

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

181

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS CUANTITATIVO DE LAS CELULAS DE LANGERHANS EPIDERMICAS EN LA LEISHMANIASIS EXPERIMENTAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA: ADRIANA RUIZ REMIGIO



DIRECTOR DE TESIS: DR. INGBORG BECKER FAUSER



2003

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA



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

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Análisis cuantitativo de las células de Langerhans epidérmicas en la leishmaniasis experimental"

realizado por Adriana Ruiz Remigio

con número de cuenta 8811372-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Propietario

M. en C. Armando Pérez Torres

Propietario

Dra. Laila Gutiérrez Kobeh

Suplente

Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Suplente

Dr. Oscar Velasco Castrejón

Consejo Departamental de Biología

M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM.



DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres pues también es parte de ellos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por este regalo de vida y porque me ha permitido llegar a esta etapa tan importante.

A mis padres Alicia y Angel por su gran amor y por apoyarme incondicionalmente en todo momento, sin ellos no sería quien soy. Los amo infinitamente.

A mi gran hermano Edgar por todos los momentos compartidos. Siempre podrás contar conmigo.

A la memoria de mis abuelitos María de la Luz y Perfecto por el amor que siempre nos dieron y por haber formado una gran familia.

A mis abuelitos Esperanza y Pedro porque siempre he podido contar con ellos. Los quiero mucho.

A todos y cada uno de mis tíos (as) y primos (as) por ser mi gran familia y por compartir los momentos más importantes de mi vida.

A mis padrinos María Luisa y Alfredo por todo su cariño.

A José de Jesús por haberle dado un nuevo sentido a mi vida y por todo su apoyo para la realización de esta tesis. **TE AMO.**

A todas mis grandes amigas a quienes nombro en orden alfabético pues todas han sido especiales en mi vida: Bety, Claudia, Ilyana, Irafs, Ireliá, Ivette, Laura, Lyliana, Marcela, Mónica, Rocely, Tere y Verónica.

A todos mis compañeros con los que he compartido mi desarrollo académico.

A todos mis profesores por haber contribuido en mi formación universitaria.

A los revisores de esta tesis: Dra. Ingebor Becker, M. en C. Armando Pérez, Dra. Laila Gutiérrez, Dr. Andrés Castell y Dr. Oscar Velasco por mejorar este escrito con sus conocimientos.

A Armando Pérez, Diana Millán, Martha Ustarroz y Armando Morales por el apoyo técnico.

A Ricardo Vargas por el apoyo prestado en el bioterio y a Marco Gudiño por el apoyo en computación.

A todos mis compañeros del laboratorio de Inmunoparasitología: José, Rocely, Miriam, Norma, Laila, Ivette, Irafs, Cristina, Magda y Susana por la convivencia diaria.

A la Dra. Inge por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por su confianza y su enorme paciencia.

A todas aquellas personas que no mencioné pero que han contribuido también en haber alcanzado esta meta.

A mi Honorable Facultad de Ciencias y mi Universidad Nacional Autónoma de México a las cuales estoy orgullosa de pertenecer.

Al maravilloso mundo de la BIOLOGÍA del que espero aprender día con día.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABREVIATURAS	iii
I) INTRODUCCIÓN	1
1) ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA LEISHMANIASIS	1
2) GENERALIDADES	2
3) TAXONOMÍA DEL GÉNERO <i>Leishmania</i>	3
4) CICLO BIOLÓGICO	4
5) CUADROS CLÍNICOS	5
A) Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	6
B) Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	7
C) Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)	8
D) Leishmaniasis cutánea esporotriciforme (LE)	8
E) Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	8
F) Leishmaniasis visceral (LV)	9
6) INTERACCIÓN DE <i>Leishmania</i> CON EL SISTEMA INMUNOLÓGICO	10
7) LAS CÉLULAS DE LANGERHANS	12
A) Origen de las células de Langerhans	13
B) Identificación de las células de Langerhans	14
i) Impregnación metálica	15
ii) Histoquímica enzimática	15
a) α -D-manosidasa	15
b) Aminopeptidasa	16
c) ATPasa	16
d) β -glucuronidasa	17
e) Colinesterasa	17
f) Esterasa inespecífica	17
g) Fosfatasa alcalina	18
h) Peroxidasa endógena	18
C) Ultraestructura de las células de Langerhans	19

D) Marcadores de las células de Langerhans	20
E) Función de las células de Langerhans	22
F) Cinética de las células de Langerhans relacionada con estímulos en la piel	26
II) HIPÓTESIS	31
III) OBJETIVOS	31
IV) DISEÑO EXPERIMENTAL	32
1) Animales de laboratorio	32
2) Cultivo de parásitos	32
3) Infección	32
4) Mediciones del grosor de las orejas y de los cojinetes plantares	33
5) Cinética de las células de Langerhans	33
A) Separación de láminas epidérmicas	33
B) Tinción para esterasa inespecífica	34
C) Conteo de las células de Langerhans epidérmicas	35
6) Análisis estadístico	35
V) RESULTADOS	36
1) Análisis del grosor de la lesión y del número de células de Langerhans en ratones infectados en oreja con <i>Leishmania mexicana mexicana</i>	36
A) Medición del grosor	36
B) Cinética del número de las células de Langerhans	40
2) Análisis del grosor de la lesión y del número de células de Langerhans en ratones infectados en plantar con <i>Leishmania mexicana mexicana</i>	45
A) Medición del grosor	45
B) Cinética del número de las células de Langerhans	49
VI) DISCUSIÓN	56
VII) CONCLUSIONES	60
VIII) PERSPECTIVAS	60
IX) LITERATURA CITADA	61

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito *Leishmania sp.* y transmitida por la picadura de un mosquito hembra del género *Lutzomyia sp.* Esta enfermedad puede manifestarse con diferentes cuadros clínicos que van desde lesiones cutáneas localizadas (LCL) hasta lesiones cutáneas difusas (LCD).

Una de las primeras células con las que el parásito entra en contacto después de ser inoculado en la piel por el piquete del vector es la célula de Langerhans (CL). Esta célula es considerada dentro de las células presentadoras de antígeno como una célula dendrítica con capacidad de fagocitar a la *Leishmania* y de iniciar una respuesta inmune primaria.

En este trabajo se realizó un análisis cuantitativo de las CL epidérmicas en ratones BALB/c (susceptibles a la leishmaniasis) infectados con *Leishmania mexicana mexicana* con la finalidad de observar si el número y la cinética de las CL en el sitio del inóculo se correlacionan con el desarrollo de la infección.

Se utilizaron dos grupos de ratones, un grupo fue infectado en oreja y el otro en cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *L. m. mexicana*. A los ratones se les realizaron mediciones del grosor de los sitios inoculados por un periodo de 54 días utilizando un vernier. Los ratones fueron sacrificados en los días 0, 13, 24, 34, 45 y 54 posteriores a la infección. De los ratones que fueron sacrificados se obtuvieron las láminas epidérmicas del sitio de la infección así como de diferentes regiones anatómicas tales como la oreja y el cojinete plantar contralaterales al sitio infectado, el dorso del pie, la zona de nariz-labio, el párpado y la cola. Las láminas se obtuvieron incubando cada sitio con solución salina balanceada y EDTA. Posteriormente fueron teñidas para esterasa inespecífica con la que adquirieron una coloración café para después ser contadas por mm^2 con una cámara lúcida.

Los resultados muestran que la infección en oreja cursa con un 10 % de aumento transitorio del grosor del sitio inoculado que ocurre a los 34 días post-infección. Este aumento se correlaciona con un aumento del 100 % en el número de las CL que ocurre de manera paralela al aumento en el grosor. Por otro lado, cuando la infección es en el cojinete plantar se observa un aumento progresivo del grosor de la lesión, registrándose su valor máximo al finalizar el experimento (a los 54 días post-infección) con un 42 % de aumento. Así mismo, se observa un aumento progresivo de las CL de manera paralela al aumento en el grosor y tiene su mayor incremento a los 54 días post-infección siendo del 34 %. Interesantemente también se registraron cambios en el número de CL en sitios distantes a los infectados los cuales fueron mayores cuando la infección era en oreja.

Posiblemente la afluencia rápida de un número importante de CL en el sitio de la infección favoreció la curación como se observó en oreja. Por otro lado, la llegada lenta de un menor número de CL permitió el establecimiento de la infección como ocurrió con la infección en el cojinete plantar.

ABREVIATURAS

CD	células dendríticas
CL	células de Langerhans
CPA	células presentadoras de antígeno
DNFB	dinitrofluorobenceno
GCL	gránulo de la célula de Langerhans
ICAM	molécula de adhesión intercelular
IDR	intradermorreacción
LCD	leishmaniasis cutánea difusa
LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LCPD	leishmaniasis cutánea pseudodifusa
LE	leishmaniasis esporotriciforme
LFA	antígeno funcional linfocítico
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LPG	lipofosfoglicano
LV	leishmaniasis visceral
MHC I	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC II	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
PAMP's	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	amortiguador salino de fosfatos
TLR	receptor tipo Toll

I) INTRODUCCIÓN

1) ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA LEISHMANIASIS

Es muy probable que la leishmaniasis se conociera desde el año 1500 y en México, en 1688 López Cogolludo escribió en su libro *Historia de Yucatán* que los primeros franciscanos, que intentaron convertir a los Itzaes del Petén, informaron de numerosos indígenas con las "orejas podridas".

En el año de 1788, Hipólito Ruiz describió la presencia de "llagas corrosivas" en la cara de pacientes originarios del Perú y en 1885 Cunningham observó por primera vez al parásito. Sin embargo, fue Leishman quien lo describió y años más tarde Ross le confirió el nombre de *Leishmania* en su honor.

El primer cultivo del parásito se realizó a principios del siglo XX (Nicolle, 1908) y en 1911 Wenyon sugiere que el transmisor de la leishmaniasis cutánea es el mosquito *Phlebotomus*.

El nombre de "úlceras de los chicleros" con el que se conoce a este padecimiento en México fue otorgado, por Seidelín en 1912, debido a la frecuencia con la que se presentaba en las personas que trabajaban en la extracción del chicle. Posteriormente en 1926 Montenegro empleó promastigotes muertos para efectuar la prueba de intradermorreacción, la cual lleva su nombre desde 1941.

En 1953 Biagi observó que la "úlceras de los chicleros" se comportaba de manera similar a la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania tropica* y diferente a la producida por *Leishmania braziliensis*, de la que entonces se suponía era la única especie que producía leishmaniasis tegumentaria en América. Por la razón anterior Biagi la

denominó *Leishmania tropica mexicana*. Esta subespecie fue elevada a la categoría de especie en 1972 por Garnham y Aldler quienes la nombraron *Leishmania mexicana*.

Posteriormente, en 1986, Lainson y Shaw establecieron la especie como *Leishmania mexicana mexicana* y Grimaldi en 1987 confirmó, mediante el uso de anticuerpos monoclonales, que *L. mexicana mexicana* es la responsable de la "úlceras de los chicleros".

2) GENERALIDADES

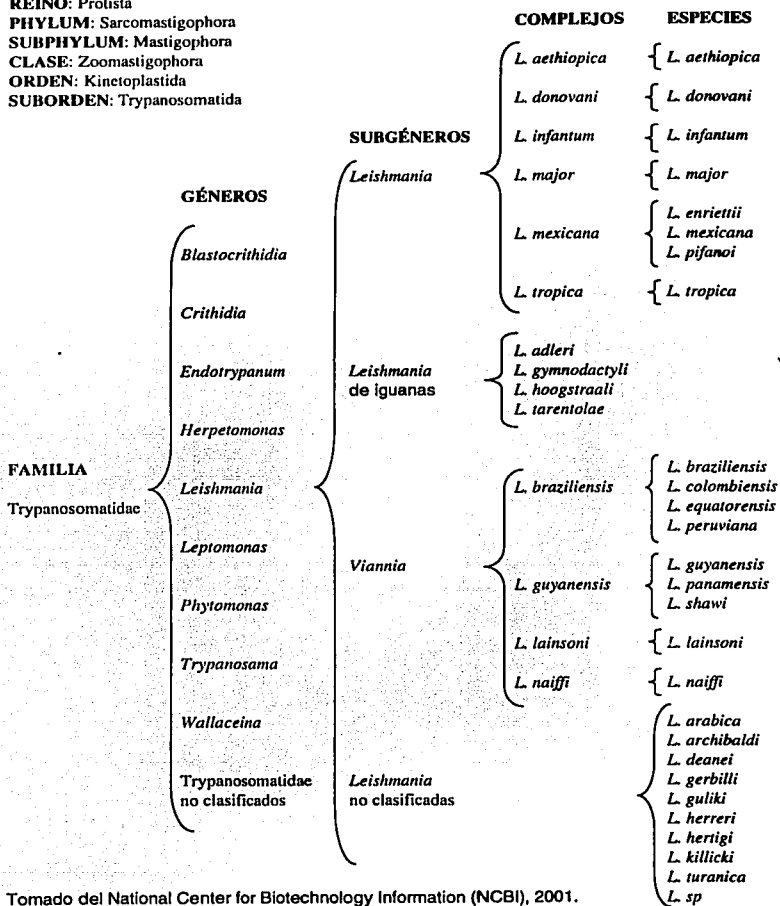
La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo del género *Leishmania*, ubicado en la familia Trypanosomatidae (Lezama e Isaac, 1995). La historia natural de la enfermedad se inicia con la introducción de promastigotes en la piel transmitidos durante la picadura de la hembra de un mosquito hematófago del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Velasco, 1991a).

Este padecimiento constituye una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia para la Organización Mundial de la Salud, debido a que cada año se diagnostican en el mundo alrededor de 400,000 nuevos casos (Velasco *et al.*, 1991b).

La leishmaniasis es una parasitosis de amplia distribución geográfica en el mundo. En México se extiende desde Coahuila y Tamaulipas hasta la Península de Yucatán, del lado del Golfo; en el Pacífico, desde Nayarit hasta Chiapas (Velasco, 1987). En total se ha identificado en 17 estados: Campeche, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (OPS/OMS, 1994). Fue en este último estado donde se registró el primer caso de leishmaniasis en el país. Posteriormente, de 1946 a 1951, se registraron alrededor de 35 casos al año en todo el país, sin embargo de la década de 1987 a 1997 se incrementaron los registros en un promedio de 800 casos anuales.

3) TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Leishmania*

REINO: Protista
PHYLUM: Sarcomastigophora
SUBPHYLUM: Mastigophora
CLASE: Zoomastigophora
ORDEN: Kinetoplastida
SUBORDEN: Trypanosomatida



Tomado del National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2001.

4) CICLO BIOLÓGICO

En el ciclo biológico de *Leishmania* intervienen el mosquito que es el transmisor y un mamífero como hospedero final donde se manifiesta la enfermedad. Además del hombre la leishmaniasis se ha detectado en mamíferos domésticos y silvestres como perros, perezosos, osos hormigueros, martuchas, mapaches, tejones, tepescuintles, tlacuaches y ratones (Lezama e Isaac, 1995). El parásito presenta dentro de su ciclo de vida dos estadios que son los de promastigote y amastigote (Figura 1). El promastigote es la fase móvil y mide de 15 a 20 μm de largo por 1.5 a 4 μm de ancho, su forma es alargada, tiene un núcleo central y un cuerpo basal por delante del cinetoplasto donde nace su flagelo (Figura 1A). Este estadio vive extracelularmente en el tracto digestivo del insecto. El amastigote representa la fase inmóvil, es de forma redondeada u oval con aproximadamente 2 a 5 μm de diámetro, con un núcleo excéntrico, un cinetoplasto y carente de flagelo, su citoplasma está cubierto por una doble membrana. Este estadio se desarrolla dentro de los macrófagos del mamífero hospedero (Figura 1B).



Figura 1. Estadios de *Leishmania* sp. A) promastigotes en un cultivo *in vitro* y B) macrófago con múltiples amastigotes.

La infección por *Leishmania* se inicia cuando un mosquito infectado pica al hospedero e introduce los promastigotes en la piel donde son fagocitados por los macrófagos. En el interior de éstos permanecen en el fagolisosoma y debido al pH ácido se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican asexualmente por fisión binaria, provocando el estallamiento de los macrófagos con la subsecuente liberación de parásitos que invaden a otras células fagocíticas donde se reinicia la proliferación de amastigotes.

Cuando los mosquitos se alimentan durante la hematofagia ingieren macrófagos infectados con amastigotes que experimentan uno o más ciclos de división antes de transformarse en promastigotes flagelados (Killick-Kendrick *et al.*, 1974). Se ha reportado que la transformación de los amastigotes a células elongadas que poseen un flagelo corto sucede en un período de 18 a 24 horas (Lawyer *et al.*, 1987). Los promastigotes se dividen continuamente por fisión binaria en el intestino del mosquito y su continua división causa que el intestino medio torácico se distienda grandemente (Walters *et al.*, 1987) y los parásitos sean impulsados hacia el esófago y faringe del mosquito (Short *et al.*, 1926). Al momento que el transmisor pica al hospedero regurgita a los promastigotes e infecta a las células del sistema fagocítico mononuclear, con lo cual se completa el ciclo biológico (Chang y Fong, 1985; Velasco *et al.*, 1991b; Blank *et al.*, 1993; Lezama e Isaac, 1995).

5) CUADROS CLÍNICOS

Las manifestaciones clínicas dependen de la especie o subespecie de *Leishmania*, así como de la eficiencia en la respuesta inmune del hospedero que está influida por factores genéticos o bien, por la infección agregada por otros organismos patogénicos (Moll *et al.*, 1995). Cuando la infección está restringida a la piel los cuadros clínicos que produce son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y leishmaniasis

cutánea pseudodifusa (LCPD) (Velasco *et al.*, 1997). En la leishmaniasis mucocutánea (LMC) las lesiones ocurren en mucosas y en la leishmaniasis visceral (LV) el parásito se encuentra en bazo e hígado (Velasco *et al.*, 1991b; Blank *et al.*, 1993).

A) Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Esta forma es conocida en México como "úlceras de los chicleros" es causada por *Leishmania mexicana mexicana* y se caracteriza por la presencia de un sólo nódulo que tiende a ulcerarse (Figura 2) o múltiples nódulos si el transmisor picó repetidamente o picaron simultáneamente varios vectores infectantes. La ulceración aparece de 15 a 20 días después y es generalmente redondeada de bordes indurados, fondo limpio e indolora (Velasco, 1991a). En las orejas el curso de la lesión es diferente ya que al principio es un pequeño nódulo pruriginoso que desarrolla una ulceración crónica muy destructiva y que resulta en la mutilación del pabellón auricular. Con excepción de las lesiones auriculares, la úlcera puede curar espontáneamente en plazo de 6 meses a 2 años o con quimioterapia con antimoniales (Castes *et al.*, 1983; Becker *et al.*, 1999). La hipersensibilidad se desarrolla en forma temprana y los pacientes son positivos a la intradermoreacción (IDR) con leishmanina (prueba de Montenegro). En este caso los linfocitos del hospedero tienen la capacidad de responder al antígeno de *Leishmania* con la producción de IFN- γ e IL-2. Se ha observado en las biopsias que habitualmente hay pocos parásitos en el interior de los macrófagos (Velasco, 1991a).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Lesión característica en la leishmaniasis cutánea localizada (LCL).

B) Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Este cuadro clínico puede ser causado por *Leishmania aethiopica* y *Leishmania mexicana amazonensis*, sin embargo en México lo causa *Leishmania mexicana mexicana*. Esta forma clínica se inicia con un nódulo que no se ulcera y se disemina por vía linfática, dando como resultado la formación de múltiples nódulos en todo el tegumento cutáneo (Figura 3) con excepción de palmas de las manos, plantas de los pies, región axilar, inguinal, genital y cuero cabelludo. Sin embargo, en México es frecuente encontrarla en mucosas y genitales (Velasco *et al.*, 1989). En esta forma clínica los pacientes son negativos a la IDR con leishmanina. Este padecimiento es de difícil tratamiento y generalmente a largo plazo causa la muerte del individuo (Velasco, 1987). En estos pacientes la respuesta inmune celular se encuentra inhibida mientras que la respuesta humoral está aumentada, aunque sin ser protectora. Al realizar análisis histopatológico se pueden observar abundantes parásitos dentro de los macrófagos del paciente (W.H.O., 1984; Walton y Velasco, 1987; Velasco *et al.*, 1989).



Figura 3. Lesión característica en la leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

C) Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)

Esta forma clínica es muy parecida a la esporotriciforme y se caracteriza por lesiones nodulares que siguen la trayectoria de los vasos linfáticos, o bien puede ser un conjunto de lesiones nodulares alrededor de otra lesión nodular algunas veces ya ulcerada. Los pacientes que tienen esta forma clínica, son negativos a la IDR con leishmanina. Las lesiones poseen escasos parásitos y al igual que las de la LCD, son refractarias al tratamiento con medicamentos o por termoterapia. Esta forma clínica, hasta ahora, solo ha sido descrita para México en la Chontalpa Tabasqueña (Velasco *et al.*, 1997) y Berzunza-Cruz y colaboradores (2000) demostraron diferencias significativas entre los aislados de esta forma clínica y otras causadas por *Leishmania mexicana mexicana*, mediante el análisis del ADN del cinetoplasto utilizando enzimas de restricción.

D) Leishmaniasis cutánea esporotriciforme (LE)

La manifestación de esta forma clínica se caracteriza por la presencia de pequeños nódulos subcutáneos que se diseminan por vía linfática generando un cuadro clínico similar a las lesiones que ocasiona una micosis causada por *Sporothrix shenckii*, es por ello que se le conoce con este nombre. En este caso la IDR es positiva y la presencia de parásitos en las biopsias es escasa (Gaafar *et al.*, 1994; James *et al.*, 1997).

E) Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Esta forma clínica también es conocida como espundia y es causada por *Leishmania braziliensis braziliensis* y probablemente también por *Leishmania braziliensis panamensis* y *Leishmania braziliensis guyanensis*. La leishmaniasis mucocutánea se presenta inicialmente como una lesión cutánea que posteriormente se disemina, se caracteriza por la aparición de

nuevos focos de infección y se extiende hacia la cavidad oronasal y faríngea (Castes *et al.*, 1983). El abultamiento de la nariz y los labios causa la característica nariz de tapir, dando lugar a una enfermedad crónica con una mutilación severa y muerte como resultado de obstrucción en las vías respiratorias o desnutrición ya que los pacientes presentan inanición debido a la odinofagia (Velasco, 1987). Esta condición no cura espontáneamente, es de difícil tratamiento y resistente a la quimioterapia. En los casos severos se presenta un incremento de células T en el sitio de la lesión (Walton, 1984). En México ha sido observada en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Velasco, 1987).

F) Leishmaniasis visceral (LV)

El cuadro clínico que causa la leishmaniasis visceral también se conoce como kala-azar o enfermedad negra y es causado por *Leishmania donovani*. Se caracteriza por la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, pérdida de peso importante, diarrea e hipergamaglobulinemia (Mason-Bahr, 1971; Velasco *et al.*, 1991b). Hay oscurecimiento de la piel, aunque esto no ha sido observado en pacientes mexicanos. Inmunológicamente se observa pérdida de la respuesta de hipersensibilidad cutánea tardía, así como de la reactividad *in vitro* de los linfocitos T a antígenos de *Leishmania*. Cuando la enfermedad se manifiesta no cura espontáneamente y lleva a la muerte a menos que se trate adecuadamente (Haldar *et al.*, 1983).

6) INTERACCIÓN DE *Leishmania* CON EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

Los diferentes cuadros clínicos que se presentan en los humanos pueden ser reproducidos de manera experimental con modelos murinos. Gracias a dichos modelos se ha obtenido información de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune de los organismos infectados con las diferentes especies de *Leishmania* (Moll, 1993a).

El proceso de infección que se presenta una vez que los parásitos penetran la piel del hospedero se lleva a cabo en diferentes etapas que incluyen la unión del parásito a la superficie de los macrófagos y su fagocitosis. El macrófago presenta el antígeno en combinación con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC I) con activación de linfocitos CD8⁺ y en asociación con moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC II) con la activación de linfocitos CD4⁺. La presentación del antígeno a los linfocitos T es un proceso requerido para la inducción y mantenimiento de las respuestas inmunológicas mediadas por células. Entre las células presentadoras de antígeno se incluyen a los macrófagos, a los linfocitos B y a las células dendríticas. A este último grupo pertenecen las células de Langerhans (CL).

Actualmente se reconoce ampliamente que diferentes factores actúan en conjunto e influyen notablemente en el proceso de presentación de antígenos. Es probable que la combinación de antígenos parasitarios, células presentadoras de antígeno y células T cooperadoras sean en buena medida los factores responsables del desarrollo de la infección. En la actualidad se considera que el desarrollo de las leishmaniasis hacia la curación o hacia la cronicidad se debe fundamentalmente a la función de las subpoblaciones de los linfocitos T CD4⁺ (Th1 y Th2). Así, los linfocitos Th1 son responsables del proceso curativo, mientras que los linfocitos Th2 lo son de la cronicidad de la enfermedad (Scott *et al.*, 1988; Scott, 1989). La activación del linfocito cooperador CD4⁺ Th1 lleva a la curación debido a un

aumento en la secreción de IL-2 e IFN- γ , las cuales son potentes citocinas activadoras del macrófago. El macrófago activado se transforma de una célula hospedera para la *Leishmania* en una célula efectora con alta capacidad leishmanicida. Lo anterior lleva a la eliminación del parásito mediante varios mecanismos, siendo uno de los más importantes el aumento en la producción de los radicales de oxígeno y de nitrógeno (Locksley y Klebanoff, 1983).

Aunque se desconocen los mecanismos responsables que inducen una respuesta de tipo Th1 o Th2, se ha establecido que entre los factores que las predisponen se encuentran la cantidad y calidad del antígeno presentado por células presentadoras de antígeno y el fondo genético del hospedero. En modelos experimentales murinos se ha visto que al infectar a ratones C57BL/6 con *Leishmania major* se presenta una resistencia natural asociada con la presencia de IFN- γ producido por las células CD4⁺ de tipo Th1. En contraste, en ratones de la cepa BALB/c se presenta producción de IL-4 por las células T CD4⁺ de tipo Th2, lo cual lleva a la progresión de la infección (Sypek *et al.*, 1993). Las cepas singénicas de ratón han definido los factores que intervienen en la resistencia a la leishmaniasis en ratones C57BL/6 y en la susceptibilidad en ratones BALB/c. Se ha encontrado que células NK así como linfocitos B y T de tipo Th1 y Th2, participan en el desarrollo del padecimiento (Bogdan *et al.*, 1996).

7) LAS CÉLULAS DE LANGERHANS

Las células de Langerhans (CL) juegan un papel muy importante en el desarrollo de la leishmaniasis debido a su localización en la piel. Para estudiar su participación se han diseñado modelos experimentales de leishmaniasis tanto *in vivo* como *in vitro*. En modelos *in vivo* se encontró que una de las primeras células con la que se encuentra la *Leishmania* introducida intradérmicamente es la célula dendrítica inmadura de la piel o CL que se caracteriza por su capacidad de iniciar una respuesta inmune primaria (Axelrod *et al.*, 1994; Banchereau y Steinman, 1998).

En el año de 1868, observando piel humana teñida con una impregnación metálica con cloruro de oro, Paul Langerhans describió una población de células dendríticas intraepidérmicas que actualmente llevan su nombre. A pesar de las limitaciones técnicas con las que contaba, identificó que estas células tenían una posición suprabasal y contaban con gran número de dendritas en cuyos extremos se presentaba una dilatación en forma de botón. Observó que algunas dendritas alcanzaban la capa córnea mientras que otras se extendían a través de las capas inferiores de la epidermis. Langerhans consideró que las células descritas formaban un "sistema nervioso intraepidérmico" (Ebling, 1980). Desde su descripción y hasta 1960 no se avanzó mucho en el conocimiento de las CL. Fue a partir de esta década que se incrementó notablemente el conocimiento de dichas células debido al desarrollo de nuevas técnicas como las enzimáticas, inmunológicas y de biología celular, además del uso del microscopio electrónico que ha permitido su identificación en varios tejidos.

Mediante estudios con microscopía electrónica se ha observado que las CL no solo se encuentran en la parte superficial de la epidermis, sino atravesando la membrana basal y en la dermis. Son células de naturaleza dendrítica que presentan un citoplasma claro debido a la ausencia de melanosomas y tonofilamentos. Son células con numerosas mitocondrias, un

retículo endoplásmico y un complejo de Golgi bien desarrollados. Una característica con la que puede reconocerse a la CL es por un gránulo en forma de raqueta de tenis, llamado gránulo de Birbeck o gránulo de la célula de Langerhans (GCL). Este se encuentra cercano al complejo de Golgi y se puede mover hacia la membrana celular (Zelickson, 1965).

A) Origen de las células de Langerhans

Las CL fueron poco estudiadas debido a varias razones. Desde la primera vez que estas células fueron descritas su origen y función fueron motivos de controversia. Inicialmente se les consideró como células nerviosas y más tarde como melanocitos desgastados o inactivos. Algunos consideraron que las CL eran artefactos de tinción, pues las técnicas que para ello se usaban eran inespecíficas y de resultados inciertos (Tamaki y Katz, 1980). Aunado a lo anterior, las técnicas que entonces eran rutinarias como la hematoxilina-eosina, no teñían a las CL por lo que muchos investigadores dudaron de su existencia. Todos estos detalles explican el hecho de que se haya estudiado muy poco a las CL (Breathnach, 1980). En 1968 surgieron dos corrientes que trataron de explicar su origen. La primera fue la teoría neural en la que las CL eran consideradas erróneamente como un componente del sistema nervioso periférico derivado del neuroectodermo (Langerhans, 1868). Esto se debió a dos razones, una es que la técnica de cloruro de oro con la que se evidenciaban las CL también impregnaba a los tejidos nerviosos y la otra, es que sus múltiples dendritas se parecían a las prolongaciones de nervios. La segunda fue la teoría melanocítica en la que las CL fueron consideradas como melanocitos desgastados (Masson, 1948; Billingham y Medawar, 1953), estados postdivisionales de melanocitos o posiblemente melanocitos inmaduros o en reposo (Zelickson, 1965; Breathnach, 1975). A pesar de que los melanocitos y las CL presentan características ultraestructurales en común, cada célula

presenta un organelo que la distingue que son el melanosoma y el GCL, respectivamente (Birbeck *et al.*, 1961). Rawles (1948) demostró que el origen de los melanocitos era a partir de las crestas neurales y posteriormente Silvers (1957) encontró células dendríticas aureooflicas en la piel de ratones experimentalmente desprovistos de crestas neurales, concluyendo que las CL no se originaban de éstas ni tenían relación con los melanocitos.

Entre 1965 y 1975 se acumularon evidencias acerca del posible origen mesodérmico de las CL. Fueron consideradas como células inmunocompetentes o como células que podían capturar materiales antigénicos (Pruneiras, 1969). Al inicio de la década de los 70's se observó que en las reacciones de hipersensibilidad retardada a alérgenos aplicados epicutáneamente algunas células parecidas a los linfocitos establecían contactos estrechos con las CL y que su número aumentaba significativamente en los vasos linfáticos y en los ganglios linfáticos regionales (Silberberg, 1971, 1973; Silberberg *et al.*, 1975). Posteriormente, Katz y colaboradores (1979) demostraron que las CL derivaban de la médula ósea y que eran continuamente sustituidas por células precursoras móviles. En conclusión, desde su descubrimiento el concepto de las CL ha variado desde considerarlas como células nerviosas, melanocitos, histiocitos y finalmente como células dendríticas presentadoras de antígenos.

B) Identificación de las células de Langerhans

Las CL muestran un patrón característico de tinción y se han empleado diversas técnicas para su identificación entre las que se encuentran las impregnaciones metálicas y las histoquímicas enzimáticas (Juhlin y Shelley, 1977).

i) Impregnación metálica

La utilización de la plata para estudiar a las CL ha tenido poca difusión debido a que impregna otros elementos cutáneos como melanocitos y terminaciones nerviosas. Sin embargo, se ha reportado que entre los estratos basal y granuloso de la piel del cobayo existe una población de células dendríticas que se pueden visualizar con el método de impregnación con plata de Holmes y morfológicamente corresponden a CL (Billinham y Medawar, 1953).

Otra impregnación metálica empleada para identificar a las CL es el método de zinc-yodo-osmio, el cual fue aplicado con éxito para la demostración de CL en piel humana normal y en pacientes con histiocitosis (Niebauer *et al.*, 1969).

ii) Histoquímica enzimática

Se ha demostrado que las CL presentan varias enzimas como son: α -D-manosidasa, aminopeptidasa, ATPasa, β -glucuronidasa, colinesterasa, esterasa inespecífica, fosfatasa alcalina y peroxidasa endógena. Sin embargo, los procedimientos enzimáticos más útiles para la observación de las CL son las histoquímicas para demostrar la actividad de ATPasa y de esterasa inespecífica.

a) α -D-manosidasa:

Es una enzima capaz de actuar sobre 1-naftil- α -D-manopiranosido. Se han demostrado células epidérmicas con actividad de α -D-manosidasa en la piel de pacientes con las enfermedades de Hurler, Hunter, Niemann-Pick tipo C y alopecia mucinosa. Por su distribución en las capas medias de los estratos espinosos y en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos, representan a las CL. El aspecto de las células manosidasa positivas no

muestra el patrón dendrítico de las CL y hasta el momento no se sabe si es consecuencia de la técnica o es característica de dichas células en los tejidos patológicos, por ello es necesario realizar el estudio de la piel normal (Elleder, 1975).

b) Aminopeptidasa:

La demostración de esta enzima no es un procedimiento que se utilice comúnmente para el estudio de las CL, aunque tiene la ventaja de que el producto de la reacción enzimática es de color rojo brillante, lo cual ha sido aprovechado para marcajes autorradiográficos (Gschneit y Brenner, 1979).

c) ATPasa:

A principios de los años 60's varios grupos de investigadores descubrieron la actividad de ATPasa en las CL. Utilizando de manera conjunta la técnica enzimática para ATPasa y el microscopio electrónico de transmisión se encontró que el producto de la reacción se localizaba únicamente en la membrana plasmática de las CL y no en otras células epiteliales (Wolff y Winkelmann, 1967). La demostración de la actividad de ATPasa es mejor cuando se utilizan láminas epidérmicas separadas de la dermis, pues así se puede observar tanto la morfología dendrítica como la distribución y se puede contar el número de CL (Mackenzie y Squier, 1975). Este método es altamente reproducible y confiable para la identificación de CL en epitelios. Aún no se conoce con certeza el significado funcional de la enzima ATPasa en las CL, pero es probable que esté involucrada en procesos de endocitosis necesarios para la captación de antígenos o en la transferencia de energía asociada con la movilidad celular (Lynch *et al.*, 1981).

d) β -glucuronidasa:

El significado biológico de la actividad de la β -glucuronidasa en las CL es hasta la fecha incierto. Se cree que puede estar relacionada al procesamiento de glucoproteínas de membrana, análogo a lo que se especula para la actividad de α -D-manosidasa (Elleder, 1975).

e) Colinesterasa:

Se han identificado células colinesterasa positivas en el murciélago, observándose una fuerte reacción en las células dendríticas epidérmicas en la vaina externa del folículo piloso, en la porción distal del conducto de las glándulas sudoríparas, en la capa germinal y el conducto de las glándulas sebáceas. También se identificaron células dendríticas positivas a la colinesterasa en el epitelio de las mucosas. Se observó que muchas de las células que habían sido positivas a la colinesterasa también contenían melanina, por lo que se pensó que eran melanocitos. Sin embargo, en mucosas y en las glándulas sudoríparas estas células no presentaban melanina, por lo cual fueron identificadas como CL (Bourlond *et al.*, 1962). También se ha detectado la presencia de acetilcolinesterasa específica en células dendríticas epidérmicas de algunas especies de ovejas, conejos, ratas y bueyes.

f) Esterasa inespecífica:

La esterasa inespecífica en las CL localiza ultraestructuralmente en la cara externa de la membrana plasmática, lo cual fue demostrado en ratones C57BL/6 (Maruyama *et al.*, 1980). La actividad de esta enzima fue descrita en células dendríticas epidérmicas de cola de ratón (Jarret y Riley, 1962) y cuando se investigó la distribución de dichas células en diferentes regiones de la piel del ratón, se observaron células positivas a la enzima en la región basal y suprabasal de la epidermis, distribuidas de manera uniforme en la piel del abdomen, dorso y

orejas. Las CL epidérmicas de la cola se encontraron asociadas a los folículos pilosos en las regiones ortoqueratóticas, mientras que las paraqueratóticas carecían de estas células (Riley, 1966). El método para la demostración de la esterasa inespecífica es sencillo y útil para la visualización de las CL epidérmicas.

g) Fosfatasa alcalina:

A principio de la década de los 70's se pensaba que la actividad de la fosfatasa alcalina se restringía a las CL epidérmicas de los primates africanos *Perodicticus potto*, *Galago senegalensis* y *Galago crassicaudatus*. Sin embargo, Schleger y Bean (1973) detectaron células dendríticas positivas a la fosfatasa alcalina en la epidermis del ganado vacuno. Esta enzima se encuentra en granulocitos y junto con la ATPasa y la esterasa inespecífica relaciona a las CL con las células del sistema fagocítico mononuclear (Berman y France, 1979).

h) Peroxidasa endógena:

Se ha observado que existe actividad de la peroxidasa en la cubierta nuclear y en el retículo endoplasmático de las CL humanas normales. Esta actividad se debe probablemente a una enzima similar a la de monocitos adherentes y de macrófagos, ya que la localización intracelular es idéntica y la enzima se inhibe por las mismas sustancias (fijador de Karnovsky, aldehído-ácido tánico y 3-amino-1,2,4, triazol) (Beelen *et al.*, 1978; Maruyama *et al.*, 1980; Dubertret *et al.*, 1981).

C) Ultraestructura de las células de Langerhans

La primera descripción del patrón estructural básico de las CL fue realizada por Birbeck y colaboradores (1961). Ellos observaron que las CL presentan un núcleo celular de apariencia marcadamente indentada por la presencia de hendiduras profundas, un aparato de Golgi bien desarrollado, citoplasma claro en comparación con el de los queratinocitos adyacentes y con un organelo citoplasmático característico llamado gránulo de Birbeck o gránulo de las células de Langerhans (GCL).

El GCL es una estructura membranosa en forma de disco con un tamaño de aproximadamente $0.3 \mu\text{m}$ que puede estar curvado, en forma de copa o torcido sobre sí mismo y además presenta una o dos proyecciones vesiculares. También puede encontrarse en forma de bastón de longitud variable con una estriación central periódica de 90 \AA o bien el bastón puede presentar una dilatación o vesícula en uno de sus extremos lo cual le da el aspecto de una raqueta de tenis. Ocasionalmente, las vesículas pueden ser observadas en ambos extremos o en la parte central del bastón (Breathnach, 1981). La mayoría de los GCL se localizan en el citoplasma en la vecindad del aparato de Golgi y en algunas ocasiones están adheridos a la membrana plasmática de las CL.

En condiciones normales se ha observado que las CL del humano presentan muchos GCL mientras que las CL de ratón tienen muy pocos. Los GCL están involucrados en los mecanismos de captación y procesamiento de material antigénico por las CL y se ha observado que la estimulación antigénica epicutánea con un hapteno induce un incremento en el número de GCL (Elofsson *et al.*, 1981; Kolde y Knop, 1987).

D) Marcadores de las células de Langerhans

Para identificar a las CL de manera más precisa se utilizan anticuerpos que reconocen marcadores de superficie y citoplásmicos. Con estos marcadores se ha podido conocer el fenotipo de las CL y han proporcionado conocimiento acerca del papel funcional de dichas células ante la presencia de antígenos. Las técnicas de tinción utilizadas son la inmunoperoxidasa, la inmunofluorescencia y el marcaje con inmuno-oro. Dichas técnicas se han aplicado en el tejido procesado de diferentes formas, ya sea en cortes en frío, en las láminas epidérmicas o bien directamente en las células epidérmicas.

Las CL muestran en su superficie moléculas codificadas por los genes HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP (Sontheimer *et al.*, 1986). Todas las CL epidérmicas expresan los antígenos CD1a y débilmente los antígenos CD1c, pero no expresan los CD1b (Schmitt *et al.*, 1986). Debido a que los queratinocitos no expresan ningún antígeno CD1, los marcadores CD1a y CD1c son muy útiles para identificar a las CL. Las moléculas CD1 pertenecen a la región HLA-IB, que es una región no clásica del MHC. Dichas moléculas estructuralmente son idénticas a las moléculas MHC I, ya que poseen una gran cadena α asociada a la cadena β -2 microglobulina. Sin embargo, difieren del MHC I en que captan y presentan antígenos presentes en el compartimento endosomal, de manera análoga a moléculas MHC II. Adicionalmente, tienen otra propiedad singular que es su capacidad de presentar algunos glucolípidos de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta propiedad las distingue de las moléculas MHC clásicas ya que éstas únicamente tienen la capacidad de presentar péptidos procesados. La presencia de moléculas CD1 en las CL las colocan en un papel central en las infecciones ocasionadas por parásitos protozoarios como es el caso de la leishmaniasis, ya que las leishmanias se encuentran en el compartimento endosomal cuando

son fagocitadas y adicionalmente están cubiertas de una extensa capa de glucolípidos como es el lipofosfoliglicano (LPG).

Otro marcador de linfocitos que tienen las CL es el antígeno CD4. Se ha observado que la expresión de este marcador es baja en las CL de piel normal y que aumenta considerablemente en enfermedades cutáneas, lo que sugiere que su expresión es regulada por citocinas inflamatorias.

Adicionalmente, las CL del humano presentan algunos marcadores de macrófagos y monocitos, aunque en niveles más bajos, como son CD14, CD15 y CD33. Utilizando anticuerpos monoclonales se ha demostrado que las CL expresan niveles bajos del Fc γ RII (CD32) y del CR3, (CD11b/CD18) y no expresan los Fc γ RI (CD64), Fc γ RIII (CD16); CR1 (CD35) y CR2 (CD21) (Wood *et al.*, 1985).

Se ha observado que las CL necesitan diversas moléculas de adhesión para poder interactuar con los linfocitos y mediante el uso de inmunohistoquímica se ha demostrado que las CL recién aisladas expresan la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1, CD54) y el antígeno funcional linfocítico-3 (LFA-3, CD58) (Teunissen *et al.*, 1994). Dentro de las moléculas de adhesión hay un grupo de moléculas de superficie llamado integrinas responsables de la migración y dirección de las CL, entre ellas encontramos a LFA-1, CR4, ICAM-1, ICAM-2 y E-cadherina que media la unión de la célula de Langerhans al queratinocito. Las CL tienen una expresión heterogénea del antígeno Lewis (CD15) que es el ligando de la E-selectina (CD62E) expresada por las células endoteliales (Blauvelt *et al.*, 1995; Janeway *et al.*, 1999).

Por otro lado, a diferencia de los macrófagos, las CL en el ratón reaccionan con un anticuerpo monoclonal conocido como NLDC-145 y la proteína reconocida por este

anticuerpo es el receptor llamado DEC-205, proteína integral de membrana con actividad de lectina, homóloga al receptor de manosa de los macrófagos y que al unir carbohidratos y mediar la endocitosis se le relaciona con la captación de antígenos (Kraal *et al*, 1986; Jiang *et al*, 1995).

E) Función de las células de Langerhans

Las CL son células presentadoras de antígeno y tienen una función importante en iniciar una respuesta inmune primaria. Estas células capturan y procesan el antígeno en la piel, desde ahí migran hacia los ganglios linfáticos y presentan el antígeno a los linfocitos T cooperadores CD4⁺ (Afonso *et al.*, 1994).

Cuando las CL se encuentran en la piel se les considera como células dendríticas inmaduras y persisten en los tejidos periféricos por períodos de tiempo variables hasta el momento en que son estimuladas por algún antígeno y migran por vía linfática adquiriendo un fenotipo diferente de maduración (Janeway *et al.*, 1999; Hertz *et al.*, 2001).

Las CL tienen la capacidad de capturar antígenos mediante varias vías como son: 1) la macropinocitosis mediante la cual forman vesículas pinocíticas; 2) la endocitosis mediada por receptores tipo lectina (Tabla 1) y receptores Fcγ tipo II (CD32) y 3) la fagocitosis de partículas como fragmentos celulares generados durante la necrosis o apoptosis, virus, bacterias y parásitos intracelulares.

Las CL pueden capturar concentraciones picomolares o nanomolares del antígeno mediante la macropinocitosis y la endocitosis, mientras que otras células presentadoras de antígeno solo capturan concentraciones de antígenos mayores a esas. Adicionalmente receptores tipo Toll (TLR's) 2, 3, 4, 5, 6 y 9 que reconocen varios patrones moleculares

asociados a patógenos (PAMP's) como LPS, lipoproteínas de bacterias, peptidoglicanos y dinucleótidos CpG, sin embargo estos receptores no son fagocíticos (Figdor *et al.*, 2002).

LECTINA TIPO-C	TIPO	CÉLULA	LIGANDO	FUNCIÓN
MMR (CD206)	I	CD Y CL	Manosa y fucosa	Captura de antígeno
DEC-205 (CD205)	I	CD Y CL	?	Captura de antígeno
Dectina 1	II	CD Y CL	β -glicanos	Interacción célula T
Dectina 2	II	CD Y CL	?	Captura de antígeno
Langerina (CD207)	II	CL	?	Formación gránulos de Birbeck
DC-SIGN (CD209)	II	CD	HIV-1 (gp120), mananas, ICAM-2, ICAM-3	Interacción célula T, captura de antígeno y migración
BDCA-2	II	CD plasmacit.	?	Captura de antígeno
DCIR (LLIR)	II	CD	?	?
CLEC-1	II	CD	?	?

Tabla 1. Lectinas tipo-C presentes en células dendríticas (CD) y células de Langerhans (CL).

La migración y maduración de las CL es crítica para iniciar la respuesta inmune celular en contra del antígeno como podría ser la *Leishmania*. El antígeno induce la maduración mediante cambios fenotípicos y funcionales de la CL que culminan en la transición de una célula dendrítica inmadura fagocítica a una célula dendrítica madura presentadora de antígeno (CPA) con capacidad migratoria. Algunas moléculas involucradas en la transición hacia CPA son CD40, TNF-R e IL-1R pues mediante la unión a sus ligandos se induce la maduración de las CL que está mediada por varios procesos (Flores-Romo, 2001).

La maduración inicia cuando un antígeno como *Leishmania* es introducido en la piel y se genera un proceso inflamatorio con producción de TNF- α e IL-1 y acumulación de más CL en ese sitio. En este momento MIP-3 α (LARC, Exodus-1) que se expresa en epitelios, juega un papel importante al ser una quimiocina atrayente de CL inmaduras o de sus precursores hacia los epitelios inflamados. Además hay aumento de MHC II intracelular en compartimentos llamados MIICs, receptores para quimiocinas como CCR1, CCR5, CCR6 (Tabla 2) y elevada expresión de CD68. Por otro lado hay niveles bajos de CCR7, CD54, CD58, CD80, CD86, CD40, CD83 y no hay DC-LAMP (Banchereau *et al.*, 2000; Proudfoot, 2002).

Receptor	Ligando
CD inmaduras	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3, MIP-5
CCR2	MCPs
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6 (solo en CL)	MIP-3 α
CXCR1	IL-8
CXCR4	SDF-1
CD maduras	
CCR7	MIP-3 β , 6CKine (SLC)

Tabla 2. Expresión de receptores para quimiocinas en células dendríticas (CD).

Una vez que la CL captura el antígeno, los niveles de E-cadherina disminuyen y junto con la elevada expresión celular de elastasas y colagenasas se degradan varios componentes de la matriz extracelular con lo que se facilita la migración de las CL a través de la piel (Tang *et al.*, 1993).

Cuando empieza la migración de las CL, hay disminución de los procesos de endocitosis y fagocitosis y de la expresión de CCR1, CCR5, CCR6, CD68 y MIP-3 α . Por otro lado, incrementa la expresión de CD54, CD58, CD80, CD86, CD40, CD83, DC-LAMP, p55 y CCR7. Las CL maduran durante su migración desde los tejidos inflamados por vía linfática con la participación de la 6Ckine (SLC) que se expresa en vasos linfáticos. Las células dendríticas maduras entran al área paracortical de los nódulos linfáticos como respuesta a la producción de MIP-3 β y/o 6Ckine en la zona de células T. Las células dendríticas pueden producir MIP-3 β y 6Ckine con lo que se amplifica la señal quimiotáctica, además, estas dos quimiocinas también son quimiotácticas para linfocitos T. Se requiere de diversas moléculas de adhesión para que las células dendríticas maduras puedan interactuar con los linfocitos T, estas son ICAM-1, ICAM-2 y LFA-1, LFA-3 (Banchereau *et al.*, 2000).

Las CL presentan antígenos endógenos mediante MHC I, mientras que las moléculas clase II se relacionan con la presentación de antígenos exógenos (Acolla *et al.*, 1995; Gielen *et al.*, 1988).

F) Cinética de las células de Langerhans relacionada con estímulos en la piel

Las CL son una población celular dinámica que cuando se presentan en la piel en número y función normal juegan un papel de centinelas equipando a la superficie cutánea con una elaborada red de proyecciones dendríticas preparada para capturar antígenos e iniciar una respuesta inmune. Sin embargo, cuando las CL están alteradas morfológica o numéricamente, esto repercute en sus propiedades fisiológicas y la red se rompe, haciendo vulnerable al sistema inmune en varias de sus vías (Streilein *et al*, 1980). Las CL tienen un papel crucial como células presentadoras de antígeno e inducen una respuesta inmune positiva al ingresar antígenos a través de la piel (Lynch *et al*, 1981). Al encontrarse las CL en la epidermis, es razonable esperar que puedan iniciar su función primaria dentro de dicha estructura y que esta función pueda depender de su densidad numérica (Bergstresser *et al*, 1980c).

Se han realizado muchos estudios para conocer la distribución y número de las CL en tejidos normales de varias especies observando diferencias. En cobayos, Wolff y Winkelmann (1967) reportan que hay aproximadamente 900 CL/mm² y su densidad no varía de región a región. Bergstresser y colaboradores (1980a) analizan el número de CL en varios sitios de la piel de roedores y reportan que en el cobayo los números son: en espalda, 1460/mm²; oreja, 990/mm²; mucosa bucal, 950/mm² y cojinete plantar, 830/mm². En el hamster los números son: espalda, 1300/mm²; oreja, 620/mm²; cachete, 130/mm² y cojinete plantar, 760/mm². En ratones C57BL: espalda, 760/mm²; oreja, 470/mm²; mucosa bucal, 690/mm²; cojinete plantar, 820/mm² y cola, 110/mm². Los mismos autores reportan que en las córneas de los ratones, los hamsters y los cobayos no hay CL. En el hombre hay algunas variaciones en el número de CL dependiendo de la región de la que se trate, siendo el rango de 460 a 1000/mm². Se considera que un hombre adulto tiene en promedio alrededor de

2x10⁹ CL en la piel. Es importante conocer los estudios cuantitativos de CL que se han realizado en organismos sanos, para poderlos comparar con los modelos experimentales o los sujetos enfermos (Schuler, 1991).

Se ha visto que las CL juegan un papel importante en el desarrollo de hipersensibilidades por contacto, por ejemplo con experimentos realizados en la piel de animales que reaccionan con sustancias como el dinitrofluorobenceno (DNFB) (Gschnait y Brenner, 1979). Para la sensibilización de la piel con sustancias químicas se requiere una fase inicial durante la cual dicha sustancia reaccione directamente con uno de sus componentes, como lo son las CL que han sido incluidas como componentes de un "sistema reticuloepitelial" hipotético que une y procesa el antígeno aplicado en la piel y preside sobre la diseminación de esta señal inmunogénica a compartimentos centrales del aparato inmunológico para iniciar la función efectora. Si las CL son de hecho la base sobre la cual se desarrolla la sensibilización a través de la piel, se debe esperar que la piel deficiente de dichas células sea incapaz de mantener la sensibilización a moléculas reactivas inmediatamente después del contacto. Esto se pudo comprobar mediante ensayos en animales expuestos a radiación (Streilein *et al.*, 1980).

Se ha observado que cuando las CL de una piel sana son expuestas a los rayos UV, aún con dosis bajas, se reduce su número y se altera su función lo cual puede tener un profundo efecto sobre la respuesta inmune (Lynch *et al.*, 1981). Estudios cuantitativos de las CL de algunas regiones anatómicas de ratones, hamsters y cobayos han demostrado que el promedio de la densidad superficial de las CL en la piel de la cola es considerablemente menor a la de la piel del cuerpo. Adicionalmente, dichas células en la cola están distribuidas de manera desigual formando una red compuesta de dos porciones, la paraqueratótica y la ortoqueratótica. La primera es la región central carente de CL y la segunda es la zona que

rodea a la región central y tiene CL distribuidas de manera regular (Bergstresser *et al*, 1980c). Otro sitio con pocas CL es el cachete del hamster que se ha observado como un sitio privilegiado inmunológicamente ya que cuando se injerta piel en este sitio, no es rechazada. Se ha propuesto que la causa de la tolerancia se debe a que el número de CL es muy bajo y a que no posee una vía de drenaje linfático o un ganglio linfático regional y por lo tanto no ocurre reconocimiento de antígenos ajenos localizados dentro del epitelio del cachete (Bergstresser *et al*, 1980b).

Se ha visto que las córneas del hamster, el ratón y el cobayo carecen de CL, por lo cual los injertos de córnea son tolerados (Schuler, 1991). En 1980, Bergstresser y colaboradores plantearon algunas hipótesis que postulan que los sitios privilegiados inmunológicamente, como lo son la córnea y el cachete, pueden generarse debido a tres factores: 1) la ausencia de una ruta de drenaje linfático evita la presentación de antígenos en los nódulos linfáticos regionales; 2) la deficiencia en el número de CL le permite al antígeno pasar directamente a través del epitelio sin una captación y presentación inmunológicamente efectiva y 3) el antígeno gana acceso directamente al sistema vascular, con inducción de una respuesta supresiva e inhibitoria (Bergstresser *et al*, 1980a).

Existen trabajos que correlacionan el número de CL en secciones de piel con enfermedades cutáneas. Sin embargo, se conoce poco sobre las variaciones numéricas de las CL de acuerdo al sexo, edad, sitio anatómico o entre individuos. En algunas enfermedades se ha logrado correlacionar el número de CL con la evolución del padecimiento.

En investigaciones realizadas en sujetos que presentan vitiligo, se reporta que el número de CL es el mismo tanto en la epidermis pigmentada así como en la no pigmentada (Birbeck *et al*, 1961; Brown *et al*, 1967).

En personas con lupus eritematoso, una enfermedad donde predominan disfunciones del sistema inmune, se han estudiado las CL epidérmicas y se ha observado que en las lesiones cutáneas de estos pacientes dichas células presentan profundas alteraciones morfológicas tales como pérdida de sus proyecciones dendríticas, distribución de manera irregular y reducción en el número en comparación con la piel normal adyacente (Sontheimer y Bergstresser, 1982).

También se ha determinado el número de CL en enfermedades virales y se ha observado que en los casos de pacientes con varicela, herpes, sarampión y rubeola hay un aumento de las CL, particularmente en las dos últimas mencionadas (Tsukahara y Horiuchi, 1996). Por el contrario, en estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en humanos que presentan el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se ha demostrado que el número de CL epidérmicas disminuye durante el estado terminal en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Saint-André Marchal *et al*, 1997).

La histiocitosis X o histiocitosis de CL es una proliferación clonal, posiblemente neoplásica, que generalmente se presenta en niños. Las CL proliferantes se acumulan en cualquier tejido donde normalmente no se localizan, muestran moderada cantidad de citoplasma y un núcleo con muescas características en forma de surcos. Generalmente se encuentran mezcladas con eosinófilos, macrófagos reactivos y neutrófilos (Carrillo-Farga y Pérez-Vega, 1997).

Una enfermedad rara en la que el número de las CL se ha visto alterado es el síndrome de Huriez, una genodermatosis autosómica dominante que se caracteriza por una escleroatrofia difusa de las manos, esclerodactilia, queratoderma lamelar de las palmas y plantas de los pies e hipoplasia de la uñas. Estudios inmunohistoquímicos y

ultraestructurales revelan una ausencia casi completa de las CL epidérmicas de la piel involucrada en esta enfermedad (Guerriero *et al*, 2000).

En la leishmaniasis aún no se ha estudiado el comportamiento de las CL a pesar de que estas son las primeras células que entran en contacto con el parásito. Interesantemente en esta parasitosis la evolución del padecimiento depende del sitio del inóculo, ya que pacientes infectados en oreja presentan úlceras crónicas que llevan a la mutilación completa del pabellón auricular si no reciben tratamiento oportuno, o sufren recaídas frecuentes una vez tratados y aparentemente curados. En contraste a esto, si la infección ocurre en cualquier otro sitio, los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada frecuentemente curan espontáneamente o responden bien al tratamiento. Sería interesante estudiar si las CL participan en este comportamiento diferencial de la evolución del padecimiento relacionado con el sitio anatómico de la infección.

II) HIPÓTESIS

El número y la cinética de las células de Langerhans epidérmicas en el sitio de la infección contribuyen al establecimiento y desarrollo de la leishmaniasis.

III) OBJETIVOS

Con la finalidad de conocer la relación que existe entre el número de CL y el desarrollo de la infección por *Leishmania mexicana mexicana*, se plantearon los siguientes objetivos:

1) Infectar ratones BALB/c con *Leishmania mexicana mexicana* en oreja o cojinete plantar y evaluar la progresión de la infección mediante mediciones periódicas del grosor de la oreja y el cojinete plantar.

2) Cuantificar las CL en el sitio del inóculo (oreja o cojinete plantar) así como en otros sitios anatómicos del ratón durante los primeros 2 meses de la infección, para correlacionar la cinética de las CL con la evolución del padecimiento.

IV) DISEÑO EXPERIMENTAL

1) Animales de laboratorio

Se utilizaron 66 ratones singénicos hembras de la cepa **BALB/c** de 6 a 8 semanas de edad, los cuales fueron separados en dos grupos de 33 ratones **cada uno**. Un grupo fue infectado con promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* en la **oreja** y el otro en el cojinete plantar. Cada grupo a su vez fue dividido en dos, uno con 13 ratones para las mediciones del grosor del sitio inoculado y del contralateral y el otro con 20 ratones para la cuantificación del número de las CL.

2) Cultivo de parásitos

Se cultivaron promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* a 25°C en RPMI 1460 (GIBCO) con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) **descomplementado**. Los promastigotes fueron contados en una cámara de Neubauer y cosechados mediante centrifugación del medio de cultivo a 4000 r.p.m. por 10 min a 25°C. El cálculo del número de promastigotes se hizo mediante la siguiente fórmula:

promastigotes/ml = # de promastigotes x 10,000 x factor de dilución

3) Infección

Cada uno de los ratones de ambos grupos fue infectado con 1×10^6 parásitos resuspendidos en un amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.15 M, pH 7.2. Un grupo de ratones fue inoculado en oreja (entre la dermis y el cartilago) y el **inóculo** fue de 5 μ l por ratón debido al grosor de la oreja, el segundo grupo fue inoculado con 20 μ l en el cojinete

plantar derecho. A un grupo de ratones se les realizaron mediciones del grosor de los sitios infectados y contralaterales en el transcurso de los 54 días que duró el experimento y el otro grupo fue sacrificado para la separación de las láminas epidérmicas y la cuantificación de las CL de las diferentes zonas de estudio.

4) Mediciones del grosor de las orejas y de los cojinetes plantares

Mediante el uso de un vernier se realizaron mediciones del grosor (mm) de los sitios inoculados y contralaterales de los 13 ratones de cada grupo, aproximadamente cada 10 días entre los días 0 y 54 posteriores a la infección.

5) Cinética de las células de Langerhans

A) Separación de láminas epidérmicas

Se obtuvieron las láminas epidérmicas de diferentes partes de los ratones, tales como: oreja, cojinete plantar, dorso del pie, nariz-labio, párpado y cola (zonas con poco o sin pelo donde hay CL). Las láminas epidérmicas se obtuvieron utilizando la técnica de Juhlin y Shelley (1977) en la que se emplea 0.02 M EDTA, pH 7.2. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les aplicó una crema depiladora en todas las zonas de estudio por un período de 5 min para dejarlas libres de pelo, después se enjuagaron perfectamente con agua, se secaron y separaron cada una de las partes. Las orejas fueron cortadas con tijeras y separadas por la mitad con la ayuda de unas pinzas de disección, obteniendo una parte dorsal y otra ventral, cada una con su epidermis. Para separar las partes dorsal del pie y cojinete plantar se utilizó una navaja de bisturí y se desprendieron completamente. En el caso de la zona de nariz-labio, el párpado y la cola se realizaron cortes en forma de rectángulo con ayuda de la navaja y se desprendieron con la pinza de disección. Cada una de estas partes

fue colocada en cajas de Petri con solución salina balanceada y EDTA 0.02 M, pH 7.2. Se acomodaron con pinzas de manera que la dermis estuviera en contacto con la solución y la epidermis se mantuviera seca. Las cajas se incubaron a 37°C durante 90 min. Posteriormente, los tejidos fueron transferidos a cajas con PBS 0.15 M, pH 7.2 y se procedió a separar las láminas epidérmicas con la ayuda de pinzas y agujas de disección utilizando un microscopio estereoscópico para obtener la epidermis lo más completa posible. Las láminas epidérmicas se colocaron en cajas de Petri con PBS 0.15 M, pH 7.2 y se prosiguió con su tinción.

B) Tinción para esterasa inespecífica

Las láminas epidérmicas fueron enjuagadas en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y fijadas en acetona concentrada a 4°C por 5 min. Posteriormente fueron lavadas con la misma solución amortiguadora donde permanecieron hasta que se preparó el medio de incubación, consistente de dos soluciones (A y B). Solución A: 1 g de pararosanilina, 5 ml de HCl concentrado y 20 ml de agua destilada. Esta mezcla se calentó a 60°C hasta que se disolvieron los cristales, se dejó enfriar y después de filtrada se guardó a 4°C. Solución B: solución de nitrito de sodio al 4 %.

El medio de incubación consistió de 20 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y 1.2 ml de pararosanilina hexasotizada, compuesta de 0.6 ml de la solución A y 0.6 ml de la solución B con 0.005 g de α naftil acetato disueltos en 0.2 ml de acetona. Una vez preparado el medio de incubación se eliminó todo el amortiguador de fosfatos donde se encontraban las láminas epidérmicas hasta dejarlas completamente secas y adheridas a la caja de Petri. Posteriormente se les agregó el medio de incubación y se despegaron con la ayuda de una aguja de disección, quedándose en incubación durante 10 min. Fueron revisadas al microscopio óptico y una vez que la tinción era la adecuada (cuando las CL se observaban

de un color más oscuro que el del fondo) se pasaron en agua destilada para lavarlas y finalmente se montaron en un portaobjetos con gelatina glicerizada de Kaiser.

C) Conteo de las células de Langerhans epidérmicas

Para contar las CL epidérmicas se utilizó una cámara lúcida adaptada a un microscopio óptico. Las preparaciones se observaron con un objetivo de 40x calibrando con una reglilla de manera que 18 campos del microscopio equivalían a $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ y el número de CL esterasa inespecífica positivas se expresó en mm^2 .

6) Análisis estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico de los resultados obtenidos utilizando la prueba de "U de Mann-Whitney".

V) RESULTADOS

Se infectaron 33 ratones BALB/c en oreja y 33 en cojinete plantar con *Leishmania mexicana mexicana*. A 26 ratones se les realizaron mediciones del grosor de los sitios inoculados y contralaterales y en 40 ratones se analizó la cinética de las CL epidérmicas en diferentes sitios anatómicos cada 10 días y durante un período de 54 días.

1) Análisis del grosor de la lesión y del número de células de Langerhans en ratones infectados en oreja con *Leishmania mexicana mexicana*

A) Medición del grosor

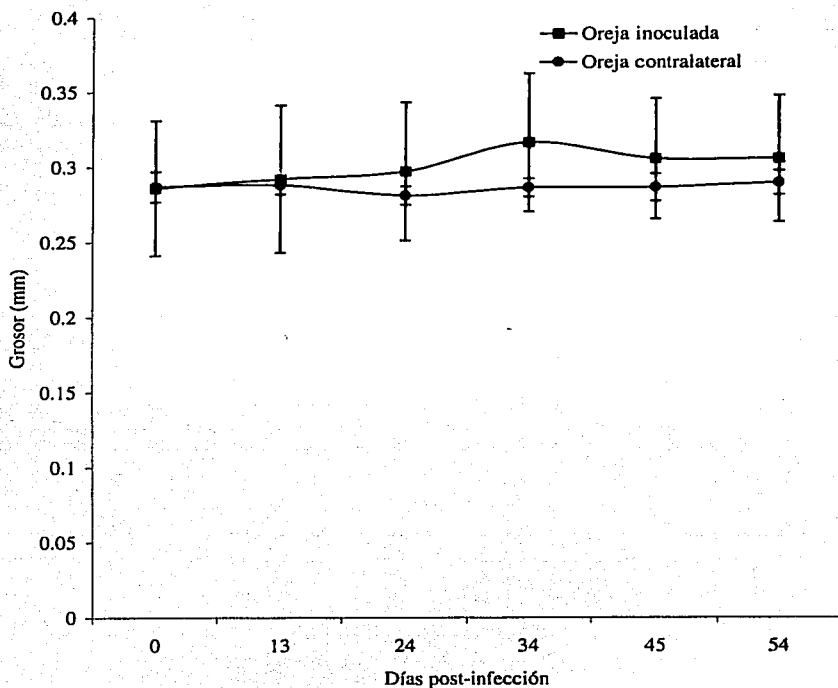
Se promediaron las mediciones del grosor de las orejas inoculadas y contralaterales de 13 ratones. En el caso de las orejas inoculadas se observó que el valor promedio de grosor pre-inóculo fue de 0.28 mm y aumentó muy ligeramente hasta llegar a un valor final de 0.3 mm el día 54. El pico de máximo grosor se presentó el día 34 post-inóculo siendo su valor promedio de 0.31 mm lo cual representa un aumento del 10 % con respecto al valor basal. Posteriormente hubo un ligero descenso a 0.3 mm finalizando así el experimento. La infección en oreja fue autolimitada y desapareció después de 34 días post-inóculo (Tabla 1 y Gráfica 1).

RATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	0.31	0.32	0.33	0.35	0.34	0.34
2	0.38	0.39	0.39	0.41	0.39	0.38
3	0.22	0.23	0.23	0.25	0.25	0.24
4	0.3	0.33	0.32	0.34	0.32	0.31
5	0.31	0.3	0.31	0.33	0.31	0.3
6	0.34	0.31	0.34	0.36	0.35	0.34
7	0.38	0.4	0.4	0.42	0.4	0.41
8	0.29	0.3	0.31	0.35	0.33	0.32
9	0.32	0.34	0.33	0.34	0.35	0.36
10	0.27	0.27	0.28	0.29	0.29	0.3
11	0.33	0.35	0.35	0.37	0.34	0.35
12	0.31	0.31	0.31	0.33	0.32	0.32
13	0.25	0.25	0.26	0.29	0.29	0.31
SUMATORIA	4.01	4.1	4.16	4.43	4.28	4.28
PROMEDIO	0.28643	0.29286	0.29714	0.31643	0.30571	0.30571
DESV.EST.	0.04562	0.04909	0.0469	0.04663	0.04051	0.04212

Tabla 1. Mediciones del grosor (mm) en oreja inoculada.

La cinética del tamaño de las lesiones del sitio inoculado y contralateral se presenta en la Gráfica 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 1. Mediciones del grosor (mm) de la oreja infectada con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* y de la oreja contralateral de ratones BALB/c.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El valor promedio del grosor de las orejas contralaterales fue de 0.28 mm al iniciar el experimento y se mantuvo invariable en el transcurso de los 54 días. Los valores se pueden observar en la Tabla 2.

WATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	0.28	0.29	0.28	0.29	0.3	0.29
2	0.29	0.28	0.27	0.29	0.29	0.3
3	0.27	0.29	0.28	0.28	0.27	0.28
4	0.3	0.3	0.28	0.29	0.29	0.3
5	0.29	0.3	0.27	0.28	0.28	0.29
6	0.3	0.29	0.28	0.28	0.27	0.28
7	0.29	0.29	0.29	0.28	0.29	0.29
8	0.28	0.28	0.28	0.29	0.29	0.3
9	0.27	0.29	0.28	0.29	0.3	0.3
10	0.3	0.29	0.28	0.29	0.29	0.28
11	0.29	0.28	0.29	0.28	0.28	0.29
12	0.29	0.28	0.29	0.3	0.29	0.28
13	0.29	0.29	0.29	0.28	0.29	0.28
SUMATORIA	3.74	3.75	3.66	3.72	3.73	3.76
PROMEDIO	0.28769	0.28846	0.28154	0.28615	0.28692	0.28923
DESV.EST.	0.01013	0.00689	0.00689	0.0065	0.00947	0.00862

Tabla 2. Mediciones del grosor (mm) en oreja contralateral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Cinética del número de las células de Langerhans

La evaluación de la cinética de las CL epidérmicas de ratones inoculados en oreja se realizó tanto del sitio infectado como de la oreja contralateral y en otras regiones epidérmicas a lo largo del experimento (Figura 4).

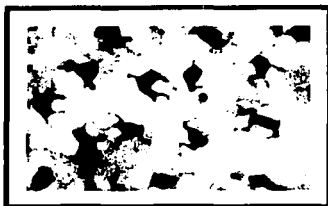


Figura 4. Células de Langerhans epidérmicas en oreja de ratón BALB/c teñidas para esterasa inespecífica.

El número basal pre-inóculo de las CL en la oreja infectada fue de 1062 células/mm² el cual aumentó progresivamente presentándose su pico máximo en el día 34 con un total de 2134 células. Durante este periodo hubo un aumento del 100 % en el número de CL de la oreja infectada siendo altamente significativo ($p=0.008$).

Posteriormente se observó una disminución y el experimento finalizó con 1418 células/mm² a los 54 días post-infección. Durante el transcurso de todo el experimento el número de CL en la oreja inoculada se observó incrementado con respecto al número basal (Tabla 3 y Gráfica 2).

PLATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	701	1480	1849	1677	1777	1049
2	1411	1590	2019	2683	1407	1608
3	1074	923	945	2043	1581	1598
4		1071		2134		
SUMATORIA	3186	5064	4813	8537	4765	4255
PROMEDIO	1062	1266	1604.33333	2134.25	1588.33333	1418.33333
DESV.EST.	355.1520801	319.60705	577.291376	415.744613	185.108977	319.891127

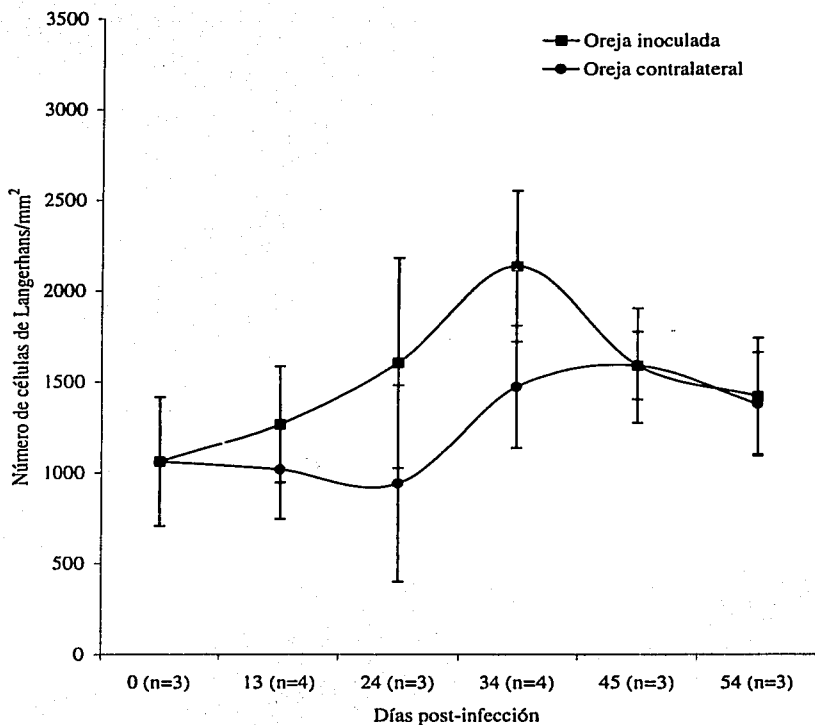
Tabla 3. Número de células de Langerhans por mm² en oreja inoculada.

En la oreja contralateral el valor basal pre-inóculo fue el mismo de la oreja infectada (1062 células/mm²). En la oreja contralateral también se presentó un ligero aumento progresivo en el número de CL que continuó hasta el día 45, donde hubo 1587 CL/mm² (p=0.01) lo cual representa un 49 % de aumento con respecto al valor inicial. Al finalizar el experimento el número descendió a 1375 células quedando muy similar al sitio inoculado (Tabla 4 y Gráfica 2).

PLATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	701	1167	1141	1171	1384	1050
2	1411	1299	1355	1952	1428	1504
3	1074	685	330	1365	1949	1572
4		921		1398		
SUMATORIA	3186	4072	2826	5886	4761	4126
PROMEDIO	1062	1018	942	1471.5	1587	1375.33333
DESV.EST.	355.1520801	271.698362	540.700472	335.6213143	14.2721752	283.791003

Tabla 4. Número de células de Langerhans por mm² en oreja contralateral.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 2. Cinética de las células de Langerhans epidérmicas en ratones BALB/c infectados en oreja con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

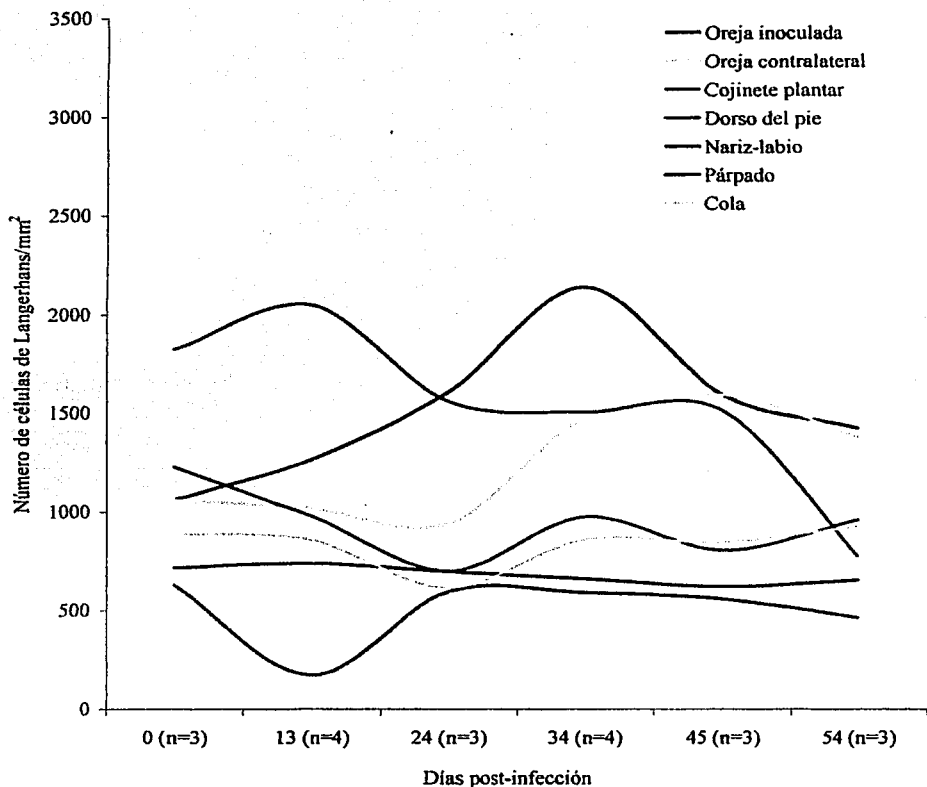
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En resumen, la infección en oreja indujo un aumento en el número de CL en el sitio infectado que empezó de manera inmediata y progresó hasta el día 34 post-infección. Se observó una correlación entre el tamaño y el número de las CL en el sitio lesionado pues cuando aumenta la lesión también aumentan las CL y cuando desciende la lesión disminuye su número. La infección en oreja también llevó a un ligero aumento de CL en la oreja contralateral sana, aunque aquí el incremento inició después del día 24 y llegó a su expresión máxima a los 45 días con un descenso posterior. Al día 34, el aumento en la oreja contralateral llegó al 68 % de los valores obtenidos para la oreja infectada. Adicionalmente se analizó el número de CL en la epidermis de otros sitios anatómicos (Tabla 5).

Día	Oreja inoculada	Oreja contralateral	Cojinete plantar	Dorso del pie	Nariz-labio	Párpado	Cola
0	1062	1062	1824	1229	630	717	890
13	1266	1018	2046	978	175	738	857
24	1604	942	1558	700	596	697	615
34	2134	1470	1501	974	592	660	857
45	1587	1586	1507	803	557	620	842
54	1418	1375	774	956	463	652	924

Tabla 5. Promedio del número de células de Langerhans por mm^2 en ratones BALB/c inoculados en oreja.

El único otro sitio que mostró diferencias significativas en el número de CL cuando el animal se inoculó en oreja fue el cojinete plantar ($p=0.03$) pues tuvo un descenso del 58% al final del experimento ($774 \text{ CL}/\text{mm}^2$) por debajo de los valores iniciales ($1824 \text{ CL}/\text{mm}^2$). Para el resto de los sitios estudiados (dorso del pie, nariz-labio, párpado y cola) no se presentaron cambios significativos en el número de CL (Tabla 5 y Gráfica 3).



Gráfica 3. Cinética de las células de Langerhans epidérmicas en distintos sitios de ratones BALB/c infectados en oreja con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2) Análisis del grosor de la lesión y del número de células de Langerhans en ratones infectados en plantar con *Leishmania mexicana mexicana*

A) Medición del grosor

Cuando la infección se realizó en el cojinete plantar de los 13 ratones, encontramos que la lesión aumentó en grosor de manera continua durante los 54 días del estudio, este aumento del 42 % fue altamente significativo ($p=0.00015$) y difiere de las observaciones hechas en la oreja infectada. El valor promedio del grosor de los cojinetes plantares inoculados al inicio fue de 1.65 mm y aumentó progresivamente hasta llegar a 2.35 mm al finalizar el experimento (Tabla 6). La infección en el cojinete plantar llevó a una enfermedad progresiva que inició a los 13 días post-inóculo (Figura 5).

RATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	1.63	1.89	1.98	1.95	2	2.12
2	1.66	1.84	1.94	1.97	2.1	2.14
3	1.63	1.89	1.91	2.05	2.13	2.22
4	1.69	1.9	1.99	2.19	2.29	2.41
5	1.64	1.8	1.84	1.84	2.1	2.22
6	1.62	1.75	1.82	1.91	2.1	2.6
7	1.6	1.78	1.83	1.99	2.15	2.28
8	1.65	2	2.2	2.1	2.2	2.42
9	1.72	1.85	2	2.2	2.49	2.88
10	1.68	1.83	1.9	1.95	1.98	2.43
11	1.76	1.99	2	1.99	2.14	2.28
12	1.51	1.76	1.86	2.07	2.21	2.34
13	1.78	1.95	2.01	2	2.09	2.21
SUMATORIA	21.57	24.23	25.28	26.21	27.98	30.55
PROMEDIO	1.65923	1.86385	1.94462	2.01615	2.15231	2.35
DESV.EST.	0.07029	0.08231	0.10365	0.10405	0.13046	0.20789

Tabla 6. Mediciones del grosor (mm) del cojinete plantar inoculado.

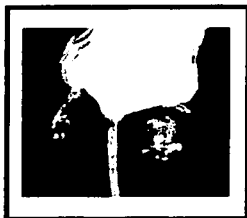


Figura 5. Lesión en cojinete plantar de ratón BALB/c infectado con *Leishmania mexicana mexicana*.

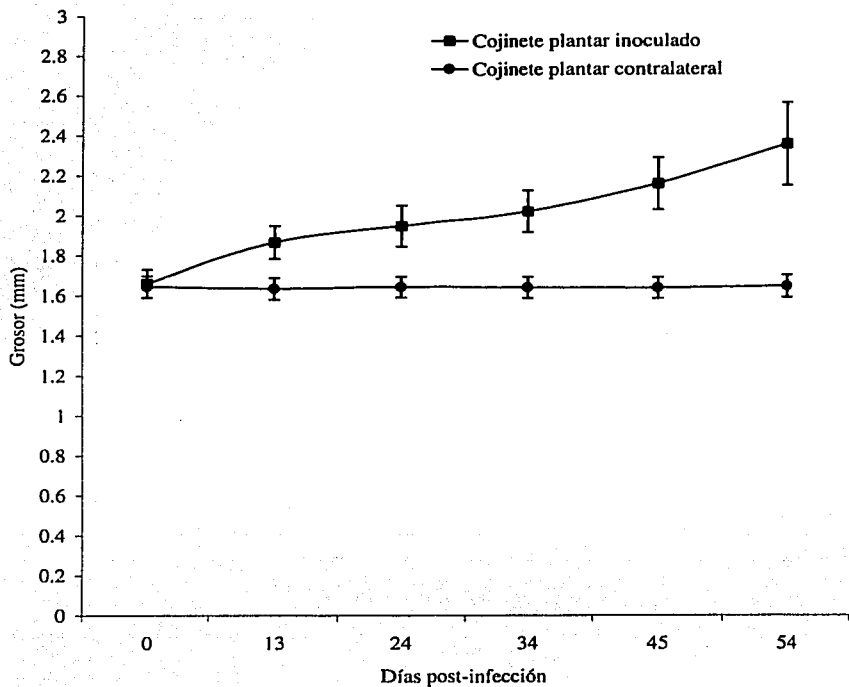
La medida del grosor en los cojinetes plantares contralaterales se mantuvo casi constante en el lapso de los 54 días, con un valor promedio de 1.63 mm a lo largo del experimento (Tabla 7).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTAR \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	1.62	1.61	1.62	1.62	1.61	1.62
2	1.67	1.68	1.67	1.67	1.66	1.67
3	1.61	1.6	1.61	1.6	1.6	1.61
4	1.69	1.68	1.69	1.69	1.69	1.69
5	1.62	1.6	1.61	1.6	1.6	1.61
6	1.62	1.61	1.62	1.61	1.61	1.62
7	1.63	1.62	1.63	1.63	1.62	1.63
8	1.66	1.64	1.65	1.64	1.64	1.65
9	1.68	1.67	1.68	1.68	1.67	1.68
10	1.67	1.65	1.65	1.65	1.65	1.66
11	1.7	1.68	1.69	1.69	1.69	1.7
12	1.5	1.49	1.5	1.5	1.5	1.49
13	1.7	1.69	1.7	1.69	1.69	1.7
SUMATORIA	21.37	21.22	21.32	21.27	21.23	21.33
PROMEDIO	1.64385	1.63231	1.64	1.63615	1.63308	1.64077
DESV. EST.	0.05409	0.05434	0.05292	0.05331	0.05266	0.05619

Tabla 7. Mediciones del grosor (mm) del cojinete plantar contralateral.

En la Gráfica 4 se observa la cinética de la evolución de la lesión con aumento progresivo en el grosor del plantar infectado.



Gráfica 4. Mediciones del grosor (mm) del cojinete plantar infectado con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* y del cojinete plantar contralateral de ratones BALB/c.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B) Cinética del número de las células de Langerhans

Se cuantificaron las CL en las láminas epidérmicas del cojinete plantar infectado, del contralateral, de la oreja, del dorso del pie, de la región de nariz-labio, del párpado y de la cola.

Los resultados obtenidos en el número de CL por mm^2 en los ratones infectados en el cojinete plantar muestran que en el sitio inoculado las CL aumentaron de 1824 hasta 2450 al final del experimento, aunque este aumento del 34 % no fue significativo (Tabla 8).

RATON \ DIAS	0	13	24	34	45	54
1	1081	829	596	2832	842	1499
2	2258	2146	1891	1995	2343	2823
3	2133	2000	1245	1404	883	3028
4		1973		2077		
SUMATORIA	5472	6948	3732	8308	4068	7350
PROMEDIO	1824	1737	1244	2077	1356	2450
DESV.EST.	646.4851126	10.08469464	7.500579585	85.85493185	5.012865829	943974

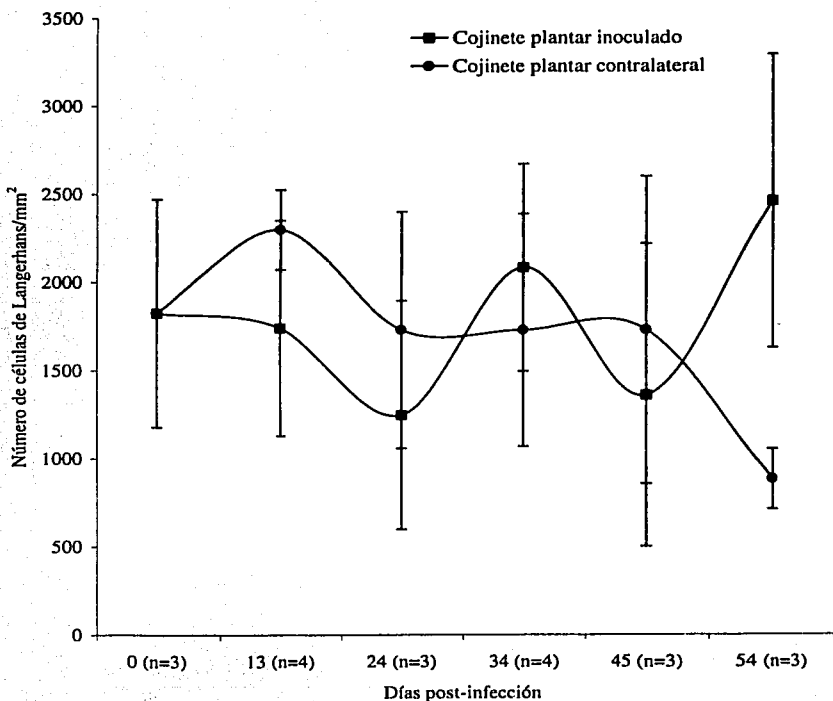
Tabla 8. Número de células de Langerhans por mm^2 en cojinete plantar inoculado.

En el caso del cojinete plantar contralateral el número de CL disminuyó de 1824 hasta 879 células por mm² al finalizar el experimento con un aumento transitorio de 2295 células a los 13 días post-infección (Tabla 9).

DIAS	0	13	24	34	45	54
1	1081	2199	2480	2528	2593	825
2	2258	2514	1493	918	855	742
3	2133	2022	1202	1752	1724	1070
4		2445		1694		
SUMATORIA	5472	9180	5175	6892	5172	2637
PROMEDIO	1824	2295	1725	1723	1724	879
DESV.EST.	646.485112	226.720092	669.842519	657.706115	869170.537386	

Tabla 9. Número de células de Langerhans por mm² en cojinete plantar contralateral.

Comparando los sitios inoculado y contralateral se observó que mientras el cojinete plantar inoculado presentó un aumento en el número de células, en el cojinete plantar contralateral hubo una disminución al finalizar el experimento (Gráfica 5).



Gráfica 5. Cinética de las células de Langerhans epidérmicas en ratones BALB/c infectados en cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

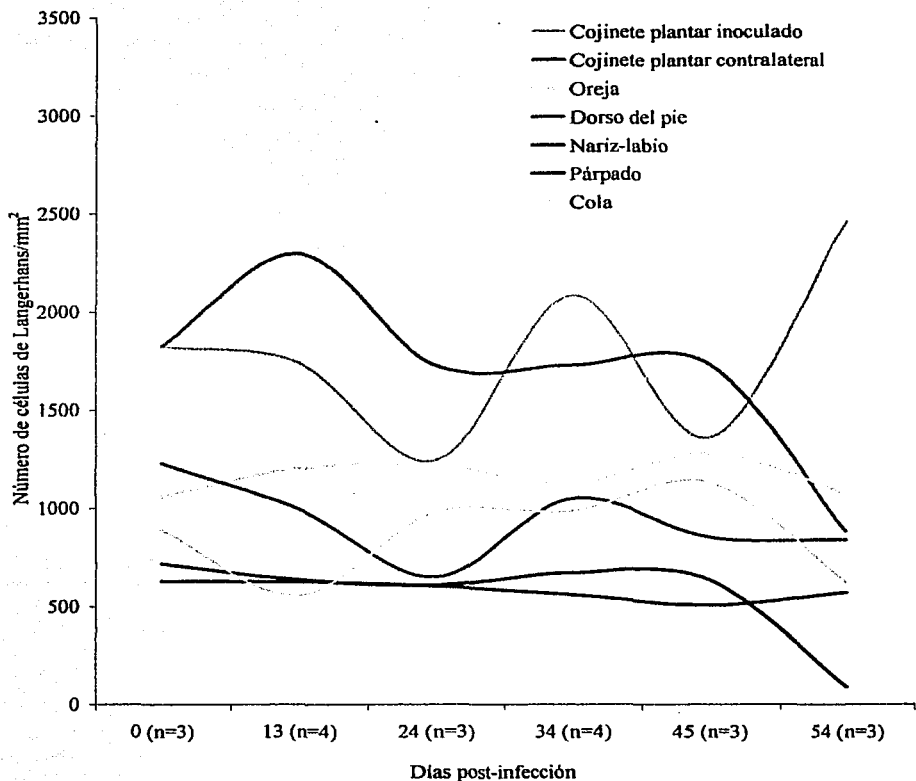
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los ratones inoculados en el cojinete plantar el número de CL en otros sitios de la piel no varió en el transcurso de la infección. Únicamente en el párpado se observó un descenso brusco de 717 a 92 CL al final del ensayo. Las CL de la oreja no presentaron fluctuaciones numéricas, siendo su número basal de 1062 células y terminal de 1076/mm². El número de las CL localizadas en el dorso del pie varió ligeramente de un número basal de 1230 hasta 835 células al final. Igualmente, en el caso de la zona de nariz-labio el número se mantuvo casi constante, siendo al inicio de 630 células/mm² y al final de 569. En la cola se contaron 890 células/mm² al inicio del experimento y al final disminuyó ligeramente hasta 622 CL. La tendencia que se observa en cojinete plantar contralateral, dorso del pie, párpado y cola al terminar el experimento es de una disminución en el número de CL (Tabla 10 y Gráfica 6).

Día	Cojinete plantar inoculado	Cojinete plantar contralateral	Oreja	Dorso del pie	Nariz-labio	Párpado	Cola
0	1824	1824	1062	1230	630	717	890
8	1737	2295	1203	997	624	636	557
24	1243	1725	1217	651	604	609	977
34	2077	1723	1125	1047	559	669	982
45	1356	1724	1274	849	505	632	1129
54	2450	879	1076	835	569	92	622

Tabla 10. Promedio del número de células de Langerhans por mm² en ratones BALB/c inoculados en cojinete plantar.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Gráfica 6. Cinética de las células de Langerhans epidérmicas en distintos sitios de ratones BALB/c infectados en cojinete plantar con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana mexicana*.

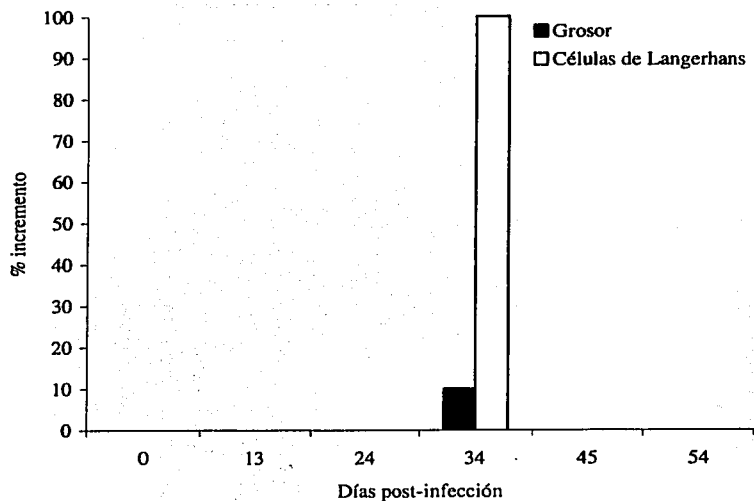
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Interesantemente, la cinética de las CL en el cojinete plantar infectado fue muy diferente a la observada en la oreja infectada, ya que en la oreja el incremento en el número de CL fue muy rápido, llegando a la duplicación (100 %) de los valores iniciales a los 34 días post-infección (Gráfica 2 y Gráfica 7). A diferencia de esto, el incremento en el número de CL en el cojinete plantar ocurrió más lento y a los 54 días aún no se había duplicado, solo se había incrementado en un 34 % (Gráfica 5 y Gráfica 7). En ambos casos el número máximo de CL se observó en el momento de máxima expresión de la lesión, es decir 10 % de aumento en el grosor de la oreja inoculada y 42 % de aumento en el grosor del cojinete plantar inoculado (Gráfica 7).

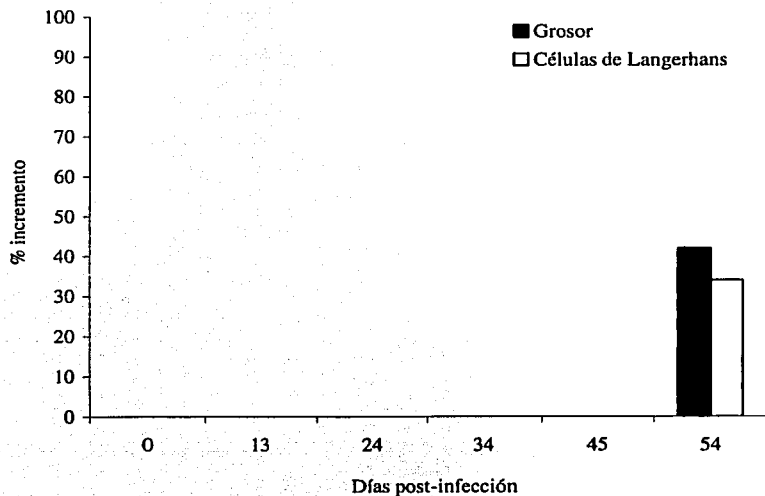
También se observó un comportamiento distinto en las CL de los sitios contralaterales a la infección, ya que las CL de la oreja contralateral aumentaron de manera paralela con las de la infectada (Gráfica 2), lo cual no ocurrió en el cojinete plantar contralateral (Gráfica 5).

En resumen, se observaron diferencias en la cinética de las CL epidérmicas, dependientes del sitio de la infección. Mientras que la infección en oreja cursó con un aumento rápido en el número de CL en la oreja infectada y un aumento paralelo de las células en la oreja contralateral (Gráfica 2), la infección en el cojinete plantar cursó con un aumento lento en el número de CL únicamente en el cojinete plantar infectado (Gráfica 5).

**Oreja
inoculada**



**Cojinete
plantar
inoculado**



Gráfica 7. Comparación entre el tamaño de la lesión y el número de células de Langerhans de ratones BALB/c infectados en oreja y cojinete plantar en el día de su máxima expresión.

VI) DISCUSIÓN

Las CL de la piel presentes en número y función normales juegan un papel de centinelas equipando a la superficie cutánea con una elaborada red de procesos dendríticos preparada para capturar materiales externos y presentarlos con gran eficiencia a linfocitos T con inducción de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, cuando las CL están ausentes o disminuidas en la piel o están significativamente alteradas en sus propiedades, esa red falla en la respuesta inmunológica. Las superficies cutáneas deficientes en CL deben ser particularmente susceptibles a la infección por microorganismos (Tsukahara y Horiuchi, 1996; Saint-André Marchal *et al*, 1997; Guerriero *et al*, 2000).

Este es el primer estudio donde se analiza el número de CL en la leishmaniasis, lo cual es importante debido a que esta enfermedad se establece a nivel de la piel y es con estas células con las que el parásito se encuentra de manera inmediata. El análisis de los cambios en el número y en la cinética a lo largo de la enfermedad pudiera tener implicaciones importantes en la severidad del padecimiento. En este estudio encontramos que la cinética de las CL se correlaciona directamente con la evolución del padecimiento, ya que el pico máximo en el número de CL se encontró en los momentos de máxima expresión de la lesión. Sin embargo, esta cinética es diferente en los distintos sitios de infección. Mientras que en la infección en oreja se observó un incremento rápido en el número de CL llegando a su máxima expresión a los 34 días post-infección, la infección en el cojinete plantar cursó con un aumento lento y progresivo a lo largo de los 54 días que duró el estudio. Interesantemente la infección en oreja también mostró su máximo aumento en grosor a los 34 días post-infección, posterior a lo cual la lesión disminuyó llegando a una

recuperación completa de la piel al finalizar el experimento. En la infección en oreja, el rápido incremento de hasta el 100 % en las CL se correlacionó con una resolución rápida y eficiente de la lesión.

A diferencia de esto, la infección en el cojinete plantar cursó con una evolución progresiva del padecimiento encontrándose una lesión de 2.35 mm a los 54 días y se observó un retardo en el incremento de las CL con un pico máximo registrado al finalizar el experimento. La infección en el cojinete plantar, a diferencia de la infección en oreja, no curó espontáneamente sino que mostró una evolución progresiva en paralelo con un incremento tardío del número de CL.

La eficiente curación observada en oreja pudiera deberse a que la región de la oreja está drenada por una gran cadena ganglionar cervical y la activación de células de la respuesta inmune por las CL migratorias sería mayor. En el caso del cojinete plantar dicha activación es retardada, ya que los ganglios popliteo e inguinal se encuentran más alejados del sitio de la infección y las CL tardarían más tiempo en llegar del sitio infectado con *Leishmania* al ganglio. En otros experimentos, donde se ha seguido por más tiempo la evolución de la lesión en el cojinete plantar, se ha observado que sigue aumentando su grosor hasta llegar a la diseminación de la lesión en las extremidades anteriores, en las orejas, en la región de nariz-labio y en la cola.

Aparentemente el incremento rápido y oportuno de las CL en la oreja posiblemente favoreció la curación espontánea en este sitio, mientras que el retardo observado en el cojinete plantar permitió que *Leishmania* se estableciera y multiplicara incontroladamente. La presencia temprana de CL en el sitio de la infección posiblemente garantice la producción de la citocina IL-12 que es activadora de macrófagos y favorece la curación ya

que induce a la respuesta Th1 con aumento en la producción de metabolitos tóxicos de oxígeno generados con el estallido oxidativo y de óxido nítrico. Ambos son críticos para la eliminación efectiva de este parásito intracelular.

Por otro lado, el retardo en la aparición de las CL evita la presencia temprana de IL-12 por lo que la activación de macrófagos es deficiente. Así, el retardo en la aparición de las CL favorece la multiplicación incontrolada del parásito dentro del macrófago en las fases tempranas del padecimiento. Una vez establecida la infección incontrolada dentro de los macrófagos, la aparición tardía de las CL aparentemente ya no representa un papel protector y ya no se correlaciona con la curación, sino con la progresión de la infección. La aparición tardía de las CL permite la multiplicación incontrolada del parásito dentro de los macrófagos llevándolos a inclinar la balanza irreversiblemente hacia una respuesta Th2.

Un análisis de citocinas presentes en la lesión en distintas etapas de la infección permitirá un análisis cualitativo de la participación de las CL en la leishmaniasis.

Las CL no únicamente desempeñan un papel protector en la leishmaniasis, también pueden ser infectadas por *Leishmania major* (Moll, 1993b). Sin embargo, las CL carecen de los mecanismos leishmanicidas como el estallido oxidativo y la producción de óxido nítrico presente en los macrófagos (Blank *et al*, 1996). Por ello, la incorporación de *Leishmania* a las CL le representa un nicho favorable que le permite multiplicarse incontroladamente llevando a una infección progresiva. De esta manera el número y la cinética de aparición de las CL en la leishmaniasis pudiera ser crítico para garantizar una activación temprana del macrófago con eliminación eficaz del parásito, antes de que logre evadir la respuesta inmune infectando a las CL. Interesantemente Moll (1993) únicamente encontró CL infectadas en fases tardías de enfermedades progresivas.

Nuestro estudio también es el primero en apuntar los cambios ocurridos en el número de CL epidérmicas en los sitios contralaterales a los infectados. Aún se desconocen los mecanismos y mediadores involucrados en estos cambios, sin embargo, es interesante observar que la red de las CL no responde de forma aislada a un estímulo infeccioso, sino que aparentemente hay una respuesta "generalizada". La implicación biológica de esta observación quedaría por estudiarse.

Este estudio arroja nueva luz sobre la importancia de la presencia y migración oportuna de las CL al sitio de la infección. La importancia de este trabajo no radica únicamente a nivel de conocer mejor los mecanismos de relación huésped-parásito en la leishmaniasis, sino que también aporta nuevos conocimientos sobre mecanismos de evasión que le permiten al parásito establecerse eficientemente en el hospedero. Además, los datos obtenidos en el presente estudio permitirán un diseño más racional del sitio de aplicación de posibles vacunas contra la *Leishmania*, ya que las características de procesamiento inmunológico de antígenos son diferentes en distintos sitios anatómicos de la piel.

VII) CONCLUSIONES

1) Con este estudio se concluye que el número de las CL se correlaciona directamente con el tamaño de la lesión en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana mexicana*.

2) La cinética de las CL se correlaciona con el pronóstico del padecimiento, ya que la aparición rápida en oreja llevó a su curación, mientras que la aparición retardada en el cojinete plantar se correlacionó con la progresión del padecimiento.

VIII) PERSPECTIVAS

Otros aspectos que pueden ser estudiados para tener un mayor conocimiento del papel que desempeñan las CL en la leishmaniasis son:

- 1) Analizar las CL de ratones resistentes a la leishmaniasis (C57BL/6).
- 2) Estudiar sitios de infección con pocas CL.
- 3) Infectar con diferentes cepas de *Leishmania*.
- 4) Determinar la producción local de citocinas.

IX) LITERATURA CITADA

- Acolla, R. S., Adorini, L., Sartoris, S., Sinigaglia, F. y Guardiola, J. 1995. MHC: orchestrating the immune response. *Immunol. Today* 16: 8-11.
- Afonso, L. C. C., Scharton, T. M., Vieira, L. Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. y Scott, P. 1994. The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263: 235-237.
- Axelrod, O., Klaus, S. y Frankenburg, S. 1994. Antigen presentation by epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 16(11): 593-598.
- Banchereau, J. y Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B. y Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- Becker, I., Volkow, P., Velasco-Castrejón, O., Salaiza-Suazo, N., Berzunza-Cruz, M., Delgado-Domínguez, J. S., Morales-Vargas, A., Ruiz-Remigio, A. y Pérez-Montfort, R. 1999. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 85: 165-170.
- Beelen, R. H. J., Van't Veer, M. B., Fluitsma, D. M. y Hoesfsmi, E. C. M. 1978. Identification of different peroxidatic activity patterns in human macrophages *in vivo* and *in vitro*. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24: 351-362.

- Bergstresser, P. R., Fletcher, C. R. y Streilein, J. W. 1980a. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J. Invest. Dermatol.* 74: 77-80.
- Bergstresser, P. R., Toews, G. B., Gilliam, J. N. y Streilein, J. W. 1980b. Unusual numbers and distributions of Langerhans cells in skin with unique immunologic properties. *J. Invest. Dermatol.* 74: 312-314.
- Bergstresser, P. R., Toews, G. B. y Streilein, J. W. 1980c. Natural and perturbed distributions of Langerhans cells: responses to ultraviolet light, heterotopic skin grafting, and dinitrofluorobenzene sensitization. *J. Invest. Dermatol.* 75: 73-77.
- Berman, B. y France, D. S. 1979. Histochemical analysis of Langerhans cells. *Am. J. Dermatopathol.* 1: 215.
- Berzuna-Cruz, M., Bricaire, G., Romero, S., Pérez-Becker, R. Saavedra, E., Pérez-Montfort, R., Crippa-Rossi, M., Velasco-Castrejón, O. y Becker, I. 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism análisis of kinetoplastic DNA. *Exper. Parasitol.* 95: 277-284.
- Billingham, R. F. y Medawar, P. B. 1953. A study of the branched cells of the mammalian epidermis with special reference to the fate their division products. *Phyl. Trans. Roy. Soc. B.* 237: 151-169.
- Birbeck, M. S. L., Breathnach, A. S. y Everall, J. D. 1961. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* 37: 51-64.
- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M. y Moll, H. 1993. Parasitism of

- epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. J. Infect. Diseases 167(2): 418-425.
- Blank, C., Bogdan, C., Bauer, C., Erb, K. y Moll, H. 1996. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. Eur. J. Immunol. 26: 792-796.
- Blauvelt, A., Katz, S. I. y Udey, M. C. 1995. Human Langerhans cells express E-cadherin. J. Invest. Dermatol. 104: 293-296.
- Bogdan, C., Gessner, A., Solbach, W. y Rölinghoff, M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. Current Opinion in Immunol. 8: 517-525.
- Bourlond, A., Wolff, K. y Winkelmann, R. K. 1962. Cholinesterase in melanocytes of the bat. Nature 214: 816-817.
- Breathnach, A. S. 1975. The cell of Langerhans. Int. Rev. Cytol. 18: 1-28.
- Breathnach, A. S. 1980. Branched cells in the epidermis: an overview. J. Invest. Dermatol. 75: 6-11.
- Breathnach, A. S. 1981. Ultrastructural morphology of Langerhans cells of normal human epidermis. En: Marks, R. y Christophers, E. (eds.). The epidermis in disease. MTP Press. Lancaster. 501 pp.
- Brown, J., Winklemann, R. K. y Wolff, K. 1967. Langerhans cells in vitiligo: a quantitative study. J. Invest. Dermatol. 19: 386-390.
- Carrillo-Farga, J. y Pérez-Vega, S. 1997. El Atlas de Hematología en video. CyberCell, México. 284 pp.
- Castes, M., Agnelli, A., Verde, O. y Rondon, A. J. 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 27: 176-186.

- Chang, K. P. y Fong, D. 1985. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: Chang, K. P. y R. S. Bray (eds.). *Leishmaniasis, human parasitic diseases*. Elsevier Science Publishers. Madrid. 1-30 pp.
- Dubertret, L., Breton-Gorius, J., Fosse, M. y Touraine, R. 1981. Peroxidatic activity in endoplasmic reticulum of normal human Langerhans cells. *J. Reticuloendothel. Soc.* 30: 313-316.
- Ebling, F. J. G. 1980. Homage to Paul Langerhans. *J. Invest. Dermatol.* 75: 3-5.
- Elleder, M. 1975. Activity of α -D-mannosidase in human Langerhans epidermal cells. *Virchows Arch. B Cell Path.* 19: 93-96.
- Elofsson, R., Andresson, A., Falck, B. y Sjöberg, S. 1981. Evidence for endocytic mechanisms in the epidermal Langerhans cells. *Acta Dermatolvenereol. (Suppl.)* 99: 29.
- Figdor, C. G., Kooyk, Y. y Adema, G. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature* 2: 77-84.
- Flores-Romo, L. 2001. *In vivo* maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 102: 255-262.
- Gaafar, A., Fadl, A., El Kadar, A. Y., El Hassan, M. M., Kemp, M., Ismail, A. I. A., Morgos, S. A. y El Hassan, A. M. 1994. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* of different zymodemes in the Sudan and Saudi Arabia: a comparative study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 552-554.
- Gielen, V., Schmitt, D. y Thivolet, J. 1988. HLA class I antigen (heavy and light chain) expression by Langerhans cells and keratinocytes of the normal human epidermis: ultrastructural quantification using immunogold labeling procedure. *Arch.*

Dermatol. Res. 280: 131.

Gschnait, F. y Brenner, W. 1979. Kinetics of epidermal Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 73: 566-569.

Guerriero, C., Albanesi, C., Girolomoni, G., De Simone, C., Capizzi, R., Amerio, P. y Tulli, A. 2000. Hurez syndrome: case report with a detailed analysis of skin dendritic cells. *Br. J. Dermatol.* 143: 1091-1096.

Haldar, J. P., Ghose, S., Saha, K. C. y Ghose, A. C. 1983. Cell-mediated immune response in indian kala azar and post-kala azar dermal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 42: 702-707.

Hertz, C. J., Kiertcher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D. y Modlin, R. L. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-Like Receptor 2. *J. Immunol.* 166: 2444-2450.

James, P. W., Schmidt, S. M., Greer, K. E., McCall, C. O. y Pearson, R. D. 1997. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis in a traveler. *South. Med. J.* 90(3): 325-327.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. y Capra, J. D. 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. Current Biology Publications, U.S.A. 635 pp.

Jarret, A. y Riley, P. A. 1962. Esterase activity in dendritic cells. *Br. J. Dermatol.* 75: 79-81.

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heuffer, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. y Nussenzweig, M. C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375: 151-154.

Juhlin, L. y Shelley, W. B. 1977. New staining techniques for the Langerhans cell. *Acta Dermatolvenereol.* 57: 289-296.

- Katz, S. I., Tamaki, K. y Sachs, D. H. 1979. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 282: 324-326.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H. y Ashford, R. W. 1974. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *Proc. Royal Soc. London* 187: 409-419.
- Kolde, G. y Knop, J. 1987. Different cellular reaction patterns of epidermal Langerhans cells after application of contact sensitizing, toxic, and tolerogenic compounds. A comparative ultrastructural and morphometric time-course analysis. *J. Invest. Dermatol.* 89: 19.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M. y Bruin, G. 1986. Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163: 981-997.
- Langerhans, P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 44: 325-337.
- Lawyer, P. G., Young, D. G., Butler, J. F. y Akin, D. E. 1987. Development of *Leishmania m. mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *J. Exp. Entomol.* 24: 347-355.
- Lezama, D. C. e Isaac, M. A. 1995. Inmunobiología de las leishmaniasis. Universidad Autónoma de Campeche. México. 115 pp.
- Locksley, R. M. y Klebanoff, S. J. 1983. Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *J. Cell. Biochem.* 22: 173-185.
- Lynch, D. H., Gurish, M. F. y Daynes, R. A. 1981. Relationship between epidermal Langerhas cell density, ATPase activity and the induction of contact

hipersensitividad. *J. Immunol.* 126: 1892-1897.

Mackenzie, I. C. y Squier, C. A. 1975. Cytochemical identification of ATPase-positive Langerhans cells in EDTA-separated sheets of mouse epidermis. *Br. J. Dermatol.* 92: 523-533.

Maruyama, T., Uda, H. y Yokoyama, M. 1980. Localization of non-specific esterase and endogenous peroxidase in the murine epidermal Langerhans' cells. *Br. J. Dermatol.* 103: 61-66.

Mason-Bahr, P. E. C. 1971. Leishmaniasis. *Int. Rev. Trop. Med.* 4: 123-140.

Masson, P. 1948. Pigment cells in man. En: *The Biology of the melanosome* (M. Gordon, ed.). *Spec. Publ. NY Acad. Sci.* 4: 15-51.

Moll, H. 1993a. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today* 14(8): 383-387.

Moll, H. 1993b. Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cells internalize *Leishmania major* and induce an antigen-specific T-cell response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 329: 587-592.

Moll, H., Flohé, S. y Blank, C. 1995. Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice. A role in the maintenance of T-cell memory? *Adv. Exp. Med. Biol.* 378: 507-509.

Nicolle, C. H. 1908. Culture du parasite du Bouton d'Orient. *C. R. Sci. Acad. Sci. Paris.* 146: 842-843.

Niebauer, G., Krawczyk, W. S., Kidd, R. L. y Wilgramm, G. F. 1969. Osmium zinc iodide reactive sites in the epidermal Langerhans cell. *J. Cell. Biol.* 43: 80-89.

OPS/OMS. 1994. Epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis en

América Latina. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.

Proudfoot, A. E. I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature* 2: 106-115.

Pruneiras, M. 1969. Interactions between keratinocytes and dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 52: 1-17.

Rawles, M. E. 1948. Origin of pigment cells from the neural crest in the mouse embryo. *Physiol. Zool.* 20: 248-266.

Riley, P. A. 1966. Esterase in epidermal dendritic cells of the mouse: study of the histochemical properties and distribution of activity of the enzyme in relation to pattering in the tail. *Br. J. Dermatol.* 78: 388-397.

Saint-André Marchal, I., Dezutter-Dambuyant, C., Martin, J. P., Willet, B. J., Woo, J. C., Moore, P. F., Magnol, J. P., Schmitt, D. y Marchal, T. 1997. Quantitative assessment of feline epidermal Langerhans cells. *Br. J. Dermatol.* 136: 961-965.

Schleger, A. V. y Bean, K. G. 1973. The melanocyte system of the cattle skin. The amelanotic dendritic cells of epidermis. *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 983-943.

Schmitt, D., Dezutter-Dambuyant, C., Brochier, J. y Thivolet, J. 1986. Subclustering of CD1 monoclonal antibodies based on the reactivity on human Langerhans cells. *Immunol. Lett.* 12: 231-235.

Schuler, G. 1991. *Epidermal Langerhans Cells.* CRC Press, Boca Raton. 324 pp.

Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E. y Sher, A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 168: 1675-1684.

Scott, P. 1989. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp.*

Parasitol. 68: 369-372.

Shortt, H. E., Barraud, P. J. y Craighesd, A. C. 1926. The life-history and morphology of *Herpetomonas donovani* in the sandfly *Phlebotomus argentipes*. Ind. J. Med. Res. XIII: 947-959.

Silberberg, I. 1971. Ultrastructural studies of Langerhans cells in contact sensitive and primary irritant reactions to mercuric chloride. Clin. Res. 19: 715 (abst).

Silberberg, I. 1973. Apposition of the mononuclear cells to Langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. Acta Dermatolvenereol. (Stockh). 53: 1-12.

Silberberg, I., Baer, R. L., Rosenthal, S. A., Thorbecke, G. J. y Berezowsky, V. 1975. Dermal and intravascular Langerhans cells at sites of passively induced allergic contact sensitivity. Cell. Immunol. 18: 435-453.

Silvers, W. K. 1957. A histological and experimental approach to determine the relationship between gold-impregnated dendritic cells and melanocytes. Am. J. Anat. 100: 225-240.

Sontheimer, R. D. y Bergstresser, P. R. 1982. Epidermal Langerhans cell involvement in cutaneous lupus erythematosus. J. Invest. Dermatol. 79: 237-243.

Sontheimer, R. D., Stastny, P. y Nunez, G. 1986. HLA-D region antigen expression by human epidermal Langerhans cells. J. Invest. Dermatol. 87: 707-710.

Streilein, J. W., Toews, G. T., Gilliam, J. N. y Bergstresser, P. R. 1980. Tolerance or hypersensitivity to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene: the role of Langerhans cell density within epidermis. J. Invest. Dermatol. 74: 319-322.

Sypck, J. P., Chung, C. L., Mayor, S. E. H., Subramanyam, J. M., Goldman, S. J., Sieburth,

- D. S., Wolf, S. F. y Schaub, R. G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *J. Exp. Med.* 177: 1797-1802.
- Tamaki, K. y Katz, S. I. 1980. Ontogeny of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 75: 12-13.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R. y Udey, M. C. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361: 82-85.
- Teunissen, M. B. M., Rongen, H. A. H. y Bos, J. D. 1994. Function of adhesion molecules lymphocyte function-associated antigen-3 and intercellular adhesion molecule-1 on human epidermal Langerhans cells in antigen-specific T cell activation. *J. Immunol.* 152: 3400-3406.
- Tsukahara, T. y Horiuchi, Y. 1996. Immunohistochemical study of cellular events in lesional skin on common virus infections. *J. Dermatol.* 23: 22-32.
- Velasco, C. O. 1987. Las leishmaniasis en México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 119-126.
- Velasco, C. O., Savarino, S. J. y Walton, B. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4: 280-289.
- Velasco, C. O. 1991a. La magnitud de una infección endémica: las leishmaniasis. En: *La seroepidemiología en México-volumen I* (A. Escobar ed.). Publicación Técnica del INDRE # 9. México, D.F. 67-76 pp.
- Velasco, C. O., Guzmán, B. C., Cruz, R. J. y González, D. F. 1991b. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE # 7. México, D.F. 56 pp.

- Velasco-Castrejón, O., Rivas, B., Lázaro, G. y Hobart, S. 1997. Leishmaniasis cutánea pseudodifusa. Una nueva forma de leishmaniasis cutánea en México. XXIII Congreso Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología. Nov. 1997. Oaxaca, Oaxaca. México.
- Walters, L. L., Modi, G. B., Tesh, R. B. y Burrage, T. 1987. Host-parasite relationship of *Leishmania m. mexicana* and *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 294-314.
- Walton, B. 1984. New World cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis. En: Tropical Diseases. R. S. Goldsmith, J. R. Heyneman (ed). Lang. Pub.
- Walton, B. y Velasco, C. O. 1987. The distribution and aetiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World. Proc. NATO Advances Study Institute on Leishmaniasis. Zakitnos, Grecia.
- Wolff, K. y Winkelmann, R. K. 1967. Ultrastructural localization of nucleoside triphosphatase in Langerhans cells. J. Invest. Dermatol. 48: 50-54.
- Wood, G. S., Turner, R. R., Shiurba, R. A., Eng, L. y Warnke, R. A. 1985. Human dendritic cells and macrophages. *In situ* immunophenotype definition of subsets that exhibit specific morphologic and microenvironmental characteristics. Am. J. Pathol. 119: 73.
- World Health Organization. 1984. "The Leishmaniasis". W.H.O. Technical Report Series No. 701. W.H.O. Geneva.
- Zelickson, A. S. 1965. The Langerhans cell. J. Invest. Dermatol. 44: 201-212.