



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA
PRODUCCIÓN DE TNF- α , IL-12, IL-18 E IL-15 Y
DE LA EXPRESIÓN DE CD40, B7-1 (CD80) Y
B7-2 (CD86) EN MONOCITOS DE PACIENTES
CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA
Y DISEMINADA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

GEORGINA DEL CARMEN CARRADA FIGUEROA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

A MI COMITÉ TUTORAL

Dra. Ingeborg Becker Fauser
Tutora Principal

Dra. Gladis Carmen Fragoso González
Cotutora

Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez
Cotutor

A CONACyT

Beca número : 163327
No. de Folio: 172658

A LOS PROYECTOS QUE FINANCIARON LA TESIS

CONACyT 47256-M
DGAPA IN231602

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi amor a mi hijo Juan Carlos por su paciencia y apoyo incondicional.

A mi madre por su amor y confianza a toda prueba.

A mi padre por despertar en mí el interés por la investigación.

A mis hermanas y hermanos por su cariño.

A mi fraternidad por su comprensión y respeto.

A mis amigos por su compañía.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por su inquebrantable esfuerzo para enseñarme el camino. ¡Mil gracias!
- Al Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez y a la Dra. Gladis Fragoso González por todo el apoyo brindado.
- A Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por su dedicación para enseñarme. Gracias Cris!
- A mis compañeros del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM.
- A Marco Gudiño Zayas por el análisis estadístico.
- A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Secretaría de Salud del Estado de Tabasco y el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco.
- Al Programa de Vectores de la Jurisdicción Sanitaria de Cunduacán, Tabasco.
- A María Eugenia Flores Romero, por su desinteresada ayuda en las largas jornadas de campo.
- Al Dr. Baldómero Sánchez Barragán, al Dr. Arturo Álvarez Carrillo y a la Dra. Magdalena Ángel Álvarez por la evaluación clínica de los pacientes.
- Muy especialmente a los pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada por su paciencia y colaboración, particularmente al paciente Salomón Pérez (†) por su gran valentía y fortaleza.

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1. DEFINICIÓN	5
3.2. TAXONOMÍA	5
3.3. CICLO BIOLÓGICO	7
3.4. FORMAS CLÍNICAS	9
3.4.1. Leishmaniasis cutánea localizada	9
3.4.2. Leishmaniasis cutánea diseminada	11
3.4.3. Leishmaniasis mucocutánea	12
3.4.4. Leishmaniasis visceral	12
3.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	13
3.6. DIAGNÓSTICO	13
3.7. TRATAMIENTO	16
3.8. ESTADO ACTUAL DE LA LEISHMANIASIS	17
3.9. RESPUESTA INMUNE	19
3.9.1. Respuesta inmune adaptativa	19
3.9.2. Respuesta inmune innata	21
3.9.2.1. Células de la inmunidad innata	23
3.9.2.2. Citocinas de la inmunidad innata	33
3.9.3. Moléculas coestimuladoras	43
4. METODOLOGÍA	47
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSIÓN	60
7. CONCLUSIONES	65
8. BIBLIOGRAFÍA	66

RESUMEN

En el presente trabajo se midió la producción de citocinas de la respuesta inmune innata TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-18, así como la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, B7-1(CD80) y B7-2 (CD86) en monocitos de pacientes con dos formas clínicas de leishmaniasis polarmente opuestas por su severidad clínica: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea diseminada (LCD). Se evaluó el efecto que ejerce la estimulación con el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* sobre la secreción de estas citocinas y la expresión de las moléculas coestimuladoras. Los pacientes estudiados fueron seleccionados en comunidades rurales del estado de Tabasco, que es un área endémica de *Leishmania mexicana*. Los pacientes con LCL fueron diagnosticados con impronta e intradermorreacción de Montenegro positivas y respondieron al tratamiento intralesional con Glucantime; y los pacientes con la forma clínica más severa o LCD fueron diagnosticados con impronta e intradermorreacción de Montenegro negativas y no respondieron al tratamiento. Se purificaron células mononucleares a partir de sangre periférica de los pacientes y de individuos sanos mediante un gradiente de densidad con Ficoll Hypaque y los monocitos fueron purificados por adherencia a placa. Para los ensayos los monocitos fueron analizados en su estado basal así como estimulados con LPS (como control positivo) y con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania*. Las citocinas fueron determinadas en el sobrenadante del cultivo de monocitos por el método de ELISA y la expresión de moléculas coestimuladoras en la superficie de monocitos se midió por citometría de flujo. El análisis de secreción de citocinas reveló que los pacientes LCL se caracterizaron por un incremento en la producción de TNF- α , IL-18 e IL-15 e una inhibición de IL-12 cuando fueron estimulados con LPG. Los monocitos de pacientes con LCD se caracterizaron por no secretar IL-18 e IL-15 cuando sus monocitos fueron estimulados con LPG. Adicionalmente se encontró que la capacidad de producir TNF- α e IL-12 por monocitos de estos pacientes tendía a disminuir con la progresión del padecimiento. El análisis de la expresión de moléculas coestimuladoras reveló que no había diferencias en la expresión de CD40 y B7-1 entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, la expresión de B7-2 se encontró significativamente mayor en pacientes con LCD que en pacientes con LCL y la expresión de ambos grupos de pacientes fue significativamente mayor que en monocitos de sujetos sanos. Esto sugiere que aparentemente la expresión de B7-2 puede correlacionarse con la severidad del cuadro clínico.

SUMMARY

In the present work we analyzed the production of cytokines TNF- α , IL-12, IL-15 and IL-18 of the innate immune response, as well as the expression of costimulatory molecules CD40, B7-1(CD80) and B7-2 (CD86) by monocytes of patients with two clinical forms of leishmaniasis, which are opposed in their clinical severity: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). We evaluated the effect exerted by lipophosphoglycan (LPG) of *Leishmania mexicana* on the secretion of these cytokines and the expression of costimulatory molecules by monocytes of these patients. The patients were selected in rural communities of the state of Tabasco, an endemic area of *Leishmania mexicana*. The patients with LCL were diagnosed with smears taken from biopsy fragments of the lesions and by positive intradermal hypersensitivity test of Montenegro. These patients responded to the intralesional treatment with Glucantime. The patients with the more severe clinical form, or DCL, were diagnosed with smears from lesions, they were negative in the hypersensitivity test of Montenegro and did not respond to the treatment. Mononuclear cells from peripheral blood of the patients and healthy individuals were purified by density gradient using Ficoll Hypaque and the monocytes were purified by adhesion to plate. The monocytes were analyzed in their basal state as well as stimulated with LPS (positive control) and with lipophosphoglycan (LPG) of *Leishmania*. The cytokines were analyzed in the supernatant of the culture medium by ELISA and the costimulatory molecule expression was evaluated on the membranes of monocytes by flow cytometry. The analysis of cytokine secretion revealed that monocytes LCL patients presented an increase in TNF- α , IL-18 and IL-15 production and an inhibition of IL-12 production, when they were stimulated with LPG. The monocytes of patients with DCL were unable to secrete IL-15 and IL-18 when stimulated with LPG. Additionally their ability to produce TNF- α and IL-12 tended to diminish with disease progression. The analysis of the costimulatory molecule expression did not reveal any differences in the expression of CD40 y B7-1 between the two groups of patients. On the other hand, B7-2 expression on monocytes from DCL patients was significantly higher than that of LCL patients, and the expression on both patients was also significantly higher than that of healthy controls. These data reflect that B7-2 expression can apparently be correlated with the disease severity.

1. INTRODUCCIÓN

En México existe una gran zona endémica de leishmaniasis que abarca a cuatro estados del sureste de la república en los que se han reportado casos de leishmaniasis cutánea con diferentes cuadros clínicos, como la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) que es la forma benigna de la enfermedad y que se caracteriza por lesiones que pueden curar espontáneamente; así como casos con mayor severidad clínica como la leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) caracterizada por lesiones nodulares metastásicas que resultan incapacitantes, que es incurable y que puede llegar a ser fatal.

En modelos murinos infectados con *Leishmania*, se ha encontrado que algunas citocinas de la respuesta inmune innata pueden modular una respuesta Th1 en ratones resistentes o una respuesta Th2 en ratones susceptibles. Asimismo, la curación de los pacientes con LCL ha sido relacionada con una respuesta inmune tipo Th1 y la severidad de los pacientes con LCD con una respuesta tipo Th2.

En la actualidad existen pocas evidencias de la importancia que tienen las citocinas de la inmunidad innata en la modulación de una respuesta tipo Th1 o Th2 en la leishmaniasis humana. De igual manera, no ha sido claro el papel que desempeñan las moléculas coestimuladoras en el curso clínico de la enfermedad.

En el presente trabajo se comparó la producción de citocinas de la inmunidad innata (TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-15) y la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, B7-1 y B7-2 en macrófagos de pacientes con la forma clínica benigna (LCL) y con la forma severa de la leishmaniasis cutánea (LCD) para determinar si las alteraciones a nivel de estas citocinas y moléculas coestimuladoras pudiera estar condicionando la severidad del cuadro clínico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis comparativo de la producción de TNF- α , IL-12, IL-15 e IL18 y de la expresión de CD40, B7-1(CD80) y B7-2(CD86) en monocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y de pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD), cuando se estimulan con el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1. Medir la producción de TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-18 en sobrenadantes de monocitos en estado basal y estimulados con LPG de *Leishmania mexicana* de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada, por la técnica de ELISA.

2.2.2. Cuantificar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, B7-1(CD80) y B7-2(CD86) en monocitos en estado basal y estimulados con LPG de *Leishmania mexicana* de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada, por citometría de flujo.

2.2.3. Analizar si el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* modula *in vitro* la capacidad de producción de estas citocinas y la expresión de moléculas coestimuladoras en monocitos de pacientes con ambas formas clínicas.

2.2.4. Analizar si la producción de citocinas y la expresión de moléculas coestimuladoras se correlaciona con la severidad del cuadro clínico.

3. ANTECEDENTES

3.1 DEFINICIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por diferentes especies de un protozoo del género *Leishmania*, que es transmitida por la picadura de un pequeño díptero perteneciente al género *Lutzomyia* (Nuevo Mundo), que puede afectar piel, mucosas y vísceras y cuyas manifestaciones clínicas pueden variar desde úlceras benignas hasta formas severas que pueden diseminar o visceralizar.¹

3.2. TAXONOMIA

El parásito *Leishmania* pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa (unicelular), al Phylum Sarcomastigophora (núcleo único), Subphylum Mastigophora (flagelado), Clase Zoomastigophora, Orden *Kinetoplastida* (posee cinetoplasto, estructura mitocondrial con DNA), Suborden Trypanosomatina, Familia *Trypanosomatidae* (uniflagelado) y al género *Leishmania* (Ross, 1903).²

La identificación y clasificación taxonómica de especies de *Leishmania* se han basado en criterios clínicos, biológicos y epidemiológicos que han variado con el tiempo. A principios de los años 70s, se utilizó la localización del parásito en el vector, su patogenicidad en la piel de hamsters y su crecimiento en medios de cultivo, para dividir al género *Leishmania* del Nuevo Mundo, en dos grandes grupos: Complejo mexicana y Complejo braziliensis.³ Pocos años después, los parásitos se clasificaron de acuerdo a la región anatómica del vector en que éstos se desarrollan y se subdividieron en: Grupo Peripylaria (intestino posterior, medio y anterior) y Grupo Suprapylaria (intestino medio y anterior) y se determinó que el Complejo mexicana pertenecía al Grupo Suprapylaria y el Complejo braziliensis al Grupo Perypylaria⁴; posteriormente, estos dos Complejos fueron reclasificados como los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*, respectivamente.⁵

En 1992 se estableció el International Leishmania Network, ILN, bajo el auspicio de la Organización Panamericana de la Salud y el *Brazilian Research Council, CNPq* en el que se propuso la siguiente clasificación:⁶

Subgénero *Leishmania*

Especies del complejo *Leishmania aethiopica*

- *Leishmania aethiopica*

Especies del complejo *Leishmania donovani*

- *Leishmania donovani*

Especies del complejo *Leishmania infantum*

- *Leishmania infantum*

Especies del complejo *Leishmania major*

- *Leishmania major*
- *Leishmania cf. major*

Especies del complejo *Leishmania mexicana*

- *Leishmania amazonensis*
- *Leishmania enriettii*
- *Leishmania mexicana*
- *Leishmania pifanoi*

Especies del complejo *Leishmania tropica*

- *Leishmania tropica*

Subgénero *Viannia*

Especies del complejo *Leishmania braziliensis*

- *Leishmania braziliensis*
- *Leishmania colombiense*
- *Leishmania equatorensis*
- *Leishmania peruviana*
- *Leishmania garnhami*

Especies del complejo *Leishmania guyanensis*

- *Leishmania guyanensis*
- *Leishmania panamensis*
- *Leishmania shawi*

Especies del complejo *Leishmania lainsoni* x

- *Leishmania lainsoni*

Especies del complejo *Leishmania naiffi*

- *Leishmania naiffi*

Leishmania No clasificada

- *Leishmania arabica*
- *Leishmania deanei*
- *Leishmania gerbilli*
- *Leishmania guliki*
- *Leishmania herreri*
- *Leishmania hertigi*
- *Leishmania killicki*

- *Leishmania turanica*
- *Leishmania sp.*
- *Leishmania sp. AM-2004*
- *Leishmania sp. MHOM/MQ/92/MAR1*
- *Leishmania sp. SA-2000*

3.3. CICLO BIOLÓGICO

El parásito tiene un ciclo de vida digenético, es decir, requiere de dos hospederos para completar su ciclo vida. La forma flagelada o promastigote (Figura 1a) se encuentra en el tubo digestivo del vector y en medios de cultivos libres de células; y la forma no flagelada o amastigote (Figura 1b) en los fagolisosomas de los macrófagos de mamíferos, incluyendo al hombre.^{7,8}

La transmisión del parásito se inicia con la picadura de un pequeño díptero de 2 a 3 mm de longitud, que en América pertenece al género *Lutzomyia*^{1,9}, y que ingiere los amastigotes al alimentarse de sangre del hospedero vertebrado. Posteriormente, los amastigotes que han sido ingeridos permanecen en el intestino del vector, durante un período de 4 a 25 días, en donde inician su transformación hacia formas alargadas, flageladas y no infectivas, llamadas promastigotes procíclicos.

Subsecuentemente ocurre la metaciclogénesis, que consiste en la transformación de los promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos, que son la forma infectiva del parásito. Durante esta transformación ocurren importantes modificaciones en la estructura del lipofosfoglicano (LPG) que es una molécula que se encuentra en gran cantidad en la superficie del parásito y que está asociada con la capacidad infectiva y sobrevivencia de *Leishmania*. La metaciclogénesis sólo ocurre en el vector y parece ser un mecanismo de preadaptación al hospedero vertebrado.^{10,11}

Después de la transformación, los promastigotes metacíclicos (Fig. 1a) migran a la cavidad bucal del insecto y son inoculados en otro hospedero al alimentarse nuevamente de sangre. En éste, los promastigotes liberados invaden células fagocíticas, transformándose en amastigotes (Fig 1b) que pueden sobrevivir dentro de los fagolisosomas de macrófagos de la piel,

mucosas, hígado, bazo y médula ósea, en donde se dividen por fisión binaria. Al lisarse las células parasitadas, los amastigotes liberados pueden invadir otras células o ser succionados por el vector, iniciándose un nuevo ciclo.^{1,8}

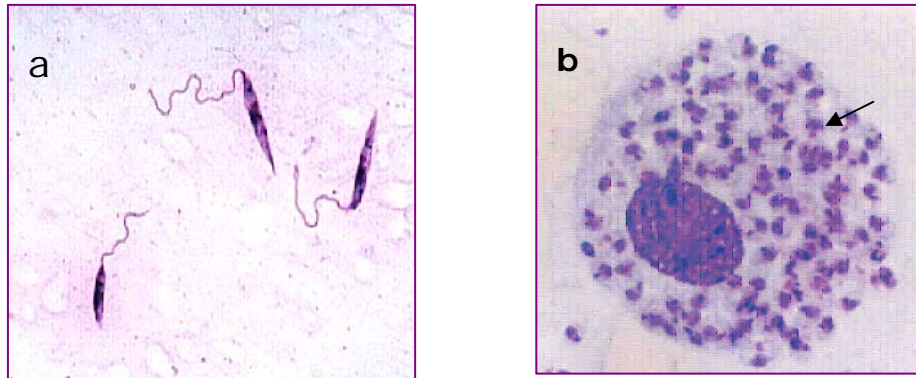
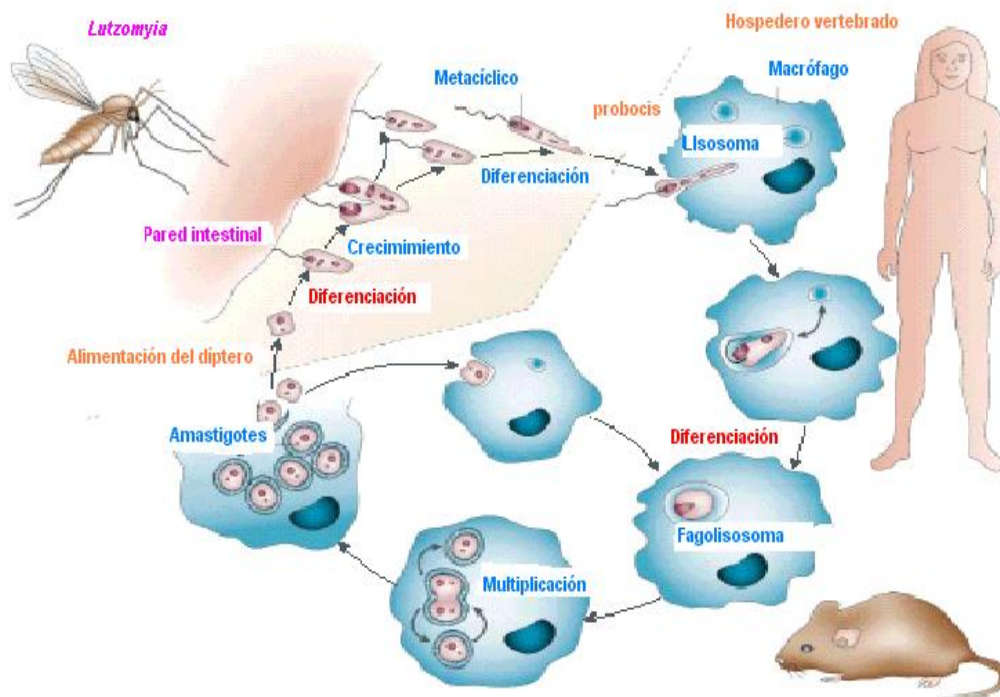


Figura 1. a) Promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* en medio de cultivo b) Abundantes amastigotes parasitando a un macrófago (Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM)

CICLO DE VIDA DE *Leishmania*



3.4. FORMAS CLÍNICAS

Pueden presentarse cuatro formas clínicas: leishmaniasis cutánea localizada, leishmaniasis cutánea diseminada o difusa, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral.¹

3.4.1. Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

La leishmaniasis cutánea localizada o LCL se encuentra en el polo benigno del espectro clínico de la enfermedad y se caracteriza por la aparición de una o más lesiones cutáneas, que pueden curar espontáneamente.¹ Los pacientes con LCL presentan respuesta positiva a la Intradermoreacción de Montenegro (Leishmanina) y la mayoría de las veces responden al tratamiento, aunque también pueden presentarse casos refractarios a los antimoniales.^{1,7,8} Esta forma clínica la puede causar *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica* en el Viejo Mundo. Sin embargo, todas las especies de *Leishmania* que se han aislado de seres humanos en las Américas, pueden causar LCL.^{6,7}

La lesión inicial aparece como una pápula en el sitio de la picadura, la cual tiende a crecer como un pequeño nódulo que se ulcera entre 15 y 20 días después. Los parásitos se diseminan por debajo del epitelio, hacia la periferia, de una manera continua y a una velocidad constante, lo que hace que la úlcera mantenga su forma circular al seguir creciendo. La lesión característica es una úlcera de bordes elevados e indurados, de centro granuloso y húmedo, que puede ser pequeña (0.25 cm) o grande (3 cm) e incluso múltiple (Figuras 2a y 2b). Estas lesiones pueden curar espontáneamente en un período de tiempo que puede variar de 6 meses a 2 años, asimismo, la mayoría de los pacientes con LCL responden a los antimoniales pentavalentes, que es el tratamiento de elección. En algunos casos puede no presentarse la úlcera típica y la lesión puede tener un aspecto verrucoso o continuar siendo nodular y transformarse en una placa infiltrada o atrófica e inclusive puede volverse vegetante. Sólo cuando la lesión se localiza en las orejas, ésta puede ser crónica y mutilante.

^{1,7,8}



Figura 2. Paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL), Cunduacán, Tabasco (Zona de la Chontalpa). Ulcera grande con infección agregada.



Figura 3. Paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL), Cunduacán, Tabasco (Zona de la Chontalpa). Toma de impronta para el diagnóstico parasitológico.

3.4.2. Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD)

La leishmaniasis cutánea diseminada se encuentra en el polo maligno del espectro clínico de la enfermedad, no responde a diversos tratamientos y por su severidad puede llegar a ser fatal.⁷ Esta forma clínica la puede causar *L. aethiopica* en Viejo Mundo y *L. amazonensis*, *L. pifanoi* y *L. mexicana* en América.⁶ Los pacientes presentan anergia a la leishmanina (Intradermorreacción de Montenegro negativa). La LCD se caracteriza por la presencia de lesiones no ulceradas, que en nuestro país son generalmente nodulares, aunque pueden ser verrucosas y además, no visceralizan. (Figuras 3a y 3b). Cuando las lesiones son predominantemente de tipo nodular la enfermedad puede parecerse a una esporotricosis^{7,8} o a la lepra lepromatosa¹. La piel es habitualmente lisa, brillante, extremadamente frágil y las abrasiones pueden confundirse con ulceraciones. El parásito se disemina por vía linfática, invadiendo prácticamente toda la piel, con excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos, palmas de las manos y plantas de los pies; sin embargo, en México se han reportado casos con lesiones en genitales externos, plantas de los pies y con frecuencia en las mucosas orofaríngea y nasal. La diseminación es muy lenta, pero progresiva y ocasionalmente algunas lesiones aparentemente parecen desaparecer, sin embargo, otras lesiones se desarrollan en otras partes del cuerpo.^{1,7,8,12}

A diferencia de la LCD del viejo mundo (*L. aethiopica*) que pueden curar,⁷ la LCD por *L. mexicana* es incurable y mortal.





Figura 4. Paciente con leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) con 18 años de evolución y originario de Teapa (Zona de la Sierra) Tabasco.

3.4.3. Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea (LMC), también llamada “espundia” la puede ocasionar *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis*⁶, y se caracteriza por una severa destrucción de las membranas nasofaríngeas. Esta afectación puede ocurrir de manera simultánea a una lesión inicial de leishmaniasis cutánea localizada o puede presentarse muchos años (hasta 30-40 años) después de la lesión inicial. Esta forma clínica no responde bien al tratamiento con antimoniales, requiriendo tiempos prolongados de aplicación y medicamentos alternativos.^{1,7,8}

3.4.4. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar se encuentra en el polo maligno del espectro clínico de la enfermedad y si no es tratada puede ser mortal en el 100% de los casos. Esta forma clínica la puede causar *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y por *L. colombiensis*, *L. chagasi* y *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo.⁶ Es una enfermedad frecuente en niños y puede presentarse de manera crónica o aguda. La LV crónica se caracteriza por fiebre crónica irregular, malestar general, escalofríos y temblores, pérdida de peso, anorexia y malestar en el hipocondrio izquierdo. Ocasionalmente puede haber tos o diarrea. Los signos clínicos más comunes son esplenomegalia no

dolorosa, con o sin hepatomegalia, descamación y palidez de membranas mucosas, con linfadenopatía. También pueden presentarse anemia y signos de desnutrición, como edema y cambios de color y de consistencia en el pelo. Pueden existir complicaciones asociadas a neumonía bacteriana o viral, disentería y tuberculosis. La LV aguda puede presentarse en personas que no habitan en zonas endémicas, incluyendo adultos. Las manifestaciones clínicas son semejantes, pero ocurren con mayor severidad y su evolución es mucho más rápida.⁷

3.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La distribución geográfica de la leishmaniasis es cosmopolita. En los últimos años se han identificado alrededor de 30 especies de *Leishmania* que pueden infectar a mamíferos, y de éstas, 20 pueden causar leishmaniasis en humanos.^{1,6}

La Organización Mundial de la Salud ha informado que la leishmaniasis es endémica en 88 países del mundo, 22 de los cuales son países del Continente Americano y 44 del Viejo Mundo; y de éstos últimos, 16 son países europeos.¹ Sin embargo, existen otros reportes que señalan que en América la enfermedad se presenta al menos en 23 países, desde el sur de Estados Unidos de América hasta Argentina.⁶ En México, la leishmaniasis se ha reportado al menos en 17 entidades federativas, desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el norte, hasta Quintana Roo en el sur, y se han descrito que existen cinco focos activos en los estados de Campeche, Chiapas, Nayarit, Quintana Roo y Tabasco.^{8,13} Las especies que se han identificado en casos de leishmaniasis en México, son: *Leishmania mexicana*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania sp.*⁶ y *L. braziliensis*.¹⁴

3.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico definitivo de cualquier forma clínica de leishmaniasis es el examen parasitológico, a través del cual puede demostrarse la presencia del parásito, ya sea como amastigote en una impronta, frotis o biopsia teñida, o como promastigote móvil en medios de cultivo. Las pruebas serológicas y la

Intradermorreacción de Montenegro solamente ofrecen evidencia indirecta de una infección por *Leishmania*.⁷

3.6.1. Impronta

En la leishmaniasis cutánea, los frotis y las improntas (impresión del líquido tisular en un portaobjetos) son mucho más útiles que las biopsias, ya que los parásitos son comprimidos de manera lateral lo que permite visualizar más fácilmente el núcleo y el cinetoplasto.⁷ Sin embargo, en ocasiones la leishmaniasis cutánea es muy difícil de diagnosticar por este método, ya que la posibilidad de observar al parásito puede disminuir debido a alteraciones de la lesión, cronicidad, tratamiento convencional o no convencional y por infecciones agregadas. En general los parásitos son más abundantes en lesiones recientes que en crónicas, particularmente en LCL y LMC; pero en los casos de LCD los parásitos siempre son abundantes, incluso en mucosas y piel aparentemente sana.^{7,8} Los parásitos también son más abundantes en el subgénero *Leishmania* que en el subgénero *Viannia*.⁷

3.6.2. Biopsia

La biopsia es muy útil para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral y se recomienda realizarla por medio de una punción y aspirado de bazo, médula ósea o ganglios linfáticos, siguiendo ese orden de acuerdo a su sensibilidad. El examen microscópico puede realizarse directamente en fresco o tiñendo las muestras. También es recomendable que los aspirados se inoculen en medios de cultivo o en hamster.⁷ La punción esplénica requiere de personal capacitado y con mucha experiencia y además se recomienda que el paciente sea hospitalizado.^{7,8} Este procedimiento sólo está indicado en casos crónicos, en los que el bazo es fibroso, y no debe realizarse en casos agudos por el riesgo de un sangrado masivo.⁷

3.6.3. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas permiten distinguir a individuos que han estado en contacto con antígenos de *Leishmania* mediante la determinación de

anticuerpos específicos. En la actualidad se dispone de ELISA y aglutinación directa; sin embargo, se recomiendan estudios previos en las áreas endémicas para establecer líneas basales o puntos de corte antes de utilizarlas de manera rutinaria. En la leishmaniasis visceral los pacientes cursan con mayores niveles de anticuerpos que los pacientes con leishmaniasis cutánea^{7,8} y las especies del subgénero *Viannia* inducen títulos más elevados de anticuerpos que las especies del subgénero *Leishmania*.⁷

3.6.4. Cultivo

La mayoría de los medios de cultivo utilizados contienen agar sangre, incluyendo al NNN, que ha sido el cultivo que con mayor frecuencia se ha utilizado para el aislamiento de *Leishmania* en la leishmaniasis cutánea, el cultivo de sangre de pacientes con LV frecuentemente es negativo.⁸ Debido a que el crecimiento de las diferentes especies del parásito puede variar mucho, se recomienda determinar el medio de cultivo adecuado y la técnica de aislamiento para cada área endémica.⁷

3.6.5. Intradermorreacción de Montenegro

Es una reacción de hipersensibilidad retardada que consiste en la aplicación intradérmica de 0.1 ml de Leishmanina que es un lisado de parásitos fijados con fenol. La prueba debe interpretarse a las 48 horas midiendo la zona de reacción y se considera positiva cuando ésta es mayor a 5 mm. La mayoría de los casos de LCL presentan una prueba positiva de a 1 a 3 meses después de la infección. Los pacientes con LV son negativos durante la fase activa y pueden presentar una reacción positiva hasta un año después de su curación. Los pacientes con LCD presentan una reacción negativa. Esta prueba es muy útil para el diagnóstico de LMC, en la cual los parásitos son muy escasos y para estudios epidemiológicos.⁷

3.7. TRATAMIENTO

A principios del siglo XX, el descubrimiento de la acción de los compuestos de antimonio en la tripanosomiasis experimental, permitió su uso en el tratamiento de la leishmaniasis. Actualmente se prefieren los antimoniales pentavalentes debido a que son más potentes y menos tóxicos que los trivalentes. Los antimoniales pentavalentes más utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis, son: el antimoniato de meglumina (Glucantime) o antimoniato de N-metilglucamina; y el estibogluconato sódico.¹⁵ La dosis recomendada es de 20 mg de sal base por kilogramo de peso por vía intramuscular durante 20 días consecutivos.^{7,16} Los antimoniales tienen acción tóxica que generalmente se manifiesta por anorexia, náuseas, vómito, malestar general, cefalea y letargia; ocasionalmente lesión renal y rara vez, muerte súbita. También se ha reportado hepato y cardiotoxicidad.⁷ Debido a su toxicidad se recomienda que en los casos de LCL los antimoniales sean aplicados de manera intralesional.¹⁷ La lista de medicamentos que se han reportado para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea es sorprendentemente larga, algunos de ellos continúan siendo usados a pesar de que existen serias dudas sobre su efecto, y su uso no se recomienda, como ejemplo puede citarse el pamoato de cicloguanilo y el metronidazol. Adicionalmente, el ketoconazol, alopurinol y fluconazol se han usado como alternativas, pero presentan algunas desventajas en toxicidad, eficacia y costo.^{7,18}

El segundo medicamento de elección recomendado ha sido la Anfotericina B^{7,19}, que es altamente activo, pero también presenta importantes complicaciones debido a su toxicidad; la pentamidina y la paromomicina también se utilizan en algunos casos.¹⁹ La pentoxifilina, fármaco usado en el tratamiento de alteraciones de la circulación periférica, ha sido utilizado con éxito como terapia asociada a los antimoniales pentavalentes.²⁰ La miltefosina, fármaco desarrollado para el tratamiento del cáncer, recientemente se ha utilizado con éxito en el tratamiento de leishmaniasis visceral y con relativo éxito en casos de LCL, refractaria al tratamiento con antimoniales.^{1,18,21}

3.8. ESTADO ACTUAL DE LA LEISHMANIASIS

La Organización Mundial de la Salud reconoció a la leishmaniasis como un problema de salud pública desde hace más de veinticinco años; sin embargo, el número de casos se ha incrementado y la distribución geográfica se ha expandido de manera importante en los últimos doce años, En la actualidad se considera que afecta alrededor de 88 países y que sólo en 36 de ellos la leishmaniasis es de notificación obligatoria. Se estima que a nivel mundial ocurren 2 millones de nuevos casos anualmente de los cuales 1.5 millones corresponden a la forma cutánea y 500 000 a la forma visceral. Adicionalmente se estima una prevalencia anual de 12 millones de personas en todo el mundo y que 350 millones se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad.¹

El TDR (UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease) es un programa global de colaboración científica, que incluye a la leishmaniasis dentro de las diez enfermedades tropicales prioritarias que afectan a poblaciones pobres y marginadas del mundo (World Health Report, 2002) y le asigna la categoría número uno, en conjunto con dengue y tripanosomiasis americana.¹

El aumento de número de casos y la expansión geográfica de la leishmaniasis también se ha observado en América. Por ejemplo, desde hace alrededor de seis años, Brasil ha experimentado importantes cambios epidemiológicos que han conducido a un aumento en la transmisión de las leishmaniasis cutánea, a un incremento y urbanización de la leishmaniasis visceral y a la presencia de un importante número de casos de LCD en zonas en donde la transmisión de *L. braziliensis* es endémica.^{1,22}

En México se ha detectado un aumento de los casos de leishmaniasis en los últimos años. Sin embargo, no existen datos estadísticos que describan la verdadera magnitud del problema a nivel nacional, debido en parte, a que la enfermedad no es prioritaria en nuestro país y a que existe un subregistro de casos.

En Tabasco ha sido posible observar un aumento de casos de leishmaniasis cutánea, particularmente en la zona de la Chontalpa, en donde la LCL es altamente endémica.²³ En esta zona, el cultivo del cacao tiene gran importancia

económica, tanto en su comercialización como en su consumo local. Los cacaotales son pequeñas parcelas con plantas de cacao de regular altura (5-8 m) que están cubiertas por altos árboles que les dan sombra, formando de esta manera un microambiente húmedo, menos cálido que el medio ambiente, con poca luz y con abundantes *detritus* orgánicos en el suelo. Estas condiciones permiten la supervivencia y proliferación del vector. Recientemente se ha demostrado la presencia de larvas y adultos de *Lutzomyia olmeca* infectada con *Leishmania sp* en los *quebraderos de cacao*, que es un área del cacaotal en donde los campesinos quiebran las mazorcas de cacao para extraer las semillas (datos no publicados). En esta zona de Tabasco, las viviendas se encuentran prácticamente inmersas en los cacaotales, lo que permite la transmisión a niños y mujeres y que además la leishmaniasis no sea considerada solamente como una enfermedad profesional. El control del vector en esta zona resulta difícil debido a que la utilización de insecticidas puede afectar también a insectos beneficiosos como los polinizadores, predadores y parásitos de otros insectos nocivos, por lo anterior los campesinos se niegan a fumigar sus parcelas, limitando aún más el control del vector. En Tabasco, también se han informado casos de LCD y LMC y existen fuertes sospechas de la presencia de la forma visceral.



Figura 6. “Quebradero de cacao” ubicado dentro de una plantación de cacao (cacaotal). Zona de la Chontalpa, Tabasco. Se han identificado larvas del transmisor *Lutzomyia olmeca*.

3.9. RESPUESTA INMUNE

El sistema inmune humano está programado para responder rápidamente ante la invasión de microorganismos patógenos y además, puede desarrollar respuestas altamente específicas que reconozcan posteriormente al agente infeccioso con el que ha entrado en contacto. Estas dos diferentes funciones del sistema inmune, se conocen como inmunidad innata e inmunidad adaptativa, respectivamente.

3.9.1. Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adaptativa puede inducir células efectoras para la eliminación de microorganismos y células de memoria para la protección de infecciones posteriores. La respuesta inmune adaptativa primaria, inicia en los ganglios linfáticos periféricos y no en el tejido mismo. Los antígenos del microorganismo patógeno son transportados hasta allí por las células dendríticas para activar células T y B vírgenes. Las células T y B activadas migran entonces al sitio de la inflamación.

En los últimos años las células T y B se han subdividido en dos grandes grupos: 1. Células relacionadas con la inmunidad adquirida, como células B foliculares/B2 y células T $\alpha\beta$ (TCR); y 2. Células relacionadas con la inmunidad innata, como las células B1 y las células B de zona marginal, así como las células T $\gamma\delta$ y células T con restricción CD1. A su vez, las células T han sido divididas en CD4+ y CD8+, de acuerdo a su reconocimiento por moléculas MHC clase II y clase I, respectivamente. Las células TCD4+ pueden diferenciarse a los fenotipos Th1 y Th2, con secreción de citocinas tipo 1 o tipo 2.²⁴

La importancia de la presentación de péptidos antigénicos de *Leishmania* a través de moléculas MHC clase II para la resolución de la enfermedad se demostró utilizando ratones deficientes en Clase II y β 2-microglobulina (*beta 2m -/-*), encontrándose que los ratones deficientes en Clase II sufren una fatal e incontrolable infección por *Leishmania*, mientras que ratones deficientes en Clase I controlan la infección con *L. major* de una manera similar a las cepas de ratones resistentes.

Sin embargo, el parásito es capaz de obtaculizar la presentación de antígenos a través de la degradación de las moléculas de MHC Clase II asociadas a la vacuola parasitófora. La degradación de moléculas del MHC Clase II por *L. mexicana* y *L. amazonensis* fue atribuida a la actividad de cisteíno proteasas, ya que fue posible inhibir esta degradación al utilizar inhibidores específicos de proteasas.²⁵

En modelos murinos se ha demostrado que el curso clínico de la leishmaniasis depende de una respuesta inmune de células Th1 (curación o resistencia) o de una respuesta tipo Th2 (progresión o exacerbación). Los ratones genéticamente resistentes (C57BL/6 y C3H) presentan una respuesta tipo Th1 relacionada con la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2 mientras que los ratones genéticamente susceptibles (BALB/c) presentan una respuesta tipo Th2 con producción de IL-4, IL-10, IL-5, IL-10 e IL-13, principalmente.²⁶

En la leishmaniasis humana se ha encontrado que los pacientes con LCL (forma benigna) presentan una respuesta de citocinas tipo Th1 en las lesiones, con predominio de IFN- γ e IL-1beta, sobre IL-4 y bajos niveles o ausencia de IL-5 e IL-10; mientras que en lesiones de pacientes con la forma severa (LCD) predominan citocinas de una respuesta tipo Th2, particularmente de IL-4, ligera expresión TNF- α y bajos niveles de IL-1beta.²⁷⁻²⁹

Adicionalmente, se han encontrado que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LCL secretan niveles elevados de IFN- γ y TNF- α , mientras que las células de pacientes con LCD no secretan IFN- γ , con un aumento de IL-4 e IL-10.³⁰

Los linfocitos T CD8+ son células efectoras de la inmunidad adaptativa, que actúan a través de la secreción de IFN- γ y TNF- α y de la lisis de células infectadas mediante un mecanismo de citotoxicidad celular. La contribución de estas células en la resistencia a la leishmaniasis se ha demostrado bajo ciertas condiciones. Por ejemplo, una dosis-inóculo intradérmica baja de *Leishmania* tiene un papel decisivo en la protección de la enfermedad de ratones resistentes. Esta resistencia se ha asociado con la acumulación de células CD8+T, mientras que ratones deficientes en estas células, no desarrollan una

respuesta protectora. Sin embargo, se considera que no se ha definido con precisión el papel de las células CD8+ en la infección por *Leishmania*.²⁵

Es importante señalar que la inducción de una respuesta Th1 o Th2 puede modularse por células o moléculas de la respuesta inmune innata.

3.9.2. Respuesta inmune innata

La inmunidad innata no se debe considerar separadamente de la inmunidad adaptativa, ya que hay células y citocinas que son comunes a ambos tipos de respuestas.

En muchos microorganismos se han descrito configuraciones moleculares únicas, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (pathogen-associated molecular patterns, por sus siglas en inglés), que son moléculas superficiales características de microorganismos que están relacionados evolutivamente. Se han descrito PAMPs en bacterias, hongos y virus. Los PAMPs pueden ser reconocidos por moléculas presentes en macrófagos, conocidos como Receptores de Reconocimiento de Patrones o PRRs, por sus siglas en inglés. Este reconocimiento puede facilitar el proceso fagocítico, y puede activar directamente al macrófago.

Los PRR pueden ser solubles o estar unidos a la membrana celular. Funcionalmente los PRR pueden dividirse en tres tipos: los que se secretan o que de forma general funcionan como opsoninas o activadores del complemento, como la proteína de unión a manosa (MBP, por sus siglas en inglés); los fagocíticos, como el receptor de manosa, los receptores *basurero* y CD14; y los de señalización, que activan mecanismos para la transcripción de genes, que conducen a una activación celular e incluyen a los TLRs (Toll-like receptors).³¹

Los TLRs son receptores son proteínas transmembranales que contienen una región conservada llamada dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR) y que se expresan principalmente en las células del sistema inmune.³²

Estos receptores pueden interactuar con patrones moleculares (PAMPs) que son comunes con una amplia variedad de patógenos, pero que raramente se

encuentran en el hospedero. En la actualidad se han identificado 13 tipos diferentes de TLRs en mamíferos.³³ Estos receptores son esenciales en la defensa del hospedero contra patógenos a través de la activación de una respuesta inmune innata, como un prerrequisito para la inducción de una respuesta inmune adaptativa.³²

La interacción de TLRs y PAMPs inicia una cascada de señalización que involucra a varias proteínas como MyD88 e IRAK, éstas permiten la activación del factor de transcripción NF- κ B que induce la secreción de citocinas proinflamatorias y efectoras, y quimiocinas que dirigen la respuesta inmune adaptativa.

Estos receptores también pueden inducir mecanismos de la respuesta inmune innata en macrófagos tales como la producción de intermediarios de oxígeno (ROI) y nitrógeno reactivos (RNI), así como diferenciación celular.^{31,34,35} El receptor TLR-2 se ha asociado con el reconocimiento de muchos patógenos intracelulares como bacterias gramnegativas y grampositivas, espiroquetas, hongos y micobacterias.³⁵

Algunos protozoarios parásitos poseen moléculas de superficie que contienen glicosilfosfatidilinositol (GPI), que pueden actuar como PAMPs y ser reconocidos por PPRs opsonisantes /activadores del complemento, fagocíticos y de señalización.³⁶

En el control y resolución de la leishmniasis se encuentran involucrados elementos tanto de la respuesta inmune innata, como de la respuesta adaptativa. Como parte de la respuesta inmune innata, se ha demostrado la importancia de células como neutrófilos polimorfonucleares, células NK y células dendríticas; así como mediadores solubles como son opsoninas, quimiocinas y citocinas que pueden ser muy eficientes para controlar la infección. Un evento importante para la eliminación de *Leishmania* es la activación del macrófago, el cual requiere del interferón gamma (IFN- γ) que es una citocina que se puede inducir tanto por células de la respuesta inmune innata (como células NK) como por células de la respuesta inmune adaptativa

(CD4⁺ Th1 y células T CD8⁺). En la respuesta inmune adaptativa, se requiere que el macrófago presente los antígenos del parásito a células T vírgenes, las cuales pueden diferenciarse a células Th1 que secretan IFN- γ , favoreciendo la activación del macrófago. En la presentación de antígenos para inducir una respuesta tipo Th1 es indispensable la expresión de moléculas del MHC clase II y de moléculas coestimuladoras CD40, B7-1 y B7-2 en la superficie del macrófago y que estas moléculas sean reconocidas por ligandos presentes en la célula T.³¹

3.9.2.1. Células de la inmunidad innata

En la leishmaniasis cutánea el parásito es inoculado en la dermis, en donde entra en contacto con células de la inmunidad innata como macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas y células NK que secretan mediadores solubles capaces de activar a otras células, así como de modificar el tráfico celular para favorecer la atracción de células efectoras y de células de la inmunidad adaptativa al sitio de la lesión.²⁵

3.9.2.1.1. Células polimorfonucleares

Los neutrófilos son células fagocíticas que pueden destruir a *Leishmania* por medio de gránulos y metabolitos reactivos del oxígeno, tan eficientemente como los macrófagos, ya que el estallido respiratorio en estas células es muy potente. Los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio de la infección, incluso dos o tres días antes que los monocitos, lo cual describe su importancia en las fases tempranas de la infección.³¹

Recientemente se ha descrito que son eficientes células presentadoras de antígenos de *Leishmania*, lo que les permite ser un vínculo entre la inmunidad innata y la adaptativa. Los neutrófilos que han fagocitado leishmanias pueden secretar quimiocinas como MIP-1, para el reclutamiento de monocitos y que también es quimiotáctica para otros neutrófilos. Estas células tienen una corta vida y entran en apoptosis espontánea 6-10 horas después de entrar en circulación. Debido a que la ingestión de células apoptóticas por el macrófago no activa funciones microbicidas, se ha propuesto que la ingestión de

neutrófilos infectados es una forma silenciosa que tiene *Leishmania* para entrar a los macrófagos.²⁵

3.9.2.1.2. Células NK

Las células NK son células de la respuesta inmune innata que tienen una actividad citotóxica y que son muy eficientes en la destrucción de células tumorales. Sin embargo, también son muy importantes en la resolución de infecciones al secretar IFN- γ y TNF- α , citocinas que pueden activar macrófagos para la destrucción de los patógenos intracelulares.^{37,38}

Estas células tienen un amplio repertorio de receptores que pueden presentarse de manera individual o en combinación, dependiendo del ligando presente en la célula blanco. Recientemente, se ha demostrado que la activación de células NK puede depender del contacto directo con células dendríticas o por citocinas secretadas por estas células. Adicionalmente, las células NK pueden estimular la maduración de células dendríticas (DC), pero aún las células dendríticas inmaduras son capaces de secretar TNF- α e IL-12 y de sobre-expresar B7-2 cuando entran en contacto con células NK y a su vez, el TNF- α secretado puede ser utilizado de manera autocrina para la activación de las células dendríticas inmaduras.³⁸

Las células NK se han asociado a la protección y curación de la leishmaniasis como la fuente primaria de IFN- γ para la activación del macrófago. De igual manera, se ha considerado que el TNF- α puede potenciar la actividad de IFN- γ . La IL-12 secretada por macrófagos o células dendríticas puede activar células NK e inducir la producción de IFN- γ y además pueden favorecer la diferenciación de células T al fenotipo Th1.³⁹ Otros autores reportan que células NK estimuladas con IL-12 o IL-18 desarrollan poca o ninguna actividad leishmanicida, pero que la combinación de IL-12 e IL-18 ejerce un efecto sinérgico en la activación de estas células.⁴⁰

Las IL-15 e IL-12 pueden también actuar de manera sinérgica sobre la célula NK para la producción de IFN- γ y TNF- α .⁴¹ Actualmente, se ha demostrado

que las células NK son capaces de interactuar directamente con el parásito vivo para producir IFN- γ , aún en ausencia de IL-12.⁴² Recientemente se ha demostrado que la interacción directa entre las células NK y el parásito se realiza a través de la molécula LPG de *Leishmania* y TLR-2 (Toll Like Receptor 2) presente en la superficie de células NK de humanos, dando lugar a una traslocación de NF- κ B para incrementar la producción de IFN- γ y TNF- α , así como la sobre-expresión de TLR-2.⁴³

Recientemente se han investigado las vías de señalización en células involucradas en la respuesta inmune innata a la leishmaniasis, los resultados mostraron que los ratones resistentes Tyk2 (-/-) infectados desarrollan severas lesiones y que sus células NK no responden al estímulo de IL-12 y además no producen IFN- γ .⁴⁴

T-bet es un factor transcripcional que se expresa en todos tipos de células y que regula la producción de IFN- γ por células Th1 y NK. Se ha demostrado que en ratones resistentes genéticamente deficientes (T-bet -/-) infectados con *Leishmania* se induce una respuesta Th2.⁴⁵

En los últimos años se ha descrito la importancia de los interferones tipo 1 (alfa/beta) en la inducción de una respuesta protectora en animales susceptibles cuando se infectan con *Leishmania*. Por ejemplo, el IFN-beta restaura la actividad citotóxica de células NK, aumentando su producción de IFN- γ , dependiente de STAT-4.⁴⁶

3.9.2.1.3. Células dendríticas

Al igual que los macrófagos, las células dendríticas tienen un papel crucial en el control de la leishmaniasis. Las células de Langerhans son las células dendríticas de la piel que pueden entrar en contacto con *Leishmania* en el sitio de la lesión, fagocitarla y transportar antígenos del parásito a los ganglios regionales para su presentación a células T. De esta manera participan activamente en la regulación de la respuesta inmune adaptativa y la persistencia del parásito en estas células permite una constante estimulación de las células de memoria. Las células dendríticas son mucho más eficientes

que los macrófagos en la presentación de antígenos de *Leishmania*, debido en parte a que las células infectadas expresan complejos muy estables de antígenos-MHC clase II. Estas células también son muy eficientes en la producción de IL-12, contrario a lo que ocurre en el macrófago infectado, en donde *Leishmania* puede inhibir la producción de esta citocina. El lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* puede modular el fenotipo e inhibir la migración de las células de Langerhans, aunque no afecta la expresión de moléculas del MHC clase II y moléculas coestimuladoras B7.⁴⁷

Otros autores han demostrado que la inducción de IL-12 por *Leishmania* en células dendríticas es CD40L dependiente y que esta inducción puede variar de acuerdo a la especie de *Leishmania*.²⁵

Recientemente, se ha demostrado que la lectina tipo C de superficie (DC-SIGN) en células dendríticas es un receptor para las formas promastigote y amastigote de parásitos del Nuevo Mundo, pero no para *L. major*. Este reconocimiento es independiente de la molécula LPG que es el principal glicoconjugado de superficie de los promastigotes.⁴⁸

3.9.2.1.4. Macrófagos

Los macrófagos con células del sistema inmune que tienen un papel primordial en la eliminación de microorganismos patógenos. Algunos protozoarios pueden parasitar macrófagos y utilizar los recursos de esta célula huésped para su crecimiento y replicación. Sin embargo, *Leishmania* es el único protozoario que necesita predominantemente al macrófago para completar su ciclo de vida.³¹

Leishmania posee abundantes glicoconjugados que se pueden secretar o que se encuentran en la superficie del parásito, como son: el lipofosfoglicano (LPG) y el proteofosfoglicano (PPG) que se encuentran unidos a la membrana, así como el fosfoglicano (PG); además del proteofosfoglicano (PPG) y la fosfatasa ácida (sAP) que se pueden secretar.⁴⁹

Los principales glicoconjugados que actúan como ligandos en la unión *Leishmania* al macrófago, son LPG y una glicoproteína de 63 kDa (gp63). LPG es el glicoconjugado más abundante en la superficie del parásito y se ha identificado en los promastigotes de todas las especies de *Leishmania*. Esta molécula se encuentra organizada como un denso y filamentoso glicocalix y estructuralmente está formada por una molécula de GPI anclada a la membrana, la cual se encuentra unida a un glicano central (heptasacárido), seguido de un fosfoglicano (PG) que contiene entre 15-30 unidades de Gal.Man-P, dependiendo de la especie de *Leishmania*, y que además se encuentra cubierto con un oligosacárido.⁵⁰

Adicionalmente, LPG y la gp63 pueden activar al sistema del complemento y recubrirse con C3b y C3bi para ingresar al macrófago a través de sus receptores CR1 y CR3, respectivamente.³¹ Se ha descrito que este es el principal mecanismo de entrada de los promastigotes metacíclicos al macrófago⁴⁹ y que los amastigotes de *L. major* y *L. donovani* pueden usar CR3.³¹

La penetración del parásito al macrófago también puede estar mediada por una serie de ligandos solubles o presentes en la superficie del macrófago, tales como: la proteína de unión a manosa o MBP (manose binding protein) que es una proteína sérica de fase aguda que puede actuar como opsonina para promover la fagocitosis o activar al sistema del complemento; el receptor de manosa que se encuentra altamente expresado en macrófagos tisulares y que puede inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y mecanismos leishmanicidas; la proteína C reactiva, que es capaz de opsonizar al parásito y favorecer la fagocitosis; el receptor parecido a lectinas; CR4; el receptor para la fibronectina que interactúa con gp63; el receptor para productos terminales de la glicosilación, y el receptor para Fc en donde las inmunoglobulinas actúan como opsoninas.^{31,49,51}

La habilidad del parásito para usar una gran variedad de receptores, facilita su entrada al macrófago y es un mecanismo de supervivencia, pero la utilización de uno u otro receptor parece depender de la especie de *Leishmania*,³¹ por

ejemplo, en *Leishmania mexicana*, se ha descrito la fagocitosis a través del receptor Fc del macrófago.⁵²

Independientemente de la importancia de la fagocitosis y de los mecanismos citocidas que se inducen para la eliminación de microorganismos, un evento muy importante en la respuesta inmune a patógenos intracelulares es su capacidad de entrar en contacto con los macrófagos y desencadenar vías de señalización para la producción de citocinas que puedan modular la respuesta inmune innata y adaptativa. Este contacto puede realizarse a través de moléculas presentes en estos microorganismos (PAMPs), con TLRs (Toll-like receptors) presentes en la superficie del macrófago.

Existen evidencias de que algunos protozoarios parásitos, como *T. cruzi* pueden interactuar con TLR-2 de macrófagos, a través de su molécula de superficie GPI (glicosilfosfatidilinositol)⁵³ y que *Leishmania* puede interactuar con TLR-4 para un control eficiente de la infección que involucra tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa.⁵⁴ De manera más específica se ha demostrado que la molécula LPG de *Leishmania major* es ligando de TLR-2.⁵⁵

Los TLRs pueden inducir la producción de citocinas, debido a que se encuentran unidos a una proteína adaptadora (MyD88) que interactúa con algunas otras moléculas en la cascada de señalización, lo cual permite la translocación nuclear de NF- κ B y la producción de citocinas como la IL-12. Adicionalmente, se ha encontrado que MyD88 es esencial en la señalización de las citocinas IL-1 e IL-18.⁵⁶

En la leishmaniasis murina se ha reportado que la interacción LPG-TLR-2 activa vías de señalización que pueden inducir resistencia a la infección, pero también puede inducir vías de regulación negativa como SOCS-1 y SOCS-3.⁵⁵ La importancia de la proteína adaptadora MyD88 se ha demostrado en modelos murinos resistentes a la leishmaniasis MyD88 (-/-), que cuando se infectan con *Leishmania*, desarrollan lesiones crónicas que no curan⁵⁵ y además generan una respuesta Th2.^{57, 58}

La fagocitosis de microorganismos se acompaña de un dramático incremento en el consumo de oxígeno por la célula fagocítica, llamado “estallido respiratorio”, el cual activa a la NADPH oxidasa de la membrana plasmática, que actúa como una fuente de potencial reductor para convertir el oxígeno molecular en aniones superóxido (O_2^-) que a la vez, generan productos altamente reactivos del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH^-), ácido hipocloroso (OCL^-) y peroxinitrito ($ONOO^-$).

El contacto de la molécula GPI de *Leishmania* con el macrófago es suficiente para iniciar una rápida activación de las PKCs del macrófago. La molécula de GPI tiene dos regiones que parecen inducir señales diferentes, como la producción de citocinas (ej. IL-12 y TNF- α) y la síntesis de óxido nítrico.

En modelos murinos se ha establecido que la activación de macrófagos por citocinas permite la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (ROI y RNI, por sus siglas en inglés) que son responsables de la actividad leishmanicida del macrófago.

El amastigote, que es la forma intracelular del parásito, prolifera dentro del fagolisosoma de los macrófagos infectados y puede ser eliminado por mecanismos intracelulares, como la producción de óxido nítrico. (NO), el anión superóxido, H_2O_2 , y el ión hidroxilo (OH^-).

Tanto el promastigote como el amastigote son susceptibles a intermediarios reactivos del oxígeno. (ROI); sin embargo, el estallido respiratorio despertado por el amastigote, es significativamente menor que el inducido por la fagocitosis de los promastigotes., posiblemente debido a que el promastigote utiliza el receptor de manosa y el amastigote no lo usa.

Mientras que los intermediarios del oxígeno contribuyen en el control de *Leishmania* durante las fases tempranas de la infección, los intermediarios del nitrógeno como el óxido nítrico (NO) son esenciales para la eliminación del parásito en fases posteriores y se les considera cruciales para la eliminación total del parásito. ³¹

El TNF- α y el IFN- γ son las citocinas principales en la activación de macrófagos que pueden actuar sinérgicamente para la transcripción de genes que codifican para la enzima óxido nítrico sintasa en su isoforma inducible (iNOS), necesaria para la producción de óxido nítrico.

El óxido nitro es muy importante en la regulación de una respuesta protectora, ya que además de tener propiedades leishmanicidas, puede promover la activación de células NK dependiente de IL-12 e IFN- γ .

Esto ocurre particularmente en las etapas tempranas de la infección, en que los macrófagos activados liberan IFN- γ que funciona de una manera autócrina para estimular la liberación de pequeñas cantidades de NO que son insuficientes para matar al parásito, pero que pueden modular la activación de células NK por secreción de IL-12. Subsecuentemente, la liberación de IFN- γ por NKs activa entonces a los macrófagos para la inducción de iNOs y la liberación de grandes cantidades de NO para matar al parásito.

Estos hallazgos sugieren que los niveles bajos de NO derivado de iNOs liberado por la producción autócrina de IFN- γ durante las etapas tempranas de la leishmaniasis es un requisito para la señalización y función de citocinas de la inmunidad innata. La importancia de iNOs en la resolución de la enfermedad se ha demostrado en animales infectados con *L. major* y *L. donovani*.³¹

En la leishmaniasis humana se ha encontrado que la expresión de iNOs en biopsias de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (forma benigna) es mayor que en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada (forma maligna), lo cual se relaciona con la función protectora de iNOs.⁵⁹

Mecanismos de Evasión: Los mecanismos de evasión de *Leishmania* son muy amplios y variados. Desde que el parásito se encuentra en el vector experimenta cambios que le permiten prepararse para sobrevivir en el hospedero vertebrado, como es la metaciclogénesis, es decir, su transformación de promastigote procíclico a promastigote metacíclico. El promastigote metacíclico expresa grandes cantidades de lipofosfoglicano (LPG), así como la metaloproteasa gp63, que lo protege de las enzimas proteolíticas presentes en el intestino del vector.⁴⁹ Adicionalmente, estas moléculas se han asociado a múltiples mecanismos de evasión muy importantes para la supervivencia del parásito dentro del hospedero vertebrado.

En el intestino del vector, el promastigote entra en contacto con un péptido llamado maxadilan que forma parte de la saliva del díptero que es un potente vasodilatador e inmunomodulador. Este péptido es capaz de suprimir la actividad leishmanicida del macrófago, inhibir la producción de óxido nítrico y de TNF- α , y acelerar el desarrollo de las lesiones de ratones infectados.⁵¹

Cuando el parásito es inoculado al hospedero vertebrado LPG y gp63 pueden activar al sistema de complemento y utilizar las fracciones C3b y C3bi como opsoninas para ingresar al macrófago a través de los receptores CR1 y CR3, respectivamente. Este mecanismo de entrada impide que se dispare el estallido respiratorio por lo cual constituye un mecanismo de evasión muy eficiente para la sobrevivencia de *Leishmania* dentro del macrófago. Adicionalmente, la interacción de algunas especies de *Leishmania* con CR3 puede inhibir la producción de IL-12.⁴⁹

LPG y gp63 también pueden proteger al parásito de la lisis por complemento inactivando el Complejo de Ataque a la Membrana (MAC).³¹ Por otro lado, LPG también puede inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, a través de una repulsión estática entre las membranas de ambos organelos, evitando de esta manera la degradación hidrolítica del parásito. Adicionalmente, LPG es resistente a las enzimas lisosomales e incluso puede destruirlas. Asimismo, la proteasa gp63 también puede degradar las enzimas lisosomales, ya que presenta una actividad óptima en el medio ácido del fagolisosoma y así proteger al parásito de la degradación hidrolítica.^{49,51}

Los componentes de la fosforilación en las cascadas de señalización tienen un papel crítico en la regulación de muchas funciones del macrófago que son inhibidas por *Leishmania*. La inhibición de las cascadas de señalización que requieren fosforilación de tirosina, parecen ser una de las estrategias usadas por *Leishmania* para prevenir la activación del macrófago y asegurar su supervivencia. *L.donovani* puede disparar rápidamente la actividad de proteintirosinfosfatasa (PTP, que desfosforilan tirosina), de manera simultánea con la inhibición de proteintirosincinasas (PKT, que fosforilan tirosina).

Esta especie de *Leishmania* incrementa de manera particular la actividad de SHP-1 que se ha correlacionado con una reducción de la respuesta a citocinas proinflamatorias, disminución en la producción de NO y supervivencia del parásito. La proteincinasa C (PKC) es una familia de cinasas de serina y treonina que regulan un amplio rango de procesos celulares. La actividad de PKC es importante para una gran variedad de procesos mediados por el macrófago, como la fagocitosis a través de CR3 y Fc y en eventos que implican la destrucción de microorganismos, como son la fusión fagosoma-lisosoma, el “estallido respiratorio” y la inducción de mediadores inflamatorios. LPG disminuye la actividad de PKC en macrófagos aumentando la proliferación y sobrevivencia de *Leishmania*. El parásito también puede modular la actividad de fosfatasa del hospedero infectado o puede expresar sus propias fosfatasa, que actúan sobre proteínas del macrófago.³¹

De manera específica LPG puede suprimir el estallido respiratorio e inactivar los radicales del oxígeno y suprimir la expresión de NOS2 y la producción de NO por el macrófago.^{51,60}

Varias especies del parásito, como *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. major* pueden inducir la producción del TGF- β en el macrófago, que es una citocina que inhibe la producción de IL-12 e IFN- γ , la generación de iNOS y NO; así como la expresión de moléculas clase II, CD40, B7-1 y B7-2 y la citotoxicidad por células NK.^{51,60-63}

Leishmania mexicana también puede inhibir la presentación de antígenos por moléculas MHC Clase II, a través de la internalización y degradación de estas moléculas dentro de la vacuola parasitófora.⁶¹

Cuando el promastigote se transforma en amastigote, la expresión de LPG disminuye; sin embargo, los amastigotes conservan moléculas GILPs (glicoinositolfosfolípidos) y glicoesfingolípidos (sin inositol) que forman un denso glicocálix inmediatamente adyacente a la superficie del parásito y a través del cual, la LPG y la gp63 se proyectan. Los GILPs pueden disminuir la actividad de la proteincinasa C (PKC) e inhiben fuertemente la expresión de NOS2. Esto nos permite entender que los amastigotes utilizan mecanismos de evasión diferentes a los promastigotes.⁵¹

Los parásitos también pueden ingresar a las células de Langerhans en la epidermis y transformarse en amastigotes. Aunque en estas células el parásito no se puede replicar, le ofrece un ambiente seguro para su transformación debido a que no expresan iNOS, ni NOS2, enzimas involucradas en la destrucción del parásito.⁶⁴

3.9.2.2. Citocinas de la inmunidad innata

Las citocinas reconocidas que regulan funciones efectoras de la inmunidad innata, son: IL-1, quimiocinas, Interferón tipo 1 (IFN- α , IFN- β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 12 (IL-12), Interleucina 18 (IL-18) e Interleucina 15 (IL-15); el macrófago produce todas ellas, pero también se pueden secretar por otras células.

3.9.2.2.1. Interleucina 1 (IL-1)

Existen evidencias que indican que IL-1 α es capaz de inducir una respuesta Th1 e inhibir una respuesta Th2 en ratones susceptibles.

IL-1 α puede prevenir la progresión en la leishmaniasis cutánea y su eficacia depende de IL-12.⁶⁵ También se ha reportado que la susceptibilidad a la leishmaniasis puede estar relacionada con la inhibición de IL- α e IL- β .⁶⁶

3.9.2.2.2. Quimiocinas

Los macrófagos y las células dendríticas, pueden secretar quimiocinas al estimularse a través de sus receptores TLRs, y a la vez, estimular la expresión de receptores para quimiocinas en células dendríticas.

Este mecanismo, mediado por TLRs, es esencial para el reclutamiento de células dendríticas al sitio de inflamación y su migración posterior a ganglios linfáticos para la activación de células T.

Las quimiocinas son moléculas que pueden regular el tráfico celular al sitio de la lesión y se ha demostrado su importancia en la resolución de la enfermedad en humanos. Se ha sugerido que los patógenos pueden determinar la naturaleza de la respuesta inmune a través de la activación diferencial de TLRs y la subsecuente expresión de quimiocinas.⁶⁷

Las quimiocinas liberadas durante una respuesta inflamatoria durante una infección incluye a: IL-8 (también conocida como CXCL8), la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, también conocida como CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL-7), MCP-4 (CCL13), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α , también conocida como CCL3), MIP-1 β (CCL4) y RANTES (CCL5), se pueden inducir por las vías TLR2 y TLR4.^{67,68} Estas quimiocinas se unen a la superficie luminal del endotelio vascular e inducen la activación de leucocitos por cambios conformacionales en las integrinas.⁶⁸

En ratones infectados con *Leishmania amazonensis* se ha establecido que la susceptibilidad está relacionada con la inhibición de IFN- γ y de las quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, MIP-2 y receptores para quimiocinas como CCR1, CCR2, CCR5.⁶⁶

En lesiones de pacientes con LCL se han demostrado altos niveles de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y moderados niveles de proteína inflamatoria de macrófagos 1 (MIP-1a), por el contrario, en pacientes con LCD los niveles de MCP-1 son significativamente más bajos y predomina la expresión de MIP-1. Otras quimiocinas, como IL-8, RANTES, I-309 y MIP-1b se expresan en mínimas cantidades o no se expresan. Ambas moléculas MCP-1 e IFN- γ en conjunto pueden activar monocitos para la eliminación del parásito.⁴⁷

Otros autores han encontrado en biopsias que los pacientes con LCL mostraban altos niveles de CCL2/ MCP-1, CXCL9/Mig y CXCL10/IFN- γ -IP-10, mientras que muestras de pacientes con LCD expresan CCL3/MIP-1 α de manera predominante; sugiriendo que diferentes patrones de citocinas están relacionados con el cuadro clínico de la leishmaniasis.⁶⁶

3.9.2.2.3. Interferones tipo I (IFN-alfa/beta)

Los interferones tipo I (IFN-alfa/beta) ejercen una potente actividad antiviral y actividades inmunoregulatorias durante las infecciones virales, pero su papel en infecciones por bacterias y protozoarios ha sido poco estudiado. Sin embargo, se ha demostrado que la administración de bajas dosis (pero no de altas dosis) de IFN-beta protege a ratones susceptibles de una leishmaniasis cutánea progresiva y de una leishmaniasis visceral fatal, y restaura la actividad citotóxica de células NK, incrementa la proliferación de linfocitos y aumenta la producción de IFN- γ e IL-12.⁴⁶

3.9.2.2.4. Interleucina 6 (IL-6)

Los macrófagos activados pueden producir interleucina 6 (IL-6) y se sugiere su importancia en una respuesta tipo Th1 en la leishmaniasis.²⁵ El mRNA de IL-6 se ha encontrado expresado en lesiones de un gran número de casos de leishmaniasis cutánea localizada, mientras que no se expresa en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada.⁶⁹

3.9.2.2.5. Interleucina 10 (IL-10)

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina que puede suprimir la respuesta Th1 y la activación de macrófagos. Inicialmente se pensó que esta citocina no era importante en la leishmaniasis, debido a que el tratamiento de ratones susceptibles con anti-IL-10 tenía poco efecto para revertir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, el papel de IL-10 en la susceptibilidad a *L. major*, necesita reconsiderarse a la luz de los nuevos conocimientos. Aunque los macrófagos han sido propuestos como una fuente importante para la secreción de IL-10, recientes estudios han demostrado que la fuente crucial *in vivo* son las células CD4+.²⁶

3.9.2.2.6. Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α)

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) secretado por los macrófagos actúa como un estímulo autocrino para incrementar el estallido respiratorio y, los intermediarios reactivos del oxígeno generados durante este estallido, aumentan a su vez la producción de TNF- α por los macrófagos.^{70,71}

El TNF- α es una citocina proinflamatoria que ha sido estudiada extensamente en modelos murinos y que se ha asociado con una respuesta protectora en ratones infectados con *Leishmania*. Durante la infección por *Leishmania*, la activación del macrófago puede ocurrir a través de la secreción autocrina del TNF- α que actúa de manera sinérgica con IFN- γ para activar la producción de óxido nítrico (NO).

El tratamiento de ratones infectados con *L. major* con TNF- α exógeno, reduce el tamaño de sus lesiones y disminuye el número de parásitos.^{72,73} y esta reducción es significativa cuando el ratón infectado se trata con TNF- α e IFN- γ .⁷⁴ Por el contrario, la aplicación de anticuerpos anti-TNF- α exacerbaban la infección por *L. major* y los ratones desarrollan grandes lesiones con un elevado número de parásitos.^{72,73,75,76} Otros autores han demostrado que ratones resistentes TNF^{-/-} y TNFR^{-/-} no resuelven la infección y que pierden su capacidad de producir NO.^{77,78}

En la leishmaniasis humana el papel protector de TNF- α resulta controversial e incluso altos niveles de esta citocina se han asociado con el daño tisular. Por ejemplo, se ha reportado que los niveles séricos de TNF- α son significativamente más altos en pacientes con la forma mucocutánea y diseminada de la enfermedad.⁷⁹ Además, pacientes con formas severas de la enfermedad como LV y LCD presentan altos niveles de TNF- α en suero.⁸⁰

Sin embargo, en lesiones de pacientes con LCL, LMC y LCD analizadas por PCR para la detección de mRNAs de citocinas proinflamatorias, se encontró mRNA en todos los casos de la forma mucocutánea y en la mayoría de los

casos de LCL, pero se expresa pobremente en los casos de la forma diseminada de la enfermedad.⁶⁹

Por otra parte, en pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea se han encontrado altos niveles de IFN- γ y de TNF- α cuando sus células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son estimuladas con antígeno de *L. amazonensis*, particularmente en la fase tardía de la enfermedad (más de 60 días) y los niveles de TNF- α disminuyen después del tratamiento de estos pacientes.⁸¹

Otros autores reportan que células de sangre periférica de individuos con antecedentes de leishmaniasis cutánea responden al estímulo de antígenos de *Leishmania* y producen niveles más altos de IFN- γ y TNF- α que individuos sanos.⁸²

Recientemente se ha comparado la inducción de TNF- α por diferentes especies de *Leishmania* en monocitos y células de sangre, encontrándose que *L. donovani* induce una mayor producción de esta citocina que *L. major*. Interesantemente, *L. donovani* produce leishmaniasis visceral que es una forma severa de la enfermedad.⁸³

Comparando sueros de pacientes con formas clínicas benignas y severas de la leishmaniasis y de la lepra, se encontraron niveles significativamente más altos de TNF- α en pacientes con las formas severas de estas enfermedades (LCD y lepra lepromatosa) que en pacientes con las formas clínicas benignas, como LCL y lepra tuberculoide.⁸⁰

En modelos murinos y pacientes con otras infecciones por protozoarios intracelulares como la enfermedad de Chagas se ha encontrado que la actividad de TNF- α sinergiza con el IFN- γ para la activación de macrófagos y producción de óxido nítrico.^{84,85} Pero otros autores asocian los altos niveles de TNF- α con formas clínicas severas de otras enfermedades, a como ocurre en la malaria severa.⁸⁶

Adicionalmente se ha demostrado que la deficiencia de TNF- α /TNFRs en ratones genéticamente modificados, puede ser beneficioso para la protección contra infecciones por *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium spp.*⁸⁷ Pero por otro lado se ha reportado que *Toxoplasma gondii* y *Brucella suis* no son capaces de inducir la secreción de TNF- α en células monocíticas humanas.^{88,89}

También se ha propuesto que la variabilidad en la producción de TNF- α por monocitos, parece estar genéticamente determinada y se ha identificado un nucleótido que estimula la transcripción de TNF- α y que está relacionado con la susceptibilidad a formas severas de leishmaniasis, así como en otras enfermedades infecciosas.⁹⁰

3.9.2.2.7. Interleucina 12 (IL-12)

La importancia de la IL-12 durante la respuesta inmune en leishmaniasis cutánea se ha descrito ampliamente en modelos murinos resistentes y susceptibles infectados con *L. major*, se encontró que la resistencia y control de la infección depende de una respuesta tipo Th1 que es mediada por IL-12.

Se ha demostrado que ratones resistentes deficientes en IL-12 (IL-12 $^{-/-}$)^{91,92}, así como ratones tratados con anticuerpos anti-IL-12^{93,94}, desarrollan una enfermedad progresiva cuando se infectan con *L. major*. Además, cuando se administra IL-12 recombinante (rIL-12) a ratones susceptibles (BALB/c) estos presentan menor número de parásitos en las lesiones y desarrollan resistencia a la enfermedad.^{93,95}

Al parecer la respuesta de las células T puede depender de la expresión de receptores funcionales para IL-12 (IL-12R), ya que células infectadas con *L. major* estimulan la expresión de IL-12R en ratones resistentes, pero la inhiben en ratones susceptibles.⁹⁶

Además, ratones deficientes en la subunidad beta del receptor para IL-12 (IL-12Rbeta2KO) desarrollan grandes lesiones cutáneas similares a las desarrolladas por ratones susceptibles BALB/c.⁹⁷

Pese a que se ha demostrado la importancia de la IL-12 en una respuesta protectora a la leishmaniasis, los promastigotes de *L. major* pueden inhibir selectivamente la producción de IL-12 por el macrófago, tanto *in vitro*⁹⁸⁻⁹⁹ como *in vivo*.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Esta inhibición puede ocurrir tanto en ratones susceptibles como resistentes; por el contrario, los amastigotes pueden activar macrófagos para producir IL-12 en respuesta a la infección por *Leishmania*.¹⁰¹

Llama la atención que algunas especies de *Leishmania* relacionadas entre si, como *L. amazonensis* y *L. mexicana* son capaces de producir infecciones incurables en animales resistentes (C3H, C57BL/6 y C57BL/10) a *L. major*.^{96, 102-107}

Adicionalmente, ratones C3H infectados con *L. amazonensis* producen menos IL-12 que aquellos infectados con *L. major*, y su producción es comparable con ratones susceptibles (BALB/c). En estos ratones, el tratamiento con IL-12 tiene poco efecto sobre el desarrollo y resolución de las lesiones.⁹⁶ De acuerdo a estos resultados, los autores proponen que la susceptibilidad puede deberse a una falla para desarrollar una respuesta tipo Th1, más que al desarrollo de una respuesta tipo Th2; debido también en parte, a que *Leishmania* es capaz de regular negativamente la expresión de los receptores para IL-12.

Resultados similares se han encontrado en ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* que desarrollan lesiones que no curan, sin embargo éstas no son progresivas, pero tampoco curan cuando son tratados con IL-12. Estos autores también infectaron ratones C57BL/6 deficientes en un componente de la cascada de señalización para la producción de IL-12, llamado STAT4, y encontraron inhibición en la producción de IL-12.¹⁰⁷

Células de ratones susceptibles a *L. mexicana* responden eficientemente a IL-12 exógena *in vitro* y producen IFN- γ ; sin embargo, los ratones genéticamente deficientes en STAT4 (STAT4^{-/-}) no responden a la IL-12 exógena *in vivo*. Esto sugiere que existe una incapacidad para producir IL-12 más que una falta de respuesta a IL-12 exógena en ratones considerados susceptibles a la infección por *L. mexicana*.¹⁰⁸

Adicionalmente, en humanos se ha reportado que *Leishmania* es capaz de inhibir *in vitro* la producción de IL-12 en monocitos.¹⁰⁹ Sin embargo, parece haber una secreción diferencial de IL-12 por monocitos de acuerdo al estado clínico del paciente, ya que en los casos curados de leishmaniasis cutánea se han encontrado altos niveles de mRNA de IL-12, pero bajos niveles en aquellos casos refractarios al tratamiento.¹¹⁰ Estos datos sugieren que incluso *in vivo* el parásito puede inhibir la producción de IL-12. Por el contrario, se han encontrado niveles marcadamente elevados en pacientes sintomáticos con leishmaniasis visceral (LV), cuando son comparados con individuos con infecciones asintomáticas, pacientes con malaria y controles sanos.¹¹¹

Estudios comparativos han demostrado que *Leishmania* inhibe *in vitro* la producción de IL-12, pero que *in vivo* induce niveles reducidos de IL-12, mientras que otros patógenos intracelulares como *T. cruzi* y *T. gondii* son potentes inductores de IL-12.¹¹²

1.1.1

1.1.2 Otros autores han reportado en modelos murinos que IL-12 e IFN- γ son esenciales para la resistencia del hospedero en la infección aguda por *T. cruzi*, *T. gondii* y *Cryptococcus neoformans*.¹¹³⁻¹¹⁵

3.9.2.2.8. Interleucina 18 (IL-18)

Interleucina 18 (IL-18) es otra citocina proinflamatoria que es producida por macrófagos activados y que en combinación con IL-12 induce IFN- γ ; pero que de manera individual no puede hacerlo.¹¹⁶⁻¹¹⁷

Los ratones resistentes IL-18^{-/-} infectados con *L. major* producen una cantidad significativamente menor de IFN- γ , disminuyen su producción de NO e incrementan su respuesta inmune Th2.¹¹⁸⁻¹²⁰ Sin embargo, llama la atención que tiempo después estos ratones son capaces de resolver sus lesiones y de inducir una respuesta Th1 eficiente.¹¹⁹⁻¹²⁰ Por otro lado, cuando los ratones resistentes infectados con *L. major* son tratados con anticuerpos α -IL-18 se exagera la infección, asociada con una disminución de NO; sin embargo, este

efecto no es persistente y los ratones no pierden la capacidad de producir IFN- γ .¹¹⁹

Con base en los reportes anteriores, se puede suponer que ante la falta de IL-18 (IL-18^{-/-} o α -IL-18) un tiempo después los ratones resistentes pueden seguir secretando IFN- γ y montar una respuesta Th1, probablemente por secreción IL-12. Entonces, la IL-18 no es suficiente para inducir una respuesta temprana Th1 y no es necesaria en ratones que pueden producir IL-12 de manera natural.¹²⁰

Sin embargo, la administración de una u otra citocina (IL-12 o IL-18) en animales susceptibles BALB/c infectados con *L. major* no induce su curación; mientras que si se administran las dos citocinas en combinación, se puede inducir una respuesta Th1 y una inmunidad adquirida protectora.^{119,121}

Por otro lado, se ha encontrado que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y los monocitos de donadores sanos, producen más IL-18 durante la infección con *L. donovani* que con *L. major*.⁸³ Adicionalmente, los niveles plasmáticos de IL-18 son marcadamente más elevados en pacientes sintomáticos con leishmaniasis visceral (LV) que pacientes con malaria o controles sanos.¹¹¹

En otras infecciones por protozoarios, se ha encontrado que ratones IL-12 (-/-) infectados con *T. gondii* muestran una cantidad de parásitos significativamente mayor que los ratones IL-18 (-/-) y el tratamiento con IL-12 o IL-18 después de la infección previene el desarrollo de lesiones mayores.¹²² Adicionalmente, en modelos murinos infectados con *Mycobacterium leprae* las interleucinas IL-12 e IL-18 también actúan de manera sinérgica e inducen la producción de NO por células peritoneales; el NO es dependiente de la producción de IFN- γ por células NK y células T.¹²³ es decir, tanto por células de la inmunidad innata como de la adaptativa. Reportes recientes sugieren que las células NK secretan IFN- γ que estimula la producción de IL-15 e IL-18 de monocitos, lo cual favorece la producción de IFN- γ por monocitos infectados con *M. tuberculosis*.¹²⁴

En la enfermedad de Chagas se ha demostrado que los ratones IL-12p35^{-/-} pueden producir IFN- γ por inducción de IL-18 detectada dos semanas después

de la infección. Esta es una evidencia de la producción de IFN- γ independiente de IL-12, pero dependiente de IL-18 y células T.¹²⁵

3.9.2.2.9. Interleucina 15 (IL-15)

En la actualidad la interleucina 15 (IL-15) es considerada como un puente de unión entre el sistema inmune innato y adaptativo a través de la regulación autocrina de citocinas proinflamatorias secretadas por el macrófago.¹²⁶ Esta interleucina comparte funciones con IL-2 y tiene un importante efecto quimiotáctico para células T, particularmente células T de memoria, también induce la proliferación de células CD4+ y CD8+ y su diferenciación preferencial a Th1 y Tc1, respectivamente; la diferenciación de NK precursoras a células NK CD56^{bright}, que es una subpoblación de células NK más eficiente en la producción de citocinas y expresión de receptores¹²⁷; así como la regulación de la secreción de IL-12 por células dendríticas¹²⁸, la estimulación potente y selectiva de células TCD8+ T con fenotipo de memoria¹²⁹ y además actúa junto con IL-12 como coestimuladora de la producción de IFN- γ y TNF- α por células NK en el control de infecciones por microorganismos intracelulares.¹³⁰

Existen evidencias que indican que algunos patógenos intracelulares son capaces de inducir *in vitro* la secreción de IL-15 por monocitos y macrófagos⁴¹ y que esta citocina puede ejercer un efecto protector. Por ejemplo, la administración previa de IL-15 a ratones que posteriormente son infectados con *Plasmodium falciparum*, les permite controlar la infección.¹³¹ Adicionalmente, los ratones deficientes en IL-15 (IL-15^{-/-}) infectados con *Plasmodium*, producen bajas cantidades de citocinas Th1 y la actividad de células NK y dendríticas se encuentra inhibida.¹³²

La administración de anticuerpos α -IL-15 a ratones resistentes infectados con *T. gondii* provoca que sean incapaces de controlar la letalidad de la infección. Asimismo, la administración del receptor soluble para IL-15 (sIL-15R α) con la finalidad de bloquear la acción de la IL-15 endógena, reduce marcadamente la actividad citotóxica de CD8+ y su capacidad de producir IFN- γ .¹³³

Mycobacterium leprae, y otras especies de micobacterias, también inducen la secreción de IL-15¹³⁴, En pacientes con lepra existen diferencias de acuerdo a la severidad del cuadro clínico, encontrándose que pacientes con lepra tuberculoide (forma benigna) producen cantidades mayores de IL-15, que los pacientes con lepra lepromatosa (forma severa).¹³⁵

En la leishmaniasis, IL-15 puede activar macrófagos infectados con *L. infantum* e inducir la destrucción del parásito directamente o indirectamente a través de la secreción de IL-12. Esta actividad leishmanicida se ha equiparado con la inducida por IFN- γ .¹³⁶

Sin embargo, en el caso de los pacientes con leishmaniasis visceral, que es una forma maligna de la enfermedad, se han encontrado niveles elevados de IL-15 tanto en plasma²⁶ como en células mononucleares de sangre.¹³⁷ Estos mismos autores han realizado experimentos de neutralización con anticuerpos monoclonales, así como la administración de IL-15 recombinante, para proponer que la producción endógena de IL-15 en pacientes con LV aguda no es suficiente para la producción de IFN- γ e IL-12.¹³⁷

3.9.3. Moléculas coestimuladoras

3.9.3.1. CD40

Durante la presentación de antígenos las moléculas MHC clase II por si solas, no son suficientes para estimular una respuesta de células T, también es un requisito la presencia de moléculas coestimuladoras como CD40 y B7-1/B7-2 en la superficie del macrófago y de CD28 y CD40L en la célula T.⁶¹ Particularmente, la interacción de CD40 de macrófagos o células dendríticas con CD40L en células T, es un potente estímulo para la producción de IL-12 y representa un mecanismo inmunoregulatorio en el desarrollo de la resistencia a la leishmaniasis.^{138,139}

La importancia de esta molécula coestimuladora se ha demostrado estudiando ratones con fenotipo resistente CD40 -/- y CD40L-/-, los cuales producen una

cantidad significativamente menor de IFN- γ e IL-12 y disminuyen su capacidad para activar macrófagos y matar al parásito.¹⁴⁰⁻¹⁴³ De la misma manera, la progresión de la enfermedad en ratones susceptibles BALB/c y en la leishmaniasis visceral ha sido asociada con una disminución en la síntesis de IL-12 dependiente de CD40.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

Sin embargo, existen reportes controversiales que sugieren que CD40 puede ser una molécula coestimuladora tanto para una respuesta Th1 como para una respuesta Th2¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ y que uno u otro tipo de respuesta depende de vías de señalización diferentes: la producción de IL-12 es dependiente de p38MAPK y la de IL-10 es dependiente de ERK-1/2.¹⁵⁰⁻¹⁵¹

Otros autores han demostrado que en macrófagos humanos al igual que en murinos, la expresión de CD40 no se altera cuando los macrófagos se infectan con *L. major*, pero que bloqueando la interacción CD40-CD40L se inhibe la producción de IFN- γ e IL-12. Adicionalmente ellos reportaron que cocultivando estos macrófagos con leucocitos de sangre periférica, sorpresivamente se incrementa la expresión de CD40 sugiriendo que para la expresión de CD40 es necesaria una retroalimentación entre el macrófago y las células efectoras.¹⁴⁹

Llama la atención que las células mononucleares de sangre periférica producen igual cantidad de IFN- γ cuando son estimuladas con antígeno de *Leishmania* únicamente, que cuando son estimuladas y además se bloquea CD40.¹⁵²

En otros patógenos intracelulares se ha demostrado que las células presentadoras de antígeno (CPA) infectadas con *T. gondii* pueden aumentar la expresión de CD40 y que la interacción de CD40-CD40L con PMBC de humanos puede estimular la óptima producción de IL-12 e IFN- γ .¹⁵³⁻¹⁵⁴

Las diferencias observadas en la expresión de CD40 y en la interacción CD40-CD40L para la producción de citocinas Th1 en *Leishmania* y en otros diferentes patógenos, ha dirigido investigaciones que proponen la existencia de mecanismos independientes de CD40 para la producción de IL-12 o IFN- γ .¹⁵⁵⁻

Estudios dirigidos a correlacionar la expresión de CD40 con la severidad del cuadro clínico en lepra, sugieren que la sobreexpresión de CD40L puede inducir IL-12 dependiente de CD40 en monocitos de pacientes con lepra tuberculoide (benigna) pero no en pacientes con lepra lepromatosa, que es la forma más severa de la enfermedad.¹⁵⁷

3.9.3.2. B7-1 Y B7-2

Las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) tienen un papel crítico en la activación de células T CD4⁺ *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, durante muchos años se ha tratado de relacionar su importancia en la resistencia y susceptibilidad a varias infecciones, se ha descrito que señalan un papel preferencial de las moléculas en la diferenciación al fenotipo Th1 o Th2.¹⁵⁸ Por un lado existen reportes en los que se demuestra que *Leishmania* puede inhibir la expresión de B7-1 y B7-2 dependiendo del fenotipo del animal infectado: por ejemplo, en animales susceptibles *Leishmania* puede inhibir la expresión de B7-1 y en animales resistentes el parásito puede inhibir la expresión de B7-2.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Estos datos sugieren que B7-1 puede estar asociada con la resistencia y B7-2 con la susceptibilidad. De la misma manera, otros estudios sugieren que la molécula B7-2 es crítica para la diferenciación de células T al fenotipo Th2 en cepas de animales susceptibles a la infección por *Leishmania*.¹⁶¹⁻¹⁶⁴

Contrariamente a estos reportes, otros autores proponen que no existe una asociación en la expresión de B7-1 o B7-2 con la resistencia o susceptibilidad a la infección; sino que B7-2 es la molécula coestimuladora dominante tanto en la respuesta inmune de ratones susceptibles como de ratones resistentes que han sido infectados con *Leishmania*.¹⁶⁵

Por otro lado, estudiando células fagocíticas de individuos sanos, se ha encontrado que los monocitos y macrófagos infectados con *L. major* o *L. chagasi* no presentan cambios en la expresión de estas moléculas coestimuladoras, contrariamente a lo que ocurre en modelos animales.^{149,166-}

167

Al estudiar otras infecciones intracelulares como la enfermedad de Chagas, se ha reportado que *T. cruzi* es capaz de inducir una rápida expresión de B7-1 y una inhibición de B7-2 en monocitos humanos ¹²⁵ ; mientras que *M. tuberculosis* no induce la expresión de B7-1 y sólo expresa B7-2 parcialmente.¹⁶⁸

Al parecer la expresión de estas moléculas coestimuladoras, se comporta de manera diferente en modelos animales, ya que al bloquear tanto B7-1 como B7-2 en ratones resistentes infectados con *T. cruzi*, se exagera la infección y falla la producción de IFN- γ ¹⁶⁹, sugiriendo que no hay una expresión diferencial asociada con la resistencia o la susceptibilidad.

Por otro lado, la inhibición de B7-2 en monocitos y células dendríticas de pacientes con lepra tuberculoide y lepra lepromatosa reducen su respuesta inmune específica contra *M. leprae*, independientemente de la severidad clínica de la enfermedad.¹⁷⁰

El papel específico de B7-1 y B7-2 en la leishmaniasis humana no es claro, pero se ha demostrado que la interacción B7-CD28 es importante en la producción de citocinas Th1 por células mononucleares (PBMC) de pacientes con la forma cutánea de la enfermedad.¹⁵²

Debido a que en la actualidad existen pocas evidencias de la importancia que tienen las citocinas de la inmunidad innata en la generación de una respuesta protectora en la leishmaniasis humana y que además, no ha sido claro el papel que desempeñan las moléculas coestimuladoras en el curso clínico de la enfermedad, se realizó el siguiente trabajo para comparar la secreción de las citocinas TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-15 y la expresión de CD40, B7-1 y B7-2 por macrófagos de pacientes con una forma clínica benigna (LCL) y una forma severa de la leishmaniasis cutánea (LCD) y así determinar si las alteraciones a nivel de estas citocinas y moléculas pudieran estar condicionando la severidad del cuadro clínico. Dado lo anterior se plantea la siguiente hipótesis: los monocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada producen más TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-18 y expresan más CD40, B7-1 y B7-2 que pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada, cuando se estimulan con el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*.

4. METODOLOGÍA

4.1. Selección de pacientes y controles sanos

Los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) se seleccionaron de comunidades rurales del Estado de Tabasco, de acuerdo a los criterios de clasificación propuestos por la OMS: lesiones activas, con impronta e Intradermorreacción de Montenegro (leishmanina) positivas y curación clínica después de tratamiento convencional con antimoniales (Glucantime). Los pacientes con LCD fueron seleccionados utilizando también los criterios de la OMS: lesiones nodulares múltiples, con impronta positiva con abundantes parásitos, Intradermorreacción de Montenegro negativa y sin respuesta al tratamiento con antimoniales pentavalentes (Glucantime). Posteriormente los pacientes con LCD fueron clasificados de acuerdo a su severidad clínica: número de lesiones, tiempo de evolución y estado general. A los pacientes con LCL se les dio seguimiento para confirmar su curación con Glucantime. Tanto a los pacientes con LCL como con LCD se les aplicó una encuesta con el fin de recabar datos clínicos y epidemiológicos que confirmaran su diagnóstico y para dar cumplimiento con los criterios de clasificación anteriormente mencionados; asimismo se les informó sobre la naturaleza de su enfermedad y la intención del proyecto de investigación, así como los riesgos y beneficios del procedimiento para la obtención de muestras (*Consentimiento informado*). Paralelamente, las cepas aisladas de los pacientes fueron tipificadas como *Leishmania mexicana*. Las muestras de sangre de los controles sanos fueron seleccionadas en un área urbana y no endémica de leishmaniasis, a través de un banco de sangre de la Ciudad de México.

Número de individuos estudiados:

Controles sanos = 30
Pacientes con LCL = 20
Pacientes con LCD = 5

4.2. Antígeno de *Leishmania*

El lipofosfoglicano (LPG) obtuvo a partir de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* cultivados en un medio bifásico con base de agar sangre

(NNN) y medio *Drosophila* Schneider suplementado con suero fetal bovino inactivado al 10% a 28°C por 3-4 días. La metacilcogénesis fue determinada incubando $2-5 \times 10^8$ promastigotes con 100 µg/100 ml de PNA por una hora a 25 °C y centrifugando a 150 x g por 5 minutos. Los parásitos obtenidos fueron tratados con una solución de cloroformo-metanol-agua (1:2:05 v/v) por dos horas a temperatura ambiente. El material insoluble fue tratado con 1-butanol al 9% y el sobrenadante fue liofilizado. El LPG fue purificado por cromatografía (HPLC) usando un gradiente de 1-propanol (5-60%) en acetato de amonio 0.1 M. El LPG fue analizado para determinar la presencia de endotoxinas, lipolisacárido (LPS) y proteínas contaminantes. En el presente trabajo el LPG se utilizó a una concentración final de 10 µg/ml.

4.3. Cultivo de monocitos

Los monocitos de individuos sanos, pacientes LCL y LCD se obtuvieron a partir de 25 ml de sangre periférica.

Primero se separaron las células mononucleares por gradiente de densidad con Ficoll Hypaque y después se purificaron los monocitos por adherencia en placa: Las muestras de sangre se diluyeron 1:3 con PBS estéril pH 7.4 y se colocaron 7 ml de sangre diluída sobre 3 ml de Ficoll Hypaque $\delta=1.007$ (Sigma Diagnostics, Inc) y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min a 20°C. Se aspiraron las células de la interfase y se lavaron 2 veces con 30 ml de PBS estéril pH 7.2 a 1200 rpm durante 10 min a 4°C. Los botones se resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo celular RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino (SFB). El recuento de células se realizó con una cámara Neubauer y se analizó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul tripano.

El número de células por mililitro se calculó de la siguiente manera:

Células/ml = Núm. de células X factor de dilución X 10 000 X volumen

Las células mononucleares se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 y se depositaron 1×10^6 células por caja. Estas se incubaron a 37°C con 5%CO₂ por 24 horas.

Los monocitos adheridos se despegaron con EDTA 5mM y lavados dos veces con PBS estéril a 1200 rpm por 10 min a 4°C. El recuento de monocitos se realizó en Cámara de Neubauer y se analizó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul tripano. La pureza de la población fue evaluada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD14 (Becton Dickinson).

La concentración de monocitos se ajustó a 1×10^6 /ml con medio de RPMI 1640 y se depositó un mililitro por pozo en una placa de cultivo de 24 pozos (Costar Corning, NY), de acuerdo a las siguientes condiciones:

Monocitos sin estimular (estado basal), monocitos con LPS a una concentración final de 100 ng/ml (control positivo) y monocitos con LPG a una concentración final de 10 µg/ml. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 18 horas.

Posteriormente se recuperó el sobrenadante para la determinación de TNF-α, IL-12, IL-18 e IL-15 y los monocitos se cosecharon y se lavaron con PBS pH 7.2 con azida de sodio al 1 % a 2000 rpm por 5 min a temperatura ambiente, para medir la expresión de CD40, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) por citometría de flujo.

4.4. Determinación de citocinas por la técnica de ELISA.

Se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos de monocitos después de 18 horas de incubación. Los niveles de TNF-α, IL-12, IL-18 e IL-15 se evaluaron por el método de ELISA.

Los anticuerpos de captura (BD Pharmigen, San José CA) se colocaron en una placa de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, NY) y la concentración se calculó de acuerdo a la citocina a determinar. La placa se lavó cuatro veces con PBS 1X/0.01 % Tween 80.

Posteriormente se agregó solución bloqueadora a cada pozo y se dejó 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces de la misma manera.

A cada pozo se agregaron 100 µl de las diferentes concentraciones de las citocinas (curva estándar) y de los sobrenadantes de monocitos de controles

sanos, de pacientes LCL o de pacientes LCD, que se obtuvieron en las siguientes condiciones:

Sobrenadante de monocitos sin estimular: Control negativo

Sobrenadante de monocitos estimulados con LPS (100 ng/ml): Control positivo

Sobrenadante de monocitos estimulados con LPG (10 µg/ml): Lipofosfoglicano de *Leishmania*.

La placa se dejó 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C hasta el día siguiente y después se lavó cuatro veces.

Se agregaron 100 µl por pozo de cada anticuerpo de detección específico para cada citocina y se incubó una hora a temperatura ambiente y después la placa se lavó tres veces.

Se agregaron 100 µl por pozo de estreptavidina-fosfatasa alcalina (GIBCO BRL 19542-018) en una concentración de 1:2000 en albumina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20 y se incubó 30 min a temperatura ambiente; después se lavó la placa ocho veces.

Se agregaron 100 µl por pozo de la solución reveladora (p-nitrofenil fosfato (pNPP) y se dejó incubar de 30 a 120 min dependiendo de la citocina, a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Se utilizó un lector de ELISA para microplacas (BIO-TEK Instruments, MN) y el programa KC4 para obtener las concentraciones de citocinas en pg/ml.

4.5. Citometría de flujo

La expresión de CD40, CD80 y CD86 en la superficie de monocitos (CD14+) de controles sanos, pacientes con LCL y pacientes con LCD se analizó por duplicado después de 18 horas de incubación en las siguientes condiciones:

Monocitos sin estimular en medio de cultivo: Control negativo

Monocitos estimulados con LPS (100 ng/ml): Control positivo

Monocitos estimulados con LPG (10 µg/ml)

Después que los monocitos fueron incubados en estado basal, con LPS y LPG, fueron cosechados y lavados con PBS pH 7.2 con 0.1% de azida de sodio.

Los monocitos se resuspendieron en 200 μ l de PBS pH 7.2 con 0.1 % de azida de sodio y 2 % de suero fetal bovino; y se tiñeron en una proporción 1:4 con los con anticuerpos monoclonales α -CD14 humano conjugados con el fluorocromo ficoeritrina (PE) y con anticuerpos monoclonales específicos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC):

Anticuerpo monoclonal de ratón α -CD40 humano conjugado con FITC

Anticuerpo monoclonal de ratón α -CD80 humano conjugado con FITC

Anticuerpo monoclonal de ratón α -CD86 humano conjugado con FITC

(*BD Pharmingen, San José, CA*).

Después de agregar los anticuerpos las muestras se incubaron 30 min en hielo y en la oscuridad. Se lavaron con PBS pH 7.2 con 1 % de azida de sodio y fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 min a 2-8°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se fijaron con 500 μ l de paraformaldehído al 1% a una concentración de 1×10^6

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSsort con el Programa CellQuest (BD Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) y los resultados fueron obtenidos en porcentajes y la distribución de los monocitos en gráficas con los valores de CD14 (PE) en el eje Y y la molécula coestimuladora específica (FITC) en el eje X.

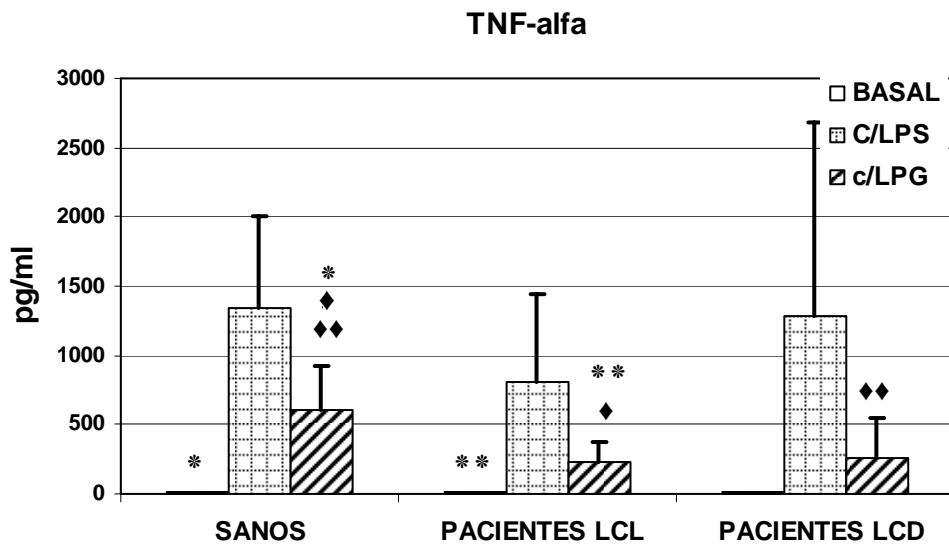
4.6. Pruebas estadísticas

Los resultados se analizaron para obtener la mediana por citocina (pg/ml) o molécula coestimuladora (%), por cada condición: basal, con LPS y con LPG. Se compararon los valores sin estímulo y con estímulo con LPG y los grupos entre sí: controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD. Para determinar si existían diferencias entre los valores se utilizó la U de Mann-Whitney considerando que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el valor $p < 0.05$. Los resultados fueron expresados en gráficas, utilizando la media y la desviación estándar

5. RESULTADOS

5.1. Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)

Los monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD no secretaron TNF- α en estado basal, pero cuando se estimularon con LPG los monocitos de sujetos sanos y pacientes LCL secretaron una cantidad significativamente mayor de esta citocina. El valor de TNF- α secretado por monocitos estimulados con LPG de pacientes con LCL y LCD fue significativamente menor ($p < 0.05$) que el de los controles sanos. (Fig. 7)



Diferencias estadísticamente significativas en la secreción de TNF- α : 1. Monocitos de sanos sin estímulo vs estimulados con LPG (*SANOS_{LPG} > SANOS_{BASAL}); 2. Monocitos de pacientes LCL sin estímulo vs estimulados con LPG (**LCL_{LPG} > LCL_{BASAL}); 3. Monocitos de sanos vs pacientes LCL, estimulados con LPG (♦SANOS_{LPG} > LCL_{LPG}); 4. Monocitos de sanos vs pacientes LCD, estimulados con LPG (♦♦SANOS_{LPG} > LCD_{LPG}). Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

TNF- α		BASAL	LPS	LPG
SANOS	MEDIA	14.0	1340.6	611.7
	DE	0	660.2	310.9
	MEDIANA	14.0	1350.0	545.0
LCL	MEDIA	14.0	806.7	233.6
	DE	0	635.7	138.4
	MEDIANA	14.0	560.0	210.0
LCD	MEDIA	14.0	1281.0	253.6
	DE	0	1408.1	300.8
	MEDIANA	14.0	1305.0	230.0

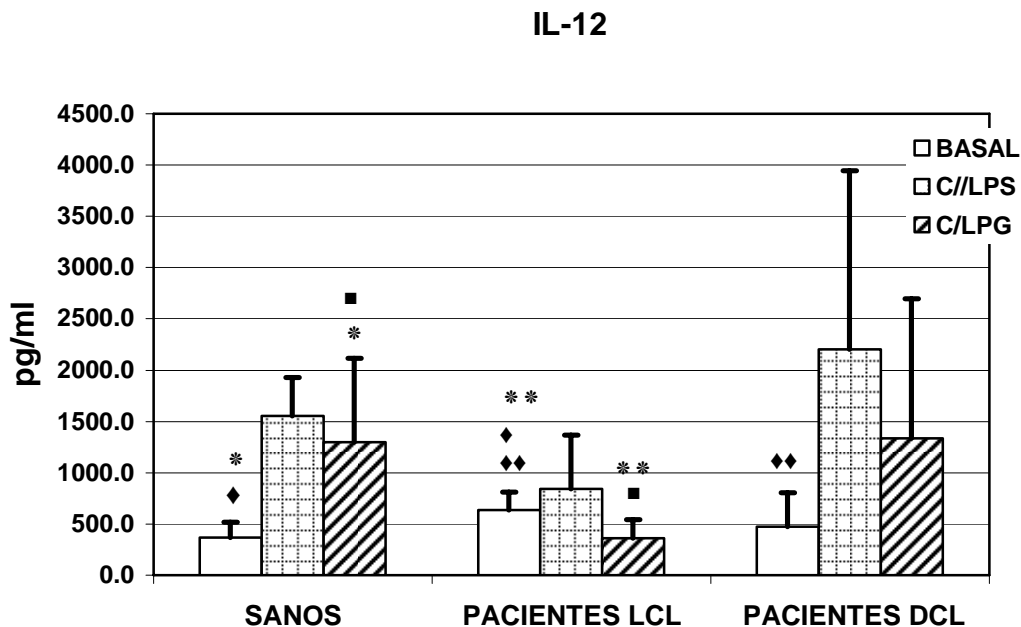
Figura 7. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de TNF- α secretado por monocitos de controles sanos, pacientes con LCL y pacientes con LCD, en estado basal y estimulados con lipopolisacárido (LPS) lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los valores de TNF- α entre ambos grupos de pacientes, al analizar los resultados de los pacientes LCD de manera individual se observó que los valores tienden a disminuir al aumentar la severidad clínica de los pacientes LCD:

LCD-1: 750 pg/ml	↓	Menor severidad clínica
LCD-2: 230 pg/ml		
LCD-3: 260 pg/ml		
LCD-4: 0 pg/ml		
LCD-5: 0 pg/ml		Mayor severidad clínica

5.2. Interleucina 12 (IL-12)

Los monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD secretaron IL-12 en estado basal, pero los pacientes LCL produjeron una cantidad significativamente mayor ($p < 0.05$) que los controles sanos y que los pacientes con LCD. Al ser estimulados con LPG, los monocitos de sujetos sanos incrementaron 3.5X su producción de esta citocina, mientras que pacientes LCL reducen de manera significativa (1.75X) su secreción de IL-12. (Fig. 8)



Diferencias estadísticamente significativas en la secreción de IL-12: 1. Monocitos de sanos sin estímulo vs estimulados con LPG (* $SANOS_{LPG} > SANOS_{BASAL}$); 2. Monocitos de pacientes LCL sin estímulo vs estimulados con LPG (** $LCL_{LPG} < LCL_{BASAL}$); 3. Monocitos de sanos vs pacientes LCL, sin estímulo (♦ $LCL_{BASAL} > SANOS_{BASAL}$); 4. Monocitos de pacientes LCL vs pacientes LCD, sin estímulo (♦♦ $LCL_{BASAL} > LCD_{BASAL}$); 5. Monocitos de sanos vs pacientes LCL, estimulados con LPG (■ $LCL_{LPG} < SANOS_{LPG}$). Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$)

<i>IL-12</i>		<i>BASAL</i>	<i>LPS</i>	<i>LPG</i>
SANOS	MEDIA	367.4	1551.3	1296.3
	DE	150.8	375.5	817.4
	MEDIANA	300.0	1450.0	895.0
LCL	MEDIA	638.0	844.3	365.0
	DE	175.5	521.1	176.7
	MEDIANA	565.0	700.0	340.0
LCD	MEDIA	477.0	2205.0	1333.0
	DE	327.7	1738.9	1363.0
	MEDIANA	460.0	2500.0	640.0

Figura 8. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de IL-12 secretada por monocitos de controles sanos, pacientes con LCL y pacientes con LCD, en estado basal y estimulados con lipopolisacárido (LPS) lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

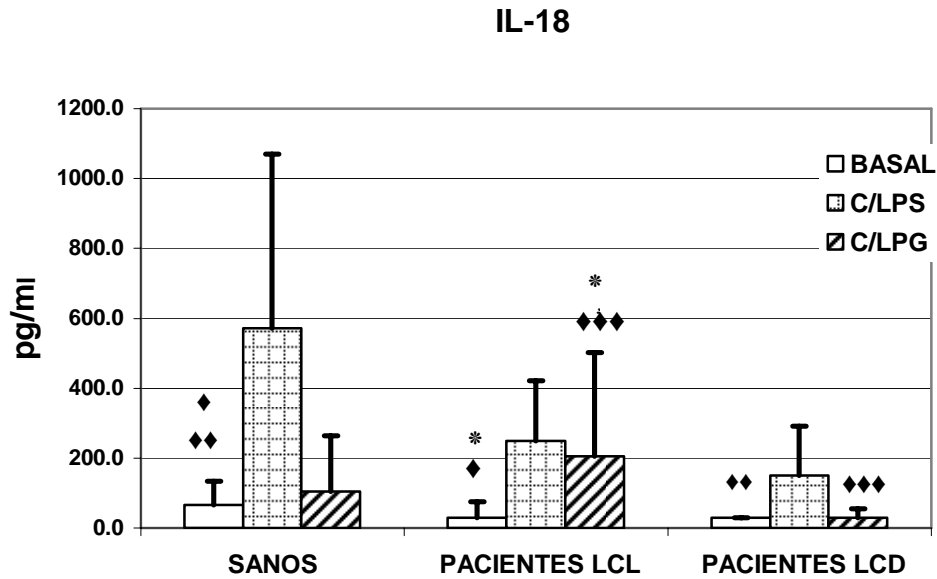
Al analizar de manera individual la secreción de citocinas por monocitos de los cinco pacientes con la forma severa de la enfermedad (LCD), se encontró que los valores de IL-12 tendían a disminuir cuando aumenta la severidad clínica:

LCD-1: 2200 pg/ml	↓	Menor severidad clínica
LCD-2: 3300 pg/ml		
LCD-3: 640 pg/ml		
LCD-4: 400 pg/ml		
LCD-5: 125 pg/ml		Mayor severidad clínica

Es decir, la producción de IL-12 es inversamente proporcional a la severidad clínica de los pacientes con LCD que fueron estudiados.

5.3. Interleucina 18 (IL-18)

En estado basal los monocitos de pacientes LCL y LCD no secretaron IL-18. Los monocitos de pacientes con LCL incrementaron significativamente su producción de IL-18 cuando fueron estimulados con LPG. A diferencia de esto, los monocitos de pacientes con LCD no respondieron al estímulo con LPG. (Fig. 9)



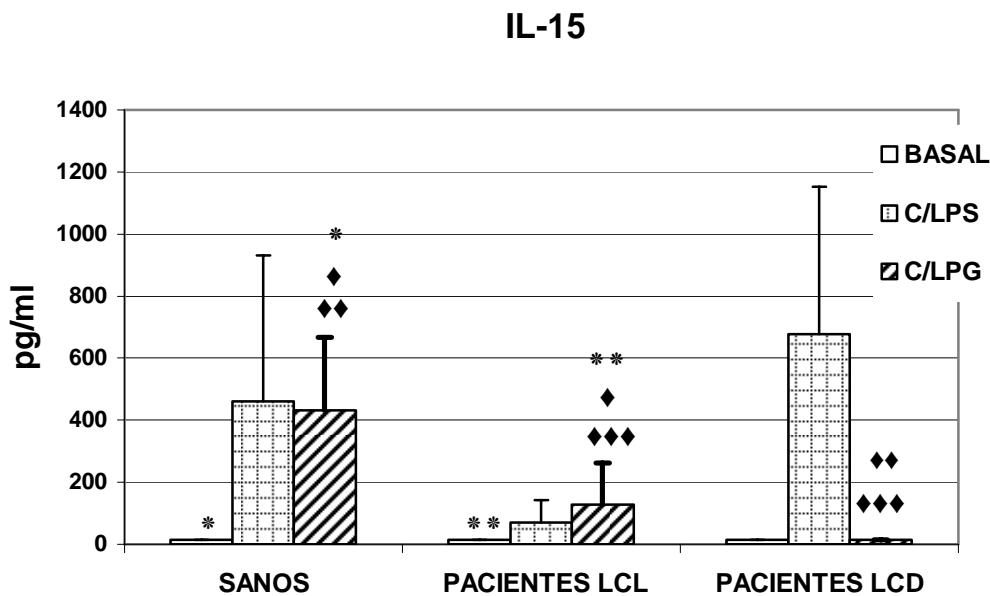
Diferencias estadísticamente significativas en la secreción de IL-18: 1. Monocitos de pacientes LCL sin estímulo vs estimulados con LPG (*LCL_{LPG} > LCL_{BASAL}); 2. Monocitos de sanos vs pacientes LCL, sin estímulo (♦ SANOS_{BASAL} > LCL_{BASAL}); 3. Monocitos de sanos vs pacientes LCD, sin estímulo (♦♦ SANOS_{BASAL} > LCD_{BASAL}); 4. Monocitos de pacientes con LCL vs pacientes con LCD, estimulados con LPG (♦♦♦ LCL_{LPG} > LCD_{LPG}). Prueba U de Mann-Whitney (p<0.05).

<i>IL-18</i>		<i>BASAL</i>	<i>LPS</i>	<i>LPG</i>
SANOS	<i>MEDIA</i>	65.5	572.0	104.4
	<i>DE</i>	67.7	497.7	158.8
	<i>MEDIANA</i>	30.0	300.0	30.0
LCL	<i>MEDIA</i>	30.0	250.0	205.2
	<i>DE</i>	0	171.1	296.8
	<i>MEDIANA</i>	30.0	250.0	120.0
LCD	<i>MEDIA</i>	30.0	150.2	30.0
	<i>DE</i>	0	140.2	0
	<i>MEDIANA</i>	30.0	120.0	30.0

Figura 9. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de IL-18 secretada por monocitos de controles sanos, pacientes con LCL y pacientes con LCD, en estado basal y estimulados con lipopolisacárido (LPS) lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

5.4. Interleucina 15 (IL-15)

Los monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD no secretaron IL-15 en estado basal, pero cuando los controles sanos y los pacientes con LCL se estimularon con LPG éstos incrementaron su producción de manera significativa ($p < 0.05$). El incremento fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en los controles sanos que en los pacientes LCL; sin embargo los monocitos de pacientes con LCD tampoco secretaron IL-15 al ser estimulados con LPG. (Fig. 10). Resumiendo encontramos que el estímulo con LPG indujo un mayor incremento en la producción de IL-15 en sujetos sanos, siendo menor en pacientes LCL y sin respuesta en pacientes LCD.



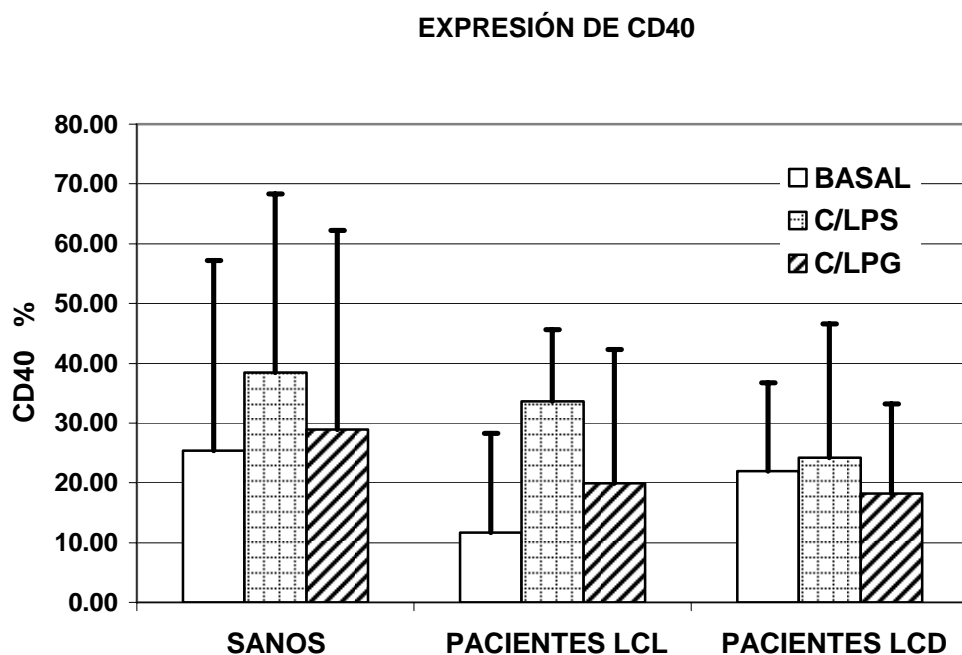
Diferencias estadísticamente significativas en la secreción de IL-15: 1. Monocitos de sanos sin estímulo vs estimulados con LPG ($*\text{SANOS}_{\text{LPG}} > \text{SANOS}_{\text{BASAL}}$); 2. Monocitos de pacientes LCL sin estímulo vs estimulados con LPG ($**\text{LCL}_{\text{LPG}} > \text{LCL}_{\text{BASAL}}$); 3. Monocitos de sanos vs pacientes LCL, estimulados con LPG ($\blacklozenge\text{SANOS}_{\text{LPG}} > \text{LCL}_{\text{LPG}}$); 4. Monocitos de sanos vs pacientes LCD, estimulados con LPG ($\blacklozenge\text{SANOS}_{\text{LPG}} > \text{LCD}_{\text{LPG}}$); 5. Monocitos de pacientes LCL vs LCD estimulados con LPG ($\blacklozenge\text{LCL}_{\text{LPG}} > \text{LCD}_{\text{LPG}}$). Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

IL-15		BASAL	LPS	LPG
SANOS	MEDIA	14.0	460.0	431.9
	DE	0	472.2	235.4
	MEDIANA	14.0	260.0	41.00
LCL	MEDIA	14.0	71.2	127.8
	DE	0	71.4	133.8
	MEDIANA	14.0	52.0	85.0
LCD	MEDIA	14.0	677.4	14.0
	DE	0	475.3	0
	MEDIANA	14.0	800.0	14.0

Figura 10. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de IL-15 secretada por monocitos de controles sanos, pacientes con LCL y pacientes con LCD, en estado basal y estimulados con lipopolisacárido (LPS) lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

5.5. Expresión de CD40

Los monocitos en estado de basal de todos los grupos expresan CD40, pero no se detectaron diferencias significativas entre ellos. Asimismo, cuando se estimularon con LPG, no se obtuvieron diferencias en la respuesta de esta molécula coestimuladora entre los 3 grupos de individuos estudiados. (Fig. 11)



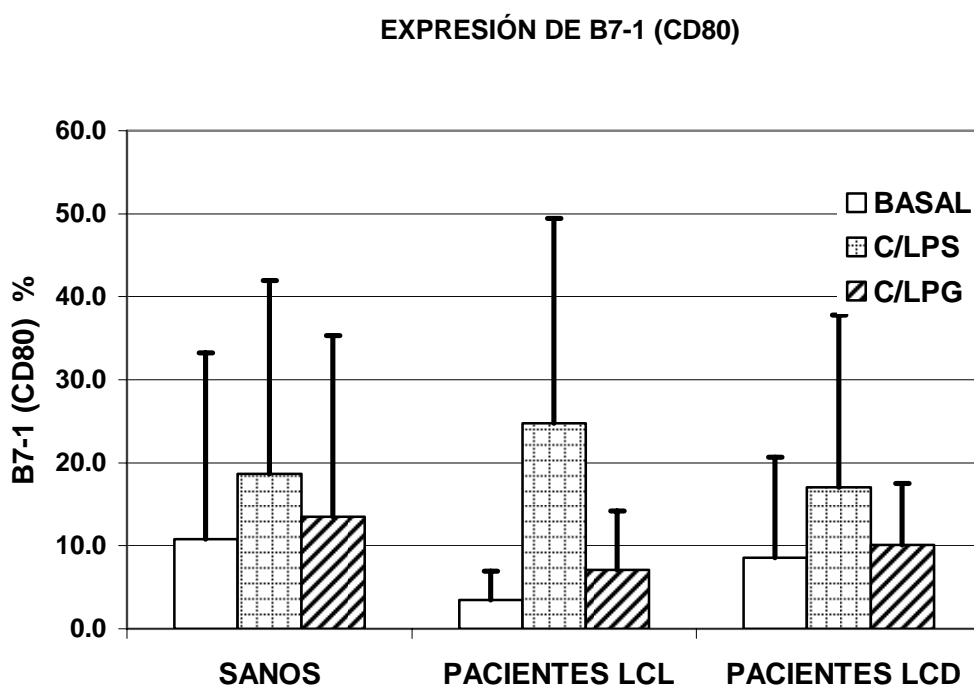
No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

<i>CD40</i>		<i>BASAL</i>	<i>LPS</i>	<i>LPG</i>
<i>SANOS</i>	<i>MEDIA</i>	25.34	38.40	28.90
	<i>DE</i>	31.9	29.9	33.35
	MEDIANA	11.1	37.4	20.45
<i>LCL</i>	<i>MEDIA</i>	11.70	33.70	19.90
	<i>DE</i>	16.6	12.0	22.4
	MEDIANA	4.9	33.0	14.65
<i>LCD</i>	<i>MEDIA</i>	21.98	24.17	18.18
	<i>DE</i>	17.0	21.07	17.27
	MEDIANA	22.25	15.4	15.1

Figura 11. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de la expresión de la molécula CD40 en monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD, en estado basal, estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

5.6. Expresión de B7-1 (CD80)

Los monocitos en estado de basal de todos los grupos expresaron B7-1, sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Asimismo, cuando se estimularon con LPG, no se observaron diferencias en la respuesta de esta molécula coestimuladora entre los 3 grupos de individuos estudiados. (Fig. 12)



No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

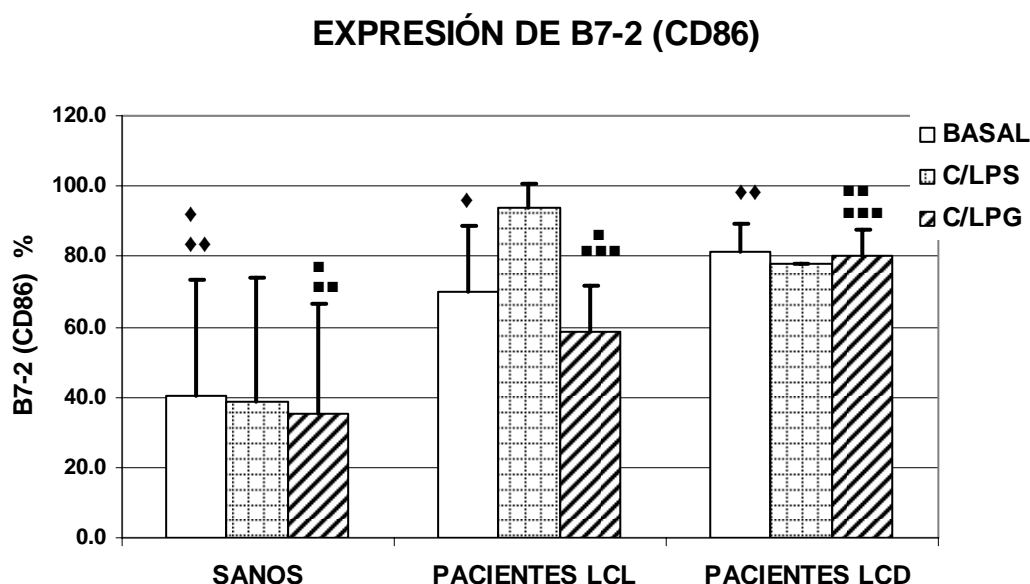
<i>B7-1</i>		<i>BASAL</i>	<i>LPS</i>	<i>LPG</i>
SANOS	<i>MEDIA</i>	10.8	18.7	13.5
	<i>DE</i>	22.4	23.3	21.8
	<i>MEDIANA</i>	1.3	3.4	8.5
LCL	<i>MEDIA</i>	3.5	24.7	7.1
	<i>DE</i>	3.7	16.6	8.0
	<i>MEDIANA</i>	2.25	30.85	5.0
LCD	<i>MEDIA</i>	8.6	17.1	10.2
	<i>DE</i>	14.0	20.72	8.6
	<i>MEDIANA</i>	2.05	17.05	7.95

Figura 12. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de la expresión de la molécula B7-1 en monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD, en estado basal, estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

5.7. Expresión de B7-2 (CD86)

En estado basal los monocitos de los controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD expresaron B7-2; pero las células de los pacientes con LCL y LCD mostraron niveles más elevados de B7-2 que los controles sanos. Cuando se comparó la expresión de B7-2 en monocitos estimulados con LPG, se observó que la expresión en pacientes LCD fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que los pacientes LCL y que los controles sanos. A su vez, la expresión de B7-2 por pacientes LCL también fue significativamente mayor que los controles sanos. (Fig. 13) Es posible observar un espectro de expresión de B7-2 en monocitos estimulados con LPG, cuando se comparan las medianas de sus valores:

Pacientes LCD (79.95) > pacientes LCL (59.8) > sanos (26.05)



Diferencias estadísticamente significativas en la expresión de B7-2: 1. Monocitos de sanos vs pacientes con LCL, sin estímulo (\blacklozenge $LCL_{BASAL} > SANOS_{BASAL}$); 2. Monocitos de sanos vs pacientes con LCD, sin estímulo ($\blacklozenge\blacklozenge$ $LCD_{BASAL} > SANOS_{BASAL}$); 3. Monocitos de sanos vs pacientes con LCL, estimulados con LPG (\blacksquare $LCL_{LPG} > SANOS_{LPG}$); 4. Monocitos de sanos vs pacientes con LCD, estimulados con LPG ($\blacksquare\blacksquare$ $LCD_{LPG} > SANOS_{LPG}$); 5. Monocitos de pacientes con LCL vs pacientes con LCD, estimulados con LPG ($\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ $LCD_{LPG} > LCL_{LPG}$). Prueba U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

B7-2		BASAL	LPS	LPG
SANOS	MEDIA	40.3	38.6	35.2
	DE	32.8	35.6	31.2
	MEDIANA	24.4	22.7	26.05
LCL	MEDIA	69.7	93.7	58.5
	DE	19.0	7.2	13.3
	MEDIANA	69.0	97.6	59.8
LCD	MEDIA	81.25	77.75	80.15
	DE	7.85	0.07	6.01
	MEDIANA	81.95	77.75	79.95

Figura 13. Valores promedio, desviación estándar (DE) y mediana de la expresión de la molécula B7-2 en monocitos de controles sanos, pacientes LCL y pacientes LCD, en estado basal, estimulados con lipopolisacárido (LPS) y estimulados con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana* por 18 horas.

6. DISCUSIÓN

6.1 Citocinas TNF- α , IL-12, IL-18 e IL-15

En los modelos murinos la producción de TNF- α se ha asociado con la resolución de la enfermedad⁷²⁻⁷⁸, pero en humanos los reportes son controversiales, ya que los pacientes con LCD tienen niveles séricos más elevados que los pacientes con LCL, sugiriendo que el daño tisular puede deberse a TNF- α .⁷⁹⁻⁸⁰ Estos datos contradicen un reporte en el cual se describe que en tejido de la mayoría de los pacientes LCL tienen mRNA de TNF- α mientras que hay muy pocos pacientes LCD que presentan esta citocina en tejido.⁶⁹

Nosotros encontramos que no existen diferencias en la producción de TNF- α por monocitos entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, cuando los pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada se analizaron de manera individual se observó que los niveles de esta citocina disminuyen al aumentar la severidad clínica. Esta disminución progresiva de la producción de TNF- α posiblemente lleva a una falta de activación del macrófago, permitiendo la sobrevivencia del parásito intracelular y su diseminación incontrolada.

A pesar de que se ha demostrado ampliamente en modelos murinos que IL-12 es muy importante para la resolución de la enfermedad⁹¹⁻⁹⁷, los promastigotes de *L. major* pueden inhibir selectivamente *in vitro* e *in vivo* la producción de IL-12, tanto en ratones como en humanos.^{98, 101,109}

Esa inhibición es más marcada en especies del Nuevo Mundo, como *L. amazonensis*. Tanto *L. mexicana* como *L. amazonensis* que pueden producir lesiones que no curan en ratones considerados como resistentes cuando se infectan con *L. major*. Adicionalmente, los ratones infectados con *L. mexicana* como *L. amazonensis* no responden al tratamiento con IL-12^{96,102-107}, contrario a lo que ocurre en ratones susceptibles BALB/c infectados con *L. major*, que si responden a IL-12. Sorprendentemente, las células infectadas *in vitro* con *L. mexicana*, si responden a la IL-12 produciendo IFN- γ .¹⁰⁸ Estos reportes sugieren diferencias entre cepas de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo y

que, dependiendo de la cepa de ratón, puede generar una deficiencia para producir IL-12 más que una incapacidad para responder a ésta.

Nuestros resultados muestran que los monocitos provenientes de sujetos sanos cuando se estimulan con LPG de *L. mexicana* incrementan su producción de IL-12, lo que contrasta con los niveles bajos descritos para monocitos de sujetos sanos infectados con *L. major*.¹⁰⁹ Sin embargo, los monocitos de pacientes con LCL estimulados con LPG de *L. mexicana* se comportan de la misma manera que los monocitos de pacientes con LCL estimulados con *L. major*, ya que ambos presentaron una inhibición significativa de IL-12.

Aunque los niveles de IL-12 secretados por monocitos estimulados con LPG son similares entre pacientes LCD y LCL; al analizar los valores de manera individual, encontramos que los niveles de IL-12 disminuyen conforme aumenta la severidad clínica de los pacientes con LCD. Esto permite suponer que podría haber un espectro de susceptibilidad de manera análoga a lo observado en ratones infectados con especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo.

Una de las citocinas que actúa en combinación con IL-12 es IL-18, ya que en modelos murinos se ha demostrado que se requieren ambas citocinas para la resolución de la infección; sugiriéndose que IL-12 está involucrada en la curación de animales resistentes y que IL-18 por sí sola no es suficiente para inducir una respuesta Th1. Interesantemente, ante la falta de IL-18, los ratones resistentes son capaces de producir IL-12 tiempo después y curar. A diferencia de esto, los ratones susceptibles requieren de IL-18 en combinación con IL-12 para inducir una respuesta Th1 y curar.¹¹⁶⁻¹²¹

Con relación a estos reportes, nosotros encontramos un aumento significativo en la producción de IL-18 en pacientes con LCL, mayor incluso que en los sujetos sanos, lo que nos permite sugerir que la IL-18 puede ser muy importante en la resolución de la forma benigna de la enfermedad a como ocurre en los animales resistentes.

A diferencia de los pacientes LCL, los pacientes con la forma severa de la enfermedad o LCD no secretaron IL-18 cuando se estimularon con LPG.

Sin embargo, pese a que éstos pacientes no secretaron IL-18 algunos de ellos (con menor severidad clínica) secretaron grandes cantidades de IL-12, la cual – por si sola- parece no ser suficiente para la curación. De esta manera, los pacientes con LCD se estarían comportando de manera análoga a los ratones susceptibles infectados con *Leishmania mexicana* que necesitan tanto IL-12 como IL-18 para curar.

En los últimos años se ha reconocido la importancia de la IL-15 en la inducción de una respuesta inmune Th1 contra patógenos intracelulares, incluyendo a la leishmaniasis.¹³¹⁻¹³⁷ Se ha demostrado *in Vitro* que la IL-15 puede activar macrófagos infectados con *L. infantum* de la misma manera que el IFN- γ e inducir la producción de IL-12.¹³⁶

Nuestros resultados muestran que los monocitos de pacientes con LCL incrementan su producción de IL-15 cuando se estimularon con LPG. A diferencia de esto, pacientes con LCD presentan una ausencia de producción de IL-15 por sus monocitos. La falta de producción de IL-15 en pacientes LCD arroja una nueva luz sobre la importancia de esta citocina en el control de la leishmaniasis.

6.2 Moléculas coestimuladoras CD40, B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86)

En la presentación de antígenos para una respuesta tipo Th1 es indispensable la expresión de las moléculas del MHC clase II y de las moléculas coestimuladoras CD40, B7-1 y B7-2, en la superficie del macrófago y estas moléculas deben unirse a ligandos presentes en la célula T.³¹

La importancia de CD40 en una respuesta protectora a la infección por *Leishmania* se ha asociado con la producción de IFN- γ e IL-12.¹⁴⁰⁻¹⁴³ La susceptibilidad se ha relacionado con una deficiente producción de IL-12 dependiente de CD40.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Pero también se ha propuesto que CD40 puede modular tanto una respuesta Th1 como una Th2, dependiendo de la vía de señalización.¹⁴⁷⁻¹⁵¹

Se ha reportado que individuos sanos expresan poco CD40 en estado basal (4%), la cual no se altera cuando los monocitos son infectados con *L. major*.¹⁴⁹ Este antecedente concuerda con nuestros hallazgos, ya que encontramos que el valor basal no se modificó cuando el monocito es estimulado con LPG. Asimismo, tampoco encontramos un cambio en la expresión de CD40 en pacientes LCL y LCD aun cuando fueron estimulados con LPG de *L. mexicana*. El papel de esta molécula coestimuladora posiblemente sea secundario ya que se ha reportado que al bloquear CD40 hay una dramática reducción de IL-12 en monocitos de individuos sanos;¹⁴⁹ pero en pacientes con leishmaniasis cutánea no se altera la producción de IFN- γ al bloquear esta molécula coestimuladora.¹⁵²

A pesar de que se ha demostrado que las moléculas coestimuladoras B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) tienen un papel crítico en la activación de células CD4⁺ T *in vivo* e *in vitro*, persisten controversias sobre su importancia en la resistencia o susceptibilidad a varias infecciones, incluyendo la leishmaniasis. En la leishmaniasis murina se ha reportado, por un lado, que B7-1 y B7-2 tienen un papel específico y diferencial en una respuesta Th1 o Th2¹⁵⁸, dependiendo de la susceptibilidad o resistencia genética del animal.¹⁵⁹⁻¹⁶⁴ El parásito puede inhibir la expresión de B7-1 en animales susceptibles y B7-2 en resistentes.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Por otro lado, hay reportes que proponen que B7-2 es la molécula coestimuladora dominante en la respuesta inmune, tanto en ratones susceptibles como en resistentes infectados con *Leishmania*.¹⁶⁵ Estos autores demuestran que en ratones susceptibles B7-2 favorece una respuesta Th2, mientras que en animales resistentes esta molécula coestimuladora favorece una respuesta Th1. Por el contrario, en monocitos humanos se había reportado que la infección con *L. major* o *L. chagasi* no alteran su expresión de B7-1 y B7-2^{149,166,167}, pero que al bloquear la interacción B7-CD28 en monocitos de pacientes con LC, esto reduce su producción de TNF- α y de IFN- γ .¹⁵² Estos datos sugieren que aunque *Leishmania* parece no modular la expresión de estas moléculas, pueden ser importantes en una respuesta protectora, sin haberse definido todavía el papel específico de cada una. En el presente trabajo tampoco encontramos cambios significativos en la expresión de B7-1 en

monocitos estimulados con LPG, tanto de sujetos sanos, como de pacientes con LCL y LCD.

A diferencia de los datos reportados en la literatura, encontramos que B7-2 se encuentra sobre-expresado en monocitos de pacientes con LCL y LCD, tanto en estado basal como estimulados con LPG, con respecto a monocitos de sujetos sanos. En los monocitos de pacientes con LCD, esta sobre-expresión no se modifica, aun cuando se estimularon con LPG.

En pacientes con LCL, la sobre-expresión de B7-2 observada en el estado basal tiende a reducirse cuando las células son estimuladas con LPG, lo cual es similar a lo que observado en modelos murinos resistentes a la leishmaniasis. Interesantemente esto no se observa en monocitos de pacientes con LCD, los cuales no modifican su expresión aun con el estímulo con LPG.

Independientemente del mecanismo que regule la expresión de B7-2 en los pacientes infectados con *Leishmania mexicana*, es muy claro que cuando los monocitos son estimulados con LPG, su capacidad de expresar B7-2 incrementa de manera proporcional a la severidad del cuadro clínico. Los pacientes con la forma severa de la enfermedad (LCD) expresan una cantidad significativamente mayor que los pacientes con la forma benigna (LCL), y estos a su vez expresan significativamente más B7-2 que sujetos que nunca han estado expuestos a *Leishmania*.

La falta de una adecuada producción de TNF- α , IL-15 e IL-18 en los monocitos de pacientes con LCD, expuestos a un antígeno de *Leishmania mexicana*, posiblemente sea uno de los factores responsables de la progresión de la enfermedad en estos pacientes. Aun queda por establecerse, si la falta de respuesta de las células es la causa o la consecuencia de la infección masiva con la cual cursan estos pacientes. Es tentador especular que la sobre-expresión de B7-2 en los monocitos de pacientes con LCD se asocia con la baja producción de citocinas activadoras de macrófagos y células NK, y que esto sea otro factor que puede originar o contribuir a la progresión de la enfermedad en pacientes con LCD.

En resumen, este es el primer trabajo en la literatura en el que se propone que la falta de citocinas de la respuesta inmune innata y la expresión de moléculas coestimuladoras puede estar asociada con la severidad clínica de pacientes infectados con *Leishmania mexicana*.

7. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que existen diferencias en la secreción de citocinas de la respuesta inmune innata entre pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada:

1. En pacientes LCL el patrón de citocinas secretadas por monocitos estimulados por LPG se caracterizó por: un incremento en la producción de TNF- α , IL-18 e IL-15 además de una inhibición de la producción de IL-12.
2. En pacientes LCD el patrón de citocinas secretadas por monocitos estimulados con LPG se caracterizó por: la falta de producción de IL-18 e IL-15 y por la disminución de los niveles de TNF- α e IL-12 al aumentar la severidad clínica de la enfermedad.

Los resultados también sugieren que existen diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras entre los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y diseminada:

3. La expresión de la molécula coestimuladora B7-2 puede estar asociada con la severidad del padecimiento, ya que la expresión en monocitos de pacientes con LCD es mayor que en pacientes LCL y en ambos grupos de pacientes es mayor que en sujetos sanos.

Este trabajo arroja datos importantes sobre posibles mecanismos relacionados con la progresión de la enfermedad en pacientes con LCD.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Leishmaniasis.WHO/TDR.<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/default.htm> (Consultado en abril de 2006)
2. Epidemiología y Control de la Leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Cuaderno Técnico No. 44. OPS/OMS. 1996.
3. Lainson R and Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World. Taxonomics problems. Br Med Bull 1974; 28: 44-48.
4. Lainson R and Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR and Evans DA. (Eds). Biology of the Kinetoplastida. London. Academic Press. 1979. pp. 1-116.
5. Lainson R and Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: The leishmaniasis in Biology and Medicine, vol 1, Peters W and Killick-Kendrick R (Eds). London: Academic Press. 1987. pp. 1-120.
6. International Leishmania Network, ILN. PAHO and the Brazilian Research Council, CNPq. <http://www.bdt.fat.org.br/leishnet/>. (Consultado en abril de 2006)
7. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis en América Latina. Taller Interamericano sobre las leishmaniasis en las Américas. Nicaragua, C. A.1994.
8. Velasco Castrejón O, Guzmán Bracho C, Rivas Sánchez B, Aguilar Torrentera F, Hernández Márques JG. Las leishmaniasis. Con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE No.7. 2ª.Ed. Secretaría de Salud. México. 1994.
9. Feliciangelli MD. Actualización sobre aspectos de biología y ecología de *Lutzomyia* ssp en las Américas. Mem I. Simp Lat Biol Control. Enf. Trop. (México). En: Biol Direcc Mariol San Amb. MSAS Venezuela. 1990; 30 (Supl.) (I): 36-52.
10. Sacks H. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. Infect Agents Dis1992 Aug; 1(4):200-6.
11. Muskus CE and Marin Villa M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. Biomedica 2002 Jun; 22(2):167-77.
12. Velasco O, Savarino S, Walton B, Gam A and Neva F. Diffuse cutaneous leishmaniasis in México. Am J Trop Med Hyg 1989; 41(3):280-288.
13. Oficina Sanitaria Panamericana/OMS. I. Conferencia Interamericana para la Prevención y Control de las Leishmaniasis. 1994. México, D.F.
14. Velasco-Castrejón O, Savarino S, Neva F, Guzmán Bracho C. Los agentes etiológicos de las leishmaniasis cutáneas en México. Presencia de *L. braziliensis* en México. Rev Lat amer Microbiol 1989; 31:231-234.
15. Litter, M. Farmacología. Experimental y Clínica. 7ma ed. Argentina, Bs. As., El Ateneo, 1986.
16. Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol 2000; 25(5):363-70.
17. Alkhwajah AM, Larbi E, al-Gindan Y, Abahusseini A, Jain S. Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration. Ann Trop Med Parasitol 1997 Dec; 91(8):899-905.
18. Clive RD, Kaye P, Croft SI, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. BMJ. 2003; 326:377-382.
19. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm Des 2002; 8(4):319-42.
20. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. Am J Trop Med Hyg 2001 Aug; 65(2):87-9.

21. Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2002; 38:1266-72.
22. Oliveira CC, Lacerda HG, Martins DR, Barbosa JD, Monteiro GR, Queiroz JW, Sousa JM, Ximenes MF, Jeronimo SM. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. *Acta Trop* 2004 Apr; 90(2):155-62.
23. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco. Programa de Vectores. Villahermosa, Tabasco. México. 2005.
24. Swain S. Lymphocyte effector functions. Lymphocyte heterogeneity — is it limitless? *Curr Opin Immunol* June 2003; 15(3):332-335.
25. Awasthi A, Mathur RK and Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 2004; 119:238-258.
26. Sacks D y Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Rev Immunol* Nov 2002; 2:845-858.
27. Tapia FJ, Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Fernandez AE, Convit J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res* 1993; 26(1-2):239-47.
28. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993 Mar; 91(3):500-5.
29. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, and Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993 Apr; 91(4):1265-6.
30. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* November 1996; 84(2):188-194.
31. Stafford JL, Neumann NF and Belosevic M. Macrophage-mediated innate defense against protozoan parasites. *Critical Rev Microbiol* 2002; 28:187-248.
32. Aderem A and Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000 Aug 17; 406(6797):782-7.
33. Doherty TM and Arditi M. TB or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? *J Clin Invest* 2004 December 15; 114(12): 1699–1703.
34. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135-45.
35. Kopp E and Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:396–401.
36. Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4022-28.
37. Bancroft GT, The role of natural killer cells in innate response to infection. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:503-510.
38. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; 5(10): 996-1002.
39. Scharon-Kersten T, Alfonso LC, Wysocka M, Trinchieri G and Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1995; 154:5320-5330.
40. Borges MM, Campos-Neto A, Sleath P, Grabstein KH, Morrissey PJ, Skeiky YA, and Reed SG. Potent Stimulation of the Innate Immune System by a *Leishmania brasiliensis* Recombinant Protein. *Infect and Immun* September 2001; 69(9): 5270-5277.

41. Waldmann TA and Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:19-49.
42. Nylén S, Maasho K, Söderström K, Ilg T and Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol* 2003; 131:457-468.
43. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 130:65-74.
44. Schleicher U, Mattner J, Blos M, Schindler H, Rollinghoff M, Karaghiosoff M, Müller M, Werner-Felmayer G, Bogdan C. Control of *Leishmania major* in the absence of Tyk kinase. *Eur J Immunol* 2004; 34(2):519-29.
45. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 cells. *Science* 2002; 295(5553):253.
46. Mattner J, Wandersee-Steinhauser A, Pahl A, Rollinghoff M, Majeau GR, Hochman PS, Bogdan C. Protection against progressive leishmaniasis by IFN-beta. *J Immunol* 2004; 17(22): 7574-82.
47. Moll H. Institut für Molekulare Infektionsbiologie. <http://www.uni-wuerzburg.de/infektionsbiologie/leishman.htm> (consultado en abril 2006)
48. Colmenares M, Corbi AL, Turco SJ, Rivas L. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol* 2004 Jan 15; 172(2):1186-90.
49. Descoteaux A and Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim. Biophys. Acta Mol Basis Dis.* 1999; 1455:341-352.
50. Turco SJ and Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46:65-94.
51. Alexander J, Satoskar AR and Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 1999; 112:2993-3002.
52. Peters C, Aebischer T, Stierhof YD, Fuchs M and Overath P. The role of macrophage receptor in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt12):3715-3720.
53. Campos MAS, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente E, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of toll-Like Receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a parasitic protozoan. *J Immunol* 2001; 167:416-23.
54. Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF, and Müller I. Toll-Like Receptor 4 Contributes to Efficient Control of Infection with the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Infect Immun* 2004 April; 72 (4): 1920–1928.
55. de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E, Schofield L. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol* 2003; 33:2822-283.
56. Takeuchi O, and Akira S. MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:155-167.
57. Muraille E, De Trez C, Brait M, De Baetselier P, Leo O, Carlier Y. Genetically resistant mice lacking MyD88-adaptor protein display a high susceptibility to *Leishmania major* infection associated with polarized Th2 response. *J Immunol* 2003; 170(8):4237-41.
58. Debus A, Gläsner J, Röllinghoff M, and Gessner A. High Levels of susceptibility and T helper 2 response in MyD88-deficient mice infected with *Leishmania major* are interleukin-4 dependent. *Infect Immun* 2003 December; 71(12): 7215–7218.

59. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2002 Aug; 70(8):4638-42.
60. Stenger S, Röllinghoff M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 2001 November; 60(Suppl 3):iii43-iii46.
61. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, and Rollinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites, *Curr Opin Immunol*. 1996; 8, 517-25.
62. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992; 257: 545-548.
63. Mosser DM and Rosenthal LA. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular response. *Sem Cell Biol* 1993; 4: 315-325.
64. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 2002; 72:132-41.
65. von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Lopez Kostka S, Mölle K, Knop J, Sunderkötter C and Udey MC. Interleukin 1 α promotes Th₁ differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med* July 14 2003; 198(2):191-199.
66. Ji J, Sun J and Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 2003 August; 71(8):4278–4288.
67. Luster AD. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 1 February 2002; 14(1):129-135.
68. Iwasaki A and Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol* 2004; 5:987–995.
69. Caceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, Bloom BR, Convit J. Determination of the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993 Mar; 91(3):500-5.
70. Ding AH, Nathan CF and Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141:2407-12.
71. Chaudhri G and Clark IA. Reactive oxygen species facilitate the *in vitro* and *in vivo* lipopolysaccharide induced release of tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 143:1290-4.
72. Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1989 Dec 1; 170(6):2097-104.
73. Liew FY, Parkinson C, Millor S, Severn A, Carrier M. Tumor necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. 1. TNF- α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunol* 1990; 69:570-573.
74. Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 1990 Dec 15; 145(12):4306-10.
75. Theodos CM, Povinelli L, Molina R, Sherry B and Titus RG. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity *in vitro* and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Infect Immun* Aug. 1991; 59 (8): 2839-2842.
76. Fonseca SG, Romao PR, Figueiredo F, Morais RH, Lima HC, Ferreira SH, Cunha FQ. TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2003 Aug; 33(8):2297-306.

77. Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. *J Immunol* 1998 Jun 1; 160(11):5506-13.
78. Wilhelm P , Ritter U , Labbow S, Donhauser N, Röllinghoff M, Bogdan C and Körner H. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol* 2001; 166:4012-4019.
79. Castes M, Trujillo D, Rojas ME, Fernandez CT, Araya L, Cabrera M, Blackwell J, Convit J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 1993; 26(1-2):233-8.
80. Pisa P, Gennene M, Soder O, Ottenhoff T, Hansson M, Kiessling R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990 May; 161(5):988-91.
81. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998 Jan; 31(1):143-8.
82. Kemp K, Theander TG, Hviid L, Garfar A, Kharazmi A, Kemp M. Interferon-gamma- and tumour necrosis factor-alpha-producing cells in humans who are immune to cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol* 1999 Jun; 49(6):655-9.
83. Iannello D, Arena A, Buemi C, Calapai M, Stassi G, Gazzara D, Mastroeni P. Differential induction of TNFalpha and IL-18 in human peripheral blood mononuclear cells infected with *Leishmania major* or *Leishmania donovani* *New Microbiol.* 2003 Oct; 26(4):399-404.
84. Silva JS, Vespa GNR, Cardoso MAG, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. *Infect Immun* 1995; 63:4862-4867.
85. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, and Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFNgamma through a nitric oxide- dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992; 33: 35-40.
86. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, Kone A, Harley R, Plowe CV, Doumbo OK, and Sztein MB. Serum levels of the proinflammatory cytokines Interleukin-1 Beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* October 2004; 72(10):5630-5637.
87. Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchard MP, Ambroise-Thomas P, Pellous H. Tumor necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol* 2001 Jun; 31(8):763-9.
88. Belloni A, Aubert D, Gomez Marin JE, Le Naour R, Bonhomme A, Guenounou M, Pinon JM. Involvement of tumor necrosis factor-alpha during infection of human monocytic cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2000 May; 86(5):406-12.
89. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol.* 2002 Dec 20; 90(1-4):383-94.
90. Knight, JC and Kwiatkowski, D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111:290-298.
91. Mattner F, Padova K, Alber G. Interleukin-12 Is indispensable for protective immunity against *Leishmania major*. *Infect Immun* Nov 1997; 65(11):4378–4383.
92. Park AY, Hondowicz B, Kopf M and Scott P. The Role of IL-12 in maintaining resistance to *Leishmania major*. *J Immunol* 2002; 168:5771-5777.
93. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12

- initiates a protective T helper type 1 immune response. *J Exp Med* 1993 Jun 1; 177(6):1797-802.
94. Heinzl FP, Rerko RM, Ahmed F and Pearlman E. Endogenous IL-12 is required for control of TH2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* 1995; 155:730-739.
 95. Heinzl FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1993 May 1; 177(5):1505-9.
 96. Jones D, Elloso MM, Showe L, Williams D, Trinchieri G, Scott P. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. *Infect Immun* 1998 Aug; 66(8):3818-24.
 97. Chakir H, Campos-Neto A, Mojibian M, Webb JR. IL-12Rbeta2-deficient mice of a genetically resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection and develop a parasite-specific Th2 immune response. *Microbes Infect* 2003 Apr; 5(4):241-9.
 98. Carrera L, Gazzinelli R, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks D. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 1996; 183:515–26.
 99. Peidrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MAJ, Alexander J and Liew FY. Regulation of interleukin 12 synthesis in macrophages by *Leishmania* phosphoglycans. *Eur J Immunol* 1999; 29: 235-244.
 100. Belkaid Y, Butcher B, Sacks D. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* 1998, 28:1389-1400.
 101. Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L. and Locksley RM. *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. *J Exp Med* 1994; 179: 447-456.
 102. Barral A, Petersen EA, Sacks DL, Neva FA. Late metastatic leishmaniasis in the mouse: a model for mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32:277-85.
 103. Calabrese, KDS, da Costa SC. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 1:49-56.
 104. Afonso, L C, Scott P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 1993; 61:2952-9.
 105. Blackwell, J. Protozoal infections.ed. Genetics of Resistance to Bacterial and Parasitic Infection 103. Taylor and Francis, London. 1988.
 106. Roberts, M, Alexander J, Blackwell JM. Genetic analysis of *Leishmania mexicana* infection in mice: single gene (*Scf-2*) controlled predisposition to cutaneous lesion development. *J Immunogenet* 1990; 17:89-100.
 107. Buxbaum LU, Uzonna JE, Goldschmidt MH, Scott P. Control of New World cutaneous leishmaniasis is IL-12 independent but STAT4 dependent. *Eur J Immunol* 2002 Nov; 32(11):3206-15.
 108. Rodriguez-Sosa M, Monteforte GM, Satoskar AR. Susceptibility to *Leishmania mexicana* infection is due to the inability to produce IL-12 rather than lack of IL-12 responsiveness. *Immunol Cell Biol* 2001 Aug; 79(4):320-2.
 109. Sartori A, Oliviera MAP, Scott P, Trinchieri G. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J Immunol* 1997; 159:2849–57.
 110. Habibi GR, Khamesipour A, McMaster WR, Mahboudi F. Cytokine gene expression in healing and non-healing cases of cutaneous leishmaniasis in

- response to in vitro stimulation with recombinant gp63 using semi-quantitative RT-PCR. *Scand J Immunol* 2001 Oct; 54(4):414-20.
111. Hailu A, van der Poll T, Berhe N, Kager PA. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2004 Nov; 71(5):561-7.
 112. Oliveira MA, Santiago HC, Lisboa CR, Ceravollo IP, Trinchieri G, Gazzinelli RT, Vieira LQ. Leishmania sp: comparative study with *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* in their ability to initialize IL-12 and IFN-gamma synthesis. *Exp Parasitol* 2000 Jun; 95(2):96-105.
 113. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J and Gazzinelli RT. Pivotal role of Interleukin-12 and Interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001; 159:1723-1733.
 114. Yap G, Pesin M, Sher A. IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2000; 165:628-631.
 115. Decken K, Kohler G, Palmer-Lehmann K, Wunderlin A, Mattner F, Magram J, Gately MK, Albert G. IL-12 is essential for protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1998; 66:4994-5000.
 116. Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* 1998; 187: 2103-8.
 117. Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Okamoto I, Kojima H, Koide K, Takeuchi M, Ikegami H, Ohta T, Kurimoto M. Interleukin-18 induces interferon-gamma production through NF-kappaB and NFAT activation in murine T helper type 1 cells. *Cell Immunol* 1999; 196: 41-50.
 118. Wei XQ, Leung BP, Niedbala W, Piedrafita D, Feng GJ, Sweet M, Dobbie L, Smith AJ, Liew FY. Altered immune responses and susceptibility to Leishmania major and Staphylococcus aureus infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 1999; 163: 2821-8.
 119. Ohkusu K, Yoshimoto T, Takeda K, Ogura T, Kashiwamura S, Iwakura Y, Akira S, Okamura H, and Nakanishi K. Potentiality of Interleukin-18 as a Useful Reagent for Treatment and Prevention of Leishmania major Infection. *Infect Immun* 2000 May; 68(5): 2449–2456.
 120. Monteforte GM, Takeda K, Rodriguez-Sosa M, Akira S, David JR and Satoskar AR. Genetically Resistant Mice Lacking IL-18 Gene Develop Th1 Response and Control Cutaneous Leishmania major Infection. *J Immunol* 2000; 164: 5890-5893.
 121. Yoshimoto T, Ohkus K, Okamura H, Nakanishi K. 1998. Induction of host resistance to Leishmania major by IL-12 and IL-18: in vivo IL-12 treatment upregulates IL-18 receptor expression of T cells. *FASEB J.* 12:A1068.
 122. Vossenkamper A, Struck D, Alvarado-Esquivel C, Went T, Takeda K, Akira S, Pfeffer K, Alber G, Lochner M, Forster I, Liesenfeld O. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur J Immunol* 2004 Nov; 34(11):3197-207.
 123. Nomaguchi H, Jahan N, Mandal BC, Yogi Y, Kawatsu K, Yoshizawa Y, Okamura H, Makino M. IL-12 and IL-18 synergistically induce the bactericidal activity of murine peritoneal cells against *M. leprae*. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi* 2001 Aug; 70(3):113-9.
 124. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H and Barnes PF. NK Cells Regulate CD8+ T Cell Effector Function in Response to an Intracellular Pathogen. *J Immunol* 2004; 172: 130-137.

125. Müller U, Köhler G, Mossmann H, Schaub GA, Alber G, Di Santo JP, Brombacher F. and Hölscher C. IL-12-Independent IFN- γ Production by T Cells in Experimental Chagas' Disease Is Mediated by IL-18. *J Immunol* 2001; 167: 3346-3353.
126. Alleva DG, Kaser SB, Monroy MA, Fenton MJ, Beller DI. IL-15 functions as a potent autocrine regulator of macrophage proinflammatory cytokine production: evidence for differential receptor subunit utilization associated with stimulation or inhibition. *J Immunol* 1997; 159:2941-2951.
127. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14-32.
128. Feau S, Facchinetti V, Granucci F, Citterio S, Jarrossay D, Seresini S, Protti MP, Lanzavecchia A, and Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 15 January 2005; 105(2): 697-702.
129. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, J. Sprent. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 1998; 8:591-9.
130. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162:4511-4520.
131. Elloso MM, Wallace M, Manning DD, Weidanz WP. The effects of interleukin-15 on human gammadelta T cell responses to *Plasmodium falciparum* in vitro. *Immunol Lett* 1998; 64:125-132.
132. Ing R, Gros P, and Stevenson MM. Interleukin-15 enhances innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection in mice. *Infect Immun* May 2005; 73(5):3172-3177.
133. Khan IA, Moretto M, Wei XQ, Williams M, Schwartzman JD and Liew FY. Treatment with soluble Interleukin-15 α exacerbates intracellular parasitic infection by blocking the development of memory CD8⁺ T cell response. *J Exp Med* June 3 2002; 195(11):1463-1470.
134. Maeurer M, Seliger B, Trinder P, Gerdes J, Seitzer U. Interleukin-15 in mycobacterial infection of antigen-presenting cells. *Scand J Immunol* 1999 Sep; 50(3):280-8.
135. Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J Immunol* 1997 Jan 15; 158(2):800-6.
136. D'Agostino P, Milano S, Arcoleo F, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Caruso R, Chifari N, Vitale G, Mansueto S, Cillari E. Interleukin-15, as Interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing Interleukin-12. *Scand J Immunol* 2004 Dec; 60(6):609-14.
137. Milano S, Di Bella G, D'Agostino P, Barbera C, Caruso R, La Rosa M, Ferlazzo V, Vitale G, La Russa C, Gambino G, Chifari N, Mansueto S, Cillari E. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Clin Exp Immunol* 2002 Feb; 127(2):360-5.
138. Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* 1996; 156:3932-3938.
139. Kelsall BL, Stuber E, Neurath M, Strober W. Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 795:116-126.

140. Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG and Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immun* 1996; 4:283–289.
141. Kamanaka M, Yu P, Yasui T, Yoshida K, Kawabe T, Horii T, Kishimoto T, Kikutani H. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. *Immun* 1996; 4:275–281.
142. Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley, BJ Jr, Ruddle NH, McMahon-Pratt D, Flavell RA. Disruption of CD40–CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun* 1996; 4:263–273.
143. Padigel UM, Perrin PJ and Farrell. JP The development of a Th1-type response and resistance to *Leishmania major* infection in the absence of CD40-CD40L costimulation. *J Immunol* 2001; 167:5874-5879.
144. Heinzl FP, Rerko RM, Hujer AM. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. *Cell Immunol* 1998 Mar 15; 184(2):129-42.
145. Buates, S and Matlashewski, G. General suppression of macrophage gene expression during *Leishmania donovani* infection, *J Immunol* 2001; 166: 3416-22.
146. Ferlin WG, von der Weid T, Cottrez F, Ferrick DA, Coffman and Howard MC. The induction of a protective response in *Leishmania major*-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb. *Eur J Immunol* 1998; 28: 525–531.
147. Awasthi A, Mathur RK, Khan A, Joshi BN, Jain N, Sawant S, Boppana R, Mitra D and Saha B. CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response. *J Exp Med* 2003; 197(8): 1037-1043.
148. Mathur RK, Awasthi A, Wadhone P, Ramanamurthy B, Saha B. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med* 2004 Jul; 7(10):540-4.
149. Brodskyn CI, DeKrey GK, and Titus RG. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun* 2001 February; 69(2):665–672.
150. Shi FD, He B, Li H, Matusevicius D, Link H, Ljunggren HG. Differential requirements for CD28 and CD40 ligand in the induction of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol* 1998; 28:3587–3593.
151. Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, Noelle RJ, Blazar BR. Analysis of the requirements for the induction of CD4+ T cell alloantigen hyporesponsiveness by ex vivo anti-CD40 ligand antibody. *J Immunol* 2000; 164:612–622.
152. Favali C, Costa D, Afonso L, Conceição V, Rosato A, Oliveira F, Costa J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI. Role of costimulatory molecules in immune response of patients with cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 2005 Jan 4; 7:86-92.
153. Subauste CS, Wessendarp M, Sorensen RU & Leiva LE. CD40–CD40 ligand interaction is central to cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii*: patients with hyper IgM syndrome have a defective type-1 immune response which can be restored by soluble CD40L trimer. *J Immunol* 1999; 162: 6690–6700.
154. Subauste CS & Wessendarp M. Human dendritic cells discriminate between viable and killed *Toxoplasma gondii*: dendritic cell activation after activation with viable parasites results in CD28 and CD40 signaling that controls IL-12-dependent and independent T cell production of IFN- γ . *J Immunol* 2000; 165:1498–1505.
155. Zhou P & Seder RA. CD40 ligand is not essential for induction of type-1 cytokine responses or protective immunity after primary or secondary infection with *Histoplasma capsulatum*. *J Exp Med* 1998; 187: 1315–1324.

156. Campos-Neto A, Owendale P, Bement T, Koppi TA, Fanslow WC, Rossi MA, Alderson MR. Cutting Edge: CD40 ligand is not essential for the development of cell-mediated immunity and resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1998; 160: 2037–2041.
157. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, Kim J, Sieling PA, Miller A, Brightbill H, Schlienger K, Rea TH, Modlin RL. A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J Immunol* 2000 Aug 1; 165(3):1506-12.
158. Sansom DM, Manzotti CN and Zheng Y. What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol* June 2003, 24(6): 313-318.
159. Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 1995; 25:2492–2498.
160. Kaye PM, Rogers NJ, Curry AJ, Scott JC. Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. *Eur J Immunol* 1994; 24:2850–2854.
161. Brown JA, Titus RG, Nabavi N, Glimcher LH. Blockade of CD86 ameliorates *Leishmania major* infection by down-regulating the Th2 response. *J Infect Dis* 1996 Dec; 174(6):1303-8.
162. Murphy, ML, Engwerda, CR, Gorak, PMA and Kaye, PM. B7-2 blockade enhances T cell responses to *Leishmania donovani*. *J Immunol* 1997; 159:4460-4466.
163. Gomes NA, Barreto-de-Souza V, Wilson ME, DosReis GA. Unresponsive CD4+ T lymphocytes from *Leishmania chagasi*-infected mice increase cytokine production and mediate parasite killing after blockade of B7-1/CTLA-4 molecular pathway. *J Infect Dis* 1998 Dec; 178(6):1847-51.
164. Brown JA, Greenwald RJ, Scott S, Schweitzer AN, Satoskar AR, Chung C, Schopf LR, van der Woude D, Sypek JP, Sharpe AH. T helper differentiation in resistant and susceptible B7-deficient mice infected with *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 2002 Jun; 32(6):1764-72.
165. Elloso M M and Scott P. Expression and contribution of B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) in the early immune response to *Leishmania major* infection. *J Immunol* 1999; 162:6708–6715.
166. De Almeida MC, Cardoso SA, Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *Int J Parasitol* 2003 Feb; 33(2):153-62.
167. Subauste CS, Malefyt RW and Fuh F. Role of CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) in the immune response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 1998; 160:1831-1840.
168. Mariotti S, Teloni R, Iona E, Fattorini L, Romagnoli G, Gagliardi MC, Orefici G, Nisini R. *Mycobacterium tuberculosis* diverts alpha interferon-induced monocyte differentiation from dendritic cells into immunoprivileged macrophage-like host cells. *Infect Immun* 2004 Aug; 72(8):4385-92.
169. Miyahira Y, Katae M, Kobayashi S, Takeuchi T, Fukuchi Y, Abe R, Okumura Ko, Yagita H, and Aoki T. Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2003 June; 71(6): 3131–3137.
170. Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorre K, Van Heuverswyn H. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi*. 2001 Feb; 70(1):15-24.