

PARTICIPACION DE LOS LINFOCITOS T EN LA LEISHMANIASIS CUTANEA

Zoila Caridad Moros
Félix J. Tapia

Laboratorio de Biología Molecular
Instituto de Biomedicina
Caracas Venezuela

RESUMEN

El mecanismo exacto por el cual el sistema inmune interviene en la destrucción del parásito *Leishmania* no se conoce, sin embargo, se considera a la inmunidad mediada por células fundamental en la resolución de la infección.

Se ha demostrado en la leishmaniasis cutánea Americana, que la densidad de linfocitos T en sangre periférica es similar en los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutáneo mucosa (LCM), leishmaniasis cutáneo difusa (LCD) e individuos sanos. Sin embargo, la evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T (T cooperador/inductor, T supresor/citotóxico, T totales y linfocitos T Tac+) han mostrado diferencias en las diferentes formas de la enfermedad.

La respuesta linfoproliferativa frente a mitógenos y antígenos de *Leishmania* ha sido estudiada por Castés y col. (1983), demostrando que los pacientes anérgicos con LCD presentan un defecto de tipo específico ya que reaccionan en forma adecuada frente a mitógenos (PHA y Con A) pero defectuosamente frente a antígenos del parásito. Los pacientes con LCL y LCM presentaron respuestas altas frente a los antígenos del parásito y disminuidas frente a PHA y Con A.

Estas alteraciones en la respuesta proliferativa de las células T a los mitógenos sugieren un defecto en las células linfoides, ya que ambos mitógenos estimulan significativamente a los linfocitos.

Recientemente Cillari y col. (1986) demostraron que las células esplénicas de ratones BALB/c infectados, producen bajos y defectuosos niveles de IL-2 frente a Con A, cuando se comparó con los no infectados e igualmente observaron una actividad supresora para inhibir la IL-2 en células adherentes de ratones infectados, la cual fue restaurada al añadir indometacina, sugiriendo que la supresión de IL-2 es mediada por prostaglandinas producida por los macrófagos.

Todo esto parece indicar que la función de las células supresoras es la de bloquear la producción de IL-2, lo cual puede ser reforzado por los hallazgos de Modlin y col. (1985), quienes observaron una disminución de células productoras de IL-2 en los granulomas de pacientes con LCD. Es posible que la falla inmunológica en LCD esté relacionada con la actividad de células supresoras en las lesiones.

Modlin y col. (1985), sin embargo, también observaron en las lesiones de LCL, un número alto de linfocitos T CD8+ y sugieren que éstos no juegan una función supresora importante que pueda inhibir la producción de linfocinas esenciales para los linfocitos T y la activación macrofágica.

SUMMARY

The precise mechanism by which the immune system eliminates *Leishmania* is unclear. However, cell-mediated immunity is considered essential for the cure of the infection.

The number of peripheral blood T cells is very similar through out the clinical spectrum of American cutaneous leishmaniasis and to that of healthy individuals. However, the characterization of the different T cell subgroups (T helper, T suppressor-cytotoxic and Tac positive T cells) has revealed marked differences among the distinct clinical forms of the disease.

Castés et al. (1983) have demonstrated by lymphoblastogenesis analysis that patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) have an adequate response to mitogens but defective to *Leishmania* antigens. In addition, patient with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL)

present a high lymphoproliferative response to the parasite antigens but moderate to PHA and Con A.

Recently, Cillari et al. (1986) have shown that splenic cells isolated from *Leishmania* infected BALB/c mice produce low levels of IL-2 after stimulation with Concanavalin A. These authors also observed a suppressor activity by adherent cells which inhibit IL-2 and it is restored by addition of indomethacin. Results which suggest that IL-2 suppression in susceptible mice is mediated by macrophage-produced prostaglandins.

These findings are also supported by those of Modlin et al. (1985) which showed a decrease number of IL-2 producing T cells in the granulomas of patients with DCL. It is possible, that the immunological failure in DCL is associated to suppressor cells present in the lesions. However, this group also observed a high density of CD8 positive T cells in the lesions of LCL patients but suggest that these cells may not play an important suppressor role that could inhibit lymphokine production.

PALABRAS CLAVES: Inmunidad Celular en Leishmaniasis.

La leishmaniasis es una enfermedad crónica, producida por un protozoo flagelado perteneciente al género **Leishmania**, el cual, a través de un insecto vector (**Phlebotomus** en el viejo mundo y **Lutzomyia** en el nuevo mundo), es capaz de infectar una variedad de vertebrados, incluyendo el hombre.

"La infección en el hombre ocurre cuando éste se introduce en el hábitat natural del vector y es por ello que el hombre es considerado un hospedador accidental (Zuckerman & Lainson, 1977; Williams & Vasconcellos, 1978) (Figura 1).

Convit y Pinardi (1974) plantearon el concepto de la leishmaniasis cutánea americana (LCA), como una enfermedad espectral basándose en una correlación de factores clínicos, histopatológicos e inmunológicos. Estos investigadores consideran la existencia de dos formas polares (polo benigno representado por la leishmaniasis cutánea localizada, LCL y el polo maligno representado por la leishmaniasis cutánea difusa, LCD) con un área intermedia bastante amplia. (Figura 2).

Otra forma clínica de la enfermedad es la leishmaniasis cutánea mucosa (LCM), dentro de la cual se considera también la posible existencia de un espectro (Rondón y col., 1985).

Con respecto al curso de la leishmaniasis cutánea en modelos experimentales se ha encontrado la existencia aparente de dos polos en distintos modelos murinos, así como de formas intermedias en ratones moderadamente resistentes a la infección, que señalan que las distintas formas clínicas de la

infección están íntimamente asociadas a factores genéticos e inmunológicos.

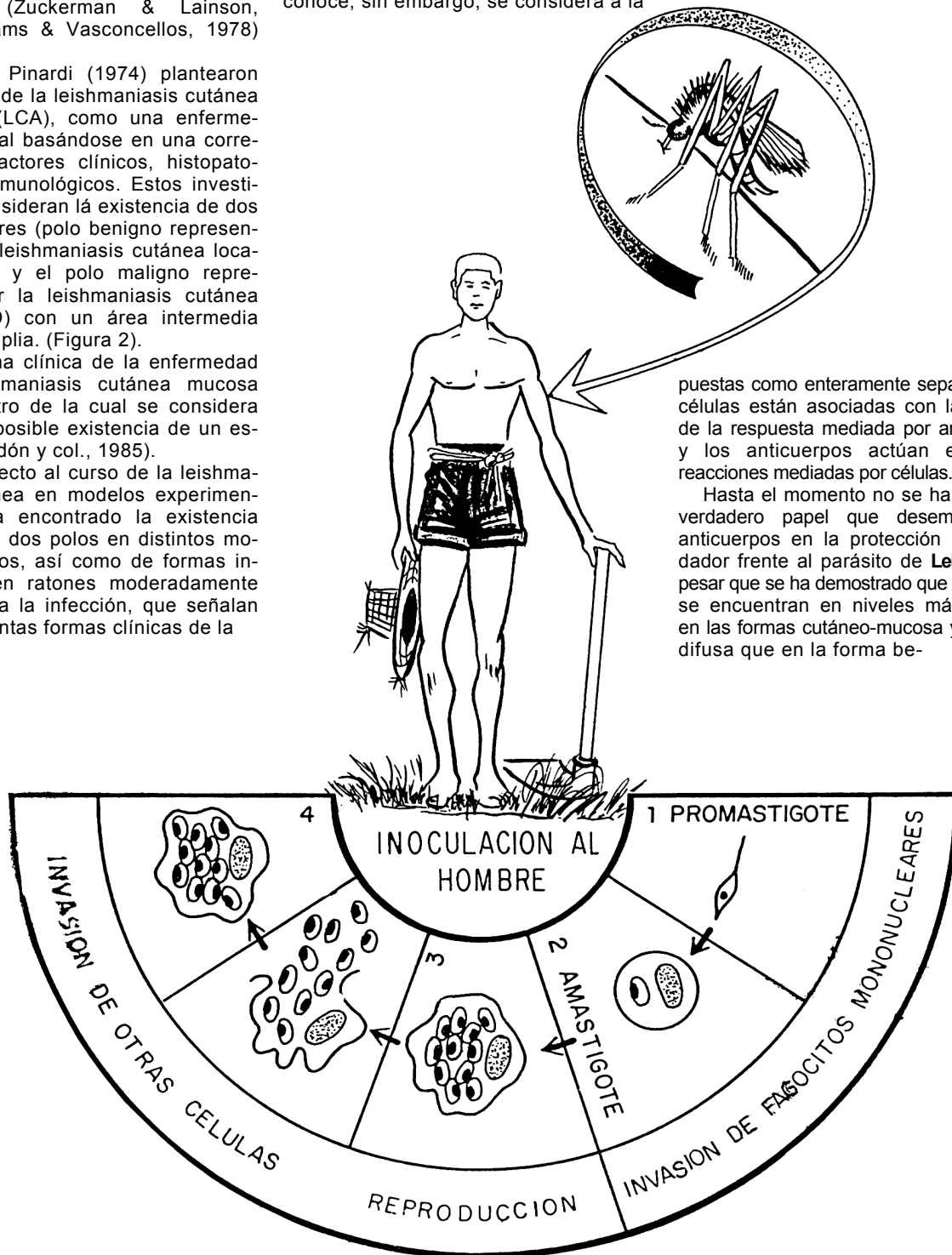
EVIDENCIA QUE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN LEISHMANIASIS ES PRINCIPALMENTE MEDIADA POR CELULAS

El mecanismo exacto por el cual el sistema inmune interviene en la destrucción del parásito **Leishmania** no se conoce, sin embargo, se considera a la

inmunidad mediada por células (IMC) fundamental en la resolución de la infección.

La IMC describe reacciones localizadas a organismos, usualmente patógenos intracelulares, mediadas por linfocitos y fagocitos más que por anticuerpos (inmunidad humoral). Actualmente se sabe que ambos mecanismos inmunes están íntimamente relacionados.

No es posible considerar ambas res-



puestas como enteramente separadas. Las células están asociadas con la iniciación de la respuesta mediada por anticuerpos, y los anticuerpos actúan en algunas reacciones mediadas por células.

Hasta el momento no se ha definido el verdadero papel que desempeñan los anticuerpos en la protección del hospedador frente al parásito de **Leishmania**, a pesar que se ha demostrado que los mismos se encuentran en niveles más elevados en las formas cutáneo-mucosa y cutáneo-difusa que en la forma be-

nigna de la infección LCL (Bray y col. 1965; Convit & Pinardi, 1969; Yarzabal y col., 1979).

Una correlación entre la IMC a los antígenos de *Leishmania* y la resistencia a la infección se ha demostrado en numerosos estudios clínicos y experimentales (Preston & Dumonde, 1976; Arredondo & Pérez, 1979; Wyler y col., 1979).

En la infección humana, los estudios, que se han realizado se basan principalmente en la reacción de HT (leishmanina o prueba de Montenegro), generalmente aceptada como una respuesta de IMC.

Evaluaciones clínicas e histopatológicas de las lesiones han indicado que en los pacientes con LCL el desarrollo de una respuesta específica está relacionada con la activación de un mecanismo de inmunidad celular (Zuckerman, 1975; Preston & Dumonde, 1976), el cual pareciera estar ausente en los pacientes con LCD (Turk & Bryceson, 1971; Convit y col., 1972). Por otra parte, los pacientes con LCM a pesar de presentar una alta respuesta de IMC, ésta no parece ser la adecuada, contribuyendo a la patología de la enfermedad (Convit & Pinardi, 1974; Castés y col., 1983).

La función de los linfocitos Ten la curación de las lesiones cutáneas fue examinada por Mitchell y col. (1980) en ratones CBA/H y C57BL/6, a los cuales se les removió el timo. Los resultados demostraron una recuperación de la infección cuando a estos animales se les transferían linfocitos T de ratones singénicos sanos.

Igualmente la importancia de los nódulos linfáticos que drenan las lesiones en la diseminación de la leishmaniasis cutánea ha sido demostrada en varios modelos experimentales (Kadivar & Soulsby, 1975; Poulter & Randolph, 1982; Reed y col. 1986). En líneas generales la remoción de los nódulos linfáticos antes de la infección en ratones resistentes permitió el desarrollo de lesiones primarias similares a las observadas en ratones susceptibles. En los experimentos de Reed y col. (1986) ratones C57BL/10 altamente resistentes y DBA/2 de resistencia intermedia desarrollaron metástasis, perdieron su respuesta de HT a *Leishma-*

nia y algunos de los animales murieron. En estudios previos ya Scott & Farrel (1982) habían demostrado que ratones resistentes C57BL/6 inoculados con *L. major* por vía intravenosa evitando así el drenaje linfático local morían de la infección.

Estos resultados sugieren que el control inmunológico al comienzo de la infección por *Leishmania* en ratones, depende de una actividad linfocitaria local que incluye la producción de monocinas y linfocinas e interrelaciones celulares que inhiben la replicación intracelular del parásito.

En otro tipo de experimentos, Giannini (1986) investigó la influencia de la irradiación UVB (luz ultravioleta espectro B) en el desarrollo de la leishmaniasis cutánea. Para ello irradió ratones medianamente resistentes B10.129 en el sitio de inoculación. La baja dosis de UVB utilizada (15 mJ/cm²) aparentemente afecta la función de las células asociadas con el sistema inmune de la piel por ejemplo células de Langerhans, linfocitos T, macrófagos, etc. Los resultados mostraron sorprendentemente una supresión de las lesiones en ratones irradiados, sin embargo, el número de parásitos en lesio-

nes fue similar en los ratones irradiados y en los controles. Estos resultados reafirman que alteraciones de tipo local en el sistema inmune de la piel, en la primera fase de la infección leishmánica influye en la respuesta inmune y el desarrollo subsecuente de la enfermedad clínica.

Giannini (1986) propone que la IMC en leishmaniasis tiene dos componentes, uno que ofrece protección y el otro que media la destrucción celular.

CARACTERÍSTICAS DE LOS LINFOCITOS EN LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR LEISHMANIA

a. HIPERSENSIBILIDAD TARDIA Y LEISHMANIASIS

En la clasificación de hipersensibilidad sugerida por Coombs y Gelj (1975), la hipersensibilidad tardía (HT, hipersensibilidad mediada por células o tipo IV) es usada para describir todas aquellas reacciones de hipersensibilidad las cuales toman más de 12 horas en desarrollarse (Roitt y col., 1985).

Existe evidencia que la resistencia adquirida a patógenos intracelulares como son *Salmonella typhimurium*,

LEISHMANIASIS CUTANEA. ESPECTRO

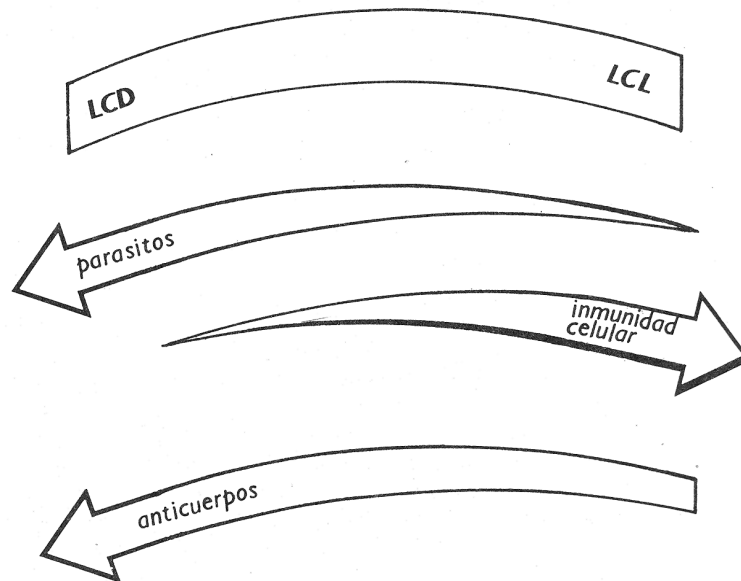


Fig. 2

Listeria monocytogenes, **Mycobacterium leprae** y **L. major**, están correlacionados con el desarrollo de una reacción de HT (Turk, 1975). La reacción de HT, es clásicamente definida como provocada específicamente, desarrollando reacciones celulares mixtas que involucran principalmente linfocitos y macrófagos y es independiente de los anticuerpos circulantes.

En el hombre el desarrollo de la reacción de HT a los antígenos de **Leishmania** (leishmanina o prueba de Montenegro) ha sido caracterizado en diversas formas clínicas de la LCA (Convit y col., 1972; Convit & Pinardi, 1974; Castés y col., 1983), observándose que los pacientes con LCL y LCM presentan una reacción de HT positiva frente a los antígenos específicos de **Leishmania**, siendo la intensidad de la reacción mayor en pacientes con LCM. Por el contrario los pacientes con LCD no dan pruebas intradérmicas positivas a estos antígenos.

El desarrollo de la reacción de HT a los antígenos de **Leishmania** es paralela a la curación de la lesión cutánea y es un prerrequisito en la adquisición de un estado de inmunidad protectora (Convit y col. 1972).

El desarrollo de la inmunidad protectora en ratones resistentes C57BL/6 infectados con **L. mexicana** fue estudiado por Pérez y col. (1981) quienes demuestran que la inmunidad protectora a la reinfección se adquiere antes que sea efectiva la curación de la lesión primaria, y es paralela con el desarrollo de la respuesta de HT específica al antígeno.

Como ha sido señalado en otras funciones mediadas por linfocitos T, existe restricción por antígenos del MHC en la inducción a la respuesta de HT. Por ejemplo, los linfocitos T no pueden mediar reacciones de HT cuando se inoculan por transferencia adoptiva a recipientes MHC incompatibles (Miller y col., 1975).

Milon y col. (1986) inocularon ratones BALB/c con una mezcla de células de nódulo linfático de ratones sensibilizados y **L. major**, observando que el pretratamiento de las células del nódulo linfático con anti-Thy-1 (anticuerpo dirigido a linfocitos T totales) más Complemento, abolía la capacidad de estas células de transferir HT. Tam-

bien observaron que al inyectar ratones infectados con células del nódulo linfático inmunes a **L. major** y glóbulos rojos de carnero no se observaba reacción de HT. Esto demuestra que la reacción de HT es una consecuencia de la interacción entre los linfocitos T "específicos" y el antígeno que provoca el reclutamiento de los leucocitos sanguíneos que van a intervenir en la reacción.

Estudios similares en modelos experimentales han demostrado que las reacciones de HT son mediadas por linfocitos T circulantes, que generalmente exhiben el fenotipo Lyt 1+ (anticuerpo que en un principio se creía distinguía linfocitos T cooperadores, hoy caracterizados por el L3T4). Vadas y col. (1976) caracterizaron este grupo celular, al tomar células de nódulos linfáticos de ratones CBA y someterlas a tratamiento con diferentes anticuerpos más Complemento. Cuando las células fueron tratadas con suero anti Lyt-1 y Complemento, su habilidad de transferir HT fue abolida sin embargo, el tratamiento con anti Lyt2 y Complemento no afectó la función.

Otros investigadores han demostrado que la inoculación de **L. enriettii** en el sitio donde previamente existía una reacción de HT provocada por BCG o dinitroclorobenceno, inhibía drásticamente el desarrollo de la lesión (Behin y col., 1978). Debido a que las reacciones de HT se caracterizan por una infiltración de linfocitos y macrófagos, el mismo grupo de investigadores (Mauel y col., 1978) ha sugerido que los macrófagos activados participan en la destrucción del parásito **Leishmania**, y que la reacción de HT provoca el reclutamiento y activación de los macrófagos al sitio de la reinoculación y la virtual eliminación de los parásitos.

Howard y col. (1980) han sugerido que la susceptibilidad en cepas de ratones congénitos y la persistencia de las lesiones en los ratones resistentes están fuertemente correlacionadas con una análoga disminución de la reacción de HT. En sus experimentos, algunas cepas de ratones congénitos e híbridos Fi, fueron infectados y su reacción de HT al antígeno soluble de **L. major** fue examinada a diferentes intervalos de tiempo. Los ratones BALB/c desarro-

laron niveles variables de HT durante el inicio de la infección, pero esta reactividad disminuye progresivamente por una supresión antígeno específica paralela a la fuerte inhabilidad de estos ratones de manifestar una efectiva resistencia a la infección por **L. major**. En contraste los ratones resistentes a la infección (CBA, C57BL/6 e híbridos Fi: BALB/c x C57BL/6) uniformemente desarrollaron altos niveles de HT, la cual persistió después de la infección.

b. RESPUESTA LINFOCITARIA ESPECIFICA Y NO ESPECIFICA

Los linfocitos de sangre periférica proliferan cuando se cultivan in vitro en presencia de mitógenos, antígenos y células alogénicas. Esta propiedad recibe el nombre de blastogénesis o transformación blástica. En su preparación hacia la división celular, sintetizan ADN, propiedad que permite la determinación in vitro de la capacidad proliferativa al añadir bases nucleares radioactivamente marcadas, previamente al pico de la mitosis celular. En leishmaniasis el uso de mitógenos permite evaluar la función linfocitaria para cada forma clínica.

Los mitógenos más utilizados son las lectinas, que estimulan en forma no específica la linfoblastogénesis de múltiples clones celulares (respuesta policlonal). Principalmente son utilizados: Fitohemaglutinina (PHA, derivada del **Phaseolus vulgaris**) y Concanavalina A (Con A, derivada de la **Canavalia ensiformis**). Ambas lectinas estimulan principalmente linfocitos T, pero existen evidencias experimentales que indican que cada una de ellas actúa sobre subgrupos diferentes de los mismos. La PHA estimula preferencialmente linfocitos T cooperadores/inductores CD4+ (Reinherz y col., 1979; 1980). El mitógeno Con A, por el contrario, parece estimular principalmente a los linfocitos T supresores/citotóxicos CD8+ (Nath y col. 1979).

También son utilizados mitógenos que estimulan selectivamente linfocitos B, como es el lipopolisacárido (LPS) derivado de la pared celular de **Escherichia coli**.

El estado de inmunocompetencia por transformación linfoblástica en la

LCA ha sido estudiado por Castés y col. (1983), encontrando importantes diferencias en las distintas formas clínicas.

Estos investigadores demostraron que la respuesta proliferativa frente a PHA en pacientes con LCL, y particularmente en pacientes con LCM, fue significativamente menor que la presente en los individuos aparentemente sanos. La respuesta proliferativa frente a Con A en pacientes con LCL y LCM fue muy similar a la de individuos sanos. Resultados que coinciden con los de Wyler y col. (1979) y Petersen y col. (1984). En pacientes con LCD, encontraron una respuesta frente a PHA y Con A normal, coincidiendo con Petersen y col. (1982).

Una disociación entre la respuesta a estos dos mitógenos también ha sido demostrada en leishmaniasis experimental por Arredondo y Pérez (1979). Los investigadores infectaron ratones BALB/c con amastigotes de *L. mexicana* y siguieron la cinética de la infección utilizando PHA, Con A y LPS. Entre la cuarta y octava semana de la infección los ratones manifestaron un aumento en la proliferación de las células esplénicas a los mitógenos utilizados. Después de este período la respuesta frente a PHA y LPS disminuyó progresivamente, mientras la proliferación frente a Con A aumentó significativamente.

Sadick y col. (1986) confirmaron estos resultados en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. major*, cultivando células del nódulo linfático frente a Con A. Se observó una disminución de la proliferación en presencia de Con A al inicio de la infección, pero ésta fue recuperada en ambas cepas de ratones y persistió durante la infección.

Las alteraciones en la respuesta proliferativa a los mitógenos, PHA y LPS, sugieren un defecto en las células linfoides, ya que ambos mitógenos estimulan significativamente linfocitos T y B respectivamente. El aumento en proliferación de las células esplénicas frente a Con A observado en los animales infectados, podría ser el reflejo de una expansión de la subpoblación de linfocitos T supresores/citotóxicos los cuales preferencialmente responden a este

mitógeno (Stobo & Paul, 1973).

La respuesta específica frente a antígenos de *Leishmania* *in vitro*, también fue evaluada por Castés y col. (1983). Para ello los investigadores midieron la respuesta linfoproliferativa de los pacientes con LCL, LCD y LCM, utilizando extractos obtenidos de dos cepas diferentes de parásitos: *L. mexicana* pifanoi y *L. braziliensis* guyanensis.

Cuando el antígeno de *L. braziliensis* fue analizado, los pacientes con LCM manifestaron una fuerte respuesta linfoproliferativa. Los pacientes con LCL presentaron una moderada reactividad linfocitaria, mientras que en los pacientes con LCD fue notable la ausencia total de respuesta *in vitro* a los antígenos de *Leishmania*, coincidiendo estos resultados con los reportados previamente por Ulrich y col. (1979). Los resultados obtenidos utilizando antígenos de *L. mexicana* fueron básicamente comparables.

Varios investigadores (Turk y col. 1971; Castés y col., 1983) demuestran la existencia de una correlación entre las pruebas de transformación linfoblástica y la reacción de inmunidad mediada por células *in vivo* al medir H T.

La respuesta específica de la IMC ha sido también evaluada por Sadick y col. (1986) en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. major*. Para ello evaluaron la respuesta linfoproliferativa frente a antígenos de *Leishmania* de las células del nódulo linfático que drenaban el sitio de infección. Ambas cepas de ratones manifestaron un aumento en proliferación al inicio de la infección; pero a partir de la tercera semana se observó una marcada disminución en la respuesta linfoproliferativa. Sin embargo, los ratones C57BL/6 recuperaron su reactividad aproximadamente a partir de la sexta semana, mientras que los ratones BALB/c nunca presentaron recuperación en su reactividad a los antígenos de *Leishmania*. Estos resultados demuestran que los linfocitos T de ratones susceptibles a la leishmaniasis presentan una respuesta defectuosa frente a los antígenos del parásito.

Otros investigadores han demostrado que los ratones BALB/c también fa-

llan en controlar la infección provocada por *L. dionovani* (Bradley & Kirkley, 1972) y de que igualmente desarrollan respuesta celular y humoral a otros antígenos incluyendo otros parásitos (Lamon y col., 1972; 1973). La ausencia de respuesta proliferativa frente a *Leishmania* se ha postulado como un evento específico que está relacionado con un defecto inmunológico del hospedador (Pérez y col., 1978).

En forma similar la ausencia de respuesta específica en pacientes con LCD, también se ha reportado como un defecto inmunológico del hospedador, más que a la infección por distintos tipos de *Leishmania*. Una evidencia en favor de esta hipótesis ha sido presentada por Convit y col. (1972) al demostrar que la inoculación accidental con material de una lesión difusa en una asistente de su laboratorio, ocasionó una lesión típica de LCA (leishmanina positiva), la cual desapareció con tratamiento y no mostró signo de enfermedad después de ocho años de seguimiento.

Existen ciertas evidencias que señalan que la LCL es causada por *L. braziliensis*, y la LCD por *L. mexicana* (Alexander & Russell, 1985; Rondón y col., 1985). Sin embargo, debido a que no se ha detectado en el Nuevo Mundo ningún caso de LCD provocada por *L. braziliensis*, el argumento sobre si las diferentes formas clínicas son el producto de la infección por diferentes especies, continúa siendo un aspecto de interés sobre el cual deben dirigirse futuras investigaciones.

Convit y col. (1972) igualmente estudiaron a pacientes con LCD para determinar si el defecto inmunológico en estos pacientes era específico para el parásito *Leishmania*, o si era un defecto generalizado que incluía otros antígenos. Para este fin, pacientes con LCD fueron inyectados intradérmicamente con 0,1 ml. de lepromina (160 x 10² bacilos de *Mycobacterium leprae*/ml) y con derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium tuberculosis* simultáneamente. En estas pruebas la respuesta de estos pacientes no difirió de la respuesta obtenida en individuos sanos sometidos al mismo tratamiento, confirmando el defecto específico de los pacientes con LCD de responder a *Leishmania*.

c. CARACTERIZACION LEUCOCITARIA EN SANGRE PERIFERICA DE LAS DIFERENTES FORMAS DE LA ENFERMEDAD HUMANA.

Se ha demostrado en la LCA, que los niveles de linfocitos T formadores de rosetas son comparables entre los pacientes con LCL, LCM y LCD, y un grupo de individuos aparentemente sanos (Castés y col., 1983; Carvalho y col., 1985).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie en los linfocitos T y otras subpoblaciones leucocitarias ha permitido la identificación de diferentes fenotipos celulares provenientes de sangre periférica y de tejido. Localización que se ha hecho utilizando procedimientos inmunocitoquímicos como la inmunofluorescencia y la inmunoperoxidasa. Se ha sugerido que la caracterización de estos fenotipos celulares pudiera inferir propiedades funcionales de los mismos (Engleman y col., 1983; Matsumoto y col., 1985).

Una evaluación de las principales subpoblaciones de linfocitos T cooperadores/inductores, T supresores/citotóxicos, T totales y linfocitos T capaces de expresar el receptor a Interleucina-2 (Tac) relacionados con los mecanismos de inmunoregulación en LCL, LCM y LCD y presentes en sangre periférica fue realizada por Cabrera y col. (1986) utilizando las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Estudios que demostraron que los pacientes con LCM presentaban una disminución del porcentaje de linfocitos T CD4+, y en consecuencia una disminución de la relación de linfocitos T cooperadores-inductores/T citotóxicos-supresores CD4/CD8. Estos resultados sugieren que el defecto en estos pacientes podría estar ubicado en la subpoblación de linfocitos T CD4+. Una disminución de la subpoblación CD4+ en este grupo de pacientes también fue observada por Carvalho y col. (1985).

Los anteriores resultados son controversiales, si se toma en consideración que estos pacientes constituyen un grupo hiperreactivo tanto a la prueba de leishmanina *in vivo* como a las pruebas de transformación linfoblástica *in vitro* frente al antígeno de *Leish-*

mania. Carvalho y col. (1985) sugieren que la baja densidad de linfocitos CD4+ no tiene necesariamente que correlacionarse con la transformación blástica a los antígenos, ya que sólo un pequeño grupo de estas células pudieran ser las que se activan frente al mitógeno. Sin embargo, en estudios recientes Tapia y col. (1986) señalan un aumento de los linfocitos T CD4+ en lesiones de LCM, lo cual sugeriría que existe una migración de sangre hacia las lesiones.

La caracterización leucocitaria en pacientes con LCD, demostró una similitud con los resultados de los individuos sanos y pacientes con LCL indicando un aparente equilibrio entre las actividades estimuladoras y supresoras. Respecto a los linfocitos T Tac+ Cabrera y col. (1986) observaron un porcentaje relativamente bajo en los pacientes con LCL y LCM como en los individuos sanos. Esto ha sido discutido por numerosos investigadores, los cuales han demostrado que este receptor sólo se expresa en linfocitos T estimulados tanto en forma específica como inespecífica (Smith, 1984). Sin embargo en la forma anérgica de la enfermedad (LCD) los investigadores observaron un ligero aumento de linfocitos T Tac+. Resultados ellos que se correlacionan con la alta carga parasitaria presente en estos pacientes y el largo tiempo de evolución de esta enfermedad que implica una estimulación antigénica continua.

Los mismos investigadores evaluaron las subpoblaciones linfocitarias después de la estimulación con antígenos de *Leishmania*, encontrando una reducción significativa del porcentaje de linfocitos T Tac+ en los pacientes con LCD. Por otra parte, en los pacientes con LCM se continuó observando una disminución de linfocitos T con fenotipos CD4+ y en consecuencia de la relación CD4/CD8.

Es interesante destacar que en el grupo de pacientes con LCD, se observó una capacidad biológica de expresar los receptores para la IL-2 ya que mostraron un nivel de linfocitos T Tac+ comparable con los individuos sanos y con los pacientes con LCL bajo estimulación mitogénica. Sin embargo, bajo estimulación con el antígeno de *Leishmania* la expresión de tales receptores

fue muy baja. Por otra parte la relación CD4/CD8 en estos pacientes se mantiene semejante a la de los individuos sanos y pacientes con LCL en todas las condiciones experimentales. Todo esto parece indicar que el defecto en estos pacientes está relacionado con aspectos funcionales de las células inmunocompetentes, más que con el número de las mismas, sugerido también por Modlin y col. (1985) en estudios de granulomas de pacientes con LCL y LCD.

d. DISTRIBUCION CELULAR Y SUBPOBLACIONES EN LOS GRANULOMAS.

Histológicamente, los pacientes con LCL pueden mostrar focos epitelioides o granuloma linfocitario con pocos o ningún parásito presente, mientras que el granuloma de los pacientes con LCD está formado principalmente por macrófagos cargados de parásitos. Las lesiones cutáneo-mucosas generalmente presentan un infiltrado celular rico en linfocitos, células plasmáticas y escasos macrófagos infectados (Convit & Pinardi, 1974; Hommel, 1978; Modlin y col., 1985).

Una caracterización *in situ* de la respuesta inmune celular en pacientes con LCL y LCD, fue realizada por Modlin y col. (1985) utilizando técnicas inmunocitoquímicas. En estos estudios los investigadores observaron una distribución similar de las células en los granulomas de los dos grupos de pacientes estudiados con linfocitos T CD8+ y CD4+ distribuidos al azar entre los macrófagos. La relación CD4/CD8 en los granulomas de pacientes con LCL (0,8) fue similar a la de los granulomas de pacientes con LCD (0,8) con un mayor porcentaje de la subpoblación CD8+. También caracterizaron los linfocitos T productores de IL-2, y las células que expresan el receptor a IL-2 (Tac), encontrando que los pacientes con LCL presentaban una mayor densidad de células productoras de IL-2. Estos investigadores no observaron diferencias entre los grupos estudiados con respecto a los linfocitos Tac+, sugiriendo que el defecto en LCD debe recaer más sobre las células productoras de IL-2 que sobre los linfocitos T Tac+. Igualmente, Modlin y col. (1985) mostraron la existencia de una alta densidad de células dendríticas (células

de Langerhans CD1+) en pacientes con LCL cuando éstas se compararon con la epidermis de individuos sanos y pacientes con LCD. Estos investigadores concluyen que la existencia de una respuesta efectiva no requiere de un exceso de linfocitos T con el fenotipo cooperator/inductor (CD4+) en relación con los T supresor/citotóxico (CD8+), o de una localización microanatómica particular de las subpoblaciones de linfocitos T en los granulomas tal como se ha demostrado en lepra. Una respuesta "efectiva" como la observada en LCL parecería estar estrechamente relacionada con la producción de linfocinas y una adecuada interrelación entre los distintos grupos celulares. En pacientes con LCL, a pesar del evidente exceso de linfocitos T supresores/citotóxicos, opera un efectivo mecanismo de respuesta inmune con un adecuado porcentaje de linfocitos T Tac+, que induce a la virtual eliminación del parásito.

Tapia y col. (1986) proponen que una respuesta inmunológica efectiva en leishmaniasis, vendría dada por un equilibrio e interrelación de los distintos grupos celulares en los granulomas, más que por una determinada distribución de linfocitos T, en contraste con lo observado en lepra.

Los resultados que presentaremos a continuación sobre leishmaniasis cutánea murina confirman lo planteado anteriormente para LCA en humanos.

e. PARTICIPACION DE LOS LINFOCITOS T EN LA PATOGENESIS DE LEISHMANIASIS CUTANEA EXPERIMENTAL.

Milon y col. (1986) compararon la frecuencia y el inmunofenotipo de los linfocitos T que median la reacción de HT específica a *L. major* en los nódulos linfáticos de ratones susceptibles BALB/c y CBA resistentes. Los resultados de este estudio demostraron que el número de linfocitos T específicos a *L. major* en los nódulos linfáticos que drenan el sitio de infección, fue cinco veces más alto en ratones BALB/c que en ratones CBA. Igualmente reportaron que mientras en ratones CBA los linfocitos T específicos son indiscriminadamente L3T4+ (T cooperador) y Lyt 2+ (T supresor citotóxico), la ma-

yoría de los linfocitos T específicos en ratones BALB/c expresan el fenotipo L3T4+. Estos resultados demostraron directamente que la respuesta inmunológica en ratones BALB/c (susceptibles a *L. major*) es ejercida principalmente por la generación de un número relativamente grande de linfocitos T L3T4+ específicos.

Se ha demostrado que los linfocitos L3T4+ activan *in vitro* macrófagos infectados con *L. major* (Louis y col., 1982; Coutinho y col., 1984), y median la resistencia *in vivo* (Liew y col., 1982). Si bien, no se conoce si los linfocitos T L3T4+ que median la reacción de HT son idénticos a los que tienen la capacidad de activar los macrófagos infectados y de mediar la resistencia, es posible que un exceso de los mismos en el sitio de la infección estuviera implicado directamente en el desarrollo de la lesión, contribuyendo al reclutamiento continuo de fagocitos sanguíneos, células hospedadoras del parásito, etc. Los mecanismos por los cuales estos macrófagos podrían ser capaces de recibir la señal de la población de células activadas necesaria para la destrucción del parásito todavía no están claros. El grupo de Jacques Louis (Louis y col., 1982; Coutinho y col., 1984) proponen la existencia de una actividad cooperadora específica en la producción de anticuerpos, que alimenta la respuesta de anticuerpos anti *Leishmania* en ratones BALB/c, los cuales en presencia de los antígenos de *Leishmania* circulantes formarían complejos inmunes que inhibirían la función parasitocida de los macrófagos.

No se ha demostrado ninguna función decisiva de los linfocitos T Lyt 2+ en el control inmunológico de la leishmaniasis cutánea. Los resultados obtenidos por Milon y col. (1986) en ratones CBA sugieren que las subpoblaciones de linfocitos T L3T4+ y linfocitos T Lyt 2+ específicos al parásito pudieran ambas estar implicadas en la resolución de las lesiones.

En ratones BALB/c infectados se ha demostrado un exceso de linfocitos T L3T4+ parásito-específicos, sin embargo un número similar de linfocitos T Lyt 2+ parásito-específicos, capaces de mediar la reacción de HT, están presentes en nódulos linfáticos de ratones BALB/c y CBA. Es posible entonces

concluir, que una producción óptima y equilibrada de linfocitos T L3T4+ y Lyt 2+ específicos al parásito son necesarios para el control inmunológico de la infección, lo cual es corroborado por Titus y col. (1985) quienes demuestran que la reducción de linfocitos T L3T4+ por la administración de un anticuerpo monoclonal anti-L3T4, resultó en un pronunciado efecto terapéutico, como reflejo de la resolución de la lesión y dramática reducción en la carga parasitaria de los ratones BALB/c tratados.

ALGUNOS ASPECTOS SOBRE INMUNORREGULACION EN LEISHMANIASIS CUTANEA.

La infección leishmánica de ratones BALB/c conduce a un estado de supresión inmunológica, que cuenta con la participación de al menos dos poblaciones de células supresoras: linfocitos T supresores con especificidad antigénica y macrófagos supresores de acción inespecífica.

Algunos investigadores han demostrado que la incapacidad de los macrófagos en controlar la replicación inicial de las leishmanias conduce a una inducción de linfocitos T supresores específicos que previenen el desarrollo de una respuesta inmune apropiada (Howard y col., 1980; Gorczynski y col., 1982; Pérez y col., 1985). Estas células T supresoras o su acción son inhibidas cuando se someten los ratones infectados a radiaciones subletales de 550 rads, permitiendo la inducción de linfocitos T efectores que van a eliminar las lesiones e inmunizan los animales a subsecuentes infecciones (Howard y col., 1981).

En humanos, Petersen y col. (1982) estudiaron el efecto supresor que podrían ejercer algunas células adherentes en los pacientes con LCL y LCD. Para esto, las células mononucleares fueron pasadas a través de una columna de nylon, con la finalidad de retener la población de células adherentes (macrófagos, linfocitos B y algunas subpoblaciones de linfocitos T). Cuando las células de pacientes con LCD, se sometieron a este tratamiento y se analizaron *in vitro*, se observó un significativo aumento en la respuesta linfoproliferativa frente al antígeno específico de *Leishmania*: Este efecto sólo se ob-

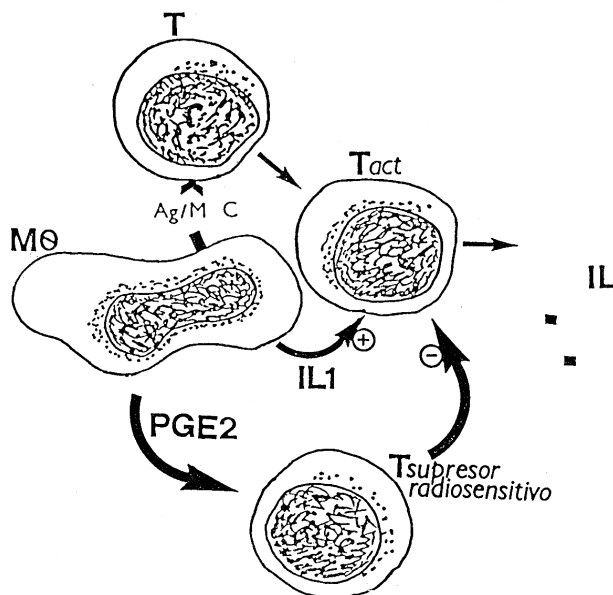


Fig. 3

servó en los linfocitos tratados de pacientes con LCD, ya que en los pacientes con LCL la respuesta específica y mitogénica estuvo disminuida.

Los mismos investigadores analizaron el efecto de la indometacina, un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, en la respuesta proliferativa frente a *Leishmania* en ambos tipos de pacientes. En pacientes con LCD se observó un incremento en la respuesta al añadirse indometacina, no así en pacientes con LCL quienes mostraron sólo un leve aumento. Los investigadores proponen a un grupo de células adherentes, i.e. macrófagos como responsables de la supresión de la respuesta inmunológica en LCD y señalan que esta supresión pudiera estar mediada por prostaglandinas.

Castés y col. (1984) demostraron una alta actividad supresora en pacientes con LCD, cuando se evaluó la respuesta inducida in vitro por *Leishmania* en presencia de Con A. Los pacientes con LCM y LCL, que como ya hemos mencionado anteriormente responden activamente frente a *Leishmania*, no presentaron actividad supresora. Los resultados obtenidos por estos investigadores en LCL no mostraron correlación entre la respuesta al antígeno específico y el grado de supresión, lo que sugiere la existencia de un equilibrio entre los mecanismos de estimulación y supresión en los pacientes del polo benigno.

Recientemente Cillari y col. (1969) demostraron que las células esplénicas de ratones BALB/c infectados, producen bajos y defectuosos niveles de IL-2 frente a Con A, cuando se comparó con los no infectados. Igualmente, demostraron que ratones irradiados subletalmente e infectados, producen altos niveles de IL-2, los cuales aumentaron en forma paralela a la regresión de las lesiones. Estos investigadores también demostraron una actividad supresora para inhibir la IL-2 en células adherentes de ratones infectados, la cual pudo ser restaurada al añadir indometacina, sugiriendo que la supresión de IL-2 es mediada por prostaglandinas producidas por los macrófagos.

Todo esto parece indicar que la función de las células supresoras es la de bloquear la producción de IL-2, lo cual puede ser reforzado por los hallazgos de Modlin y col. (1985), quienes observaron una disminución de células productoras de IL-2 en los granulomas de pacientes con LCD. Es posible que la falla inmunológica en LCD esté relacionada con la actividad de células supresoras en las lesiones.

Modon y col. (1985), sin embargo, también observaron en las lesiones de LCL, un número alto de linfocitos T CD8+, y sugieren que éstos no juegan una función supresora importante que pueda inhibir la producción de linfocinas esenciales para los linfocitos T y la

activación macrofágica.

Un modelo para explicar la producción de IL-2 en humanos, que pudiera explicar lo antes mencionado, fue propuesto por Chouaib y Fradelizi (1982) (Figura 3). Los linfocitos producen IL-2 cuando son estimulados por antígenos o lectinas. Esta producción de IL-2 depende de la liberación de factores por parte de las células accesorias. Se ejerce un control negativo cuando se liberan monocinas inhibitorias como la PGE2, la cual no interaccionaría directamente con los linfocitos T productores de IL-2, sino que activaría a un subgrupo de linfocitos T radiosensibles capaces de inhibir a las células productoras de IL-2. Sin embargo, es probable que la PGE2 actúe como un modulador más que como un regulador.

Wyler y col. (1987) observaron que los linfocitos del nódulo linfático que drenaba la lesión en ratones C57BL/6 elaboraban IFN- γ cuando son co-cultivadas con macrófagos infectados por *L. major*. Sin embargo ni el bloqueo de la producción de IFN- γ con ciclosporina A (la cual bloquea la producción de linfocinas por los linfocitos activados) ni el tratamiento con anti-IFN- γ afectó la capacidad leishmanicida de los macrófagos. Recientemente Behforouz y col. (1986) reportaron que el tratamiento con ciclosporina A facilita la curación espontánea en ratones BALB/c nu/nu), lo que indirectamente sugiere que un mecanismo independiente de linfocinas pero dependiente de linfocitos sensibilizados pudieran estar asociados en la defensa del hospedador contra el parásito.

Lo antes expuesto permite concluir, que los linfocitos T juegan un papel fundamental en la recuperación y protección de la infección por *Leishmania*, y que el espectro observado en leishmaniasis cutánea murina es muy similar al espectro clínico humano, siendo posiblemente el reflejo de condiciones genéticas e inmunológicas. De igual manera se concluye que existen diferencias en la participación de los distintos subgrupos de linfocitos T en las diferentes formas de la leishmaniasis, en donde una efectiva respuesta inmunológica vendría dada por un equilibrio en la interrelación de los distintos grupos celulares.

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a los Dres. **Mariam Ulrich, Angel Hernández y Alexis Mendoza** por sus valiosos comentarios. Esta revisión es parte del Seminario Especial de Grado (Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, U.C.V.) de **Zoila C. Moros A.** Las ideas expuestas son producto del estímulo de los proyectos CONICIT S1-1936 y CDCH M10.16.87.

BIBLIOGRAFIA

- Alexander, J., Russell, D.G.- Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape: The leishmaniasis. *C. Top. Microbiol. Immunol.* 120: 43-69, 1985.
- Arredondo, B., Pérez, H.- Alterations of the immune response associated with chronic experimental leishmaniasis. *Infect. Immun.* 25: 16-22, 1979.
- Behin, R., Mauel, J., Sordat, B.- Leishmania tropica pathogenicity and in vitro macrophage function in strain of inbred mice. *Exp. Parasitol.* 48: 81-91, 1979.
- Behin, R., Mauel, J., Rowe, D.S.- Mechanism of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. 111. Inhibition of leishmanial lesion in the guinea pig by delayed hypersensitivity reactions to unrelated antigens. *Clin. Exp. Immunol.* 29: 320-325, 1978.
- Behforouz, N.C., Wenger, C.D., Mathison B.A.- Prophylactic treatment of BALB/c mice with cyclosporin A and its analog B-5-49 enhances resistance to Leishmania major. *J. Immunol.* 136: 3067-3075, 1986.
- Bradley, D.J., Kirkley, J.- Variation in susceptibility of mouse strain to Leishmania donovani infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 697-708, 1972.
- Bray, R., Lainson, R.- The fluorescent antibody staining technique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 59: 535-544, 1965.
- Cabrera, M., Castés, M., Trujillo, D.- Estudio comparativo de poblaciones leucocitarias en pacientes con leishmaniasis cutánea americana. *Acta Cient. Vzlan.* 36 (supl. 1): 93, 1986. Parte de los resultados presentados pertenecen a la Tesis Especial de Grado: Estudio de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con leishmaniasis cutánea americana. Presentada por Maira Cabrera ante la Universidad Central de Venezuela. Escuela de Biología. Mayo 1986.
- Carvalho, E., Johnson, W., Barreto, E., Marsden, P., Costa, J., Reed, S., Rocha, H.- Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosa) leishmaniasis. *J. Immunol.* 135:4144-4148, 1985.
- Castés, M., Agnelli, A., Verde, O., Rondon, A.- Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 27: 176-186, 1983.
- Castés, M., Agnelli, A., Rondón, A.- Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 279-286, 1984.
- Chouaib, S., Fradelizi, D.- The mechanism of inhibition of human IL-2 production. *J. Immunol.* 129: 2463-2468, 1982.
- Cillari, E., Liew, F., Leichuk, R.- Suppression of interleukin-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with Leishmania major. *Infect. Immun.* 54: 386-394, 1986.
- Convit, J., Lapenta, P.- Sobre un caso de leishmaniasis tegumentaria de forma diseminada. *Rev. Policl. Caracas.* 17: 153-156, 1948.
- Convit, J., Pinardi, M.E.- Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Int.* 8: 17-20, 1969.
- Convit, J., Pinardi, M.E., Rondón, A.J.- Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66: 603-610, 1972.
- Convit, J., Pinardi, M.E.- Cutaneous leishmaniasis. The Clinical and immunopathological spectrum in South America. Trypanosomiasis and leishmaniasis with special reference to Chagas disease. Ciba Foundation Symposium 20, Elsevier. Excerpta Medica. North Holland, Amsterdam, pp 160-166, 1974.
- Coombs, R.R.A., Gell, P.G.H.- Classification of allergic reactions responsible for clinical hypersensitivity and disease. En: *Clinical Aspects of Immunology*. Gell, P.G.H., Coombs, R.R.A. & Lackmann P.J. (eds.). Blackwell Publ., pp 761-778, 1975.
- Coutinho, S., Louis, J., Mauel, J., Engers, H.- Induction by specific T lymphocytes of intracellular destruction of Leishmania major in infected murine macrophages. *Parasite Immunol.* 6: 157-170, 1984.
- Engleman, E., Benike, C., Metzler, C., Evans, R.- Blocking of human T lymphocyte function by anti-Leu 2 and anti-Leu 3 antibodies: Differential inhibition of proliferation and suppression. *J. Immunol.* 130: 2623-2628, 1983.
- Giannini, M.S.H.- Suppression of pathogenesis in cutaneous leishmaniasis by UVB irradiation. *Infect Immun.* 51: 838-843, 1986.
- Gorczyński, R.M., MacRae, S.- Analysis of subpopulations of glass-adherent mouse skin cells controlling resistance/susceptibility to infection with Leishmania tropica, and correlation with the development of independent proliferative signals to Lyt 14/Lyt2+T lymphocytes. *Cell Immunol.* 67: 74-89, 1982.
- Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M., Lanotte, G.- The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72: 213-218, 1978.
- Howard, J., Hale, Ch., Liew, F.- Genetically determined susceptibility to Leishmania major infection in expressed by haematopoietic donor cells in mouse radiation chimaeras. *Nature.* 288: 161-162, 1980.
- Howard, J., Hale, C., Liew, F.- 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.
- Kadivar, D.M.H., Soulsby, E.J.L.- Model for disseminated cutaneous leishmaniasis. *Science.* 190: 1198-1200, 1975.
- Lainson, R., Shaw, J.- Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. *Nature.* 273: 595-600, 1978.
- Lamon, E.W., Shurzak, H.M., Klein, E.- The lymphocyte response to primary viral neoplasm (MSV) through its entire course in BALB/c mice. *Int. J. Cancer.* 10: 581-585, 1972.
- Lamon, E.W., Klein, B., Andersson, E. M., Fenyo, A., Shurzak, H.M.- The humoral antibody response to a primary viral neoplasm (MSV) through its course in BALB/c mice. *Int. J. Cancer.* 12: 637-646, 1972.
- Liew, F., Hale, Ch., Howard, J.- Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cell. *J. Immunol.* 128: 1917-1922, 1982.
- Louis, J., Zubler, R., Coutinho, S., Lima, G., Behin, R., Mauel, J., Engers, H.- The in vitro generation and functional analysis of murine T cell populations and clones specific for a protozoan parasite, Leishmania tropica. *Immunol. Rev.* 61: 215-243, 1982.
- Matsumoto, K., Okubo, G., Yokoya

- ma, M.- Distribution of marker-specific lymphocyte subsets in healthy human subjects. *J. Clin. Lab. Immunol.* 16: 143-147, 1985.
33. Mauel, J., Buchmuller, Y., Behin, R.- Studies on the mechanism of macrophage activation. I. Destruction of intracellular *Leishmania* in macrophages activated by cocultivation with stimulated lymphocytes. *J. Exp. Med.* 148: 393-407, 1978.
 34. Miller, J.F., Vadas, M.A., Whitelaw, A., Gamble, J.- H-2 gene complex restricts transfer of delayed-type hypersensitivity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 5095-5098, 1975.
 35. Milon, G., Titus, R., Cerottini, J. Ch., Marchal, G., Louis, J.- Higher frequency of *Leishmania* major-specific L3T4 cells in susceptible BALB/c as compared with resistant CBA mice. *J. Immunol.* 136: 1467-1471, 1986.
 36. Mitchell, G., Curtis, J., Handman, E., McKenzie, I.- Cutaneous leishmaniasis in mice: Disease patterns in reconstituted nude mice of several genotype infected with *Leishmania tropica*. *AJEBAK.* 58: 521-532, 1980.
 37. Modlin, R.L., Tapia, F.J., Bloom, B.R., Gallinoto, M.E., Castés, M., Rondón, A.J., Rea, I.H., Convit, J.- In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. exp. Immunol.* 60: 241-248, 1985.
 38. Nath, I., Narayanan, R.B., Mehra, V. K., Sharma, A.K., Gupte, M.E.- Concanavalin A induced suppressor activity. *J. Clin. Lab. Immunology.* 2: 319-324, 1979.
 39. Pérez, H., Arredondo, B., González, M.- Comparative study of American cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. *Infect. Immun.* 22: 301-307, 1978.
 40. Pérez, H., Pocino, M., Malavé, I.- Nonspecific immunodepression and protective immunity in mice infected with *Leishmania mexicana*. *Infect. Immun.* 32: 415-419, 1981.
 41. Pérez, H.- Inmunología de la leishmaniasis cutánea experimental. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* 1: 104-129, 1982.
 42. Pérez, H.A., Henríquez, M., De la Rosa, M.- Activación de las células supresoras en la respuesta de hipersensibilidad tardía en ratones BALB/c infectados o vacunados con *Leishmania mexicana* pifanoi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 80: 429-438, 1985.
 43. Petersen, E., Neva, F., Oster, Ch., D(az, H.- Specific inhibition of lymphocyte proliferation response by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 306: 387-392, 1982.
 44. Petersen, E.A., Neva, F.A., Barral, A.- Monocyte suppression of antigen-specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. *J. Immunol.* 132: 2603-2606, 1984.
 45. Poulter, L.W., Randolph, C.R.- Mechanisms of immunity to leishmaniasis. Significance of lymphatic drainage from the site of infection. *Clin. exp. Immunol.* 48: 396-402, 1982.
 46. Preston, P., Dumonde, D.- Experimental cutaneous leishmaniasis. V. Protective immunity in subclinical and self healing infection in mouse. *Clin. exp. Immunol.* 23: 126-138, 1976.
 47. Reed, S.G., Andrade, Z.A., Roters, S. B., Inverso, J.A., Sadigursky, M.- *Leishmania mexicana amazonensis* infections in "resistant inbred mice following removal of the draining lymph node". *Clin. exp. Immunol.* 64: 8-14, 1986.
 48. Reinherz, E., Kung, P., Goldstein, G., Schollossman, S.- Separation of functional subsets of human T cells by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 4061-4068, 1979.
 49. Reinherz, E., Kung, P., Gideon, G., Schollossman, S.- A monoclonal ab. human cytotoxic/suppressor T cell subset previously defined by a heteroantiserum termed TH2, *J. Immunol.* 124: 1301-1307, 1980.
 50. Roitt, I., Brastoff, J., Male, D.- *Immunology.* Gower Medical Publ., Londres, pp. 10.8-10.11, 1985.
 51. Rondón, A., Reyes, O., Ulrich, M., Tapia, F.J.- Leishmaniasis cutáneo mucosa. *Dermatología Venezolana.* 23: 11-26, 1985.
 52. Sadick, M., Locksley, R., Tubbs, C., Raff, H.- Marine cutaneous leishmaniasis: Resistance correlates with the capacity to generate interferon- in response to *Leishmania* antigens in vitro. *J. Immunol.* 136: 655-661, 1986.
 53. Scott, P.A., Farrell, J.P.- Experimental cutaneous leishmaniasis: disseminated leishmaniasis in genetically susceptible and resistant mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 230-236, 1982.
 54. Smith, K.- Interleukin-2. *Ann. Rev. Immunol.* 2: 319-333, 1984.
 55. Stobo, J.D., Paul, W.E.- Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as probe for T cell subsets. *J. Immunol.* 110: 362-375, 1973.
 56. Tapia, F.J., Gross, A., Castés, M., Mosca, W., Modlin, R.L., Convit, J.- Cellular immune response in the skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. VI International Congress for Parasitology, Brisbane, Queensland, Australia, Aug. 24-30, 1986.
 57. Titus, R., Ceredig, R., Cerottini, J.Ch., Louis, J.- Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. *J. Immunol.* 135: 2108-2114, 1985.
 58. Turk, J., Bryceson, A.- Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.* 13: 209-266, 1971.
 59. Turk, J.- Interaction between B and T lymphocytes in delayed hypersensitivity. En: Van Furth (ed) mononuclear phagocytes in immunity infection and pathology. Blackwell, Oxford. pp. 533-542, 1975.
 60. Ulrich, M.- Inmunología de la leishmaniasis. *Immunol. Clin.* 2: 125-131, 1979.
 61. Vadas, M., Miller, J., McKenzie, I., Chism, S., Shen, F.-W., Boyse, E., Gamble, J., Whitelaw, A.- Ly and Ia antigen phenotypes of T cells involved in delayed-type hypersensitivity and in suppression. *J. Exp. Med.* 144: 10-15, 1976.
 62. Wyler, D., Weimbaum, F., Herrod, H.- Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmanial antigens. *J. Infect. Dis.* 140: 215-221, 1979.
 63. Wyler, D., Beller, D.I., Sypek, J.- Macrophage activation for antileishmanial defense by an apparently novel mechanism. *J. Immunol.* 138: 1246-1249, 1987.
 64. Williams, P., De Vasconcellos, C.- Taxonomy and transmission of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* 16: 1-42, 1978.
 65. Yarzabal, L., Arango, M., Puga, M., Rojas, Z., Delgado, O., Convit, J.- El ensayo inmuno-enzimático (ELISA) en la leishmaniasis Americana. *Inmunol. Clin.* 2: 3-11, 1979.
 66. Zuckerman, A.- Parasitological Review. Current status of the immunology of blood and tissue protozoa I. *Leishmania*. *Exp. Parasitol.* 38: 370-400, 1975.
 67. Zuckerman, A., Lainson, R.- *Leishmania* possibly in parasitic protozoa. I. Taxonomy, Kinetoplastidae and flagellates. JP Krew, (ed.), Academic Press, Nueva York, pp. 195-200, 1977.