



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA PARTICIPACIÓN DE  
LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN LESIONES  
DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA  
LOCALIZADA Y DIFUSA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SOFÍA ESCOTO HERNÁNDEZ

T U T O R A

DRA. INGEBOURG DOROTHEA BECKER FAUSER

2007



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Datos del alumno.**

Escoto  
Hernández  
Sofía  
57 10 14 47  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
9910362-0

**Datos del tutor**

Dra  
Ingeborg  
Becker  
Fauser

**Datos del sinodal 1**

Dra  
Laila  
Gutiérrez  
Kobeh

**Datos del sinodal 2**

Dr  
Armando  
Pérez  
Torres

**Datos del sinodal 3**

Dra  
Norma  
Salaiza  
Suazo

**Datos del sinodal 4**

Dra  
Ana Maria  
Fernández  
Presas

**Datos del trabajo escrito**

Análisis comparativo de la participación de la muerte celular programada en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa  
70 p  
2007

*Agradezco .....*

a todos los integrantes del laboratorio de Inmunoparasitología, de forma especial a la Dra. Norma y a la Dra. Becker por todo su apoyo durante la realización de éste trabajo y sobretodo su paciencia.

a todas y cada una de las persona que de una u otra forma han intervenido en mi formación académica, muy especialmente a los profesores comprometidos con su labor y a los amigos que han estado siempre a mi lado.

y por supuesto a mi familia, que siempre me apoya y confía en mí.

***México, Pumas, Universidad...***

# Índice

## RESUMEN

### 1. LEISHMANIASIS

#### 1.1 Definición

#### 1.2 Agente y Vector

- Taxonomía
- Ciclo biológico

#### 1.3 Epidemiología

- Las Leishmaniasis en México

#### 1.4 Síndromes Clínicos

- Leishmaniasis Cutáneas (localizada y diseminada)
- Leishmaniasis Muco-cutánea
- Leishmaniasis Visceral

#### 1.5 Manejo de la enfermedad

- Diagnóstico
- Tratamiento
- Prevención

### 2. RESPUESTA INMUNE

#### 2.1 Respuesta Inmune Innata

#### 2.2 Respuesta Inmune Humoral

#### 2.3 Respuesta Inmune Celular

#### 2.4 Respuesta Inmune en Leishmaniasis

### 3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)

#### 3.1 Definición

#### 3.2 Importancia de la Apoptosis en el Sistema Inmune

## HIPÓTESIS

## OBJETIVOS

## MATERIAL Y METODOS

## RESULTADOS

## DISCUSIÓN

## CONCLUSIONES

## APENDICE I

## REFERENCIAS

## RESUMEN

La leishmaniasis en México es producida por la infección del parásito intracelular *L. mexicana mexicana*, cuyas formas clínicas más comunes son la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), esta última la forma más grave. Estudios previos se han enfocado en el papel de la apoptosis en infecciones por otras especies del género *Leishmania* por ser éste un proceso importante en la respuesta inmune. Debido a que no se han realizado estudios sobre el efecto que podría tener la infección sobre la apoptosis de las células de las lesiones de los pacientes con LCL y LCD, es de gran interés e importancia analizar este aspecto así como los mecanismos involucrados y poder establecer diferencias en ambas formas clínicas. La apoptosis o muerte celular programada (MCP) puede actuar como un mecanismo de defensa frente estímulos patológicos, por lo que caracterizar su papel en la interacción hospedero-parásito ha cobrado gran interés, ya que promete aportar datos importantes para el desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos en contra del parásito, así como de la enfermedad que produce.

En este trabajo se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas presentes en las lesiones de 17 pacientes con LCL y 5 con LCD. Esto se realizó con el fin de analizar si el porcentaje de células en apoptosis puede correlacionarse con el grado de severidad del cuadro clínico provocado por la infección con *L. mexicana*. Se trabajó con cortes por congelación de biopsias de piel de pacientes con LCL y con LCD utilizando la técnica de tinción de TUNEL para la identificación de células en apoptosis. El análisis microscópico de las muestras se realizó con la ayuda de un microscopio Zeiss Axioskop, una cámara Axio CamMRc y el software KS 300 3.0. Adicionalmente se evaluó si el número de células en apoptosis cambia en 3 pacientes con LCD que estuvieron sometidos a un tratamiento combinado de pentamidina + alopurinol e inmunoterapia con IFN- $\gamma$ .

El presente trabajo reveló una diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.039$ ) entre ambos grupos de pacientes. Los 17 pacientes con LCL

presentaron un promedio de 45.45% (error estándar 4.1) de células apoptóticas en 15 campos (con un promedio de 56.04 células por campo), mientras que los 5 pacientes con LCD presentaron un promedio de 25.25 % (error estándar 6.18) en el mismo número de campos (con un promedio de 81.47 células por campo).

El tratamiento con medicamentos leishmanicidas redujo la carga parasitaria en los pacientes con LCD. La reducción en el número de parásitos se asoció con un incremento en el porcentaje de células en apoptosis, haciéndolo muy parecido al observado en las lesiones de los pacientes con LCL. Los resultados muestran que el número de parásitos y el porcentaje de células apoptóticas es inversamente proporcional en las lesiones. No queda claro si esto refleja la causa o el efecto de la disfunción de la respuesta inmune encontrada en pacientes con LCD, ya que la ausencia de apoptosis posiblemente permite una sobrecarga de parásitos intracelulares en macrófagos, llevándolos a un agotamiento funcional. La apoptosis posiblemente permite la distribución de una excesiva carga parasitaria hacia cuerpos apoptóticos, que pueden ser fagocitados por otras células, reduciendo el número de parásitos en su interior. El procesamiento de estos cuerpos apoptóticos genera nuevos epítopes, los cuales favorecen la generación de nuevas clonas de linfocitos, incrementando así el número de células capaces de activar a macrófagos. El resultado del incremento en el número de células apoptóticas pudiera favorecer una respuesta inmune más eficaz, lo que lleva a la resolución de la enfermedad, como se observa en los pacientes con LCL. De esta manera, la apoptosis pudiera representar un mecanismo inmune decisivo que ayude a la activación del macrófago, favoreciendo así la resolución de la enfermedad.

La disminución de las células apoptóticas en pacientes con LCD posiblemente se correlacione con la falta de activación del macrófago, llevando a un aumento en la carga parasitaria y la progresión de la parasitosis.

# 1. LEISHMANIASIS

## 1.1 Definición

En el sentido amplio, la leishmaniasis es una zoonosis causada por la infección de un protozooario intracelular obligado del género *Leishmania*. La leishmaniasis es una enfermedad que comprende tres diferentes formas clínicas: leishmaniasis visceral, leishmaniasis mucocutánea y la leishmaniasis cutánea; la manifestación de cualquiera de ellas, está directamente relacionada con la especie infectante.<sup>23, 27</sup>

## 1.2 Agente y Vector

*Leishmania* pertenece al grupo de los denominados “cinetoplástidos”, que se caracterizan por poseer una sola mitocondria en la cual se distingue una concentración de DNA mitocondrial denominada precisamente cinetoplasto.<sup>12</sup> Este protozooario hemoflagelado se transmite mediante la picadura de la hembra hematófaga del “mosco de la arena”, conocido comúnmente en México como “jejen” (“sandfly” en inglés). Ese pequeño mosco piloso, tiene una longitud de 2 a 3 mm, por lo que es capaz de atravesar las redes que comúnmente se usan como mosquiteros.<sup>44</sup> Se han identificado como vectores a 30 especies de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo); en las zonas endémicas la mayoría de los individuos no están infectados.<sup>23, 27</sup>



Figura 1. Vector *Phlebotomus* sp.  
(Foto: S. Sinclair. [www.keele.ac.uk/depts/aep/staff/rdwres.htm](http://www.keele.ac.uk/depts/aep/staff/rdwres.htm))

## - Taxonomía

La clasificación taxonómica de este parásito está basada en la zona en que éste se desarrolla dentro del vector, dividiendo al género *Leishmania* en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Se ubican dentro del subgénero *Leishmania* a los organismos que restringen su desarrollo a la porción anterior del tracto digestivo de la mosca (desarrollo suprapilórico), mientras que aquellos perteneciente al subgénero *Viannia* se desarrollan tanto en el intestino medio como en el posterior del vector.<sup>27</sup>

Con el avance de las técnicas moleculares, la identificación y taxonomía de las diferentes especies de *Leishmania* han dejado de fundamentarse en criterios clínicos, biológicos y epidemiológicos, para apoyarse en marcadores moleculares específicos, estableciéndose métodos moleculares bioquímicos e inmunológicos que permiten identificarlos a nivel de subespecie.

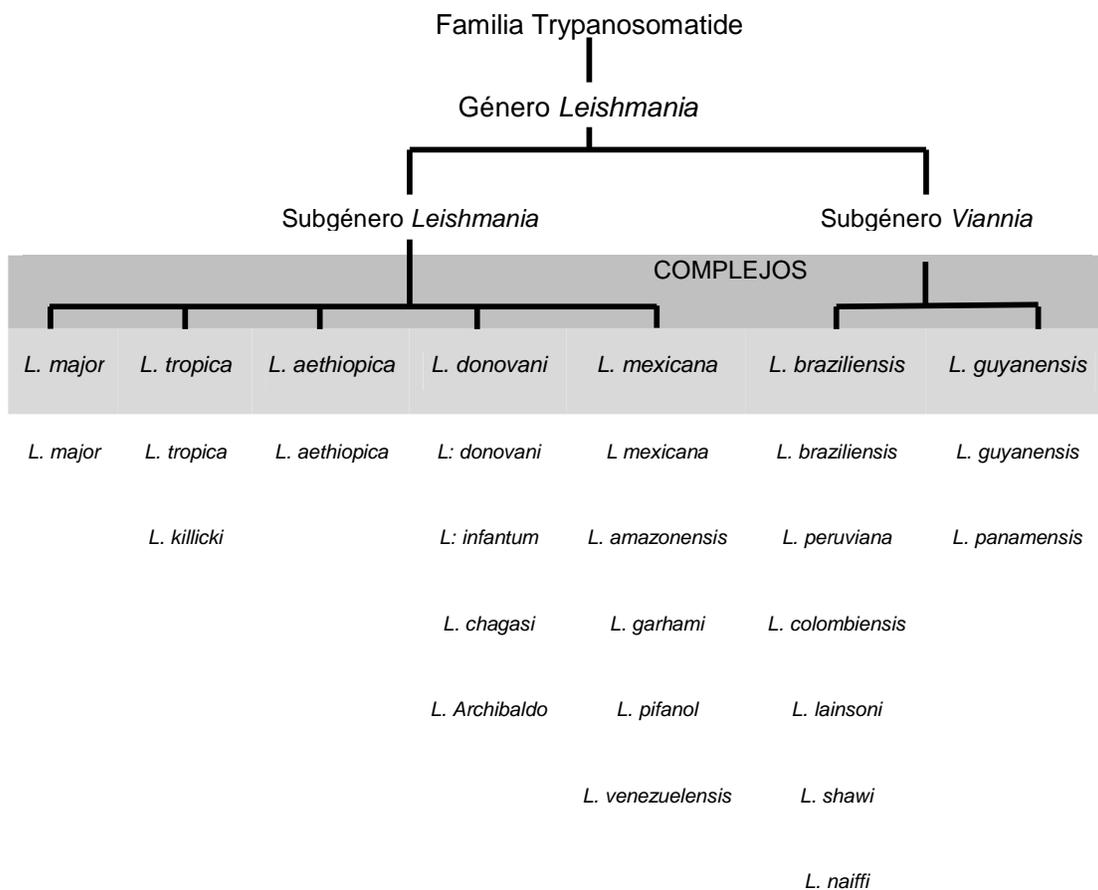


Figura 2. Clasificación taxonómica de *Leishmania* (Modificado de Salaiza, 2001 y García, 2001). No se muestran: *L. arabica*, *L. gerbilli* (Viejo mundo); *L. aristides*, *L. enrietti*, *L. deanei* y *L. hertigi* (Nuevo mundo); especies identificadas como no patógenas para el hombre.

### - Ciclo de Vida e Infección

La morfología de las diferentes especies es esencialmente igual, sin embargo, ésta cambia durante el ciclo de vida del parásito. El estadio denominado promastigote se observa sólo cuando el parásito se encuentra dentro del vector. El promastigote es fusiforme y flagelado, con un núcleo ubicado en la parte central del cuerpo, tiene aproximadamente 15 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud por 1.5 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 3). Un vez que el vector inocula su carga parasitaria al hospedero mamífero, los parásitos son fagocitados por células fagocíticas, principalmente macrófagos, dentro de las cuales cambian a una forma redonda u oval, no flagelada, con un gran núcleo excéntrico, a este estadio se denomina amastigote (Figura 4).<sup>27</sup>



Figura 3. *Leishmania mexicana*  
(promastigote)



Figura 4. Macrófago infectado (amastigotes)

Cuando el mosquito se alimenta de un mamífero infectado, ingiere a los parásitos en estadio de amastigote dentro de la célula infectada. El parásito se transforma en promastigote en el intestino del insecto y se multiplica por fisión longitudinal. Los promastigotes dentro del mosquito pueden ser desde ligeramente redondeados (promastigotes procíclicos inmaduros) o elongados y altamente móviles (promastigotes metacíclicos infectivos). Los promastigotes metacíclicos infectivos migran hacia la probóscide de flebotomo y son inoculados al hospedero mamífero, donde son fagocitados por células del sistema fagocítico mononuclear, como macrófagos. Dentro de la célula fagocítica, los parásitos se transforman en amastigotes y vuelven a proliferar

rápidamente por fisión binaria lisando al macrófago. Los amastigotes liberados infectan a otros macrófagos o circulan por la linfa, sangre y líquido tisular, cerrándose el ciclo si son de nuevo ingeridos por un flebotomo.<sup>56</sup>

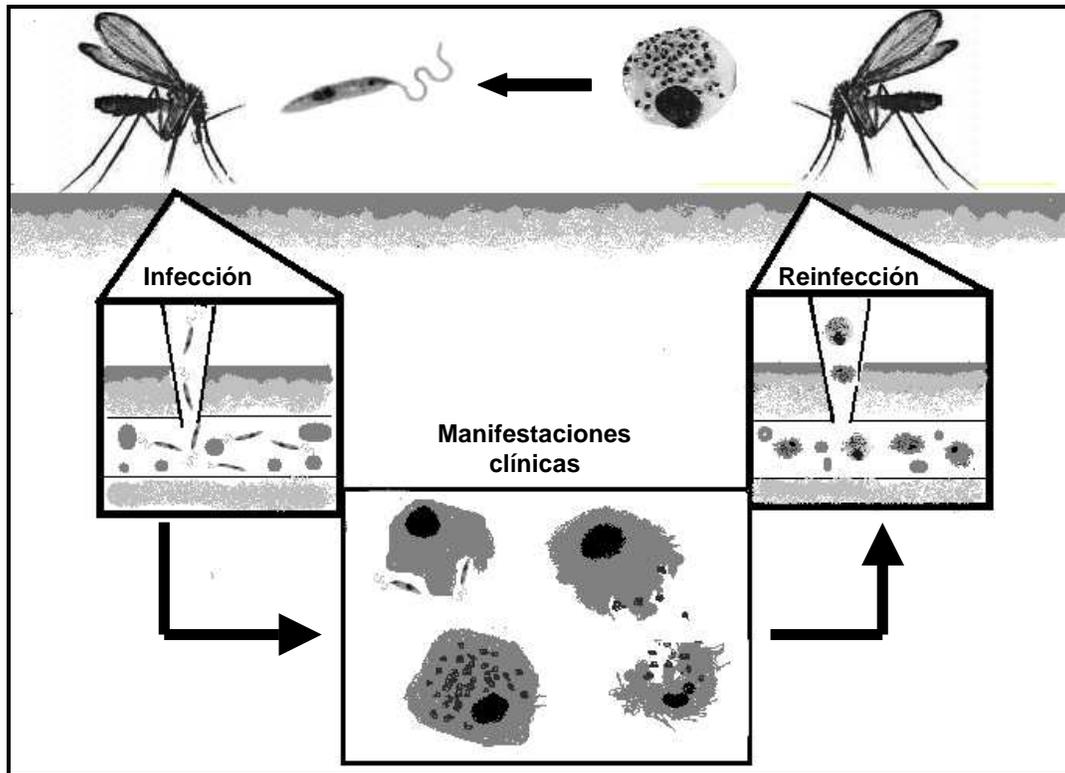


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania sp.*

### 1.3 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ubica a la leishmaniasis como la cuarta enfermedad más importante en el trópico, que afecta a 88 países de los cuales 22 pertenecen al Nuevo Mundo y 66 al Viejo Mundo. Se estima que existe un prevalencia global de 12 millones de casos con una incidencia de 1.5 a 2 millones de casos anuales (1.0 a 1.5 millones corresponden a formas cutáneas y 500 000 a viscerales).<sup>23</sup> Dado que la infección por *Leishmania sp.* depende de la relación ecológica entre la actividad humana y el sistema de reservorio, se calcula que 350 millones de habitantes de zonas endémicas están en riesgo de infección. El riesgo va en aumento debido a factores humanos tales como la migración, deforestación y urbanización, además de factores ambientales que afectan la distribución del vector, pues hoy en día se

comienzan a informar de casos en zonas peridomicilarias, donde nunca antes se había presentado.<sup>22, 55</sup>

Dentro de las formas cutáneas se puede hacer la distinción entre la tipo zoonótica que involucra un reservorio animal y la antroponótica, en la que los humanos son considerados la única fuente de infección para el vector, ésta última sólo se presenta en los países del Viejo Mundo. Latinoamérica es uno de los principales focos de leishmaniasis cutánea de tipo zoonótica provocada por la infección de especies pertenecientes a los complejos *L. (Viannia) braziliensis* y *L. (Leishmania) mexicana*. Los vectores son extremadamente diversos y los reservorios son comúnmente roedores y otros mamíferos de mayor tamaño que habitan en áreas boscosas y/o selváticas, sólo algunos pertenecen a áreas peridomésticas como los perros. El que roedores y perros actúen como reservorios, es un importante factor de riesgo, pues es más común el contacto del humano con estos animales, llevando el ciclo de transmisión del parásito hacia las zonas habitadas. En estos tiempos, la infección por *Leishmania sp.* esta menos restringida a personas cuyas actividades laborales los llevan a trabajar dentro de las zonas selváticas y el rango de edad de las personas infectadas está incrementándose.<sup>22</sup>

### **- Las Leishmaniasis en México**

En nuestro país, la leishmaniasis es una enfermedad que probablemente se presenta desde tiempos prehispánicos según revela una urna olmeca cuyo rostro presenta marcas posiblemente relacionadas a la leishmaniasis cutánea diseminada descrita por Martínez Marañón en 1982. La primer descripción de la forma cutánea de la leishmaniasis en México se hizo en 1912 por Seidelin, denominándola “ulcera de los chicleros” debido a que las lesiones se presentaban con mayor frecuencia en la orejas de las personas dedicadas a este oficio.<sup>5, 69</sup>

Actualmente las leishmaniasis se distribuyen en los Estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas en el norte del país; Veracruz, Tabasco, Campeche Yucatán y Quintana Roo bordeando las costas del Golfo de México y Mar Caribe; Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco y Nayarit sobre las costas del Océano Pacífico y San Luis Potosí, Morelos y Puebla en el centro del territorio.<sup>63</sup>

La península de Yucatán es un claro ejemplo de zona endémica para *Leishmania (Leishmania) mexicana*, en donde se ha identificado una temporada restringida de transmisión entre los meses de Noviembre a Marzo. La rata trepadora (*Otodylomys phyllotis*) y el ratón de campo (*Peromyscus yucatanicus*) son especies silvestres de roedores que se infectan naturalmente, los cuales actúan como reservorios y cuyos vectores potenciales son *Lutzomyia olmeca olmeca* y *Lu. cruciata*, en toda la península de Yucatán.<sup>4, 5</sup>

#### **1.4 Síndromes Clínicos**

La leishmaniasis comprende tres diferentes formas clínicas, relacionadas directamente con la especie infectante.

##### **- Leishmaniasis cutánea (LC)**

Existen dos tipos de LC, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). La LCL puede ser producida por las especies pertenecientes a *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y las especies pertenecientes al complejo de *L. (Leishmania) mexicana*. La LCD puede ser producida por *L. aethiopica*, y dos especies pertenecientes al complejo *Leishmania (Leishmania) mexicana* que son *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis*.<sup>22, 27, 44, 48</sup>

Después de la inoculación se produce una inflamación local, con secreción de histamina y subsecuente infiltración de neutrófilos y monocitos, que se observa como una pápula eritematosa y pruriginosa en el sitio de la picadura.<sup>24</sup> Aproximadamente en 15 a 20 días después de la infección, la pápula se vuelve hiperqueratótica desarrollándose posteriormente una úlcera de 0.5 a 3 cm de diámetro cubierta por una costra, exudado seco, células muertas y una mezcla de organismos vivos y muertos.<sup>34, 48</sup> Pueden presentarse una o más lesiones dependiendo del número de piquetes del vector. La úlcera es generalmente redonda, de bordes indurados, fondo limpio e indolora, mientras no exista una segunda infección por bacterias u hongos.<sup>44</sup> Al inicio del padecimiento, las lesiones de pacientes con LCL presentan macrófagos con escasos parásitos intracelulares y frecuentemente es difícil encontrar macrófagos infectados (Figura 6), dichas lesiones puede sanar en 6 meses hasta 2 años, por lo general espontáneamente o bajo tratamiento.<sup>34, 44</sup>

La LCD es la forma crónica de la LC, en la cual el parásito se disemina por la vía linfática, líquido tisular o sangre desarrollándose múltiples nódulos por prácticamente toda la piel excepto cuero cabelludo, axilas, región inguinal, genitales, palmas de las manos y plantas de los pies.<sup>72</sup> Los nódulos son comúnmente descritos como suaves y carnosos, a diferencia de los relacionados a la lepra que son generalmente más indurados.<sup>27, 30</sup> No se conocen los factores que determinan el desarrollo de la LCD, la forma más severa de la enfermedad. Se considera que la respuesta inmune del hospedero determina el cuadro clínico. Las lesiones de estos pacientes se caracterizan por tener macrófagos con abundantes amastigotes intracelulares (Figura 7).

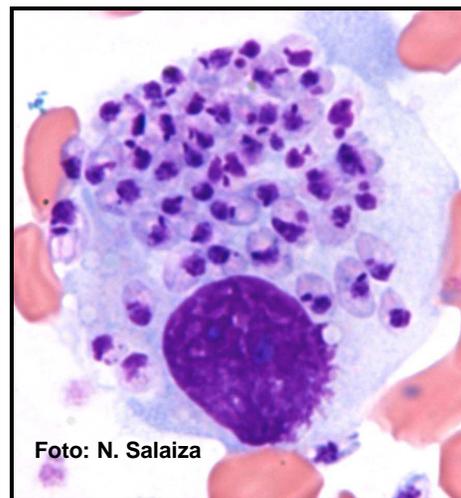
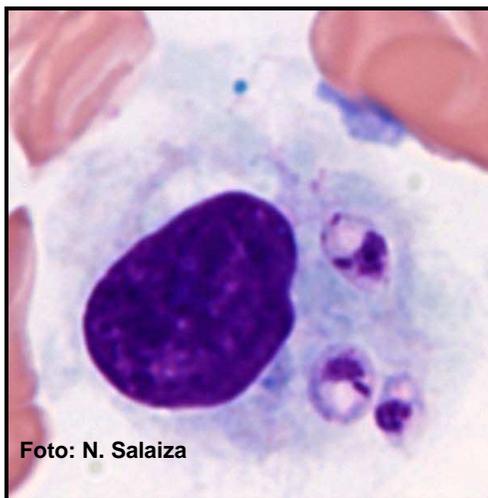


Figura 6 y 7. A la izquierda se muestra un típico macrófago perteneciente a un paciente con LCL y a la derecha uno de un paciente con LCD. Es claro que otra de las diferencias entre estos pacientes radica en el número de parásitos que se observan en el citoplasma de los macrófagos.

### **- Leishmaniasis mucocutánea (LMC)**

Este tipo de leishmaniasis es de evolución crónica, causada por especies pertenecientes al complejo *L. (Viannia) braziliensis*. Esta forma clínica es muy desfigurante, ya que las lesiones afectan la mucosa nasal y orofaríngea. Conocida también como espundia, la LMC se manifiesta meses o años después de que la lesión cutánea inicial ha sanado completa o parcialmente.<sup>27</sup> El proceso inflamatorio a lo largo de la mucosa provoca que el paciente tenga dificultad para respirar y ocasionalmente presenta sangrados en las mucosas afectadas. Posteriormente pueden desarrollarse ulceraciones cubiertas por un exudado mucopurulento o producirse hipertrofia de los tejidos del labio superior y nariz desarrollándose la denominada “nariz de tapir”. La destrucción del tejido blando y cartílago llega a ser tan severa que ocasiona la pérdida de labios, partes blandas de la nariz y paladar blando. Las lesiones no llegan a curarse y la enfermedad progresa, el paciente puede finalmente morir debido a una infección secundaria, aunque la mortalidad es baja.<sup>27, 44</sup>

### **- Leishmaniasis visceral (LV)**

Esta forma clínica puede ser producida por *L. chagasi*, *L. infantum* y *L. donovani*. Se caracteriza por el desarrollo de hiperplasia de las células del sistema fagocítico mononuclear del hígado, bazo, médula ósea, nódulos linfáticos, mucosa del intestino delgado y otros tejidos linfoides. Inicialmente la hematopoyesis ocurre normalmente, pero se reduce así como también disminuye el tiempo de supervivencia de los eritrocitos y leucocitos, produciendo anemia y granulocitopenia; a su vez las células infectadas comienzan a proliferar conduciendo al desarrollo de hepatomegalia y esplenomegalia. Aunque generalmente no se describen lesiones cutáneas previas, es común que la piel de los pacientes se torne oscura en cara, manos, pies y abdomen. Por dicho motivo esta forma clínica se denomina “Kala Azar” o enfermedad negra en la India.<sup>27, 48</sup>

Los síntomas y signos que se manifiestan comúnmente incluyen intervalos irregulares de fiebre, presentándose aumentos de temperatura dos o tres veces cada día; debilidad, pérdida de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, palidez de mucosas y malestar general con apariencia

desmejorada por el obscurecimiento de la piel, junto con los cambios en la cabellera, que se presenta despigmentada y alterada en su forma natural.<sup>27</sup>

## **1.5 Manejo de la enfermedad**

### **- Diagnóstico**

En el caso de las LC, el diagnóstico puede confundirse con neoplasias, infecciones cutáneas por hongos como histoplasmosis o por bacterias como lepra, sífilis, tuberculosis y ántrax cutáneo, por mencionar algunas. En el caso de la LV, el diagnóstico puede desviarse hacia desórdenes hematológicos y linfáticos.<sup>27, 34</sup>

Debido a esas posibles confusiones, es importante que el diagnóstico se haga con base en un historial apropiado de exposición (factores epidemiológicos), además de varias pruebas clínicas combinando técnicas inmunológicas y de biología molecular.

Las pruebas básicas que deben realizarse para el diagnóstico de LC son <sup>44</sup>:

- Impronta: Consiste en obtener una muestra de células o líquido tisular expuesto de una úlcera o de una superficie de incisión de la lesión por contacto con un portaobjetos y elaborar preparaciones teñidas con Giemsa para observar al microscopio. El líquido tisular también puede ser obtenido por medio de punción. Dependiendo de la etapa de desarrollo de la lesión podrán o no observarse parásitos, con excepción de la LCD, que sin importar la antigüedad de la lesión siempre podrán encontrarse.
- Biopsia: Consiste en la tinción inmunohistoquímicas de cortes de un fragmento de tejido obtenido de la lesión. Se utilizan anticuerpos anti-leishmania para localizar parásitos intracelulares.
- Intradermoreacción de Montenegro. Consiste en la inoculación vía intradérmica 0.1 ml de un lisado de parásitos fijados con fenol. A las 48 horas se espera ver una reacción eritematosa e indurada en el sitio de la inyección. La prueba se considera positiva cuando la lesión mide más de 5 mm de diámetro. Histológicamente, la reacción es de hipersensibilidad celular de tipo retardado. Reacciones positivas se observan generalmente en pacientes con LCL, mientras que los pacientes con LCD presentan reacciones negativas.<sup>27</sup>

- Pruebas inmunológicas/serología. Se utiliza inmunofluorescencia indirecta o técnica de ELISA para detectar anticuerpos anti-leishmania.
- Cultivo. Se lleva a cabo un cultivo en medio RPMI a partir de una porción de biopsia y observar a los 7 días si existe presencia de parásitos.

En el caso de la forma visceral, la presencia de los síntomas antes mencionados aunado a los resultados de pruebas inmunológicas y la observación de los amastigotes en los tejidos confirman generalmente el diagnóstico. Sin embargo, las etapas tempranas de la enfermedad son más difíciles de identificar.<sup>27</sup> Actualmente existen pruebas comerciales para la identificación de anticuerpos y antígenos que se están usando rutinariamente en países africanos, India y en menor grado en países europeos. <sup>16</sup>

### **- Tratamiento**

No existe un tratamiento óptimo para todas las formas de leishmaniasis, aunque los antimoniales, hasta ahora, son los medicamentos más adecuados. Cada área endémica debe establecer su propio régimen de tratamiento basado en la eficacia y toxicidad.

Las formas cutáneas del Viejo y el Nuevo Mundo son diferentes, pues la primera es menos severa y generalmente las lesiones curan por sí solas en un periodo de pocos meses o años, sin tratamiento alguno; esta curación se asocia al desarrollo de inmunidad protectora.<sup>27, 34</sup>

Debido a que las lesiones cutáneas ocurren en zonas descubiertas del cuerpo tales como el rostro y los brazos, se consideran cosmética o funcionalmente importantes, por lo que el tratamiento local es lo apropiado para las lesiones tempranas sin inflamación. Por otra parte la terapia sistémica es lo adecuado para los pacientes con lesiones múltiples o más complicadas.<sup>34</sup>

Actualmente los medicamentos más utilizados por su eficacia y menor toxicidad son los antimoniales pentavalentes, tales como el estibogluconato de sodio (Pentostam) y el metil glutamina-antimoniato (Glucantime). Ambos fueron desarrollados en los años cuarenta, difieren en su eficacia y toxicidad debido a sus concentraciones diferentes de antimonio (Pentostam: 100 mg/ml; Glucantime: 85 mg/ml). La vía de administración de ambos es parenteral a una dosis de 20 mg por kilogramo por día durante 20 días. Aunque se sabe que inhiben la glicólisis y la oxidación de ácidos grasos en el parásito, no se conoce

su modo de acción, se piensa que inhibe la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP).<sup>34, 44</sup>

Para la forma visceral se han probado terapias inmunoquímicas combinando IFN- $\gamma$  con antimoniales pentavalentes, lográndose la curación. Recientemente se ha dado a conocer el miltefosine, el primer medicamento oral para la LV.<sup>44, 56</sup> Sin embargo no existe un tratamiento eficaz contra la LCD, pese que se han probado diferentes medicamentos sólo se ha llegado a detener o aminorar los síntomas.

### **- Prevención**

Ante la falta de una vacuna contra la leishmaniasis, la mejor forma de prevenirla es evitando la exposición de la población de las zonas endémicas al vector. Mediante la aplicación de insecticidas pueden disminuirse las poblaciones del vector en las áreas peridomésticas. Por otra parte, la prevención debe ser también a nivel personal, primeramente evitando zonas de riesgo, usando repelentes y ropa que proteja a la persona de posibles picaduras, así como usar redes de cama o pabellones.<sup>16</sup>

Otra medida importante de prevención es el control de la infección de aquellos animales que sirven como reservorio de la leishmaniasis zoonótica, especialmente los perros, debido a la convivencia de estos animales con el hombre. Ya que es aún más difícil detectar la infección en los perros, se ha recurrido la aplicación de insecticidas directamente sobre el pelaje del animal, reduciendo el número de picaduras y protegiéndolo de la infección, sin embargo esta aplicación debe repetirse regularmente. Una nueva opción es la utilización de collares tratados con deltametrin, que permite que el perro este protegido por un periodo mayor a los 8 meses.<sup>16</sup>

## **2. RESPUESTA INMUNE**

Se denomina inmunidad al estado de protección contra las enfermedades infecciosas (*immunis*= libre).<sup>1</sup> La respuesta inmune es tan compleja que se ha tratado de dividir con base en la caracterización de sus eventos, tales como tiempo, especificidad, diversidad y memoria inmunológica, dividiéndola en respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, esta

división es demasiado generalizada por lo que también se puede dividir en respuesta inmune innata, celular y humoral.

### - Respuesta Inmune Innata

La respuesta inmune innata es el mecanismo de defensa más antiguo filogenéticamente entre los organismos pluricelulares.<sup>1</sup> También conocida como inmunidad natural, constituye la primera línea de defensa contra infecciones. Los elementos celulares y moleculares de ésta respuesta actúan contra estructuras moleculares características de los microorganismos sin ser específicos a un patógeno.<sup>1, 29</sup> Incluye componentes físicos y químicos, proteínas circulantes en sangre y células

**Barreras.** Constituyen la primera línea de defensa que previene la entrada de patógenos al cuerpo. Las principales barreras epiteliales son la piel y membranas mucosas, que actúan como barreras físicas. La piel y membranas mucosas producen barreras químicas. Las secreciones como sudor, saliva, lágrimas, moco y sebo proporcionan un pH contrario a las condiciones requeridas para los patógenos. Estos fluidos corporales poseen componentes antibióticos, las defensinas son los péptidos mejor conocidos de este tipo.<sup>1</sup> En estas barreras también se hospeda flora propia que compete con los patógenos por los recursos.

También pueden considerarse otros elementos como barreras fisiológicas, como son la temperatura corporal y el ácido gástrico, éstos evitan el desarrollo de patógenos.<sup>29</sup>

**Proteínas.** Las proteínas plasmáticas pueden combatir a los microorganismos que entren en la circulación. Los componentes del sistema de complemento constituyen la mayor parte de las proteínas en la circulación. El sistema de complemento comienza con el reconocimiento del microorganismo mediante 3 vías posibles: vía alternativa o de reconocimiento directo de estructuras en la superficie del microorganismo, vía clásica o por detección de anticuerpos unidos a la superficie del microorganismos a través de la proteína de complemento C1 y vía de la lectina o activación de la vía clásica desencadenada por el reconocimiento de residuos de manosa en glicoproteínas o glicolípidos microbianos por lectinas de unión a manosa. Una

vez desencadenado el sistema de complemento, el proceso proteolítico de la C3 genera el fragmento C3b que unido a la superficie microbiana actúa como opsonina que promueve la fagocitosis del microorganismo. El fragmento C3a es liberado y estimula el proceso inflamatorio. C3b en conjunto con otros elementos generan una proteasa que actúa proteolíticamente sobre la proteína C5. El fragmento C5a desencadena el flujo de neutrófilos hacia el sitio de infección y recluta componentes de fase aguda importantes en el proceso inflamatorio. C5b inicia la formación del complejo proteínico de C6, C7, C8 y C9. Este complejo proteínico constituye una proteasa que causa la lisis del microorganismo.<sup>1</sup>

**Células.** Se refiere a células tales como monocitos, neutrófilos y macrófagos tisulares que discriminan los antígenos propios de aquellos ajenos al cuerpo, esto gracias al reconocimiento de los denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs constituyen estructuras moleculares compartidas por una gran parte de los patógenos, pues generalmente corresponden a elementos esenciales para la fisiología de estos. Al grupo de receptores en las células del hospedero que identifican los PAMPs se les denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRR-pattern recognition receptors).<sup>46</sup>

**Fenómeno inflamatorio.** Esta repuesta es inducida por el daño físico o por introducción del patógeno, e involucra 3 eventos principales: la vasodilatación, el edema y la migración de fagocitos.

El incremento del diámetro de los vasos sanguíneos y el aumento en la permeabilidad de los tejidos, permite la extravasación de células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos. La emigración de los fagocitos es un proceso de múltiples pasos, que incluyen la adherencia de las células a la pared endotelial de los vasos sanguíneos o marginación, la emigración entre las células endoteliales del capilar o diapedesis y finalmente su migración a través del tejido hacia el sitio de invasión o quimiotaxis.<sup>29</sup>

El proceso inflamatorio es iniciado por diversos mediadores, cuya interacción aún no se ha entendido por completo. Algunos de estos mediadores son derivados del agente infeccioso, otros son liberados por las células afectadas en repuesta al daño, otros son generados por diversos sistemas enzimáticos del plasma y otros más son productos de los glóbulos blancos que participan

en la repuesta inflamatoria. Entre los mediadores liberados por las células dañadas están varias proteínas séricas llamadas proteínas de fase aguda; la proteína C reactiva es la proteína de fase aguda producida en mayor cantidad por el hígado en respuesta al daño tisular. La histamina es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria que son liberados por las células en repuesta al daño sufrido; esta molécula causa la vasodilatación de los vasos sanguíneos.<sup>1, 29</sup>

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de infección, ya que aparecen desde los 30 minutos post-infección. Los neutrófilos son fagocitos que poseen gránulos con enzimas líticas y sustancias bactericidas, que junto con los mecanismos microbicidas dependientes e independientes de oxígeno logran la destrucción del microorganismo fagocitado. Los mecanismos dependientes de oxígeno en los fagocitos tienen como resultado la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno que resultan altamente tóxicos para los microorganismos fagocitados. Por otra parte los mecanismos microbicidas independientes de oxígeno se enfocan en la síntesis de péptidos citotóxicos y antimicrobiales denominados defensinas. Estas moléculas ricas en cisteína, forman canales iónicos en las paredes de las bacterias que permiten el paso de iones afectando el equilibrio osmótico, llevándolas a la muerte.

Posteriormente los macrófagos arriban al sitio donde se está llevando a cabo el proceso inflamatorio. Los macrófagos se activan por citocinas secretadas por células TH1, por mediadores de la respuesta inflamatoria como las denominadas proteínas de fase aguda, la histamina y cininas, o por componentes de la pared bacteriana. Una vez activados, los macrófagos son capaces de fagocitar antígenos exógenos, formándose un fagosoma que se unirá con un lisosoma formando un fagolisosoma. El lisosoma contiene enzimas hidrolíticas que digieren el material fagocitado. Durante la fagocitosis se desarrollan mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno, es decir se lleva a cabo el estallido respiratorio, un proceso metabólico que resulta en la activación de una oxidasa unida a membrana que cataliza la reducción de iones oxígeno en aniones superóxido ( $O_2^-$ ), el cual resulta muy tóxico para los microorganismos. El anión superóxido a su vez genera otros agentes oxidantes tales como los radicales hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Además, cuando un macrófago es activado por una molécula como un lipopolisacárido (LPS), junto con la acción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ), incrementa la expresión de la enzima óxido-nítrico sintasa inducible (iNOS), la cual oxida el aminoácido L-arginina a L-citrulina y óxido nítrico (NO). El NO es un gas con una potente actividad antimicrobial, que puede potenciar su efectividad al combinarse con O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Existen evidencias de que el NO y sustancias derivadas de éste, son los principales medios de los cuales se vale el macrófago para actuar en contra de bacterias, hongos, gusanos parásitos y protozoarios.<sup>29</sup>

Otras células como linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y mastocitos llegan al sitio del daño tisular y colaboran con la eliminación del patógeno.

### **- Respuesta Inmune Humoral**

Se caracteriza por la participación de anticuerpos, glicoproteínas constituidas de dos cadenas pesadas y dos ligeras unidas por puentes de disulfuro, secretados por las células plasmáticas provenientes de linfocitos B.<sup>1</sup> Los linfocitos B proliferan gracias a la identificación de antígenos mediante otra molécula de anticuerpo unida a su membrana llamado receptor B, induciendo al linfocito a dividirse, dando paso a células B de memoria y células B efectoras o células plasmáticas.

Los anticuerpos se unen al antígeno, opsonizándolo para que sea fagocitado. Adicionalmente activan al sistema de complemento, neutralizan toxinas y evitan la unión del patógeno a las células blanco cubriendo sus epítopes. <sup>29</sup>

### **- Respuesta Inmune Celular**

Los linfocitos T son las células que participan en la respuesta inmune celular. Se generan en la médula ósea y maduran en el timo. La maduración implica, entre otros cambios, la expresión de una molécula de unión a antígenos denominada receptor de células T (TCR). A diferencia del receptor B, el receptor T no reconoce a los antígenos directamente, necesita que estos estén unidos a ciertas proteínas de membrana llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) existentes en células presentadoras de antígenos, como son los macrófagos y las células dendríticas. <sup>1, 29</sup> Existen dos tipos de moléculas MHC: MHC de clase I, que presenta antígenos endógenos

generados en el citosol y MHC de clase II, que presenta antígenos exógenos, procesados en vesículas endocíticas. Los péptidos antigénicos que cada una presenta son reconocidos por una subpoblación diferente de linfocitos T. Las moléculas clase I del MHC se forma de una cadena  $\alpha$  unida a una pequeña proteína de  $\beta 2$  microglobulina y la expresan la mayoría de las células nucleadas. Por su parte las moléculas clase II del MHC se componen de una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$  de glicoproteína y se encuentran en las células presentadoras de antígenos.<sup>29, 62</sup>

Las subpoblaciones maduras de linfocitos se diferencian por poseer un determinado tipo de glicoproteínas de superficie. Los linfocitos que expresan la glicoproteína CD4 reconocen restrictivamente a los péptidos antigénicos presentados por la molécula MHC de clase II y en general constituyen a células cooperadoras ( $T_H$ ), que al reconocer el antígeno en asociación con moléculas coestimuladoras se activan y se transforman en células efectoras. Las células  $CD4^+$  efectoras forman dos subpoblaciones que se diferencian debido al patrón de citocinas que secretan, el cual es determinante en la activación de otras células.<sup>1</sup>

La respuesta inmune es regulada en primer lugar por el antígeno y en segundo por la interacción entre linfocitos, células presentadoras de antígenos y las moléculas que producen, tales como anticuerpos y citocinas. El patrón de citocinas producido por las células  $CD4^+$  efectoras puede promover una respuesta inmune mediada por células ( $Th1$ ) o una respuesta inmune en la que predomine la acción de anticuerpos ( $Th2$ ).<sup>29</sup>

Las citocinas fundamentales para el desarrollo de la llamada respuesta  $Th1$  son el  $IFN-\gamma$ , las interleucinas 2 ( $IL-2$ ),  $IL-12$  y la  $IL-18$ , las cuales están relacionadas al proceso inflamatorio y daño tisular. La citocina  $IL-18$  es producida por macrófagos y queratinocitos en el inicio de la respuesta inmune. La citosina  $IL-18$  en principio estimula la respuesta  $Th1$  inducida por  $IL-12$ . Las citocinas  $IL-18$  e  $IL-12$  actúan en conjunto estimulando la proliferación de células  $Th1$  diferenciadas (células T) y células asesinas naturales o NK (natural killers), promoviendo también la producción de  $IFN-\gamma$  en estas células.<sup>52, 73</sup> El  $IFN-\gamma$  activa a los macrófagos, incrementa la expresión de la molécula de MHC de clase I y clase II e incrementa la presentación de antígenos. Otras funciones del  $IFN-\gamma$  son el regular la producción de  $IL-12$  en los macrófagos y células

dendríticas y activar el receptor de esta citocina en células T activadas. La IL-12 es una citocina muy importante para el desarrollo y activación de las células Th1. La IL-2 es otra citocina secretada por las células T, sus funciones incluyen promover la proliferación y diferenciación de células T antígeno-específicas, así como la activación y proliferación de células NK.<sup>1</sup>

En el caso de la denominada respuesta Th2, destaca la participación de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-10. La influencia de la IL-4 es crítica para direccionar la respuesta inmune hacia un tipo Th2, pues activa y promueve la proliferación de células B productoras de inmunoglobulina IgG, lo que no activa el sistema de complemento. Además la IL-4 en conjunto con la IL-5 induce la producción de IgE y sostienen la actividad de eosinófilos. Por su parte la IL-10 secretada por células Th2, actúa sobre las células Th1 inhibiendo la síntesis de citocinas. La IL-18 estimula directamente a basófilos y mastocitos a producir citocinas propias de la respuesta Th2.<sup>53</sup>

Por otra parte, los linfocitos CD8, son en su mayoría células efectoras citotóxicas ( $T_C$ ), que una vez activadas gracias a la acción de citocinas y al reconocimiento de antígenos unidos a moléculas MHC de clase I, proliferan y se diferencian en linfocitos T citotóxicos. Cuando el linfocito T CD8 reconoce a la célula infectada puede utilizar al menos 3 mecanismos para inducir su muerte, ya sea mediante la acción conjunta de las perforinas y granzimas, de FasL/Fas así como la liberación de citocinas como TNF- $\alpha$ . El linfocito CD8 ejerce su función efectora mediante la exocitosis de gránulos líticos, los cuales contienen moléculas de perforina que son capaces de insertarse en la membrana de la célula blanco, formando poros y provocando el colapso del potencial de membrana. Sin embargo, la función más destacada de la perforina es permitir el paso de otras moléculas de los gránulos líticos del linfocitos, las granzimas. La Granzima B pertenecen a la familia de las catepsinas y desencadena la cascada de señalización del proceso apoptótico.<sup>70</sup> Por otra parte, el linfocito CD8 puede inducir la apoptosis de la célula blanco mediante la expresión en su membrana de FasL/CD95, ligando que induce la trimerización del receptor Fas/CD95/APO-1 en la célula blanco. La unión de TNF- $\alpha$  al receptor TNFR-I también desencadena el proceso apoptótico.<sup>51</sup>

Los linfocitos CD8+ actúan de forma significativa en contra de células infectadas por virus, bacterias y protozoos.<sup>33</sup> Aunque aún no se entiende por

completo los mecanismos mediante los cuales otras células contribuyen en la adecuada respuesta de los linfocitos CD8, se han identificado la participación de las células CD4 y células dendríticas. Se ha planteado un modelo que describe el proceso mediante el cual podrían estar interactuando las células T CD8, CD4 y dendríticas. Las células dendríticas fagocitan al antígeno del medio extracelular o de los restos de células en apoptosis o en necrosis. El antígeno es procesado y presentado vía MHC clase II, las células CD4 lo reconocen y sobre-regulan la expresión de CD40L. La interacción de los linfocitos CD4 y células dendríticas mediante CD40L-CD40, activa a las células dendríticas que a su vez estimulan a las células T CD8 vírgenes que reconocen al antígeno presentado por las células dendríticas mediante la molécula MHC I.<sup>1, 29, 35</sup> Las células dendríticas pueden activarse por la interacción con células T CD4+ recientemente activadas incluso si estas últimas se encuentran en apoptosis.<sup>58</sup>

#### **- Respuesta inmune en leishmaniasis**

La picadura del vector desencadena la respuesta inmune en el hospedero, iniciando con una respuesta inflamatoria en el sitio de la picadura. Además del daño mecánico producido por la introducción de la probóscide del mosquito en la piel del hospedero, el mosquito secreta saliva junto con la que inocula al parásito, lo que favorece la infección.<sup>3</sup> Experimentalmente se ha encontrado que la saliva del vector exacerba el desarrollo de las lesiones cutáneas causadas por diferentes especies del género *Leishmania*. Esto es debido a que contiene un péptido llamado maxadilán el cual interfiere o inhibe la producción de citocinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras en monocitos y células dendríticas lo cual afecta la presentación de antígenos.<sup>17</sup>

Así mismo, en la especie *Phlebotomus papatasi* se ha detectado la existencia de una pequeña molécula soluble en etanol, la cual ejerce una gran capacidad inhibitoria sobre la protein-fosfatasa 1 (PP-1) y la protein-fosfatasa 2A (PP-2A) de macrófagos murinos. Esta molécula es probablemente la responsable de la reducción en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible y por lo tanto, de la disminución de la producción de NO en macrófagos murinos.<sup>71</sup> Norsworthy y col. (2004) también detectaron la disminución en la producción de NO además de altos niveles de interleucina 10 en macrófagos derivados de médula ósea

que fueron expuestos al extracto de glándulas salivales de *Lutzomyia longipalis*.

Como parte de la respuesta inflamatoria, se reclutan células de la respuesta inmune innata, que en conjunto montan una respuesta en contra de los parásitos inoculados. Como se mencionó anteriormente, en los primeros momentos de la infección migran neutrófilos, los cuales actúan como células fagocíticas, liberando quimiocinas tipo IL-8, que promueven la migración de más neutrófilos al lugar de la inoculación. Estos polimorfonucleares tienen una vida corta, permaneciendo de 6 a 10 horas en circulación y posteriormente mueren por muerte celular programada o apoptosis. Después de dos o tres días, se desencadena la migración de monocitos responsables de ingerir tanto a los parásitos como a los restos de los neutrófilos muertos.<sup>7</sup>

Otra célula de la respuesta inmune innata que participa desde el inicio de la infección es la célula NK, cuya actividad citotóxica no está restringida por moléculas MHC. Las células NK son linfocitos derivados de médula ósea que actúan sobre las células infectadas ejerciendo un proceso lítico y secretando IFN- $\gamma$ .<sup>1</sup> El papel de las células NK es sumamente importante en el control de la leishmaniasis porque su activación induce la producción de citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que activan macrófagos, lo que aunado a su capacidad lítica de las mismas células NK, limita el crecimiento de los parásitos.<sup>68, 67</sup>

La IL-12 es una citocina relacionada a la activación de las células NK. Es secretada principalmente por células dendríticas aunque también por macrófagos. Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos que fagocitan al parásito *Leishmania sp.* y migran a los órganos linfoides, en donde presentan el antígeno a las células T, induciendo la respuesta inmune mediada por células. Llama la atención el hecho de que la carga parasitaria de células de Langerhans (células dendríticas ubicadas en epidermis y mucosas) es mucho más baja respecto a la observada en macrófagos, sin embargo son estimuladoras más potentes que estos.<sup>60</sup> Las células dendríticas, junto con los macrófagos también pueden secretar citocinas antiinflamatorias como la IL-10. Las células dendríticas infectadas por *Leishmania sp.* sufren diversas afectaciones que dependen del subtipo de células dendríticas y la especie del parásito. En la infección *in vitro* de células dendríticas murinas derivadas de médula ósea por *L. mexicana*, se encontró que estas células redujeron la

capacidad de secreción de IL-12 y también se afectó la capacidad de maduración. Estas propiedades fueron restablecidas con un estímulo adicional de IFN- $\gamma$  más LPS (lipopolisacárido).<sup>11</sup>

Células dendríticas como macrófagos interactúan con células T mediante las moléculas coestimuladora CD40 con CD40L, lo cual es determinante en la resolución de la enfermedad. El reconocimiento antigénico por linfocitos T en estas células presentadoras de antígenos (CPAgs) en presencia de moléculas coestimuladoras como CD40/CD40L induce la producción de IL-12. Esta activa a las células T e induce la producción de IFN- $\gamma$ . Esta citocina desencadena los mecanismos leishmanicidas en los macrófagos incrementando la transcripción de iNOS y la liberación de NO. Otra citocina liberada por los linfocitos T es TNF- $\alpha$  que actúa de manera sinergista con IFN- $\gamma$  en la inducción de NO en macrófagos. Una evidencia de lo anterior es el hecho de que al usar anticuerpos neutralizantes anti-TNF- $\alpha$ , se exacerba la enfermedad en ratones resistentes CBA y C3H.<sup>7</sup> También se ha establecido en modelos murinos que el estallido oxidativo es importante en el control de la enfermedad, pues se demostró que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> tienen una participación importante en la actividad leishmanicida de macrófagos.<sup>49</sup>

El parásito *Leishmania* ha desarrollado diversas estrategias para evadir la respuesta inmune innata del hospedero. Desde el inicio de la infección el parásito es protegido por la saliva del vector. Posteriormente, utilizan los mecanismos de la respuesta inmune para infectar a la célula blanco. Se ha reportado que los promastigotes metacíclicos tiene la capacidad de protegerse del complejo C5b-C9 del complemento, evitando su inserción mediante la elongación de la cadena correspondiente al fosfoglicano de la molécula LPG (lipofosfoglicano predominante en la membrana del parásito). Por otro lado, la proteasa de superficie gp63 de *Leishmania* acelera la conversión de C3b a C3bi lo cual facilita la unión de la *Leishmania* al receptor de complemento CR3 de los macrófagos.<sup>10</sup> La fagocitosis mediante estos receptores también favorecen la sobrevivencia del parásito, ya que no inducen un buen estallido oxidativo.<sup>3</sup>

Una vez dentro del macrófago, el parásito modula la función leishmanicida. La LPG inhibe el estallido oxidativo y la gp63 puede degradar las enzimas lisosomales del fagolisosoma.

Se ha descrito, que si el macrófago es activado adecuadamente por citocinas  $IFN\gamma$  y  $TNF-\alpha$ , lograría contrarrestar los mecanismos de evasión del parásito.<sup>7, 10</sup> En dicha activación pueden participar células de la respuesta inmune innata, como las células NK, o bien células de la respuesta inmune adaptativa como son los linfocitos CD4 Th1. Una respuesta Th1 también se asocia a una respuesta humoral con predominio de isotipos IgG1 e IgG3, inmunoglobulinas opsonizantes del parásito, cuyos receptores  $Fc\gamma$  están en el macrófago. La fagocitosis a través de estos receptores induce un potente estallido oxidativo favoreciendo la eliminación del parásito.<sup>18, 37</sup>

También la participación de linfocitos T CD8+ es sumamente importante para controlar la parasitosis ya que estos linfocitos ejercen dos funciones: tienen la función citotóxica sobre macrófagos infectados y adicionalmente pueden secretar citocinas activadoras de macrófagos favoreciendo la muerte de los parásitos intracelulares. La importancia de las células CD8+ se demostró gracias a la eliminación en ratones del gen de  $\beta 2$ -microglobulina, cuyo producto forma parte de la estructura de las moléculas MHC de clase I. Los animales sufrieron una deficiencia en la generación de linfocitos T citotóxicos CD8+ y se observó que se volvían más susceptibles a infecciones por patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Trypanosoma cruzi*. Entre las evidencias del papel de los linfocitos CD8+ en la leishmaniasis se encuentran los resultados de Da-Cruz y cols. (1994) y de Gaafar (1999) quienes informan que durante la fase aguda de la formación de las lesiones y durante el proceso de eliminación de *L. major*, se observa un alto número de linfocitos T CD8+ en lesiones y en sangre periférica. Posteriormente, en el 2002, el grupo de Da-Cruz y cols. encontraron que durante la infección activa de pacientes infectados con *L. braziliensis*, la proporción de células CD4+ es mayor que la de células CD8+, sin embargo durante el proceso curativo el número de linfocitos CD8+ se incrementa y dicha proporción cambia acercándose al equilibrio. También en lesiones de pacientes con LCL infectados por *L. braziliensis* se encontró una alta frecuencia de linfocitos CD8+ en apoptosis durante la fase activa de la enfermedad. No obstante la frecuencia fue significativamente menor en los pacientes que presentaron curación espontánea.<sup>9</sup>

Los pacientes con LCD presentan una respuesta inmune del tipo Th2 con citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 y cursan con una enfermedad progresiva que

los lleva a la muerte. En estos pacientes se demostró que los linfocitos CD8 tienen disminuida su capacidad citotóxica así como la producción de citocinas activadoras de macrófagos  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF-}\alpha$ .<sup>8, 63</sup>

Aún quedan muchas interrogantes sobre el papel que juegan cada uno de los subtipos celulares de la respuesta inmune, no sólo aquellos relacionados a la respuesta innata sino también los linfocitos T CD4 y T CD8, que son importantes en definir la resistencia o susceptibilidad a la leishmaniasis, tanto por su producción de  $\text{IFN}\gamma$  y  $\text{TNF-}\alpha$ , como por su función células citotóxicas con capacidad de inducir apoptosis en los macrófagos infectados.

### 3. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)

#### 3.1 Definición

La muerte celular programada (MCP) o apoptosis (*apo* = separación; *ptosis* = caída) es un proceso activo de la célula, que al detectar alguna anomalía como mutaciones o al ser infectada, pone en marcha la maquinaria apoptótica codificada en su genoma, lo que comúnmente también se le conoce como suicidio celular. Se diferencia de la necrosis, por que esta última se presenta necesariamente al existir un daño del medio externo sobre la membrana celular, provocando que la célula pierda total control de la regulación del intercambio entre su medio interno y el externo.

Las diferencias entre la apoptosis y necrosis se resumen en el siguiente cuadro<sup>15, 64</sup>:

Apoptosis	Necrosis
<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Proceso dirigido genéticamente por la célula misma en respuesta a señales externa y/o internas</li><li>▪ Importante en el desarrollo, homeóstasis y respuesta inmune</li><li>▪ Las etapas del proceso se pueden dividir en tres fases: iniciación, ejecución (reducción de tamaño y la fragmentación del genoma en fragmentos de una longitud determinada) y eliminación (fagocitosis de restos celulares).</li><li>▪ No hay respuesta inflamatoria</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Fenómeno provocado por un daño excesivo del medio externo</li><li>▪ Constituye una muerte patológica</li><li>▪ Se distingue el aumento del volumen celular debido a la entrada de agua por la ruptura de la membrana plasmática, además de la condensación y degradación irregular de la cromatina hay alteración en los organelos y se libera el contenido celular.</li><li>▪ Reacción inflamatoria</li></ul>

Por tanto, la apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado que juega un papel muy importante en el desarrollo y salud del organismo, en donde la célula participa activamente en su eliminación procurando el control de las poblaciones celulares sin dañar las células adyacentes. <sup>13</sup>

Con base en la caracterización de los eventos que lo componen, el proceso apoptótico se puede dividir en tres etapas<sup>64</sup>:

### 1. *Fase de iniciación*

Comprende la recepción del estímulo, ya sea interno o externo. Las señales intracelulares se originan por estrés biológico, iniciando la vía intrínseca, con la liberación del citocromo C de la mitocondria. Las señales extracelulares requieren de la unión con el ligando de la membrana plasmática en la célula receptora (célula blanco), con lo que se desencadena la cascada de señalización (vía extrínseca) compuesta de mediadores génicos y bioquímicos intracelulares que inicialmente intentan reparar los daños celulares. Si estos fallan, se sigue con el proceso de la muerte celular. Los inductores de la muerte celular pueden ser fisiológicos, tales como hormonas y citocinas; biológicos, es decir virus, bacterias, parásitos etc; químicos (fármacos) o físicos (radiaciones).

Dependiendo del estímulo se describen dos rutas: la vía extrínseca cuyo inicio radica en el establecimiento de conexiones con el espacio extracelular y la vía intrínseca también denominada mitocondrial y anteriormente “de la ceramida”; ambas desencadenan la cascada de señalización que comprende la siguiente fase del proceso apoptótico.

### 2. *Fase de ejecución*

Una vez recibido el estímulo proapoptótico, la célula sufre modificaciones morfológicas y bioquímicas. Comienza a perder contacto con las células vecinas debido a la alteración de las moléculas de adhesión, la membrana se deforma formando ondulaciones o abombamientos, el citoplasma se contrae y la célula disminuye en tamaño. Otro cambio, importante para la posterior “limpieza” de los restos celulares, es la exposición del fosfolípido fosfatidil serina, propio de la capa interna de la membrana citoplasmática.

Las señales que inician la vía extrínseca se reciben a través de los receptores transmembranales pertenecientes a la familia del receptor del TNF- $\alpha$  que incluye también a la proteína FAS (también llamada CD95).<sup>39</sup> Los ligandos activadores de estas vías son las proteínas ligando FAS (FAS L) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Diversos miembros

de la familia TNF presentan un dominio de muerte (Death Domain o DD) asociado en su porción intracelular a proteínas adaptadoras tales como el receptor TNF asociado al dominio de muerte (TNF receptor associated death domain o TRADD) para el receptor TNFR-I y el factor asociado al dominio de muerte (Factor associated death domain o FADD) para FAS.<sup>13</sup>

Los DD promueven la activación de las proteínas mediadoras y efectoras de la apoptosis denominadas caspasas, que son los mediadores y efectores de mayor responsabilidad durante esta fase del proceso y hasta su término (ver figura 8).<sup>59</sup> Las caspasas constituyen una familia de proteasas de cisteína que se encuentran como zimógenos inactivos en el citoplasma, constan de tres dominios: un prodominio N-terminal altamente diverso requerido para la activación del zimógeno, un dominio correspondiente a una subunidad grande (p20) y una subunidad enzimática (p10). Durante su activación sufren un procesamiento proteolítico que origina la enzima madura constituida de dos heterodímeros p20/p10, que exponen dos sitios activos independientes.<sup>59</sup> Se dividen en tres subfamilias según la homología en sus secuencias de aminoácidos, la función de los miembros de las subfamilias I y II está ligada al proceso apoptótico. Las caspasas 2, 8, 9 y 10 son miembros de la subfamilia I denominadas caspasas activadoras. Las caspasas 8 y 10 en su forma inactiva poseen prodominios largos, los cuales contienen un DED. Las caspasas 2 y 9 poseen dominios de reclutamiento asociados a caspasas o CARDs (Caspase-Associated Recruitment Domains). La subfamilia II comprende a las llamadas caspasas ejecutoras o efectoras 3, 6 y 7, las cuales presentan prodominios cortos que no están involucrados con las interacciones proteína-proteína.<sup>25</sup>

El DD de TRADD tiene la capacidad de unir otras proteínas asociadas a DD, incluyendo FADD. La proteína adaptadora FADD interacciona con dos módulos protéicos, uno DD y un dominio efector de muerte o DED (Death Effector Domain). Se ha observado que la presencia de FADD desempeña un papel importante en la unión de caspasas con los receptores de la familia TNF, ya sea mediante su DD unido a TRADD o

mediante la interacción directa con el DD citosólico de los receptores y usando su DED para unir DED asociados a caspasas. Los DED expuestos interaccionan con los DEDs en los prodominios de la caspasa 8, lo cual induce la oligomerización de la procaspasa 8. Posteriormente se forma un complejo proteico masivo denominado DISC (death-inducing signal complex). En este complejo se compactan dos subunidad lineares de la procaspasa 8 que se autoactiva en caspasa 8. Existen diferencias en la activación de la procaspasa 8 según la línea celular en la que ocurra. En células linfoides la caspasa 8 es fuertemente activada, por lo que puede activar directamente la cascada de señalización de procasasas. La activación de la procaspasa 10 es similar a la de la procaspasa 8. La caspasa 10 puede actuar de manera independiente a la caspasa 8, funciona principalmente en células linfoides. La señal pro-apoptótica proveniente del receptor Fas en células T recluta y activa procaspasa 10. El reclutamiento de la procaspasa 2 por los receptores activos, se da mediante adaptadores tales como las proteínas de interacción con el receptor o RIP (Receptor-interacting protein) homólogo a los DDs y TRADD. Después de ser reclutada, la procaspasa 2 es activada.<sup>25</sup>

En general hay pocos cambios en los organelos, las cisternas del retículo endoplásmico se ensanchan y se fusionan, pero los cambios en la mitocondria son de especial atención. La vía mitocondrial o intrínseca, se conoce también como la vía de las ceramidas por que este glucolípido interviene en la liberación del citocromo C. La ceramida se sintetiza en el retículo endoplásmico y mitocondrias y la activan agentes externos a través de la esfingomielina o las vías de Fas y TNF, además de las alteraciones no corregidas en el material genético que activan la síntesis de la proteína del gen p53. Este glucolípido, aunado a otras proteínas, interviene en los cambios iónicos entre la matriz mitocondrial y el citoplasma, produciendo un descenso del potencial transmembranal. Se desacopla la cadena de transportación de electrones, se incrementa la generación de especies reactivas del oxígeno y se aumenta la permeabilidad de la membrana interna de la mitocondria liberando el citocromo C (ver figura 8).<sup>39</sup>

En la ruta mitocondrial, están involucradas proteínas de la familia Apaf-1 (apoptotic protease activation factor-1 o factor 1 de activación de proteasas apoptóticas) en la activación de las procaspasas.<sup>25</sup> Estas proteínas son proteínas adaptadoras con un dominio CARD en combinación con un dominio de unión y oligomerización de nucleótidos. Los dominios CARD de Apaf-1 y de las procaspasas interactúan teniendo como resultado la activación de las caspasas. Las proteínas Apaf-1 poseen un dominio regulatorio que su oligomerización sea dependiente de ATP (adenosin trifosfato) o dATP (deoxiadenosin trifosfato). Las moléculas de Apaf-1 oligomerizadas en conjunto con la procaspasa 9 y el citocromo C forman el complejo masivo conocido como apoptosoma.<sup>13, 25, 59</sup> Los dominios CARD de Apaf-1 y de la procaspasa 9 son de formas complementarias y cargas opuestas, su interacción activa la procaspasa 9. La caspasa 9 activa tiene la capacidad de activar a su vez a las procaspasas 3 y 7. La caspasa 3 activada puede activar a la procaspasa 9 con lo que se forma una ruta de retroalimentación positiva proapoptótica.<sup>25</sup>

La vía mitocondrial es gobernada por la familia de proteínas Bcl-2. Esta familia comprende proteínas muy conservadas a través de la evolución de los metazoarios, que pueden estar asociadas a señales pro-apoptóticas o anti-apoptóticas. Algunos de los genes de la familia Bcl-2 producen dos o más proteínas que algunas veces pueden ejercer efectos opuestos sobre la regulación de la muerte celular. De hecho, algunas de estas proteínas pueden desempeñar actividad anti-apoptótica o pro-apoptótica según el contexto celular. Las proteínas pro-apoptóticas Bid, Bim y BAD normalmente se encuentran en el citosol pero pueden ser inducidas a actuar sobre la mitocondria. La caspasa 8 puede también participar en la activación de la vía mitocondrial a través de la conversión de la proteína citosólica Bid a su forma activa tBid. Este evento representa un importante punto de intersección entre la vía extrínseca representada por el receptor de muerte y la intrínseca o mitocondrial.<sup>25, 59</sup> Las proteínas de la familia Bcl-2 regula la liberación del citocromo C de la mitocondria, pero también se ha reportado que controlan la liberación de otras proteínas de la mitocondria como las

caspasas 2, 3 y 9, el factor inductor de la apoptosis (AFI) y DIABLO, el inhibidor de las proteínas de la familia IAPs, familia de proteínas supresoras de la apoptosis. Estas proteínas están codificadas en el genoma del núcleo, sin embargo son transportadas a la mitocondria donde son almacenadas en el espacio intermembranal.

La caspasa 3, forma activa de la procaspasa 3, es una caspasa clave para la ejecución de la apoptosis. El cimógeno puede ser activado por las caspasas 8 y 10 (vías extrínseca), 9 (vía intrínseca) o moléculas de granzima B. A su vez la caspasa 3 tiene como sustrato las procaspasas 3, 6 y 9, aunque también actúa sobre moléculas como la PARP y DNA-PK involucradas en la reparación de DNA. Las caspasas 6 y 7 son altamente homólogas a la caspasa 3, por lo que los cimógenos de éstas pueden ser activados por la caspasa 3 pero no por la granzima B. Los sustratos de la caspasa 6 incluyen, proteínas láminas, procaspasa 3 y PARP, ésta última también es sustrato de la caspasa 7. La inactivación de moléculas como PARP y DNA-PK, por la acción enzimática de las caspasas mencionadas anteriormente, asegura la degradación del material genético de la célula apoptótica. Aunque la membrana nuclear permanece intacta se produce una redistribución de los poros nucleares debido a la acción de la caspasa 9, lo que se asocia con la degradación de proteínas nucleares. Esto permite la entrada de la caspasa 3 al núcleo para actuar sobre la molécula ICAD. ICAD es el inhibidor específico de la deoxiribonucleasa activadora de caspasa o CAD (caspase-activated deoxiribonuclease), nucleasa de 40 kilodaltones que gracias a la actividad proteolítica de la caspasa 3 es liberada del complejo que forma con su inhibidor y degrada el DNA, formando fragmentos de 180 a 20 pares de bases y múltiplos de ellos. A la par de este suceso, la actividad proteolítica de las caspasas sobre las proteínas láminas, componente del esqueleto nuclear, permite la condensación de la cromatina y la descomposición de la membrana nuclear.<sup>32</sup>

Es precisamente la fragmentación del material genético lo que se ha aprovechado para el desarrollo de pruebas para la identificación de células en apoptosis. Un ejemplo es la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling), tinción derivada de la uridina, en la que

los fragmentos de DNA producidos durante el proceso de apoptosis son marcados en el extremo 3'-OH terminal con nucleótidos modificados en una reacción enzimática catalizada por la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT por sus siglas en inglés).<sup>28</sup>

Finalmente la célula se fragmenta en varias vesículas de tamaño heterogéneo rodeadas de membrana plasmática, denominados cuerpos apoptóticos, en los que se reparte el contenido celular, evitando que se vacíe incontrolablemente y que componentes potencialmente peligrosos dañen el tejido circundante, provocando inflamación. La formación de los cuerpos apoptóticos se debe a la actividad proteolítica de las caspasas sobre moléculas como la fodrina componente esencial del citoesqueleto.<sup>45</sup>

Cuando la apoptosis es el resultado de la actividad citotóxica de un linfocito T, libera a la célula blanco gránulos que contienen moléculas de perforina, proteínas perturbadoras de membrana, y moléculas de granzima, proteínas pertenecientes a la familia de proteasas de serina.<sup>40</sup> Como se mencionó anteriormente, la perforina forma poros en la membrana citoplasmática alterando el estricto intercambio entre los medios extra e intracelulares. Esto facilita el paso al interior de la célula a las moléculas de granzima. La granzima B es capaz de activar varias procaspasas, tales como las procaspasas 3, 7, 9 y 10, aunque no se conoce completamente el mecanismo. Dado que la granzima B está involucrada en la activación tanto de caspasas activadoras como efectoras, su actividad es determinante para la iniciación de la degradación del material genético y del proceso apoptótico.<sup>6</sup>

### 3. Fase de eliminación

La duración del proceso apoptótico es variable entre los diferentes tipos celulares, pero en general se puede decir que es de corta duración y rara vez pueden verse *in situ* a las células que están muriendo, pues son rápidamente removidas preferentemente por fagocitos profesionales.<sup>31</sup>

Los cuerpos apoptóticos también pueden ser fagocitados por células vecinas del mismo tejido, con lo cual se evita liberar el contenido citoplasmático y adicionalmente se induce la síntesis y secreción de moléculas anti-inflamatorias en el fagocito.<sup>32</sup>

El mecanismo de reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos no está completamente claro. Varias moléculas de superficie podrían estar involucradas de manera simultánea o secuencialmente en este proceso: las lectinas (como aquellas que reconocen azúcares que ha perdido ácido sialico), integrinas (como el receptor de trombospondina), receptores “scavenger”, trasportadores ABC, CD14 y receptores de complemento.<sup>65</sup> Sin embargo, se ha propuesto que la exposición en la membrana externa de las moléculas de fosfatidilserina es una señal que basta para inducir la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos.

La apoptosis fue descrita únicamente para células de organismos multicelulares, pero recientemente se ha estado estudiando el papel de la muerte celular programada, denominada también como paraptosis, en los organismos unicelulares, en los cuales posiblemente funcione como un mecanismo para regular sus poblaciones a favor de su supervivencia. En diversos estudios se ha analizado la presencia de varios de los componentes de la apoptosis, tales como la formación tipo escalera del DNA en los geles de agarosa y actividad tipo caspasa en algunas de las especies de *Leishmania*. Sin embargo, esta paraptosis es distinta a la apoptosis descrita para células de eucariontes.<sup>20, 42, 75</sup>

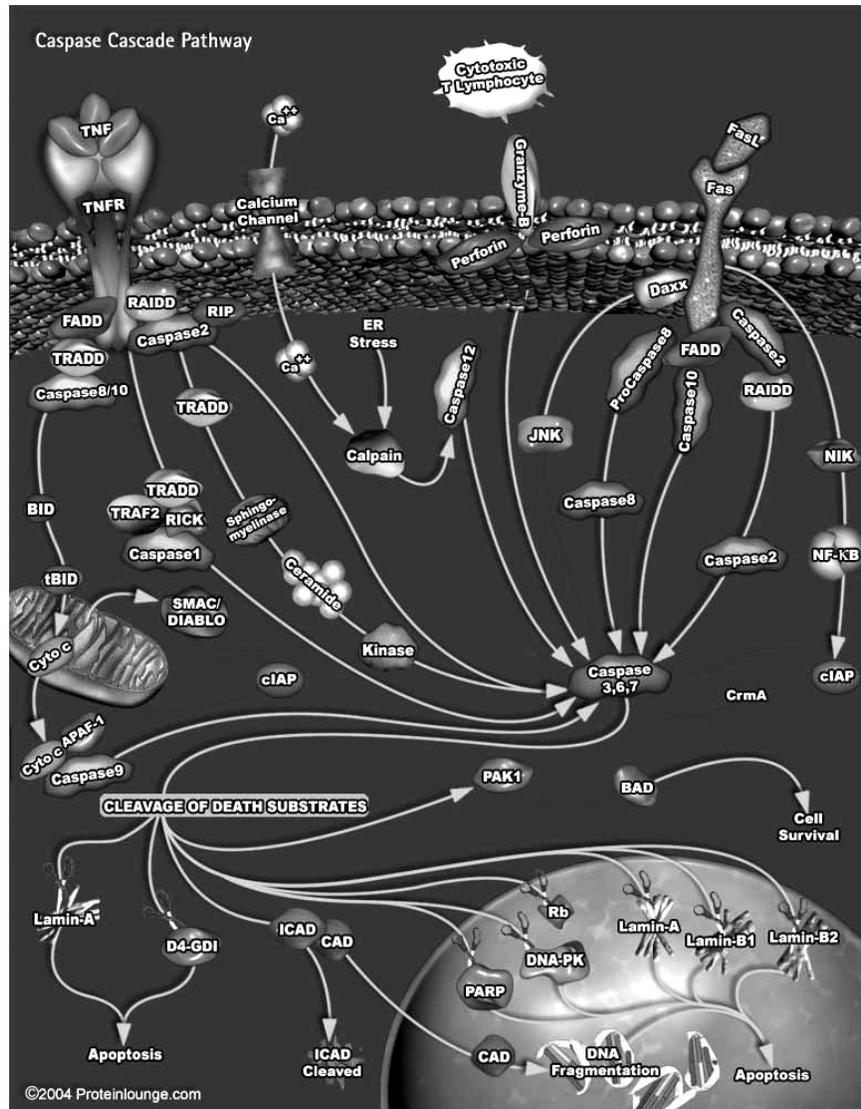


Figura 8. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. (tomado de. [http://www.merckbiosciences.co.uk/popup/cbc/caspase\\_cascade\\_interactive\\_pathway.htm](http://www.merckbiosciences.co.uk/popup/cbc/caspase_cascade_interactive_pathway.htm))

### 3.2 Importancia de la Apoptosis en el Sistema Inmune

Se ha demostrado la importancia de la apoptosis en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los organismos pluricelulares, pero cabe destacar que es ante todo un mecanismo de regulación de las poblaciones celulares. Es así como son eliminadas aquellas células del sistema inmune que reaccionan contra antígenos propios, células infectadas y células que han proliferado y/o migrado al sitio de infección y ya cumplieron su tarea.

La presencia de células en apoptosis es permanente y la cantidad varía según el tejido, sin embargo, eventos ajenos a los procesos naturales del cuerpo,

como son las infecciones por parásitos, alteran el porcentaje basal de células apoptóticas.

La MCP es un proceso importante en la interacción hospedero-parásito, que puede estar actuando a favor de la respuesta inmune contra el patógeno extraño o favoreciendo la sobrevivencia y diseminación del patógeno.

El estudio del papel que juega el proceso apoptótico en la relación hospedero-parásito es preponderante para la búsqueda de nuevos fármacos y tratamientos para la cura de enfermedades parasitarias, en las cuales se ha demostrado que el parásito tiene influencia sobre la MCP de las células de la respuesta inmune, situación que puede estar evitando que el sistema inmune del paciente sea capaz de resolver por completo la enfermedad.<sup>14, 74</sup> Se ha observado que patógenos intracelulares como *Salmonella*, *Shigella* y micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. bovis* y *M. leprae* modulan la apoptosis de macrófagos.<sup>36</sup> Mustafa et al. (2001) reportan que *M. tuberculosis* y *M. leprae* (agentes etiológicos de la tuberculosis y lepra respectivamente) alteran la expresión de Fas en el macrófago, haciendo de éste un “santuario”, evitando la apoptosis inducida por células T.

Otros ejemplos de enfermedades asociadas a la inhibición (cáncer, lupus eritematoso sistémico, herpesvirus) o incremento de la apoptosis (SIDA, Alzheimer, Parkinson), hacen evidente que la apoptosis es relevante en la fisiopatología de la enfermedad, así como también en la relación hospedero-parásito.

En la leishmaniasis se ha informado que *L. donovani* inhibe la apoptosis de macrófagos inducida *in vitro* por la eliminación del M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) del medio de cultivo. La inhibición de la muerte celular del macrófago infectado probablemente es el resultado de la acción conjunta de la molécula LPG (lipofosfoglicano) del parásito y la expresión de citocinas que el parásito promueve, tales como TNF- $\alpha$ , GM-CSF, TGF- $\beta$  y IL-6.<sup>47</sup> También se ha reportado que *L. major* inhibe la apoptosis de neutrófilos mediante la inhibición de la caspasa 3, una proteasa efectora de la muerte celular programada. Esto le favorece al parásito ya que prolonga la vida de los neutrófilos en el sitio de infección, al parecer el tiempo suficiente para que estos sean relevados por los macrófagos, la célula hospedera de la *Leishmania sp.*<sup>2</sup>

Aunado a estos estudios, en nuestro laboratorio se encontró que *L. mexicana* inhibe la actividad citotóxica de linfocitos CD8+ de pacientes con LCD.<sup>63</sup> La inhibición de la apoptosis posiblemente es favorable para el parásito, ya que evade los mecanismos leishmanicidas dependientes del oxígeno que se activarían cuando nuevos macrófagos fagociten a cuerpos apoptóticos que contienen a *Leishmania*. Si *Leishmania* tiene la capacidad de alterar la actividad de las células CD8+ así como de inhibir la MCP de los macrófagos, estarían favoreciendo la progresión de la enfermedad, ya que se evitaría la eliminación de las células infectadas favoreciendo la diseminación del parásito. Adicionalmente se limitaría la generación de nuevas clonas de linfocitos T específicas para antígenos del parásito.

La inhibición de la apoptosis también favorece la diseminación de la parasitosis a nuevos hospederos, ya que los vectores fagocitarían macrófagos intensamente infectados, garantizando así su capacidad de transmisión de la enfermedad.<sup>47</sup>

Sin embargo, se desconoce si la inhibición de los fenómenos citotóxicos de linfocitos CD8 de pacientes con LCD hecha *in vitro*, también ocurre en los tejidos de pacientes con distintos cuadros clínicos de leishmaniasis.

## **HIPÓTESIS**

Las lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) presentan un porcentaje mayor de células en apoptosis que las de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el número de células apoptóticas en tejidos de pacientes con LCL y LCD infectados con *L. mexicana*. Analizar si existe una correlación entre el número de células apoptóticas con la severidad del cuadro clínico.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar las biopsias cutáneas obtenidas de lesiones de pacientes con LCL y LCD mediante la técnica de TUNEL.
- Determinar si existen cambios significativos en los porcentajes de células apoptóticas en los tejidos de pacientes con LCD que fueron sometidos a tratamiento, en biopsias correspondientes a las etapas pretratamiento, tratamiento y postratamiento.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se trabajó con biopsias congeladas de lesiones de 18 pacientes con LCL y 5 con LCD, previamente obtenidas en viajes de campo, las cuales fueron tomadas con micro-sacabocados (biopsy-punch). Estos pacientes con leishmaniasis cutánea fueron diagnosticados por intradermoreacción de Montenegro, pruebas serológicas de ELISA y por improntas positivas. Todos los pacientes firmaron una hoja de consentimiento y recibieron tratamiento con glucantime. El protocolo fue sometido a la comisión de ética de los estados de Tabasco y Campeche y se realizó en conjunto con los Servicios de Salud de estos estados. Las biopsias fueron incluidas en medio O.C.T. compound. Ortho Cutting Tissue compound (Tissue Tek; Sakura) para su criopreservación y almacenadas a una temperatura constante de -70°C.

### **Evaluación del porcentaje de células apoptóticas**

#### **▪ Tinción por técnica de TUNEL**

De las biopsias cutáneas criopreservadas se realizaron cortes por congelación de 4-5 micras en un criostato y se colocaron en portaobjetos especialmente tratados (superfrost) para incrementar su adherencia. El tejido se fijó sumergiendo las laminillas en paraformaldehído al 4% durante 20 min. y se inhibió la actividad de peroxidasa endógena con metanol-peróxido al 3%, ambos durante 30 min. con tres lavados en PBS entre un paso y otro. Posteriormente se permeabilizó el tejido con una mezcla de Tritón x-100 al 0.1% (Sigma) en citrato de sodio al 1% fresco, por 2 min., durante los cuales se mantuvieron las laminillas sobre una cama de hielo dejando que la solución cubriera el corte al deslizarse sobre el portaobjetos. Después de lavar 2 veces con PBS, se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, POD; Roche) por 60 min. (solución marcadora + solución enzimática). Se revelaron con sustrato para peroxidasa (DAB+H<sup>2</sup>O<sup>2</sup>), Diaminobencidina (DAB 10x; Roche) en un buffer de peróxido de hidrógeno (J.T. Baker) y se monitoreó el cambio de coloración del tejido debido a que esto ocurre muy rápidamente, la reacción se detuvo sumergiendo las laminillas en PBS. Finalmente se contratiñó con hematoxilina y se montaron las laminillas

con resina. Para cada evento de tinción se utilizó un control positivo de la tinción, adicionando una DNasa (DNase I, 600 u / ml; Invitrogen) y uno negativo, al cual sólo se agrega la solución de nucleótidos marcados sin la presencia de la enzima TdT.

### **Evaluación del efecto del tratamiento en pacientes con LCD**

Se realizaron tinciones con la técnica de TUNEL, siguiendo el procedimiento antes descrito en cortes de lesiones de 2 paciente con LCD correspondiente a diferentes etapas del tratamiento combinado de pentamidina + alopurinol e inmunoterapia con IFN- $\gamma$ .8

### **Análisis**

Utilizando un microscopio Zeiss Axioskop con una cámara Axio CamMRc usando el objetivo 63x y el software AxioVision 300 3.0, se evaluaron 15 campos de 21, 080  $\mu\text{m}^2$  a fin de cubrir la mayor parte del corte. Se realizó un primer conteo en el que sólo se tomó en cuenta la tinción TUNEL+ y posteriormente se repitió para contar las células TUNEL+ y TUNEL-. Los criterios de inclusión fueron siguientes:

- El núcleo debía observarse completamente teñido de color café o ámbar.
- El tamaño de la célula debía ser lo suficientemente grande para que indicara que no se trataba de un parásito o un cuerpo apoptótico independiente.
- Morfología típica de una célula en apoptosis, es decir con evidente formación de cuerpos apoptóticos.

Finalmente se obtuvo el promedio de células TUNEL+ por paciente y por grupo de ambas formas clínicas, así como las desviaciones estándares de estos últimos valores.

Para el análisis estadístico se implementó la prueba U-Mam-Whitney utilizando el software FPSS versión 11.

## RESULTADOS

El presente trabajo reveló una diferencia estadísticamente significativa entre el número de células apoptóticas en los cortes de las biopsias de piel de ambos grupos de pacientes ( $P=0.039$ ). Los 17 pacientes con LCL presentaron un promedio de 45.45% (error estandar 4.1) de células apoptóticas en 15 campos (con un promedio de 56.04 células por campo), mientras que los 5 pacientes con LCD presentaron un promedio de 25.25 % (error estandar 6.18) en el mismo número de campos (con un promedio de 81.47 células por campo) (ver Figura 9).

Los tejidos se encontraban en buenas condiciones de conservación y únicamente dos tejidos tuvieron que ser excluidos porque estaban muy dañados. La tinción fue específica en los tejidos de ambos grupos de pacientes permitiendo diferenciar fácilmente entre células TUNEL+ (con núcleos en color ambar o café) y TUNEL- (con núcleos en azul).

Los cortes de las lesiones de pacientes con LCL presentaron una estructura normal de la piel. La morfología del núcleo de las células TUNEL+ de pacientes con LCL se mostraba en general más regular y compacta que en las células TUNEL+ de los pacientes con LCD. Se encontró que las células TUNEL+ se distribuyen en forma similar por toda la dermis (ver Figuras 10 y 12). En contraparte, en la mayoría de los cortes del tejido de las lesiones de pacientes con LCD se observó la epidermis compactada y en general el daño causado por la infección es severo. La morfología de las células TUNEL+ fue muy variada, así como su distribución en el tejido (ver Figuras 11 y 13).

Cabe señalar que no se cuantificaron las células de la epidermis para evitar incluir células en un proceso apoptótico no relacionado a la infección por *Leishmania mexicana*. La cuantificación de células apoptóticas únicamente se realizó en la dermis de ambos grupos de pacientes.

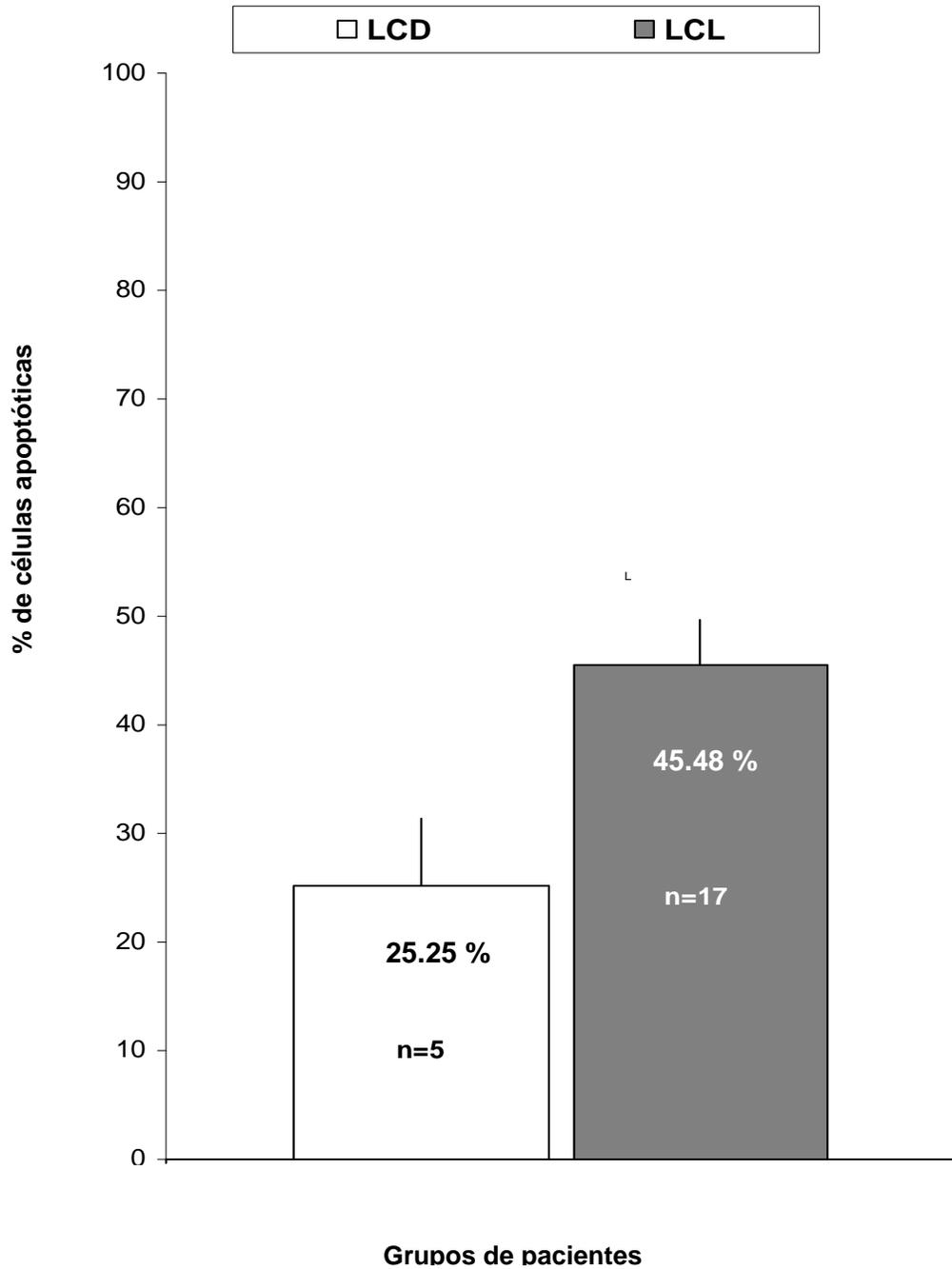


Figura 9. Porcentajes totales de células TUNEL+ por grupo de paciente. La barra clara corresponde a los pacientes con LCD; la barra oscura corresponde al grupo de los pacientes con LCL.

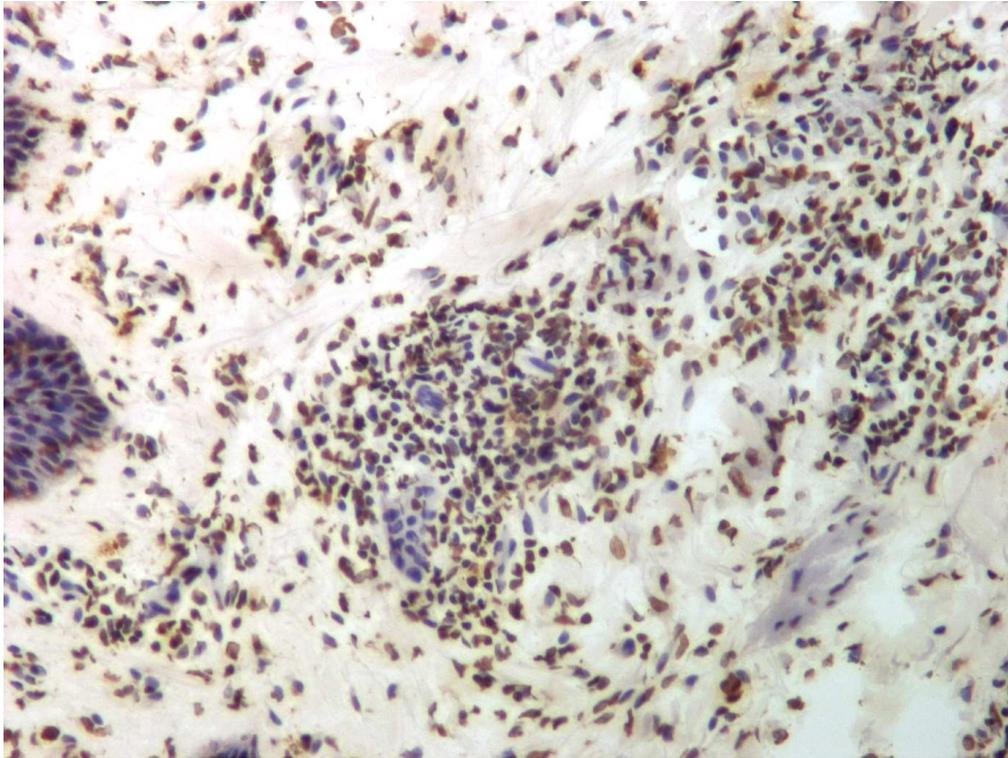


Figura 10. Fotomicrografía del corte de una lesión cutánea de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada procesada con la técnica de TUNEL (100X). Mediante la tinción café de los núcleos se identifican numerosas células apoptóticas en la dermis. La tinción azul de los núcleos indica que esas células no están en apoptosis.

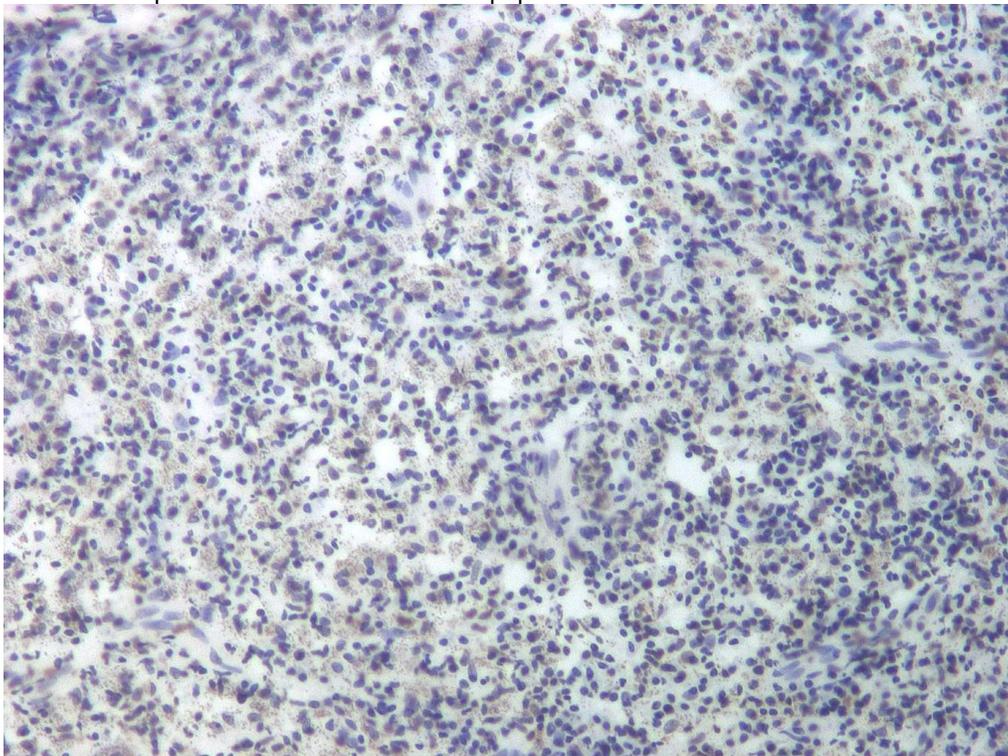


Figura 11. Fotomicrografía de un corte de una lesión cutánea en un paciente con leishmaniasis cutánea diseminada procesada con la técnica de TUNEL (100X). Son escasas las células que muestran núcleos teñidos de café (células en apoptosis) TUNEL+ y en azul TUNEL-.

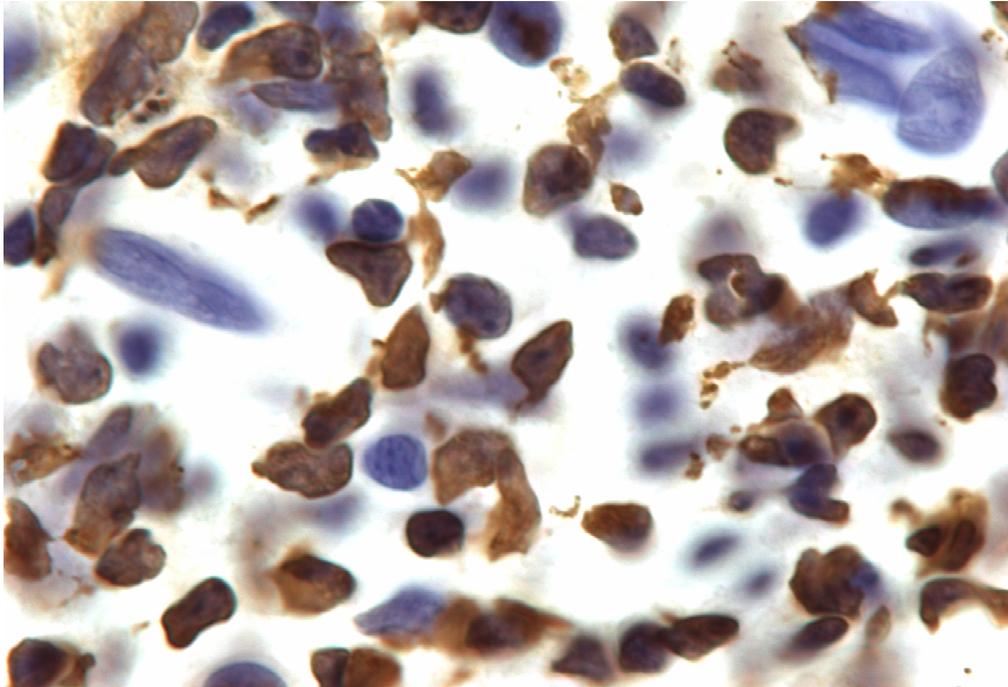


Figura 12. Fotomicrografía del corte de una lesión cutánea de un paciente con LCL procesada con la técnica de TUNEL (630X). En color café se observan las células TUNEL+ y en azul TUNEL-.

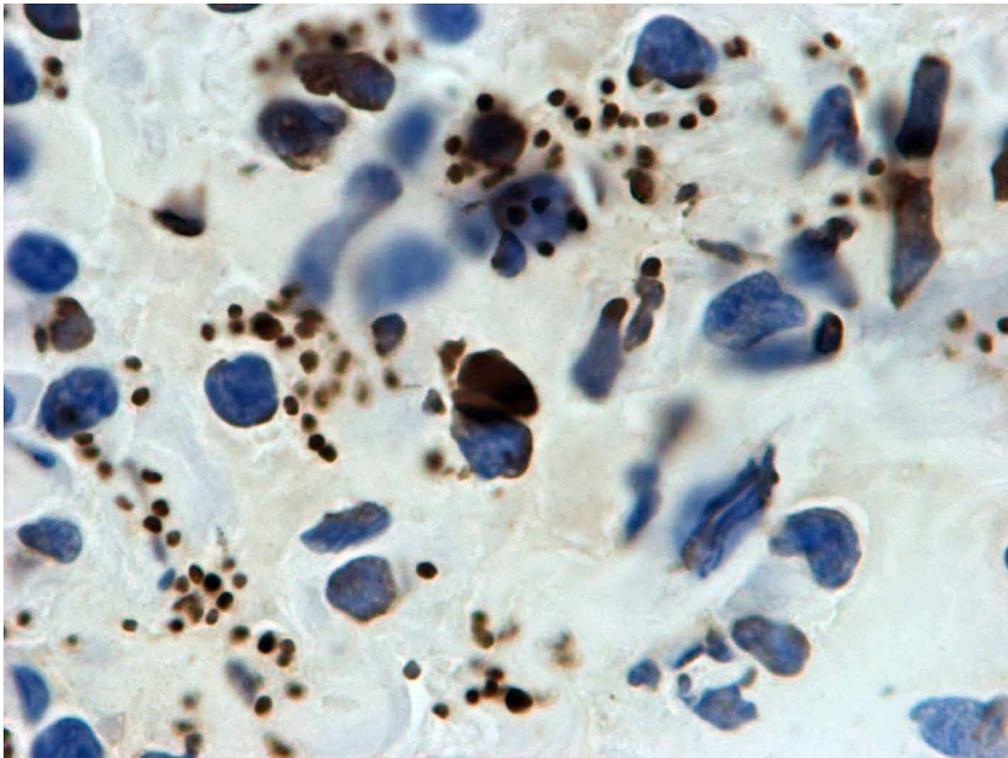


Figura 13. Fotomicrografía del corte de una lesión cutánea de un paciente con LCD procesada con la técnica de TUNEL (630X). En color café se observan las células TUNEL+ y en azul TUNEL-. Nótese la presencia de numerosos parásitos cuyo núcleo se encuentra teñido de café.

Se buscó una correlación entre los datos clínicos y el número de células apoptóticas para ambos grupos de pacientes.

Para el análisis del grupo de LCL se dividieron a los pacientes en 5 grupos, dependiendo del número de células apoptóticas en sus lesiones. De esta manera el grupo 1 tenía el 10%, el grupo 2 tenía el 20% y así sucesivamente hasta el grupo 6 que tenía alrededor del 70% de células apoptóticas en los tejidos. Se compararon la edad, género, tiempo de evolución, tratamiento, número de parásitos y células apoptóticas. Cabe mencionar que ninguno de los pacientes con LCL recibió tratamiento sistémico. Algunos pacientes se aplicaron tratamientos tópicos de diversa índole sin efecto leishmanicida comprobado varios meses antes de la toma de la biopsia cutánea. No se encontró una correlación entre los distintos tratamientos tópicos y del resto de los parámetros analizados con respecto al número de células apoptóticas (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Análisis del grupo de pacientes con LCL.** La abreviatura que se muestra se utilizará de aquí en adelante para identificar a los pacientes. Otras abreviaturas utilizadas: ND= No disponible, S/T= Sin tratamiento.

Paciente (Abreviatura)	Edad	Sexo	Tiempo de evolución	Tratamiento	Cantidad parásitos	No lesiones	células TUNE+ (%)	
Misael Lara Pérez (#6)	22	M	2 meses	S/T	1 a 5	3	15.34	20%
Gonzalo Antonio (GA)	ND	M	ND	ND	ND	ND	16.58	
Santiago Hernández (SH)	18	M	2 años	S/T(quemadura c/aditivo)	1 a 5	6	20.9	30%
Micaela Díaz Montejo (#7)	38	F	2 meses	S/T	1 a 5	1	26.24	
Carmita Cerino (CC)	44	F	3 meses	Líquido curajote, Nizoral, penicilina polvo	600	1	34.89	40%
Joel González (JG)	18	M	2 meses	5-fluorouracilo	250	1	41.34	50%
Bertha García (BG)	39	F	1 año	Sal éxon	5 a 10	1	43.04	
Rubicel Baños (RB)	16	M	2 meses	S/T	1 a 5	1	51.19	60%
Nemias Landeros (NL)	25	M	1 mes	S/T	5 a 10	1	51.47	
José Díaz Ramírez (JDR)	26	M	2 años	S/T( quemadura c/cigarro)	5 a 10	1	51.76	70%
Andrea Sánchez (AS)	44	F	4 meses	S/T	ND	4	55.92	
Pedro López Hernández (PLH)	40	M	ND	S/T	1 a 5	1	57.06	70%
Rosa Rojas Gómez (RRG)	30	F	2 meses	Jabón con cal	5 a 10	2	57.5	
Raúl Roque Cruz (RRC)	ND	M	ND	polvo para mosca	ND	1	58.21	70%
Herquinio Izquierdo (HI)	22	M	5 meses	Pomada	91	1	59.97	
Humberto H. (HH)	ND	M	ND	ND	ND	ND	61.82	70%
Luis Felipe Hernández (LFH)	11	M	3 meses	Isodine	5 a 10	1	69.88	

El grupo de pacientes con LCD había recibido glucantime en distintos periodos, esto ocurrió varios meses antes del estudio. El análisis de células apoptóticas de pacientes con LCD reveló que 4 de los 5 pacientes presentaron valores menores al 36% (siendo el promedio 19.73%) y únicamente un paciente (FA) presentó un valor de 47.36% de células apoptóticas. No se encontró una correlación entre los parámetros analizados y el número de células apoptóticas (ver Tabla 2).

Tabla 2. **Análisis del grupo de pacientes con LCD.** La abreviatura que se muestra se utilizará de aquí en adelante para identificar a los pacientes. Otras abreviaturas utilizadas: ND= No disponible, S/T= Sin tratamiento.

Paciente (Abreviatura)	Edad	Sexo	Tiempo de evolución	Tratamiento	Cantidad parásitos	células TUNEL+ (%)	
Maribel Córdoba (MC)	18	F	16 años	S/T	Incontables	5.78	10%
Alberto Morales (AM)	46	M	20 años	Glucantime	Incontables	16.08	20%
Amado González (AG)	44	M	20 años	Glucantime	Incontables	21.56	30%
Fermín Domínguez (FD)	55	M	30 años	Glucantime	Incontables	35.48	50%
Faustino Ambriz (FA)	56	M	30 años	Glucantime	Incontables	47.36	
Claudia de la Cruz	ND	F	ND	ND		36.53	40%

El tercer grupo de análisis lo conformaron 3 pacientes con LCD, quienes recibieron tratamiento leishmanicida durante varios meses. A dos de los pacientes (AM y AG) de este grupo se les tomaron biopsias cutáneas antes, durante y después del tratamiento. En total se analizó un periodo de 4 meses. Al tercer paciente (FA) se le tomaron varias biopsias cutáneas a lo largo de 7 meses. En los pacientes AM y AG se analizó el número de parásitos y el número de células apoptóticas en las lesiones: antes, durante y después del tratamiento. Los pacientes AM y AG recibieron un tratamiento leishmanicida consistente en pentamidina, allopurinol e interferón gama recombinante humano durante 2 meses.

Se encontró que hubo una modificación del número de parásitos y de células apoptóticas durante el periodo de tratamiento. En el paciente AG, el tratamiento llevó a una disminución en el número de parásitos de 1200 al inicio del tratamiento a 100 después de 4 meses (número total de parásitos observados). Durante este mismo periodo se incrementaron las células apoptóticas de 41.65% al inicio hasta 49.31% al final de los 4 meses. En el caso del paciente AM, no fue posible obtener el porcentaje de células TUNEL+ al inicio de tratamiento debido a que no se disponía de la biopsia correspondiente, sin embargo se observó una disminución en el número de parásitos de 800 a 0 parásitos durante los 4 meses. Durante este mismo periodo se observó que el porcentaje de células apoptóticas aumentaron de 46.65% al inicio hasta 56.65% al final del cuarto mes. En ambos pacientes se observó que al disminuir el número de parásitos, hubo una tendencia de aumento en el número de células en apoptosis en las lesiones (ver Figuras 14 y 15). Sin embargo, al finalizar el tratamiento ambos pacientes recayeron y el número de parásitos se incrementó nuevamente hasta alcanzar niveles cercanos a los registrados al inicio del tratamiento.

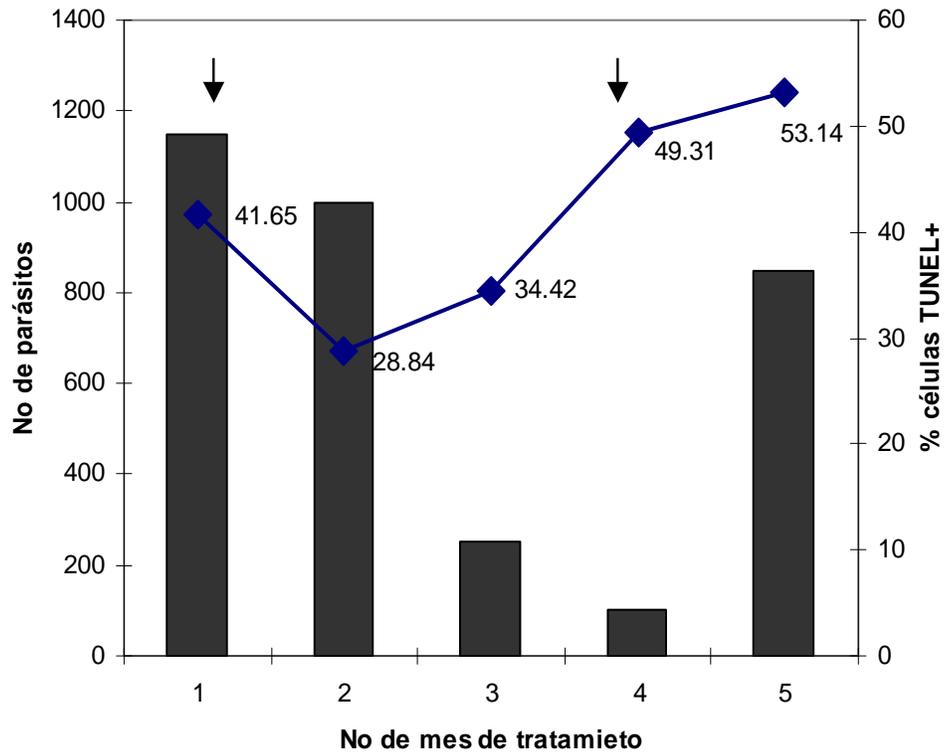


Figura 14. Comparación de los porcentajes de células apoptóticas (línea y viñetas) respecto al No de parásitos observados en un corte de una lesión cutánea (barras) del paciente AG durante y después del tratamiento. Las flechas indican el inicio y término del tratamiento.

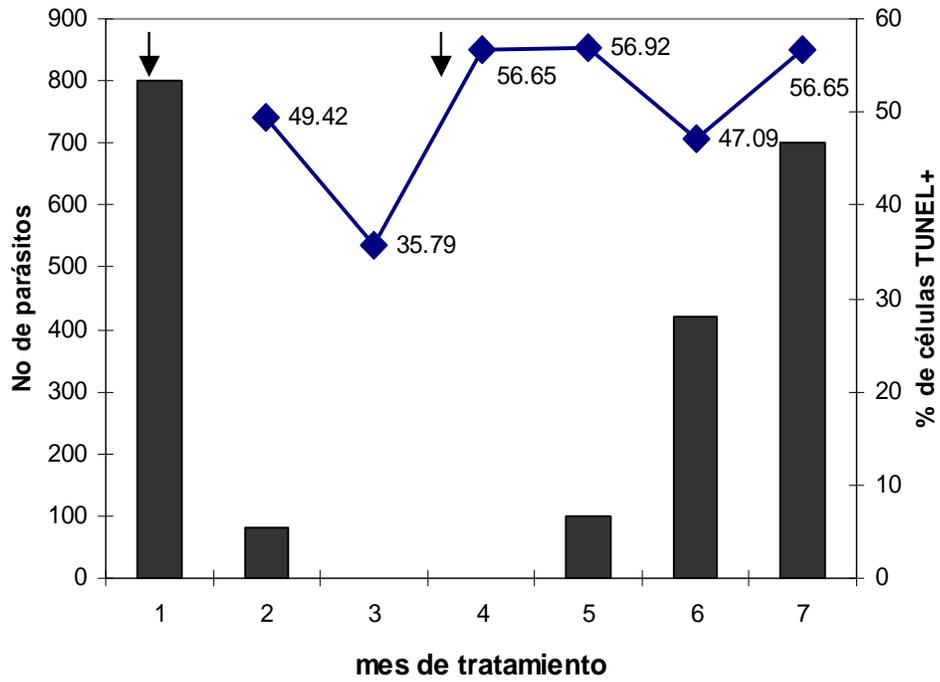


Figura 15. Comparación de los porcentajes de células apoptóticas (línea y viñetas) respecto al No de parásitos observados un corte de una lesión cutánea del paciente AM (barras) durante y después del tratamiento. Las flechas indican el inicio y término del tratamiento.

El tercer paciente con LCD (FA) recibió tratamiento con glucantime durante distintos periodos en un transcurso de 7 meses. Las biopsias cutáneas tomadas a distintos intervalos de tiempo mostraron una disminución en el número de parásitos en la lesión. Sin embargo se encontró un aumento en el número de células apoptóticas de 30% al inicio del periodo de tratamiento y cerca del 60% al final. Cabe mencionar que a diferencia de los primeros dos pacientes con LCD, este paciente no se estudió en el momento del tratamiento, si no en intervalos no relacionados con el tratamiento observándose también una disminución en el número de parásitos lo cual correlaciona con el incremento en la apoptosis observada (ver Figura 16).

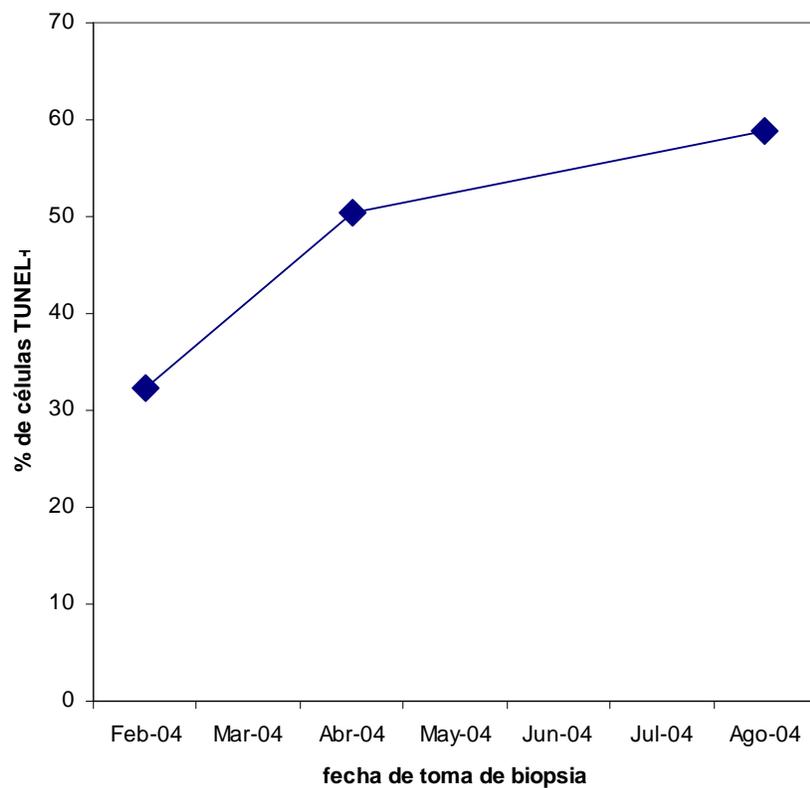


Figura 16. Porcentaje de células en apoptosis en observados en cortes de lesiones cutáneas del paciente FA. Las biopsias fueron tomadas en tres fechas postratamiento.

## DISCUSIÓN

La apoptosis actúa como mecanismo importante en procesos fisiológicos tales como el mantenimiento de la homeostasis, la limitación en el número de linfocitos después de que se resuelve una infección, la eliminación de células inflamatorias cuando se finaliza un cuadro infeccioso, así como la remodelación de tejidos. Aunque se ha estudiado la apoptosis en padecimientos de diferente naturaleza, poco se sabe sobre la participación de apoptosis en enfermedades parasitarias.

En el presente estudio analizamos la presencia de apoptosis de las células de las lesiones cutáneas de pacientes con LCL y LCD. Encontramos que pacientes con LCL, la forma más benigna de la enfermedad, presentan un importante número de células apoptóticas en las lesiones. En contraste, los pacientes con LCD presentaron un número significativamente menor, a pesar de que la infección en estos pacientes es mucho más severa con la presencia de macrófagos intensamente parasitados en las lesiones. Los datos obtenidos en el presente estudio aparentemente apuntan hacia una incongruencia entre el número de células apoptóticas en las lesiones y la severidad del padecimiento.

Dado que la LCL cursa con una evolución “benigna”, asociada a una respuesta inmune celular tipo Th1, el presente hallazgo sugiere que la apoptosis posiblemente contribuye a la inducción o desarrollo de una buena respuesta inmune celular. Uno de los posibles efectos benéficos atribuibles a la apoptosis en la resolución de la leishmaniasis pudiera deberse a, que esta induce una redistribución de parásitos de una célula muy infectada hacia múltiples cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados por otras células con mecanismos leishmanicidas más eficaces. Se han descrito múltiples receptores que fagocitan células apoptóticas. Entre estos se encuentran los receptores “scavenger” tipo A, CD36 y receptores para fosfatidilserina.<sup>43</sup>

De esta manera, la apoptosis pudiera contribuir a la eliminación eficaz de un parásito intracelular, como es *Leishmania*. Algunas de estas células fagocíticas podrían ser células dendríticas, las cuales podrían ser activadas directamente si alguno de estos cuerpos apoptóticos presentara CD40L, y una vez activadas, estas podrían activar células T CD8+ mediante CD40, siguiendo el

modelo de traspresentación. La traspresentación es un fenómeno mediante el cual la presentación de antígenos se produce gracias a la traslocación de la proteína antigénica desde el fagosoma recién fusionado con el retículo endoplásmico, al citosol del fagocito con la participación de la proteína chaperona Sec61.<sup>31, 38, 40, 61</sup> Es mediante la traspresentación que se cree que el macrófago puede presentar los antígenos externos de *Leishmania sp* a linfocitos CD8+ mediante MHC clase I. Se ha identificado en la infección por *M. tuberculosis*, que las células dendríticas son capaces de fagocitar cuerpos apoptóticos de macrófagos infectados y posteriormente presentar antígenos de la bacteria vía MHC clase I y CD1b.<sup>66</sup> Dado que existen varios puntos de similitud entre estas dos enfermedades, es muy posible que este fenómeno también se presente en infecciones por *Leishmania*.

Es posible que la apoptosis diversifique la respuesta inmune contra *Leishmania* mediante la generación de nuevos epítopes. Las células dendríticas que fagocitan cuerpos apoptóticos que contienen *Leishmania*, los digieren en los fagolisosomas y generan nuevos epítopes para ser presentados a los distintos subtipos de linfocitos. Esto incrementa el repertorio de linfocitos que reconocen a *Leishmania* y que por lo tanto participan en el control de la enfermedad. De esta manera la respuesta inmune se vuelve más eficaz para el reconocimiento y eliminación del parásito.

Trabajos previos relacionados con el papel de la apoptosis en la leishmaniasis se han enfocado a diferentes aspectos de la enfermedad. Algunos de ellos se han dedicado exclusivamente a determinar si este proceso de muerte es modificado por el parásito, buscando las moléculas involucradas.<sup>14, 24</sup> Otros grupos se han enfocado a los efectos que ejerce el parásito sobre alguna población celular, particularmente macrófagos, o bien en la relación de niveles de distintas citocinas y/o moléculas pro- y anti-apoptóticas.<sup>2, 9, 47</sup> Hasta la fecha no existen reportes enfocados a estudiar el porcentaje de células en apoptosis en lesiones de pacientes con LCL y LCD. Conocer este dato nos está aportando información novedosa sobre la contribución de la apoptosis como posible mecanismo inmune que participa en la evolución del padecimiento. La correlación entre el número de células en apoptosis y la severidad de la manifestación clínica posiblemente indique que la apoptosis es un proceso que está actuando a favor de la resolución de la enfermedad. Los resultados

obtenidos en el análisis muestran que el porcentaje promedio de células apoptóticas en las lesiones de pacientes con LCL es significativamente mayor que el observado en las lesiones de pacientes con LCD, ambos infectados por *L. mexicana*. De primera instancia este resultado indica que la apoptosis no solo es un proceso que participa en la inmunopatogénesis de las formas cutáneas de la leishmaniasis, si no que puede ser parte importante en la resolución de la enfermedad.

Sin embargo, aun se desconoce la causa por la cual la apoptosis se encuentra disminuida en pacientes con LCD. Se ha descrito que algunas especies de *Leishmania* pueden interferir en el proceso apoptótico de células de la respuesta inmune. Aunque no existen reportes que señalen que *L. mexicana* interfiere en el proceso apoptótico, es probable que pueda ejercer un efecto similar al reportado para *L. major* y *L. donovani*. La disminución de la apoptosis en pacientes con LCD posiblemente sea indicativo de la modulación de la apoptosis por el parásito.

Un posible mecanismo mediante el cual *Leishmania* module la apoptosis en pacientes con LCD, pudiera estar asociado a la inhibición que ejerce el parásito sobre linfocitos CD8+ en estos pacientes. Resultados previos del laboratorio demostraron que *L. mexicana* inhibe funcionalmente a los linfocitos CD8+ en su actividad citotóxica y en su capacidad para producir IFN- $\gamma$  en los pacientes con LCD.<sup>63</sup> Pinheiro y col. (1999) observaron que células T expuestas al antígeno crudo de *L. amazonensis* presentaron anergia y deficiencia en su capacidad para presentar antígenos. Se puede especular que la inhibición de la actividad citotóxica de los CD8+ se traduce en la inhibición de las vías de inducción de apoptosis a través de los receptores de la familia TNF y sus ligandos (FAS/FASL) así como la vía de Perforina/Granzima. Lo anterior podría estar relacionado al bajo porcentaje de célula apoptóticas observadas en las lesiones de los pacientes con LCD.

En resumen, la inhibición de la apoptosis en la forma severa de la leishmaniasis cutánea nos habla de que el desarrollo normal del proceso de muerte celular programada en las células involucradas en la respuesta inmune contra la infección por *L. mexicana* favorece la resolución de la infección. Los resultados de Desbarats y cols. en el 2003, apoyan esta observación ya que demuestran que ratones resistentes a la leishmaniasis que tienen una buena

respuesta Th1 se hacen susceptibles cuando el mecanismo de muerte celular es bloqueado, pese a que exista una fuerte respuesta Th1. Este grupo propone que la apoptosis puede ser un factor más importante que el patrón de citocinas, en la resistencia a la enfermedad.

Los resultados obtenidos en el análisis del efecto del tratamiento sobre el porcentaje de células apoptóticas en las lesiones de los pacientes con LCD también confirma la relación entre el proceso apoptótico y la mejoría clínica del paciente. Se observó que en forma general, el tratamiento disminuye el número de parásitos presentes en las lesiones y adicionalmente eleva el porcentaje de células en apoptosis, lo que se tradujo en una mejoría evidente en los pacientes. Aparentemente el tratamiento indujo un ligero viraje en las características de la lesión de pacientes con LCD hacia características de pacientes con LCL. Esto podría correlacionarse con los resultados de Da-Cruz y cols. (2002) que indican que el tratamiento incrementa la población de CD8+ citotóxicos.

Bertho y colaboradores (2000) reportaron que las lesiones de pacientes infectados con *L. braziliensis* presentan linfocitos CD8+ en apoptosis y lo asocian a un papel regulatorio, pues se impide una sobreactivación de la respuesta inmune.

La participación de la apoptosis en la inmunopatogénesis de la leishmaniasis es amplia y posiblemente una parte de la apoptosis en las lesiones corresponde a un proceso regulatorio "normal" de las poblaciones celulares en general y otro porcentaje está directamente relacionado con el proceso infeccioso y con la respuesta inmune.

Una observación preliminar hecha en nuestro estudio mostró que todos los macrófagos en las lesiones de un paciente con LCL se encontraban en apoptosis, sin embargo, no se determinó si estos macrófagos estaban infectados. Adicionalmente se observó un número importante de células en apoptosis que no correspondían a macrófagos. Probablemente el resto de estas células apoptóticas son linfocitos y otras células de la respuesta inmune que ya habían cumplido su tarea y están siendo eliminadas como parte de la regulación de la respuesta inmune.

Es importante destacar que se desconoce el destino de las leishmanias en una célula apoptótica. Cuando el macrófago entra en apoptosis deja de ser una

célula viable para la multiplicación del parásito, sin embargo se desconoce si *Leishmania* también sucumbe durante el proceso apoptótico o si los parásitos son fagocitados dentro de los cuerpos apoptóticos, los cuales pueden ser fagocitados por otras células.

Otro dato encontrado en el presente estudio es que las células apoptóticas se encuentran tanto en epidermis como en la dermis. Sin embargo, la cuantificación de las células apoptóticas únicamente se realizó en la dermis de pacientes con LCL y LCD, para evitar errores debidos a factores externos que pudieran modificar las células apoptóticas de la epidermis.

Aún no podemos conocer completamente cual es papel general del proceso apoptótico en la respuesta inmune contra la infección por *L. mexicana*. Para poder llegar a entender plenamente por qué la apoptosis es importante en la resolución de la enfermedad, es necesario insistir en la caracterización de la subpoblación de células en apoptosis en las lesiones de los pacientes de ambas forma clínicas; posteriormente, se deben analizar los cambios en este conjunto celular durante las diferentes etapas de la infección y tratamiento.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el porcentaje de células en apoptosis en lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) es significativamente mayor que el de lesiones de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

No existen indicios que señalen que los tratamientos caseros influyeran en el resultado obtenido para los pacientes con LCL, por lo que se puede correlacionar con el alto porcentaje de células apoptóticas con la forma curable de la leishmaniasis cutánea y un bajo porcentaje de células apoptóticas con la forma severa de la enfermedad. Sin embargo, no existen otros aspectos como el tiempo de evolución de la enfermedad, edad o sexo del paciente que pueda correlacionarse con el resultado obtenido en el grupo de pacientes con LCD.

Se observó que el tratamiento produjo un aumento en el porcentaje de células apoptóticas en los tejidos de los tres pacientes con LCD analizados. Dicho aumento se relaciona con la disminución del número de parásitos en las lesiones y con la mejoría clínica de dos de los pacientes (datos previos del laboratorio).

Se propone que el desarrollo adecuado de la muerte celular programada como parte de la respuesta inmune contra la infección por *L. mexicana* facilita la eliminación de los parásitos al permitir que la excesiva carga parasitaria de un macrófago en anergia sea dividida entre otras células fagocíticas. El procesamiento de los cuerpos apoptóticos por estos fagocitos genera nuevos epítopes, incrementando de esta manera el número de linfocitos que reconocen a la *Leishmania sp.* y que participarían en el control de la enfermedad.

## **APENDICE 1**

Tabla 3. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas de pacientes con LCD teñidos con la técnica de TUNEL (C de C es una paciente considerada predifusa)

Paciente		C de C		FA		AM		MC		AG		FD	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
# Campo	1	32	61	17	46	5	54	3	43	29	85	9	46
	2	52	83	54	32	8	36	1	62	10	95	11	19
	3	42	81	22	44	6	54	4	52	19	60	19	44
	4	44	28	61	25	6	44	8	59	17	71	25	35
	5	58	89	35	30	11	53	6	69	26	70	22	49
	6	65	121	10	22	6	39	2	114	15	78	20	19
	7	43	88	31	31	9	41	0	95	17	110	25	56
	8	37	33	25	29	5	63	0	67	33	103	18	16
	9	69	169	47	44	14	38	0	127	23	104	31	38
	10	42	57	4	39	17	56	8	132	37	96	38	33
	11	43	58	35	38	5	54	4	46	21	42	15	43
	12	49	86	102	42	20	60	15	64	35	89	14	23
	13	50	101	16	35	17	46	8	79	39	109	30	74
	14	39	83	5	37	16	112	14	96	16	74	9	38
	15	29	68	12	35	14	80	1	101	11	80	23	29
<b>TOTALES</b>		<b>694</b>	<b>1206</b>	<b>476</b>	<b>529</b>	<b>159</b>	<b>830</b>	<b>74</b>	<b>1206</b>	<b>348</b>	<b>1266</b>	<b>309</b>	<b>562</b>
<b>SUMA</b>			<b>1900</b>		<b>1005</b>		<b>989</b>		<b>1280</b>		<b>1614</b>		<b>871</b>

Porcentaje de células +TUNEL por paciente					
C de C	FA	AM	MC	AG	FD
36.52631579	47.36318408	16.0768453	5.78125	21.56133829	35.47646383

Tabla 4. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas de pacientes con LCL teñidos con la técnica de TUNEL

Paciente		HI		AS		RB		LF		CC		HH	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
# Campo	1	52	44	29	64	27	42	36	11	42	90	23	3
	2	68	63	50	51	24	28	30	11	45	86	20	21
	3	90	119	31	27	41	19	38	18	34	78	35	46
	4	60	42	36	26	25	10	32	24	38	65	25	24
	5	65	14	28	12	34	9	40	17	37	69	20	10
	6	62	16	26	17	24	21	31	14	30	40	37	57
	7	52	26	34	26	30	24	26	27	14	28	25	9
	8	57	31	37	25	43	27	45	15	26	39	30	11
	9	59	9	33	24	47	48	37	14	38	40	16	3
	10	50	19	44	50	41	26	31	9	14	21	21	3
	11	63	22	34	18	25	40	31	2	12	27	22	8
	12	55	60	32	7	43	46	24	10	59	113	26	9
	13	56	18	43	28	31	29	53	27	42	119	31	2
	14	86	39	46	30	36	56	48	8	40	75	27	19
	15	72	110	21	8	47	69	34	24	29	43	16	6
<b>TOTALES</b>		<b>947</b>	<b>632</b>	<b>524</b>	<b>413</b>	<b>518</b>	<b>494</b>	<b>536</b>	<b>231</b>	<b>500</b>	<b>933</b>	<b>374</b>	<b>231</b>
<b>SUMA</b>			<b>1579</b>		<b>937</b>		<b>1012</b>		<b>767</b>		<b>1433</b>		<b>605</b>

Porcentaje de células +TUNEL por paciente					
HI	AS	RB	LFH	CC	HH
59.97466751	55.92315902	51.18577075	69.88265971	34.89183531	61.81818182

Tabla 4. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas de pacientes con LCL teñidos con la técnica de TUNEL (continua)

Paciente		BG		RRC		JG		PLH		RRG		NL	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
# Campo	1	15	18	48	79	12	20	8	17	29	18	24	25
	2	27	25	22	29	15	18	24	6	22	26	13	10
	3	32	10	37	21	24	29	20	25	14	11	25	31
	4	28	5	70	17	23	26	26	4	31	34	20	17
	5	24	9	50	51	23	22	21	4	41	25	11	24
	6	29	24	55	9	29	51	31	18	31	17	23	11
	7	14	61	61	35	29	25	21	6	29	23	23	13
	8	22	58	39	14	26	32	22	3	34	25	18	35
	9	18	13	46	49	13	16	26	7	68	34	18	17
	10	32	31	28	13	16	13	32	35	34	16	38	28
	11	33	80	39	8	6	13	3	35	21	32	35	18
	12	12	43	11	9	6	9	28	10	13	15	14	9
	13	28	23	26	16	10	34	25	6	45	21	48	49
	14	14	54	31	40	11	19	5	18	36	36	10	19
	15	34	25	15	25	10	32	11	34	12	7	12	7
<b>TOTALES</b>		362	479	578	415	253	359	303	228	460	340	332	313
<b>SUMA</b>			<b>841</b>		<b>993</b>		<b>612</b>		<b>531</b>		<b>800</b>		<b>645</b>

Porcentaje de células +TUNEL por paciente					
BG	RRC	JG	PLH	RRG	NL
43.04399524	58.20745217	41.33986928	57.06214689	57.5	51.47286822

Tabla 4. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas de pacientes con LCL teñidos con la técnica de TUNEL (continua)

Paciente		#7		JDR		# 6		GA		SH	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
# Campo	1	7	19	18	23	4	34	14	53	1	65
	2	6	23	20	36	1	30	32	104	6	51
	3	9	13	45	25	4	25	17	106	7	39
	4	12	42	31	22	6	26	16	65	6	5
	5	6	13	18	9	2	28	19	69	18	44
	6	6	15	12	0	6	22	21	109	16	24
	7	8	18	14	0	5	13	6	41	5	23
	8	3	75	28	9	7	32	14	89	5	15
	9	12	37	16	15	11	22	9	36	8	95
	10	12	11	23	52	1	36	8	33	18	56
	11	18	19	22	34	2	3	13	88	10	25
	12	10	18	23	16	2	2	12	50	19	42
	13	6	37	9	2	2	9	16	71	15	40
	14	7	30	20	11	2	33	13	68	5	15
	15	15	15	25	48	3	5	5	100	10	25
<b>TOTALES</b>		137	385	324	302	58	320	215	1082	149	564
<b>SUMA</b>			<b>522</b>		<b>626</b>		<b>378</b>		<b>1297</b>		<b>713</b>

Porcentaje de células +TUNEL por paciente				
#7	JDR	# 6	GA	SH
26.24521073	51.7571885	15.34391534	16.5767155	20.89761571

Tabla 5. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas del paciente AM (paciente con LCD) tratado con medicamentos antileishmanicidas. Tejidos teñidos con la técnica de TUNEL

fecha		20-02-96		25-03-96		27-03-96		11-04-96		03-06-96		02-07-96		10-09-96	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<b># Campo</b>	1	35	37	49	71	32	45	33	14	18	9	31	44	55	37
	2	36	30	31	78	38	46	30	10	20	8	53	55	51	21
	3	19	20	33	70	33	48	39	25	2	18	50	64	35	14
	4	34	46	32	82	39	76	19	30	16	17	62	112	68	26
	5	43	45	47	59	32	52	28	39	7	8	33	22	53	50
	6	36	60	36	8	35	55	47	50	11	2	76	72	64	23
	7	32	27	42	85	28	48	35	14	10	2	24	49	50	21
	8	23	42	35	102	28	58	31	15	21	10	38	57	48	57
	9	48	46	30	83	35	50	22	17	12	14	71	81	25	45
	10	21	22	31	25	34	59	47	21	27	21	51	30	50	47
	11	28	19	26	17	28	26	28	33	0	0	64	42	50	86
	12	39	18	24	7	21	39	35	26	0	0	39	44	27	79
	13	30	32	54	92	37	77	25	32	0	0	42	45	34	33
	14	23	28	29	101	19	25	36	17	0	0	41	44	75	4
	15	24	10	31	71	28	61	22	22	0	0	61	66	56	24
<b>TOTALES</b>		471	482	530	951	467	765	477	365	144	109	736	827	741	567
<b>SUMA</b>		<b>953</b>		<b>1481</b>		<b>1232</b>		<b>842</b>		<b>253</b>		<b>1563</b>		<b>1308</b>	

Porcentaje de células +TUNEL por fecha						
20-02-96	27-03-96	25-03-96	11-04-96	03-06-96	02-07-96	10-09-96
49.42288	35.78663	37.90584	56.65	56.917	47.0889315	56.6514

Tabla 6. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas del paciente AG (paciente con LCD) tratado con medicamentos antileishmanicidas. Tejidos teñidos con la técnica de TUNEL

fecha		27-03-96		11-04-96		26-04-96		14-05-96		10-09-96		29-01-97	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
# Campo	1	14	19	29	100	49	110	51	31	73	22	9	13
	2	35	8	76	114	40	76	27	73	82	59	36	35
	3	10	29	55	79	42	64	37	77	87	34	24	16
	4	17	21	48	92	41	97	53	59	75	21	32	20
	5	11	44	70	119	52	67	23	30	49	30	16	13
	6	22	58	34	151	44	71	48	29	45	26	11	12
	7	21	6	47	137	40	91	57	70	32	33	26	31
	8	19	28	35	137	31	79	38	72	16	33	16	32
	9	13	37	36	108	28	71	34	30	56	59	22	30
	10	20	26	23	102	46	61	60	29	55	55	22	30
	11	22	46	54	92	0	0	62	29	25	59	66	49
	12	24	39	26	120	0	0	63	52	16	47	25	50
	13	16	9	38	113	0	0	51	29	73	77	30	20
	14	16	26	64	79	0	0	31	59	31	41	34	49
	15	27	6	38	118	0	0	39	24	21	53	50	29
<b>TOTALES</b>		287	402	673	1661	413	787	674	693	736	649	419	429
<b>SUMA</b>			689		2334		1200		1367		1385		848

Porcentaje de células +TUNEL por fecha					
27-03-96	11-04-96	26-04-96	14-05-96	10-09-96	29-01-97
41.65457184	28.83461868	34.41666667	49.30504755	53.14079422	49.41

Tabla 7. Resultados de los conteos en los cortes de lesiones cutáneas del paciente FA (paciente con LCD) tratado con medicamentos antileishmanicidas. Tejidos teñidos con la técnica de TUNEL

fecha		16-02-04		16-04-04		26-08-04	
Tinción TUNEL		+	-	+	-	+	-
<b># Campo</b>	1	21	34	14	22	19	18
	2	27	50	19	12	13	25
	3	22	34	21	5	19	29
	4	11	37	21	15	22	15
	5	19	51	28	14	19	7
	6	18	33	26	19	19	24
	7	21	36	25	20	21	26
	8	18	38	11	57	13	10
	9	28	24	16	19	22	6
	10	16	53	12	16	14	5
	11	24	69	24	6	21	10
	12	23	48	15	7	20	2
	13	17	47	20	29	19	6
	14	16	19	24	22	19	4
	15	13	41	18	26	20	9
<b>TOTALES</b>		294	614	294	289	280	196
<b>SUMA</b>			<b>908</b>		<b>583</b>		<b>476</b>

Porcentaje de células +TUNEL por fecha		
16-02-04	16-04-04	26-08-04
32.37885463	50.42881647	58.82352941



## Referencias

1. Abbas, A. & A.H. Lichtman. 2005. *Cellular and Molecular Immunology* (updated edition). 5ta ed. ELSEVIER Saunders. 243-344
2. Aga, E., D. M. Katschinski, G. van Zanbergen, H. Laufs, B. Hansen, K. Müller, W. Solbach & T. Laskay. 2002. Inhibition of the Spontaneous Apoptosis of Neutrophil Granulocytes by the Intracellular Parasite *Leishmania major*. *J. Immunol.* 169: 898-905
3. Almeida de, M.C., V. Vilhena, A. Barral & M. Barral-Netto. 2003. Leishmanial infection: Analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98(7): 861-870
4. Andrade-Narvaez, F. J., Canto-Lara, S.B.; van Wynsberghe, N.R. et al. 2003. Seasonal transmission of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the state of Campeche, -yucatan peninsula, Mexico. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98: 995-998
5. Andrade-Narvaez, F. J., S. Medina-Peralta, A. Vargas-González, S. Canto-Lara & S. Estrada-Parra. 2005. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Rev. Inst. Med Trop. S. Paulo*, 47(4): 191-194
6. Atkinson, E., M. Barry, A.J. Darmon, I. Shostak, P.C. Turner, R.W. Moyer & R.C. Bleackley. 1998. Cytotoxic T Lymphocyte-assisted Suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J. Biol. Chem.* 273(33):21261-21266
7. Awasthi, A, R. Kumar Mathur & B. Saha. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian. J. Med. Res.* 119: 238-258
8. Becker, I., P. Volkow, O. Velasco-Castrejon, N. Salaiza-Suazo, M. Berzunza-Cruz, J. Sotero-Delgado, A. Morales-Vargas, A. Ruiz-Remigio & R. Pérez-Montfort. 1999. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Res.*, 85: 165-170
9. Bertho, A. L., A. M. Da-Cruz & S. G. Coutinho. 2000. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesion of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 317-325
10. Bogdan, C. & M. Rölinghoff. 1997. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasit.* 28(1998): 121-134
11. Brandonisio, O., R. Spinelli & M. Pepe. 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes Infect.* 6: 1402-1409
12. Brusca, R. & G. Brusca. 2003. *Invertebrates*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, E. U. A., 2da ed., 133
13. Caballero-Benítez, A. & J. Morán-Andrade. 2002. Mecanismos Moleculares de la Regulación de la Muerte Apoptótica. *Rev. Edu. Bioquim.* 21(4): 235-244
14. Carsten, G.K., U. Gross & M.L. Lopes. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interaction. *Trends Parasitol.* 17(10):480-486
15. Chamond, R.R., J.C. Añón, C.M. Aguilar & F.G. Pasadas. 1999. Apoptosis y enfermedad. *Alergol. Immunol. Clin.* 14(5): 367-374
16. Clive R. D., P. Kaye, S. L. Croft & S. Sundar. 2003. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BJM*, 326: 377-382

17. Costa, D. J., C. Favali, J. Clarencio, L. Afonso, V. Conceicao, J. C. Miranda, R. G. Titus, J. Valenzuela, M. Barral-Netto, A. Barral & C. I. Brodskyn. 2004. *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Homogenate Impairs Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression on Human Monocytes and Dendritic Cells. *Infect. Immun.*, Marzo 1, 2004; 72(3): 1298 - 1305
18. Cox, F. & F.Y. Liew. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today*. 13: 445-448
19. Da-Cruz, A.M., R. Bittar, M. Mattos, M. Oliveira-Neto, R. Nogueira, V. Pinho-Roberto, R.B. Azeredo-Coutinho & S.G. Coutinho. 2002. T-Cell-Mediated Immune Response in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(2):251-256.
20. Debrabant, A., N. Lee, S. Bertholet, R. Duncan y H. L. Nakhasi. 2003. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int. J. Parasit.* 33: 257-267
21. Desbarats, J., J.E. Stone, L. Lin, Z.F. Zakeri, G.S. Davis, L.M. Pfeiffer, R.G. Titus & M.K. Newell. 2004. Rapid early onset lymphocyte cell death in mice resistant, but not susceptible to *Leishmania major* infection. *Apoptosis* 5(2): 189-196.
22. Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 95: 239-245
23. Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis. *Nature*, 2: 692-693
24. Eidsmo, L., S. Nylén, A. Khamesipour, M. A. Hedblad, F. Chiodi & H. Akuffo. 2005. The Contribution of the Fas/FasL Apoptotic Pathway in Ulcer Formation during *Leishmania major*- Induced Cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* 166(4): 1099-1108
25. Fan, T. J., L. Han, R. Cong & J. Liang. 2005. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 37(11): 719-727
26. Gaafar, A., B. Veress, H. Permin, A. Kharazmi, T.G. Theander & A.M. Hassand. 2002. Caracterización of the Local and Systemic Immune in Patients with Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania major*. *Clin. Immunol.* 91: 314-320.
27. Garcia, L. S. 2001. Leishmaniasis. En: *Diagnostic Medical Parasitology*. American Society for Microbiology Press, 4ta ed., Washington D.C., cap. 8, 205-233 p.
28. Gavrieli, Y., Y. Sherman & S.A. Ben-Sasson. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119(3): 493-501
29. Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne & J. Kuby. 2003. *Immunology*. W. H. Freeman and Company, 5 ed., New York, 551 p.
30. Goulart, B.I.M., G. Oliveira-Penna & G. Cunha. 2002. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35(4): 365-375
31. Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert & S. Amigorena. 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cell. *Nat.* 425:397-402
32. Häcker, G. 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 301(1): 5-17

33. Harty, J., A. Tvinnereim & D. White. 2000. CD8+ T cell effectors mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* 18:275-308
34. Hepburn, N. C. 2000. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Dermatol.* 25: 363-370
35. Hernández, J., S. Aung, K. Marquardt & L. Sherman. 2002. Uncoupling of proliferative potencial and gain of effector function by CD8+ T cell responding to self-antigens. *J. Exp. Med.* 196: 323-332
36. Hernández, M. O., I. Neves J. R., J. S. Sales, D. S. Carvalho, E. N. Sarno & E. P. Sampaio. 2003. Induction of Apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Immunology*, 109: 156-164
37. Hernandez-Ruiz J. & I. Becker. 2006. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Publica Mex.* 2006 Sep-Oct;48(5):430-9.
38. Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante et al. 2003. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nat.* 425: 402-406
39. Jarpa-Orrego, S. 1999. Apoptosis (muerte celular programada). *Boletín de la Academia Chilena de Medicina*, No. 36 ([www.uchile.cl/instituto/medicina/boletin/boletin36/conf4.html](http://www.uchile.cl/instituto/medicina/boletin/boletin36/conf4.html))
40. Kovacsovics-Bankowski, M. & K. Rock. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science.* 267: 243-246
41. Lieberman, J. 2003. The ABCS of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Review Immunology*, 3: 361-370
42. Lindoso, J.A.L., P.C. Cotrim & H. Goto. 2004. Apoptosis of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int. J. Parasit.* 34: 1-4
43. Lynda M. Stuart, RR. & Alan B. Ezekowitz. 2005. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity* 22:539-550
44. Markle, W. H. & K. Makhoul. 2004. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am. Fam. Physician*, 69(6):1455-1460
45. Martin, S.J., A.G. O'Brien, W.K. Nishioka, A.J. McGahon, A. Mahboubi, T.C. Saïdo & D.R. Green. 1995. Proteolysis of Fodrin (Non-erythroid Spectrin) during Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 270(12): 6425-6428
46. Medzhitov, R. & A. Janeway. 1997. Innate Immunity: impact on the adaptative immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 4-9
47. Moore, J. & G. Matlashewski. 1994. Intracellular Infection by *Leishmania donovani* Inhibits Macrophage Apoptosis. *Journal of Immunology*, 152: 2930
48. Murray, P.R., K. Rosenthal & M.A., Pfaller. 2005. *Medical Microbiology*. ELSEVIER MOSBY Staed, E.U.A., 870-876
49. Murray, W.H. & F.C., Nathan, 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive versus oxigen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* (189) 4: 741-746
50. Mustafa, T., G. Bjune, R. Jonsson, R. Hernnández Pando & R. Nilsen. 2001. Increased expression of Fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in *Mycobacterial* infection. *Acand. J. Immunol.* 54: 630-639

51. Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88:355-365
52. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui & H. Okamura. 2001. Interleukin-18 Regulates Both Th1 and Th2 Responses. *Ann. Rev. Immunol.* 19: 423-474
53. Nakanishi, K. 2002. Regulation of Th1 and Th2 immune response by IL-18 (artículo en japonés) *Kekkaku.* 77(2): 87-93
54. Norsworthy, N. B., J. Sun, D. Elnaiem, G. Lanzaro & L. Soong. 2004. Sand Fly Saliva Enhances *Leishmania amazonensis* Infection by Modulating Interleukin-10 Production. *Infect. Immun.* 72(3): 1240-1247
55. Organización Mundial de la Salud. 2002. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire.1 Noviembre 2002 Año 77 No. 44 365-372 (<http://www.who.int/wer>)
56. Organización Mundial de la Salud. 2004. Life cycle of *Leishmania*. [www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leish/lifecycle.htm)
57. Pinheiro, R. O., E. F. Pinto, A. B. Benedito, U. G. Lopes & B. Rossi-Bergmann. 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. *An. Acad. Bras. Ciên.* 76(3): 519-527
58. Propato, A., G. Cutrona & V. Francavilla. 2001. Apoptotic cells overexpress vinculin and induce vinculin-specific cytotoxic T-cell cross-priming. *Nat. Med.* 7: 807-813
59. Reed, J. 2000. Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture, Mechanisms of Apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157(5): 1415-1430
60. Ritter, U., A. Meibner, C. Scheidig & H. Körner. 2004. CD8- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis, *Eur. J. Immunol.*, 34: 1542-1550
61. Rodriguez, A., A. Regnault, M. Kleijmeer, P. Ricciardi-Castagnoli & S. Amigorena. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cell. *Nat. Cell. Biol.* 1:362-368
62. Salaiza, N. L. & I. Becker Fauser. 2001. Papel del los linfocitos T citotóxicos CD8+ en infecciones por protozoarios intracelulares. *Boletín de Educación Bioquímica*, 20(4): 264-268
63. Salaiza, S. N. 2001. Análisis del Perfil Celular y Análisis Cualitativo y Cuantitativo de Linfocitos T Citotóxicos CD8+ en Pacientes con Leishmaniasis Cutáneas Localizada y Difusa y su Correlación con el Tratamiento. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM. México. 82pp.
64. Sánchez-Torres, L. E. & F. Diosdado-Vargas. 2003. Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Téc. Pecu. Méx.*, 41(1): 49-62
65. Savill, J. 1995. The innate immune system: recognition of apoptotic cells. En: Christopher D. Gregory (Ed.) *Apoptosis and the Immune Response*. Wiley Liss. Inc., New York, cap. 11, 341-369
66. Schaible U, F. Winau, P. Sieling, K. Fischer, H. Collins, K. Hagens, R. Modlin, V. Brinkmann & S. Kauffmann. 2003. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-1 and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 9: 1039-1046.

67. Scharton, K.T. & P., Scout, 1995. The role of the innate immune response in Th1 development following *Leishmania major* infection. *J. Leuk. Biol.* 57: 515-522
68. Scott, P. & G., Trinchier. 1995. The role of natural killer cells in host parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 34-40
69. Seidelin, H. 1912. Leishmaniasis and babesiasis in Yucatan. *Ann. Trop. Med. Parasit.*,6: 295-299
70. Trapani, J. & M. Smyth. 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2:735-747
71. Waitumbi, J. & A. Warburg. 1998. *Phlebotomus papatasi* Saliva Inhibits Protein Phosphatase Activity and Nitric Oxide Production by Murine Macrophages. *Infection and Immunity*, 66(4): 1534-1537
72. Walton, B & C.O. Velasco. 1987. The distribution and etiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the new world. *Proc. NATO Advances Study Institute on Leishmaniasis Zakitnos, Grecia.*
73. Yoshimoto, T, K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira & K. Nakanishi. 1998. IL-12 Up-Regulates IL-18 Receptor Expression on T Cell, Th1 Cell, and B Cell: Synergism with IL-18 for IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 161:3400-3407
74. Zambrano-Villa, S., D. Rosale-Borjas, J.C. Carrero & L. Ortiz-Ortiz. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *Trens Parasitol.* 18(6): 272-278
75. Zangger, H., J.C. Mottram & N. Fasel. 2002. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation:programmed cell death or necrosis?.*Cell Death Differ.* 9: 1126-1139