

Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana

Andrés Vidal Cagigas

RESUMEN

La Leishmaniasis es una zoonosis producida por un protozoo flagelado del género *Leishmania* spp, que infecta los macrófagos del hospedero y se transmite por la picadura de un insecto flebotómico. Se caracteriza por un espectro de manifestaciones clínicas, histológicas e inmunológicas que dependen de la respuesta del huésped, la duración de la enfermedad y la especie involucrada. El conocimiento de la respuesta inmune, en la patogénesis de esta enfermedad, es importante para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas como la inmunoterapia, y para el desarrollo de vacunas que buscan prevenirla.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea americana, inmunología.

EPIDEMIOLOGÍA

La Leishmaniasis es un problema serio de salud pública, registrada en aproximadamente 88 países del mundo. Se calcula una prevalencia mundial de 12 millones de casos. Se cree que la incidencia anual oscila entre 1.5 a 2 millones de casos nuevos para las Leishmaniasis cutáneas y existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.¹ Se encuentra distribuida en América, desde el sur de Texas hasta el norte de Argentina y en las islas del Caribe. El número de casos se ha estimado en 59.300 por año y 59 millones de personas residen en áreas endémicas.² En Colombia en el año 2000 fueron reportados 3.898 casos de Leishmaniasis en todas sus formas, en 2001 se registraron 3.265 y 5.620 en el 2002, de

los cuales el 97.2% (5.464) correspondieron a casos de Leishmaniasis cutánea. Este aumento aparente no obedece a brotes de la enfermedad, sino al mejoramiento de la vigilancia de este evento y al ajuste de la información por parte de los departamentos.³

TAXONOMÍA

El vector es un insecto que pertenece a la familia *Phlebotominae*, géneros *Lutzomyia* y *Psychodopygus* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. En Colombia se han encontrado flebotomos desde el nivel del mar hasta 2.640 metros de altura. Se han descrito 125 especies de *Lutzomyia* incriminadas como especies vectoras: *Lu. trapi-doi* con *Leishmania panamensis*, *Lu. umbratilis* con *Leishmania guyanensis*, *Lu. spinicrasa* con *Leishmania braziliensis*, *Lu. evansi* con *Leishmania infantum*, y *Lu. flaviscuetela* con *Leishmania amazonensis*. Tienen un período de vida de 20 a 30 días, y se alimentan de jugos y sustancias azucaradas de las plantas; además, las hembras son hematófagas y se alimentan de sangre de varios vertebrados entre los que se encuentran el hombre, perros, zorros, roedores, perezosos, marsupiales, osos hormigueros, equinos, cerdos y aves de corral.⁴

El parásito causante de la Leishmaniasis es un protozoo que pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*, del cual se han categorizado dos subgéneros de acuerdo con el sitio en donde se multiplican en el interior del vector: el subgénero *leishmania*, cuyas especies se desarrollan en el intestino anterior y medio del insecto, y el subgénero *viannia*, cuyas especies se desarrollan inicialmente en el intestino posterior migrando luego a los intestinos medio y anterior. Estos subgéneros, a su vez, se dividen en complejos y estos últimos en especies, que son indistinguibles morfológicamente, pero se pueden diferenciar por métodos extrínsecos como el comportamiento biológico del parásito y la clínica de la enfermedad, o métodos intrínsecos más precisos y complejos como son el análisis isoenzimático, los anticuerpos monoclonales y la PCR. (Figura 1).^{1,4}

Andrés Vidal, RI Dermatología, Universidad del Valle, Cali.

Correspondencia: Hospital Universitario del Valle, Dermatología.

Teléfono: 556 0233. Fax: 558 5412, Cali, Colombia.

E-mail: andresvc75@hotmail.com

Immunología de la Leishmaniasis cutánea americana

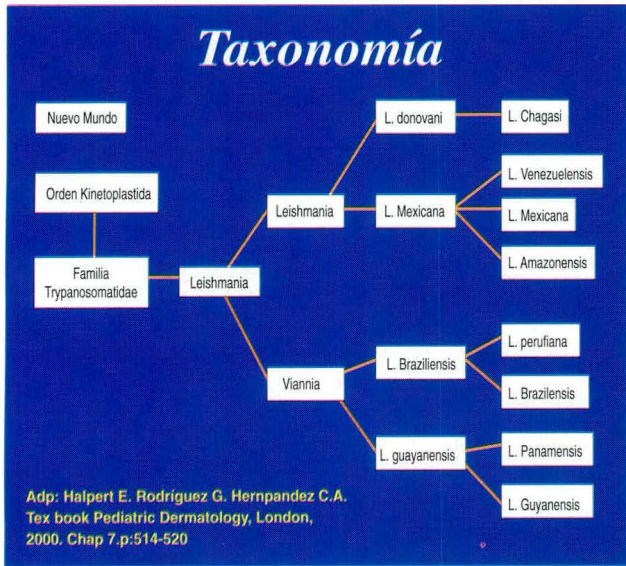


Figura 1. Clasificación taxonómica en el Nuevo Mundo.

En América todas las especies pueden causar lesiones cutáneas simples. Las lesiones de la mucosa son más características del subgénero *Viannia*, especialmente las especies *L.V. braziliensis* y *panamensis*, pero también pueden ser causadas por *L.V. guyanensis* y *L.L. amazonensis*. La forma difusa es poco común, causada por *L.L. mexicana* en Norteamérica, América Central y las islas del Caribe, y por *L. L. amazonensis* y *L. L. venezuelensis* en Suramérica. La lesión crónica de la oreja, conocida como “úlceras del chichlero”, vista en la península de Yucatán en México, es producida por *L. L. mexicana*.²

MORFOLOGÍA

El parásito tiene dos formas en su ciclo de vida: en el vector adopta la forma de promastigotes, que miden de 10 a 15 micras de largo y 3 micras de ancho, poseen un núcleo central, y un cinetoplasto terminal o subterminal de donde sale un flagelo que les permite movilizarse.⁵ En esta forma pueden ser observados en medios de cultivo mantenidos a una temperatura entre 23°C y 28°C. No existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, puesto que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. A pesar de ello, los medios más frecuentemente utilizados son los difásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN), y los medios

líquidos para cultivos de células de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con suero bovino fetal desactivado (10% a 30%).⁶

En el hospedero mamífero adoptan la forma de amastigotes y se localizan dentro de los macrófagos, son ovalados o redondeados, miden de 2 a 5 micras, no poseen flagelo, son inmóviles, tienen un núcleo con cariosoma central y un cinetoplasto. A la microscopía de luz y con tinción de Wright o Giemsa el citoplasma es azul claro, el núcleo de color púrpura y el cinetoplasto de violeta oscuro.⁵

CICLO DE VIDA

Las hembras del vector al picar rompen con sus piezas bucales varios capilares, formando una laguna de la cual succionan sangre y elementos tisulares de la dermis. Dentro de estos elementos se encuentran los macrófagos infectados con los amastigotes. Éstos llegan al intestino del insecto, donde el parásito es liberado de los macrófagos, y por un proceso de transformación se convierten en promastigotes y se multiplican por fisión binaria. Se denomina *promastigote nectomona* cuando se encuentra anclado a las microvellosidades del tubo digestivo, gracias a un flagelo muy largo; mide unas 10 micras y tiene el cinetoplasto muy cerca del núcleo celular. Al progresar hacia porciones anteriores del tubo digestivo del vector, el cuerpo se hace más redondo y el flagelo, rico en lipofosfoglicanos, se achata para facilitar la adhesión a las lectinas que revisten el tubo digestivo, el cinetoplasto está en posición anterior, carece de capacidad infectiva y se llama *promastigote haptomona*. Hacia los diez días de haber entrado en el vector pierde la adherencia por cambios del lipofosfoglicano, el flagelo se hace muy largo en comparación con el cuerpo, con una bolsa flagelar grande rellena de vesículas y material de secreción; deja de multiplicarse, pero recupera la infectividad y se sitúa de manera libre en la hipofaringe del vector listo para ser inoculado. Es el *promastigote metacíclico*.

Cuando las hembras infectadas pican a un hospedero mamífero inoculan en la dermis entre 10 y 200 promastigotes, muchos de los cuales son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares y eosinófilos; otros se fijan a receptores de los macrófagos dérmicos y son fagocitados.⁵ Dentro de los macrófagos se transforman en amastigotes y el mecanismo de salida no es claro; se ha aceptado que se multiplican rápidamente por fisión binaria rompiendo el macrófago, pero datos obtenidos por videomicroscopía sugieren que los amastigotes contenidos en las vacuolas se acumulan en la periferia de las células infectadas y se liberan en varias ho-

Inmunología de la *Leishmaniasis cutánea americana*

ras por un proceso que recuerda la exocitosis. Los parásitos libres pueden invadir células dendríticas y fibroblastos, así como nuevos macrófagos en los que se repite el proceso multiplicativo. A pesar de la evidencia por videomicroscopía de la presencia de parásitos en las células dendríticas y los fibroblastos, no se conoce el mecanismo y las moléculas involucradas en la invasión y supervivencia de los amastigotes en estas células.⁷

METACICLOGÉNESIS

Es el proceso que sufren los promastigotes en el intestino del vector, por el cual pasan de una forma no infectante o procíclicos, a una forma altamente infectante y resistente al sistema inmune del hospedero, denominándose metacíclicos. Este proceso también ocurre en cultivos.

En el vector o en los cultivos los promastigotes tienen una fase de crecimiento replicativa o logarítmica, y otra fase estacionaria donde no hay replicación. La metaciclogénesis se acelera durante la fase estacionaria y se correlaciona con la infectividad, pero *Leishmania* del subgénero *viannia* no ha mostrado una infectividad estrictamente relacionada con la fase estacionaria y la cinética de crecimiento y el punto de máxima infectividad varían entre las especies.

Desde el punto de vista morfológico, el primer paso en el desarrollo dentro del vector es el de amastigote a promastigote en 18 a 24 horas posterior a la ingestión. Los promastigotes se replican y pasan por diferentes estadios; en el subgénero *leishmania* se han descrito los promastigotes procíclicos, nectomónadas, haptomónadas, paramastigotes y promastigotes metacíclicos; estos últimos son más pequeños, con un flagelo largo, móviles y migran a la probóscide del vector para ser inoculados al hospedero mamífero en una nueva ingestión de sangre.

En la forma infectante o metacíclica ocurre la sobreexpresión de moléculas que se asocian con su virulencia, siendo las más conocidas el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína gp63. En el subgénero *leishmania*, el LPG se expresa en toda la superficie, formando un glicocalix; consta de cuatro dominios: a) un lípido de anclaje tipo liso-1- O-alquilfosfatidilinositol, b) un núcleo hexacárido, c) una unidad repetitiva fosforilada, y d) un dominio terminal conformado por un disacárido o trisacárido. Durante la metaciclogénesis el LPG sufre un incremento en su tamaño y modificaciones en la composición de los azúcares de las unidades repetitivas o del dominio terminal. El aumento en el tamaño se debe a una duplicación del número de unidades

repetitivas. La gp63 es una metaloproteasa que presenta polimorfismo entre las especies, y el aumento en la infectividad de los promastigotes está asociado con su expresión y grado de glicosilación que la hacen más estable.^{8,9}

Empleando técnicas para detectar genes expresados diferencialmente, se han identificado las siguientes moléculas que están sobreexpresadas en los promastigotes metacíclicos: el producto del gen B, los genes meta-1, mat-1, SHERP y HASP, pero sus funciones no están aún bien esclarecidas.

El promastigote debe ser capaz de vencer ciertos obstáculos en el vector, como por ejemplo las enzimas proteolíticas que digieren la sangre ingerida y una membrana peritrofica para poder alcanzar el epitelio intestinal. El LPG protege al parásito contra las enzimas proteolíticas y le permite al promastigote procíclico la adhesión al intestino del vector, función que se pierde en el promastigote metacíclico debido a modificaciones en los azúcares terminales y con cambios conformacionales de la molécula, pudiendo migrar a la probosis (Figura 2).^{8,9}

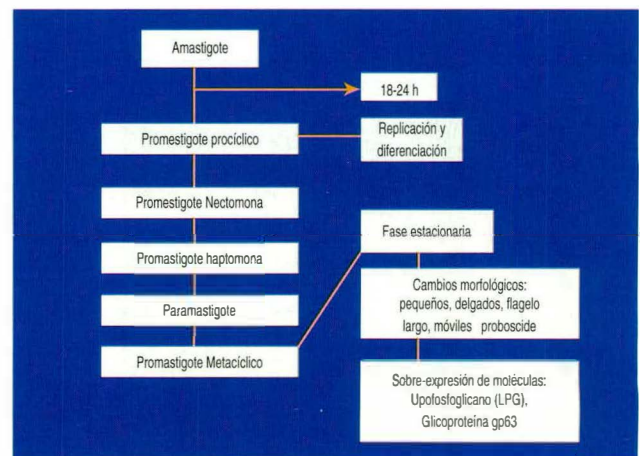


Figura 2. La metaciclogénesis es un proceso que ocurre en el interior del vector, por medio del cual los promastigotes se vuelven altamente infectivos y resistentes al sistema inmune.

INTERACCIÓN HUÉSPED-PARÁSITO

Cuando los promastigotes se inoculan intradérmicamente por la picadura del vector, son atacados por factores de defensa no específicos como los polimorfonucleares y el complemento, que son evadidos por el parásito por varios mecanismos: a) invasión rápida de los macrófagos, b) elementos presentes en la saliva del vector. Cuando se inyec-

Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana

ta un gran número de parásitos en ratones experimentales, la saliva aumenta marcadamente la infección comparada con la inyección de parásitos libre de saliva. Cuando el número de parásitos inyectados es alrededor de cien, el parásito no sobrevive, a menos que sea co-inyectado con la saliva del vector. El maxadilam (MAX) es un péptido presente en la saliva que aumenta la virulencia del parásito, actuando como un potente vasodilatador; se cree que actúa como un inmunomodulador, inactivando el complemento y retardando la respuesta mediada por células. En la infección experimental de ratones con *Leishmania major* se ha visto que la saliva incrementa la producción de IL-4, importante en la progresión de la enfermedad, y también aumenta la producción de prostaglandina E2, IL-10 e IL-6, que pueden inhibir la activación de los macrófagos, observándose que son menos capaces de producir TNF α , Óxido Nítrico (ON) y H $_2$ O $_2$, que son marcadores de activación; c) el lipofosfoglicano (LPG) bloquea el complejo de ataque a la membrana C5b-9; d) la glicoproteína gp63 transforma la fracción C3b del complemento en una forma inactiva C3bi; y e) proteínas cinasas sobrepresadas fosforilan la fracción C3 y no es hidrolizada a C3b y C3a (Figura 3).^{9,10}

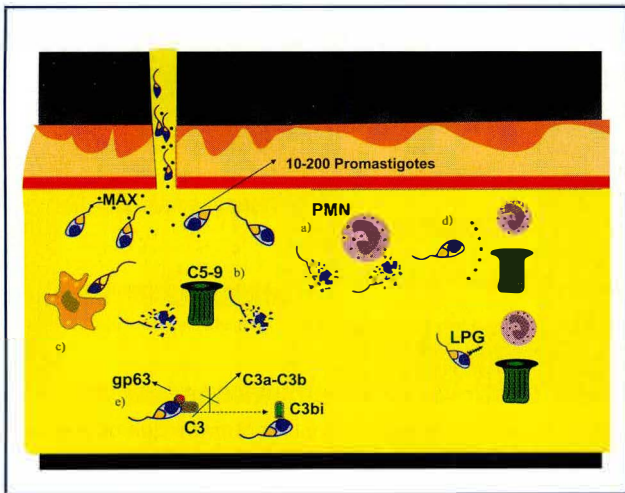


Figura 3. Los promastigotes se inoculan en la dermis del huésped donde son rápidamente destruidos por: a) polimorfonucleares neutrófilos y b) el complejo de ataque a la membrana C5-9 del complemento. El parásito se defiende: c) invadiendo rápidamente los macrófagos; d) por medio del péptido maxadilam (MAX) presente en la saliva del vector y el lipofosfoglicano (LPG), que bloquean los PMN y el C5-9; e) la glucoproteína gp63 fosforila C3 y no se hidroliza a C3a-C3b, y se transforma en C3bi, que es inactiva.

Con la activación del complemento por las vías clásica y alterna se forman C3b y C4b unidos por enlaces covalentes a las superficies del parásito y actúan como opsoninas, uniéndose al receptor específico para el complemento tipo 1 (CR1 o CD35) en los macrófagos, el cual actúa principalmente induciendo la fagocitosis. El promastigote sufre la fagocitosis tipo cierre, donde la unión a receptores dispara el reclutamiento adicional de receptores de la membrana alrededor con un reordenamiento del citoesqueleto, permitiendo la extensión de un pseudópodo que avanza a lo largo del organismo como un cierre, englobándolo. Se ha sugerido un mecanismo adicional de fagocitosis por enrollamiento, donde varios pseudópodos asimétricos se adhieren en diferentes partes del microorganismo. C3b es degradado proteolíticamente por una proteasa serina plasmática llamada Factor I en fragmentos C3bi, C3d y C3dg, que no participan en la activación del complemento, pero son reconocidos por receptores en los fagocitos. La fracción inactiva C3bi se une a los promastigotes por medio del LPG y la gp63, y se emplea para invadir los macrófagos a través de la unión al receptor para el complemento tipo 3 (CR3 ó MAC-1); este receptor es miembro de la familia de las integrinas y está conformado por una cadena α y una cadena β . La entrada del parásito por esta vía favorece su supervivencia dentro del macrófago, puesto que la ocupación del receptor no induce una respuesta oxidativa en los macrófagos. Otros receptores de los macrófagos que participan en la internalización de los promastigotes son: el receptor para la fracción Fc α de IgG (FcR α), el receptor para la fibronectina (FnR) y el receptor para la manosa y fucosa (FMR). Probablemente la interacción entre los múltiples receptores y los ligandos ocurre simultáneamente, dependiendo del estado de activación del macrófago (Figura 4).

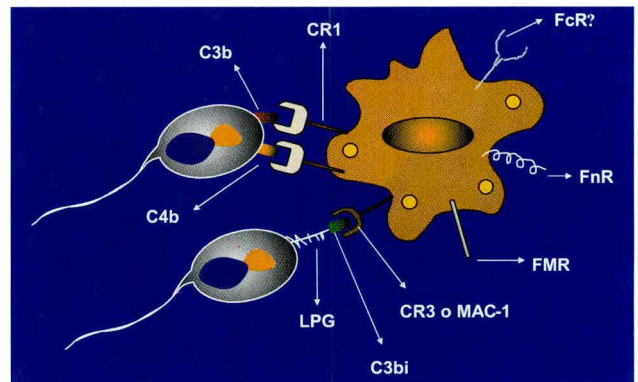


Figura 4. Receptores antigénicos y sus ligandos que permiten que el promastigote sea fagocitado por los macrófagos.

Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana

Dentro del macrófago los promastigotes se encuentran en fagosomas que se unen a lisosomas formando los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas (VP), que son un compartimiento ácido, rico en péptidos microbicidas y enzimas hidrolíticas. Aunque todas las VP comparten características tales como el pH ácido y la presencia de hidrolasas y lisosomas asociadas con las proteínas de membrana LAMP-1 y LAMP-2, también hay diferencias entre las VP producidas por diferentes especies de *Leishmania*; por ejemplo, las producidas por *L. mexicana* y *amazonensis* son grandes y contienen un gran número de amastigotes, mientras que las de *L. major* y *donovani* son pequeñas y con poco espacio alrededor de los amastigotes. No se ha establecido la importancia en cuanto a patogenicidad y virulencia de estas diferencias.

Un segundo sistema de ataque utilizado por el macrófago es la producción de radicales libres de oxígeno, para lo cual cuenta con la oxidasa fagocítica y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS). La primera es una enzima que se ensambla en la membrana plasmática y en la membrana fagolisosómica de los macrófagos activados, y su función es reducir el oxígeno molecular a productos reactivos intermedios de oxígeno (ROI), como los radicales superóxido que son tóxicos para los parásitos. La segunda es una enzima citosólica que es inducida por el INF- α y cataliza la conversión de arginina en citrulina, liberando ON que difunde libremente del citoplasma al fagolisosoma, activándose por el pH ácido y que al unirse con el peróxido o superóxido de hidrógeno, generados por la oxidasa fagocítica, forman radicales peroxinitrito capaces de destruir el parásito. La gp63 degrada las enzimas lisosómicas dañinas para el parásito y el LPG está involucrado en la inhibición de la proteínasasa C que está relacionada con la respuesta oxidativa del macrófago, e inhibe la fusión endosoma fagosoma con lo cual el parásito gana tiempo para transformarse en amastigote, sufriendo cambios bioquímicos y metabólicos que lo vuelven un parásito intracelular obligado, haciéndose más resistente a las enzimas hidrolíticas y al pH ácido del fagolisosoma.^{7,9-11}

Una vez liberados los amastigotes, el LPG está involucrado en la invasión de nuevos macrófagos; sin embargo, se ha visto que está ausente en los amastigotes de algunas especies como el *L. L. donovani*, y en las especies donde está presente es poco abundante comparado con los promastigotes. El proteofosfoglicano (PPG) podría ser importante para la invasión en aquellas especies deficientes en LPG. En la *L. L. amazonensis*, una molécula unida a la heparina y los glicosíngolípidos está implicada en el proceso

de invasión. En los macrófagos juega un papel muy importante el receptor Fc de la IgG, junto con CR3 y el receptor de manosa. Las células hospederas transportan los amastigotes desde el sitio inicial de la infección a los ganglios linfáticos de drenaje, donde los antígenos parasitarios se presentan a los linfocitos T vírgenes y donde los parásitos persisten indefinidamente. Probablemente son las células dendríticas las encargadas de esta función.⁷

Los macrófagos y monocitos se diseminan a través del sistema circulatorio y el sistema reticuloendotelial. Se ha observado el parásito en cultivos de sangre periférica, bazo y médula ósea de pacientes con diferentes formas de Leishmaniasis, causadas por especies habitualmente asociadas con enfermedad cutánea. El compromiso de las mucosas y la presencia de lesiones secundarias, fuera de la ruta del drenaje linfático desde lesiones primarias, soporta la diseminación hematológica. Una característica interesante de la Leishmaniasis es que, a pesar de la desaparición de la lesión y la resistencia a la reinfección, parásitos residuales permanecen en el huésped por períodos prolongados. Ellos pueden originar lesiones reactivadas por trauma o por inmunosupresión, aunque es más común la Leishmaniasis visceral en casos de reactivación en pacientes con sida. El trauma ocasionalmente ha precedido el desarrollo de lesiones desde las cuales se ha aislado la *Leishmania*, lo que sugiere que una respuesta inflamatoria no específica puede disparar la patogénesis de la enfermedad cutánea, estimulando a los queratinocitos a producir TNF α e IL-1, los cuales inducen la expresión de moléculas de adhesión intercelular, la extravasación de leucocitos y su acumulación en los sitios de inflamación, y probablemente el flujo de monocitos infectados que conducen a la reactivación de la enfermedad. También, en respuesta a estos mediadores proinflamatorios, las células de Langerhans podrían movilizar parásitos quiescentes presentes en la piel normal de individuos infectados y drenar en los nodos linfáticos, donde pueden disparar la respuesta inmune y la patogénesis.²

LA RESPUESTA INMUNE

El resultado clínico de la infección con *Leishmania* va desde una infección sin enfermedad o enfermedad leve, hasta una grave y amenazante para la vida, dependiendo de factores del parásito y el huésped; entre éstos encontramos la especie de *Leishmania* aislada. Sin embargo, es claro que una sola cepa puede producir más de una forma clínica de la enfermedad. Estas diferencias son probablemente influidas por la propia respuesta inmune del huésped.¹²

Convit y colaboradores realizaron infecciones experimentales en humanos, y establecieron que la respuesta del huésped es el principal determinante de la expresión de la enfermedad con la infección de *Leishmania* del complejo *mexicana*. Se inocularon voluntarios con microorganismos aislados de lesiones de pacientes con Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que desarrollaron lesiones cutáneas simples, autolimitadas y conversión en el test cutáneo. Estos experimentos, la baja ocurrencia de casos de LCD y los casos más frecuentes de Leishmaniasis cutánea localizada realzan la contribución del hospedero humano en el resultado de la infección.¹³

A. En el modelo murino

El modelo murino ha jugado un papel importante en el conocimiento de los mecanismos inmunológicos asociados con la enfermedad. La infección en ratones resistentes, como las cepas CBA, CH3 o C57BL/6 con *L. major* o *L. mexicana*, produce una lesión que cura espontáneamente en 20 a 30 semanas. En estos ratones la resolución de la infección es mediada por LT CD4 Th1 que producen IFN α , el cual induce la producción de ON en las células fagocíticas, principalmente los macrófagos, que conduce a la destrucción del parásito. La infección en estas cepas semeja la Leishmaniasis cutánea autolimitada en el humano. Por otro lado, la cepa susceptible BALB/c produce lesiones nodulares que no curan y evolucionan a la visceralización y producción de metástasis; desarrollan una respuesta Th2. Los linfocitos T CD4 pueden diferenciarse en dos subpoblaciones, Th1 y Th2, que producen diferentes citoquinas, siendo el IFN- γ , la IL-2 y el TNF características de las primeras, y las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y el factor transformante de crecimiento- β (TGF β) de las segundas, que provocan diferentes respuestas efectoras, participan en el desarrollo y expansión de las subpoblaciones respectivas, y ejercen una regulación cruzada sobre la subpoblación recíproca. Actualmente se sabe que los linfocitos T pueden expresar diversas combinaciones de citoquinas y que puede haber muchas subpoblaciones con patrones más heterogéneos de producción de citoquinas, pero generalmente las reacciones inmunitarias crónicas están dominadas por subpoblaciones Th1 y Th2. Estas subpoblaciones tienen distintos patrones de migración, por diferencias en su unión a las selectinas endoteliales y su capacidad de respuesta a diferentes quimioquinas.^{12,14}

La diferenciación de las subpoblaciones está determinada por los estímulos presentes de manera precoz durante las respuestas inmunitarias. Se ha propuesto la existen-

cia de unas subpoblaciones de células dendríticas CD1 y CD2, las cuales dirigirían las respuestas Th1 y Th2, respectivamente. En el desarrollo de Th1, ciertos patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs) activan las células dendríticas a través de los receptores Toll-like (TLRs) para secretar IL-12 y ésta, a su vez, activa los transductores de señales y al activador de transcripción tipos 4 y 1 (STAT4- STAT1) en el LT, que actúa sobre el factor de transcripción T-bet que activa los genes para producir IFN γ , IL-2 y TNF. En el desarrollo de Th2 la inhabilidad del antígeno para activar las células dendríticas y producir IL-12 lleva a la producción de IL-4 que, al unirse a su receptor en el LT, activa el STAT6, que estimula al factor de transcripción GATA3 para activar los genes que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 y factor transformante de crecimiento- β (TGF β) (Figura 5).¹⁵

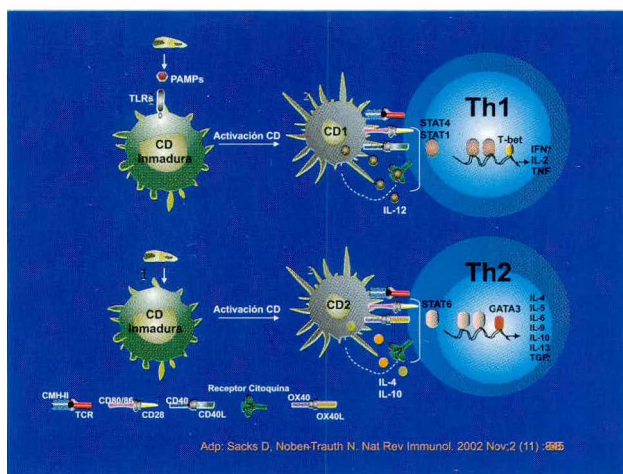


Figura 5. Diferenciación de sub-poblaciones de linfocitos TCD4.

También se involucran las moléculas coestimuladoras en la polarización de los Th. La activación de los LT requiere del reconocimiento del antígeno para el cual es específico, y de una señal coestimuladora dada por las células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas contienen pocos parásitos pero son altamente eficientes en estimular las células T específicas; esto es mediado a través de la interacción entre moléculas CD40 expresadas en la célula dendrítica y el ligando CD40L expresado en los LT, lo cual lleva a cambios en la

Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana

expresión del complejo mayor de histocompatibilidad, y las B7s (CD80 ó B7-1 y CD86 ó B7-2) que son expresadas en la célula dendrítica, y sus ligandos CD28 y CTLA-4 son expresados en los LT. Otras moléculas coestimuladoras encontradas en las células dendríticas son las OX40 (su ligando es el OX40L) y la B7-DC; esta última es una potente señal para la producción de IFN γ . Experimentalmente se ha demostrado que la expresión de B7-1 y 2 juntas y sus respectivos ligandos CD28 – CTLA-4, CD40 y B7-DC son importantes en la diferenciación hacia Th1. Por otro lado, B7-2 sola y OX40 son importantes en la diferenciación hacia Th2 (Figura 6).^{12,15}

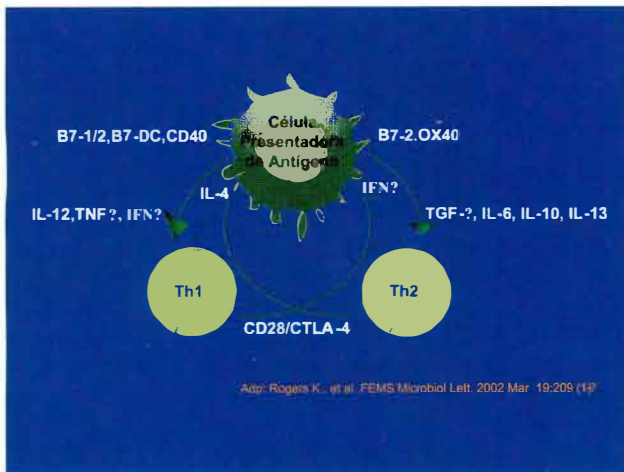


Figura 6. Las moléculas co-estimuladoras y sus ligandos participan en la diferenciación hacia Th1 o Th2.

La constitución genética del huésped también es un determinante importante en esta diferenciación de subpoblaciones, sin conocerse hasta el momento los genes que controlan los patrones de respuesta de los linfocitos T.¹⁶

En ambos tipos de ratones la inoculación de promastigotes metacíclicos de *L. major* resulta, dentro de minutos a horas posteriores a la infección, en la producción de IL-4 y otras citoquinas Th2. La respuesta temprana Th2 se debe en parte a la activación de una población oligoclonal de células T que expresan un receptor $\nu\beta 4\nu\alpha 8$ que reconoce el péptido LACK (homólogo del receptor para la proteína cinasa C activada). Estas células pueden ser predeterminadas para producir IL-4 e IL-10 (posiblemente son células reguladoras) (Figura 7).^{15,17}

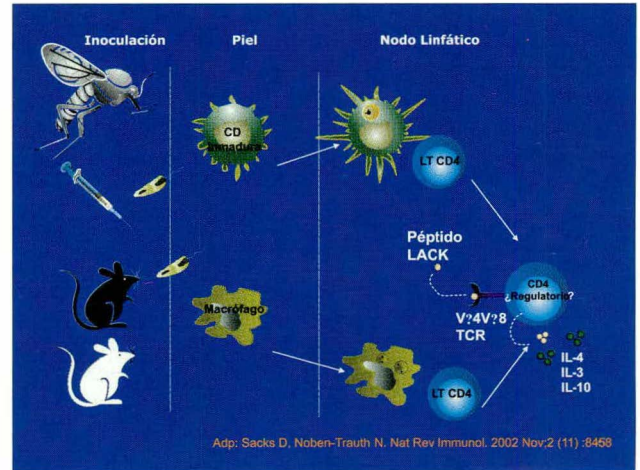


Figura 7. La respuesta temprana en ratones susceptibles y resistentes es de tipo Th2.

La evolución hacia la resistencia, donde los parásitos permanecen restringidos al sitio de infección y a los ganglios linfáticos de drenaje local, se debe a que: a) una sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras como CD40 en las células dendríticas y su unión al ligando CD40L en el LT virgen, estimula la producción de IL-12 por la célula dendrítica, uniéndose a su receptor (IL-12R) en el LT virgen, generando una respuesta Th1 con producción de niveles altos de IFN γ y TNF; b) estas citoquinas estimulan al macrófago produciendo la sobreexpresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS); c) los linfocitos CD8 cooperan con el control de la infección por la producción de IFN γ y su actividad citolítica, la cual está mediada por la unión Fas-Fas ligando (FasL); d) después de la cura, un número bajo de amastigotes persisten en el sitio de la infección en los macrófagos, células dendríticas y fibroblastos, llevando a la producción de IL-10, que regula los LT CD4 Th1 (Figura 8). La evolución hacia la susceptibilidad para *L. major* se debe a la falla de una redirección dependiente de IL-12 de la respuesta Th2 temprana, resultando en la expansión clonal y dominancia de LT CD4 Th2. La respuesta Th1 defectuosa puede deberse a varios mecanismos: a) diseminación de parásitos a las vísceras donde las condiciones Th2 son mantenidas. La clase de respuesta inmune en estos estudios puede basarse en la presencia de células dendríticas CD2 que expresen las moléculas coestimuladoras y citoquinas requeridas para una respuesta Th2; b) una expresión inestable de la cadena $\gamma 2$ del receptor de la IL-12

Inmunología de la Leishmaniasis cutánea americana

(IL-12R γ 2) sobre los LT CD4; c) las citoquinas Th2 producen un bloqueo de la diferenciación de LT CD4 Th1 y un condicionamiento de los macrófagos infectados a no responder a las señales necesarias para activar la muerte del parásito por medio del óxido nítrico; d) el reclutamiento de neutrófilos en el sitio de la inflamación puede inhibir la diferenciación hacia Th1 por la producción de TGF-B; e) la unión de anticuerpos específicos del parásito como IgG al receptor específico del macrófago (FcR) hace que éste produzca IL-10, la cual disminuye la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) (Figura 9).¹⁵

Los anticuerpos estimulados por las interleuquinas de las células Th2 no inducen fagocitosis ni activan el complemento eficazmente, antagonizan la acción del IFN- γ e inhiben la activación de los macrófagos, por lo que actúan como células supresoras controlando la reacción inflamatoria mediada por células Th1. Por esto el desarrollo de Th2 se asocia con un déficit de inmunidad celular frente a infecciones por microorganismos intracelulares. La IL-4 actúa sobre los linfocitos B, estimulando la producción de IgE que se une a los mastocitos. La IL-5 activa los eosinófilos. La IL-10 puede inhibir la producción de IFN γ y favorece el desarrollo de linfocitos Th2, pero se ha visto que ratones resistentes producen niveles más altos de IL-10 que los susceptibles, lo que sugiere que esta citoquina puede participar en una retroalimentación negativa para prevenir la sobreproducción de IFN γ y evitar un posible daño a los tejidos. La IL-6 puede promover el desarrollo de ambas respuestas Th1 y Th2.¹²

B. En el humano

La enfermedad es el resultado de la interacción entre factores como la especie de *Leishmania*, la virulencia y la respuesta inmune del huésped, que se cree es el mayor determinante y lleva a la presentación de diversas formas clínicas. La Leishmaniasis cutánea americana incluye: la Leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la Leishmaniasis mucocutánea (LMC) y la Leishmaniasis cutánea difusa (LCD). La LCL se caracteriza por una o pocas lesiones en piel, granulomatosas y ulceradas, con una marcada infiltración linfocitaria y pocos parásitos; tiende a resolver espontáneamente o con tratamiento en un período de meses o años. En el sitio de la infección los macrófagos secretan abundantes citoquinas inflamatorias como el TNF α , IL-2, IL-6 e IL-12 y proteína C3 del complemento. El granuloma presenta un patrón de citoquinas mixto con predominio de las citoquinas tipo Th1, y los niveles de subgrupos de linfocitos T inician mecanismos efectores, como la activación macrofágica y la lisis de células infectadas, claves en el control de la enfermedad. El parásito en la piel estimula la producción de IFN γ , que promueve la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y HLA-DR por los queratinocitos y la migración de linfocitos T epidermotrópicos. Las células dendríticas promueven una respuesta tipo Th1; una vez se elimina el parásito, se regulan las señales accesorias epidérmicas. A nivel sistémico, la LCL se caracteriza por un patrón más de tipo Th1 con niveles altos de IFN- γ , IL-2, TNF α , IL-6, IL-1 e IL-8 y niveles bajos de IL-4, IL-5 e IL-10.¹⁸⁻²⁰

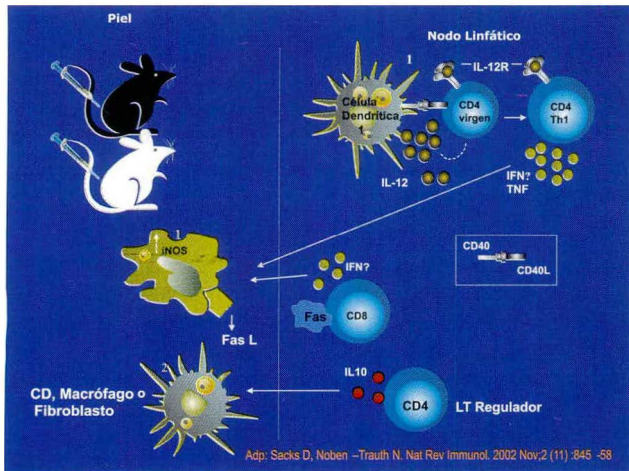


Figura 8. En los ratones resistentes la evolución es hacia una respuesta inmune de tipo Th1.

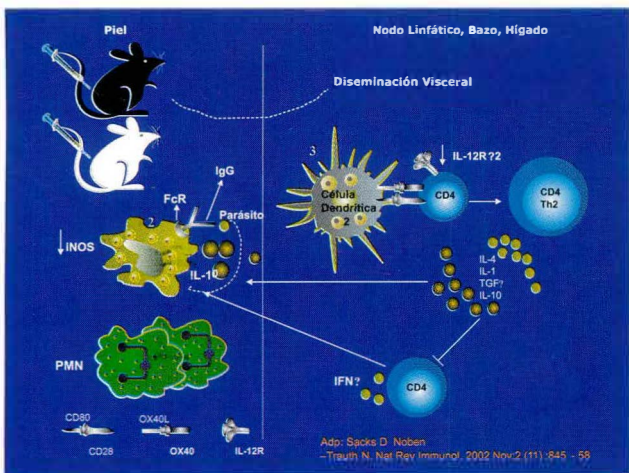


Figura 9. En los ratones susceptibles hay una incapacidad de virar hacia una respuesta de tipo Th1.

Inmunología de la *Leishmaniasis cutánea americana*

La Leishmaniasis mucocutánea (LMC) se caracteriza por úlceras en la piel, con gran infiltrado mononuclear y pocos parásitos, que desaparecen y años después reaparecen en las mucosas nasal, oral, faríngea y laríngea causando gran destrucción, lesiones que son de difícil tratamiento, con recidivas frecuentes. Esta forma de la enfermedad presenta una marcada hipersensibilidad hacia antígenos de leishmania a nivel tisular y sistémico, lo que se asocia con una enfermedad destructiva y crónica. En el granuloma se observa un patrón de citoquinas mixto Th1 y Th2, con niveles altos de IFN γ , IL-2, IL-4, IL-5, e IL-10. La mucosa puede comprometerse varios años después de que las lesiones de la piel han curado, el huésped permanece con una infección subclínica y el parásito y/o la memoria inmunológica son activados por re-infección, inmunosupresión o trauma, produciendo una respuesta inmunitaria crónica que lleva al daño tisular. La activación está asociada con la hiperproducción de IL-1 y TNF α por los queratinocitos, lo que aumenta la expresión de ICAM-1 y HLA-DR de los queratinocitos y células endoteliales, iniciando el tráfico de LT sin la necesidad de una presentación antigénica concomitante. La liberación de citoquinas por los queratinocitos promueve un estado proinflamatorio persistente con daño tisular. A nivel sistémico hay una combinación de respuesta Th1 y Th2; la Th2 predomina permaneciendo la enfermedad en estado crónico, con niveles altos de IL-2, IFN γ , TNF α e IL-5.¹⁸⁻²⁰

La Leishmaniasis cutánea difusa (LCD), caracterizada por la presencia de numerosos nódulos diseminados no ulcerados, con abundantes macrófagos, parásitos y pocos linfocitos, sufre recaídas después del tratamiento y es el resultado de una parálisis inmune inducida por antígenos específicos. En la LCD la epidermis posee pocas células de Langerhans CD1, y los queratinocitos fallan en expresar ICAM-1 y HLA-DR. Tanto en el granuloma cutáneo como a orden sistémico hay un predominio de citoquinas Th2, sin la producción de IFN γ ni IL-2, y niveles altos de IL-5 y TNF α , pero este último parece no contribuir a la curación de las lesiones en ausencia de una respuesta funcional de linfocitos T.¹⁸⁻²⁰

La Leishmaniasis diseminada (LD) es una forma emergente nueva de Leishmaniasis, vista desde la década pasada en el noreste de Brasil. Afecta más a hombres mayores de 19 años que trabajan en agricultura. Se caracteriza por presentar entre 10 y 300 lesiones que pueden ser una mezcla de pápulas, nódulos, úlceras y lesiones acneiformes, localizadas en dos o más partes del cuerpo, que se desarrollan en un período de varios días y puede haber en un 25% compromiso de las mucosas. La extensión rápida de

las lesiones, el compromiso de las mucosas y las manifestaciones prodrómicas como fiebre, escalofrío y malestar general, sustentan la hipótesis de diseminación sanguínea de la leishmania. Se encuentran niveles bajos de IFN γ y de TNF α y un incremento de la IL-10. Menos del 40% curan con un curso simple de antimonio pentavalente.²¹

En todas las formas clínicas se desarrolla una respuesta temprana de anticuerpos, que se mantiene durante todo el curso de la infección y desaparece únicamente después de que se ha eliminado la mayoría de los parásitos. Antígenos de *leishmania* como LPG y gp63 inducen la producción de anticuerpos específicos, principalmente de tipo IgM e IgG, pero las evidencias clínicas excluyen un papel protector, por lo cual los estudios serológicos se han realizado principalmente con fines diagnósticos, para el seguimiento de pacientes tratados y en estudios sobre los mecanismos inmunopatogénicos. La producción de anticuerpos varía y depende de la forma clínica, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección. Las formas LCL y LMC, que son infecciones intracelulares crónicas, cursan con títulos bajos de anticuerpos y pueden producir una respuesta importante de inmunoglobulinas de tipo IgM en la fase temprana y luego desarrollar una respuesta de tipo IgG. Los niveles de anticuerpos específicos de tipo IgA e IgE son bajos. En la LCD hay una respuesta humoral fuerte, con títulos de anticuerpos altos del tipo IgG. También se ha demostrado la presencia de diferentes subclases de anticuerpos entre las diferentes formas clínicas: en la LCL predominan la IgG1 e IgG3, en LMC la IgG3 y en la LCD la IgG4, que parecen estar relacionadas con las citoquinas secretadas por cada célula. La respuesta Th1 induce la producción de IgG2a y la Th2 la de IgE e IgG1.¹⁸⁻²⁰

Los linfocitos T CD8 cumplen un papel importante debido a su mecanismo citotóxico y a la producción de IFN γ y TNF α , que son citoquinas activadoras de macrófagos y, por lo tanto, favorecen la muerte del parásito. La IL-12 induce la producción de IFN γ por parte de los linfocitos B y células NK, al tiempo que aumenta la actividad citotóxica de estas células y de los linfocitos T CD8. Aunque las biopsias de piel presentan un alto porcentaje de células NK, su función no está muy bien aclarada.¹⁸⁻²⁰

Inmunoterapia

El tratamiento de elección de la Leishmaniasis son las sales de antimonio, como el N-metil glucamina (Glucantime®) y el estibogluconato sódico (Pentostam®), con una dosis que se calcula con base en el contenido de antimonio

pentavalente, de 20 mg/kg/día por veinte días, con una eficacia hasta del 95%. Generalmente son bien tolerados, pero se pueden presentar efectos colaterales como: malestar general, anorexia, vómito, náuseas, artralgias, mialgias, cefalea, letargia, alteración de las enzimas hepáticas, anemia y leucopenia, anormalidades electrocardiográficas como inversión de la onda T, prolongación del QT y depresión del segmento ST, y están contraindicados en el embarazo.²³

Un estudio realizado en Brasil mostró tasas de cura de 51% para *L.V. brasiliensis* y del 26% para *L.V. guyanensis*.²² Otro estudio realizado en Colombia comparó regímenes de 10 y 20 días con Glucantime® en LCL, causada por especies del subgénero *Viannia*, encontrando tasas de cura del 61% y 67%, respectivamente; ambos regímenes fallaron en niños menores de 5 años.²³

En algunos pacientes los efectos colaterales de los antimoniales obligan a suspender el tratamiento; además, hay pacientes que presentan deficiencia en la respuesta inmune específica contra *Leishmania*, como en el caso de la LCD, donde el Glucantime® suprime los parásitos de las lesiones, pero persisten los infiltrados macrofágicos, presentándose recidivas a las pocas semanas de suspender el tratamiento. Por lo anterior, se ha estudiado la posibilidad de tratar la Leishmaniasis con compuestos potenciadores de la respuesta inmune, proceso conocido como inmunoterapia.¹⁸

En Venezuela, Convit y colaboradores demostraron la eficacia de la inmunoterapia, con una mezcla de BCG más promastigotes muertos de *Leishmania*, en pacientes con LCL. Se demostró que pacientes con LCL infectados con *L. braziliensis* o *L. mexicana*, tratados con tres dosis de inmunoterapia, mostraban la misma proporción de curación que los pacientes que recibían tres ciclos de quimioterapia, sin causar los efectos colaterales de éstos.²⁴ Actualmente en Venezuela se ha estandarizado su uso y se asocia con la quimioterapia en las formas más severas de la enfermedad como son la LMC y LCD. El paciente recibe 6.4×10^8 promastigotes muertos de *leishmania* y BCG, según la reactividad del paciente a la tuberculina (<10 mm: 0.2 mg; 10 a 20 mm: 0.02 mg; > 20 mm: 0.01 mg), junto con el antimonio pentavalente. La inmunoterapia se aplica cada 6 a 8 semanas por un total de 6 veces.²⁵

Al recibir la inmunoterapia los LT CD4 son capaces de proliferar y producir IFN γ en respuesta a antígenos de *Leishmania* y *Mycobacteria*. El BCG activa en forma no específica a los macrófagos a producir IL-12 y TNF α . La IL-12 estimula a los NK a secretar IFN γ y TNF α . Los antígenos de *leishmania* son presentados a los LT CD4 para estimular

una respuesta específica contra el parásito. Los LT vírgenes se diferencian en células específicas tipo Th1. Ambas vías conducen a la activación macrofágica y a la eliminación de los parásitos y el control de la infección.¹⁸

Estudios en modelos experimentales han utilizado la IL-12, que tiene un papel importante en el inicio de una respuesta Th1 protectora con alta producción de IFN γ que, a su vez, inhibe la generación de una respuesta Th2. En ratones susceptibles, la IL-12, dada de forma temprana en la infección, previene el desarrollo de una respuesta Th2 y promueve el desarrollo de una respuesta Th1 dependiente de IFN γ que conduce a la cura.²⁶ También se ha utilizado la IL-12 en combinación con sales de antimonio, y se ha encontrado que, al reducir la carga parasitaria con el antimonio, hay un cambio en el patrón de la respuesta inmune de un tipo Th2 a una Th1.²⁷

Vacunación

Históricamente, la Leishmaniasis cutánea ha sido foco de múltiples intentos de vacunación, puesto que desde la Antigüedad se observó que individuos que sanaban de la enfermedad eran protegidos contra posteriores infecciones. Los beduinos exponían los bebés a picaduras por el insecto transmisor del botón de Oriente, para protegerlo de posteriores lesiones faciales. Otra práctica antigua en el Oriente Medio era puncionar la piel de un paciente sano con material infectado con lesiones de individuos enfermos.

Vacunas con organismos vivos

En 1908 Nicolle y Mancea establecieron las condiciones de cultivo favorables para promastigotes; desde entonces se inició la vacunación con organismos vivos (infección controlada).

Grandes estudios llevados a cabo en la URSS con promastigotes vivos (infección controlada) mostraron altos índices de éxito. Éste era dependiente de la viabilidad e infectividad del organismo inyectado. Se observó que organismos con poca virulencia ocasionaban hipersensibilidad retardada pero no protegían contra la infección natural.

Con la utilización de organismos vivos para la vacunación se observaron varios problemas:

- Desarrollo de lesiones grandes e incontrolables
- Exacerbación de enfermedades como psoriasis y otros trastornos cutáneos.
- Inmunosupresión: baja respuesta a vacuna contra difteria, pertussis y tétanos.

Immunología de la *Leishmaniasis cutánea americana*

Este tipo de vacunas fue descontinuado en 1990, por lo que se enfocaron los esfuerzos hacia la vacunación con organismos muertos.²⁸

Vacunas con organismos muertos

Extensas pruebas de vacunación en Brasil y Ecuador demuestran que vacunas con organismos muertos inducen protección significativa contra la infección natural. Los individuos inmunizados desarrollan respuesta específica de células T de tipo Th1, la cual indica un potencial para protección de la infección.

Convit y col, pioneros en vacunas con organismos muertos, usaron la combinación de promastigotes muertos de *L. mexicana* y *L. braziliensis* con BCG de forma tanto terapéutica como profiláctica. Algunos estudios han mostrado poca diferencia en la incidencia de la enfermedad entre un grupo vacunado con BCG sola y otro grupo con BCG y vacuna. Otros estudios refieren mayor eficacia con la vacuna combinada que con la BCG sola, sugiriendo que BCG únicamente tiene efecto inmunoestimulador transitorio.²⁸

Vacunas con organismos vivos atenuados

Datos iniciales indican que muchos parásitos clonados directamente de la lesión de piel en ratones fueron avirulentos; con estos hallazgos consideraron que la población de parásitos en las lesiones es heterogénea. Los organismos avirulentos, que son rápidamente destruidos por el hospedero, pueden contribuir más a la respuesta inmune que los organismos virulentos.

1. Se comprobó que antígenos de *L. mexicana* pueden ser presentados a células T por macrófagos que albergan parásitos muertos pero no por los que albergan parásitos viables. Los ratones inyectados con organismos avirulentos clonados fueron protegidos contra la infección con organismos virulentos derivados de la misma lesión. Este tipo de vacunación no se ha podido utilizar en humanos debido a que en ausencia de un claro perfil genético de cualquier organismo avirulento clonado hasta el momento puede haber el riesgo de reversión hacia un organismo con fenotipo virulento.
2. Ratones inyectados con parásitos atenuados por irradiación también se protegieron de la infección.
3. Avances en la manipulación genética que actúan sobre el genoma de *Leishmania*, introduciendo o eliminando genes, tienen el potencial para facilitar la fabricación de vacunas con parásitos vivos atenuados. Ahora es posible generar parásitos carentes de genes esen-

ciales para su sobrevivencia en el hospedero mamífero, tales como el gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (DHFR-TS). El uso de organismos atenuados es muy prometedor, puesto que simula estrechamente el curso natural de la infección y, por lo tanto, lleva a una respuesta inmune similar.²⁸

Vacunas sintéticas y recombinantes

El primer antígeno recombinante usado para vacuna contra la *Leishmania* fue el Leishmaniolyisin o gp63, proteína de membrana presente en los promastigotes de todas las especies de *Leishmania*. Los parásitos mutantes carentes de esta proteína son totalmente avirulentos. Desafortunadamente, en modelos humanos y animales la respuesta de células T a gp63 ha sido variable; sin embargo, cuando se detecta respuesta, ésta tiende a ser de tipo Th1.

El segundo candidato es un antígeno de membrana de función desconocida, el gp46/M2 o antígeno de superficie de parásito 2 (PSA-2). Al igual que gp63, pertenece a una familia de multigenes expresada en todas las especies de *Leishmania* excepto en *L. braziliensis*. Su presencia en tantas especies lo convierte en candidato atractivo para el desarrollo de una vacuna panleishmania.

La proteína ribosomal eucariótica leishmanial (LeIF) es también una candidata para vacuna, basada en su habilidad para inducir citoquinas tipo Th1 en humanos.

El homólogo al receptor para quinasa activada (LACK), que se expresa en promastigotes y amastigotes, ha demostrado buena protección, principalmente si se administra con IL-12 como adyuvante.²⁸

Vacunas con antígenos no proteicos

Estudios iniciales indican que glicolípidos como el LPG pueden brindar una excelente protección, que depende del uso de adyuvantes como liposomas o *Corinebacterium parvum*. Estos antígenos pueden ser reconocidos por células T y son presentados por las células dendríticas tipo 1.²⁸

Vacunas de DNA desnudo

Son una nueva aproximación que pretende revolucionar la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas. El gen codificado, candidato a servir como vacuna, es clonado y el DNA se inyecta directamente en el músculo o la piel. El plásmido de DNA es tomado por las células y trasladado al núcleo donde es transcrito a RNA y luego trasladado al citoplasma. La expresión del plásmido puede ser

muy baja, pero es suficiente para provocar una respuesta inmune de células T y B. Además de lograr la inducción de una buena respuesta, ésta es duradera, no requiere adyuvantes, y su tecnología de producción es simple.²⁸

Vacunas con proteínas del vector

Un descubrimiento reciente es que proteínas de las glándulas salivales del vector pueden usarse como vacuna contra la infección por *Leishmania major*. Valenzuela y colaboradores mostraron que la proteína SP-15 de la saliva del vector es marcadamente inmunogénica en el ratón.²⁹ Usando *Lutzomyia*, Morris y colaboradores encontraron que con el maxadilam (MAX) se logró una gran protección contra *L. major*, que se debe a una respuesta inmune mediada por células. La ventaja de esta aproximación es que teóricamente la vacunación contra proteínas de glándulas saliva-

les de un vector dado puede proteger al huésped de la infección contra cualquier patógeno que el vector transmita.³⁰

SUMMARY

Leishmaniasis is a zoonosis produced by a flagellated protozoan of the genus *Leishmania* spp, that infects the host's macrophages, and is transmitted by phlebotomine sandflies. Leishmaniasis is characterized by several clinical, histologic, and immunologic manifestations, depending on the host's immune response, the time of duration of this disease and the genus involved. The knowledge of immune responses in the pathogenesis of this disease is very important for the development of new treatment alternatives, such as immunotherapy and vaccines, trying to prevent it.

Key words: American cutaneous Leishmaniasis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Halpert E., Rodríguez G. Hernández CA. Leishmaniasis. En: Harper J, Oranje A, Prose N. Textbook of Pediatric Dermatology, London 2000:514-526.
2. Weigle K., Saravia N. Natural History, Clinical Evolution, and the Host-Parasite Interaction in New World Cutaneous Leishmaniasis. Clin Dermatol 1996; 14:433-450.
3. SIVIGILA. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. 2000-2002
4. Ministerio de Salud. Leishmaniasis. Plan Nacional de Control. Manual de Normas Técnico Administrativas. Bogotá 1994:37-64.
5. Klaus SN., Frankenburg SF. Leishmaniasis and other protozoan infections. En: Freedberg IM., Eizen AZ., Wolff K., et al. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. McGraw-Hill, New York 1999:2609-2619.
6. Kalter DC. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of Leishmaniasis. Dermatol Clin 1994; 12:37-50.
7. Handman E. Interaction of Leishmania with the host macrophage Trends in Parasitology 2002; 18: 332-334.
8. Turco S., Spät G., Beverley S. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. Trends in Parasitology 2001; 17:223-226.
9. Muskus C., Marin M. Metacicllogénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. Biomédica 2002; 22:167-177.
10. Robledo S., Wozencraft A., Saravia N. Human monocyte infection by *Leishmania Viannia panamensis*. J Immunol 1996; 152:1265-1275
11. Abbas AK. Inmunidad innata. En: Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. Inmunología Celular y Molecular, Madrid, McGraw-Hill 2002:280-302.
12. Rogers KA., De Krey GK., Mbow ML. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Microbiology Letters 2002; 209:1-7.
13. Convit J., Pinaridi ME., Rondon AJ. Diffuse cutaneous Leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. Trans R Soc Trop Med Hyg 1972; 66:603-610.
14. Melby P. Recent developments in Leishmaniasis. Current Opinions in infectious Diseases 2002; 15: 485-490.
15. Sacks D., Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to leishmania and resistance to leishmania major in mice. Nat Rev Immunol 2002; 2:845-858.
16. Abbas AK. Citoquinas. En: Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. Inmunología Celular y Molecular, Madrid, McGraw-Hill 2002:243-279.
17. Chang KP., Reed S., McGwire B., et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Tropica 2003; 85:375-390.
18. Castes M., Tapia F J. Inmunopatología de la Leishmaniasis tegumentaria americana. Acta Cientif Venez 1998; 49:42-56.
19. Agudelo S., Robledo S. Respuesta inmune en infecciones humanas por leishmania spp, IATREIA 2000; 13: 167-178.
20. Lenis AM. La respuesta celular inmune en la Leishmaniasis cutánea americana. Biomédica 1998; 18: 274-284.
21. Turetz M., Machado P., Ko A, et al. Disseminated Leishmaniasis: A new and emerging form of Leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. J Infect Dis 2002; 186:1829-1834.
22. Romero GA., Guerra MV., Paes MG., et al. Comparison of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania (V) braziliensis* and *L. (V) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am J Trop Med Hyg 2001; 65:456-465.
23. Palacios R., Ochoa MT., Osorio LE., et al. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimoniate for cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. Am J Trop Med Hyg 2001; 64:187-193.
24. Convit J., Castellanos P.L., Ulrich M., et al. Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of American cutaneous Leishmaniasis. J Infect Dis 1989; 160:104-115.

25. Rodríguez G. Leishmaniasis difusa. Revista Asociación Colombiana de Dermatología & Cirugía Dermatológica 2000; 8:33-40.
26. Heinzel FP., Shoenhaut DS., Rerko RM., *et al.* Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. J Exp Med 1993; 177:1505-1509.
27. Nabors GS., Alfonso LCC., Farrell JP. Switch from type 2 to type 1 helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with IL-12 and Pentostam. Immunol 1995; 92:3142-3146.
28. Handman E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 2001; 14:229-243.
29. Valenzuela J., Belkaid Y., Garfield M., *et al.* Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. J Exp Med 2001; 194: 331-342.
30. Morris R., Shoemaker C., David J., *et al.* Sandfly Maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. J Immunol 2001; 167:5226-5230.