

INMUNOLOGIA DE LA LEISHMANIASIS *¡Error! Marcador no definido.*
TEGUMENTARIA AMERICANA

MARIANELLA CASTES y FELIX J. TAPIA

Instituto de Biomedicina, Cátedra de Inmunología, Escuela J.M. Vargas, Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

Dirección para correspondencia:

**Dra. Marianella Castés
Instituto de Biomedicina
Apdo. 4043 (Carmelitas)
Caracas, Venezuela.**

RESUMEN

La complejidad de la inmunidad celular en una enfermedad parasitaria puede ser evaluada en diferentes compartimientos. En el presente trabajo se presentan los resultados en sangre periférica y lesión cutánea de las tres formas clínicas de la leishmaniasis tegumentaria. Estas formas clínicas, que conforman un espectro clínico, histológico e inmunológico son la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), cutánea difusa (LCD); y el área intermedia que comprende las lesiones mucosas y verrugosas (LCM).

El conjunto de resultados sugiere que el patrón de citoquinas determinado en sangre periférica y en las lesiones que presentan los pacientes con LCL, la forma resistente de la enfermedad es un patrón tipo Th1, lo cual conduce a la curación de las lesiones en estos pacientes, ya sea espontáneamente o luego de una terapia apropiada. Las formas diseminadas de los pacientes con LCD, resistentes a la quimioterapia, se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th2, con una ausencia total de producción de IL2 e INF- γ por parte de los linfocitos específicos para el antígeno. Este tipo de respuesta Th2 probablemente es la responsable de que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección, lo cual conduce a la diseminación del parásito por toda la superficie cutánea. En el área intermedia se encuentran los pacientes con LCM, con lesiones destructivas de las mucosas orales y nasofaríngeas, con tendencia a la cronicidad. Se caracterizan por un patrón de citoquinas mixto tipo Th1 y Th2 que coexisten simultáneamente. Esta situación puede ser la responsable de la no resolución de la enfermedad en estos pacientes, ya que cuando ambos tipos de citoquinas se producen es posible que las citoquinas tipo Th2 predominen sobre las tipo Th1.

El análisis en la lesión cutánea demostró que la epidermis en la LCD carece de las señales accesorias ICAM-1 y MHC-II por parte de los queratinocitos, y presenta un número variable de células de Langerhans. En LMC, la expresión de ICAM-1 y MHC-II está exacerbada, y las células de Langerhans están ausentes del epitelio lesionado. Por su parte, la epidermis de la LCL manifiesta las señales accesorias adecuadas, ICAM-1 en parches y MHC expresado universalmente por los queratinocitos. El granuloma de la LCD se caracterizó por relaciones CD4/CD8 y T memoria/T vírgen bajas, un escaso número de linfocitos $T\gamma\delta$, un aparente defecto en la expresión de receptores direccionales LFA-1, y patrones de citoquinas tipo Th1 y Th2, con predominio de patrón Th2. El granuloma de LMC manifestó las mayores relaciones CD4/CD8 y T memoria/T vírgen, bajo número de linfocitos $T\gamma\delta$, un alto cociente de adhesión celular, y patrones de citoquinas mixtos Th1 y Th2. Por su parte, el granuloma de LCL se caracterizó por una relación CD4/CD8 dentro de los intervalos normales, una relación alta de T memoria/T vírgen, numerosos cúmulos de linfocitos $T\gamma\delta$, una alta expresión de receptores direccionales, y respuestas de citoquinas tipos Th1 y Th0.

También se discuten resultados sobre la eficacia inmunológica tanto en inmunoterapia como en inmunopprofilaxis de la vacuna combinada de BCG más promastigotes de *Leishmania*. En su aplicación como inmunoterapia se demuestra que este tipo de vacuna combinada es capaz de estimular una respuesta tipo Th1 en pacientes con LCL sometidos a esta forma de tratamiento. Como inmunopprofilaxis es capaz de estimular en individuos sanos provenientes de una zona endémica, una respuesta de inmunidad mediada por células tipo Th1 (positividad en respuesta cutánea

de Montenegro, respuesta proliferativa *in vitro* y producción de interferón- γ), con una baja respuesta de anticuerpos. Lo cual demuestra que la vacuna combinada es potencialmente útil tanto para su utilización en el tratamiento de pacientes con LCL, como protectora para la mayoría de los vacunados cuando se aplica como inmunoprolifaxis para el control de la leishmaniasis.

1.- El Espectro clínico en la leishmaniasis tegumentaria americana.

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) se presenta en tres formas clínicas generales, que conforman un espectro clínico, histológico e inmunológico^{25,26}. El polo resistente representado por la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) se caracteriza por lesiones dérmicas ulceradas limitadas, simples y ocasionalmente múltiples, que después de un periodo variable de tiempo de meses o años regresan espontáneamente o con tratamiento³⁰. Los parásitos de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* son responsables de esta forma de la enfermedad. El análisis histológico de las lesiones muestra una estructura granulomatosa inmunitaria con una marcada infiltración de células linfoides y la presencia de pocos parásitos. La respuesta inmunológica mediada por células (IMC) evaluada tanto *in vivo* mediante la prueba cutánea de Montenegro o leishmanina, como *in vitro* mediante la técnica de transformación linfoblástica en respuesta a antígenos de *Leishmania*, es positiva en prácticamente todos los pacientes¹⁷.

El polo susceptible, o leishmaniasis cutánea difusa (LCD), se caracteriza por la presencia de nodulos no ulcerados, ricos en parásitos y a menudo diseminados por toda la superficie cutánea²⁵. En estos pacientes se observa una marcada tendencia a

recidivas después de una terapia adecuada. En todos los casos los parásitos del subgénero *Leishmania* han sido implicados como el agente causal⁴⁶. Histológicamente, los granulomas son diseminados con macrófagos vacuolizados repletos de amastigotes y pocos linfocitos. La IMC evaluada tanto *in vivo* como *in vitro* está ausente¹⁷.

El área intermedia del espectro comprende lesiones mucosas y verrugosas. Las lesiones de la leishmaniasis cutánea mucosa (LCM) usualmente se presentan al inicio como úlceras cutáneas localizadas que desaparecen, pero años después reaparecen en las membranas mucosas, orales, nasales, faringeadas o laringeadas, causando gran daño histológico, anatómico y ruptura funcional del tejido. Esta forma clínica presenta resistencia frente a los tratamientos convencionales y recidivas. Los parásitos del subgénero *Viannia* han sido identificados como el principal agente causal de la LCM⁴⁶. Las lesiones se caracterizan por un fuerte infiltrado de células mononucleares, con escaso número de parásitos. Las reacciones de IMC están aumentadas en estos pacientes^{16,17}.

2.- Inmunología de la leishmaniasis experimental, con especial énfasis en la dicotomía Th1 y Th2.

Los modelos murinos de leishmaniasis han jugado un importante papel en el desarrollo del conocimiento que se tiene sobre los mecanismos inmunológicos asociados con resistencia y/o susceptibilidad a la enfermedad. El patrón de enfermedad producido por la inoculación de parásitos *Leishmania* en cepas de ratones con diferentes orígenes genéticos, puede variar ampliamente, dependiendo de factores determinados

genéticamente tanto en el hospedador, como en el parásito. La infección de animales resistentes (CBA, CH3 o C57BL/6) con *L. major* o *L. mexicana* produce una lesión, no ulcerada, que cura espontáneamente en 20 a 30 semanas después del reto parasitario. Estos animales desarrollan respuestas de anticuerpos y de hipersensibilidad tardía (HT)^{37,67}. Los ratones susceptibles, BALB/c, infectados con las mismas cepas de *Leishmania* producen lesiones nodulares que no curan, y que evolucionan hacia la visceralización y producción de metástasis. Estos animales no desarrollan respuesta de HT, pero si producen anticuerpos^{1,2,67}. Existe consenso en que el modelo de leishmaniasis cutánea experimental producido por *L. mexicana* o *L. major* es un buen modelo para el estudio de la LCL humana. Sin embargo, no parece existir un buen modelo para el estudio de la LCD y la LCM.

Las respuestas inmunológicas mediada por linfocitos T cooperadores-inductores CD4+ juegan un papel fundamental en la resistencia frente a la leishmaniasis^{41,49,59,71,82}. La existencia en el ratón de dos subpoblaciones de linfocitos T CD4+ denominadas Th1 y Th2, caracterizadas por perfiles diferentes de linfoquinas ha sido ampliamente confirmada⁶². Estas células juegan un papel fundamental en el desarrollo de infecciones parasitarias. En la leishmaniasis cutánea murcha la diferencia entre resistencia y susceptibilidad reside a nivel de la expansión de los linfocitos T CD4+ Th1 o Th2.

La infección de *L. major* o *L. mexicana* de ratones resistentes conduce a la inducción preferencial de linfocitos tipo Th1 que secretan IL2, INF- γ y TNF- α , las cuales activan a los macrófagos a la eliminación intracelular de los parásitos, vía la síntesis de óxido nítrico^{39,50,51,53,84,92}. En contraste, la infección en ratones susceptibles con esos

mismos parásitos, conduce a la activación de linfocitos Th2 productores de IL-4 e IL-10 que regulan en forma negativa la activación de macrófagos^{39,53,84}.

Varios factores han sido implicados en lo que puede conducir a un linfocito T CD4+ a diferenciarse en Th1 o Th2 luego de la infección leishmánica, a saber: i) el tipo de células presentadoras de antígeno⁷⁶; ii) Los niveles de citoquinas endógenas^{6,40,47,79,82,98}; y iii) la naturaleza del antígeno reconocido^{83,84}.

Por su parte, los linfocitos T CD8+ también han sido divididos en dos subpoblaciones funcionales basadas en su patrón de secreción de citoquinas^{9,44,80}. Existen evidencias que las células CD8+ también pueden contribuir a la resolución de la leishmaniasis cutánea murcha, sugiriéndose que su efecto protector puede estar ligado a su habilidad para producir INF- γ ^{31,63,93}.

3.- Inmunología humoral de la leishmaniasis humana

Los pacientes con cualquiera de las formas clínicas de LTA desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la enfermedad, que se mantiene durante el curso de la infección y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos. Aparentemente, estos anticuerpos no juegan un papel relevante en la protección frente a *Leishmania*. Algunos trabajos señalan que la respuesta de inmunidad humoral es principalmente el reflejo de la carga parasitaria^{29,32,38}. Por esta razón, los estudios serológicos en la leishmaniasis se han utilizado principalmente con fines de diagnóstico, para el seguimiento de los pacientes tratados y en estudios sobre los mecanismos inmunopatogénicos, lo cual indudablemente constituye un valioso aporte al conocimiento de la enfermedad.

Los títulos de anticuerpos son mas elevados en la LCD, siguiendo en orden de magnitud los pacientes con LCM y los pacientes con LCL, con cargas parasitarias mas bajas^{45,94}. También se ha observado un descenso muy significativo en los niveles de anticuerpos parásitos-específicos después de tratamiento de pacientes con LCL con quimioterapia o inmunoterapia^{74,95}. Convit y col.²⁹ correlacionaron los niveles de anticuerpos, con la prueba de Montenegro y el número de áreas del sistema respiratorio comprometidas en el proceso patológico en pacientes con LCM. Los resultados mostraron que a medida que el compromiso era más extenso y más severo, los niveles de anticuerpos estaban mas elevados y la HT se hacía más debil o negativa.

Un aspecto mas reciente y novedoso de la utilidad de los estudios serológicos en el conocimiento de la enfermedad, se ha desarrollado a partir de las evidencias acumuladas sobre la asociación entre la presencia de una respuesta Th1 y Th2 y los isotipos predominantes de las inmunoglobulinas específicas, durante el curso de infecciones y otros procesos patológicos. Esto también ha sido reportado en varios estudios murinos y humanos, especialmente en las infecciones por helmintos y en la alergia^{66,96}. Ulrich y col.⁹⁶ demostraron que IgG4 específicas para *Leishmania* predominaban en 19 de los 20 sueros evaluados de pacientes con LCD. Estos resultados sugieren que la evaluación de las subclases de inmunoglobulinas abre un nueva perspectiva para la evaluación de la respuesta humoral en la leishmaniasis, no sólo durante el curso de la enfermedad, sino también en la evaluación de respuestas en esquemas terapéuticos y en los procesos de re-infección o reactivación de la enfermedad.

4.- Inmunidad mediada por células (IMC) en la leishmaniasis humana.

4.1.- Inmunidad periférica

Estudios previos en la LTA humana basados principalmente en reacciones de HT y evaluaciones clínicas e histopatológicas, han demostrado que en la infección humana la resistencia está claramente asociada al desarrollo de una respuesta de IMC específica en los pacientes con LCL^{72,73}, la cual parece estar ausente en los pacientes con LCD²⁵. Por su parte estas respuestas también están presentes en los pacientes con LCM, pero no parecen ser adecuadas para controlar la enfermedad, por el contrario se cree que contribuyen con su patología.

La respuesta de inmunidad celular en pacientes con las tres formas clínicas de LTA fue evaluada en nuestro laboratorio^{17,18,20}. Los resultados demuestran que pacientes con LCD adolecen de una respuesta de IMC tanto *in vivo* como *in vitro* frente a los antígenos de *Leishmania*. Así mismo, se demostró una supresión de la respuesta a la ConA, mitógeno de linfocitos T, inducida por el antígeno de *Leishmania* en estos pacientes¹⁸. Los linfocitos de sangre periférica de pacientes con LCD no fueron capaces de expresar el receptor para la IL-2 ni de producir INF- γ , ambos marcadores de activación y proliferación celular, en respuesta al antígeno leishmánico, pero si realizaban ambas funciones en respuesta al mitógeno linfocitario fitohemaglutinina (PHA).

Recientemente, comprobamos que estos pacientes no producen ni INF- γ ni IL-2 en respuesta a antígenos de *Leishmania*^{22,24}. Este defecto parece ser altamente específico para el parásito *Leishmania*, ya que los pacientes son capaces de producir

ambas citoquinas en respuesta al PPD (derivado proteico de *Mycobacterium tuberculosis*) y a la PHA. En contraste, los pacientes con LCD evaluados presentaban niveles significativos, y en algunos casos muy elevados de IL-5. Además, ninguno fue capaz de producir simultáneamente IL-5 e INF- γ .

Una alta proporción (52%) de pacientes con LCD presentaban niveles séricos significativos, aunque moderados, de TNF- α ²³ como también ha sido demostrado por Pisa y col.⁶⁹. Sin embargo, el TNF- α no parece contribuir a la curación de las lesiones en ausencia de una respuesta funcional de linfocitos T. Una moderada proporción (39%) de los pacientes con LCD presentaron niveles séricos significativos del receptor soluble para la IL-2 (rsIL-2). Es posible que el rsIL-2 juegue un papel en la supresión de la respuesta de linfocitos T, como ha sido demostrado en pacientes con leishmaniasis visceral⁵.

Nuestros resultados nos permiten concluir que en los pacientes con LCD hay un predominio de las citoquinas tipo Th2, las cuales pueden regular negativamente los mecanismos efectores frente a *Leishmania* mediados por las citoquinas tipo Th1 (IL-2 e INF- γ), conduciendo a que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección^{22,24}.

En el extremo resistente del espectro se ubican los pacientes con LCL. Estudios previos^{17,18,20} demostraron que estos pacientes presentan respuestas proliferativas frente a los antígenos de *Leishmania*. Además se observó un aumento significativo en la expresión del receptor para la IL-2 y producción de INF- γ , luego de exposición de sus células mononucleares tanto al antígeno de *Leishmania*, como a la PHA. Sin embargo, estas respuestas aunque positivas, fueron significativamente menores que en los

pacientes con LCM. En un estudio reciente^{22,24} confirmamos que una alta proporción (77%) de los pacientes con LCL producen niveles significativos de INF- γ en respuesta al antígeno de *Leishmania*, PHA, y PPD. Sin embargo, sólo la mitad de ellos (38%) fueron capaces de producir ambas citoquinas (IL-2 e INF- γ). La posibilidad que exista un defecto en la producción de IL-2 en estos pacientes, no es probable considerando su buena respuesta a la terapia²⁷ y la alta proporción de pacientes que curan espontáneamente³⁰. Los resultados sugieren que la IL-2 es producida, e inmediatamente consumida, probablemente en la producción de INF- γ ⁹⁹. Más aún nuestros estudios^{22,24} demuestran que una alta proporción de estos pacientes (63%) producen rsIL-2, lo cual es el reflejo de un estado de activación inmunitaria. Es importante señalar que estos pacientes poseen los niveles mas bajos de IL-5, comparado con los pacientes con LCD y LCM. Una proporción (38%) de los pacientes con LCL también producen niveles significativos de TNF- α , el cual pudiera participar en la curación de las lesiones^{23,52}. Nuestros resultados sugieren que los pacientes con LCL se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th1 en el comportamiento sanguíneo, tal y como ha sido demostrado para las formas curativas en el modelo experimental mürido.

En los pacientes con LCM demostramos una fuerte respuesta linfoproliferativa frente al antígeno de *Leishmania*, y un aumento significativo de los receptores para la IL-2, el cual fué mucho mayor en la células mononucleares estimuladas con antígeno leishmánico que con PHA^{17,18,20}. Recientemente, demostramos que una alta proporción de pacientes con LCM eran capaces de producir INF- γ (80.7-92.3%) e IL-2 (61.9-85.7%) en respuesta al antígeno de *Leishmania*, al PPD y a la PHA^{22,24}. Los mismos pacientes

que producían IL-2 e INF- γ en respuesta al antígeno leishmánico, también produjeron niveles séricos elevados de IL-5. El 94% de los pacientes con LCM produjo ambas citoquinas: IL-5 e INF- γ .

También observamos que un 64% de los pacientes con LCM tenían niveles séricos significativamente mas elevados de TNF- α que las otras dos formas clínicas de LTA^{23,51} han demostrado que el INF- γ activa a los macrófagos para producir monoquinas como el TNF- α y la IL-1, las cuales promueven a los macrófagos a eliminar no específicamente a los patógenos. Sin embargo, una sobre-producción de estas citoquinas puede ser extremadamente dañina a menos que sean cuidadosamente controladas. Se ha demostrado que el TNF- α es responsable de la patología asociada con la malaria cerebral³⁶. Un 64% de los pacientes con LCM fueron positivos tanto para TNF- α como para el INF- γ . Con respecto al rsIL-2 mas del 60% de los pacientes con LCM producían niveles significativos de este receptor, lo cual es probablemente el reflejo de una activación inmunológica bajo la presión sostenida por la carga parasitaria^{22,24}. Otros investigadores también han demostrado reacciones exageradas de IMC en estos pacientes^{16,33}.

Nuestros resultados señalan que el patrón de citoquinas de los pacientes con LCM es una mezcla Th1 y Th2. Cuando ambos patrones de citoquinas son producidas, la respuesta tipo Th2 puede predominar sobre la Th1 y la enfermedad puede mantenerse en un estado crónico. No parece probable que los pocos parásitos presentes puedan ser la causa directa del daño intenso que se observa en las membranas de las mucosas en esta forma de la enfermedad.

Todos estos trabajos fueron realizados utilizando extractos crudos del parásito. Sin embargo, para evaluar en forma precisa la respuesta inmunológica de pacientes con LTA, e identificar algunos epitopes de linfocitos T inmunodominantes que puedan estar implicados en la protección o en la inmunopatología. Cabrera¹² recientemente, midió la respuesta de linfocitos T frente a antígenos específicos definidos. Los antígenos evaluados fueron la proteína recombinante gp63 (rgp63) de *Leishmania major*^{58,77,78} y las proteínas de estrés de 65KD de *Mycobacterium bovis* (rHSP65) y de 70 KD de *M. tuberculosis*. La evaluación se realizó en pacientes con LCL y LCM y controles voluntarios de zonas endémicas. Las proteínas de estrés son unos de los antígenos reconocidos principalmente durante la respuesta inmunitaria frente a un amplio rango de patógenos^{55,103}. Igualmente, éstas proteínas pueden tener una alta reactividad cruzada que las asocia a fenómenos de auto-reactividad⁴², de allí la importancia de su estudio. Así mismo, identificaron estas respuestas frente a una serie de epítopes contenidos en estos antígenos definidos. Los resultados de este estudio fueron los siguientes:

- 1.- La mitad de los pacientes con LCM y controles de zonas endémicas respondieron positivamente a la proteínas rgp63 de *L. major*, medido por la producción de INF- γ .
- 2.- Pacientes con LCL y LCM mostraron una alta respuesta a la proteína de estrés rHSP70 kD de *M. tuberculosis*, medido por la proporción de respondedores y niveles de INF- γ ; siendo los pacientes con LCM mas reactivos que los pacientes con LCL.
- 3.- Los pacientes con LCM mostraron las mas altas frecuencias de respuestas frente a péptidos sintéticos de la rgp63. Los péptidos de la HSP65 de *M. bovis* fueron poco reconocidos por pacientes o individuos controles en respuestas proliferativas.

Es importante hacer notar que los altos niveles de INF- γ en respuesta a la rHSP70 puede jugar un papel en el daño al tejido observado en estos pacientes, tal como se ha reportado en pacientes con lepra tuberculoide y lepromatosa⁴³, cuyo daño en la piel y los nervios de estos paciente se asocia con una alta expresión intralesional de la HSP70KD.

4.2.- Inmunidad en las lesiones

4.2.1.-La respuesta inmunológica cutánea.

La piel es una parte importante del sistema inmunológico donde ocurren una serie de respuestas complejas, tanto humorales y celulares. Por esta razón, la piel ha sido considerada como un órgano inmunológico autosuficiente, compuesto de células inmunocompetentes (ie. Células de Langerhans epidérmicas, queratinocitos y linfocitos T); la unidad perivascular dérmica (ie. células endoteliales, pericitos vasculares, linfocitos T, mastocitos y dendrocitos dérmicos); y citoquinas interactuantes y quimocinas^{10,90}.

Los dos tipos de células presentadoras de antígeno (CPA) localizadas en la epidermis son las células de Langerhans y los queratinocitos. Las células de Langerhans son miembros de la familia de células dendríticas, y son las CPA omnipresentes en piel. En contraste, los queratinocitos solo se transforman en células inmunocompetentes activas después de un estímulo cutáneo^{4,11}. Ambos grupos celulares participan en la generación del proceso inflamatorio expresando moléculas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC-II) y moléculas de adhesión, ambas necesarias para la migración y retención de las células inflamatorias^{4,11,65,90}. Las células de Langerhans y los queratinocitos también producen monoquinas, que pueden contribuir

con la migración de linfocitos T epidermotrópicos. Estas monoquinas incluyen a la IL-1, IL-6, IL-8, factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y TNF- β ⁶⁵. Además, recientemente se ha podido demostrar que los queratinocitos son capaces de presentar antígenos a linfocitos T, en una forma MHC-II restringida, aumentando así su contribución a la inmunidad celular local⁶⁴. Estas evidencias asignan un papel importante a la epidermis en la iniciación de los procesos inflamatorios^{65,86,90}.

Los procesos de inmunoregulación en piel ocurren en tres fases: reclutamiento, retención/proliferación, y recirculación⁶⁵. La fase de reclutamiento involucra la extravasación de leucocitos a través de la unidad perivascular dérmica, y la subsecuente migración de estas células hacia la epidermis. La fase de retención/proliferación comprende la interacción entre células de Langerhans, queratinocitos, linfocitos T epidermotrópicos y citoquinas, y la subsecuente proliferación de linfocitos T y formación de un granuloma o infiltrado dérmico. La fase de recirculación es activada después de la eliminación del insulto cutáneo, e involucra la baja regulación de señales accesorias provenientes de las células de Langerhans y los queratinocitos. Los procesos de inmunoregulación pueden ser afectados por factores como la naturaleza del antígeno, las CPA epidérmicas, los linfocitos T efectores y las citoquinas.

Nickoloff⁶⁵ señala como defectos a nivel de las señales accesorias de la epidermis conducen al desarrollo de procesos inflamatorios en piel, y propone tres modelos de enfermedad cutánea: 1) El modelo citotóxico donde se da la fase efectora de la respuesta inmunitaria; 2) El modelo tolerogénico, caracterizado principalmente por la

falta de participación del queratinocito como célula inmunocompetente accesoria, lo cual promueve un estado de anergia selectiva; y 3) El modelo proinflamatorio, caracterizado por estancamiento de células inflamatorias en piel como consecuencia de pocas señales accesorias por parte de las células de Langerhans y excesiva expresión de ICAM-1 por los queratinocitos.

4.2.2. LCL: el modelo citotóxico en leishmaniasis tegumentaria americana.

La epidermis de pacientes con LCL posee numerosas características asociadas con inflamación activa. Estas incluyen: densidad apropiada de Células de Langerhans CD1a⁺^{13,14,85,86,87,89,90}; elevada expresión por parte de los queratinocitos de moléculas MHC-II; presencia de grupos de queratinocitos que expresan la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Igualmente, un subgrupo de Células de Langerhans epidérmicas en las lesiones expresa CD83⁸⁸, molécula miembro de la Superfamilia de las Inmunoglobulinas presente en linfocitos activados¹⁰⁴. La distribución de ICAM-1 en la epidermis de LCL es similar a la observada en otros desordenes cutáneos, habiéndose asociado con la producción de IFN- γ y la migración selectiva de linfocitos T epidermotrópicos⁴⁸. Por su parte, IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , TNF- β e IL-8 pueden ser detectados en la epidermis separada de lesiones de LCL utilizando la reacción en cadenas de la polimerasa realizada después de transcripción reversa (RT-PCR)¹³.

El granuloma de LCL presenta un patrón de citoquinas mixto Th1 y Th0, con un predominio de citoquinas tipo Th1^{15,57,68}. Los niveles de subgrupos de linfocitos T en el granuloma de LCL (Figura 1) indican que mecanismos efectores, tales como activación

macrofágica y lisis de células infectadas, están involucrados en el control de la enfermedad⁷⁰.

La presencia de parásitos en la piel induce la producción local de IFN- γ en la lesión, el cual promueve la expresión de ICAM-1 y HLA-DR por los queratinocitos y la migración de linfocitos T epidermotrópicos. Las células de Langerhans como potentes células estimuladoras de linfocitos T *Leishmania*-específicos¹⁰¹, promueven una respuesta efectiva tipo Th1 frente al parásito. Una vez que el parásito es eliminado, o no es reconocido por el sistema inmunitario del hospedador gracias a sus mecanismos de evasión, las señales accesorias epidérmicas son bajo-reguladas. Proceso que induce la cura de la inmunopatología cutánea causante de la lesión. Por ejemplo, el tratamiento con luz ultravioleta del espectro B (UVB) de ratones infectados con *Leishmania* reduce la manifestación dermatológica sin disminuir la carga parasitaria³⁵.

La presencia de ulcera en la LCL ha sido generalmente asociada con la existencia de una infección bacteriana secundaria. Recientemente, la utilización de ratones SCID (animales con inmunodeficiencia combinada severa carentes de linfocitos T y otras células inmunocompetentes) ha permitido demostrar que los linfocitos T CD4+ son indispensables para la formación de la ulcera leishmánica⁹¹. Resultados que sugieren como una respuesta inmunitaria capaz de eliminar al parásito puede también causar daño tisular.

4.2.3. LCD: el modelo tolerogénico en leishmaniasis tegumentaria americana.

Las deficiencias epidérmicas de citoquinas y señales accesorias mediadas por citoquinas pueden afectar la función de las células presentadoras de antígeno e inducir una anergia parásito-específica. La epidermis de LCD posee pocas células de Langerhans CD1a+ y CD83+, y los queratinocitos fallan en expresar HLA-DR o ICAM-1¹⁴ (Figura 1). La epidermis de LCD no tiene IL-6 y sólo pocos pacientes expresan mRNA para IL-1 β y TNF- α ¹⁵, lo cual indica un posible defecto en la producción de monoquinas por las células presentadoras de antígeno. De esta manera, la ausencia de IL-6 pudiera ser el resultado de la poca expresión de IL-1 β y TNF- α , ya que estas monoquinas inducen la producción de IL-6⁹⁷.

El granuloma de LCD se caracteriza por una respuesta predominantemente del tipo Th2, con una cantidad alta y poco usual de linfocitos T vírgenes y sin orden microanatómico particular. También existe un aparente defecto en la expresión de la molécula LFA-1, ya que el CD18 (LFA-1b) está bajo-regulado y se observan un mayor número de linfocitos infiltrantes CD11a+ (LFA-1a) que en pacientes con LCL^{88,89,90}.

La disparidad en los niveles de células epidérmicas CD1a + y CD83+ entre pacientes con LCL y LCD pudiera estar relacionada con el disparo de la actividad celular, ya que la expresión de CD83 está asociada con presentación antigénica y las interacciones celulares que ocurren después de la activación linfocitaria¹⁰⁴. De tal manera, que el CD83 pudiera estar identificando un subgrupo de células de Langerhans CD1a sensibilizadas, responsables de presentar antígenos a linfocitos T memoria. En conclusión, la lesión de LCL posee las señales accesorias necesarias para promover una

respuesta inmunitaria efectiva frente a *Leishmania*, mientras que en la lesión de LCD se manifiesta un defecto en la función epidérmica.

Algunos factores de riesgo como el componente genético del hospedador⁷, la especie del parásito¹⁰⁰ y la sensibilidad a la UVB³⁵ pudieran estar involucrados en la susceptibilidad a la LCD. En estas situaciones, el parásito evade la respuesta inmunitaria del hospedador, y las citoquinas producidas no pueden activar a los queratinocitos para que expresen ICAM-1 y HLA-DR. Igualmente, las células de Langerhans están disminuidas por la acción directa de los parásitos⁸ o por la falta de sensibilización de la epidermis. Eventos que conllevan a la generación de una respuesta tipo Th2 que crea un estado de tolerancia progresiva hacia el parásito y resulta en la parálisis de linfocitos T cutáneos (Figura 1).

4.2.4. LCM: el modelo proinflamatorio en leishmaniasis tegumentaria americana.

La característica más resaltante de las lesiones de LCM es la ausencia de células de Langerhans CD1a+ y CD83+ en el epitelio de la mucosa^{56,88,89,90}. Esto pudiera ser el reflejo de una migración selectiva de las células de Langerhans que después de sensibilizadas viajan hacia los ganglios linfáticos adyacentes, o es producto del efecto citolítico del parásito sobre las células durante el curso prolongado de la enfermedad. En la epidermis de LCM se observa una expresión exacerbada de HLA-DR e ICAM-1, confirmando el estado de hipersensibilidad asociado con esta forma clínica de la leishmaniasis. Igualmente, observamos una acumulación selectiva de linfocitos T que expresan el receptor antigénico (TCR) ab hacia la membrana basal del epitelio de la

mucosa¹³ (Figura 1). El granuloma de LCM presenta un patrón de citoquinas mixto Th1 y Th2, caracterizado por una abundancia de IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10⁴⁸. La IL-4 promueve la proliferación de Th2⁷⁵ y la secreción de IL-10, la cual bajo-regula las señales accesorias de las células presentadoras de antígeno y la producción de citoquinas Th1, previniendo la acción efectora del IFN- γ . El granuloma de LCM presenta una alta relación CD4/CD8 como resultado de un importante aumento de linfocitos T CD4+ en las lesiones y densidad baja en sangre periférica^{17,56}. En estas lesiones la expresión de LFA-1 (CD11a+ CD18+) está alterada de manera que ambas subunidades de la molécula se expresan en forma comparable^{88,90}.

La mucosa puede comprometerse en la enfermedad varios años después que las lesiones cutáneas primarias están curadas. De tal forma que individuos sin lesiones cutáneas aparentes permanecen infectados crípticamente. El parásito y/o la memoria inmunológica pudiera ser activada por re-infección, inmunosupresión o trauma fomentando una respuesta inmunitaria crónica que contribuye con el daño tisular.

En las lesiones de LCM, la activación de la enfermedad pudiera estar asociada con la hiperproducción de citoquinas como la IL-1 y TNF- α por los queratinocitos. Estas citoquinas son capaces de sobre-regular la expresión de ICAM-1 y HLA-DR de las células endoteliales y de los queratinocitos, y así iniciar el tráfico de linfocitos T sin la necesidad de una presentación antigénica concomitante. La ausencia de células de Langerhans epiteliales pudiera causar una transducción inadecuada y deficiente de las señales necesarias para cumplir la fase efectora de la respuesta inmunitaria. Más aún, la

liberación de monoquinas por los queratinocitos pudiera promover un estado proinflamatorio persistente con daño tisular asociado (Figura 1)

5.- Comparación de marcadores leucocitarios en linfocitos de sangre periférica y de lesiones.

Las Figuras 2 y 3 presentan los resultados correspondientes a los marcadores leucocitarios: CD4 (T cooperadoras/inductoras), CD8 (T supresoras/citotóxicas) y CD25, tanto a nivel de linfocitos periféricos, como linfocitos de las lesiones⁶¹. Los resultados mas significativos son una marcada disminución de los linfocitos T CD4+ de sangre periférica y de la relación CD4/CD8 en los pacientes con LCM comparados con los otros dos grupos de pacientes. Resultados similares fueron observados por Carvalho y col.¹⁶. Como se puede ver esta disminución ocurre por un secuestro de estas células hacia las lesiones, donde se observa un aumento significativo de estas células en los pacientes con LCM. No se observaron diferencias en el número de linfocitos T CD8+ entre los tres grupos de pacientes ni a nivel de las lesiones, ni a nivel de sangre periférica. En la Figura 3 mostramos los resultados para el marcador CD25, tanto en las células periféricas no estimuladas, como en las estimuladas con el antígeno y en los linfocitos de las lesiones. Los pacientes con LCD son incapaces de expresar el receptor para la IL-2 luego de estimulación antigénica. En cambio los pacientes con LCL y LCM expresan eficientemente este receptor luego de estimulación con el antígeno leishmánico, siendo esta estimulación significativamente mayor en los pacientes con LCM. Sin embargo, a

nivel de las lesiones existe un mayor reclutamiento de estas células en los pacientes con LCL, que en los otros dos grupos de pacientes.

MODELO SOBRE LA RELACION PARASITO-RESPUESTA INMUNOLOGICA DEL HOSPEDADOR.

En conclusión, se plantea un modelo sobre la relación parásito-respuesta inmunológica del hospedador en base a los parámetros inmunológicos demostrados, tanto a nivel de sangre periférica, como en las lesiones de pacientes con LTA (Figura 4). El conjunto de nuestras investigaciones sugiere que el patrón de citoquinas que presentan los pacientes con LCL, la forma resistente y curativa de la enfermedad, tanto a nivel de las lesiones, como en linfocitos de sangre periférica estimulados con el antígeno de *Leishmania*, es un patrón tipo Th1, lo cual conduce a la curación de las lesiones en estos pacientes, ya sea espontáneamente o luego de una terapia apropiada^{27,28}. Las formas diseminadas de los pacientes con LCD, resistentes a la quimioterapia, se caracterizan por un patrón de citoquinas tipo Th2, con una ausencia total de producción de IL-2 e INF- γ por parte de los linfocitos específicos para el antígeno, y con una señal baja de los ARN mensajeros para citoquinas a nivel de las lesiones. Por el contrario una producción exagerada de IL-5 tanto en circulación, como en las lesiones. Este tipo de respuesta Th2 probablemente es la responsable de que estos pacientes sean incapaces de controlar la infección, lo cual conduce a la diseminación del parásito por toda la superficie cutánea. En el área intermedia se ubican los pacientes con LCM, con lesiones destructivas de las mucosas orales y nasofaríngeas, con tendencia a la cronicidad. Estos

pacientes no responden bien a la quimioterapia y presentan una alta tasa de recidivas. Se caracterizan por un patrón de citoquinas mixto tipo Th1 y Th2 que coexisten simultáneamente. Esta situación puede ser la responsable de la no resolución de la enfermedad en estos pacientes, ya que cuando ambos tipos de citoquinas se producen es posible que las citoquinas tipo Th2 predominen sobre las tipo Th1. Por ejemplo, la IL-4 puede reducir la efectividad del INF- γ .

Las moléculas de adhesión como el ICAM-1s son un buen marcador de una respuesta inmunológica efectora. En nuestro caso observamos niveles bajos de esta molécula en los pacientes con LCD, tanto en sangre como en las lesiones, lo que implica que estos pacientes poseen una falla en las señales accesorias necesarias para que se genere la respuesta inflamatoria. Los pacientes con LCL y LCM poseen niveles altos de ICAM-1s lo que indica que esta molécula participa en los mecanismos efectores activados para la eliminación del parásito.

Las diferencias observadas en el perfil de citoquinas en estos pacientes pueden ayudar a explicar la inmunopatología de las tres formas clínicas de LTA, y es un buen ejemplo de como los parásitos pueden estimular una regulación negativa de las citoquinas y emplear las actividades biológicas de las citoquinas del hospedador para promover su propia sobrevivencia.

5.- Respuesta inmunológica en pacientes con LCL tratados con inmunoterapia con BCG mas promastigotes de *Leishmania*.

En Venezuela, Convit y Col.²⁷ demostraron la eficacia terapéutica de la inmunoterapia, constituida por una mezcla de BCG mas promastigotes autoclavados de *Leishmania*, en pacientes con LCL. Los resultados demostraron que pacientes con LCL infectados con *L. brasiliensis* o *L. mexicana*, tratados con tres dosis de inmunoterapia mostraban la misma proporción de curación que los pacientes que recibían tres ciclos de quimioterapia, con 20 inyecciones i.m diarias de antimonio de meglumina, sin causar los severos efectos colaterales del tratamiento con quimioterapia. Actualmente la inmunoterapia está siendo utilizada en Venezuela de preferencia que la quimioterapia o asociada con ella en las formas más severas de la enfermedad: LCM y LCD²⁸.

En nuestro laboratorio evaluamos varios aspectos de la IMC de estos pacientes con LCL incluidos en el protocolo de inmunoterapia, incluyendo respuestas linfoproliferativas *in vitro* a mitógenos y antígeno de *Leishmania*, pruebas cutáneas de leishmanina y subpoblaciones leucocitarias en los pacientes con LCL²¹. Estas respuestas fueron evaluadas antes y después de tratamiento y curación de 39 pacientes con LCL que habían recibido inmunoterapia, en 34 pacientes sometidos a quimioterapia, y en 14 pacientes curados luego de la administración de BCG solo.

Se demostró evidentes signos de activación de linfocitos T en pacientes curados que habían recibido quimioterapia o inmunoterapia. Por ejemplo, se observó un aumento en la expresión de receptores para la IL-2 después de tratamiento, comparado con sus valores pre-tratamiento. Además, un porcentaje significativo de los pacientes demostró un aumento en las respuesta proliferativas *in vitro* frente a mitógenos, y tanto *in vivo* como *in vitro* frente al antígeno de *Leishmania*. No se encontraron evidencias del

desarrollo de una respuesta exagerada frente a parásitos de *Leishmania* en el grupo tratado con inmunoterapia, ya que el nivel final de reactividad inmunológica fue comparable al grupo con quimioterapia. Tampoco se encontraron diferencias en términos de la respuesta inmunológica final entre los pacientes curados con BCG solo y los otros grupos. Sin embargo, la eficacia terapéutica del BCG fue menor, ya que el tiempo de curación medio fue mayor (22 semanas) y el porcentaje de curación (40%) fue menor, que con los otros dos tratamientos²¹.

Recientemente, Cabrera¹² estudiando pacientes con LCL tratados con inmunoterapia demostró además un aumento significativo en los niveles de INF- γ en respuesta a los antígenos de *Leishmania* y *Mycobacteria* comparado con los pacientes no tratados. Se observó una correlación significativa entre la respuesta proliferativa al antígeno de *Leishmania* y la producción de INF- γ en el grupo tratado.

Basado en los resultados globales obtenidos, Cabrera¹² propuso el siguiente modelo de bases inmunológicas para explicar el mecanismo de acción de la inmunoterapia en pacientes con LCL (Figura 5). Antes de recibir la inmunoterapia, los pacientes con LCL ya poseen linfocitos CD4+ los cuales son capaces de proliferar y producir INF- γ en respuesta a antígenos de *Leishmania* y *Mycobacteria*¹². Luego de la inmunoterapia, el BCG, puede activar en forma no específica a los monocitos y macrófagos a producir IL-12, IL-1 y TNF- α ³⁴. Estos productos, particularmente la IL-12, estimula a las células NK a secretar INF- γ y TNF- α ¹⁰². Los antígenos de *Leishmania* contenidos en la inmunoterapia son presentados a los linfocitos T CD4+ para estimular una respuesta específica contra el parásito. Las células Th0 se diferencian en células

específicas tipo Th1. Ambas vías conducen a la activación macrofágica y a la eliminación de los parásitos, y eventualmente al control de la infección.

De nuestros estudios concluimos que la inmunoterapia es muy útil en el tratamiento de los pacientes con LCL por su alta eficiencia, baja propensión a producir efectos colaterales y porque no induce un estado de hiper-reactividad, además de ser mas económica.

6.- Respuesta inmunológica en individuos sanos vacunados con BCG mas promastigotes de *Leishmania*.

La leishmaniasis es una de las pocas enfermedades parasitarias con una larga historia de intentos de vacunación (revisado por Modabber⁶⁰). Observaciones clínicas de que pacientes curados espontaneamente o luego de tratamiento con drogas, raras veces presentaban recurrencia de la enfermedad sustentó la creencia de que una respuesta de inmunidad protectora podía ser inducida.

En el Nuevo Mundo, se han probado vacunas con parásitos enteros contra la leishmaniasis tegumentaria Americana³, principalmente en Brasil entre los años 1930-1940 y mas recientemente⁵⁴ usando una mezcla de promastigotes sonicados con cinco cepas de *Leishmania*. Los resultados de estos ensayos han demostrado una incidencia reducida de la enfermedad entre los individuos que convirtieron positivamente sus pruebas cutáneas de leishmanina.

En nuestro laboratorio realizamos un estudio de vacunación para evaluar las respuesta de inmunidad celular *in vivo* (pruebas cutàneas de leishmanina) e *in vitro*

(proliferación de células T y producción de INF- γ tanto a antígenos de *Leishmania* como de *Mycobacterium* luego de la vacunación de voluntarios sanos provenientes de un área endémica de leishmaniasis, con promastigotes muertos de *Leishmania* con y sin BCG¹⁹. Se realizaron pruebas cutáneas con PPD y antígeno leishmánico en 692 voluntarios, de los cuales se seleccionaron 208 sujetos doble negativos (< 7mm de induración) para participar en el protocolo. Los individuos estudiados fueron divididos en cuatro grupos de vacunación: (A) promastigotes muertos BCG, (B) BCG solo, (C) promastigotes muertos solos, y (D) placebo. Se administraron tres dosis de vacunas con intervalos de 6-10 semanas. A los 4-6 y 12-18 meses se volvieron a medir las respuestas cutáneas al PPD y al antígeno de *Leishmania*. Los resultados de este ensayo demostraron que la vacuna combinada, BCG mas promastigotes de *Leishmania*, produjo una estimulación de la respuesta inmune frente a antígenos de *Leishmania* y *Mycobacterium*, en un alto porcentaje de los vacunados (>85%), evaluada con las tres técnicas utilizadas (pruebas cutáneas, respuesta proliferativa y/o producción de INF- γ). Esto fue evidente desde la primera dosis de vacuna en las respuesta proliferativas y en la producción de INF- γ , y se mantuvo hasta un año después de la aplicación de las tres dosis de vacuna. El grupo B, que recibió BCG solo, respondía tan bien como el grupo A al PPD, pero no muy efectivamente frente al antígeno de *Leishmania*. Lo inverso era verdad para el grupo C que recibió promastigotes solos. Un significativo porcentaje de conversión se observó en el grupo placebo en el seguimiento de los 12-18 meses después de vacunación, tanto para el PPD (58%) como para el antígeno de *Leishmania* (21%), lo que sugiere, ya sea exposición ambiental a antígenos leishmánicos o de mycobacterias durante el protocolo

de vacunación, o mas probable, una respuesta producida por las pruebas cutáneas repetidas.

La respuesta de anticuerpos específicos tipo IgG contra: BCG, PPD antígenos de *Leishmania* también se evaluó en estos mismos individuos⁸¹. Un bajo porcentaje (38%) de los individuos vacunados incrementaron sus niveles de anticuerpos específicos para *Leishmania* o *Mycobacteria*, y los que los aumentaron se pueden clasificar como "bajos respondedores" comparados con los títulos observados antes de la vacunación. Por lo tanto no se encontraron evidencias de que la vacunación *per se* conduzca a un nivel potencialmente exacerbatorio de la enfermedad asociado con una respuesta de anticuerpos, con predominio de linfocitos T tipo Th2, especialmente en lo que respecta a la respuesta anti-*Leishmania*. Estos resultados tomados en conjunto demuestran que la vacuna combinada es potencialmente protectora para la mayoría de los vacunados. En estos momentos se realiza un protocolo de vacunación en una zona altamente endémica de leishmaniasis en Venezuela (Sanare, Edo. Lara), con el fin de probar la eficacia de la vacuna combinada para disminuir la incidencia de leishmaniasis.

AGRADECIMIENTOS

El conjunto de nuestros trabajos fueron financiados con proyectos UNDP/World Bank/WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (Grants ID-880178, ID-930102, ID 930020, ID 931187), CONICIT S1-2313, CDCH (M.10.11.2024/90 y 09-35-2379/93) y BID-CONICIT BTS-59 y BTS-60.

REFERENCIAS

- 1.- Alexander, J. and Kaye, P.M. Immunoregulatory pathways in murine Leishmaniasis: different regulatory control during *Leishmania mexicana mexicana* and *Leishmania major* infections. *Clin.Exp.Immunol.*, 61:674-682, 1985.
- 2.- Alexander, J. and Phillips, R.S. *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana*: cross-immunity in mice. *Exp. Parasitol.*, 45: 93-100, 1978.
- 3.- Antunes, C.M.F., Mayrink, W., Magalhaes, P.A., Costa, C.A., Melo, M.N. and Dias, M. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int.J.Epidemiol.* 15:572-580, 1986.
- 4.- Aubock, J., Romani, N., Grauber, G. and Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br. J. Dermatol.*, 114:465-472, 1986.
- 5.- Barral-Netto, M., Barral, A., Santos, S.B., Carvalho, E.M., Badaro, R., Rocha, H., Reed, S.G. and Johnson, WD. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J. Immunol.*, 147:281-285, 1991.
- 6.- Belsevic, M., Finbloom, D.S., van der Meide, P.H., Slayter, M.V. and Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J.Immunol.*, 143:266-274, 1989.
- 7.- Blackwell, J.M. A murine model of genetically controlled host responses to Leishmania. In: Ecology and Genetics of host parasite interactions. *Rollinson D, Anderson RM, eds., Academic Press, New York, U.S.A.*, pp 147-157, 1985.
- 8.- Blank, C., Fuchs, H., Rappersberger, K., Röllinghoff, M. and Moll, H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. *J. Infect. Dis.*, 167:418-425, 1993.
- 9.- Bloom, B.R., Salgame, P. and Diamond, B. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today*, 13:131-136, 1992.
- 10.- Bos, J.D. and Kapsenberg, M.L. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol. Today*, 14:75-78, 1993.
- 11.- Breathnach, S.M. and Katz, S.I. Keratinocytes synthesize Ia antigen in acute cutaneous graft-vs-host disease. *J. Immunol.* 131:2741-2745, 1983.

- 12.- Cabrera, M. T cell responses associated with immunotherapy of American cutaneous leishmaniasis. *Thesis presented for the degree of Doctor of Philosophy at the Faculty of Medicine, University of London*, 1994.
- 13.- Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Oriol, O., Kraal, G. and Tapia, F.J. Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.*, 99:95S-98S, 1992^a.
- 14.- Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Rondón, A.J. and Tapia, F.J. Immunocytochemical characterization of epidermal cells in American cutaneous leishmaniasis. *Acta Micros.*, 1:118-1211, 1995b.
- 15.- Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F.J., Sanchez, M., Yamamura, K., Uyemura, R.L., Modlin, R.L., Bloom, B.R. and Convit, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Immunol.*, 91:500-505, 1993.
- 16.- Carvalho, E.M., Johnson, W.D., Barreto, E., Marsden, P.D., Costa. J.L.M., Reed, S.G. and Rocha, H. Cell mediated immunity in American cutaneous leishmaniasis. *J. of Immunology*, 135:4144-4148, 1985.
- 17.- Castés, M., Agnelli, A., Verde, O. and Rondón, A.J. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 27:176-186, 1983.
- 18.- Castés, M., Agnelli, A. and Rondón, A.J. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 57:279-286, 1984.
- 19.- Castés, M., Blackwell, J., Trujillo, D., Formica, S., Cabrera, M., Zorrilla, G., Rodas, A., Castellanos, P.L. and Convit, J. Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG. I. Skin test reactivity, T cell proliferation and interferon-gamma production. *Vaccine*. 12:1041-1051, 1994.
- 20.- Castés, M., Cabrera, M., Trujillo, D. and Convit, J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor and production of interleukin-2 and interferon- γ in human American cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1207-1213, 1987.
- 21.- Castés, M., Moros, Z., Martinez, A., Trujillo, D. and Convit, J. Cell-mediated immunity in localized cutaneous leishmaniasis patients before and after treatment with immunotherapy or chemotherapy. *Parasite Immunol.* 11:211-222, 1989.
- 22.- Castés, M., Trujillo, D., Calcagno, M., Cabrera, M. and Convit, J. Response Th1/Th2 in human American cutaneous leishmaniasis: its possible relevance for the design of a vaccine. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88:42-43, 1993^a.

- 23.- Castés, M., Trujillo, D., Rojas, M.E., Fernandez, C.T., Araya, L., Cabrera, M., Blackwell, J. and Convit, J. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.*, 26:233-238, 1993b.
- 24.- Castés, M. Th1 and Th2 responses in human cutaneous leishmaniasis: relation to the outcome of infection and implications for immunotherapy and vaccine development. In "Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis", edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres-Dittmar and Martín Sánchez, 203-221, 1996.
- 25.- Convit, J. and Pinardi, M.E. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect to the host. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:603-610, 1972.
- 26.- Convit, J. and Pinardi, M.E. Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunological spectrum in South America. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chaga's Disease. *Ciba Foundation Symposium nº 20 (new series). Amsterdam, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland*, pp. 159-169, 1974.
- 27.- Convit, J., Castellanos, P.L., Rondon, A.J., Pinardi, M.E, Ulrich, M., Castés, M., Bloom, B.R. and Garcia, L. Immunotherapy versus chemotherapy in localized cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*, Febrero, 21:401-405, 1987.
- 28.- Convit, J., Castellanos, P.L., Ulrich, M., Castés, M., Rondon, A., Pinardi, M.E., Rodríguez, N., Bloom, B.R., Formica, S., Valecillos, L. and Bretaña, A. Immunotherapy of localized, intermediate, and diffuse forms of American cutaneous leishmaniasis. *J.Infect.Dis*, 160:104-115, 1989.
- 29.- Convit, J., Ulrich, M., Fernández, C.T., Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Castés, M. and Rondón, A.J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87:444-448, 1993.
- 30.- Costa, J.M.L., Netto, E.M., Vale, K.C., Osaki, N.K., Tada, M.S. and Marsden, P.D. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis braziliensis* ulcers. *Trans. Roy. Soc. Trp. Med. Hyg.*, 81:606-608, 1987.
- 31.- Cruz, A.M., Conceicao-Silva, F., Bertho, A., Nogueira, R., Antas, PRZ. and Coutinho, S.G. Cell mediated immune responses to leishmanial antigens. Reactivity of T cell subsets (CD4+and CD8+) derived from peripheral blood of human American cutaneous leishmaniasis patients before and after therapy. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 86:203-204, 1991.
- 32.- Chiller, T.M., Samudio, M.A. and Zoulek, G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas` disease and leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:650-656, 1990.

- 33.- Dorea, R.C.C., Coutinho, S.G., Sabroza P.C., Hendriks, J., Cysne, L. and Conceicao-Silva, F. Quantification of *Leishmania*-specific T cells in human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) by limiting dilution analysis. *Clin.Exp.Immunol.* 71:26-31, 1988.
- 34.- Frommel, D. and P.H. Lagrange. BCG: A modifier of immune responses to parasites. *Parasitol. Today* 5:188-190, 1989.
- 35.- Giannini, S.H. Effects of ultraviolet B irradiation on cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Today*, 8:44-48, 1992.
- 36.- Grau, G.E., Fajardo, L.F., Piquet, P.F., Allet, B., Lambert, P.H. and Passali, P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 237:1210-1212, 1987.
- 37.- Grimaldi, G., Moriearty, P.L. and Hoff, R. *Leishmania mexicana*: Immunology and histopathology⁴ in C3H mice. *Exp. Parasitol.*, 50:45-56, 1980.
- 38.- Gutierrez, Y., Salinas, F.G., Palma, G., Valderrama, L.B., Santrich, C.V. and Saravia, N.G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43:281-289, 1991.
- 39.- Heinzl, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffmann, R.L. and Locksley, R.M. Reciprocal expression of interferon- γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 169:59-72, 1989.
- 40.- Heinzl, F.P. Interleukin 12 and the regulation of CD4⁺ T-cell subset responses during murine leishmaniasis. *Parasitol.Today* 10:190-192, 1994.
- 41.- Howard, J.G., Hale, C. and Liew, F.Y. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. *J. Exp. Med.* 153:557-568, 1981.
- 42.- Kaufmann, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, 11:129-136, 1990.
- 43.- Khanolkar-Young, S., Young, D.B, Colston, M.J., Stanley, J.N.A. and Lockwood, DNJ. Nerve and skin damage in leprosy is associated with increased intralesional heat shock protein. *Clin. Exp. Immunol.* 96:410-415, 1994.
- 44.- Kemeny, D.M., Noble, A., Holmes, B.J. and Diaz-Sanchez, D. Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell. *Immunol. Today*, 15:107-110, 1994.

- 45.- Labrada, M., Weigle, K., Valderrama, L. and Saravia, N. Evaluacion de la respuesta de isotipos de inmunoglobulina específica a *Leishmania* en leishmaniasis tegumentaria Americana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 84:409-416, 1989.
- 46.- Lainson, R. and Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. *The leishmaniasis Vol. 1. Accademic Press INC (London)*, pp. 1-120, 1987.
- 47.- Leal, L.M.C.C., Moss, D.W., Kuhn, R., Müller, W. and Liew, F.Y. Interleukin-4 transgenic mice of resistant bakcground are susceptible to *Leishmania major* infection. *Eur.J.Immunol.*, 23:566-569, 1993.
- 48.- Lewis, R.E., Buchsbaum, M., Whitaker, D. and Murphy, G.F. Intercellular adhesion molecule expression in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J. Invest. Dermatol.*, 93:672-677, 1989.
- 49.- Liew, F.Y., Howard, J.G. and Hale, C. Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. III. Protection against fatal *Leishmania tropica* infection induced by irradiated promastigotes involves Lyt-1+2 T cells that do not mediate cutaneous DTH. *J.Immunol.*, 132:456-461, 1984.
- 50.- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M.J. and Moncada, S. Macrophge killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J.Immunol.* 144:4794-4797, 1990^a.
- 51.- Liew, F.Y., Yang, D.M., Severn, A. and Cox, F.E.G. TNF- α reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunol.*, 74:304-309, 1991.
- 52.- Liew, F.Y. and Cox, F.E.G. Non-specific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunoparasitol.Today*, 12:17-20, 1991.
- 53.- Locksley, R.M. and Scott, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol.Today*, 12:A58-A6, 1991.
- 54.- Mayrink, W., Williams, P., da Costa, C.A., Magalhaes, M.N., Melo, M.N. and Dias, M. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the state of Espirito Santo, Brazil. *Ann. Trop. Med.Parasitol.* 79:259-269, 1985.
- 55.- Maresca, B. and Carratu, L. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol.Today*, 8:260-266, 1992.
- 56.- Martínez-Arends, A., Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Mosca, W., Valecillos, L. and Convit, J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Trop.*, 494:271-280, 1991.

- 57.- Melby, P.C., Andrade-Narvaez, F.J., Darnell, B.J., Valencia-Pacheco, G., Tryon, V.V. and Palomo-Cetina, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.*, 62: 837-842, 1994.
- 58.- Mendonca, S.C.F., Russell, D.G. and Coutinho, S.G. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). *Clin.Exp. Immunol.*, 83:472-478, 1991.
- 59.- Mitchell, G.F., Curtis, J.M., Handman, E. and McKenzie, I.F.C. Cutaneous leishmaniasis in mice: disease patterns in reconstituted nude mice of several genotypes infected with *Leishmania tropica*. *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.*, 58:521-532, 1980.
- 60.- Modabber, F. Vaccine: the only hope to control leishmaniasis. In "Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis", edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres-Dittmar and Martín Sánchez, 223-236, 1996.
- 61.- Modlin, R.L., Tapia, F.J., Bloom, B.R., Gallinoto, M.E., Castés, M., Rondón, A.J., Rea, T.H. and Convit, J. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 60:241-249, 1985.
- 62.- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J.Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
- 63.- Muller, I., Kroph, P., Etges, R.J. and Louis, J.A. Gamma-interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect.Immun.* 61:3730-3738, 1993.
- 64.- Mutis, T., De Bueger, M., Bakker, A. and Ottenhoff, T.H.M. HLA class II+ human keratinocytes present *Mycobacterium leprae* antigens to CD4+ Th1-like cells. *Scand. J. Immunol.*, 37:43-51, 1993.
- 65.- Nickoloff, B.J. Role of interferon- γ in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch. Dermatol.*, 124:1835-1843, 1988.
- 66.- Nüsslein, H. and Spiegelberg, H.L. Human interleukin-4 induces both IgE and IgG4 secretion *in vitro*. *J. Clin Lab. Anal.* 4:414, 1990.
- 67.- Pérez, H., Labrador, F. and Torrealba, J.W. Variations in the response of 5 strains of mice of *Leishmania mexicana*. *Int.J.Parasitol.* 9:27-32, 1979b.
- 68.- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceição-Silva, F. and Modlin, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.*, 91: 1390-1395, 1993.

- 69.- Pisa, P., Gennene, M., Soder, O., Otthenhoff, M., Hansson, M. and Kiessling, R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J. Inf. Dis.* 161:988-991, 1990.
- 70.- Pompeu, M.L., Freitas, L.A., Santos, M.L.V., Barral, A. and Barral-Neto, M. *Leishmania amazonensis* infection: A comparison of *in vivo* leishmanicidal mechanisms between immunized and naive infected BALB/c mice. *Exp. Parasitol.*, 74:169-176, 1992.
- 71.- Preston, P.M., Carter, R.L., Leuchars, E., Davies, A.J.S. and Dumonde, D.C. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of thymectomy on the course of infection of CBA mice with *Leishmania tropica*. *Clin.Exp.Immunol.*, 10:337-357, 1972.
- 72.- Preston, P. and Dumonde, D. Immunology of clinical and experimental leishmaniasis. In: *Immunology of parasitic Infection*, (eds S. Cohen and E.H. Sadum). Blackwell Scientific, Oxford. pp. 167-202, 1976^a.
- 73.- Preston, P. and Dumonde, D. Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and self-healing infections in the mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 2:126-, 1976b.
- 74.- Rodríguez, V., Centeno, M. and Ulrich, M. La respuesta serológica en la leishmaniasis cutánea americana en relación con inmunoterapia y quimioterapia. *Bol. Soc. Venezolana de Microbiol*, 13:10-12, 1993.
- 75.- Romagnani, S. Induction of Th1 and Th2 response: A key role for the "natural" immune response? *Immunol. Today*, 13:379-381, 1992.
- 76.- Rossi-Bergmann, B., Müller, I. and Godinho E.B. TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. *Infect.Immun.* 61:2266-2269, 1993.
- 77.- Russell, D.G. *Leishmania* and the macrophage. *Immunol. Today*, 11:74-75, 1990.
- 78.- Russo, D.M., Burns J.M.Jr., Carvalho, E.M., Armitage, R.J., Grabstein, K.H., Button. L.L., McMaster, W.R. and Reed, S.G. Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *J.Immunol.*, 147:3575-3580, 1991.
- 79.- Sadick, M.D., Heinzl, F.P., Holaday, B.J., Pu, R.T., Dawkins, R.S. and Locksley, R.S. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon- γ independent mechanism. *J.Exp.Med.*, 171:115-127, 1990.
- 80.- Salgame, P., Abrams, J.S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R.L. and Bloom, B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, 254:279-282, 1991.

- 81.- Sharples, C.E., Shaw, M.A., Castés, M., Convit, J. and Blackwell, J.M. Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens. *Vaccine*. 12:1402-1412, 1994.
- 82.- Scott, P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J.Immunol.* 147:3149-3155, 1991.
- 83.- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E. and Sher, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J.Exp.Med.*, 168:1675-1684, 1988.
- 84.- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L. and Sher, A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol.Rev.*, 112:162-182, 1989.
- 85.- Tapia, F.J., Rojas, E., Kraal, G., Mosca, W. and Convit, J. Immunocytochemical analysis of Langerhans cells in murine cutaneous leishmaniasis. *In The Langerhans Cell. Thivolet, J. and Schmitt, D (eds), John Libbey Eurotext Ltd., pp. 479-490, 1988.*
- 86.- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Acuña, L. and Mosca, W. Epidermal Langerhans cells in infectious diseases. *Histol. Histopath.*, 4:499-508, 1989.
- 87.- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Fernández, C.T. and Convit, J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol. Res.*, 26:239-247, 1993.
- 88.- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Fernández, C.T., Rondón, A.J., and Convit, J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp. Dermatol.*, 3:17-22, 1994^a.
- 89.- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G. and Sánchez, M.A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 15: 160-165, 1994b.
- 90.- Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G. and Sánchez, M.A. Epidermal immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. In "Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis", edited by Felix J. Tapia, Gisela Cáceres-Dittmar and Martín Sánchez, 139-152, 1996.
- 91.- Terabe, M., Kuramochi, T., Ito, M., Ueyama, Y., Katakura, K., Hama, N., Onodera, T. and Matsumoto, Y. CD4+ cells are indispensable for ulcer formation in cutaneous

leishmaniasis. *VIII International Congress of Parasitology, Izmir, Turquía, Octubre 10-14, 1994, Abstract Po35.16(791)* página 376, 1994.

92.- Theodos, C.M., Povinelli, L., Molina, R., Sherry, B. and Titus, R.G. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity *in vitro* and resistance to cutaneous leishmaniasis *in vivo*. *Infect.Immun.*, 59:2839-2842, 1991.

93.- Titus, R.G., Milon, G., Marchal, G., Vassalli, P., Cerottini, J.C. and Louis, J.A. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 17:1429-1433, 1987.

94.- Ulrich, M., Centeno, M., Mattout, A. and Convit, J. Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39:179-184, 1988.

95.- Ulrich, M. La respuesta humoral en la leishmaniasis Americana. *Dermatol.Venezol.*, 31:31-33, 1993.

96.- Ulrich, M., Rodriguez, V., Centeno, M. and Convit, J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin. Exp. Med.*, 100:54-58, 1995.

97.- Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Ann. Rev. Immunol.*, 8:253-278, 1990.

98.- Vieira, L.Q., Hondowicz, .BD., Afonso, L.C.C., Wysocka, M., Trinchieri, G., and Scott, P. Infection with *Leishmania major* induces interleukin-12 production *in vivo*. *Immunol.Lett.* 40:157-161, 1994.

99.- Vilcek, J., Henriksen-Destefano, D., Siegel, D., Klion, A., Robb, R.J. and Le, J. Regulation of IFN- γ induction in human peripheral blood cell by exogenous and endogenously produced interleukin-2. *J. Immunol.* 135:1851-, 1985.

100.- World Health Organization. *WHO Tech. Rep. Ser. No. 71*, 1984.

101.- Will, A., Blank, C., Röllinghoff, M., and Moll, H. Murine epidermal Langerhans cells are potent stimulators of an antigen-specific T cell response to *Leishmania major*, the cause of cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.*, 22: 1341-1347, 1992.

102.- Wu, C-Y., Demeure, C., Kiniwa, M., Gately, M. and Delespesse G. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J.Immunol.* 151:1938-1949, 1993.

103.- Young, R.A.. Stress proteins and immunology. *Ann.Rev.Immunol.* 8:401-420, 1990.

104.- Zhou, L-J., Schwarting, R., Smith, H.M. and Tedder, T.F. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cell, Langerhans cells, and

activated lymphocytes is a new member of the Ig Superfamily. *J. Immunol.*, 149: 735-742, 1992.

Leyenda de la Figura 1.

Participación de la epidermis en la respuesta inmunológica de la leishmaniasis tegumentaria americana. La leishmaniasis cutánea americana (LCL) posee la mayoría de los componentes asociados con un proceso inflamatorio activo: numerosas Células de Langerhans (LC); queratinocitos (KC) que expresan ICAM-1 (triángulos sólidos) y HLA-DR (círculos vacíos); una acumulación selectiva de linfocitos T epidermotrópicos (T) que expresan LFA-1 (rectángulos sólidos); y la generación de una respuesta Th1. La leishmaniasis cutáneo-mucosa (MCL) se caracteriza por una expresión exacerbada de ICAM-1 y HLA-DR por los KC, una ausencia de LC epiteliales, tráfico de linfocitos T epiteliales, y un granuloma mixto Th1/Th2. En la leishmaniasis cutánea difusa (DCL) los KC no expresan ICAM-1 o HLA-DR, existen pocas LC y hay una producción defectuosa de monoquinas. El granuloma es del tipo Th2 con muchos macrófagos HLA-DR+ (M) cargados de parásitos. *Tomado con permiso de Tapia y col., 1994b.*