



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LINFOCITOS CD4 Y
CD8 EN BAZO DE RATONES BALB/c INOCULADOS
CON LEISHMANIA MEXICANA (L. MEXICANA)
AISLADO DE DOS FORMAS CLINICAS,
LEISHMANIASIS CUTANEA LOCALIZADA (LCL) Y
CUTANEA DIFUSA (LCD)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MONICA IRAIS VILLASEÑOR CARDOSO



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

DIRECTOR DE TESIS: DR. OSCAR VELASCO CASTREJON



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Estudio comparativo de linfocitos CD4 y CD8 en bazo de ratones BALB/c
inoculados con Leishmania mexicana (L.mexicana) aislado de dos formas
clínicas, Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y cutánea difusa (LCD)

realizado por **MONICA IRAIS VILLASEÑOR CARDOSO**

con número de cuenta **9038194-0**, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis **Dr. Oscar Velasco Castrejón**

Propietario **M en C Beatriz Rivas Sánchez**

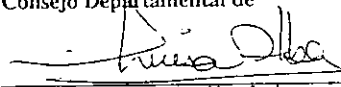
Propietario **Dra. María Esther Martínez Murillo**

Suplente **Dra. Laila Gutiérrez Kobeh**

Suplente **Dr. Guillermo Salgado Maldonado**

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de


Dra. Luisa A. Alba Lois



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

DEDICATORIA

A mamá Edith y a papá Jaime por su confianza y apoyo incondicional durante toda mi vida

A mi hermana Edith M, quien ha sido mi sólida compañía desde siempre

A la mamá grande, mamá Maria por ser parte de mi formación como persona.

A mis tías (os) y primas (os).

A mis amigas del alma: Adriana Perdomo F, Paola Talavera B, Victoria Aguilar U y Fabiola Martínez R. gracias por todos los momentos gratos y su apoyo total e incondicional en mis lapsos de depresión y sobre todo por ser mis mejores amigas.

A mis amigos de toda la vida, por quienes conocí el lado oscuro: Marco A. Álvarez G, José Castro, Siddhartha Neri C, Emilio Galván E, Humberto Salas T, Carlos Cárdenas C.

A Eduardo Pérez C, por todo lo que tenemos y sobre todo por soportarme pacientemente en cualquier circunstancia. T.A. ¿ Como se dice?...

Al Dr. Oscar Velasco C y a la Dra. Beatriz Rivas S, por ser mis maestros en el ámbito profesional y humano, por compartir conmigo sus conocimientos y amistad , por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ingeborg Becker. Por todas las facilidades otorgadas durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Norma Salaíza quien me guió por el mundo de la inmunohistoquímica,

Al grandioso equipo del laboratorio de inmunoparasitología: Rocely, Roxana, Adriana, Miriam, Laila, José y Arturo.

A los jefes del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental Ricardo Vargas y Miguel O. Rabadán, por proporcionarme y atender a los ratones “singénicos”, y por todos los momentos de trabajo y sano esparcimiento.

Al Sr. Pedro Balderas autor del excelente trabajo de tinción en los cortes histológicos.

A Lucy y a Rosi por su gran ayuda con la mecanografía.

A todos mis compañeros de la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM, de quienes aprendí y los cuales me ofrecieron su ayuda desinteresada. Gracias.

A mis sinodales que amablemente revisaron mi trabajo y por sus valiosas aportaciones y consejos

A la doblemente **H. FACULTAD DE CIENCIAS.**

A mi Alma Mater

La UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco Teórico	3
3.1 Distribución Geográfica	3
3.2 Vectores	4
3.3 Reservorios	5
3.4 Agente Etiológico	6
3.4.1 Morfología	6
3.4.2 Taxonomía	7
3.4.3 Ciclo de Vida	9
3.5 Formas Clínicas	10
3.6 Interacciones Huésped-Parásito	13
3.6.1 Respuesta Inmune	13
3.6.2 Interacción con el macrófago y células de Langerhans	15
3.7 Histopatología	18
3.8 Antecedentes	20
4. Objetivos	25
5. Metodología	26
5.1 Ratones	26
5.2 Obtención de parásitos e infección de ratones	26
5.3 Curvas de infección	28
5.4 Histopatología	28
5.5 Inmunohistoquímica	29
5.6 Cuantificación de células	31
5.7 Análisis Estadístico	32
6. Resultados	33
6.1 Análisis Histopatológico	33
6.2 Curvas de infección	34
6.3 Inmunohistoquímica	36
7. Discusión	46
8. Conclusiones	58
9. Bibliografía	59

RESUMEN

La leishmaniasis es un problema de salud pública en México. En el desarrollo de esta enfermedad, las células del sistema inmune juegan un papel importante, pues de acuerdo a las citocinas secretadas por los linfocitos T CD4 y CD8, se obtiene la resolución o exacerbación de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo es comparar las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 en bazo de ratones infectados con 2 cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y difusa (LCD). Por tal motivo, se inocularon ratones BABL/c, intraplantarmente con 1×10^6 promastigotes de LCL y LCD. Semanalmente se realizó la medición del cojinete plantar y se registraron las curvas de infección. A partir del primer día y a las 5, 10 y 15 semanas postinfección se extrajo el bazo, una parte se fijó en Zamboni para análisis histopatológico y la segunda se congeló para realizar la inmunohistoquímica. En el análisis histopatológico no se observaron cambios estructurales importantes o presencia del parásito. Las curvas de infección fueron similares hasta las 15 semanas. En la inmunohistoquímica se observó una disminución significativa ($p > 0.05$) de CD4 al primer día de infección tanto en LCL (5.57 ± 0.39) como en LCD (4.55 ± 0.38) con respecto al testigo (8.57 ± 0.69). Por otro lado también se observó una diferencia en el número de células entre las cepas de *Leishmania* CD4 y CD8, siendo menor en los ratones infectados con LCD. La diferencia fue notable en el número de células del bazo, en donde LCD presentó menor cantidad de células CD4 y CD8, sugiriendo una diferencia importante en la capacidad de ambas cepas para activar la respuesta inmune de los ratones infectados.

2. Introducción.

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania*, la cual entra al mamífero hospedero a través de la picadura de un mosquito hembra de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) (Velasco-Castrejón *et al.*, 1994).

A nivel mundial, las leishmaniasis están presentes en localidades de 82 países del mundo (72 en países subdesarrollados) y se estimaron 12 millones de casos existentes para 1990 además de 600 mil casos nuevos anuales (WHO.1984). En México, más del 90% de los casos de leishmaniasis se han notificado en los estados de Tabasco, Quintana Roo, Campeche, Oaxaca, Nayarit y Chiapa y se ha reportado la transmisión en 20 entidades federativas (O.Velasco, 1999, comunicación personal).

En México se han reportado los cuatro tipos de leishmaniasis del nuevo mundo : leishmaniasis cutánea localizada (LCL), cutánea difusa (LCD), mucocutánea (LMC) y visceral (LV) o Kala-azar. También se ha comprobado la presencia de varios vectores representados por distintas especies del género *Lutzomyia* y algunos de los reservorios naturales incluyendo roedores silvestres y animales domésticos como el perro. La transmisión de las leishmaniasis está asociada a fenómenos ecológicos y demográficos como nuevos asentamientos humanos en áreas enzoóticas, desarrollo de proyectos agrícolas, construcción de sistemas de irrigación y migraciones temporales hacia áreas selváticas (Velasco-Castrejón *et al.*, 1991).

3. Marco teorico.

3.1 Distribución geográfica.



Figura 1. Distribución geográfica de las formas clínicas de leishmaniasis

Esta zoonosis es de distribución cosmopolita con excepción de Australia. En América, las leishmaniasis se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En México, al menos 17 entidades han sido reportadas, desde el norte Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el norte, hasta el sureste en la península de Yucatán y Chiapas. En la zona del Golfo involucra a los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y en la zona del pacífico a Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa. Asimismo, afecta estados como San Luis Potosí, Morelos y Puebla (Figura 1) (Velasco-Castrejón *et al.*, 1994).

3.2 Vectores

La transmisión de la leishmaniasis es realizada por las hembras de especies hematófagas de dípteros de la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae. Por esta razón resulta importante comprender la dinámica de la transmisión, la distribución de los tipos de leishmaniasis y las áreas de riesgo; Así mismo el diseño de posibles métodos de control que requiere necesariamente revisar diversos aspectos entomológicos (Valdespino-Gómez *et al.*, 1994).

Los representantes de Phlebotominae tienen amplia distribución en el mundo, actualmente se reconocen 11 géneros que comprenden alrededor de 600 especies. El género *Lutzomyia* es el que está mejor representado y distribuido en América, existen por lo menos 200 especies, la mayoría de éstas se encuentran en las selvas tropicales perennes y caducifolias, con algunos representantes en las zonas desérticas y en los bosques mixtos de encino coníferas (Valdespino-Gómez *et al.*, 1994).

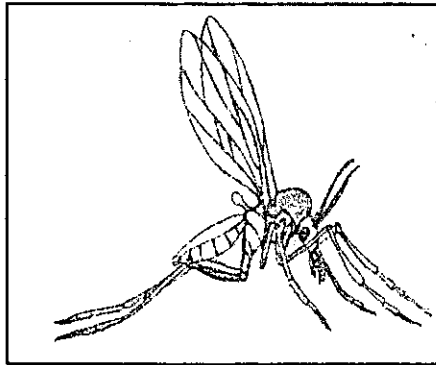


Figura 2. *Phlebotomus* spp.

El flebotomo es un insecto díptero de 2 a 3.5 mm de largo, de color pardo amarillento y recubierto de cerdas y escamas (Figura 2). La hembra llega a vivir 3 semanas y cada puesta consta de 50 a 100 huevos. La ovoposición y el desarrollo de las larvas se realiza preferentemente en suelos ricos en humus. Después de que se produce la eclosión del huevo y según las condiciones climatológicas, transcurrirán entre 35 y 60 días, pasando por cuatro estadios larvarios hasta la aparición de los insectos adultos en humedad y material nitrogenado (Esquerdo, 1993).

3.3 Reservorios:

En las regiones urbanas son los animales domésticos los que actúan como reservorios, mientras que en las zonas rurales y forestales los roedores salvajes, los tlacoaches y perros son los que constituyen los principales reservorios de los parásitos (Esquerdo, 1993). En particular, en los estados del sureste el método indígena de aprovechamiento de la tierra para actividades de agricultura (cortarquemar) favorece el contacto del ser humano con los roedores silvestres (reservorios) y con los vectores antropofílicos. Las quemas se realizan durante los meses de noviembre a marzo, cuando la vegetación alta, la temperatura y la humedad favorecen el desplazamiento de roedores infectados, además el hombre se adentra para cosechar, extraer madera, chicle y/o cazar y de esta manera se lleva a cabo el ciclo de transmisión selvática. Por todo lo anterior se puede concluir que la LC es una zoonosis de transmisión selvática en la cual el hombre es un huésped accidental.

3.4 Agente etiológico

3.4.1 Morfología.

Leishmania durante su ciclo de vida, cambia de una fase móvil: el promastigote que habita el lumen del intestino del transmisor el cual es inoculado por picadura al huesped transformándose en una inmóvil intracelular, el amastigote, que vive exclusivamente en las células del sistema fagocítico mononuclear (Monroy, 1986).

El amastigote tiene una forma redondeada u oval de 2-5 μm de diámetro, con un núcleo excéntrico, un kinetoplasto, un blefaroplasto (cuerpo basal) de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo del promastigote. Esta etapa sólo se observa en el sistema fagolisosomal de macrófagos mamíferos parasitados y algunas veces en los medios de cultivo (Bates, 1994).



Figura 3. Amastigote de *Leishmania* spp.

El promastigote de forma fusiforme tiene aproximadamente 12 - 20 μm de largo que consta de un núcleo situado aproximadamente en la parte central del parásito y un flagelo anteronuclear que nace de un cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto y

sale del cuerpo por el polo anterior y carece de membrana ondulante (Bates, 1994). Ambas fases amastigote y promastigote se reproducen por fisión binaria.

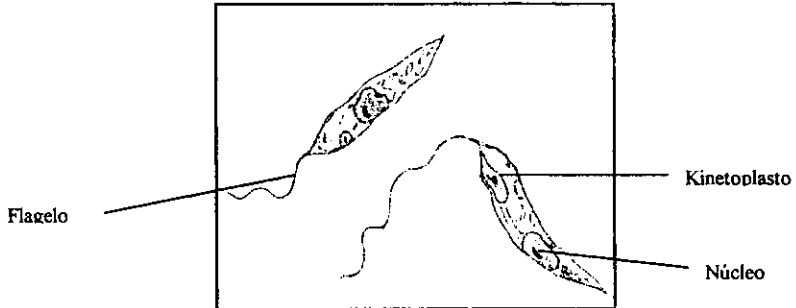


Figura 4. Promastigote de *Leishmania* spp

3.4.2 Taxonomía.

El reconocimiento del género *Leishmania* fue basado originalmente en criterios de distribución geográfica, enfermedad producida en el hombre, epidemiología, variedad biológica y geográfica. En la actualidad no es aceptada una clasificación universal, sin embargo muchos trabajos se basan en las formas causantes de la enfermedad en el hombre. En 1984 se propuso que el género debería subdividirse en 2 subgéneros *Leishmania* y *Sauroleishmania*. En 1990, la OMS modificó la clasificación taxonómica, de acuerdo a la localización del parásito en el tubo digestivo del vector, dividiendo al género *Leishmania* en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia* (Figura 5). El primero se desarrolla en la parte anterior al píloro (desarrollo suprapilórico), en el punto de unión del intestino medio y posterior.

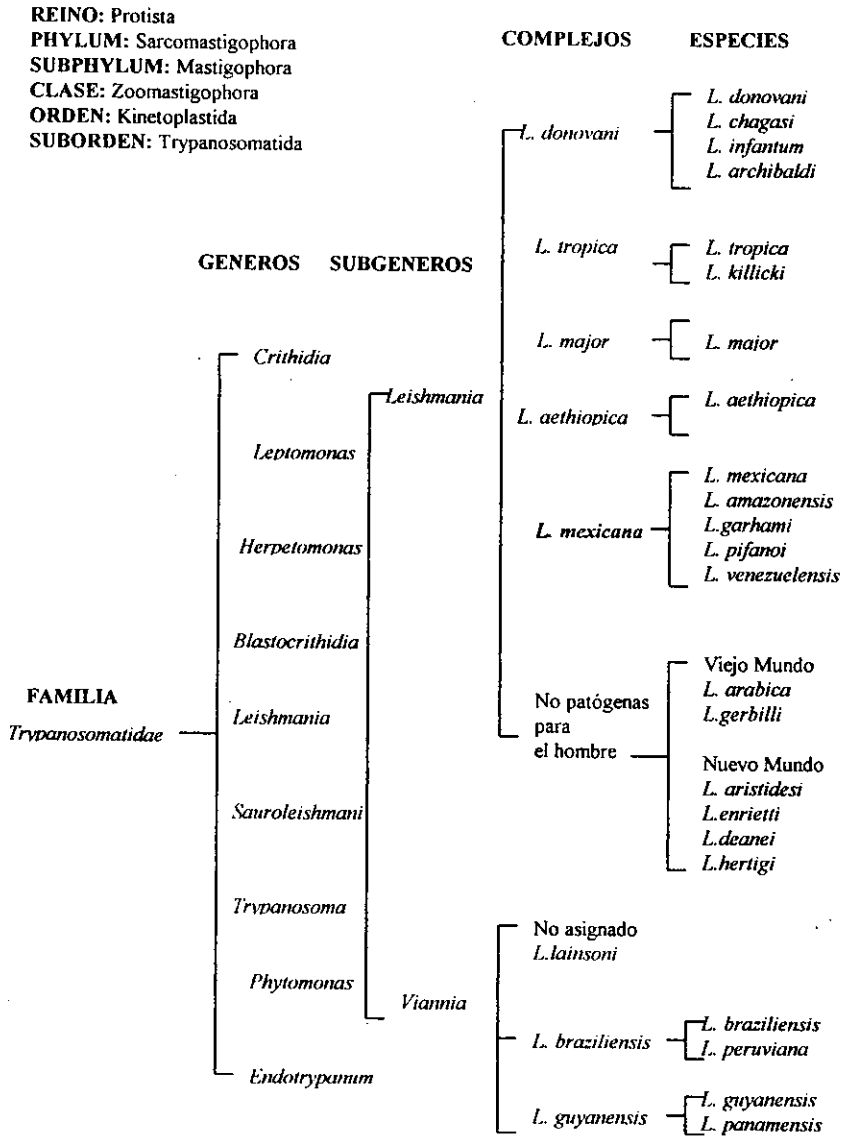


Figura 5. Taxonomía del género *Leishmania* OMS 1991

Viannia por su parte lo hace tanto en el intestino medio como en el posterior (Velasco-Castrejón *et al.*, 1994).

Los métodos inmunológicos como el uso de anticuerpos monoclonales y el uso de zimodemos (Rivas 2000, comunicación personal) además de la biología molecular, han sido aplicados recientemente para el estudio del género *Leishmania* con el objeto de revelar características intrínsecas del parásito que no son modificadas por el hospedero o factores ambientales. Algunos de estos métodos han demostrado tales características, los cuales pueden ser usados para distinguir especies o subespecies (WHO, 1984).

3.4.3 Ciclo de vida.

El promastigote parasita el intestino de su hospedero primario, el mosquito hembra. Dentro del mosquito el promastigote evoluciona a un estadio infectivo que está presente en la proboscis del mosquito. La liberación de los promastigotes metacíclicos ocurre cuando el mosquito succiona sangre de un vertebrado.

La sobrevivencia del parásito dentro del hospedero vertebrado depende en gran medida de una entrada exitosa al macrófago y su posterior transformación hacia la forma de amastigote (Figura 6). Los amastigotes viven en el fagolisosoma del macrófago y la infección es amplificada por la fagocitosis de nuevas células monocíticas de amastigotes liberados por macrófagos lisados. El ciclo es completado cuando el mosquito se alimenta de un tejido infectado e ingiere amastigotes los cuales posteriormente se transforman en promastigotes (Russell y Talamas, 1989).

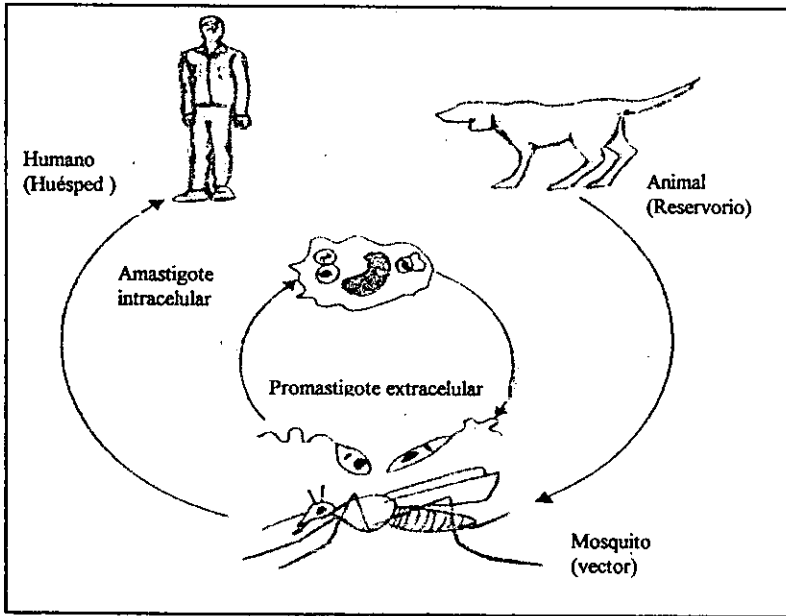


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

3.5 Formas clínicas

Las formas clínicas causadas por *L. mexicana mexicana* son la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros, la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) o leishmaniasis leproide y la leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia.

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros. En este caso la lesión cutánea comienza en el sitio de entrada del parásito formándose una pequeña pápula que se desarrolla a un nódulo ulceroso en el centro (Figura 7). La ulceración es generalmente redondeada de bordes indurados, fondo limpio e indolora, algunas veces la

lesión se mantiene nodular o se transforma en una placa infiltrada o atrófica e inclusive se vuelve vegetante. Las lesiones pueden tener aspecto de pápulas, nódulos, úlceras, tubérculos o placas infiltradas (Barral *et al.*, 1995). A veces puede curar espontáneamente en un periodo que va desde los 6 meses a dos años (Velasco *et al.*, 1970). Muchos pacientes con LCL tienen lesiones simples en partes expuestas de sus cuerpos y responden generalmente a drogas (antimoniales pentavalentes). Puede ocasionar cicatrices deformantes pero no hay otra secuela inmediata. En la leishmaniasis mucocutánea algunos grupos de pacientes (<3%) desarrollan lesiones destructivas en las cavidades orales, meses o años después de la resolución de lesiones primarias en la piel (Carvalho *et al.*, 1985).



Figura 7. Leishmaniasis cutánea localizada

Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) o leishmaniasis leproide. Esta caracterizada por la presencia de nódulos progresivos no ulcerados de donde la *Leishmania* se disemina por vía linfática; a partir de estos sitios los parásitos se diseminan por el líquido tisular por la linfa o por la sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento (con excepción del cuero cabelludo), la región axilar, inguinal, genitales externos y las plantas de los pies (Figura 8). En México los pacientes presentan lesiones frecuentes en la mucosa orofaríngea y nasal (Velasco-Castrejón *et al.*, 1994). En estos pacientes se observa una marcada tendencia a recidivas después de una terapia adecuada.

En todos los casos, los parásitos del subgénero *Leishmania* han sido implicados como el agente causal. La LCD está acompañada por una depresión inmune específica a los antígenos del parásito en presencia de abundante *Leishmania* (Preston *et al.*, 1978).

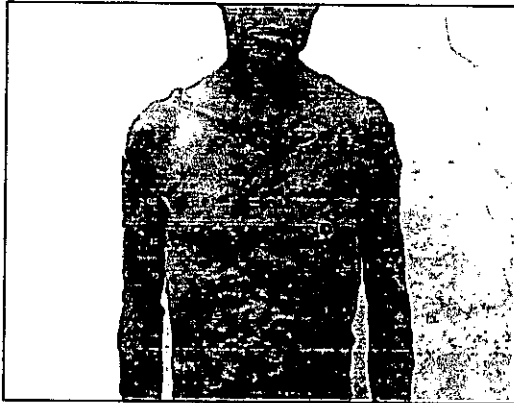


Figura 8. Leishmaniasis cutánea diseminada.

Leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia. Es caracterizada por lesiones mutilantes en las cavidades nasofaríngeas y orales que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso causan inanición debido al intenso dolor (Velasco, 1990).

Leishmaniasis visceral (LV) o Kala - azar. Afecta vísceras y puede ser mortal, los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, malestar general, anorexia, pérdida de peso que puede progresar hasta la caquexia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia, inmunosupresión, hipergammaglobulinemia (Smelt *et al.*, 2000) y palidez de mucosas. Hay oscurecimiento de la piel, particularmente de cara abdomen, pies y manos.

3.6 Interacciones huésped-parásito

3.6.1 Respuesta inmune

Las células del sistema inmune juegan un papel importante durante la infección con *Leishmania* pues las citocinas secretadas por estas células determinan la resolución o exacerbación de la enfermedad.

Algunas de las células involucradas son los linfocitos T, que se diferencian de acuerdo a los marcadores moleculares que presentan en la superficie, dentro de los cuales encontramos las poblaciones CD4 y CD8; a su vez existen subpoblaciones de CD4, las Th1 y Th2. Posterior a la infección por *Leishmania*, varios factores han sido implicados para conducir a un linfocito T CD4 a diferenciarse en Th1 o Th2 como lo son el tipo de células presentadoras de antígeno, los niveles de citocinas endógenas, naturaleza del antígeno reconocido (Castés *et al.*, 1998), dosis del mismo, ruta de liberación, moléculas coestimuladoras e intensidad de las señales entregadas a través del receptor antigénico de células T (TCR) (Locksley *et al.*, 1999).

La subpoblación Th1 produce citocinas del tipo de interferon gama (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral (TNF), factores de transcripción tales como el factor regulador de interferon (IRF-1) (Bogdan *et al.*, 1998) y linfoxina T (LT) (Launois *et al.*, 1998). Estas citocinas tienen delineado un camino por el cual las células T-CD4 se diferencian en células efectoras Th1, confiriendo al huésped resistencia a la enfermedad (Pingel *et al.*, 1999).

La citocina IFN- γ es conocida como inductor de síntesis de óxido nítrico que deja radicales tóxicos en el parásito; además al principio de la infección, antes de la inducción

de una respuesta específica de células T, juega un papel importante en la activación de macrófagos (Milón *et al.*, 1995).

El papel protector de la IL-12 obedece a su capacidad de activar células NK y producir IFN- γ (Satoskar *et al.*, 1999; Coffman *et al.*, 1999) desarrollando una respuesta protectora de células tipo Th1 y/o aumento de los macrófagos a un estado leishmanicida (von Stebut *et al.*, 1998). Este fenómeno puede tener un impacto importante en el uso de IL-12 como adyuvante de vacuna en individuos que padecen una infección en la cual domina una respuesta tipo Th2 (Schopf *et al.*, 1999). La IL-12 también es producida por células del linaje hematopoyético (fagocitos mononucleares, células dendríticas, neutrófilos y células B) y del linaje no hematopoyético como queratinocitos (Milon *et al.*, 1995).

El TNF- α en cantidades insuficientes esta asociada con progresión de la enfermedad y posteriormente la muerte (Goldfeld y Tsai, 1996).

La subpoblación Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y factores desactivadores de macrófagos (factor transformador de crecimiento β , prostaglandina E₂) (Bogdan *et al* 1998). Las infecciones incurables causadas por *Leishmania* están comúnmente asociadas con estas citocinas. Estas citocinas producidas en cantidades elevadas secretadas por células Th2, bloquean la producción de TNF- α efectuada por los macrófagos (Abbas *et al.*, 1995).

Una de las citocinas más importantes es la IL-4 que puede interrumpir la producción de IFN- γ (Heinzel y Rerko, 1999). Su producción durante un corto periodo de tiempo (menos de 48 horas después de la infección) basta para causar un desarrollo irreversible de células Th2 (Himmelrich *et al.*, 1998).

Por otro lado, las células T-CD8 asociada con MHC I, tienen como función controlar el desarrollo de lesiones secundarias y/o reinfecciones. En tejidos linfoides de ratones que tienen que resolver una infección primaria *in vitro* en *L. major*, estas células pueden expandirse después de una reestimulación. El efecto benéfico de células CD8 en las lesiones es parecida a la producida por el IFN- γ , un efecto benéfico citotóxico directo en macrófagos parasitados (Milon *et al.*, 1995).

3.6.2 Interacción con el macrófago y células de Langerhans.

La leishmaniasis cutánea es iniciada cuando una pequeña cantidad de promastigotes son inoculados en la dermis del hospedero. En el interior, la fase de promastigote penetra al macrófago donde realizará su transformación hacia amastigote, una vez que ha llegado a esta etapa, se divide por fisión binaria consecutiva dentro del fagolisosoma del macrófago. (Love *et al.*, 1998).

Estos macrófagos no sólo sirven como células hospederas para *Leishmania*, sino también como células presentadoras de antígeno que modulan la respuesta inmune celular específica y después de una activación apropiada funcionan como células efectoras para matar intracelularmente a los parásitos (Ritter *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha puesto en duda la eficiencia de los macrófagos como células presentadoras de antígeno, pues se ha comprobado que expresan pequeñas cantidades de MHC II y posiblemente moléculas estimuladoras (Wolfram *et al.*, 1996) y además su actividad endocítica va más encaminada hacia la búsqueda y destrucción de antígenos que a la presentación de éstos (Puré *et al.*, 1990).

Los principales mecanismos de defensa con los que cuenta el macrófago son el estallido respiratorio proceso por el cual se generan radicales libres de O_2 y síntesis de óxido nítrico (ON). El ON tiene funciones protectoras incluida la destrucción de tumores, parásitos, hongos, bacterias y virus (Stanger *et al.*, 1994). En leishmaniasis in vitro el ON inhibe la conversión de amastigote hacia promastigote (Murria, 1982). Estos mecanismos pueden ser activados mediante la secreción de citocinas con efecto microbicida: IFN- γ , TNF- α . El IFN- γ junto con el TNF- α inducen la síntesis de óxido nítrico (Barral, 1995).

Existen otras citocinas que juegan un papel importante en la inmunofisiología de la leishmaniasis; como por ejemplo la IL-12. En tejidos infectados los macrófagos no liberan IL-12 en respuesta a un estímulo y tampoco parece que los macrófagos sean la fuente primaria de IL-12 en tejidos lesionados. Estos datos han indicado que los macrófagos son la última respuesta a la destrucción de organismos (von Stebut *et al.*, 1998).

Al igual que los macrófagos, los parásitos también cuentan con mecanismos desconocidos hasta el momento, para evadir la actividad microbicida dentro del fagolisosoma, una posibilidad es que la infección de los macrófagos por parásitos resistentes inhibe su capacidad para activarse o que apagan la actividad de macrófagos previamente activados (Scott *et al.*, 1983).

El estado de desarrollo de *Leishmania* parece ser otra de las formas de evasión a los mecanismos de erradicación del parásito. Se ha observado que los promastigotes son más susceptibles al peróxido de hidrógeno, mientras que los amastigotes son cuatro veces más resistentes y contienen más catalasa y glutatión peroxidasa que los primeros (Isaza *et al.*, 1996). Esta marcada diferencia consiste en el temprano desarrollo de la mitocondria en amastigotes en comparación con los promastigotes (Lemesre *et al.*, 1997).

Extracelularmente, los promastigotes no infectivos de *Leishmania* son sensibles a la fijación y lisis del complemento, para tal efecto el parásito despliega diversas acciones para evadir los efectos antileishmania: 1) *Leishmania* activa complemento vía clásica y alterna, 2) La proteína gp63 de *Leishmania* acelera la conversión de C₃b a C₃bi (C₃b inactivo) molécula que funciona como opsonina para los macrófagos (Bogdan y Rollinghoff, 1998). 3) La lisis de promastigotes por el complejo C5-9 de ataque a la membrana, es inhibido por moléculas de superficie de *Leishmania* como son la gp63 y la lipofosfoglicana (LPG) (Mosser y Brittingham, 1997).

Existen dos receptores de complemento, CR1 y CR3 que median la adhesión de macrófagos a moléculas de *Leishmania* CR3 es el receptor predominante involucrado en el enlace de ambos estados de promastigote in vitro, la fase logarítmica (no infectiva) y la fase estacionaria (infectiva) (Russell y Talamas, 1989).

La piel es el primer lugar de contacto cuando sobreviene una infección por *Leishmania* y en ella ocurren importantes procesos inmunológicos ya sea humorales o celulares para tratar de contrarrestar la enfermedad. Durante este proceso intervienen diferentes células tales como linfocitos T, queratinocitos, mastocitos, células de Langerhans y células endoteliales entre otras.

Los macrófagos y células de Langerhans (CL) situados en la piel de los mamíferos, han sido identificadas como poblaciones celulares importantes, que son invadidas en el curso de la enfermedad y son consideradas como un lugar privilegiado para los parásitos. Estos grupos celulares contribuyen a la inducción y expresión de células mediadoras de inmunidad durante la leishmaniasis cutánea.

Las CL son células dendríticas inmaduras localizadas próximas al sitio de inoculación de la infección e implica que en la epidermis se encuentran en un estado funcional inactivo (von Stebut *et al.*, 1998; Streinlein y Grammel, 1989). La función de las CL involucra dos componentes desarrollados en secuencia, una presentación en la cual los antígenos son tomados de los tejidos como la piel y una actividad de sensibilización en la cual las CL adquieren capacidad para inducir una respuesta en los linfocitos T (Romani *et al.*, 1989; von Stebut *et al.*, 1998). A pesar de endocitar amastigotes de un tamaño variable de entre 2-5 μm , las CL presentan una baja actividad endocítica en comparación con el nivel exhibido por los macrófagos (Puré *et al.*, 1990; Blank *et al.*, 1993) siendo su papel preferencialmente célula presentadora de antígeno (CPA).

En leishmaniasis cutánea las CL migran de la epidermis hacia el sitio de infección localizada en la dermis, en donde reciben señales que estimulan la maduración. Estas CL expresan su actividad después de la migración hacia el bazo y nódulos linfáticos (von Stebu *et al.*, 1998; Blank *et al.*, 1993; Romani *et al.*, 1989, Streilein y Grammel, 1989). Participan en la generación del proceso inflamatorio expresando moléculas tipo II del MHC, observadas solo en LCL (Barral *et al.*, 1995) y moléculas de adhesión. Actúan como estimuladores de linfocitos T, promoviendo una respuesta tipo Th1 (Castés *et al.*, 1998).

3.7 Histopatología

La acumulación temprana de células fagocíticas mononucleares (o hiperplasia) en los tejidos invadidos es una característica común en todas las variaciones clínicas y geográficas de la leishmaniasis. Las especies dermatópicas inducen un histiasoma inicial en la piel. Los cambios patológicos que caracterizan a varias de las formas clínicas refleja el

balance entre la multiplicación del parásito, que resulta en un cambio degenerativo y la respuesta inmune del paciente (WHO, 1984).

Los cambios histológicos que ocurren en la leishmaniasis cutánea son denominados por la evidencia de la hipersensibilidad retardada a los antígenos de parásitos (WHO, 1984).

En la LC la respuesta histológica puede ser reconocida por la respuesta inmune celular y por la respuesta del tejido.

Respuesta inmune celular. En formas tempranas o en pacientes con bajos niveles de anticuerpos existe un gran número de macrófagos, algunos vacuolados llevando gran cantidad de parásitos. El infiltrado de linfocitos y células plasmáticas incrementa progresivamente como simultáneamente lo hace la lesión involucrada.

La eliminación de parásitos es seguido usualmente por la destrucción de macrófago del hospedero. Esto ocurre en grupos situados en la dermis, con la liberación de amastigotes o en macrófagos de la zona subepidérmica, se causa la licuefacción de la capa basal y ulceración. Los leucocitos polimorfonucleares están presentes en la zona necrótica y los linfocitos son numerosos en la periferia. La resolución ocurre por el reemplazo de los centros necróticos por células gigantes de Langerhans y algunas células epiteloides. Estudios citoquímicos sugieren que los complejos inmunes juegan un papel esencial en la necrosis. Las lesiones que no llegan a la necrosis se convierten en crónicas y desarrollan una histología tuberculoide con solo algunos parásitos. Durante la infección con *Leishmania mexicana* el proceso necrótico puede ser muy severo, llegando a destruir el cartílago de la oreja (WHO, 1984).

La histopatología en pacientes ha sido descrita como una reacción exudativa celular que coincide con un tiempo de evolución de menos de 2 meses, sugiriendo que ésta es la primera reacción del hospedero a la presencia de el parásito en el tejido (Isaza *et al.*, 1996). Las lesiones del género *Leishmania* son caracterizadas por un influjo temprano de neutrófilos, eosinófilos y monocitos. En formas de autolimitación de la infección, las lesiones maduran lentamente a granulomas consistentes de células infectadas rodeadas por macrófagos con linfocitos y migración de neutrófilos (Badolato *et al.*, 1996). En la mayoría de las lesiones estudiadas se encuentran todos los fenotipos de células T, a través del infiltrado inflamatorio. Las células T, CD8 son confinadas a la zona del manto rodeando al granuloma. Esta organización de linfocitos T ha sido reportado para granulomas de tuberculosis leproide (Pirmez *et al.*, 1990). También hay predominio de un tipo de infiltrado caracterizado por abundantes células mononucleares y la formación de granulomas ha sido asociada con leucocitos polimorfonucleares.

3.8 Antecedentes.

Dos de las formas clínicas de la leishmaniasis: LCL y LCD, son producidas por la misma especie: *Leishmania mexicana mexicana* (Figura 9). Varios autores han propuesto la posibilidad de que una cepa produzca varias formas clínicas debido, quizás, a pequeñas variaciones genéticas dentro de la misma cepa. Becker *et al.* (1996), realizaron estudios en pacientes con LCL y LCD, utilizando la reacción en cadena de polimerasa empleando RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y enzimas de restricción, con lo cual detectaron pequeñas variaciones genéticas del parásito.

En modelos experimentales, se han presentado evidencias considerables que sugieren que la infección con *Leishmania* es influenciada por factores genéticos del hospedero que puede afectar no solo la susceptibilidad a la infección, sino la capacidad de montar una respuesta inmune contra el parásito (Castés *et al.*, 1983).

Además, un número substancial de estudios dejan demostrado claramente que muchas patologías autoinmunes, alergias, infecciones y en otras enfermedades están correlacionadas con el desarrollo de distintas subpoblaciones de células T-CD4 (Coffman *et al.*, 1999).

CARACTERÍSTICAS CLINICAS DE LA LC EN MEXICO		
CARACTERISTICA	LCL	LCD
Lesión	Unica o multiple	Todo el cuerpo
Tipo de lesión	Úlcera, Nodulo Placa infiltrada Placa atrófica Vegetante Acneiforme	Nódulos Placa infiltrada Placa atrófica
Via de diseminación	-----	Tisular Linfática Hemática
Tratamiento	Cura con tratamiento y a veces espontáneamente	Refractario

Figura 9. Características clínicas de la leishmaniasis cutánea en México (LCL y LCD)

La generación de anticuerpos monoclonales y de técnicas más recientes para el aislamiento de clones celulares y sus mediadores químicos (Carrada,1993) han podido

diferenciar varias subpoblaciones de células T CD8 y CD4, siendo esta última la que paradójicamente contribuye a la resistencia y susceptibilidad de *Leishmania* (Launois *et al.*, 1997).

Ritter *et al.*, 1996, por análisis inmunohistoquímico en lesiones de pacientes con LCL y LCD infectados con *L. mexicana mexicana* detectaron que para lesiones de LCL, la población predominante fueron los macrófagos (52%) y células CD3 (21 %) con un predominio de CD4. En comparación con LCL, la distribución y composición de leucocitos en lesiones de LCD, son los macrófagos la principal población (70 %) los linfocitos T fueron menos abundantes (12%). La reducida proporción de células T en LCD puede ser atribuida a una disminución en el número de células CD4, y una proporción inversa de CD4/CD8 comparado con lesiones de LCL. En suma, la diferencia en el porcentaje de células CD8 en LCL y LCD es importante (Figura 10).

Estudios realizados por Castés y Tapia (1998) en sangre periférica y lesiones de piel demuestran que las lesiones poseen componentes asociados con un proceso inflamatorio activo: numerosas células de Langerhans (CL), queratinocitos, acumulación selectiva de linfocitos T (Tapia *et al.*, 1994). Los granulomas son caracterizados por una proporción normal de CD4/CD8. En cuanto a lesiones de pacientes LCD, existen pocas CL y una producción defectuosa de monocinas. El granuloma está constituido por células del tipo Th2 con muchos macrófagos cargados de parásito, se caracterizan por una baja proporción de células CD4/CD8. En general, las proporciones de células CD4/CD8 son las mismas en lesiones que en sangre periférica (Tapia *et al.*, 1994).

CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS DE LA LC		
CARACTERISTICA	LCL	LCD
* Reacción de Montenegro	Positiva	Negativa
* Título de AC (IFI)	Bajo (\bar{x} = 1:8)	Alto (\bar{x} = 1:64)
* No. de parásitos en lesión	Escasos	Numerosos
Histología		
** Epidermis	Gruesa	Corta y aplanada
** Macrófagos	52%	72%
** Células T	21% CD4>CD8	12% CD4<CD8
** Neutrófilos	++	+
** Células B	++	+
** Células de Langerhans	Epidermis = Dermis	Epidermis > Dermis

Figura 10. Características inmunológicas e histológicas de pacientes con LCL y LCD.

(* Velasco- Castrejón,1990, **Ritter *et al.*,1996)

En 1990 Pirmez *et al.*, encontró en lesiones de pacientes con LCL producida por *L. braziliensis* existe un predominio de CD4 sobre CD8; Estas células CD8 están confinadas a la zona del manto rodeando el granuloma. Esta organización de células T ha sido reportado para granulomas leproso tuberculoides.

En cambio, Isaza *et al.*, 1996 encontraron que en lesiones con LCL causadas por *L. panamensis* un predominio de células CD8 sobre CD4. La predominancia de células observadas correspondió a macrófagos (50%) seguido de linfocitos (45.8 %).

Soong *et al.*, 1997, observaron en estudios histológicos de lesiones de ratones infectados con *L. amazonensis*, un infiltrado perivascular de 2 a 4 semanas post-infección

y entre las 8 y 12 semanas se encontró una extensa colección de macrófagos vacuolados y áreas focales de infiltración celular con una mezcla de linfocitos, células plasmáticas y leucocitos polimorfonucleares. En el estudio inmunohistoquímico se encontró que a las 9 semanas post-infección, las células CD4 se presentaron en mayor proporción que las CD8. Para las 20 semanas es escaso el número de CD8.

Al igual que en las otras dos formas clínicas, en LV existe un predominio de células CD4 sobre CD8 en humanos (Wilson *et al.*, 1996). Sin embargo, otros resultados indican que la proporción de CD4 es mucho más baja en bazo que en sangre periférica (Cenini *et al.*, 1993).

En cuanto a la presencia de parásitos en los órganos afectados, Lira *et al.*, 1998, realizaron un estudio comparativo en hamsters inoculados con varias cepas de *L. tropica* (LCL), con los siguientes resultados: a las 4 semanas posteriores a la inoculación se hallaron parásitos en bazo e hígado, entre las semanas 8 a 12 este número se incrementó y posteriormente permaneció constante y en algunos casos declinó significativamente, por lo que a las 32 semanas solo se encontraron niveles bajos en la infección.

Haciendo un análisis inmunohistoquímico en 30 biopsias de piel de pacientes con LCL, procesados con 2 anticuerpos monoclonales (Esterre *et al.*, 1992) encontraron que las células CD4 y CD8 fueron igualmente representados con una proporción local de CD4/CD8 de 1.05 ± 0.7 , contrastando con la observada en sangre periférica de 6 pacientes con el mismo tipo de enfermedad. Los marcadores de superficie en células mononucleares circulantes no fueron significativamente diferentes entre pacientes y controles sanos.

4. Objetivos

Objetivo general: Comparar las subpoblaciones de linfocitos CD4 y CD8 en bazo de ratones infectados con 2 cepas de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con LCL y LCD.

Objetivos particulares:

- Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para la detección de células CD4 y CD8 en ratones susceptibles BALB/c inoculados con *L. mexicana*.
- Comparar las curvas de infección de ratones BALB/c inoculados con cepas de LCL y LCD aislado de pacientes.
- Determinar y comparar el porcentaje de células CD4 y CD8 en el bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* aislada de pacientes con LCL y LCD en diferentes tiempos.
- Realizar un análisis histopatológico en bazo de ratones inoculados con LCL y LCD, observar la existencia de cambios morfológicos importantes, así como la presencia del parásito en diferentes tiempos de infección.

5 Metodología.

5.1 Ratones

Se trabajaron ratones hembras susceptibles BALB/c de 8 a 10 semanas de edad para la inmunohistoquímica y de 8 a 20 semanas para los grupos control en las curvas de infección. Los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la UNAM.

5.2 Obtención de parásitos e infección de ratones.

Para este estudio se utilizaron parásitos de *L. mexicana* de las cepas Esteban (LCL) MHOM/MX/93/INDRE EC y Fermín (LCD) MHOM/MX/93/INDRE FD conservados en medio RPMI 1640 (Gibson, USA) adicionado suero fetal de ternera (SFT) (HyClone, UTA, USA) en una proporción 9:1, crecidos hasta alcanzar la fase logarítmica infectiva de 8 días (Rivas, 1994). Del cultivo se tomaron 50 μ l para contar en cámara de Neubauer para poder determinar la cantidad necesaria de cada cepa para inocular a cada ratón con 1×10^6 promastigotes obteniéndose con 8 ml. del cultivo. Esta cantidad se centrifugo a 2500 rpm por 5 minutos, se decantó el pelet y se lavó con solución salina al 0.8%, este procedimiento se repitió 3 veces. Una vez obtenido el parásito se reconstituyó en 2 ml de solución salina al 0.8% suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB), en una proporción 9:1. A cada ratón se le inocularon 40 μ l de *Leishmania* intraplantarmente con una jeringa de insulina. (Figura 11)

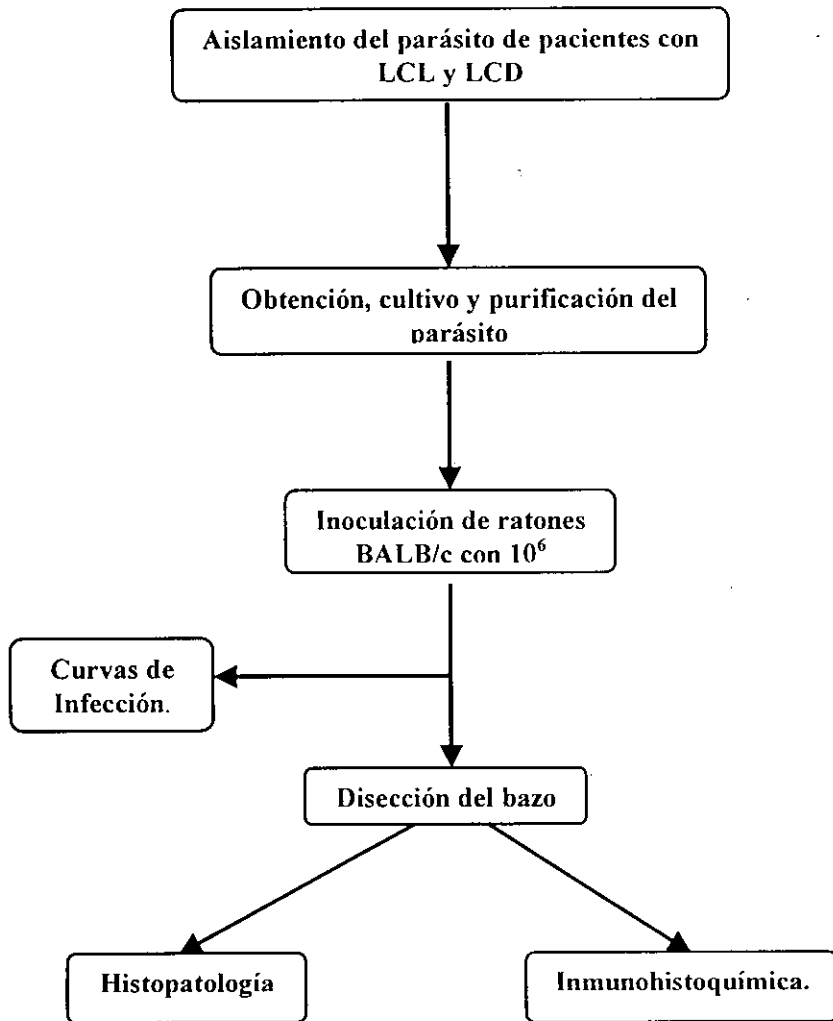


Figura 11. Metodología

5.3 Curvas de infección.

A partir de la fecha de inoculación en los periodos trabajados 5, 10, 15 y 20 semanas, con ayuda de un vernier (Scala, México) se realizaron las mediciones del cojinete plantar de la pata infectada de cada ratón y posteriormente se realizaron las curvas de infección, así como su observación para determinar la aparición de metástasis en alguna parte del cuerpo. Los datos obtenidos de estas mediciones se realizaron tomando en cuenta la medida en el grosor de la pata de los ratones infectados a la cual se le restó la medida del grosor de la pata control (2mm). Después de las 20 semanas se siguieron observando a los ratones hasta las 40 semanas para constatar la evolución de la enfermedad: presencia de nódulos o necrosis en alguna parte del cuerpo o muerte.

5.4 Histopatología

Al primer día y a las semanas 5, 10 y 15, se sacrificaron 4 ratones, obteniéndose el bazo para su análisis histopatológico e inmunohistoquímico. Los tejidos de cada ratón se fijaron en Zamboni (Zamboni. 1965) por 24 horas a 4°C, y posteriormente lavados con amortiguador de fosfatos para Zamboni. Una vez incluidos en parafina , se realizaron cortes de 4 μ m de grosor se procesaron para tinción de hematoxilina-eosina y Periodic acid-Schiff (PAS). Se observaron al microscopio para detectar la presencia del parásito o alteraciones estructurales importantes en la constitución del bazo.

5.5 Inmunohistoquímica.

En el tiempo seleccionado se disecó el bazo de cada animal incluyendo una parte del órgano en medio de soporte tisular (Jung, Alemania), se congeló con nitrógeno líquido y almacenados hasta su procesamiento a -70 C. Posteriormente se realizaron cortes de $4 \mu\text{m}$ de grosor en crióstato (Microm, USA) estos fueron colectados en portaobjetos cubiertos con poly L-lisina (SIGMA, USA) dejados secar al aire y fijados en acetona fría por 10 minutos secados a temperatura ambiente, lavados con amortiguador consistente de Tris 0.01M NaCl 0.15M adicionado con azida de sodio 0.01 %, albúmina sérica bovina (BSA) 0.1 % con un pH 7.4 (en este caso no se omitió el uso de ázida de sodio aun cuando se ha referido que reduce la actividad enzimática de la peroxidasa). Por un periodo de 30 min a temperatura ambiente, los cortes se bloquearon con leche descremada 0.1% y 10 % de suero fetal de ternera (SFT), disueltos en amortiguador.

Los cortes se incubaron en el primer anticuerpo monoclonal rata anti ratón CD4 (L3T4) con una dilución 1:100 (PharMingen, USA) y anticuerpo monoclonal de rata anti ratón CD8a (Ly-2) en una dilución 1:400 (PharMingen, USA) $100 \mu\text{l}$ a cada corte por 45 min a temperatura ambiente (en algunos casos el anticuerpo primario se dejó incubar toda la noche a 4° C). Se colocó el segundo anticuerpo conjugado ratón anti rata $\text{IgG}_1 / \text{IgG}_{2a}$ biotinado, dilución 1:200 (PharMingen, USA). Entre cada incubación se realizaron los lavados con el amortiguador antes referido La estreptavidina peroxidasa 1:75 fue diluida en Tris 0.05M pH 7.4 e incubada por 30 min., en este último lavado se utilizó amortiguador de Tris 0.1M, pH 7.4 (Figura 12).

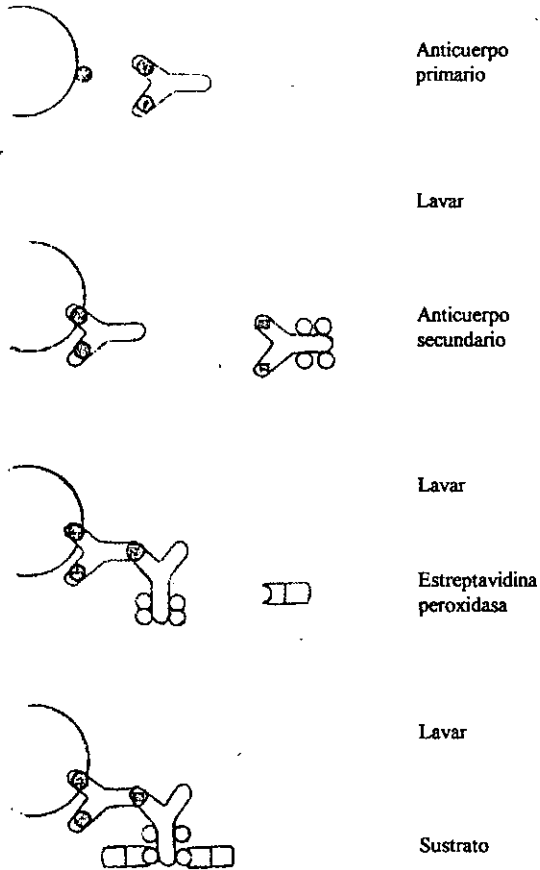


Figura 12. Técnica de inmunohistoquímica . El anticuerpo primario se une al antígeno de la célula. Un segundo anticuerpo secundario biotinado reacciona con el anticuerpo primario. La streptavidina peroxidasa reacciona con la biotina del anticuerpo secundario. El sustrato se une a este complejo el cual al agregarse el cromógeno da una reacción colorida (Barret, 1990).

El cromógeno utilizado fue diaminobenzidina (Sigma USA) 0.0025g en 5 ml. de Tris 0.1M y 50 μ l de H₂O₂ (la reacción del sustrato es muy rápida y se preparó justo antes de comenzar a revelar) y se observó en el microscopio hasta detectar reacción (10 min) se detuvo la reacción sumergiendo los cortes en agua por 1 minuto.

Los controles se realizaron sin colocar primer ni segundo anticuerpos, substituyendo éstos por amortiguador. Se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 1 min y fueron aclarados con cloruro de Litio y montados en resina sintética.

Al igual que otros estudios inmunohistoquímicos, en preparaciones de bazo de ratón, algunas células se tiñeron positivamente sin previa incubación de algún anticuerpo, estas células aparentemente fueron células polimorfonucleares, indicando probablemente que las macromoléculas de biotina están presentes en su superficie (Guesdon *et al* 1979). Este fue el margen de error considerado para la cuantificación de CD4 y CD8 y eliminar el sesgo, se tuvo un control negativo, sin anticuerpo primario y secundario.

5.6 Cuantificación de células.

El número de células se evaluó contando el número total de células y el número de células teñidas por campo (en 10 campos) por cada corte de bazo, con un aumento 100 x. El total se expresó como el promedio de los porcentajes \pm la desviación estándar . Se consideraron como células positivas solo aquellas en las que se observó el núcleo y la tinción rodeando al linfocito.

5.7 Análisis estadístico.

Para determinar diferencias en la inmunohistoquímica en los diferentes tiempos de infección, se realizó una comparación entre los porcentajes y desviaciones estándar de los dos grupos estudiados, LCL y LCD y controles, mediante la prueba estadística t-student para muestras independientes. El análisis se realizó en el programa Origin versión 4.1. Se consideraron como muestras independientes las que presentaron una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis Histopatológico.

En el análisis histopatológico de los cortes de bazo teñidos por H-E y PAS, no presenta cambios estructurales importantes con respecto al bazo testigo en los diferentes tiempos de infección (Figura 13), tanto en LCL como en LCD (Figura 14), así como la ausencia del parásito en el tejido.

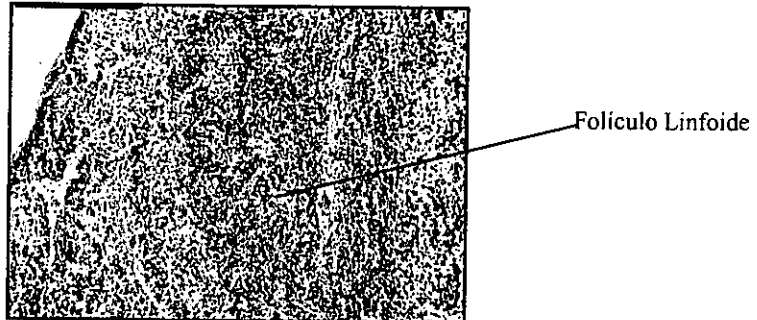


Figura 13. Corte histológico de bazo de ratón testigo, realizado por tinción de PAS, con un aumento 40x.

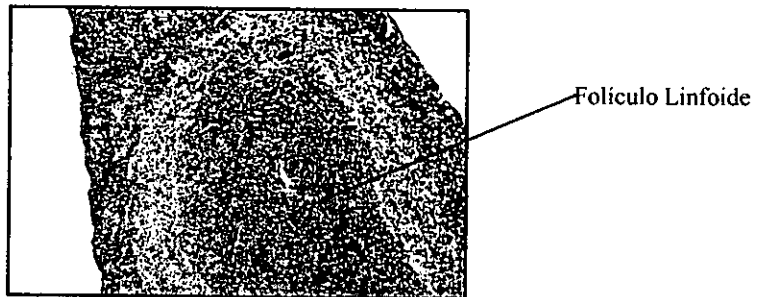


Figura 14. Corte histológico de bazo de ratón BALB/c inoculado con cepa de paciente aislado de LCD, 5ª semana, realizado por tinción de PAS, con un aumento 40x

6.2 Curvas de infección.

En ambas curvas de infección se registraron los tiempos manejados en la evolución de la patología. Las lesiones en las patas de los ratones se observaron como un engrosamiento del cojinete plantar, las cuales comenzaron a distinguirse a partir de la 3ª semana (Tabla 1).

Tiempo	LC	Prom \pm DS
5 semanas	LCL	1.08 ± 0.25
	LCD	0.4 ± 0.054
10 semanas	LCL	2.6 ± 0.57
	LCD	1.2 ± 0.075
15 semanas	LCL	5.15 ± 0.40
	LCD	4.5 ± 0.14
20 semanas	LCL	9.36 ± 0.66
	LCD	6.1 ± 0.12

Tabla 1. Promedio \pm DS de las curvas de infección del cojinete plantar de ratones Balb/C inoculados con cepas de LCL y LCD aislados de pacientes.

A partir de la 5ª semana el aumento en el grosor de la pata en ambos grupos fue diferente, percibiéndose a partir de este tiempo mayor aumento en el cojinete de LCL (1.08 ± 0.25 mm) que en LCD (0.4 ± 0.05 mm). A la 10ª semana LCD aumentó 3 veces más (1.2 ± 0.07 mm) con respecto al periodo anterior, mientras LCL mantuvo un incremento proporcional (2.6 ± 0.057 mm) de acuerdo con los datos de la 5ª semana, en este caso la diferencia entre ambos grupos de ratones en este tiempo fue de casi 1 mm. En la 15ª semana LCL su crecimiento fue el doble (5.15 ± 0.40 mm) con respecto al tiempo anterior, mientras LCD (4.5 ± 0.4 mm) aumentó casi 4 veces más con respecto a la 10ª semana. En el

transcurso de la 15ª a la 20ª semana fue cuando la diferencia entre los 2 grupos de ratones se hizo evidente, LCL presentó mayor engrosamiento de la pata (9.36 ± 0.66 mm) siguiendo su crecimiento lineal, mientras que en LCD (6.1 ± 0.12 mm) este aumento se dio de forma mas pausada (Figura 15).

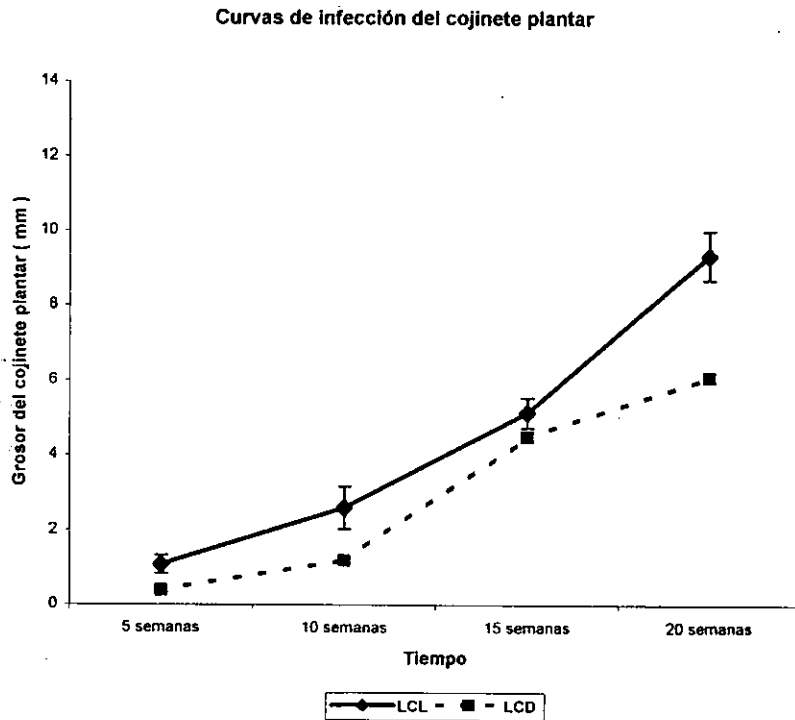


Figura 15 Curvas de infección del cojinete plantar de ratones BALB/c inoculados con 1×10^6 parásitos de cepas aisladas de pacientes con LCL y LCD de *L. mexicana*.

Por otra parte se observó la aparición de nódulos a causa de *Leishmania* en la cola a la 19ª semana en ratones con LCL, en tanto que para LCD no se presentaron

diseminaciones en la 20ª semana de registro. Para ambas cepas de *Leishmania* en los periodos de tiempo observados para la evolución de la enfermedad, la extremidad inoculada se necrosó y se perdió a la 39ª semana. Durante el tiempo de estudio las lesiones tanto en LCL como en LCD no se curaron espontáneamente o presentaron alguna mejoría.

6.3 Inmunohistoquímica.

Para ambas formas clínicas, las células CD4 y CD8 se encuentran situados en gran número en los folículos germinales del bazo y rodeando las arteriolas esplenicas (Figura 16 y 17).

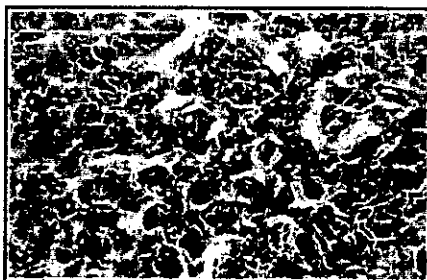


Figura 16. Inmunohistoquímica en bazo de ratón testigo. Aumento 100x

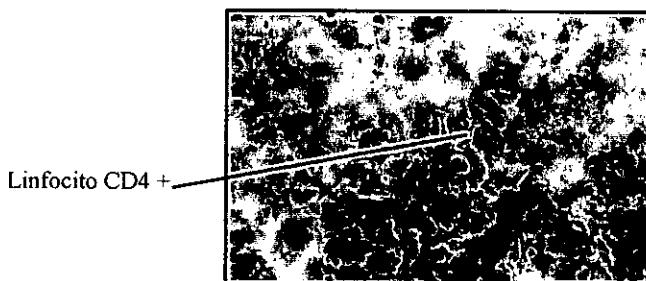


Figura 17. Inmunohistoquímica en bazo de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* (LCL 5ª semana) Aumento 100 x

En la figura 18 se observa el porcentaje de células CD4 y CD8 de los ratones infectados con LCL. Para CD8 no existió diferencia entre el testigo (3.75 ± 0.49) y el ratón del primer día (3.74 ± 0.66 mm) pero se consideró como poblaciones distintas ($p = 0.649$). A partir de la 5ª semana se dio un aumento en el número de células (6.07 ± 0.39) con lo cual en este tiempo rebasó el promedio del porcentaje del grupo control ($p = 1.93 \times 10^{-5}$). En la 10ª semana el ascenso de estas células es mínimo (6.96 ± 1.10) pero sin estar sobre los niveles del control ($p = 4.85 \times 10^{-5}$). Para la 15ª semana el incremento se hizo evidente y aumentó casi el doble (9.65 ± 0.87) en comparación con la 10ª semana, teniendo para este tiempo una diferencia significativa con los ratones testigo ($p = 4.08 \times 10^{-8}$) quedando por encima de su promedio del porcentaje de células.

Se trabajó un grupo de ratones testigos de distintas edades para cada tiempo de infección, al no observarse diferencias en cuanto al número de células CD4 y CD8 se decidió trabajar una sola población que abarcará todos los tiempos estudiados.

En cuanto a las células CD4 se registró una disminución importante al primer día de infección (5.57 ± 0.39) con respecto al testigo (8.57 ± 0.69) $p = 5.56 \times 10^{-6}$, conforme transcurrió el tiempo hasta llegar a la 5ª semana el número de células se elevó (9.38 ± 0.41) pero sin tener una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p = 0.19$). El incremento de estas células continuó hacia la 10ª semana (10.55 ± 1.26) rebasando el promedio del porcentaje del control. A la 15ª semana el número de CD4 siguió aumentando pero de forma paulatina (10.93 ± 0.77) y al igual que para las células CD8 fue en este tiempo cuando se tuvo una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p = 8.2 \times 10^{-8}$). (Tabla 2)

Tiempo	Linfocito	Prom % \pm DS	t-student	p*
Testigo	CD4	8.57 \pm 0.69		
	CD8	3.75 \pm 0.49		
1 día	CD4	5.57 \pm 0.39	-8.69	5.65 x 10 ⁻⁶
	CD8	3.74 \pm 0.66	-0.46	0.64
5 semanas	CD4	9.38 \pm 0.41	1.38	0.19
	CD8	6.07 \pm 0.39	-7.55	1.93 x 10 ⁻⁵
10 semanas	CD4	10.55 \pm 1.26	3.07	0.01
	CD8	6.96 \pm 1.10	6.78	4.85 x 10 ⁻⁵
15 semanas	CD4	10.93 \pm 0.77	4.71	8.24 x 10 ⁻⁴
	CD8	9.65 \pm 0.87	14.75	4.08 x 10 ⁻⁸

* p < 0.05, valor significativo

Tabla 2. Prueba t-student para células CD4, CD8 y testigo de LCL en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L mexicana* en diferentes tiempos de infección.

Porcentaje de células CD4 y CD8 en ratones infectados con LCL

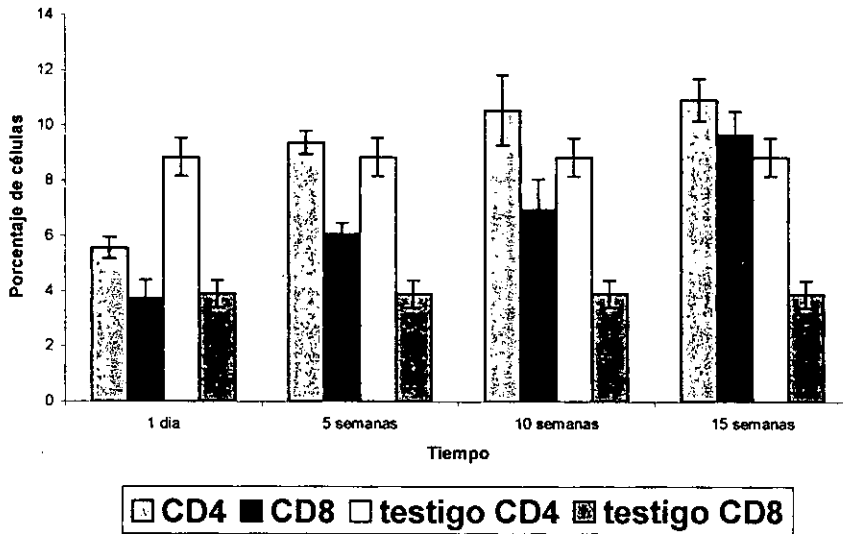


Figura 18. Porcentaje de células CD4 y CD8 en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL, en diferentes tiempos de infección, determinados por la técnica de inmunohistoquímica

Respecto a LCD (Figura 19) CD8 al primer día (3.06 ± 0.32) se observó ligeramente por debajo del promedio del porcentaje en los ratones testigo (3.75 ± 0.49) a pesar de eso considerándose como poblaciones distintas ($p = 0.01$). Para la 5ª semana se registró un ligero descenso en el número de CD8 (3.12 ± 0.25) con respecto a el testigo, pero presentando valores iguales de ($p = 0.01$). A la 10ª semana las células incrementaron (5.6 ± 0.13) en comparación con el periodo anterior, siendo significativamente distinto de los valores del grupo control ($p = 6.39 \times 10^{-5}$). El incremento a la 15ª semana se dio en menor grado pero guardando la proporción lineal respecto a los periodos anteriores (7.37 ± 0.54), siendo una población evidentemente diferente al testigo ($p = 6.33 \times 10^{-7}$).

Las células CD4 al igual que en LCL, disminuyeron drásticamente al primer día (4.55 ± 0.38) con respecto al testigo (8.57 ± 0.69). Para la 5ª semana el número aumentó considerablemente (6.04 ± 0.66) pero no lo suficiente como para llegar a los niveles del control ($p = 5.29 \times 10^{-5}$). A la 10ª semana el aumento fue mínimo (7.66 ± 0.74) con respecto al tiempo anterior, considerado como una población distinta comparado con el testigo ($p = 0.02$). Hacia la 15ª semana (8.96 ± 0.65) las células alcanzaron el promedio del porcentaje del grupo control, después de la caída de linfocitos al primer día de infección, pero sin considerarse como poblaciones distintas ($p = 0.81$). En este caso CD4 nunca llegó a rebasar el número de células del grupo control en los distintos periodos de tiempo estudiados (Tabla 3).

Tiempo	Linfocito	Prom % \pm DS	t-student	p*
Testigo	CD4	8.57 \pm 0.69		
	CD8	3.75 \pm 0.49		
1 día	CD4	4.55 \pm 0.38	-11.41	4.64 x 10 ⁻⁷
	CD8	3.06 \pm 0.32	-2.99	0.01
5 semanas	CD4	6.04 \pm 0.66	-6.71	5.29 x 10 ⁻⁵
	CD8	3.12 \pm 0.25	-2.86	0.01
10 semanas	CD4	7.66 \pm 0.74	-2.75	0.02
	CD8	5.60 \pm 0.13	6.55	6.39 x 10 ⁻⁵
15 semanas	CD4	8.96 \pm 0.65	0.24	0.81
	CD8	7.37 \pm 0.54	11.04	6.33 x 10 ⁻⁷

* p < 0.05, valor significativo

Tabla 3. Prueba t-student para células CD4 y CD8 de LCD en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* en diferentes tiempos de infección.

Porcentaje de células CD4 y CD8 en ratones infectados con LCD

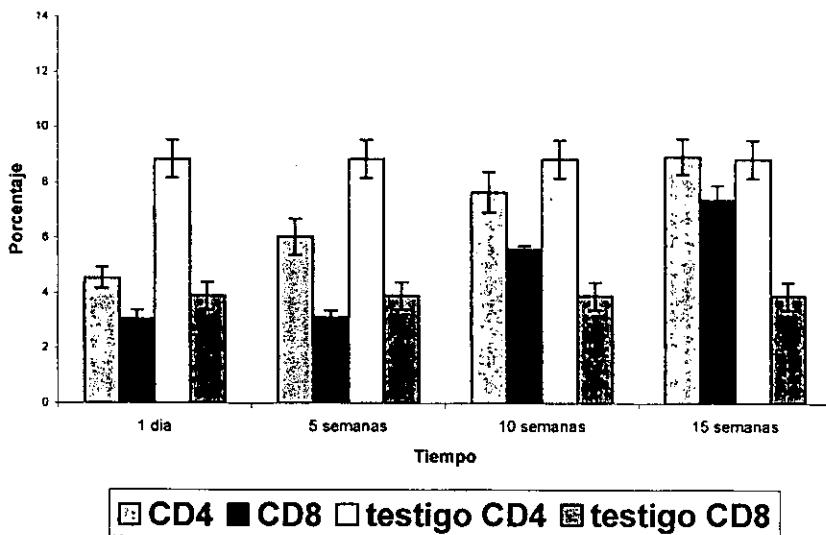


Figura 19. Porcentaje de células CD4 y CD8 en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* aislados de paciente con LCD en diferentes tiempos de infección, determinado por la técnica de inmunohistoquímica.

En la tabla 4 se comparan las células CD4 y CD8 entre las formas clínicas manejadas. En CD8 (Figura 20) al primer día en LCL y LCD se mostraron como poblaciones iguales ($p = 0.06$). En la 5ª semana LCL aumentó mientras LCD mantuvo la misma cantidad de células que al primer día considerándose significativamente diferentes ($p = 8.97 \times 10^{-4}$). A la 10ª semana LCD aumentó (5.6 ± 0.13) alcanzando el número de LCL (6.96 ± 1.10), hecho que se observó en el nivel de significancia el cual los manejo como poblaciones distintas ($p = 0.09$). En la 15ª semana LCL aumentó nuevamente sobre el promedio del porcentaje de LCD, teniendo en este tiempo una diferencia considerable ($p = 0.03$). En todos los tiempos registrados, las células CD8 en LCD siempre se observaron por debajo del porcentaje de LCL.

Tiempo	Linfocito	t-student	p*
Testigo	CD4 CD8		
1 día	CD4	6.84	0.006
	CD8	2.94	0.06
5 semanas	CD4	9.06	0.002
	CD8	13.4	8.97×10^{-4}
10 semanas	CD4	3.52	0.03
	CD8	2.43	0.09
15 semanas	CD4	8.49	0.003
	CD8	3.84	0.03

* $p < 0.05$, valor significativo

Tabla 4. Prueba t-student para células CD4 y CD8 en bazo de ratones BALB/c inoculados con cepas de *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL y LCD.

Porcentaje de células CD8 en ratones infectados con LCL y LCD

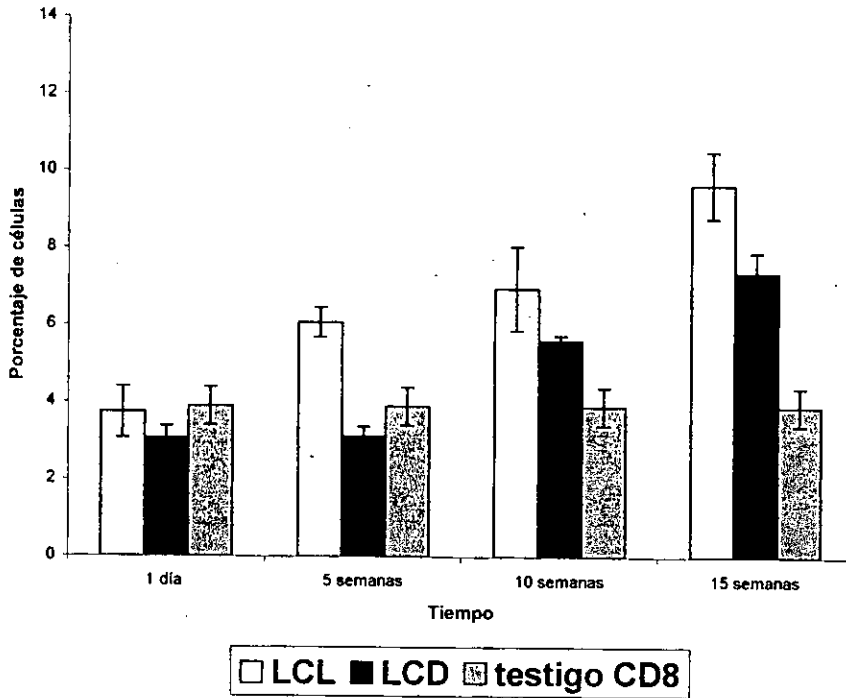


Figura 20 Porcentaje de células CD8 en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL y LCD en diferentes tiempos de infección, determinado por inmunohistoquímica.

El promedio del porcentaje de células CD4 entre LCL y LCD se observó con una diferencia significativa en todos los tiempos estudiados, sin embargo al igual que lo sucedido con las células CD8 en LCD el número de células permaneció por debajo de LCL e inferior al testigo, excepto para la 15ª semana. De igual forma para ambos casos el porcentaje de CD4 disminuyó radicalmente al primer día con respecto al testigo (Figura 21).

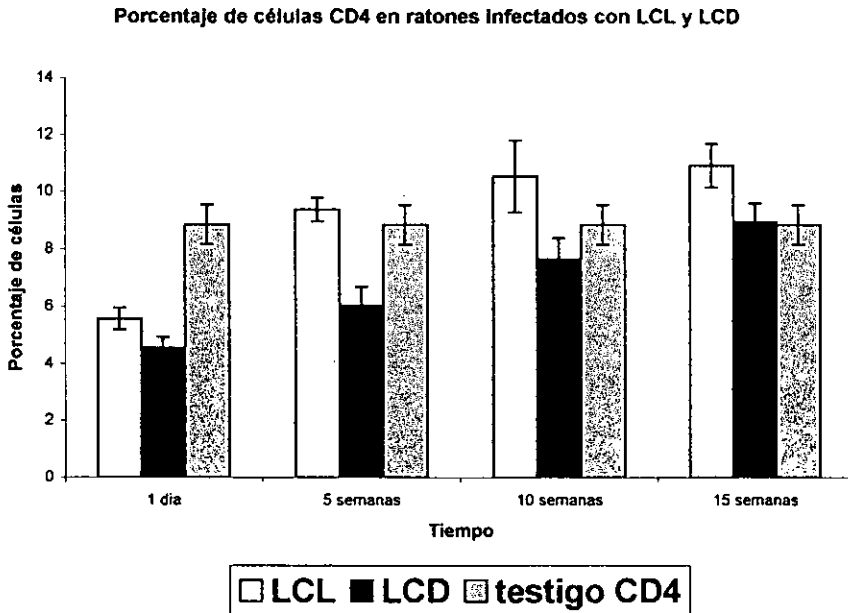


Figura 21. Porcentaje de células CD4 en bazo de ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL y LCD en diferentes tiempos de infección, determinado por la técnica de inmunohistoquímica.

7. Discusión.

Se realizó un estudio histopatológico e inmunohistoquímico de los bazos de ratones BALB/c inoculados intraplantarmente con 1×10^6 promastigotes de 2 cepas de *Leishmania mexicana*, aislada de un paciente con LCL y otra aislada de LCD. Se decidió para este trabajo inocular ratones con 1×10^6 parásitos, cantidad suficiente para producir una lesión y tener un amplio margen de error al momento del conteo e inoculación con *Leishmania* pues de acuerdo a el trabajo realizado por Rivas (1989), al infectar ratones con diferentes cantidades de *L mexicana* (0.1×10^6 , 1×10^6 y 3×10^6) no observó diferencias importantes en los cojinetes plantares de los ratones al realizar sus respectivas curvas de infección. En este trabajo con la dosis inoculada las lesiones en la pata se comenzaron a detectar a la 3ª semana y las metástasis en la cola hacia la 19ª semana. Las lesiones en las patas así como las metástasis tanto en LCL como en LCD no se curaron o presentaron alguna mejoría en el tiempo que duró esta investigación. Después del periodo de medición y observación de los ratones, la enfermedad progresó hasta la 39ª semana, periodo en el que la extremidad presentó necrosis y por lo tanto pérdida de la pata infectada, motivo por el cual el animal se vio impedido para sostenerse y trepar para conseguir su alimento muriendo de inanición como respuesta secundaria a la infección.

Los datos obtenidos en este trabajo concuerdan con los referidos por Rivas (1989), con respecto al tiempo de aparición de las lesiones y metástasis, pero difieren con varios grupos de investigación que han reportado que después de la inoculación con dosis diferentes de *L tropica* (1×10^5 y 1×10^6) las lesiones curaron entre las 6 y 18 semanas respectivamente (Preston *et al.*, 1978). Mientras al inocular cantidades mayores de *L major*

(1×10^7 y 2×10^6) se desarrollaron lesiones necróticas, ulcerativas y no curativas (Mohrs *et al.*, 1999). Aun cuando otras investigaciones también han trabajado con *L. mexicana* (Pérez *et al.*, 1979) sus resultados no concuerdan con los obtenidos en este trabajo, pues observaron la aparición de nódulos a la 2ª semana y metástasis en la cola en la 6ª semana. Por lo tanto, comparando todos estos resultados se podría deducir que *Leishmania* presenta variaciones en cuanto al tipo de enfermedad que pueda producir de acuerdo a la especie, su localización geográfica y a la dosis inoculada.

En las curvas de infección desde las 15 semanas se observaron diferencias en el grosor de la pata para LCL y LCD, los 2 grupos de ratones presentaron aumento en el grosor del cojinete, pero es en LCL donde se dio un aumento mayor en el grosor de la pata teniendo su máximo a partir de las 15 semanas (5.15 ± 0.40). Podría decirse que fue en este momento cuando en LCL comenzó a montarse una respuesta en contra del parásito, mientras LCD presentó una inmunosupresión pues en todos los tiempos siempre permaneció con niveles inferiores a los de LCL.

Histopatológicamente en esta investigación, la ausencia de cambios morfológicos evidentes en el bazo disecado de los ratones, así como la falta del parásito en el tejido nos indica que las cepas utilizadas de *L. mexicana* aparentemente no se diseminaron al bazo a las 15 semanas postinfección estos resultados son comparables con los obtenidos por Soong *et al.* (1997), en bazo de ratones infectados con *L. amazonensis*. La ausencia de parásitos en el bazo podría explicarse por los datos reportados por Stenger *et al.*, 1994 donde en tejidos de bazo e hígado de ratones infectados con *L. mexicana* existe una alta producción de ON, el cual tiene un efecto citotóxico en los parásitos, lo que sugiere que esto sea un mecanismo protector en contra de la expansión de los parásitos hacia estos órganos.

Por otro lado, las células involucradas en los diferentes tipos clínicos de las leishmaniasis han sido ampliamente estudiadas en lesiones y sangre periférica de pacientes, encontrándose grandes diferencias entre sí. Teniendo como base lo anterior, en este trabajo se realizaron estudios inmunohistoquímicos *in situ* de las 2 cepas de *L. mexicana* estudiadas, con el fin de obtener más información para tratar de comprender los mecanismos del proceso infeccioso y se determinó si existen diferencias inmunológicas entre ellas.

El primer paso y uno de los objetivos de este estudio fue la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica, en el cual se enfrentó el problema de encontrar la dosis requerida del anticuerpo, y al mismo tiempo definir las cantidades adecuadas, el cual no solo depende de la concentración sino también del tejido a estudiar, el medio de montaje del mismo (por congelación o parafina), el cromógeno, los amortiguadores de lavado, los tiempos de incubación y los adhesivos para los portaobjetos.

La inmunohistoquímica se ha utilizado en muchos casos para hacer una caracterización de las células o citocinas presentes en un tejido. Los estudios hechos *in situ* además de proporcionar una visión en la distribución de dichas células, permite también investigar la respuesta inmune celular, ya que las reacciones antígeno-anticuerpo son una de las más específicas en biología razón por la cual las reacciones inmunohistoquímicas son más precisas que las técnicas histoquímicas ordinarias. En este caso el uso de las tinciones con inmunoperoxidasa en el bazo resultó ser el método de tinción más eficaz por ser la peroxidasa una enzima muy estable, fácil de obtener, de tamaño pequeño y por no unirse a anticuerpos de sitios adyacentes, ya que las pequeñas cantidades de peroxidasa endógena de los tejidos puede ser inhibida fácilmente, además existe una alta disponibilidad de cromógenos.

En este trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales buscando caracterizar algunas de las células implicadas en la respuesta inmune celular (CD4 y CD8). Quizás una de las dificultades a enfrentar con el uso de anticuerpos monoclonales como herramienta en la investigación, es encontrar las condiciones óptimas para obtener resultados satisfactorios.

Uno de los problemas más comunes en las tinciones inmunológicas resultado de la unión antígeno-anticuerpo, son las reacciones no específicas causadas por la unión de proteínas a sitios del tejido altamente afines. Si se aplicara el primer anticuerpo al tejido, este se unirá inespecíficamente a estos lugares con carga eléctrica. Por tal motivo, es indispensable bloquear previamente aplicando una proteína inocua a la muestra antes de colocar el primer anticuerpo y de esta manera eliminar los sitios de carga. El método más usado y realizado para este trabajo fue el empleo de un bloqueador de leche descremada suplementada con SFT. Es importante que el suero usado no presente hemólisis, pues provoca tinción alrededor de las células rojas dando falsos positivos (Bourne, J *et al.*, 1994).

Cuando se quiere determinar la dilución adecuada en los métodos de tinción con inmunoperoxidasa, se deben tomar en cuenta varios factores: concentración del anticuerpo, número de sustancias no específicas presentes en los anticuerpos, tiempo de incubación, amortiguadores de lavado y diluciones, así como la fijación del tejido. La concentración del anticuerpo es muy importante para tener una buena reacción, ya que si el anticuerpo es escaso, se reduce la posibilidad de detectar la reacción antígeno-anticuerpo. De esta manera se tiene que encontrar una dilución exacta para el primer anticuerpo y combinar diluciones tanto del anticuerpo secundario como del conjugado avidina-biotina (AB) (Guesdon *et al.*, 1979).

Por otro lado, el amortiguador usado fue Tris 0.01 M NaCl 0.15 M, azida de sodio (NaN₃) 0.01% y BSA 0.1%. Mucho se ha discutido acerca del uso de NaN₃ en tinciones

donde el sustrato es la enzima peroxidasa, pues en altas concentraciones la azida de sodio compete por la unión en el sustrato con la peroxidasa inhibiendo la coloración. Este buffer se utilizó sólo en los lavados del primer y segundo anticuerpo, no así para diluir el conjugado AB y realizar sus lavados, teniendo un resultado satisfactorio, eliminando fondos oscuros y reacciones inespecíficas en el tejido (Ghobrial *et al.*, 1989).

Para considerar una tinción positiva o descartar falsos positivos se consideraron varios factores, son positivas aquellos tejidos donde el precipitado de DAB oxidada se observa bordeando la superficie de las células, las que están localizadas en la pulpa roja y centros germinales. Los linfocitos deben tener variación en la intensidad del color, pues no todas tienen la misma cantidad de marcador (Bourne, 1983).

En México *L. mexicana* produce leishmaniasis cutánea la cual a su vez se divide en LCL y LCD. Partiendo del hecho de que ambas se diferencian notablemente a nivel clínico, varios investigadores decidieron realizar estudios en varios aspectos para establecer si esta distinción se presenta en otros niveles, tales como histológico, antígenos de superficie y molecular. En cuanto a las proteínas integrales de superficie de membrana de promastigotes, Rivas *et al.* (1994) encontraron diferencias en las cepas aisladas de LCL, LCD y LCPD lo cual sugiere la importancia del antígeno de *Leishmania* involucrado en la respuesta del huésped.

En el aspecto molecular Berzunza *et al.* (2000) realizaron análisis de ADN del kinetoplasto de los aislados de LCL, LCD y LCPD, utilizando diversos patrones de enzimas de digestión. Los resultados evidenciaron que la heterogeneidad de ADN en especies de *L. mexicana* podría estar relacionado directamente con la enfermedad clínica, sugiriendo que distintos patrones de proteínas de restricción puede tener implicaciones biológicas

importantes. Este trabajo fue la pauta para estudios posteriores en donde se determinaron moléculas de superficie

Leishmania presenta moléculas de superficie como lo son la LPG y la gp63, importantes debido a su capacidad inmunogénica. Diversos estudios mostraron que estas y otras moléculas presentan modificaciones importantes de acuerdo a la especie de *Leishmania*, así tenemos que en *L. mexicana* la composición de carbohidratos en LPG en cepas causantes de LCL y LCD varían de acuerdo a la presencia o ausencia de xilosa, galactosamina y ácido N-neuroamínico (NANA), LCL presenta xilosa, galactosamina y NANA mientras LCD sólo presenta galactosamina (Rivas, 1994).

En este sentido y por los datos aportados de las investigaciones anteriores, varios autores sostienen que el parasitismo por *Leishmania mexicana* que puede resultar en un proceso asintomático o patológico, está dado fundamentalmente por el polimorfismo genético del parásito determinando la forma clínica de la enfermedad (Lanouis *et al.*, 1997; Becker, 1996) pues se tiene evidencia que ninguna especie de *Leishmania* tiene las mismas proteínas de superficie en amastigotes (Wolfram *et al.*, 1996). Por lo tanto las diferencias en la expresión de antígenos de superficie de *Leishmania mexicana* tiene como consecuencia el desarrollo de diferentes tipos de leishmaniasis, estos antígenos de *Leishmania* pueden expresarse de acuerdo a la especie, subespecie y localización geográfica (Hernández *et al.*, 1989).

Tomando en cuenta los resultados de los trabajos previos en los cuales se tienen evidencias de que existen diferencias importantes a nivel clínico, histológico, molecular y de antígenos de superficie entre las formas clínicas LCL y LCD, se decidió analizar en este trabajo la respuesta inmune de ambas formas de leishmaniasis cutánea y determinar si es

que existen diferencias entre ambas, teniendo presente que las dos son producidas por *L. mexicana*.

Se determinó en este trabajo por medio de inmunohistoquímica la proporción de células CD4 y CD8 en las dos formas clínicas de leishmaniasis cutánea. En condiciones normales, los linfocitos y células accesorias están dispuestos anatómicamente en el bazo (centros germinales) como lo están en los ganglios linfáticos (Ledbetter et al., 1980; van Ewijk et al.,1981). Las vainas periarteriolares contienen principalmente linfocitos T, siendo las dos terceras partes de la clase cooperadora CD4 y una tercera parte CD8 (Abbas et al., 1995). Estos linfocitos CD4 y CD8 juegan un papel importante en el curso de la enfermedad producida por *Leishmania*, ya que de acuerdo a las citocinas secretadas pueden resolverla o exacerbarla. Otro factor importante es la cantidad de células presentes en el órgano linfoide de acuerdo al tiempo de evolución en la infección.

De acuerdo a nuestros resultados, se observó un predominio de CD4 sobre CD8 en todos los tiempos manejados de LCL que concuerdan con los de varios grupos de investigación en donde encuentran las mismas proporciones de estos marcadores (Pirmez et al., 1990; Isaza et al., 1996; Soong et al., 1997). Sin embargo Esterre et al., 1992 en lesiones de pacientes con LCL encuentra proporciones iguales de CD4 y CD8.

Ahora bien, en LCD en nuestra investigación se siguió manteniendo la proporción CD4>CD8, mientras que por su parte Ritter et al. (1996) y Tapia et al. (1994) obtuvieron proporciones inversas de estas células CD8>CD4. Lo que se puede atribuir a que se trabajaron diferentes tejidos, las investigaciones anteriores utilizaron lesiones de pacientes mientras en nuestro trabajo se manejaron bazos de ratones. Sugiriendo que al momento de trabajar con ratones singénicos se elimina la mayoría de las variables que puedan influir en la respuesta inmunológica del huésped, dejando sólo la producida por el parásito. Además

de que las cepas para inocular que se utilizaron en esta investigación se aislaron de pacientes que provienen de regiones geográficas comunes (Chontalpa, Tabasco).

Por otro lado en este trabajo fue en LCL, la forma clínica curativa, en donde CD8 incrementó de tal forma a lo largo del tiempo que a la 15ª semana (9.65 ± 0.87), llegó casi al mismo promedio del porcentaje que CD4 (10.93 ± 0.77), con lo cual se podría inferir que a partir de este tiempo, en esta leishmaniasis cutánea podría darse un proceso de cura debido al aumento de CD8 y a la capacidad que pueda presentar el huésped para tratar de contrarrestar la enfermedad (equiparable con los resultados de las curvas de infección en donde a la semana 15, LCL presenta el máximo crecimiento de la pata) pues el papel central de las células CD8 es modular el curso de la infección (Soong *et al.*, 1997) y de resistencia en contra de una re-infección por *Leishmania* (Hubert *et al.*, 1998). Aun no se ha dilucidado si el proceso de cura está asociado solamente por el incremento de CD8 o también por el balance de CD4 y CD8 (Da-Cruz *et al.*, 1994). Además se ha observado que la depleción de células T CD8 tiene como resultado el incremento en el cojinete plantar y aumento de la carga parasitaria en ratones susceptibles y resistentes. Sin embargo Hubert *et al.* (1998) observaron que en ratones infectados con *L major* y deficientes en producir células CD8 desarrollaron una respuesta típica Th1, presentando pequeñas lesiones en el cojinete plantar y reducido número de parásitos en ganglios linfáticos y bazo, los cuales producen cantidades importantes de IFN- γ . Estos autores concluyeron que las células CD8 no necesariamente son requeridas funcionalmente para mantener un control inmunológico. Así que en este trabajo el incremento de CD8 en LCL para la 15ª semana no implica forzosamente una respuesta favorable en el huésped, pues el hecho de encontrarse en cantidades mayores no significa que sean funcionalmente capaces de producir citocinas que

conlleven a una respuesta curativa. Lo cual se podría correlacionar con el suceso observado en la pata de los ratones la cual se necrosó y se perdió, indicando que aun con el aumento de CD8 a partir de la 15ª semana en LCL, las lesiones no presentaron un proceso de cura inherente al papel atribuido a dichas células.

En este trabajo en el primer día de infección se observó una drástica disminución en el porcentaje de células T CD4 en LCL y LCD, lo cual no sucedió con CD8. Varios grupos de investigadores realizaron estudios donde analizaron las poblaciones CD4 y CD8 en sangre periférica de pacientes con LCL, obteniendo resultados similares en cuanto a esta disminución se sugirieron las siguientes hipótesis: 1) una posible migración de estas células hacia el sitio de infección o muy probablemente hacia los ganglios linfáticos pues en particular CD4 facilita el reclutamiento de monocitos y macrófagos (Soong *et al.*, 1997). 2) la infección puede provocar un estado de inmunosupresión inespecífica secundario a esta como mecanismo de evasión del parásito frente a la respuesta inmunológica activa del hospedero (Macías *et al.*, 1997, 1999). Por lo tanto existen evidencias que sugieren que las células T CD4 son capaces de inducir resistencia en la leishmaniasis experimental, pues el encontrarse en mayor número determina el desarrollo de la enfermedad por estar asociado con la producción de citocinas en el periodo inicial de infección, con lo cual se puede sugerir que el papel de las células CD4 en la leishmaniasis es participar en el proceso inflamatorio y reclutamiento celular, así que el control de la LCL y LCD está asociado con la capacidad del hospedero de montar una respuesta inmune local que puede activar y regular la inflamación en el tejido afectado (Soong *et al.*, 1997). Sin embargo, otros datos indican que las células T CD8 pueden estar involucradas en el proceso de curación y control de la enfermedad (Da Cruz *et al.*, 1994). Estas células por el contrario no poseen la capacidad de migrar al sitio de infección motivo por el cual se encuentran preferentemente

en ganglios linfáticos y bazo, hecho que se refleja en nuestro estudio pues no se observa esa marcada disminución de estas células al primer día. Esto nos indica que la migración de las células CD4 al sitio de infección no sólo sucede en sangre periférica como se había reportado hasta el momento, sino también sucede en órganos linfoides como el bazo.

Hasta ahora sólo se ha discutido el papel de algunos factores que puedan inducir a las células CD4 y CD8 a secretar citocinas y desatar una respuesta favorable o desfavorable, uno de estos factores es la genética del hospedero, en este estudio se utilizaron ratones singénicos susceptibles BALB/c capaces de desarrollar la enfermedad con el fin de mantener el mayor número de variables controladas en el huésped. Los mecanismos responsables de la incapacidad de los ratones BALB/c para curar la infección en *Leishmania* es desconocido, algunos proponen que la susceptibilidad está a cargo de un solo gen (Scl-1) mientras otros proponen que reside en las células del sistema hematopoyético (Scott y Farrell, 1981). Así, el espectro de respuestas en varias cepas de ratón durante la infección ofrece una nueva visión acerca de la importancia de variaciones en la respuesta de poblaciones humanas frente a *Leishmania* en especial en América del sur, donde parece que la resistencia a la infección no es sólo por individuos, sino por razas y su control genético (Preston *et al.*, 1978). Por lo tanto, algunos factores de riesgo como el componente genético del hospedero, la especie del parásito, pueden estar involucrados en la susceptibilidad a la LCD, motivo por el cual este tipo de LC presentó valores inferiores comparados con LCL tanto en la inmunohistoquímica como en las curvas de infección. Cáster y Tapia. (1998), proponen que en estas situaciones el parásito evade la respuesta inmune del huésped y las citocinas producidas no pueden activar a los queratinocitos, eventos que conllevan a la generación de una respuesta Th2 que crea un estado de tolerancia progresiva hacia el parásito y resulta en la parálisis de los linfocitos T cutáneos y

sistémicos (Cástes y Tapia, 1998). En suma, LCD puede estar acompañada de una depresión inmune específica producida en el hospedero (Preston *et al.*, 1978).

Los periodos de tiempo se establecieron de acuerdo a trabajos previos en los cuales se reportan que son requeridas menos de 48 horas en ratones BALB/c para que las células CD4 puedan producir citocinas que determinen el curso de la enfermedad, ya sea resolviéndola o exacerbándola (Locksley *et al.*, 1999; Launois *et al.*, 1997; Himmelrich *et al.*, 1998). Por lo tanto, se decidió establecer como primer tiempo 1 día de postinfección. Por otro lado Rivas (1984) observó que la producción de anticuerpos en ratones infectados con *L mexicana* sucede a la 5ª semana. Mientras Soong *et al.*, 1997 determinaron que es a partir de las 8 semanas cuando comenzó a apreciarse un aumento significativo de células CD4 y CD8 respecto a los controles en bazo de ratones infectados con *L amazonensis*. De esta forma se estableció el esquema para trabajar los periodos de tiempo más convenientes y en los que se han observado algunos de los cambios más significativos en la histopatología, curvas de infección e inmunohistoquímica en el transcurso de la infección.

Para dilucidar adecuadamente los mecanismos involucrados en lo anteriormente expuesto es necesario realizar estudios inmunohistoquímicos para subpoblaciones CD4 (Th1 y Th2), CD8 en lesiones, sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos de ratón en periodos de infección más largos que permitan seguir el curso de la enfermedad hasta su curación o progresión. Seguir la migración de las células CD4/CD8 y presencia del parásito hacia otros sitios de infección en el caso de los linfocitos, o del sitio de infección a los lugares de producción de la respuesta inmune (en el caso del parásito). Integrar en la inmunohistoquímica a las células de Langerhans, las cuales son el primer contacto en la interacción hospedero-parásito. Los datos recaudados en este trabajo podrían ser importantes pues se pueden aplicar en el desarrollo de una vacuna que de acuerdo a la

dosis induzca una respuesta inmunológica Th1, aplicada en una población genéticamente diversa y tener resultados satisfactorios como lo proponen Menon y Bretscher, (1998).

8. CONCLUSIONES

- La ausencia de cambios morfológicos en el bazo, así como la ausencia del parásito en el tejido, indica que las cepas de *L. m. mexicana* no se diseminaron hacia el bazo durante el tiempo de estudio (15 semanas).
- Las curvas de infección de los ratones BALB/c presentan diferencias entre las cepas de LCL y LCD, siendo esta última la que presenta un menor crecimiento en el cojinete plantar.
- En las cepas manejadas de LCL y LCD, el porcentaje de células CD4 se encuentra en mayor proporción que en CD8.
- En LCD el porcentaje de células CD4 y CD8 están en menor cantidad en comparación con LCL, debido probablemente a una inmunosupresión intrínseca del parásito involucrado.
- Para LCD se observó una proporción mayor de CD4 > CD8 en todos los tiempos manejados, mientras que trabajos previos notifican una proporción inversa (CD4 < CD8).
- En la estandarización de la inmunohistoquímica se obtuvieron resultados satisfactorios con el uso de ázida de sodio en el amortiguador de Tris, NaCl, reduciendo los fondos oscuros del tejido, aun cuando se ha referido que la NaN_3 reduce la actividad enzimática de la peroxidasa

9. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, J. S. Pober. 1995. Inmunología celular y molecular. Interamericana McGraw-Hill, Madrid. 517 pp.
- Badolato, R., D. L. Sacks, D. Savoia y T. Musso. 1996. *Leishmania major*: Infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. Exp. Parasitol. 82:21-26.
- Barral, A., M. Teixeira, P. Reis, V. Vinhas, J. Costa, H. Lessa, A. L. Bittencourt, S. Reed, E. M. Carvalho y M. Barral-Neto. 1995. Transforming grow factor- β in human cutaneous leishmaniasis. Am. J. Pathol. 147(4):947-954.
- Barret, J. 1990. Inmunología medica. Interamericana McGraw-Hill, México. 466 pp
- Bates. P. A. 1994. The developmental of *Leishmania* promastigotes. Exp. Parasitol. 79:215-218.
- Becker, I. 1996. IMETAFA. Epidemiología Molecular. Trypanosomiosis, Leishmaniosis.
- Berzunza-Cruz, M., G. Bricaire, S. Zuluoaga-Romero, R. Pérez-Becker, E. Saavedra-Lira, R. Pérez-Montfort, M. Crippa-Rossi, O. Velasco-Castrejón, I. Becker. 2000. *Leishmania mexicana mexicana* genetic heterogeneity of mexican isolates using length polymorphism análisis of kinetoplast DNA. Exp. Parasitol.
- Blank, C., H. Fuchs, K. Rappersberger, M. Röllinghoff y H. Moll. 1993. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. J. Infec. Dis. 167:418-425.
- Bogdan, C., H. Moll, W. Solbach y M. Röllinghoff. 1990. Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with interleukin 4 activates murine

- macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. Eur. J. Immunol. **20**:1131-1135.
- Bogdan, C. y M. Rölinghoff. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion. Int. J. Parasitol. **28**:121-134.
 - Bourne, J. A. 1983. Handbook of immunoperoxidase staining methods. Dako corporation. U. S. A. 37 pp.
 - Carrada, T. B. 1993. La inmunidad celular y la vacunación contra la leishmaniasis cutánea. Rev. Alergia Méx. **40**(4):98-105.
 - Carvalho, E. M., W. D. Johnson, E. Barreto, P. D. Marsden, J. L. M. Costa, S. Reed y H. Rocha. 1985. Cell Mediated Immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. J. Immunol. **135**(6):4144-4148.
 - Castés, M, A. Agnelli, A. O. Verde y A. J. Rondón. 1983. Characterization of the celular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin. Immunol. Immunopathol. **27**: 176-186.
 - Castés, M., F. J. Tapia. 1998. Inmunología de la leishmaniasis tegumentaria americana. Acta Cient. Venez. **49**(1):42-56.
 - Cenini, P., N. Berhe, A. Hailu, K. McGinnes y D. Frommel. 1993. Mononuclear Cell Subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. J. Infect. Dis. **168**: 986-992.
 - Coffman, R. L., S. Mocci y A. O'Garra. 1999. The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **238** : 1-12.
 - Da-Cruz, A. M., F. Conceicao- Silva, A. L. Bertho y S. G. Coutinho. 1994. *Leishmania* reactive CD4⁺ and CD8⁺ cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. J. Infect. Immun. **62**(6): 2614-2618.

- Esquerdo, F. 1993. Patologia Tropical. Masson, Barcelona. 436 pp.
- Esterre, P. J., P. Frenay, M. Chevallier y J. A. Grimaud. 1992. Cell populations in the lesions of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. 421: 239-247.
- van Ewijk, W., L. Peter, van Soest, G. J. Engh. 1981. Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies to the antigens Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, and T200. J. Immunol. 127 (6): 2564-2604.
- Ghobrial, R. M., M. Boublik, H. J. Winn, H. Auchincloss Jr. 1989. In vivo use of monoclonal antibodies against murine T cell antigens. Clin. Immunol. Immunopathol. 52: 486-506.
- Goldfeld, A. E. y E. Y. Tsai. 1996. TNF- α and genetic susceptibility to parasitic disease. Exp. Parasitol. 84: 300-303.
- Guesdon, J. L., T. Temynch y S. Avrameas. 1979. The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27 (8): 1131-1139.
- Heinzl, F. P y R. M. Rerko. 1999. Cure of progressive murine leishmaniasis: interleukin 4 dominance is abolished by transient CD4+ T cell depletion and T helper cell type 1-selective cytokine therapy. J. Exp. Med. 189(12):1895-1905.
- Hernández, A. G., G. Payares, A. Misle y F. Dagger. 1989. The heterogeneity of *Leishmania* cell-surface antigens. Parasitol. Res. 75: 583-588.
- Himmelrich, H., C. Parra-Lopez, F. Tacchini-Cottier, J. A. Louis y P. Launois. 1998. The IL-4 rapidly produced in Balb/c mice after infection with *Leishmania major* down-regulates IL-12 receptor β 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. J. Immunol. 161: 6156-6163.

- Hubert, M., E. Timms, T. K. Mak, M. Rollinghoff y M. Lohoff. 1998. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. Infect. Immun. 66 (8): 3968-3970.
- Isaza, D. M., M. Restrepo, R. Restrepo, G. Caceres-Dittmar y F. J. Tapia. 1996. Immunocytochemical and histopatologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania Panamensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 55 (4): 365-369.
- Kima, P. E., L. Soong, C. Chicharro, N. H. Ruddle y D. M. Pratt. 1996. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. Eur. J. Immunol. 26 :3163-3169.
- Launois, P., J. A. Louis, G. Milon. 1997. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. Parasitol. 115: S25-S32.
- Launois, P., T. Cottier, C. Parra, J. A. Louis. 1998. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous leishmaniasis. Int. Rev. Immunol. 17: 157-80
- Ledbetter, J. A., R. V. Rouse, H. S. Micklem y L. A. Herzenberg. 1980. T cell subsets by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. J. Exp Med. 152: 280-295.
- Lemesre, J. L., D. Sereno, S. Daulouède, B. Veyret, N. Brajon y P. Vincendeau. 1997. *Leishmania* spp: nitric oxide-mediated metabolic inhibition of promastigote and axenically grown amastigote forms. Exp. Parasitol. 86: 58-68.
- Lira, R., S. Méndez, L. Carrera, C. Jaffe, F. Neva y D. Sacks. 1998. *Leishmania tropica*: The identification and purification of metacyclic promastigotes and use in establishing mouse and hamster models of cutaneous and visceral disease. Exp. Parasitol. 89:331-342.

- Locksley, R. M., S. Pingel, D. Lacy, E. Wakil, M. Bix y D. J. Fowell. 1999. Susceptibility to infectious diseases: *Leishmania* as a paradigm. J. Infect. Dis. 179 (suppl 2): S305-308.
- Love, D. C., M. M. Kane y D. M. Mosser. 1998. *Leishmania amazonensis*: The phagocytosis of amastigotes by macrophages. Exp. Parasitol. 88: 161-171.
- Macías-Abraham, C., N. Robles, X. Palacios, C. Vega, A. González y J. M. Ballester. 1999. Respuesta inmune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. 15 (1): 25-29.
- Macías-Abraham, C., A. Matamoros, A. Bencomo, X. Palacios, A. Belli, A. González, J. M. Ballester. 1997. Evaluación de la respuesta inmune en enfermos con Leishmaniasis cutánea localizada en Nicaragua. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. 13 (1): 38-40.
- Menon, J. N y P. A. Bretscher. 1998. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. Eur. J. Immunol. 28: 4020-4028.
- Milon, G. G. Del Giudice y J. A. Louis. 1995. Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. Immunol. Today. 11(7):244-246.
- Mohrs, M, B. Ledermann, G. Kohler, A. Dorfmueller, A. Gessner y F. Brombacher. 1999. Differences between IL-4 and IL-4 receptor α deficient mice in chronic leishmaniasis reveal a protective role for IL-13 receptor signaling. J. Immunol. 162: 7302-7308.
- Monroy, A. 1986. Relación huésped-parásito en leishmaniasis. Infectol. 7:230-237.

- Mosser, D. M. y A. Brittingham. 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. Parasitol. **115**: S9-S23.
- Murray, H. W. 1982. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. J. Immunol. **129**:351-357.
- Pérez H., F. Labrador y J. W. Torrealba. 1979. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. Int. J. Parasitol. **9** : 27-32.
- Pingel, S., P. Lanunoi, D. J. Fowell, C. W. Turck, S. Southwood, A. Sette, N. Glaichenhaus, J. A. Louis y R. M. Locksley. 1999. Altered ligands reveal limited plasticity in the T cell response to a pathogenic epitope. J. Exp. Med. **189**(7):1111-1120.
- Pirmez, C, C. Cooper, M. Paes, A. Schubach, V. K. Torigian y R. L. Modlin. 1990. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. J. Immunol. **145**: 3100-3104.
- Preston, P. M., K. Behbehani y D. C. Dumonde. 1978. Experimental cutaneous leishmaniasis:VI: Anergy and allergy in the cellular immune response during non-healin infection in different strains of mice. J. Clin. Lab. Immunol. **1**: 207-219.
- Puré, E, K. Inaba, M. T. Crowley, L. Tardelli, M. D. Witmer-Pack, G. Ruberti, G. Fathman y R. P. Steinman. 1990. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of Major Complex Class II molecules and expression of invariant chain. J. Exp. Med. **172**: 1459-1469.
- Reiner, S. L., S. Zheng, Z. Wang, L. Stowring y R. M. Locksley. 1994 *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a

broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. J. Exp. Med. **179**:447-456.

- Ritter, U., H. Moll, T. Laskay, E. B. Bröcker, O. Velasco, I. Becker, y R. Gillitzer. 1996. Differential Expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. J. Infect. Dis. **173**:699-709.
- Rivas, B. 1989. Estudio integral de la respuesta inmune murina en una cepa de *Leishmania mexicana mexicana* aislada de un caso de leishmaniasis cutánea diseminada. Tesis Prof. E. N. C. B. I. P. N.
- Rivas, B. 1994. Purificación, análisis y estudio biológico de la lipofosfoglicana de diferentes cepas de *Leishmania mexicana mexicana*. Tesis Maestría. E. N. C. B. I. P. N.
- Romani N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A. M. Livingstone, C. G. Fathman, K. Inaba y R. M. Steinman. 1989. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. J. Exp. Med. **169**: 1169-1178.
- Russell, D. G., P. Talamas. 1989. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. Parasitol. Today. **10**: 328-333.
- Saha, B., A. Saini, R. Germond, P. J. Perrin, D. M. Harlan, y T. A. Davis. 1999. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. Eur. J. Immunol. **29**: 2319-2329.
- Satoskar, A., L. M. Stamm, X. Zhang, A. A. Satoskar, M. Okano, C. Terhorst, J. R. David y B. Wang. 1999. Mice lacking NK cells develop an efficient TH1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. J. Immunol. **162**:6747-6754.
- Schopf, L. R., J. L. Bliss, L. M. Lavigne, C. L. Chung, S. F. Wolf and J. P. Sypek. 1999. Interleukin-12 is capable of generating an antigen-specific Th1-type response in

the present of an ongoing infection-driven Th2 response. Infect. Immun. 67(5):2166-2171.

- Scott, P. A., y J. P. Farrell. 1981. I. Nonspecific immunodepression in Balb/c mice infected with *Leishmania tropica*. J. Immunol. 127 (6): 2395-2400.
- Scott, P., D. Sacks y A. Sher. 1983. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. J. Immunol. 131(2): 966-971.
- Smelt, S. C., S. E. Cotterell, C. E. Engwerda y P. M. Kaye. 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. J. Immunol. 164: 3681-3688.
- von Stebut, E., Y. Belkaid, T. Jacob, D. L. Sacks y M. C. Udey. 1998. Uptake of *Leishmania major* amastigotes in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. J. Exp. Med. 188(8):1547-1552.
- Stenger, S., H. Thuring, M. Rollinghoff y C. Bogdan. 1994. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. J. Exp. Med. 180: 783-793.
- Streilein, J. W. y S. F. Grammer. 1989. *In vitro* evidence that Langerhans cells can adopt two functionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. J. Immunol. 143(12):3925-3933.
- Soong, L., C. H. Chang, J. Sun, B. J. Longley, N. H. Ruddle, R. A. Flavell, D. M. Pratt. 1997. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. J. Immunol. 158: 5374-5383.

- Tapia, F. J., Cáceres-Dittmar, G, y Sánchez. M. A. 1994 Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. Immunol. Today. 15:160-165.
- Valdespino-Gómez. J L, Velasco-Castrejón O, Escobar Gutierrez A, Del Rio-Zolezzi A, Ibáñez-Bernal S, Margos-López C. 1994 Enfermedades Tropicales en México. Diagnóstico tratamiento y distribución geográfica. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos, México. D.F. 381 pp.
- Velasco-Castrejón O. 1970. Leishmaniasis cutánea en voluntarios humanos. Mem. Congr. Mex. Dermatol . México.
- Velasco-Castrejón O. 1990. Leishmaniasis in the Chontalpa, state of Tabasco, México. Amer. J. Trop. Hyg.
- Velasco-Castrejón. O, Guzmán-Bracho. C, Rivas-Sánchez. B, Aguilar-Torrentera F, Hernández Márquez. 1994. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE numero 4, México, D.F.
- Wilson, M. E., M. Sandor, A. M. Blum, B. M. Young, A. Metwali, D. Elliot, R. G. Lynch, y J. V. Weinstock. 1996. Local suppression of IFN-g in hepatic granulomas correlates with tissue-specific replication of *Leishmania chagasi*. J. Immunol. 156: 2231-2239.
- WHO. Leishmaniasis. 1984 Div. Control. Trop. Dis. WND/World Bank/ WHO Sp. Prog. Research. Trans. Trop. Dis. TDR.
- Wolfram, M., M. Fuchs, M. Wiese, Y. D. Stierhof y P. Overath. 1996. Antigen presentation by *Leishmania mexicana* infected macrophages: activation of helper T

cells by a model parasite antigen secreted into the parasitophorous vacuole or expressed on the amastigote surface. Eur. J. Immunol. **26**: 3153-3162.

- Zamboni, L y C. De Martino. 1965. Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. J. Cell. Biol. **35**: 148 A.