α (Salomao et al., 1996).

Los macrófagos activados segregan otras citoquinas, adicionalmente al TNF- α , que no solamente regulan estas células en forma autocrina sino que también juegan un rol importante en la modulación de la respuesta inmune adquirida. Es el caso de la IL-6, la cual aparte de suprimir la acción leishmanicida de macrófagos activados con IFN- γ , TNF- α y estar involucrada en la patología de la leishmaniasis (Hatzigeorgiou et al., 1993), favorece la inducción de IL-4 y el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 (Rincón et al., 1997). Sin embargo, cuando ratones BALB.B (susceptibles) deficientes en IL-6 fueron infectados con *L. major*, los niveles de producción de citoquinas asociadas con una respuesta de tipo Th1 (IL-12), excepto por IFN- γ y Th2 (IL-4, IL-13) fueron inferiores a los de los ratones controles BALB.B (Titus et al., 2001). Estos resultados, conjuntamente con aquellos de otros autores (Ladel et al., 1997; Saunders et al., 2000) revelan que los efectos de la IL-6 en el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 o Th2, son variados e impredecibles.

Igualmente, el rol de IL-1 β y GM-CSF en leishmaniasis es variable y contradictorio, dependiendo del estudio. Mientras que algunos trabajos *in vitro* e *in vivo* indican que estos mediadores solubles incrementan la actividad leishmanicida de los macrófagos y por lo tanto juegan un rol protector en la leishmaniasis (Hatzigeorgiou et al., 1993; Satoskar et al.,

1998), otros autores reportan que estas citoquinas tienen un efecto deletéreo en esta enfermedad (Liew and O'Donnell, 1993; Theodos et al., 1994). Finalmente, es importante notar que antígenos de *Leishmania* presentados por macrófagos obtenidos de cultivos con GM-CSF pueden proteger ratones susceptibles BALB/c frente a un desafío con *L. major* a través de la activación de linfocitos Th1 (Doherty and Coffman, 1993).

Los macrófagos activados también ejercen un rol regulador a través de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el TGF- β . En un estudio reciente en pacientes con LM la producción de niveles elevados de las citoquinas pro-inflamatorias IFN- γ y TNF- α está asociada con una capacidad disminuida de las citoquinas IL-10 y TGF- β para modular esta respuesta. (Bacellar et al., 2002).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Células

Las células mononucleares periféricas (CMP) utilizadas en este estudio se obtuvieron de nueve pacientes residentes en la zona endémica de Chulumani (Yungas). Los participantes fueron informados previamente y con la aprobación de los mismos se prosiguió el estudio. El criterio utilizado para el diagnóstico fue la presencia de signos clínicos (lesión activa) compatibles con LM, un test de inmunofluorescencia indirecta positivo para *Leishmania* y una respuesta de hipersensibilidad retardada frente a antígenos de *Leishmania*. La evaluación de la respuesta inmunológica de los pacientes se realizó incorporando en el presente estudio, CMP de 11 donadores sanos. Las CMP fueron purificadas mediante centrifugación de sangre total heparinada sobre un gradiente de Histopaque-1077 (SIGMA, St. Louis, MO, EEUU) durante 45 min a 340 X G y 21°C. Las células fueron lavadas tres veces con medio RPMI 1640 (SIGMA) sólo previamente a su utilización; la viabilidad de las células se determinó por exclusión con el colorante azul de tripano. La suspensión final de células fue preparada en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero humano tipo AB (SIGMA) inactivado, penicilina y estreptomicina (medio completo).

4.2.- Antígeno

El lisado de parásitos se obtuvo a partir de formas promastigotes de *Leishmania braziliensis braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) cultivadas en medio Schneider a 27°C (5 a 7 días) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB) (Life Technologies GIBCO BRL, Grand Island, NY, EEUU), penicilina y estreptomicina. Los promastigotes lavados dos veces en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.2 luego de centrifugación (800 x G, 10 min, 4°C) y resuspendidos a una concentración de 10^8 parásitos/ml; la suspensión parasitaria fue sometida a siete ciclos de congelación (-70°C) y descongelación (37°C), el antígeno total soluble de *Leishmania* (ALb) se mantuvo a -20°C hasta su utilización. El contenido proteico de esta preparación antigénica se determinó mediante la técnica de Lowry.

4.3.- Anticuerpos

Se utilizaron CD4 y CD8 MACS MicroBeads (Miltenyi Biotec GMBH, Alemania) para la selección positiva de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

4.4.- Cultivo de Células Mononucleares Periféricas

Los cultivos de CMP fueron realizados en triplicado en placas de 96 alveolos (1.25×10^5 células) y en duplicado en placas de 24 alveolos (1.25×10^6 células) en medio completo, en presencia o ausencia de ALb ($15\mu\text{g/ml}$ concentración final), forbol miristato acetato (PMA) (SIGMA), ionomicina (I) (SIGMA), a concentraciones finales de 40 ng/ml y $1\ \mu\text{g/ml}$, respectivamente. La elección de la concentración final de ALb utilizada, fue guiada por reportes de estudios previos, por lo cual se determinó utilizar una concentración promedio de $15\ \mu\text{g/ml}$ (Melby et al., 1989; Bacellar et al., 2002). Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 5% CO_2 durante 72 hs.

4.5.- Test de proliferación celular

Durante las últimas 4 hs, los cultivos de las placas de 96 alvéolos fueron incubados con $20\ \mu\text{l}$ de alamarBlue (BioSource International, Camarillo, CA, EEUU) que permite la reducción de resazurin (color azul y no fluorescente) a resorufin (color rosado y altamente fluorescente) (O'Brien et al., 2000). La proliferación fue monitoreada luego de la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y la substracción de la absorbancia de la línea de base registrada a una longitud de onda de 600 nm .

4.6.- Separación de subpoblaciones CD4 y CD8

Se pusieron en suspensión las células de los cultivos de las placas de 24 alvéolos, se centrifugaron ($800 \times G$, 10 min, 4°C) y se lavaron dos veces con PBS, 2mM Etilendiaminotetraacético (EDTA), 5% SFB (tampón). Para todos los procedimientos de lavados, marcación y separación magnética, se utilizó tampón frío. Los sobrenadantes de cultivo se alicuotaron y se guardaron a -20°C hasta su utilización para la dosificación de citoquinas. Para la marcación magnética, se repartieron las suspensiones de células de cada condición en dos tubos y se incubaron con $20\ \mu\text{l}$ de MACS MicroBeads CD4 o CD8 durante 15 min a 4°C . Al cabo del periodo de incubación, se completó el volumen de cada tubo a $500\ \mu\text{l}$ y se depositaron en columnas MACS tipo LS (Miltenyi Biotec) colocadas previamente en un campo magnético de un separador MACS y equilibradas con tampón. Luego de lavar la columna ($3 \times 3\text{ml}$ tampón) se recolectaron las fracciones CD4^+ y CD8^+ luego de retirar la columna del separador, depositar 5 ml de tampón y expulsar el efluente

mediante la utilización de un pistón. El recuento de linfocitos se realizó en presencia de azul de tripano.

4.7.- Dosificación de citoquinas

La producción de GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13 y TNF- α fue determinada en los sobrenadantes de cultivo de CMP al cabo de 72 hs como se ha descrito, con la utilización de kits de ELISA de BIOSOURCE Europe S.A. (Bélgica). Estos consisten en ELISAs sándwich, para los cuales se siguieron las instrucciones de la casa comercial. Se realizaron curvas estándar para cada una de las citoquinas usando las citoquinas recombinantes de referencia proporcionadas y los resultados fueron leídos de estas curvas. Las sensibilidades de los test son las siguientes: GM-CSF, 3pg/ml; IFN- γ , 0.03IU/ml; IL-1 β , 2pg/ml; IL-4, 2pg/ml; IL-6, 2pg/ml; IL-13, 12pg/ml y TNF- α 3pg/ml.

4.8.- Análisis Estadístico

Para la utilización de métodos paramétricos y no paramétricos, se verificaron primeramente las condiciones de aplicación de: normalidad, utilizando el test de Shapiro-Wilk. Todos los resultados han sido expresados como la media \pm desviación estándar (SD). La media fue calculada para cada variable y condición de estimulación en donadores sanos y pacientes con LM. Las variables de linfoproliferación y porcentaje de sub-poblaciones celulares CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ fueron analizados por el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Para la producción de citoquinas se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y Test-T fue utilizado para la comparación de las citoquinas entre donadores sanos (DS) y pacientes LM (LM) La probabilidad (p) <0.001 y p<0.05 fue considerada altamente significativa (**) y significativas (*). Todos los test fueron realizados en el programa estadístico SPSS (versión 9.0).

5.- RESULTADOS

5.1.- Examen clínico y diagnóstico celular y parasitológico

Todos los pacientes presentaban lesiones mucosas activas al momento de tomar la muestra de sangre. Cuatro pacientes presentaban dos lesiones y cinco pacientes una lesión. El examen parasitológico reveló la presencia de parásitos en extendidos de lesiones de tres pacientes. Una reacción positiva de hipersensibilidad retardada (leishmanina) fue observada en 93% de los casos. Todos los pacientes se encontraban bajo un régimen de tratamiento al momento de tomar la muestra de sangre.

5.2.- Respuesta linfoproliferativa de CMP inducida por PMA-I o antígeno de *Leishmania braziliensis* (ALb)

La proliferación de células de 10 donadores sanos y 9 pacientes con leishmaniasis mucocutánea, fue analizada cuantitativamente mediante la técnica de “Alamar Blue” en términos de aumento del porcentaje de reducción relacionado con el crecimiento de las células. La Fig. 6 resume la respuesta de células de donadores sanos en condiciones de cultivo diferentes. Solamente el estímulo policlonal (PMA-I) resultó en un crecimiento significativo de células mononucleares en comparación con el comportamiento de las mismas células en presencia de medio de cultivo (RPMI sólo). Sin embargo, y a pesar de no causar una multiplicación neta de las células, la incubación de las mismas con ALb permitió detectar un aumento de 17% del porcentaje de reducción en estos cultivos en comparación con la condición control. Dos de los 10 donadores sanos evidenciaron una respuesta linfoproliferativa luego de incubación con ALb. Esto indicaría ya sea que esta preparación antigénica estimula una respuesta no específica o bien que antígenos de la misma comparten epitopes con otros agentes infecciosos frente a los cuales responden las células T de donadores sanos.

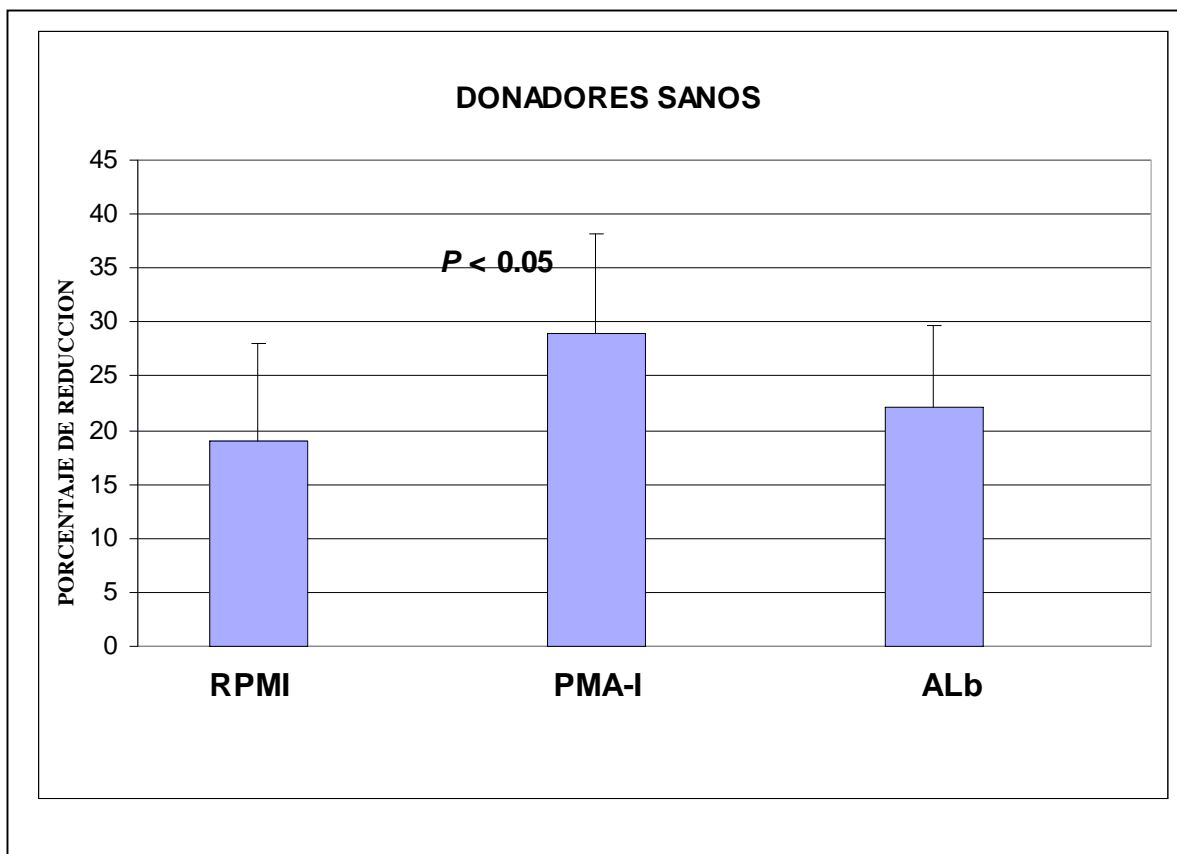


Fig. 6. Respuesta linfoproliferativa de CMP estimuladas con PMA-I o ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los porcentajes de reducción.

Por el contrario, la activación de las células de pacientes con leishmaniasis muco-cutánea con PMA-I no se tradujo en una respuesta proliferativa significativamente diferente a la respuesta de los cultivos de células no estimuladas (RPMI solo), cuando se analizaron en su totalidad las respuestas de las nueve muestras (Fig. 7 A). De igual manera, estos cultivos no respondieron en forma significativa al estímulo con ALb. Sin embargo, es de hacer notar que el crecimiento de las células incubadas con ALb, traducido en porcentajes de reducción, se incrementó en un 58% en comparación con los controles (5.3 ± 5.0 vs 8.4 ± 7.0). Por otra parte, siete de las nueve muestras de CMP de pacientes (77%) respondieron al estímulo policlonal del PMA-I con una linfoproliferación significativamente superior a la de los cultivos controles (Fig. 7 B). Por lo tanto, la ausencia de respuesta de estas células al estímulo específico del ALb en nuestro estudio, no se debió a una incapacidad de proliferar de las mismas.

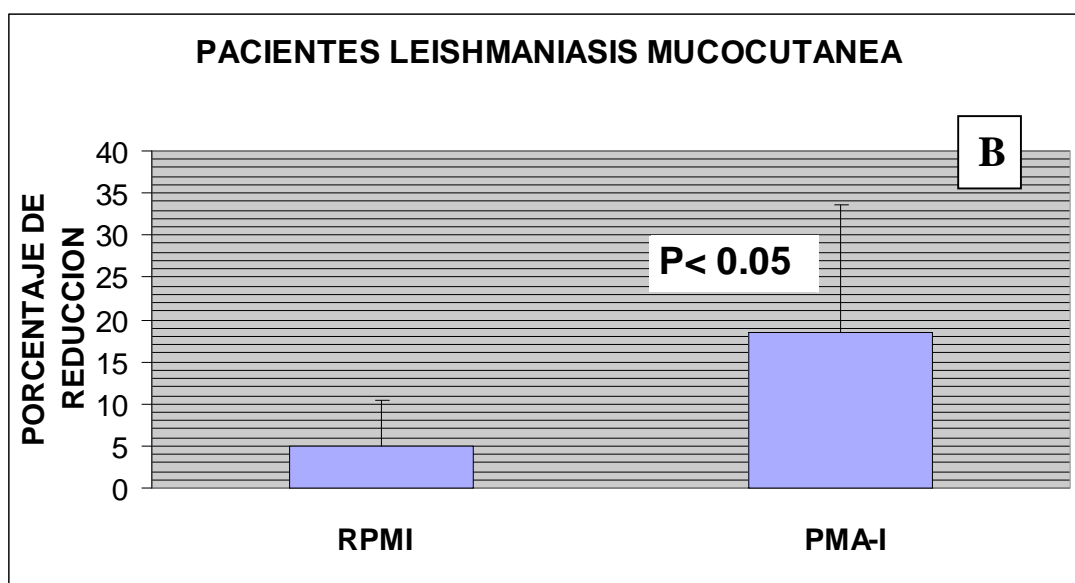
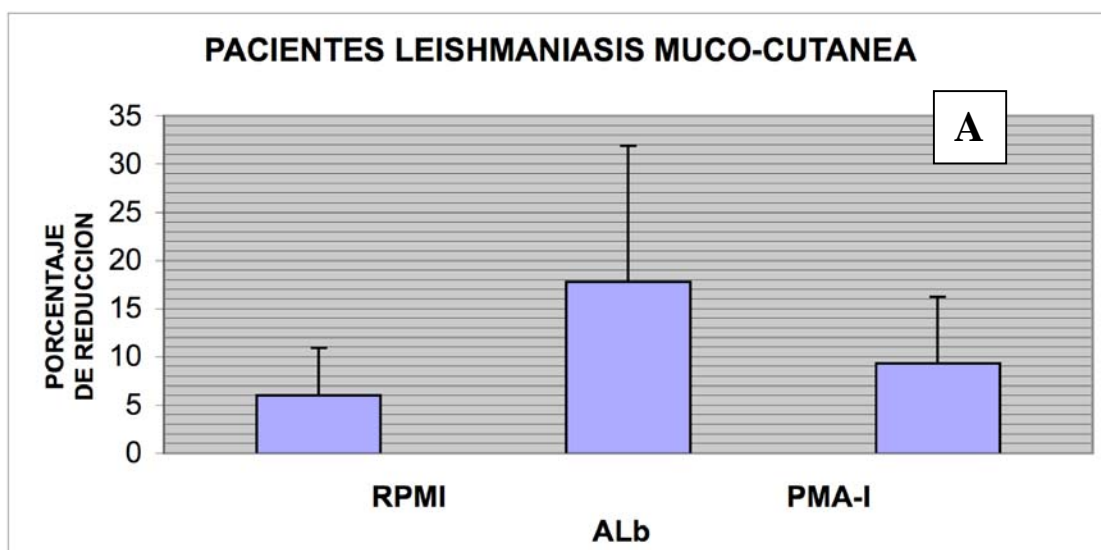


Fig. 7. Respuesta linfoproliferativa de CMP de nueve pacientes estimuladas con PMA-I o ALb (A) y CMP de siete pacientes estimuladas con PMA-I (B). Los resultados representan la media \pm DS de los porcentajes de reducción.

5.3.- Perfil de citoquinas liberadas por CMP de donadores sanos y pacientes con LM

La producción de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-13, GM-CSF, IFN- γ y TNF- α , se evaluó en sobrenadantes de cultivo de células estimuladas con PMA-I y ALb, mediante kits de ELISA disponibles en el comercio (BIOSOURCE, Nivelles, Bélgica). Las citoquinas se

seleccionaron por representar subpoblaciones de linfocitos Th1, Th2 y monocitos. Se observó que las células de pacientes con LM produjeron perfiles de citoquinas específicos para esta forma clínica en comparación con aquellos secretados por las células de donadores sanos. Ambas poblaciones de células liberaron niveles elevados de IFN- γ luego del estímulo con PMA-I y ALb (Fig 8).

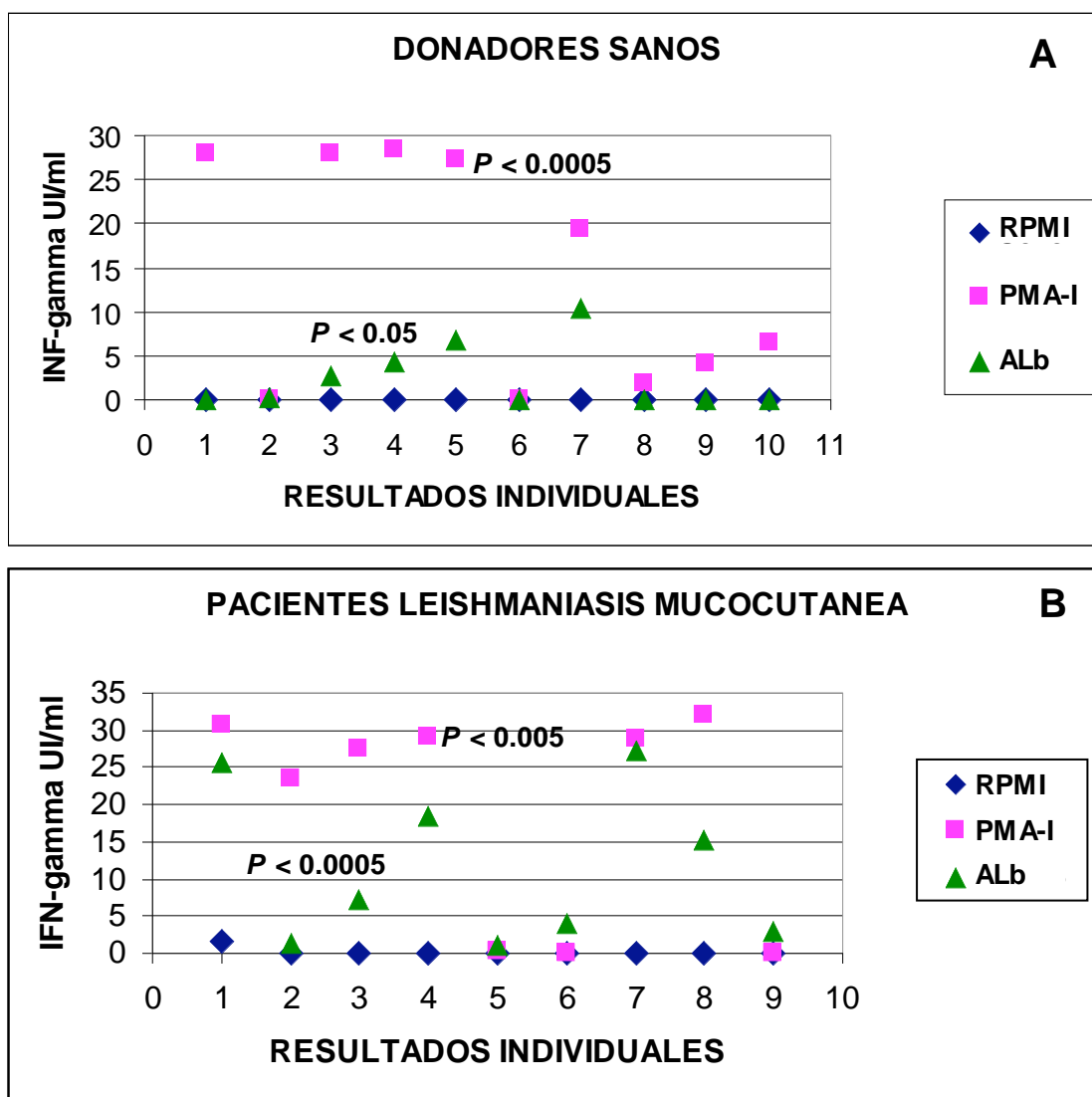


Fig. 8. Producción de IFN- γ de 10 donadores sanos (A) y 9 pacientes con LM (B) en sobrenadantes de cultivo de CMP incubadas en presencia de PMA-I y ALb. Los resultados representan los valores individuales de producción de cada paciente.

Sin embargo, el nivel medio de producción de IFN- γ de los 9 pacientes evaluados (11.45 ± 10.4 UI/ml) fue superior al valor medio de la producción de esta citoquina por los 10 donadores sanos (2.4 ± 3.7 UI/ml) luego de estimulación con ALb (Fig. 9).

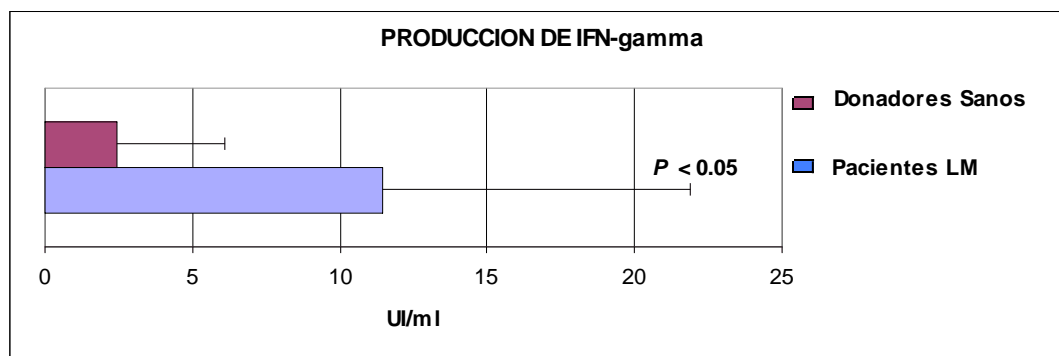


Fig. 9. Comparación de la producción de IFN- γ de donadores sanos y pacientes con LM luego de estimulación con ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de CMP.

La estimulación con PMA-I aumentó los niveles de secreción de IL-4 (80.5 ± 71.1 pg/ml) e IL-13 (1263.6 ± 1334.9 pg/ml) por CMP de donadores sanos en comparación con la producción de los cultivos controles para IL-4 (8.35 ± 11.1 pg/ml) e IL-13 (23.7 ± 3.8 pg/ml). Es de hacer notar que la concentración de IL-4 tanto en los cultivos controles con RPMI solo, como en los cultivos con ALb (7.25 ± 8 pg/ml) estuvo por debajo de la escala mínima de visualización por lo cual las barras correspondientes no aparecen en la Fig. 10. Las células de pacientes mostraron un comportamiento similar a las muestras de donadores sanos; la Fig. 11 refleja los niveles de producción de IL-4 (126 ± 87.4 pg/ml) e IL-13 (1429.8 ± 1293.3 pg/ml) in vitro luego del estímulo con PMA-I, en comparación con las concentraciones en los cultivos con RPMI solo para IL-4 (4.9 ± 0.21 pg/ml) e IL-13 (21.2 ± 2.20 pg/ml).

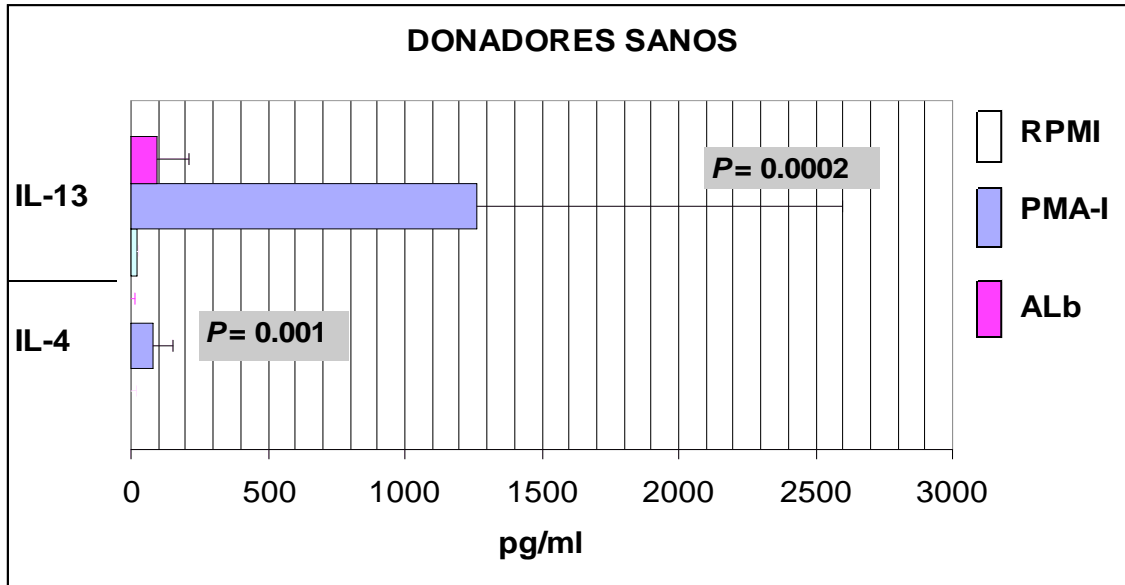


Fig. 10. Producción de IL-4 e IL-13 por CMP de 10 donadores sanos luego de incubación con RPMI, PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de IL-4 e IL-13 en sobrenadantes de CMP.

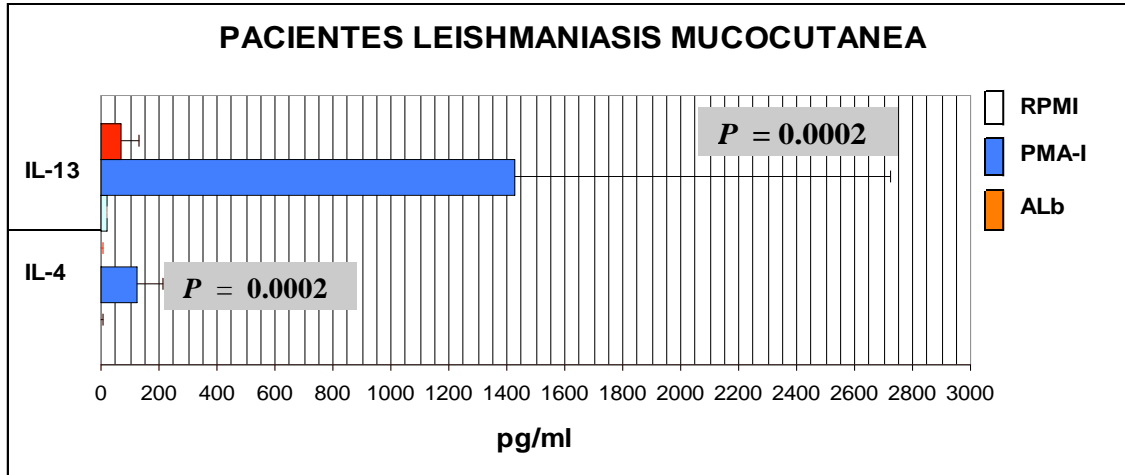


Fig. 11. Producción de IL-4 e IL-13 por CMP de 9 pacientes con LM luego de estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de cultivo.

Se pudo constatar que el estímulo con ALb estimulo la producción de IL-13, tanto en un 30% (3/10) como en un 44% (4/9) de las células de donadores sanos y pacientes con LM,

respectivamente (Fig. 12). Estos resultados permiten pensar que la IL-13 sería producida durante una fase inicial de infección con *Leishmania (V) braziliensis*.

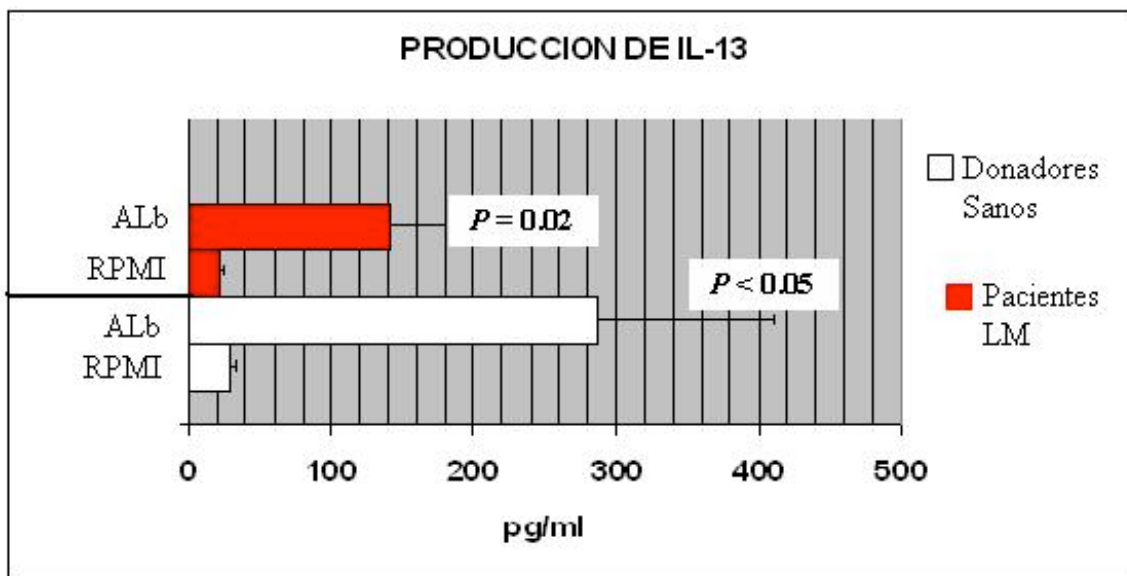


Fig.12. ALb indujo la producción de IL-13 en células T respondedoras de 3 donadores sanos y 4 pacientes con LM. Los resultados representan la media \pm DS de la concentración de IL-13 en sobrenadantes de cultivo.

Contrariamente a la producción de IL-4 e IL-13, los niveles de concentración de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y GM-CSF en los sobrenadantes de cultivo de donadores sanos, no se vieron afectados por ninguna de las condiciones de estimulación (Fig. 13).

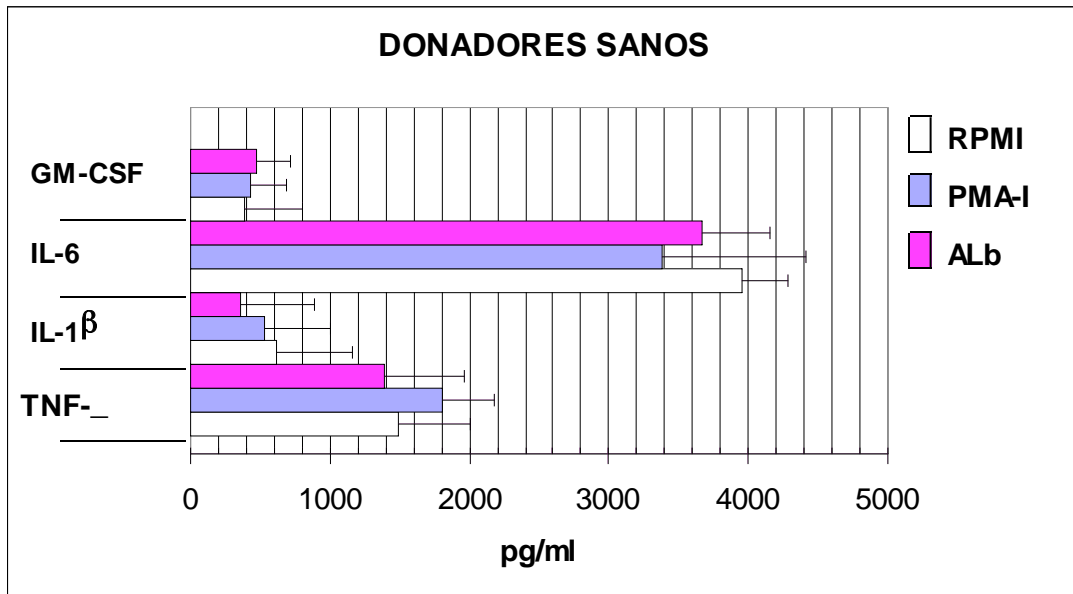


Fig. 13. Producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y GM-CSF por CMP de donadores sanos luego de estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de CMP.

Otra característica observada solamente en la respuesta de CMP de pacientes, fue la producción de niveles de GM-CSF (526.3 ± 358.5 pg/ml) significativamente diferentes al de los cultivos controles (190 ± 185.6 pg/ml), luego de estimular las células con PMA-I (Fig. 14). Ya que este comportamiento no se observó en los cultivos con CMP de donadores sanos, se podría pensar que si bien durante el curso de la infección con *Leishmania (V) braziliensis* las células de los pacientes han sido preactivadas para producir GM-CSF, probablemente, la frecuencia de clones específicos para la producción de esta citoquina ha sido muy baja en las muestras utilizadas para nuestro estudio y el estímulo con ALb no ha permitido niveles significativos de producción de GM-CSF. Es interesante hacer notar que 3 de los 9 pacientes incluidos en el estudio (33%) presentaron un aumento de la producción de GM-CSF (520 ± 293.1 pg/ml) en comparación con los controles (110 ± 35.1 pg/ml), luego del estímulo con ALb ($P < 0.05$) (gráfica no mostrada).

En este estudio, no evidenciamos en los cultivos la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL1- β , IL-6, TNF- α) por parte de las CMP de pacientes (Fig. 14).

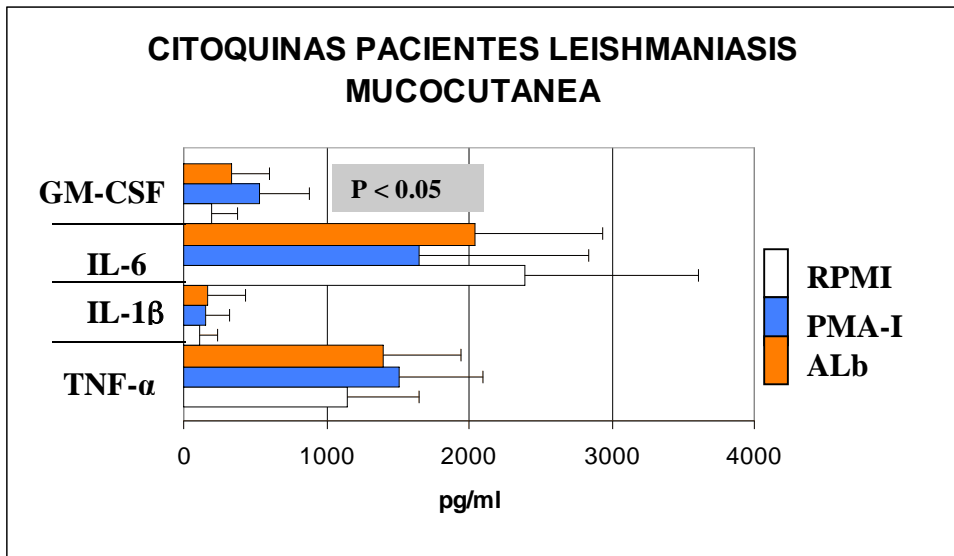


Fig. 14. Producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y GM-CSF por CMP de pacientes luego de estimulación con PMA-I y ALb. Los resultados representan la media \pm DS de los niveles de estas citoquinas en sobrenadantes de cultivo.

5.4.- Análisis fenotípico de sub-poblaciones de linfocitos T

Se analizaron los fenotipos de superficie CD4⁺ y CD8⁺ para evaluar la participación de estas poblaciones linfocitarias en la producción de las citoquinas, luego de la estimulación de CMP con ALb. Comparativamente, los linfocitos CD4 predominan en la respuesta de donadores sanos, mientras que la respuesta de pacientes con LM sugiere una mayor participación de linfocitos CD8⁺ (Tabla 1).

Tabla 1. Relación CD4/CD8 en Células Mononucleares Periféricas de donadores sanos y pacientes con LM *

Condiciones de cultivo	Donadores sanos	Pacientes LM
CMP + RPMI	1.4 ± 0.9	0.9 ± 0.8
CMP + ALb	1.2 ± 1.0	1.0 ± 0.9

* CMP de 10 donadores sanos y 9 pacientes con LM fueron analizadas por el fenotipo de superficie. Los resultados representan la media de la relación CD4/CD8 ± desviación estándar.

6.- DISCUSIÓN Y CONCLUSION

El presente estudio ha tenido como objetivo principal, mejorar nuestra comprensión sobre los mecanismos efectores de la respuesta inmune en la infección natural, asociados con la patología de la leishmaniasis (leishmaniasis muco-cutánea). Si bien los mecanismos asociados con una susceptibilidad o resistencia han sido extensamente documentados en infecciones experimentales con *L. major* (Rogers et al., 2002), la respuesta inmune de humanos frente a estos parásitos no está totalmente definida como en el modelo murino. Hemos basado nuestra hipótesis de estudio en que en humanos, a diferencia del modelo murino, la respuesta inmune frente a *Leishmania* está asociada con una mezcla de citoquinas de tipo Th1 y Th2.

La evaluación de la respuesta inmunológica desarrollada por pacientes con LM, puede ser realizada en términos de proliferación celular, análisis del fenotipo celular y producción del perfil de citoquinas específicas en cultivos in vitro, que constituyen una importante aproximación en la determinación de los mecanismos involucrados con esta forma clínica de la enfermedad. Adicionalmente, se han utilizado células de donadores sanos para una comparación con la respuesta de pacientes y para lograr un acercamiento a los eventos iniciales de la respuesta inmune frente a *Leishmania (V) braziliensis*.

Las CMP de pacientes con LM respondieron débilmente en tests de proliferación linfocitaria en presencia del estímulo específico con ALb. La disminución en la capacidad de la respuesta específica de los pacientes se manifestó no solamente en comparación con la respuesta de células de donadores sanos (proliferación significativa en cultivos con PMA-I), sino también por el hecho de que solamente 77% de las muestras celulares de pacientes proliferaron en cultivos con PMA-I. Estos resultados estarían en contradicción con estudios anteriores según los cuales la magnitud de la respuesta de células T tiende a ser mayor en pacientes con LM en comparación con pacientes con LC (Carvalho et al., 1985; Castés et al., 1988; Conceição-Silva et al., 1990; Saravia et al., 1989), sugiriendo que pacientes con LM presentan una exacerbada hipersensibilidad a antígenos parasitarios, lo cual agravaría el cuadro clínico de estos individuos. Sin embargo, es importante destacar que estudios previos

realizados por Gaafar et al., (1995) muestran que en un porcentaje reducido de pacientes con leishmaniasis cutánea severa (30%) la respuesta proliferativa es menor a la respuesta de un 80% de pacientes con leishmaniasis cutánea leve.

A pesar de la disminución en la capacidad proliferativa de las células de pacientes, estas evidenciaron su activación a través de la producción de citoquinas, lo que sugeriría, que en la fase de infección de estos pacientes y bajo un regimen de tratamiento, la respuesta inmune necesaria para una recuperación, se traduce en la producción de citoquinas y no tanto en la multiplicación de células efectoras.

Por otra parte, las discrepancias entre estudios previos y nuestros resultados podrían ser explicadas por el hecho de que las muestras utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas de pacientes con lesiones activas y sometidas a un régimen de quimioterapia al momento de la toma de muestra. En concordancia con los reportes de otros autores que observan una disminución de la respuesta linfoproliferativa al final del tratamiento (Da-Cruz et al., 1994; Toledo et al., 2001), es probable que in vivo el tratamiento provoque una reducción de la carga parasitaria lo cual conduciría a un número menor de células T respondedoras. Mas aún, un número reducido de clones específicos de *Leishmania* in vivo podrían contribuir a esta ausencia de respuesta.

Adicionalmente, se observó que células de dos donadores sanos proliferaron frente al estímulo con ALb. La expansión de linfocitos T de individuos no expuestos frente a antígenos de *Leishmania* ha sido previamente reportada en la literatura (Kemp et al., 1992; Gabaglia et al., 2000). Según los estudios de Kemp et al., (1992), células memoria de estos individuos serían mayormente las células que proliferan en un respuesta primaria frente a antígenos parasitarios debido a que las células T reactivas in vitro responden en una reacción cruzada frente a una re-evocación antigénica de microorganismos del medio ambiente.

Con relación a la producción de citoquinas y en concordancia con estudios anteriores (Gabaglia et al., 2000), se determinó que la capacidad de producción de IFN- γ por CMP de

pacientes frente al estímulo con ALb no es específica de LM, ya que las CMP de donadores sanos también mostraron esta capacidad. Sin embargo, se pudieron detectar concentraciones de IFN- γ más elevadas en los sobrenadantes de cultivo de CMP de pacientes en comparación con los sobrenadantes de CMP de donadores sanos. Estas observaciones no hacen más que reafirmar la idea de que si bien el IFN- γ es una citoquina importante en la defensa del huésped frente a *Leishmania*, la producción incontrolada de este mediador soluble estaría asociada con el daño en pacientes con LM.

No observamos un aumento en la producción de TNF- α , a pesar de que dicha producción es potencializada por el IFN- γ (Stein and Gordon, 1991) y concentraciones elevadas de esta citoquina están asociadas con la patología de LM (Bacellar et al., 2002). La determinación de una baja producción de TNF- α por las células de pacientes sugiere que los mismos se encontraban en franca recuperación de la infección mucosa como consecuencia del tratamiento ya que se han observado niveles bajos de este marcador en pacientes con LM al concluir el tratamiento (Da Cruz et al., 1996) y por otra parte se ha visto que la inhibición de la producción de TNF- α tiene un efecto curativo en pacientes con LM resistentes al tratamiento (Lessa et al., 2001).

El análisis de las citoquinas de tipo Th2, IL-4 e IL-13, fue incluido en este estudio. Solamente el estímulo con PMA-I permitió observar niveles detectables de IL-4 en los sobrenadantes de cultivo tanto de células de individuos no expuestos como en los cultivos de células de pacientes, lo cual induce a pensar que si bien las células tienen la competencia para producir IL-4, el antígeno utilizado no activaría la producción de esta citoquina en una fase inicial de infección ni tampoco en un proceso de tratamiento, durante la etapa de remisión de la lesión mucosa. La IL-13, sin embargo, fue detectada tanto en cultivos con PMA-I como en células incubadas con ALb. Aunque, en esta última condición, solamente un 30% y un 44% de las muestras de donadores y pacientes con LM, respectivamente, sintetizaron IL-13. Es probable que la producción de una respuesta de tipo Th2 (IL-13) con propiedades anti-inflamatorias en asociación con la producción de IFN- γ permita atenuar el desarrollo de lesiones y una mejor eliminación de parásitos. Por otra parte, el hecho de que la IL-13 no haya sido detectada en todas las muestras de pacientes incubadas con ALb, no

excluye la participación de otras citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , las cuales han sido asociadas con una modulación de la respuesta de tipo Th1 en LM (Bacellar et al., 2002; Faria et al., 2005).

Aunque linfocitos T activados pueden sintetizar IL-6, la ausencia simultánea de la producción de tres citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) sugiere que los monocitos no fueron activados para sintetizar citoquinas. Sin embargo, es probable que la actividad leishmanicida de los monocitos se manifieste a través de la producción de NO por efecto del IFN- γ , cabe recordar que los niveles de esta citoquina aumentaron en los cultivos luego de estimulación con ALb en nuestro estudio. Por otra parte, ha sido interesante constatar no solamente la producción de GM-CSF por células de pacientes tratadas con PMA-I, sino también que un 33% de las muestras de pacientes con LM fueron inducidas a producir GM-CSF por el ALb. Esta citoquina tendría una participación en la destrucción de parásitos intracelulares en pacientes con LM sometidos a un tratamiento. Se ha reportado que mediadores inflamatorios pueden ser generados por monocitos tratados con GM-CSF tales como IL-18 y H₂O₂ los cuales aumentarían la actividad microbicida frente a *L. tropica* (Handman and Burgess, 1979).

Relacionando los resultados de este estudio con los reportados en la literatura, se ha visto que GM-CSF conjuntamente con una vacuna consistente en un antígeno de *L. amazonensis*, tiene la capacidad de aumentar la producción de IFN- γ , en donadores sanos (Follador et al., 2002a). Hipotéticamente, se podría pensar que en una remisión eficaz de la lesión mucosa in vivo, participarían el GM-CSF conjuntamente con otras citoquinas y el IFN- γ ya que estudios previos han demostrado que la adición exógena de IFN- γ o productos de células de pacientes con LM conteniendo IFN- γ a macrófagos humanos infectados con *Leishmania* no es suficiente para eliminar los microorganismos (Carvalho et al., 1985; Reed et al., 1992).

La identificación de GM-CSF en este estudio in vitro en relación con LM adquiere mayor significancia ya que reafirmaría la potencialidad de esta citoquina como un importante adyuvante en combinación con antígenos de *Leishmania* para el tratamiento de LM, como se ha descrito previamente (Badaro et al., 2001).

La expansión de poblaciones de linfocitos T in vitro es una estrategia utilizada comúnmente para evaluar las poblaciones de linfocitos T relevantes. El análisis de la relación de linfocitos CD4/CD8 si bien no ha sido concluyente, ya que no se ha observado un patrón significativamente diferente entre los grupos de donadores, ha permitido percibir una tendencia en la respuesta de donadores sanos y pacientes. En la respuesta de donadores y pacientes frente al estímulo con ALb predominarían linfocitos CD4 y CD8, respectivamente. Nuestros resultados sugieren que en una etapa inicial de infección predominan linfocitos CD4 mientras que en una fase posterior, durante el proceso de recuperación de una lesión mucosa predominarían los linfocitos CD8. En este contexto, el mecanismo de cura y resistencia a la infección con *Leishmania* se manifestaría a través de una actividad citolítica, a través de las citoquinas o una combinación de ambas. Estas observaciones no concuerdan con los resultados reportados por Bacellar et al., (2002) según los cuales linfocitos con fenotipo CD4, principalmente, están asociados con LM. Las discrepancias entre estos estudios y nuestros resultados podrían explicarse por las diferentes especies de *Leishmania* utilizadas (*L. amazonensis* versus *L. (V) braziliensis* en este estudio), al hecho de que nuestros pacientes se encontraban bajo tratamiento o debido a que la toma de muestras para este estudio fue realizada en una etapa de infección mas temprana. Cabe recordar que la producción de IL-13 observada en nuestros cultivos corresponde a una respuesta de tipo Th2, la cual según algunos autores se desarrolla durante la fase temprana de infección, es transitoria y precede el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 polarizada (Bourreau et al., 2001).

En resumen, la presente investigación es un argumento adicional a favor de una respuesta inmune celular de pacientes frente a *Leishmania* variada y representada, parcialmente, por los dos tipos de respuestas: T1 y T2. De acuerdo al comportamiento de las muestras celulares de donadores sanos, este patrón de respuesta sería inducido al inicio de la infección por *L. (V) braziliensis*. Una característica específica de la respuesta de pacientes en nuestro estudio ha sido la producción de niveles elevados de IFN- γ , cuyos efectos serían limitados en algunos pacientes por la IL-13, citoquina anti-inflamatoria. Adicionalmente, la producción específica de GM-CSF en muestras de pacientes, cuyo rol eventual sería el de potencializar la respuesta inmune del huésped para la destrucción de parásitos intracelulares.

Finalmente, la controversia entre los resultados de diferentes investigadores podría elucidarse a través de estudios comparativos que contemplen, además del análisis de la respuesta inmune ex vivo de pacientes bien caracterizados, el estudio de las cepas de parásitos involucradas.

Importantes avances han sido realizados en la inmunología de la leishmaniasis como la demostración de la dicotomía en subpoblaciones de células CD4 Th1 y Th2 que lleva a la protección o exacerbación de la enfermedad. Sin embargo, aspectos sobre las interacciones complejas entre subpoblaciones celulares y múltiples citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IFN- γ etc.), anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β , etc.), y características inmunogenéticas de pacientes con LM aun requieren ser esclarecidos.

7. - BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., K. M. Murphy & A. Sher. 1996. **Functional diversity of helper T lymphocytes.** *Nature*.383: 787-793.
- Aggarwal, B. B., W. J. Kohr, P. E. Hass, B. Moffat, S. A. Spencer, W. J. Henzel, T. S. Bringman, G. E. Nedwin, D. V. Goeddel, and R. N. Harkins. 1985. **Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization.** *Journal of Biological Chemistry*. 260:2345-2354.
- Alexander, J., A. R. Satoskar and D. G. Russell. 1999. ***Leishmania* species: models of intracellular parasitism.** *Journal of Cell Science*. 112: 2993-3002.
- Amato, V., H. F. Andrade JR, and M.I. Duarte. 2003. **Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment.** *Acta Trópica*. 85: 39-49.
- Ampuero, J. S. 2000. **Leishmaniasis.** Módulos Técnicos. Serie documentos monográficos. N° 8. Pp.1-80. Lima
- Antoine, J. C., C. Jouanne, T. Lang, E. Prina, C. de Chastellier and C. Fréhel. 1991. **Localization of major histocompatibility complex class II molecules in phagolysosomes of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis*.** *Infection and Immunity*. 59: 764-775.
- Añez, N., Y. Tang, A. Rojas, G. Crisante, M. Killick-Kendrick and R. Killick-Kendrick. 2003. **Detection of amastigote-like forms in the valve of *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania major*.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 495-498.
- Aruga, A., E. Aruga, M. J. Cameron and A. E. Chang. 1997. **Different cytokine profiles**

released by CD4+ and CD8+ tumor-draining lymph node cells involved in mediating tumor regression. *Journal of Leukocyte Biology.* 61: 507-516.

Ashford, R. W., P. Desjeux, P. de Raadt. 1992. **Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis.** *Parasitology Today.* 8: 104-105.

Azulay, R. D. and D. R. Azulay, Jr. 1995. **Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis.** *International Journal of Dermatology.* 34: 303-307.

Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollob and E. M. Carvalho. 2002. **Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients.** *Infection and Immunity.* 70: 6734-6740.

Bach, E. A., M. Aquet and R. D. Schreiber. 1997. **The IFN- γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.** *Annual Review of Immunology.* 15: 563-591.

Badaro, R., I. Lobo, M. Nakatani, A. Muiños, E. M. Netto, R. N. Coler and S. G. Reed. 2001. **Successful use of a defined antigen/GM-CSF adjuvant vaccine to treat mucosal leishmaniasis refractory to antimony: A case report.** *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 5: 223-232.

Barton, B.E., J. Shortall, J.V. Jackson. 1996. **Interleukins 6 and 11 protect mice from mortality in a staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock model.** *Infection and Immunity.* 64: 714-718.

Barral-Netto, M., A. Barral, C. E. Brownell, Y. A. Skeiky, L. R. Ellingsworth, D. R. Twardzik and S. G. Reed. 1992. **Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escapes mechanism.** *Science.* 257: 545-548.

Barral-Netto, M., P. Machado, A. Barral. 1995. **Human Cutaneous Leishmaniasis: recent**

advances in physiopathology and treatment. European Journal of Dermatology. 5: 104-113.

Belosevic, M., D. S. Finbloom, P. H. Van der Meide, M. V. Slayter, C. A. Nacy. 1989. **Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with Leishmania major.** Journal of Immunology. 143: 266-274.

Bellamy, R., C. Ruwende, T. Corrah, K. P. McAdam, H. C. Whittle, A. V. Hill. 1998. **Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans.** England Journal of medicine. 338: 640-644.

Bianchi, R., U. Grohmann, C. Vacca, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti and P. Puccetti. 1999. **Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation.** Journal of Immunology. 163: 2517-2521.

Biedermann, T., S. Zimmermann, H. Himmelrich, A. Gummy, O. Egeter, A. K. Sakrauski, I. Seegmüller, H. Voigt, P. Launois, A. D. Levine, H. Wagner, K. Heeg, J. A. Louis and M. Röcken. 2001. **IL-4 instructs Th1 responses and resistance to Leishmania major in susceptible BALB/c mice.** Nature Immunology. 2: 1054-1060.

Bittencourt, A.L. and A. Barral. 1991. **Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 86: 51-56.

Blackwell, J., J. Freeman, D. Bradley. 1980. **Influence of H-2 complex on acquired resistance to Leishmania donovani infection in mice.** Nature. 283: 72-74.

Blackwell, J. M. 1996. **Genetic susceptibility to leishmanial infections: studies in mice and man.** Parasitology. 112 (suppl): S67-S74.

- Blackwell, J.M., G.F. Black, C.S. Peacock, E.N. Miller, D. Sibthorpe, D. Gnananandha, J.J. Shaw, F. Silveira, Z. Lins-Lainson, F. Ramos, A. Collins and M.-A. Shaw. 1997. **Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London – Series B: Biological Sciences. 352: 1331-1345.
- Blackwell, J.M. 1999. **Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis**. Parasitology Today. 15: 73-75.
- Bogdan, C. 1998. **The multiplex function of nitric oxide in (auto) immunity**. Journal of Experimental Medicine. 187:1361–1365.
- Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. M. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley and K. J. Gollob. 2001. **Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis**. Infection and Immunity. 69: 3232-3239.
- Bourreau, E., G. Prévot, R. Pradinaud, and P. Launois. 2001. **Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4⁺ T cells unresponsive to IL-12**. Journal of Infectious Diseases. 183: 953-959.
- Brinkman, B.M., T.W. Huizinga, S.S. Kurban, E.A. van der Velde, G.M. Schreuder, J.M. Hazes, F.C. Breedveld and C.L. Verweij. 1997. **Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease?** British Journal of Rheumatology. 36: 516-521.
- Brown, M. A., J. Hural. 1997. **Functions of IL-4 and control of its expression**. Critical Review of Immunology. 17: 1-32.

- Brodskyn, C. I., A. Barral, V. Boaventura, E. Carvalho, M. Barral-Netto. 1997. **Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis.** *Journal of Immunology*. 159: 4467-4473.
- Butz, E.A. and M.J. Bevan. 1998. **Massive expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells during an acute virus infection.** *Immunity*. 8: 167-175.
- Cabrera M., M.A. Shaw, C. Sharples, H. Williams, M. Castes, J. Convit, J. M. Blackwell. 1995. **Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis.** *Journal of Experimental Medicine*. 182: 1259-1264.
- Caceres-Dittmar, G., F. J. Tapia, M. A. Sánchez, M. Yamamura, K. Uyemura, R. L. Modlia, B. R. Bloom and J. Convit. 1993. **Determination the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction.** *Clinical Experimental Immunology*. 91: 500-505.
- Carvalho, E. M., W. D. Johnson, E. Barreto, P. D. Marsden, J. L. Costa, S. Reed and H. Rocha. 1985. **Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis.** *Journal of Immunology*. 135: 4144-4148.
- Carvalho, E. M., A. Barral, D. Pedral-Sampaio, M. Barral-Netto, R. Badaro, H. Rocha, W. D. Johnson Jr. 1992. **Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*.** *Journal of Infectious Diseases*. 165: 535-540.
- Carvalho, L. H., G. Sano, J. C. R. Hafalla, A. Morrot, M. A. Curotto de Lafaille and F. Zavala. 2002. **IL-4 secreting CD4⁺ T cells are crucial to the development of CD8⁺ T-cell responses against malaria liver stages.** *Nature Medicine*. 8: 166-170.

- Castes, M., A. Agnelli, O. Verde and A. J. Rondon. 1983. **Characterization of the cellular immune response in american cutaneous leishmaniasis.** Clinical Immunology and Immunopathology. 27: 176-186.
- Castes, M., A. Agnelli and A. J. Rondon. 1984. **Mechanism associated with immunoregulation in human american cutaneous leishmaniasis.** Clinical Experimental of Immunology. 57: 279-286.
- Castes, M., F. J. Tapia. 1998. **Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis.** Acta Científica Venezolana. 49: 42-56.
- Cellier, M., G. Govoni, S. Vidal, T. Kwan, N. Groulx, J. Liu, et al. 1994. **Human natural resistance-associated macrophage protein: cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression.** Journal of Experimental Medicine. 180: 1741-1752.
- Charlab, R., J.G Valenzuela, E. D. Rowton and J.M. Ribeiro. 1999. **Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 26: 15155-15160.
- Chatelain, R., K. Varkila and R. L. Coffman. 1992. **IL-4 induces a Th2 response in Leishmania major-infected mice.** Journal of Immunology. 148: 1182.
- Conceição-Silva, F., R. C. C. Dórea, C. Primes, A. Schubach and S. G. Coutinho. 1990. **Quantitative study of Leishmania braziliensis braziliensis reactive Y cells in peripheral blood and in the lesions of patients with american mucocutaneous leishmaniasis.** Clinical Experimental of Immunology. 79: 221-226.

- Coutinho, S., M. Oliveira, A. Da-Cruz, P. De Luca, S. Mendoça, A. Bertho, L. Soong, and D. McMahon-Pratt. 1996. **T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure.** *Experimental Parasitology*. 84: 144-155.
- Da-Cruz, A. M., F. Conceição-Silva, A. L. Bertho and S. G. Coutinho. 1994. **Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis.** *Infection and Immunity*. 62: 2614-2618.
- Da-Cruz, A. M., M. Pereira de Oliveira, P. De Luca, S. Mendoça, S. Coutinho. 1996. **Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 91: 225-229.
- Da-Cruz, A. M., R. Bittar, M. Mattos, M. P. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Ribeiro, R. B. Azeredo-Coutinho and S. G. Coutinho. 2002. **T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy.** *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 251-256.
- D'Andrea, A., M. Aste-Amezaga, N. M. Valiante, X. Ma, M. Kubin, G. Trinchieri. 1993. **Interleukin-10 inhibits human lymphocyte IFN- γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 synthesis in accessory cells.** *Journal of Experimental Medicine* 178: 1041-1048.
- Da Silva, R.P., B.F. Hall, K.A. Joiner and D.L. Sacks. 1989. **CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages.** *Journal of Immunology*. 143: 617-622.
- David, C., L. Dimier-David, F. Vargas, M. Torrez and J. P. Dedet. 1992. **Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: are prospective**

study.

- Davies, C. E., A. M. Cooper, C. Peacock, R. P. Lane and J. M. Blackwell. 1990. **Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of Leishmania major in the sand fly, Phlebotomus papatasi.** Parasitology. 101: 337-343.
- Davies, C. R., P. Kaye, S. L. Croft, S. Sundar. 2003. **Leishmaniasis: new approaches to disease control.** B M J. 326: 377-382.
- Dayer, J. M., B. Beutler, and A. Cerami. 1985. **Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts.** Journal of Experimental Medicine. 162: 2163-2168.
- Dekrey, G. K., H. C. Lima and R. G. Titus. 1998. **Analysis of the immune responses of mice to infection with Leishmania braziliensis.** Infection and Immunity. 66: 827-829.
- Desjeux, P., M. Quilici, J. Lapierre. 1974. **A propos de 113 cas de leishmanioses cutanées et cutáneo-muqueuse observés en Bolivie. Etude séro-immunologiques de 71 cas.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique. 67: 387-395
- D'Eustachio, P., M. Brown, C. Watson, W. E. Paul. 1988. **The IL-4 gene maps to chromosome 11, near the gene encoding IL-13.** Journal of Immunology. 141: 3067-3071
- De Moura, T. R., F. O. Novais, F. Oliveira, J. Clarêncio, A. Noronha, A. Barral, C. Brodskyn and C. I. de Oliveira. 2005. **Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis.** Infection and Immunity. 73: 5827-5834.

- De Waal Malefyt, R., C.G. Figdor, R. Huijbens, S. Mohan-Peterson, B. Bennett, J. Culpepper, W. Dang, G. Zurawski and J.E. de Vries. 1993. **Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes.** *Journal of Immunology*. 151: 6370-6381.
- Díaz, N. L., O. Zerpa, L. V. Ponce, J. Convit, A. J. Rondon and E. J. Tapia. 2002. **Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion.** *Experimental Dermatology*. 11: 34-41.
- Dijkmans R. and A. Billiau. 1988. **Interferon- γ : a master key in the immune system.** *Current Opinion in Immunology*. 1: 269-274.
- Dinareello, C.A. 1996. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood*. 87: 2095-2147.
- Doherty, T. M. and R. L. Coffman. 1993. **Leishmania antigens presented by GM-CSF-derived macrophages protect susceptible mice against challenge with *Leishmania major*.** *Journal of Immunology*. 150: 5476-5483.
- Dominguez, M., I. Moreno, M. López-Trascasa and A. Toraño. 2002. **Complement interaction with Trypanosomatid promastigotes in normal human serum.** *Journal Experimental Medicine*. 195: 451-459.
- Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver and M.A. Liu. 1997. **DNA vaccines.** *Annual Review of Immunology*. 15: 617-648.
- Escomel, E. 1911. **La Espundia.** *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 4: 489-492.
- Esterre, P., S. Guerret, P. Ravisse, L. Dimier-David, J. P. Dedet and J. A. Grimaud. 1994. **Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis.** *Parasite*. 1: 305-309

- Etges, R. and I. Muller. 1998. **Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions.** Journal of Molecular Medicine. 76: 372-390.
- Farell, J. P., I. Muller and J. A. Louis. 1989. **A role for Lyt2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice.** Journal of Immunology. 22: 3063-3069.
- Faria, D. R., K. J. Gollob, J. Barbosa, Jr., A. Schriefer, P. R. L. Machado, H. Lessa, L. P. Carvalho, M. A. Romano-Silva, A. R. de Jesus, E. M. Carvalho and W. O. Dutra. 2005. **Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis.** Infection and Immunity. 73: 7853-7859.
- Fattori, E., M. Cappelletti, P. Costa, C. Sellitto, L. Cantoni, M. Carelli, R. Faggioni, G. Fantuzzi, P. Ghezzi and V. Poli. 1994. **Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice.** Journal of Experimental Medicine. 180: 1243-1250.
- Fernandez-Botran, R., V. M. Sanders, T. R. Mosmann, E. S. Vitetta. 1988. **Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells.** Journal of Experimental Medicine. 168: 543-558.
- Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau and F. Di Virgilio. 1997. **Purinergic Modulation of Interleukin-1b Release from Microglial Cells Stimulated with Bacterial Endotoxin.** Journal of Experimental Medicine. 185: 579-582.
- Fey, G.H. and J. Gauldie. 1990. **The acute phase response of the liver in inflammation.** Progress in liver diseases. 9:89-116.

- Finkelman, F. D., J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban Jr., M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, W. E. Paul. 1990. **Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.** Annual Review of Immunology. 8: 303-333.
- Follador, I., A. Cibele, G. Orge, L. H. Cheng, L. P. de Carvalho, O. Bacellar, R. P. Almeida, E. M. Carvalho. 2002a. **Immune response to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.** Vaccine. 20: 1365-1368.
- Fransen, L., J. Van der Heyden, R. Ruyschaert, and W. Fiers. 1986. **Recombinant tumor necrosis factor: Its effects and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed cell lines.** European Journal of Cancer and Clinical Oncology 22:419-426.
- Frater-Schroeder, M., W. Risau, R. Hallmann, P. Gautschi, and P. Bohlen. 1987. **Tumor necrosis factor type α , a potent inhibitor of endothelial cell growth *in vitro*, is angiogenic *in vivo*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84:5277-5281.
- Gaafar, A., A. Kharazmi, A. Ismail, M. Kemp, A. Hey, C. B. V. Christensen, M. Dafalla, A. Y. El Kadar, A. M. El Hassan and T. G. Theander. 1995. **Dichotomy of T cell response to leishmania antigens in patients suffering from cutaneous leishmaniasis: absence or scarcity of Th1 activity is associated with severe infections.** Clinical Experimental of Immunology. 100: 239-245.
- Gabaglia, R. C., M. T. Valle, D. Fenoglio, M. A. Barcinski and F. Manca. 2000. **CD4⁺ T cell response to Leishmania spp. in non-infected individuals.** Human Immunology. 61: 531-537.
- Gasson, J. C. 1991. **Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-**

stimulating factor. Blood. 77: 1131-1145.

Gauchat, J.F., E. Schlagenhaut, N. P. Feng, S. Alouani, G. Elson, L. D. Notarangelo, T. Wells, H. P. Eugster, J. Y. Bonnefoy. 1997. **A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T and endothelial cells encoding an alternative type II interleukin-4/interleukin-13 receptor.** European Journal of Immunology. 27: 971-978.

Gaze, S. T., W. O. Dutra, M. Lessa, L. H. Guimarães, A. R. de Jesus, L. P. Carvalho, P. Machado, E. M. Carvalho, K. J. Gollob. 2006. **Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population.** Scandinavian journal of Immunology. 63: 70-78.

Giri, J. G., P. T. Lomechco and S. B. Mizel. 1985. **Studies on the synthesis and secretion of interleukin-1.** Journal of Immunology. 134: 343-349.

Gomes-Pereira, S., O. R. Rodríguez, N. Rolão, P. D. Almeida and G. M. Santos-Gomes. 2004. **Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non-cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8 T cell and TGF- β production.** FEMS Immunology and Medical Microbiology. 41: 59-68.

Gonzalez, R., L. De Sousa, R. Devera. 1999. **Seasonal and nocturnal domiciliary human landing/biting behaviour of *Lutzomyia (lutzomyia) evansi* and *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (diptera; Psychodidae) in a periurban area of a city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoategui State).** Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 93: 361-364.

Gor, D. O., N. R. Rose and N. S. Greenspan. 2003. **Th1-Th2: a Procrustean paradigm.**

Nature Immunology. 4: 503-505.

Gradoni, L., M. Gramiccia and A. Scalone. 2003. **Visceral leishmaniasis treatment, Italy.** Emerging Infectious Diseases. 9: 1617-1620.

Green, S.J., R.M. Crawford, J.T. Hockmeyer and M.S. Meltzer. 1990. ***Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha.** Journal of Immunology. 145: 4290-4297.

Greenbaum, L. A., J. B. Hozowitz, A. Woods, T. Pasqualini, E. P. Reich, K. Bottomly. 1988. **Autocrine growth of CD4⁺ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells.** Journal of Immunology. 140: 1555-1560.

Grevelink S, Lerner E. 1996. **Leishmaniasis.** Journal of the American Academy of Dermatology. 34: 257 – 270.

Grimaldi, G. JR., and R. B Tesh. 1993. **Leishmaniasis of the new world: Current concepts and implications for future research.** Clinical Microbiology Reviews. 6: 230-250.

Grogl, M, T. N. Thomason, E. D. Franke. 1992. **Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 47: 117-126.

Grossman, R. M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D. P. Murphy, L. T. May, T. S. Kupper, P. B. Sehgal and A. B. Gottlieb. 1989. **Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86: 6367-6371.

Guérey, J-C. and L. Adorini. 1995. **Dendritic Cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T-cell.** Journal of Immunology. 154: 536-544.

Gurunathan, S., D. L. Sacks, D. R. Brown, S. L. Retner, H. Charest, N. Glaichenhaus and R. A. Seder. 1997. **Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major.** Journal of Experimental Medicine. 186: 1137-1147.

Gurunathan, S., C. V. Wu, B. L. Freidag and R. A. Seder. 2000. **DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity.** Current Opinion Immunology. 12: 442-447.

<http://www.who.int/ctd/html/leis.html>

[http://www. Who.org](http://www.who.org)

Hajjar, K. A., D. P. Hajjar, R. L. Silverstein, and R. L. Nachman. 1987. **Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells.** Journal of Experimental Medicine. 166:235-245.

Handman, E. and A. W. Burgess. 1979. **Stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of *Leishmania tropica* killing by macrophages.** Journal of Immunology. 122: 1134-1137.

Handman, E. 2001. **Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development.** Clinical Microbiology Reviews. 14: 229-243.

Hanna, J., T. Gonen-Gross, J. Fitchett, T. Rowe, M. Daniels, T. I. Arnon, R. Gazit, A. Joseph, K. W. Schjetne, A. Steinle, A. Porgador, D. Mevorach, D. Goldman-Wohl, S. Yagel, M. J. LaBarre, J. H. Buckner and O. Mandelboim. 2004. **Novel**

APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation.
Journal of Clinical Investigation. 114: 1612-1623.

Hart, P. H., G. F. Vitti, D. R. Burgess, G. A. Whitty, D. S. Piccoli, J. A. Hamilton. 1989.
Potencial anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and prostaglandin E2.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86: 3803-3807.

Hart, D. 1997. **Dendritic Cell: Unique leukocyte Populations which control the primary immune response.** Blood. 90: 3245-3287.

Hatzigeorgiou, D.E., S. He, J. Sobel, K. H. Grabstein, A. Hafner and J.L. Ho. 1993. **IL-6 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages.** Journal of Immunology. 151: 3682-3691.

Havell, E.A. 1987. **Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis.** Journal of Immunology. 139: 4225-4231.

Heinzel, F.P., M. D. Sadick, B. J. Holaday, R. L. Coffman and R. M. Locksley. 1989.
Reciprocal expression of interferon gamma and interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. Journal of Experimental Medicine. 169: 59.

Heinzel, F.P., D.S. Schoenhaut, R.M. Rerko, L.E. Rosser and M.K. Gately. 1993.
Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*.
Journal of Experimental Medicine. 177: 1505-1509.

Hepburn, N. C. 2000. **Cutaneous leishmaniasis.** Clinical and Experimental Dermatology. 25: 363-370.

- Herwaldt, B. L. 1999. **Leishmaniasis**. Lancet. 354: 1191.
- Higes, R. and I. Muller. 1998. **Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interaction**. Journal of Molecular Medicine. 76: 372-390.
- Himmelrich, H., P. Launois, I. Maillard, T. Biedermann, F. Tacchini-Cottier, R. M. Locksley, M. Röcken and J. A. Louis. 2000. **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**. Journal of immunology. 164: 4819-4825.
- Hirano, T., S. Akira, T. Taga and T. Kishimoto. 1990. **Biological and clinical aspects of interleukin 6**. Immunology Today. 11: 443-449.
- Hirano, T. 1992. **Interleukin-6 and its relation to inflammation and disease**. Clinical Immunology and Immunopathology. 62: 560.
- Hondowicz, B. and P. Scott. 2002. Influence of parasite load on the ability of type 1 T cells to control *Leishmania major* infection. Infection and Immunity. 70: 498-503.
- Howard, A. D., M. J. Kostura, N. Thornberry, G. J. Ding, G. Limjuco, J. Weidner, J. P. Salley, K. A. Hogquist, D. D. Chaplin and R. A. Mumford. 1991. **IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31- kDa IL-1 alpha**. Journal of Immunology. 147: 2964-2969.
- Hsieh, C.-S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra and K.M. Murphy. 1993. **Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages**. Science. 260: 547-549.

- Huber, M., E. Timms, T. W. Mak, M. Röllinghoff and M. Lohoff. 1998. **Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice.** Infection and Immunity. 66: 3968-3970.
- Hultgren, O., M. Kopf, A. Tarkowski. 1998. **Staphylococcus aureus induced septic arthritis and septic death is decreased in IL-4-deficient mice: role of IL-4 as promoter for bacterial growth.** Journal of Immunology. 160: 5082-5087.
- Ijzermans, J. N., R. L. Marquet. 1989. **Interferon-gamma: a review.** Immunobiology. 179: 456-473.
- Imura, H., and J. Fukata. 1994. **Endocrine-paracrine interaction in communication between the immune system and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitaryadrenal axis in inflammation.** European Journal of Endocrinology 130: 32–37.
- Jain-Vora, S., A.M. LeVine, Z. Chroneos, G.F. Ross, W...M. Hull, J.A. Whitsett, Barton, B.E., J. Shortall and J.V. Jackson. 1998. **Interleukin-4 enhances pulmonary clearance of *Pseudomona aeruginosa*.** Infection and Immunity. 66: 4229-4236.
- Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport and M. Shlomchik. 2001. **Immunobiology 5: The immune system in health and disease.** Fifth Ed. Garland Publishing. United States of America. p. 677.
- June, C. H. 1991. **Signal transduction in T cells.** Current Opinion in Immunology. 3: 287-293.
- Kalter, D. C. 1989. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis.** Program of Dermatology. 23: 1-11.

- Kamhawi, S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, D. Sacks. 2000. **Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies.** Science. 290: 1351-1354.
- Kharazmi, A., K. Kemp, A. Ismail, S. Gasim, A. Gaafar, J. A. Kurtzhals, A. M. El Hassan, T. G. Theander, M. Kemp. 1999. **T-cell response in human leishmaniasis.** Immunology Letters. 65: 105.
- Kemp, M. M.B. Hansen and T. G. Theander. 1992. **Recognition of *Leishmania* antigens by T lymphocytes from nonexposed individuals.** Infection and Immunity. 60: 2246-2251.
- Khoo, S.H., L. Pepper, N. Snowden, A.H. Hajeer, P. Valley, E.G. Wilkins, B.K. Mandal, W.E. Ollier. 1997. **Tumor necrosis factor c2 micro satellite allele is associated with the rate of HIV disease progression.** AIDS. 11: 423-428.
- Kima, P. E., N. H. Ruddle and D. McMahon-Pratt. 1997. **Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigens to CD8⁺ T cells.** Journal of Immunology. 159: 1828-1834.
- Kindler, V., A.P. Sappino, G.E. Grau, P.F. Piguet and P. Vasalli. 1989. **The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection.** Cell. 56: 731-740.
- Kirk, C.W., A.G. Droogan, S.A. Hawkins, S.A. McMillan, N.C. Nevin, C.A. Graham. 1997. **Tumour necrosis factor microsatellites show association with multiple sclerosis.** Journal of the Neurological Sciences. 147: 21-25.
- Kishimoto T. 1989. **The biology of interleukin-6.** Blood. 74: 1-10.

- Kishimoto, T., S. Akira, T. Taga. 1992. **Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines.** *Science*. 258: 593-597.
- Kohase, M., D. Henriksen-DeStefano, L. T. May, J. Vilcek, and P. B. Sehgal. 1986. **Induction of β 2-interferon by tumor necrosis factor: a homeostatic mechanism in the control of cell proliferation.** *Cell*. 45: 659-666.
- Kunicka, J.E., M.A. Talle, G.H. Denhardt, M. Brown, C.A. Prince, and G. Goldstein. 1993. **Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of production of multiple lymphokines by *in vivo* administration of dexamethasone.** *Cellular Immunology* 149: 39-49.
- Kurt-Jones, E. A., S. Hamberg, J. Ohara, W. E. Paul, A. K. Abbas. 1987. **Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. I. Lymphokine production and lymphokine responsiveness.** *Journal of Experimental Medicine*. 166: 1774-1787.
- Ladel, C.H., C. Blum, A. Dreker, K. Reifenberg, M. Kopf and S.H.E. Kaufmann. 1997. **Lethal tuberculosis in interleukin-6 deficient mutant mice.** *Infection and Immunity*. 65: 4843-4849.
- Lang, T., R. Hellio, P. M. Kaye and J. C. Antoine. 1994. **Leishmania donovani- infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation.** *Journal of Cell Science*. 107: 2137-2150.
- Lara, M.I., Z. Layrisse, J.V. Scorza, E. Garcia, Z. Stoikow, J. Granados and W. Bias. 1991. **Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela.** *Human Immunology*. 30: 129-135.

- Launois, P., T. Ohteki, K. Swihart, H.R. MacDonald and J.A. Louis. 1995. **In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1.** European Journal of Immunology. 25: 3298-3307.
- Launois, P., I. Maillard, S. Pingel, K.G. Swihart, I. Xenarios, H. Acha-Orbea, H. Diggelman, R.M. Locksley, H.R. MacDonald and J.A. Louis. 1997. **IL-4 rapidly produced by V β 4V α 8 CD4+ T cells instruct Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice.** Immunity: 6: 541-549.
- Launois, P., H. Tacchini-Cottier, C. Parra-Lopez and J.A. Louis. 1998. **Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis.** International Reviews Immunology. 17: 157-180.
- Le, J., D. Weinstein, U. Gubler, and J. Vilcek. 1987. **Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts.** Journal of Immunology. 138:2137-2142.
- Le Beau, M. M., E. R. S. Lemons, R. Espinoza, R. A. Larson, N. Arai, J. D. Rowley. 1989. **IL-4 and IL-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del (5q).** Blood. 73: 647-650.
- Leibovich, S. J., P. J. Polverini, H. M. Shepard, D. M. Wiseman, V. Shively, and N. Nuseir. 1987. **Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor- α .** Nature (London). 329:630-632.
- Lentsch, A.B., B.J. Csermak, J.A. Jordan, and P.A. Ward. 1999. **Regulation of acute lung in inflammatory injury by endogenous IL-13.** Journal of Immunology. 162: 1071-1076.

- Lessa, H.A., P. Machado, F. Lima, A.A. Cruz, O. Bacellar, J. Guerreiro and E.M. Carvalho. 2001. **Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 65: 87-89.
- Liew, F.Y., C. Parkinson, S. Millott, A. Severn and M. Carrier. 1990. **Tumor necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis.I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis.** Immunology. 69: 570-573.
- Liew, F. Y. and C. A. O'Donnell. 1993. **Immunology of leishmaniasis.** Advances in Parasitology. 32: 161-259.
- Liew, F. Y., D. Xu and L. Chan. 1999. **Immune effector mechanism in parasitic infections.** Immunology Letters. 65: 101-104.
- Lima, G. M. C. A., A. Puel, C. Decreusefond, Y. Bouthillier, J. C. Mevel, I. A. Abrahamsohn and D. Mouton. 1998. **Susceptibility and resistance to *Leishmania amazonensis* in H-2^q syngeneic high and low antibody responder mice (Biozzi Mice).** Scandinavian Journal of Immunology. 48: 144-151.
- Lima, H. C., G. K. DeKrey and R. G. Titus. 1999. **Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 94: 71-76.
- Locksley, R. M., S. L. Reiner, F. Hatam, D R. Littman, N. Killeen. 1993. **Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4- deficient mice.** Science. 261: 1448-1451.
- Louis, J. A., A. Gumy, A. Voigt, P. Launois and M. Rocken. 2003. **The use of the murine**

model of infection with *Leishmania major* to reveal the antagonistic effects that IL-4 can exert on T helper cell development and demonstrate that these opposite effects depend upon the nature of the cells targeted for IL-4 signaling. Pathologie Biologie. 51: 71-73.

Maasho, K., F. Sanchez, E. Schurr, A. Hailu and H. Akuffo. 1998. **Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity.** Infection and Immunity. 66: 2698-2704.

Maasho, K., I. Satti, S. Nylen, G. Guzman, F. Koning and H. Akuffo. 2000. **A *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase (LACK) induces both interferon-gamma and interleukin-10 in natural killer cells of healthy blood donors.** Journal of Infectious Diseases. 182: 570-578.

Manetti, R., P. Parronchi, M.G. Giudizi, M.-P. Piccini, E. Maggi, G. Trinchieri and S. Romagnani. 1993. **Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells.** Journal of Experimental Medicine. 177: 1199-1509.

Marsden, P. D., 1986. **Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911).** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 80: 859-875.

McGuire, W., A. S W. Hill, C. E. M. Allsop, B. M. Greenwood and D. Kwiatkowski. 1994. **Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria.** Nature. 371: 508-511.

McKenzie, A. N., X. Li, D.A. Largaespada, A. Sato, A. Kaneda, S.M. Zurawski, E.L. Doyle, A. Milatovich, U. Francke and N.G. Copeland. 1993. **Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes.** Journal of Immunology. 150: 5436-5444.

- Manickasingham, S. and C. Reis e Sousa. 2000. **Microbial and T cell-derived stimuli regulate antigen presentation by dendritic cell in vivo.** Journal of Immunology. 165: 5027-5034.
- Martinez. E., F. Le Pont, M. Torrez, J. Tellería, F. Vargas, M. Muñoz, S. De Doncker, J. C. Dujardin, J. P. Dujardin. 1998. **A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a sub andean region of Bolivia.** Acta Tropica. 71: 97-106.
- Matthews, D., C. L. Emson, G. J. McKenzie, H. E. Jolin, J. M. Blackwell and A. N. J. McKenzie. 2000. **IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection.** Journal of Immunology. 164: 1458-1462.
- Melby, P.C., Neva, F. A. and D. L. Sacks. 1989. **Profile of human T cell response to leishmanial antigens.** Journal of Clinical Investigation. 83: 1868-1875.
- Melby, P. C. 2002. **Vaccination against cutaneous leishmaniasis: current status.** American Journal Clinical Dermatology. 3: 557-70.
- Mijatovic, T., V. Kruys, D. Caput, P. Defrance and Georges Huez 1997. **Interleukin-4 and -13 inhibit tumor necrosis factor- α mRNA translational activation in lipopolysaccharide-induced mouse macrophages.** Journal of biological chemistry. 272: 14394-14398.
- Miles, S. A., A. R. Rezai, J. F. Salazar-Gonzalez, M. V. Meyden, R. H. Stevens, D. M. Logan, R. T. Mitsuyasu, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto and O. Martinez-Maza. 1990. **AIDS kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 87: 4068-4072.

- Moffat, M.F. and W.O. Cookson. 1997. **Tumour necrosis factor haplotypes and asthma.** Human Molecular Genetics. 6: 551-554.
- Mohrs, M., B. Ledermann, G. Köhler, A. Dorfmueller, A. Gessner and F. Brombacher. 1999. **Differences between IL-4 and IL-4 receptor α -deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling.** Journal of Immunology. 162: 7302-7308.
- Mogensen, S. C. and J. L. Virelizier. 1987. **The interferon-macrophage alliance.** Interferon. 8: 55-84.
- Mosley, B., D. L. Urdal, K. S. Prickett, A. Larsen, D. Cosman, P. J. Coulon, S. Gillis and S. K. Dower. 1987. **The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 α precursor but not the interleukin-1 β precursor.** Journal of biological chemistry. 262: 2941-2944.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman. 1986. **Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** Journal of Immunology. 136: 2348-2357.
- Muchamuel, T., S. Menon, P. Pisacane, et al. 1997. **IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia: correlation with down-modulation of TNF- α , IFN- γ , and IL-12 production.** Journal of Immunology. 158: 2898-2903.
- Muller, I. 1992. **Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to Leishmania major.** European Journal of Immunology. 22: 3063-3069.
- Muller, L., P. Kropf, J. A. Louis and Milon. 1994. **Expansion of gamma interferon-producing CD8⁺ T cells following secondary infection of mice immune to**

Leishmania major. Infection and Immunity. 62: 2575-2581.

Munker, R., J. Gasson, M. Ogawa, and H. P. Koeffler. 1986. **Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony stimulating factor.** Nature. 323:79-82.

Muralis-Krishna, K., J.D. Altman, M. Suresh, D.J. Sourdive, A.Z. Zajac, J.D. Miller, J. Slansky and R. Ahmed. 1998. **Counting antigen-specific CD8 Tcells: a reevaluation of bystander activation during viral infection.** Immunity. 8: 177-187.

Murray. H. W., K. E. Squires, C. D. Miralles, M. Y. Stoeckle, A. M. Granger, A. Granelli-Piperno and C. Bogdan. 1992. **Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis.** Journal of Immunology. 148: 1858-1863.

Murray, H. W., C. Montelibano, R. Peterson and J. P. Sypek. 2000. **Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis.** Journal of Infectious Diseases. 182: 1497-1502.

Nakanishi, K. 2001. **Innate and acquired activation pathways in T cells.** Nature Immunology. 2: 140-142.

Noben-Trauth, N., W. E. Paul and D. L. Sacks. 1999. **IL-4 and IL-4 receptor-deficient BALB/c mice reveal differences in susceptibility to Leishmania major parasite substrains.** Journal of Immunology. 162: 6132-6140.

O'Brien, J., I. Wilson, T. Orton and F. Pognan. 2000. **Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity.** European Journal of Biochemistry. 267: 5421-5426.

- O'Garra, A. 1998. **Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.** *Immunity*. 8: 275-283.
- Ohara, J., S. Late, J. Inman, W. E. Paul. 1985. **Partial purification of murine B-cell stimulatory factor (BSF)-1.** *Journal of Immunology*. 135: 2518.
- Old, I.J. 1985. **Tumor necrosis factor (TNF).** *Science*. 230: 630-632.
- Opal, S. M., and V. A. DePalo. 2000. **Anti-inflammatory cytokines.** *Chest*. 117: 1162-1172.
- Park, L.S., U. Martin, R. Sorensen, S. Luhr, P. J. Morrissey, D. Cosman and A. Larsen. 1992. **Cloning of the low-affinity murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor and reconstitution of a high-affinity receptor complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 4295-4299.
- Paul, W.E. 1991. **Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine.** *Blood*. 77: 1859-1870.
- Pearson, R. D., and A. Q. Sousa. 1996. **Clinical spectrum of Leishmaniasis.** *Clinical of Infectious Diseases*. 22: 1.
- Piedrafita, D., D. Xu, D. Hunter, R. A. Harrison and F. Y. Liew. 1999. **Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*.** *Journal of Immunology*. 163: 1467-1472.
- Piliard, X., R. de Waal Malefijt, H. Yssel, D. Blanchard, I. Chretien, J. Abrams, J. de Vries and H. Spits. 1988. **Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones.** *Journal of Immunology*. 141: 849-855.

- Pinto-da-Silva, L., M. Camurate, K. A. Costa, S. M. P. Oliveira, N. L. da Cunha-e-Silva and E. M. B. Saraiva. 2002. **Leishmania (Viannia) braziliensis metacyclic promastigotes purified using Bauhinia purpurea lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo.** International Journal for Parasitology. 32: 1371-1377.
- Piñero, J., E. Martinez, R. Pacheco, Z. Aragón, F. De Armas, A. Del Castillo, B. Valladares. 1999. **PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis.** Acta Tropica. 73: 21-29.
- Pirmez, C. M., K. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliveira, F. Conceicao-Silva and R. L. Modlin. 1993. **Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis.** Journal of Clinical Investigation. 91: 1390.
- Poli, V., R. Balena, E. Fattori, E. Markatos, M. Yamamoto, H. Tanaka, G. Ciliberto, G. A. Rodan and F. Costantini. 1994. **Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion.** EMBO Journal. 13: 1189-1196.
- Probst, P., E. Stromberg, H. Ghalib, M. Mozel, R. Badaro, S. Reed and J. Webb. 2001. **Identification and Characterization of T Cell-Stimulating Antigens from Leishmania by CD4 T Cell Expression Cloning.** Journal of Immunology. 166: 498-505.
- Racke, M.K., A. Bonomo, D.E. Scott, B. Canella, A. Levine, C.S. Raine, E.M. Shevach and M. Rocken. 1994. **Cytokine induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease.** Journal of Experimental Medicine. 180: 1961-1966.
- Rafati, S., A. Kariminia, S. Seyde-Eslami, M. Narimani, T.Taheri, M. Lebbatard. 2002 **Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against Leishmania major**

in BALB/c mice: the partial protection relies on interferon-gamma producing CD8+ T lymphocyte activation. *Vaccine* 20: 2439–2447.

Reed, S. G., J. S. da Silva, J. L. Ho, J. K. Koehler, D. M. Russo, D. L. Pihl and R. W. Coombs. 1992. **Cytokine activation of human macrophage infected with HIV-1 to inhibit intracellular protozoa.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 5: 666-675.

Reiner, S.L., S. Zheng, Z.-E. Wang, L. Stowring and R.M. Locksley. 1994. **Leishmania promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection.** *Journal of Experimental Medicine*. 179: 447-456.

Reiner, S. L. and R. M. Locksley. 1995. **The regulation of immunity to Leishmania major.** *Annual Reviews Immunology*. 13: 157-177.

Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, H. Lessa, O. Bacellar and E. M. Carvalho. 1998. **Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31: 143-148.

Rincón, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig and R. A. Flavell. 1997. **Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells.** *Journal of Experimental Medicine*. 185: 461-469.

Roberts, L. J., T. M. Baldwin, J. M. Curtis, E. Handman, S. J. Foote. 1997. **Resistance to Leishmania major is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9.** *Journal Experimental of Medicine*. 185: 1705-1710.

Roberts, L. J., E. Handman, S. J. Foote. 2000. **Science, medicine, and the future: Leishmaniasis.** *British Medical Journal*... 321: 801-804.

Robledo, S., A. Wozencraft, A.Z. Valencia and N. Saravia. 1994. **Human monocyte**

infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. Journal of Immunology. 152: 1265-1276.

Rogers, K. A., G. K. Dekrey, M. L. Mbow, R. D. Gillespie, C. I. Brodskyn and R. G. Titus. 2002. **Type 1 and Type 2 responses to *Leishmania major*.** FEMS Microbiology Letters. 209: 1-7.

Roy, S., W. McGuire, C.G. Mascie-Taylor, B. Saha, S.K. Hazra, A.V. Hill and D. Kwiatkowski. 1997. **Tumor necrosis factor promoter polymorphism and susceptibility to lepromatous leprosy.** Journal of Infectious Diseases. 176: 530-532.

Ruddle, N. H. and B. H. Waksman. 1968. **Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity: III. analysis of mechanism.** Journal of Experimental Medicine. 128: 1267-1279.

Russell, D. G., X: Sonmei and C. Prasanta. 1992. **Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation.** Journal of Cell Science. 107: 2137-2150.

Russo, D.M., P. Chakrabarti, A.Y. Higgins. 1999. ***Leishmania*: naïve human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8 (+) cytotoxic effectors.** Experimental Parasitology. 93: 161-170.

Sadick, M.D., F.P. Heinzl, B.J. Holaday, R.T. Pu, R.S. Dawkins and R.M. Locksley. 1990. **Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma independent mechanism.** Journal of Experimental Medicine. 171: 115-127.

Salomao, R., A. Castelo Filho, I. M. de Medeiros, M. A. Sicolo. 1996. **Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with visceral leishmaniasis (Kala-**

azar). **Association with activity of the disease and clinical remission following antimonial therapy.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 38: 113-118.

Sampaio, MCR., YM. Traub-Cseko. 2003. **The 245 kb amplified chromosome of *Leishmania (V.) braziliensis* contains a biopterin transporter gene.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 98: 377-378.

Santiago, M., P. De Luca, A. Bertho, R. Azeredo-Coutinho and S. Coutinho. 2000. **Detection of intracitoplasmic cytokines by flow cytometry.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 95: 401-402.

Saravia, N. G., L. Valderrama, M. Labrada, A. F. Holguin, C. Navas, G. Palma and K. A. Weigle. 1989. **The regulation of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in new world leishmaniasis.** Journal Infection and diseases. 159: 725-735.

Satoskar, A. R., M. Okano, S. Connaughton, A. Raisanen-Sokolowski, J. R. David and M. Labow. 1998. **Enhanced Th2-like responses in IL-1 type 1 receptor-deficient mice.** European Journal of Immunology. 28: 2066-2074.

Saunders, B.M., A.A. Frank, I.M. Orme and A.M. Cooper. 2000. **Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection.** Infection and Immunity. 68: 3322-3326.

Saura, M., R. Martinez-Dalmau, A. Minty, D. Perz-Sala, S. Lams. 1996. **Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells.** Biochemical Journal. 313: 641-646.

Schleimer, R.P., A. Jacques, H.S. Shin, L.M. Lichtenstein, and M. Plaut. 1984. **Inhibition**

- of T cell-mediated cytotoxicity by anti-inflammatory steroids.** Journal of Immunology 132: 266–271.
- Scott, P. 1991. **IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in murine model of cutaneous leishmaniasis.** Journal of Immunology. 147: 3149.
- Scott, P., G. Trinchieri. 1995. **The role of natural killer cells in host-parasite interactions.** Current Opinion in Immunology. 7: 34-40.
- Seder, R. A. and W. E. Paul. 1994. **Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4⁺ T cells.** Annual Reviews of Immunology. 12: 635-673.
- Sen, G. C. and P. Lengyel. 1992. **The interferon system.** Journal of Biological Chemistry. 267: 5017-5020.
- Solbach, W., and T. Laskay. 2000. **The host response to *Leishmania* infection.** Advances in Immunology 74: 275–317.
- Spithill, T. W. and R. J. Grumont. 1984. **Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles.** Molecular and Biochemical Parasitology. 12: 217-236.
- Stäger, S., J. Alexander, A. C. Kirby, M. Botto, N. Van Rooijen, D. F. Smith, F. Brombacher and P. M. Kaye. 2003. **Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8 T-cell responses.** Nature. Medicine. 9: 1287-1292.
- Stein, M. and S. Gordon. 1991. **Regulation of tumor necrosis factor (TNF) release by murine peritoneal macrophages: role of cell stimulation and specific phagocytic plasma membrane receptors.** European Journal of Immunology.

21: 431- 437.

Suematsu, S., T. Matsuda, K. Aozasa, S. Akira, N. Nakano, S. Ohno, J. Miyazaki, K. Yamamura, T. Hirano and T. Kishimoto. 1989. **IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86: 7547-7551.

Sugarman, B. J., B. B. Aggarwal, P. E. Hass, I. S. Figar, M. A. Palladino, Jr., and H. M. Shepard. 1985. **Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.** Science. 230:943-945.

Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English and G. Huston. 1990. **IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors.** Journal of Immunology. 145: 3796-3806.

Swihart, K., U. Fruth, N. Messmer, K. Hug, R. Behin, S. Huang, G. del Giudice, M. Aguet and J. A. Louis. 1995. **Mice from a genetically resistant background lacking the interferon- γ receptor are susceptible to infection with Leishmania major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response.** Journal of Experimental Medicine. 181: 961-971.

Sypek, J.P., C.L. Chung, S.E.H. Mayor, J.M. Subramanyam, S.J. Goldman, D.S. Sieburth, S.F. Wolf and R.G. Schaub. 1993. **Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response.** Journal of Experimental Medicine. 177: 1797-1802.

Takahashi, M., M. C. Yoshida, H. Satoh, J. Hilgers, Y. Yaoita, T. Honjo. 1989. **Chromosomal mapping of the mouse IL-4 and human IL-5 genes.** Genomics. 4: 47-52.

Tanabe, O., S. Akira, T. Kamiya, G. G. Wong, T. Hirano, T. Kishimoto. 1988. **Genomic**

structure of the murine IL-6 gene: High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *Journal of Immunology.* 141: 3875.

Teixeira, M.M., R. Correa-Oliveira and R. T. Gazzinelli. 2000. **Immunoregulation in parasitic infection: insights for therapeutic intervention.** *Immunology Today.* 21: 536-538.

Terabe, M., T. Kuramochi, M. Ito, T. Hatabu, C. Sanjoba, K-P. Chang, T. Onodera and Y. Matsumoto. 2000. **CD4 cell are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis.** *Infection and Immunity.* 68: 4574-4577.

Terry, C. F., V. Loukaci and F. R. Green. 2000. **Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation.** *Journal of Biological Chemistry.* 275: 18138-18144.

Theodos, C. M., A. Shankar, A. L., Glasebrook, W. D. Roeder and R. G. Titus. 1994. **The effect of treating with anti-interleukin-1 receptor antibody on the course of experimental murine cutaneous leishmaniasis.** *Parasite Immunology.* 16: 571-577.

Thornhill, M.H., J. Li and D.O. Haskard.1993. **Leukocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926.** *Scandinavian Journal of Immunology.* 38:279-286.

Tighe, H., M. Corr, M. Roman and E. Raz. 1998. **Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint.** *Immunology Today.* 19: 89-97.

Tilg, H., E. Trehu, M. B. Atkins, et al. 1994. **Interleukin-6 as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55.** *Blood.* 83: 113-118.

- Titus, R. G., G. K. Dekrey, R. V. Morris and M. B. P. Soares. 2001. **Interleukin-6-deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease.** Infection and Immunity. 69: 5189-5192.
- Toledo, V. P. C.P., W. Mayrink, K. J. Gollob, M. A. P. Oliveira, C. A. da Costa, O. Genaro, J. A. Pinto and L. C. C. Afonso. 2001. **Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz. 96: 89-98.
- Torrez, M., M. Lopez, F. Le Pont, E. Martinez, M. Muñoz, D. Hervas, N. Yaksic, J. Arévalo, D. Sossa, J. P. Dedet and J. P. Dujardin. 1998. ***Lutzomyia nuneztovari anglesi* (Diptera: Psychodidae) as a probable vector of *Leishmania braziliensis* in the Yungas, Bolivia.** Acta Tropica. 71: 311-316.
- Tomonaga, M., D. W. Golde, J. C. Gasson. 1986. **Biosynthetic (recombinant) human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Effect on normal bone marrow and leukemia cell lines.** Blood. 67: 31-37.
- Trinchieri, G. 1997. **Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ).** Current Opinion in Immunology. 9: 17-23.
- Tumang, M.C., C. Keogh, L.L. Moldawer, D.C. Helfgott, R. Teitelbaum, J. Hariprashad and H.W. Murray. 1994. **Role and effect of TNF-alpha in experimental visceral leishmaniasis.** Journal of Immunology. 153: 768-775.
- Valenzuela, J. G., Y. Belkaid, M. K. Garfield, S. Mendez, S. Kamhawi, E. D. Rowton, D. L. Sacks and J. M. C. Ribeiro. 2001. **Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary**

protein. Journal of Experimental Medicine. 194: 331-342.

Vannier, E., M.C. Miller, C. A. Dinarello. 1992. **Coordinated anti-inflammatory effects of interleukin4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America. 89: 4076-4080.

Vexenat, J. A., A. C. Barreto, A. C. Rosa.1986. **Infecção experimental de Lu. Whitmani, em cães infectados com *Leishmania braziliensis braziliensis*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 19: 80. Suplemento

Vidal, S. M., D. Malo, K. Vogan, E. Skamene, P. Gros. 1993. **Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg.** Cell. 73: 469-485.

Vieira, M. G. S., F. Oliveira, S. Arruda, A. L. Bittencourt, A. A. Barbosa Jr, M. Barral-Netto and A. Barral. 2002. **B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniases.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 97: 979-983.

Vilcek, J., V. I. Palombella, D. Henriksen-DeStefano, C. Swenson, R. Feinman, M. Hirai, and M. Tsujimoto. 1986. **Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors.** Journal of Experimental Medicine. 163:632-643.

Vilcek, J. and T. H. Lee. 1991. **Tumor necrosis factor.** Journal of Biological Chemistry. 266: 7313-7316.

Wang, Z. E., S. L. Reiner, F. Hatam, F. P. Heinzl, J. Bouvier, C. W. Turck and R.M. Lockley. 1993. **Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-**

microglobulin- deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. Journal of Immunology. 151: 2077-2086.

Wang, Z-E., S. L. Reiner, D. K. Dalton, R. M. Locksley. 1994. **CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon- γ deficient mice infected with *Leishmania major*.** Journal of Experimental Medicine. 179: 1367-1371.

Weiss P.1943. **Epidemiología y clínica de las leishmaniosis tegumentarias en el Perú.** Revista de Medicina Experimental. 2: 209-48.

Wirth, J.J., F. Kierszenbaum and A. Zlotnik. 1989. **Effects of IL-4 on macrophage function: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*).** Immunology. 66: 296-301.

WHO- World Health Organization. 1990. **Control of the leishmaniasis.** Report of a WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 793: 1-158.

World Health Organization. 1998. **Advances in the battle against leishmaniasis.** TDR News. 57: 2.

Xing, Z., J. Cauldie, C. Cox. 1998. **IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.** Journal Clinical Investigation. 101: 311-320.

Yamamura, M., K. Uyemura, R.J. Deans, K. Weinberg, T.H. Rea, B.R. Bloom, R.L. Modlin. 1991. **Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions.** Science. 254: 277-279.

Yang, J., T. L. Murphy, W. Ouyana and K. M: Murphy. 1999. **Induction of interferon- γ production in Th1 CD4⁺ T cells: evidence for two distinct pathways for**

promoter activation. European Journal of Immunology. 29: 548-555.

Yang, J., H. Zhu, T. L. Murphy, W. Ouyang and K. M. Murphy. 2001. **IL-18-stimulated GADD45 β required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN- γ production.** Nature Immunology. 2: 157-163.

Yoshida, A., T. Nagata, M. Uchijima and Y. Koide. 2001. **Protective CTL response is induced in the absence of CD4 T cells and IFN-gamma by gene gun DNA vaccination with a minigene encoding a CTL epitope of *Listeria monocytogenes*.** Vaccine. 19: 4297-4306.

Yoshimoto, T., K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira and K. Nakanishi. 1998. **IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells and B cells: synergism with IL-18 for IFN- γ production.** Journal of Immunology. 161: 3400-3407.

Zurawski, C., J. E. de Vries. 1994. **Interleukin 13, an interleukin-4 like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells.** Immunology Today. 15: 19-26.

Zwingenberger, K., G. Harms, C. Pedrosa, S. Omena B. Sand-kamp, S. Neifer. 1990. **Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production.** Clinical Immunology Immunopathology. 57: 242.