



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES
PARASITOLÓGICAS DR. JOSÉ FRANCISCO TORREALBA

www.bdigital.ula.ve

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

INTERACCIÓN CELULAR EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA
EXPERIMENTAL

Mérida, 2002

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado

Presentado por la Br. Yasseйда Lorena Jiménez Lamedа, como
requisito parcial para obtener el título de Licenciada en Biología en la
ilustre Universidad de Los Andes

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Parasitológicas Dr. José Francisco Torrealba, del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes.

Por la Br. Yasseйда L. Jiménez Lameda

www.bdigital.ula.ve

Tutora. Prof. Ana Lugo de Yarbuh

Co-tutor. Dr. Cesare Colasante

Mérida, Mayo de 2002

RESUMEN.

En el presente estudio, 1×10^3 promastigotos de *Leishmania braziliensi* (MAMU- 93) y *L. mexicana*(574) (aislado de referencia internacional), fueron inyectadas por la vía intradermal en la región plantar de los tarsos posteriores de dos grupos de ratones BALB/c, con el fin de conocer la respuesta celular y la activación de las células epidermales de Langerhans (CL) en el sitio de la inoculación de estos parásitos. Cambios morfológicos en los promastigotos de *L. braziliensis* fueron detectados en los frotis de las muestras de piel coloreadas con Giemsa. Estos parásitos mostraron forma ovoide, algunos con un corto flagelo entre los 30 minutos (min) y 1 hora (h) post inyección (pi). Estas muestras también mostraron células inflamatorias tales como, macrófagos normales (McN) (28,0% y 68,25%) a los 30 min y 6 semanas (sem) pi respectivamente, macrófagos activados (McA) (74,3%) a los 30 min pi, neutrófilos (N) (31,12%) a las 5 h pi, linfocitos (L) (3,0%) a las 3 sem pi, linfocitos degradados (LD) (3,0%) a los 2 d pi, monocitos (M) (4,33%) a los 5 d pi y monocitos activados (MA) (31,6%) a las 5 h pi. Las secciones de piel coloreadas con Giemsa Colofonio (GC) revelaron alteración epidermal e infiltrado celular dermal, compuesto principalmente por fagocitos mononucleares como macrófagos, linfocitos y monocitos, junto a células polimorfonucleares, así como células mastoides en la dermis profunda entre las 5 h y 6 sem pi. Los parásitos no fueron detectados en la epidermis. Las improntas de piel de los ratones BALB/c inyectados con promastigotos de *L. mexicana* y coloreados con Giemsa mostraron 35,0% y 58,0% de McN a los 30 min y 6 sem pi respectivamente, 96,0% de McA a los 5 d pi, 21,56% de N a las 2 h pi, 3,0% de eosinófilos a las 2 sem pi. Las secciones de piel coloreadas con

GC revelaron alteraciones similares a las de la piel de los ratones inyectados con *L. braziliensis*. En este estudio, utilizamos la inmunotinción con Avidina Biotina y el anticuerpo monoclonal NLDC- 145 específico para caracterizar las células de Langerhans (CL) epidermales murinas, en fragmentos de 1 mm² de piel de las patas de los ratones. Los resultados mostraron que la inyección de los promastigotos de *L. braziliensis* en la piel, producen un incremento progresivo de las CL en el sitio de la inyección de los parásitos, estadísticamente significativo ($P < 0,05$). La densidad de las CL epidermales fue aumentando desde los 30 min pi con $200 \pm 78,66$ CL/mm², alcanzando un valor máximo de $4502,7 \pm 632,4$ CL/mm² a las 6 sem pi. En la piel inyectada con promastigotos de *L. mexicana*, la densidad de las CL epidermales fue de $2903,5 \pm 76,5$ CL/mm² a los 30 min pi y de $729,5 \pm 51,5$ CL/mm² a las 2 sem pi. El número de CL fue siempre más alto en los fragmentos de epidermis de los ratones inyectados con *Leishmania*, que en las epidermis de los ratones sanos controles. Estas muestras de piel mostraron entre 275 y 89 CL/mm². Los resultados de este estudio, revelaron que los promastigotos en la piel son capaces de sobrevivir fuera de los macrófagos hasta 1 h pi. Por otro lado, estos parásitos estimularon la proliferación de varios tipos de células inflamatorias como las CL presentadoras de antígeno en el sitio de inoculación de los parásitos.

Palabras claves. Leishmaniasis cutánea, ratones BALB/c, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, Epidermis, Células de Langerhans.

INDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimiento

Resumen

Nº de página

1. Introducción

2. Hipótesis y Objetivo

3. Materiales y Métodos

3.1. Animales Experimentales

3.2. Aislados de *Leishmania*

3.3. Metodología

3.3.1. Caracterización del aislado de parásitos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.3.2. Preparación del inóculo del parásito.

3.3.3. Infección de los ratones con los promastigotos de cultivo.

3.3.4. Obtención de las muestras de piel de los ratones inocularados.

3.3.5. Procesamiento de las muestras de piel de los ratones inocularados con los aislados de *Leishmania*.

3.3.5.1. Frotis de piel: Coloración: Giemsa, Inmunofluorescencia indirecta.

3.3.5.2. Estudio histológico en secciones de piel. Coloración con Giemsa Colofonio.

3.3.5.3. Estudio inmunocitoquímico. Inmunofluorescencia indirecta.

3.3.5.4. Separación dermis epidermis. Reacción Avidina Biotina

4. Resultados

4.1. Identificación del aislado de *Leishmania*.

- 4.2. Estudio celular en la piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado MAMU-93 de *L. braziliensis*.
 - 4.2.1. Tipos de células en los frotis de piel. Coloración con Giemsa .
 - 4.2.2. Observación de parásitos en los frotis de piel.
 - 4.2.2.1 Coloración con Giemsa.
 - 4.2.2.2 Inmunofluorescencia indirecta.
 - 4.2.3. Histopatología de la piel de los ratones infectados con el aislado MAMU-93.
- 4.3. Estudio inmunocitoquímico en las secciones histológicas de la piel de los ratones inoculados con *L. braziliensis*.
 - 4.3.1. Reacción de inmunofluorescencia indirecta.
- 4.4. Estimación del número de células de Langerhans mediante el sistema Avidina Biotina.
- 4.5. Estudio celular en la piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado 574 de *L. mexicana*.
 - 4.5.1. Cuantificación celular en los frotis de piel.
 - 4.5.1.1. Coloración con Giemsa.
 - 4.5.1.2. Inmunofluorescencia indirecta.
 - 4.5.2. Histopatología de la piel de los ratones BALB/c infectados con el aislado 574 de *L. mexicana*.
- 4.6. Estudio inmunocitoquímico.
- 4.7. Estimación del número de células de Langerhans mediante el sistema Avidina Biotina.
- 5. Discusión y Conclusiones.
- 6. Bibliografía citada.

INDICE DE FIGURAS

	Nº de página
Figura 1 a.	Sección de epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c (100x). Reacción Avidina Biotina.
Figura 1 b.	Sección de epidermis separada y utilizada para la cuantificación de las células de Langerhans (400x). Reacción Avidina Biotina.
Figura 1 c.	Detalle de (b) (1000x). Reacción Avidina Biotina.
Figura 2.	Ensayo de PCR específico para <i>L. braziliensis</i> en el gel de electroforesis al 3% de agarosa coloreada con Bromuro de Etidio.
Figura 3.	Tipos de células y de parásitos identificados en los frotis de piel de los ratones inoculados con <i>L. braziliensis</i> (Coloración: Giemsa 400x).
Figura 4.	Forma y tamaño de los parásitos presentes en los frotis de piel de los ratones inoculados con <i>L. braziliensis</i> .
Figura 5.	Secciones histológicas de piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. braziliensis</i> (Coloración: Giemsa Colofonio)
Figura 6.	Sección histológica de la piel de los ratones BALB/c con 2 semanas pi con <i>L. braziliensis</i> .
Figura 7.	Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c con 4 y 6 semanas pi con <i>L. braziliensis</i> (Coloración: Giemsa Colofonio)
Figura 8.	Sección histológica de la piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. braziliensis</i> y procesadas mediante la reacción de Inmunofluorescencia Indirecta.
Figura 9.	Secciones histológicas de piel de ratón BALB/c inoculado con <i>L. mexicana</i> con 2, 5 días pi (Coloración Giemsa Colofonio).
Figura 10.	Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. mexicana</i> con 2 semanas pi (Coloración Giemsa Colofonio).
Figura 11.	Sección histológica de la piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. mexicana</i> con 4 semanas pi Inmunofluorescencia Indirecta.

INDICE DE GRÁFICO

	Nº de página
Gráfico 1. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. braziliensis</i> .	
Gráfico 2. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. mexicana</i> .	

INDICE DE CUADROS

	Nº de página
Cuadro 1. Estimación del número y tipo de células presentes en los frotis de piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado MAMU – 93 <i>L. braziliensis</i> .	
Cuadro 2. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. braziliensis</i> .	
Cuadro 3. Estimación del número y tipo de células presentes en los frotis de piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado 574 <i>L. mexicana</i> .	
Cuadro 4. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c inoculados con <i>L. mexicana</i> .	

1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una parasitosis común al hombre y a ciertos animales, caracterizada por ser transmitida por insectos hematófagos de los Géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el viejo y nuevo mundo respectivamente (Lainson y Shaw, 1987).

El termino leishmaniasis en general, se aplica a por lo menos a tres enfermedades humanas causadas por especies de protozoarios estrechamente relacionadas, estas enfermedades son: leishmaniasis cutánea (LC) leishmaniasis mucosa o mucocutánea y leishmaniasis visceral.

En la piel, las lesiones cutáneas se inician con la formación de una pequeña pápula o eritema papuloso rico en parásitos e infiltrado celular, con bordes elevados engrosados y rojizos. Al cabo de cierto tiempo las lesiones cutáneas se ulceran y se presentan recubiertas con una capa de material necrótico, el tejido ulcerado es costroso debido a la presencia de una infección secundaria causada por bacterias.

En la mucosa las lesiones inicialmente muestran una induración nodular en el tabique nasal, las cuales rápidamente se ulceran dañando el cartílago nasal y la mucosa del lado opuesto del septo nasal se edematiza perforándose el tabique nasal. Este tipo de lesiones pueden además encontrarse en la region nasobucofarigeo, labio superior e inferior de la boca e invadir la faringe y el paladar.

La leishmaniasis visceral produce severas alteraciones histopatológicas debido a la rápida invasión por los parásitos de los tejidos viscerales, causando la muerte del hospedador. En este tipo de enfermedad puede formarse o no una pequeña pápula en el sitio de la picadura del insecto transmisor.

En 1903 Leishman, Donovan y Wright descubrieron el parásito de *Leishmania* a partir de muestras de biopsias de lesiones de enfermos de la India. Posteriormente, Pessoa (1961), Lainson y Shaw (1972) reportaron que la leishmaniasis es una enfermedad cuyo agente causal es un protozoo parásito perteneciente a la Familia Trypanosomatidae Doflein, 1901; Clase Mastigophora Calkins, 1909; Orden Kinetoplastida Honingerg, 1963; Género *Leishmania* Ross, 1903.

Es un parásito digenético que puede presentarse en dos formas diferentes en su ciclo biológico, en forma amastigota redondeada inmóvil y sin flagelo, esta forma se encuentra dentro de las células fagocíticas mononucleares y polimorfonucleares. La otra forma del parásito es el promastigoto, esta forma se desarrolla en el tracto digestivo del insecto transmisor, es alargado, móvil y con un flagelo anterior libre (Lainson y Shaw, 1987).

La LC se ha descrito en casi todo el Continente Americano reportándose casos activos desde México hasta el norte de Argentina (Aguilar y cols., 1996).

En Venezuela la enfermedad tiene una distribución en focos separados geográficamente debido a las diferentes especies de *Leishmania*, las cuales habitan en las zonas endémicas que se encuentran ubicadas en los Valles del Sistema Montañoso Andino, en la depresión de Yaracuy, en zonas boscosas de Turén y en algunas regiones de los Llanos.

Entre 1965 y 1993 se han registrado alrededor de 31.201 casos de leishmaniasis cutánea, con un 75% de los enfermos en los estados Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre (Aguilar y cols., 1996).

La leishmaniasis cutánea en Venezuela está asociada con varias manifestaciones clínicas y fue primero reconocida por Iturbe y González

(1917), en un paciente localizado al oeste del estado Barinas. Tejera (1919), estudió varios casos con complicaciones mucocutáneas en el estado Trujillo y la leishmaniasis visceral fue diagnosticada por Martínez y Ponds (1941) en niños del estado Guárico.

Pifano (1940), describió casos cutáneos y mucosos infectados con *L. braziliensis* y Scorza y cols. (1979), describen la *L. garnhami* como un parásito que produce lesiones cutáneas en poblaciones cercanas a los valles interandinos venezolanos (Valera y cols., 1978).

En la naturaleza, el ciclo biológico de la *Leishmania* se inicia cuando el insecto transmisor hace su ingesta sanguínea sobre las lesiones cutáneas, tanto del hombre como de otros hospedadores mamíferos infectados con este parásito. Los amastigotos ingeridos alcanzan el tracto digestivo del insecto donde se transforman en promastigotos y luego pasan al pro ventrículo. Cuando el insecto transmisor infectado pica al hombre la sangre ingerida llega al pro ventrículo, en este momento se produce el regurgitamiento de la saliva arrastrando consigo los promastigotos hacia la dermis, en esta región de la piel los parásitos son fagocitados y en el citoplasma de las células fagocíticas se dividen y se multiplican por fisión binaria, formándose de este modo los nidos de amastigotos (Lainson, 1983).

Lewis (1975) ha relacionado la morfología y tamaño de las piezas bucales de los flebótomos americanos, con la habilidad de estos insectos para picar a vertebrados terrestres y particularmente a los mamíferos.

Este insecto durante la ingesta sanguínea deposita los promastigotos en la epidermis o capas superiores de la dermis, cuando introduce su estilete bucal a 130 nm de profundidad, nivel de donde ingiere la sangre, de tal forma que cuando el parásito es inoculado en forma natural por los

flebotominos, la picadura es superficial y la profundidad de la misma dependerá de la morfología y tamaño de las piezas bucales, del número de dientes maxilares, de la longitud del labrum y de la estructura de la hipofaringe, causando una pequeña pápula en el sitio de la picadura. La penetración del estilete bucal en la piel conduce a la formación de un surco desde la epidermis hasta la dermis (Carnevali y Scorza, 1982)

El depósito de los promastigotos en la piel establece una estrecha relación con los componentes celulares del sistema inmune cutáneo, el cual comprende las células dendríticas cutáneas llamadas células de Langerhans epidermales, los linfocitos - T dendríticos epidérmicos, las células veladas de los vasos linfáticos aferentes cutáneos, los queratinocitos, los macrófagos tisulares, la unidad perivascular que incluye a las células endoteliales vasculares y linfáticas, pericitos vasculares, mastocitos, dendrocitos dermales y las células interdigitantes y dendríticas foliculares de los ganglios linfáticos adyacentes (Bos, 1986).

Estos componentes celulares participan en los mecanismos inmunorreguladores asociados con la leishmaniasis cutánea humana y experimental, produciéndose una cascada de eventos asociados con la epidermis y relacionados con la liberación de citocinas, migración linfocitaria y la subsecuente expresión de señales accesorias (Bos y Kapsenbergh, 1986; Streilein y cols., 1989; Schuler y Steiman, 1985).

Así como la piel es la principal barrera física del hospedador también forma parte importante del sistema inmune y es el sitio de las complejas respuestas celular y humoral durante una infección por *Leishmania Sp* (Moll, 1993).

Las capas que la conforman, la epidermis y la dermis se encuentran separadas por una membrana basal. Cada una de estas capas contienen

una población de células las cuales desempeñan papeles activos durante el desarrollo de la infección.

En la epidermis se encuentran localizadas las células de Langerhans, los queratinocitos y los linfocitos - T epidérmicos, mientras que en la dermis se localizan tanto macrófagos como linfocitos - T (Sprecher y Becker, 1991).

En estas regiones el contacto entre los parásitos y las células cutáneas promueve una respuesta inmune, tanto en la piel de los humanos como en la de los animales mamíferos experimentalmente infectados con *Leishmania sp*, produciéndose la alteración tisular debido a la presencia de los parásitos (Tapia y cols., 1993).

Esta alteración promueve la activación de las células dendríticas presentadoras de antígeno, las cuales constituyen un grupo heterogéneo de células, cuya función principal es la de capturar y procesar antígenos para luego ser presentados a los linfocitos - T y así desencadenar la respuesta inmunológica y la producción de las señales accesorias tales como: la expresión de moléculas MHC-II por parte de las células de Langerhans y la expresión de moléculas de adhesión intracelular ICAM-I por los queratinocitos (Moll y cols., 1993; Sánchez y cols., 1993).

La leishmaniasis cutánea esta asociada con una reacción inflamatoria local, la cual conduce a la activación de las células de Langerhans y de los queratinocitos y a la migración de los linfocitos T hacia la epidermis para procesar el antígeno, toda esta acumulación de células y de moléculas en la dermis genera una respuesta TH1 que conlleva al desarrollo de la infección y a la formación de la lesión cutánea (Martinez y cols., 1991; Magalhanes y cols., 1986).

Las células de Langerhans son un tipo de células dendríticas presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea y se localizan en

la epidermis. Representan el 1 % de las células de la epidermis y cubren el 25% de la superficie cutánea debido a sus largos procesos dendríticos y a su orientación horizontal, forman una red casi continua que les permite captar los antígenos que penetran a través de la piel. Estas células fueron descubiertas por Paul Langerhans en 1868 y presentan características morfológicas semejantes a una neurona, se reconocen por unas estructuras citoplasmáticas denominadas gránulos de Birbeck.

En la epidermis las células de Langerhans presentan dos fases de diferenciación, las células inmaduras que capturan y procesan el antígeno en la epidermis migrando hacia los nódulos linfáticos y las células maduras las cuales son eficientes estimuladores de los linfocitos T específicos para el antígeno que se encuentra en los nódulos linfáticos (Sprecher y Becker, 1991).

El establecimiento de una infección por *Leishmania sp*, requiere de la participación de las células presentadoras de antígeno epidermales, siendo las células de Langerhans las que migran desde la epidermis hacia el sitio de infección en la dermis, allí capturan y transportan el antígeno por vía linfática hacia los nódulos linfáticos para presentarlos a los linfocitos - T. (Moll y cols., 1993 Sánchez y cols., 1993).

La activación de las células de Langerhans contribuye con la producción de monoquinas, las cuales ayudan a inducir la migración de los linfocitos - T epidermotrópicos, a la inducción de la producción de interleucinas IL-1, IL-6 y IL-8, el factor de necrosis tumoral TNF α y β , factor de estimulación de colonias de macrófagos (GM-CSF), lo que conduce al desarrollo de la infección y por ende a la formación de la lesión cutánea (Moll y cols., 1993; Sánchez y cols., 1993; Nickoloff y cols., 1988; Cáceres y cols., 1992; Dustin y cols., 1989; 1983; Nickoloff y cols., 1988).

El curso de la infección por *Leishmania* Sp tanto en humanos como en otros mamíferos, puede verse afectado por la respuesta inmune del hospedador, por la virulencia del parásito o por ambos factores (Müller y cols., 1989; Sprecher y cols., 1991).

En este sentido algunos estudios inmunológicos, bioquímicos e histopatológicos han sido utilizados tanto en humanos, en modelos experimentales y en estudios in vitro, con el fin de dilucidar la influencia de estos factores sobre la infección cutánea (Countinho-Abath y Coelho, 1965; Wilson y cols., 1979; Grimaldi y cols., 1980; Alexander, 1981).

El seguimiento parasitológicos en la detección de *Leishmanias* en las lesiones cutáneas y en otros tejidos, se ha llevado a cabo sobre la base de la observación del parásito, por el examen directo de frotis o aspirado de las lesiones, así como también mediante la observación de las secciones histológicas de las lesiones coloreadas por técnicas convencionales.

El uso de técnicas inmunocitoquímicas y anticuerpos monoclonales han permitido la localización de los antígenos específicos y la caracterización de las diferentes células involucradas en la respuesta inmune de varios desórdenes cutáneos, las cuales además de contribuir con la información debida a la presencia del parásito, participan en la dinámica de formación del granuloma leishmánico (Sells y Burton, 1981; Salinas y cols., 1989).

En una infección por *Leishmania* el resultado de la interacción entre los fagocitos mononucleares y los parásitos determina el curso de la infección y dependiendo de las características de esa interacción, la entrada y sobrevivencia del parásito en la célula hospedadora determinará la susceptibilidad o resistencia a la infección (Wright y Silvertein, 1984).

Robledo y cols, (1994) al realizar un estudio sobre la interacción entre los parásitos y el hospedador, consideraron a la vía de fijación de

complemento y al papel de los receptores del complemento en la infección de monocitos humanos, como la vía clásica o facilitadora de la entrada del parásito, sin que ocurriera la producción de intermediarios de oxígeno durante la interacción receptor- parásito.

Otros estudios experimentales han revelado diversos mecanismos, para explicar la adherencia y fagocitosis de los promastigotos de *Leishmania* por las células mononucleares, determinándose que para que ocurra la internalización de los parásitos, se requiere de la participación de mecanismos, que permitan la unión directa de los parásitos con la membrana de la célula hospedadora (Mosser y Edelson 1985; Wilson y cols., 1988).

Tomando en consideración las investigaciones anteriormente mencionadas, nos hemos propuesto realizar un estudio utilizando métodos convencionales de coloración de tejidos y una metodología inmunocitoquímica, con el fin de identificar y cuantificar el número relativo de los diversos tipos de células que componen el infiltrado celular en la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. braziliensis* y *L. mexicana*.

Por otro lado, determinaremos la frecuencia con que se presentan las células de Langerhans epidermales, en las muestras de epidermis separadas del sitio de la inyección intradermal con los promastigotos de ambos aislados de *Leishmania*.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVO.

HIPÓTESIS

La infección experimental de ratones BALB/c con promastigotos de *L. braziliensis* y *L. mexicana*, induce el desarrollo de una respuesta celular en la piel de estos animales, debido a la relación que se establece entre los parásitos y las células comprometidas en el desarrollo de la infección cutánea

OBJETIVO

Reconocer en el tejido cutáneo de los ratones BALB/c experimentalmente infectados con promastigotos de *L. braziliensis* y *L. mexicana*, los diferentes tipos de células y la frecuencia de las células de Langerhans presentadoras de antígeno en diferentes tiempos de la infección cutánea.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales experimentales

Se utilizaron un total de 48 ratones machos BALB/c de 7 semanas de nacidos, provenientes del Bioterio de cría de la Universidad de los Andes (BIOULA), alimentados con ratarina y agua *ad libitum*.

3.2. Aislados de *Leishmania*

1. **Aislado de *Leishmania*: M/HOM/Ve/93/MAMU.** Los parásitos fueron aislados a partir de muestras de biopsia de una lesión cutánea de un niño de 11 años de edad, procedente de la Aldea el Palmar, el Bordo Mesa Bolívar, estado Mérida y mantenida en el laboratorio en el medio de cultivo NNN.
2. ***L. mexicana*: M/RHO/Su/P/L574.** Cepa de referencia Internacional

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Caracterización del aislado de parásitos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las muestras de sangre periférica fueron extraídas por venipuntura al niño MAMU, y centrifugadas a 2000 rpm durante 20 min. Las muestras de sueros fueron almacenadas a -40°C hasta su utilización. 50 μL de una suspensión de Chellex-100-iron (Bio-Rad Laboratorios[®] Hercules CA), y 1 μL de 20mg/ml de proteinasa K fueron agregados a 150 μL de suero.

Después de 1 hora de incubación a 65°C , la muestra fue calentada durante 10 min. El Chellex fue precipitado en una centrífuga Eppendorf por 1 min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de plástico y 25 μL fueron usados para el ensayo de PCR. Los oligoneuclótidos usados fueron derivados de una secuencia de DNA, gen espaciador ribosomal de *L. braziliensis*; 5'GCAGCACAGGGAAAG'3 y 5'ÁTGGAGAGAGGCACTAGC'3.

La mezcla de reacción con un volumen final de 25 μL fue formada por: KCL 50 mM, Tris-HCL 10 mM a pH 8.8, MgCl_2 1.5 mM, Tritón X-1000 al 1%,

0.2 mM de cada NTPs, 1 μ L de cada primer y 1 unidad de Taq polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wis).

La amplificación del DNA fue realizada en un termociclador (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) programado como sigue: primer ciclo, 5 min a 94°C; segundo ciclo, 1 min a 60°C, 1 min a 72 °C y 1 min a 94°C, este ciclo fue repetido 10 veces. El tercer ciclo, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y 1 min a 93°C, este ciclo fue repetido 25 veces. El cuarto ciclo consistió de 1 min a 60°C y 5 min a 72°C.

Todas las reacciones fueron realizadas durante un período de dos días usando el mismo stock de reactivos y el mismo equipo. Los controles consistieron de: β Globina humana la cual produce un producto de 268 pares de base (pb), controles positivos consistente de sangre humana proveniente de pacientes con *L. braziliensis* y un control negativo que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción sin DNA.

Un volumen de 10 μ L de la muestra producto de la reacción fue procesado por electroforesis en geles de agarosa. Las bandas de amplificación del DNA fueron transferidas a filtros de nylon e hibridizadas con digoxigenina. Esta prueba fue preparada como sigue: La amplificación del plásmido recombinante (pLbbrs4) conteniendo la secuencia blanco fue realizada con los mismos primers. La banda de 126-pb amplificada de DNA fue marcada con digoxigenina por la incorporación del multiprimer dUTP-digoxigenina usando el Kit Genius (Boehringer Mannheim). Las pruebas hibridizadas fueron detectadas por quimioluminiscencia con Lumi-Phos 530 (Boehringer Mannheim) y el tiempo de exposición varió entre 5 y 20 min de acuerdo a las recomendaciones del producto.

3.3.2. Preparación del inóculo de parásitos

Para la obtención de los parásitos, los tubos de cultivo NNN identificados como el aislado MAMU-93 de *Leishmania* y el aislado 574 de *L. mexicana*, en los cuales estaban contenidos los promastigotos, fueron centrifugados a 2000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente fueron eliminados los sobrenadantes y los empaquetados de parásitos fueron lavados tres veces con PBS a pH 7.2, centrifugándolos a 2000 rpm por 20 min, los empaquetados finales de parásitos fueron resuspendidos en 5µL de PBS a pH 7.2.

Un volumen de 0.5µL de cada una de la suspensiones de parásitos fue colocado sobre láminas portaobjeto y cubiertos con una laminilla de 22x 22 mm², el número de parásitos fue cuantificado en 100 campos microscópicos a 400x siguiendo la técnica de Pizzi (1957) y modificada por Brener (1961).

Una vez conocido el número de parásitos se realizaron diluciones seriadas con el fin de obtener 1000 promastigotos en 0.01 mL de solución de cada aislado de parásitos. Cada uno de los inóculos fueron utilizados para la infección experimental de los ratones.

3.3.3. Infección de los ratones con los promastigotos de cultivo

Un total de 40 ratones machos BALB/c de 7 semanas de nacidos provenientes del Bioterio de cría de la Universidad de los Andes (BIOULA), fueron separados en dos grupos; un grupo de 24 ratones fue inoculado con los parásitos del aislado MAMU-93 y el otro grupo con 16 ratones fue inoculado con el aislado 574.

Los animales de cada grupo fueron inoculados inyectándoles por vía intradermal en la región plantar de los tarsos posteriores, 0.01 mL de la

suspensión con 10^3 promastigotos de cada uno de los aislados de *Leishmania*, utilizando una jeringa de 1 mL con aguja de 27G x ½". Como control se utilizó un grupo de 5 ratones sanos.

3.3.4. Obtención de las muestras de piel de los ratones inoculados

Para la obtención de las muestras de piel, los ratones que fueron inoculados con cada uno de los aislados de *Leishmania*, se sacrificaron por sobrianestesia con cloroformo y las muestras de la piel inoculada fueron separadas en los siguientes tiempos de post infección: 30 minutos (min), 2 horas (h), 5h, 2 días (d), 5d, 2 semanas (sem), 4 sem y 6 sem.

Cada fragmento de piel fue dividido en tres porciones: una porción para hacer los frotis de piel, otra para la preparación de las secciones histológicas de piel y una tercera porción para la separación de la epidermis.

La piel de la región plantar de los tarsos posteriores de 5 ratones sanos fue procesada de la misma manera que la de los animales inoculados.

3.3.5. Procesamiento de las muestras de piel de los ratones inoculados con los aislados de *Leishmania*

3.3.5.1. Frotis de piel

- **Coloración: Giemsa, Inmunofluorecencia indirecta**

Las porciones de piel completa (3.3.4) fueron frotadas sobre láminas portaobjeto en forma circular dejando todo el tejido disperso, las preparaciones se dejaron secar para luego fijarla con acetona y colorearlas con Giemsa al 10% en Solución Sörensen.

Esta técnica permitió la observación de los parásitos y la cuantificación de las células presentes en la piel en los distintos tiempos post-infección.

Otro grupo de láminas conteniendo los frotis de piel inoculada fueron procesadas mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la observación de los parásitos y de restos antigénicos (punto 3.3.5.3.).

3.3.5.2. Estudio histológico en secciones de piel

Para el estudio histopatológico las porciones de piel separada de los ratones a los distintos tiempos pi (3.3.4), fueron fijadas en formalina neutra al 10% en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.2 durante 1 día, luego se deshidrataron por pasajes en alcohol isopropílico al 100% durante 1h; alcohol isopropílico + acetona 1:1 1h; acetona al 100% 1h; acetona + xilol 1:1 30 min; xilol al 100% 2h; xilol + parafina 1:1 toda la noche y luego fueron incluidas en paraplast.

Los bloques de parafina conteniendo las muestras de piel fueron cortados a 7 μ en un microtomo American Optical Spencer. Los tejidos se desparafinaron con pasajes sucesivos por xilol tres veces durante 15 min cada uno y se hidrataron con pasajes sucesivos por alcohol isopropílico al 100%, 90%, 80%, 70% y agua destilada, se fijaron con acetona y se colorearon.

Coloración con Giemsa Colofonio (Bray y Garham, 1962)

Las secciones de piel desparafinadas e hidratadas (3.3.5.2) se incubaron con el colorante de Giemsa diluido 1:20 en Buffer Fosfato Potasio a pH 7.2, durante 1h. Se pasaron rápidamente por una solución acidulada (Ácido Acético Glacial) y por agua destilada, seguidamente se clarificaron en Colofonio y por pasajes por acetona, acetona-xilol 70:30, xilol-acetona 70:30, xilol, xilol y finalmente se cubrieron con el medio de montaje DPX y

laminillas cubreobjetos. Las preparaciones histológicas se dejaron secar para la observación en el microscopio de luz.

3.3.5.3. Estudio Inmunocitoquímico

- **Inmunofluorescencia indirecta (Lugo de Yarbuh y cols., 1996)**

Las secciones de piel fueron desparafinadas e hidratadas siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.3.5.2. y los frotis de piel de los ratones fueron preparados según el punto 3.3.5.1. Ambas muestras fueron fijadas con acetona e incubadas durante 30 min con suero normal de carnero al 3% en PBS a pH 7.2 + tritón 0.1% (Solución 1), las muestras fueron lavadas con sol. 1 por 15 min, incubadas con el antisuero anti-*Leishmania* diluido 1:30 con sol.1 durante 1 h, lavadas 3 veces con PBS a pH 7.2, por 5 min, incubadas con el anticuerpo secundario anti - ratón FITC-conjugado diluido 1:300 en PBS a pH 7.2, durante 1 h, lavadas 3 veces con PBS pH 7.2, por 5 min cada uno y cubiertas con gelatina tamponada 9:1 en el momento de la observación en el microscopio de fluorescencia. Esta técnica permitió la detección del antígeno presente en el tejido cutáneo.

3.3.5.4. Separación Dermis- Epidermis (Tapia y cols., 1988.)

- **Reacción Avidina-Biotina**

Las porciones de piel inoculada con *Leishmania* y obtenidas como se explica en el punto 3.3.4. fueron sumergidas en Etilen Diamina Tetra Acido acético (EDTA) durante 30 min a 37° C, con el fin de facilitar la separación dermis -epidermis.

Con ayuda de aplicadores de madera y un microscopio esteroscópico se separaron manualmente los trozos de epidermis. Estas muestras fueron colocadas en uno de los pozos de una microplaca y fijadas con acetona

durante 5 min, hidratadas con PBS a pH 7.2, incubadas con el antisuero monoclonal de rata NLDC- 145 (anticuerpo primario) por 30 min, lavadas con PBS a pH 7.2 por 5 min, incubadas con el antisuero monoclonal de rata biotilado (anti - ratón IgG - biotilado) diluído 1:30 en PBS a pH 7.2, por 45 min e incubadas en el complejo Avidina-Biotina (ABC) por 30 min.

La solución de ABC fue preparada partir de un Kit de ABC (Vector) de la siguiente manera:

1.0 mL de PBS

10 μ L del reactivo A

10 μ L del reactivo B

agitado en el vortex

las epidermis fueron lavadas con PBS a pH 7.2, por 5 min y reveladas con Amino Etil Carbazole (AEC) por 10 min.

El AEC fue preparado de la siguiente manera:

9.5 mL de Buffer Fosfato a pH 5.3, 0.1 M

0.5 μ L de H₂O₂ al 3%

500 μ L de AEC (40 mg de AEC fueron disueltos en 5 ml de N-N dimetilformamida).

Seguidamente las epidermis fueron lavadas con agua de chorro, colocadas sobre láminas portaobjeto, cubiertas con gelatina glicerizada (10 gr de gelatina disueltos en 60 mL de agua destilada caliente más 70 mL de glicerina y 1 mL de fenol) y una laminilla cubreobjeto (**Figura 1a**).

1a. Sección de epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c. Reacción Avidina Biotina (100x)

Las preparaciones de epidermis separadas fueron utilizadas para la cuantificación de las células de Langerhans en 100 campos microscópicos

a 400x. El número de células fue expresado con el promedio de las CL/mm² ± la desviación estandar (SD) (**Figura 1b y c**).

El resultado del número de CL estimado en cada preparación y tiempo pi fue analizado usando la técnica de Scheffe (1968), o mediante un análisis de varianza para comparar la frecuencia de las CL epidermales en todos los tiempos pi.

1b. Sección de epidermis separada utilizada para la cuantificación de las células de Langerhans. Reacción Avidina Biotina (400x)

1c. Detalle de (b). Reacción Avidina Biotina (1000x)

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización e Identificación del aislado de *Leishmania*

En la caracterización del aislado MAMU-93 de *Leishmania* por PCR, la utilización de los primer F1 y F2 dentro de los elementos repetitivos del espaciador ribosomal, se obtuvo una banda única de 126 pb de amplificación específica de *L. (Viannia) braziliensis*. En la **Figura 2** se muestra un gel de agarosa coloreado con Bromuro de Etidio. La línea 1, muestra pGEM[®] DNA usado como marcador de peso molecular el producto de una banda con 126 pb fue obtenida con las muestras positivas: líneas 2 aislado MAMU - 93, líneas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 controles positivos y línea 10 control negativo. Estos resultados permitieron la identificación del aislado MAMU 93 como *L. braziliensis*.

Figura 2. Ensayo de PCR específico para *L. braziliensis* en gel de electroforésis al 3% de Agarosa coloreado con Bromuro de Etidio. la línea 2 muestra la amplificación por PCR banda única obtenida con la muestra MAMU- 93

4.2. Estudio celular en la piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado MAMU- 93 de *L. braziliensis*

4.2.1. Tipos de células en los frotis de piel

•Coloración con Giemsa

La cuantificación de los tipos de células en los frotis de piel de los ratones inoculados con el aislado MAMU-93 de *L. braziliensis* y coloreados con Giemsa, se presenta en el **cuadro 1**. Se observa un incremento en el número de macrófagos activados (McA) de 74.3% a los 30 min pi, en relación con el 28.0% de macrófagos normales (McN) en el mismo tiempo pi, 57.66% de McA con relación al 29.67% de McN a las 2 h pi. A partir de este tiempo pi, el número de McA disminuyó en relación con la proporción de McN, observándose un 31.74% de McA y 68.25% de McN a las 6 sem pi.

En relación con las células polimorfonucleares, se evidenció un incremento en la proporción de neutrófilos con valores que oscilaron entre el 5.0% a los 30 min pi, 12.67% a las 2 h pi, 31.12% a las 5 h pi y 7.0% a los 2 d pi. Después de este tiempo pi no se observaron neutrófilos en las muestras de frotis de piel examinadas.

En cuanto la proporción de linfocitos fue de 1.3% y 3.0% a los 30 min y 2 sem pi respectivamente, así mismo, la proporción de monocitos normales y de monocitos activados fue de 4.33% y 31.16% a los 5 d y 5 h pi. Por lo

tanto en los frotis de piel de los ratones sanos. se encontró una alta proporción de McN (96.0%) a los 30 min y muy poca o ninguna de los otros tipos de células.

Cuadro 1. Estimación del número y tipo de células presentes en los frotis de piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado MAMU-93 de *L.braziliensis* y coloreados con Giemsa

Tiempo infección	McN	McA	Neutrófilos	Eosinófilos	Linfocitos Normales	Linfocitos Degradados	Monocitos	Monocitos Activados	Ratón sano
30min	28,0	74,3	5,0	0	1,3	0	0	0	96,0
2h	29,67	57,66	12,67	0	0	0	0	0	0
5h	30,66	15,95	31,12	0	0	0	0	31,6	2,0
2d	51,33	33,0	7,0	0	0	3,0	0	0	1,0
5d	64,33	23,67	0	0	0	0	4,33	0	1,0
2s	76,67	14,33	0	0	3,0	0	0	0	0
4s	63,76	34,61	0	0	0	0	0	0	0
6s	68,25	31,74	0	0	0	0	0	0	0

McN: macrófagos normales, McA: macrófagos activados

4.2.2. Observación de parásitos en los frotis de piel

4.2.2.1. Coloreados con Giemsa

Las células estuvieron representadas por McN, McA, monocitos, linfocitos normales, linfocitos activados y neutrófilos acompañados de diferentes formas del parásito.

En algunos frotis de piel coloreados con Giemsa, fueron observados parásitos flagelados de forma alargada a los 30 min y 1 h pi, igualmente formas redondeadas del parásito semejantes a amastigotos **Figura 3 a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l.**

Figura 3. Tipos de células y amastigotos identificados en los frotis de piel de los ratones inoculados con *L. braziliensis* (coloración: Giemsa 400x)

3. a, b, c, d: muestran parásitos → , macrófagos ● , linfocitos activados → y linfocitos normales →

a)

b)

c)

d)

3. e, f, g, h: muestran linfocitos activados → , linfocitos normales → macrófagos con actividad citoplasmática → , Neutrófilos

e)

f)

g)

h)

www.bdigital.ula.ve

3. i, j, k, l: muestran: Amastigotos → , Macrófagos ● Monocito

i)

j)

k)

l)

En la figura 4 se pueden observar las diferentes formas y tamaño de los parásitos en los frotis de piel con 30 min pi, dibujados en una cámara clara. Las formas flageladas midieron entre 4 y 8 μ de ancho y entre 5 y 17 μ de alto, mientras que las formas redondeadas midieron entre 2 y 7 μ de ancho y 3 y 12 μ de alto.

Figura 4. Forma y tamaño de los parásitos presentes en los frotis de piel de los ratones a los 30 min de inoculación con *L. braziliensis*.

4.2.2.2 Inmunofluorescencia indirecta

En los frotis de piel de los ratones inoculados con el aislado MAMU- 93 y procesados mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, observamos los parásitos fluorescentes tal como fueron descritos anteriormente en los frotis coloreados con Giemsa, así como macrófagos activados vacuolados con porciones fluorescentes en el citoplasma a los 30 min, 2 h y 5 h pi.

A los 2 y 5 días pi, los frotis mostraron células epiteliales y macrófagos con reacción fluorescente alrededor de sus membranas. A las 2 y 4 sem pi fue frecuente la observación de linfocitos fluorescentes así como, macrófagos activados con inclusiones fluorescentes en el citoplasma, en tanto que a las 6 sem pi, la fluorescencia fue localizada sobre las membranas de los macrófagos activados principalmente.

4.2.3. Histopatología de la piel de los ratones infectados con el aislado MAMU-93

El estudio histopatológico realizado en las secciones de piel de los ratones con 30 min de infectados con *L. braziliensis* y coloreadas con Giemsa - colofonio, reveló abundantes células granuladas en el tercio superior de la epidermis y el estrato granuloso pronunciado hacia la dermis.

A las 2 h pi, se observaron estructuras de formas anchas semejantes a las formas amastigotas.

En las secciones de piel separadas a las 5 h pi, fue frecuente la presencia de abundantes mastocitos intensamente granulados en la dermis superficial muy cerca de la epidermis y de macrófagos activados.

En estas secciones histológicas fue frecuente la observación del desplazamiento de la dermis hacia la epidermis (**Figura 5 a, b, c, d**).

Figura 5 Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. braziliensis*. (Coloración: Giemsa Colofonio)

5a. Muestra granulocitos en la capa epidermal superficial. Area dermal superficial de aspecto esponjoso en estrecho contacto con la epidermis profunda. Necrosis dermal con intenso infiltrado celular (1000x).

5b. Tejido dermal con amastigotos dispersos (1000x)

5c. Estructuras granulares en la epidermis y desplazamiento del tejido dermal hacia la epidermis (640x)

5d. Detalle de la figura 5c en la que se observan las estructuras granuladas en la epidermis e infiltración dermal en la epidermis → (1250x)

A los 2 y 5 días pi la dermis mostró áreas con infiltración celular, abundantes macrófagos activados, mastocitos y macrófagos alrededor del área perivascular y destrucción celular en la dermis profunda.

A las 2 sem pi la epidermis mostró una necrosis puntual sin delimitación entre las capas epidermal y dermal (**Figura 6**).

Figura 6. Sección histológica de la piel de ratones BALB/c con 2 semanas pi con *L. braziliensis* que muestra: necrosis epidermal —→infiltrado celular y alteración dermal alrededor del área perivascular→ (Coloracion: Giemsa Colofonio (100x)

A las 4 y 6 sem pi la piel mostró un engrosamiento del tejido epitelial epidermal, abundantes focos de infiltrado celular en la dermis, mastocitos en la dermis profunda y macrófagos muy cerca del área perivascular engrosada (**Figura 7 a, b, c, d**).

Figura 7. Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c con 4 y 6 semanas pi con *L. braziliensis*. (Coloración: Giemsa Colofonio)

7a. Intensa reacción epitelial epidermal y granuloma dermal con abundante infiltrado celular (1000x).

7b. Muestra tejido dermal esponjoso con abundantes células inflamatorias (1000x).

7c. Muestra granuloma y necrosis dermal con abundante infiltrado celular (100x)

7d. Muestra abundante áreas granulomatosas con destrucción dermal (100x)

4.3. Estudio inmunocitoquímico en las secciones histológicas de la piel de los ratones inoculados con *L. braziliensis*

4.3.1. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta

. Las secciones histológicas de la piel procesadas por IFI y con 30 min y 2 h pi, mostraron intensa fluorescencia en la unión dermis-epidermis, parásitos de forma similar a los promastigotos inoculados así como, formas redondeadas libres en la superficie dermal.

A las 5 h pi la epidermis permaneció fluorescente siendo más intensa alrededor del área perivascular dermal

A los 2 y 5 días pi tanto la epidermis como la dermis mostraron fluorescencia puntual y en la dermis se observaron restos antigénicos fluorescentes. Las secciones de piel procesadas a los 2, 4, y 6 sem pi, mostraron restos antigénicos fluorescentes dispersos en la dermis (**Figura 8**).

Figura 8. Sección histológica de la piel de ratón BALB/c inoculado con *L. braziliensis* a las 5 h pi, que muestra intensa fluorescencia en el tejido dermal, con especial referencia en la unión dermo-epidermis (1000x).

4.4. Estimación del número de Células de Langerhans mediante el Sistema Avidina-Biotina. Inoculación con *L. braziliensis*

Pocos minutos después de la inyección intradermal de los promastigotos del aislado MAMU 93 de *L. braziliensis* en las extremidades posteriores de los ratones BALB/c, se produjo un incremento de las C L en la epidermis separada del sitio de la inyección de los parásitos, el cual resultó

estadísticamente significativo ($P < 0,05$) al hacer las comparaciones entre cada período de estudio.

La cuantificación de las CL en cada sección epidermal mostró un valor inicial de 200.0 ± 83.7 CL/mm² a los 30 min, 442.0 ± 22.7 LC/mm² a las 2 h, $525.0 \pm 13,8$ CL/mm² a las 5 h, 1448.0 ± 128.3 CL/mm² a los 2 días, 3061.7 ± 98.1 LC/mm² a los 5 días, 4502.7 ± 713.3 CL/mm² a las 2 sem.

A partir de las 2 sem pi los valores de CL comenzaron a disminuir de tal forma que cuantificamos 1864.7 ± 356.3 CL/mm² a las 4 sem pi y 898.0 ± 480.7 CL/mm² a las 6 sem pi.

El número de CL cuantificadas en las epidermis separadas de los ratones sanos controles variaron entre 83.0 ± 27.2 y 121.0 ± 29.2 CL/mm².

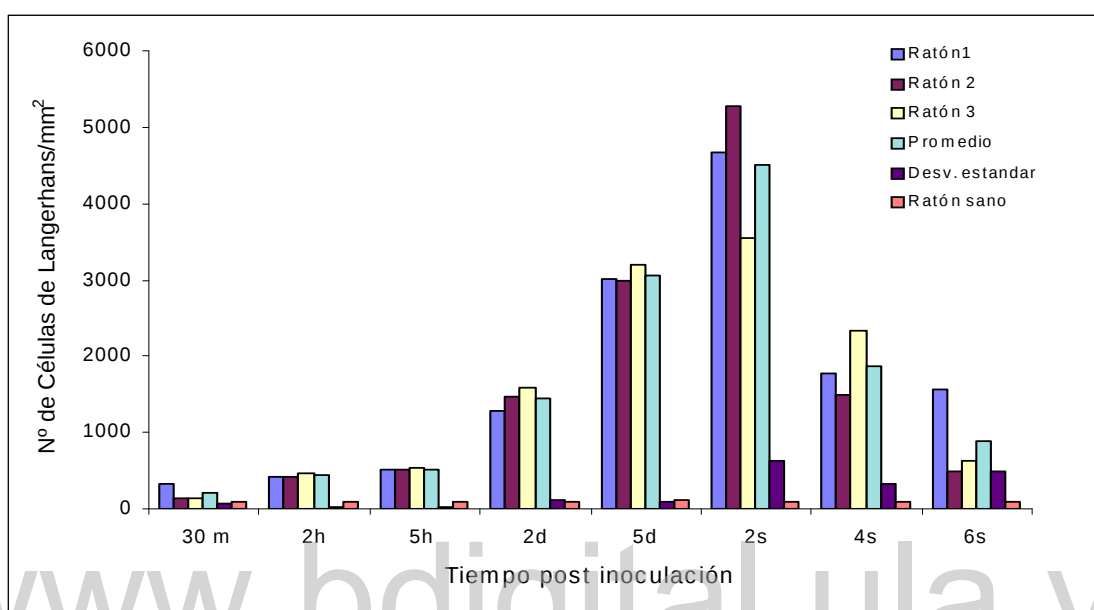
En el **Cuadro 2** se observa el número de CL detectadas en cada una de los trozos de epidermis separados de cada ratón BALB/c infectado con *L. braziliensis*. El **gráfico 1** muestra el incremento progresivo del número de CL desde los 30 min pi, alcanzándose el máximo en el número de estas células a las 2 sem pi, y una disminución progresiva del número de CL a medida que transcurre el tiempo de infección hasta las 6 sem pi.

Cuadro 2. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. braziliensis*.

Ratón N°	30 min	2h	5h	2d	5d	2S	4S	6S
Ratón 1	318	422	511	1283	3001	4680	1766	1575
Ratón 2	133	431	526	1465	2984	5274	1486	500
Ratón 3	149	474	544	1596	3200	3554	2342	621
Promedio	200	442	525	1448	3061,7	4502,7	1864,7	898
Desv. estándar	78,66	21,11	12,44	110	92,22	632,44	318,22	480,78
Ratón sano	101	93	89	97	115	97	98	103

min, minutos; h, horas; d, días; s, semana; pi, post-inoculación, Desv. desviación

Gráfico 1. Representación del número de células de Langerhans en la epidermis separada de los ratones BALB/c inoculados con *L. braziliensis*



4.5. Estudio celular en la piel de los ratones BALB/c inoculados con el aislado 574 de *L. mexicana*

4.5.1. Cuantificación celular en los frotis de piel

4.5.1.1. Coloración con Giemsa

La estimación de los tipos de células en los frotis de piel de los ratones inoculados con el aislado 574 de *L. mexicana* y coloreados con Giemsa, determinó una proporción de 35,0% (McN) y 60.5% de (McA) a los 30 min pi respectivamente.

A partir de este tiempo pi el número de McA aumentó en relación con la proporción de McN, observándose un 96.0% de McA y 3.0% de McN a los

5 días pi. Estos tipos de células continuaron disminuyendo hasta la 4 sem pi, cuando ocurre un nuevo incremento a las 6 sem pi.

En relación con las células polimorfonucleares se produjo un incremento en la proporción de neutrófilos, con valores que oscilaron entre el 6.0 % a los 30 min pi, 21.5% a las 2 h y 17.5% a los 5 d pi.

A partir de este tiempo pi el número de neutrófilos varió entre 14.0%, 13.5% y 10.0% a las 2, 4 y 6 sem pi respectivamente.

En relación con el número de eosinófilos sólo observamos el 3.0% de este tipo de célula a las 2 sem pi.

La proporción de linfocitos degradados también fueron observados con 1.5% a los 30 min pi y 48.0%, 22.5% y 19.0% a las 2, 4, y 6 sem pi respectivamente. Un 3.5% y 1.5% de Monocitos fué observado a las 2 h pi y 6 sem pi respectivamente.

Una alta proporción de McN (96.0%) fue observada en la piel de los ratones sanos controles (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Número y tipo de células observadas en los frotis de piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana*

Tiempo infección	McN	McA	Neutrófilos	Eosinófilos	Linfocitos Normales	Linfocitos. Degradado	Monocitos	Monocitos Activados	Ratón Sano
30min	35,0	60,5	6,0	0	1,5	1,5	0	0	96,0
2h	24,5	41,5	21,5	0	4,0	0	3,5	0	0
5h	2,5	35,0	17,5	0	16,5	0	0	0	2,0
2d	19,0	43,5	14,5	0	12,0	0	0,5	0	1,0
5d	3,0	96,0	0	0	0	0	1,0	0	1,0
2s	10,0	14,0	14,0	3,0	68,5	48,0	2,5	0	0
4s	42,5	19,0	13,5	0	49,0	22,5	1,0	0	0
6s	58,0	47,5	10,0	0	68,0	19,0	1,5	0	0

McN: macrófagos normales, McA: macrófagos activados, 96% McN en el ratón sano

4.5.1.2. Inmunofluorescencia indirecta

En los frotis de piel de los ratones inoculados con el aislado 574 y procesados mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, observamos parásitos fluorescente, macrófagos activados vacuolados con porciones fluorescente en el citoplasma a los 30 min pi.

A los 2 y 5 días pi los frotis mostraron macrófagos con fluorescencia alrededor de su membrana, mientras que a los 2, 4 y 6 sem pi fue frecuente la detección de linfocitos y macrófagos activados con inclusiones fluorescentes en el citoplasma.

4.5.2. Histopatología de la piel de los ratones infectados con el aislado 574 de *L. mexicana*

Las secciones histológicas de la piel de los ratones con 30 min pi con el aislado 574 y coloreadas con Giemsa colofonio, mostraron abundante mastocitos muy granulados en el borde superior de la epidermis y en el epitelio epidermal profundo cercano a la dermis, los amastigotos fueron observados en la dermis junto al infiltrado celular.

A los 2 y 5 días pi se observó mayor cantidad de mastocitos muy granulados en la epidermis, abundante infiltrado celular compuesto por macrófagos activados, linfocitos y neutrófilos en el tejido dermal (**Figura 9 a, b**).

A las 2, 4 y 6 sem pi las secciones histológicas de la piel mostraron destrucción dermal e infiltrado celular formado por macrófagos activados y linfocitos (**Figura 10 a, b**).

Figura 9. Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c con 2 días (a) y 5 días pi (b) con *L. mexicana* (Coloración: Giemsa Colofonio)

9 a. Mastocitos granulados en la dermis, infiltrado celular dermal (200x)

9b. Muestra mastocitos muy granulados →, infiltrado celular y disgregación dermal (500x).

Figura 10. Secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana*. (a) mastocitos dispersos en la dermis 2 sem pi. (b) Infiltrado celular, alteración dermal alrededor del área perivascular y mastocito en la dermis profunda a las 6 sem pi (200x).

10 a.

10 b.

4.6. Estudio inmunocitoquímico

- **Inmunofluorescencia Indirecta**

Las secciones histológicas de la piel de los ratones BALB/c procesadas por IFI y con 30 min pi, mostraron parásitos fluorescentes dispersos sobre el tejido dermal.

A los 2 y 5 días pi la reacción fluorescente fue observada en el borde del tejido epidermal. Los restos antigénicos fluorescentes fueron observados dispersos en la dermis a las 4 y 6 sem pi como se muestra en la **Figura 11**.

Figura 11. Sección histológica de la piel de ratón BALB/c con 4 sem pi que muestra antígeno de *L. mexicana* disperso en el tejido epidermal (Isotiocianato de fluoresceína contractada con Ioduro de propidio) (500x).

4.7. Estimación del número de células de Langerhans mediante el Sistema Avidina-Biotina. Inoculación con *L. mexicana*

Las epidermis separadas de los ratones infectados con el aislado 574 de *L. mexicana* revelaron un elevado número de CL, representado por 2903.5 ± 76.5 CL/mm² a los 30 min pi. A partir de este tiempo pi el número de CL comenzó a disminuir registrándose los siguientes valores: 2103 ± 187 CL/mm² a las 2 h pi; 524 ± 26 CL/mm² a las 5 h pi y 189 ± 49 CL/mm² a los 2 días pi.

A partir de este último tiempo pi, el número de CL estuvo representado por 919.5 ± 60.5 CL/mm² a los 5 d pi; 729.5 ± 51.5 CL/mm² a las 2 sem pi; 613 ± 119 CL/mm² a las 4 sem pi y 1089.5 ± 24.5 CL/mm² a las 6 sem pi.

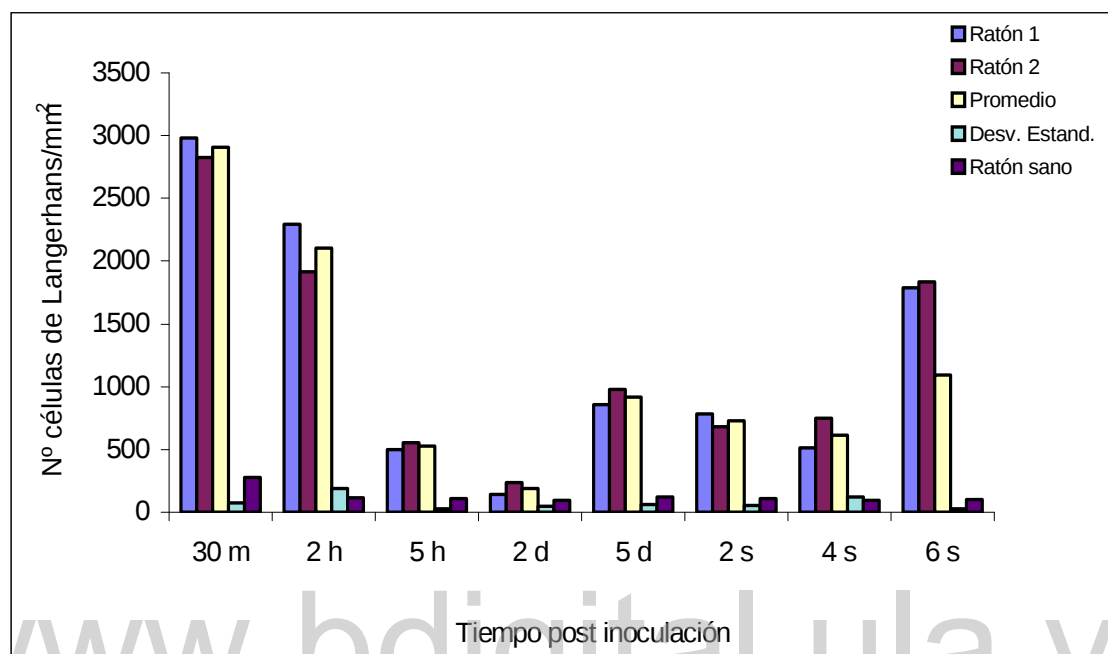
En el **Cuadro 4** y en el **gráfico 2** se muestra el número de CL detectadas en las epidermis separadas de cada grupo de ratones infectado con *L. mexicana*, así como el número de CL presentes en la epidermis de los ratones sanos cuyos valores variaron entre 93 y 275 CL/mm².

Cuadro 4. Número de células de Langerhans en la epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana*

Ratón N°	30 min	2 h	5 h	2 d	5 d	2 s	4 s	6 s
Ratón 1	2980	2290	498	140	859	781	512	1785
Ratón 2	2827	1916	550	238	980	678	750	1834
Promedio	2903.5	2103	524	189	919.5	729.5	613	1089.5
Desv. Estand.	76.5	187	26	49	60.5	51.5	119	24.5
Ratón sano	275	115	106	93	120	105	97	101

Desv Estand: Desviación estándar, min: minutos, h: horas, d: días, s: semanas,

Gráfico 2. Representación del número de células de Langerhans en la epidermis separada de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. mexicana*.



5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las células de Langerhans epidermales son ciertamente las células presentadoras de antígeno más importantes de la piel, se dividen en la epidermis, (Czernielewski y cols., 1985) y constituyen un grupo de células dendríticas inmaduras, las cuales maduran una vez que han salido del microambiente epidermal para convertirse en células inmunológicamente funcionales (Schuler y Steinmann, 1985).

Las investigaciones realizadas por Romani y cols. (1989), han sugerido que la función de las células de Langerhans envuelve dos eventos

secuenciales los cuales contemplan: la presentación del antígeno y las etapas de sensibilización en las cuales las CL adquieren la capacidad de inducir la respuesta de las células - T. El primer evento ocurre en la epidermis mientras que el segundo puede ocurrir sólo cuando las células dendríticas migran por la circulación a los nódulos linfáticos o al bazo.

La proliferación de las células - T permite la formación de granulomas, los cuales pueden ser de varios tipos: infiltrado linfo-histiocítico o reacción tipo-tuberculina compuesto generalmente por linfocitos y monocitos, granuloma tuberculoide compuesto de linfocitos, macrófagos diferenciados, células epitelioides y células gigantes multinucleadas y el granuloma macrofágico compuesto de macrófagos no diferenciados y pocos linfocitos (Modlin y cols., 1983a; Gross y cols., 1988).

En este sentido el resultado de las observaciones en los frotis de piel de los ratones infectados con el aislado MAMU-93 de *L. braziliensis* y 574 de *L. mexicana*, reveló que desde el mismo momento en que ocurre la penetración intradermal de los promastigotos de estos parásitos en la piel, se activa la proliferación de las células inflamatorias.

La diferenciación de los tipos de células localizadas en la piel de los ratones BALB/c infectados con cada uno de los aislados de parásitos en los diferentes tiempos pi, reveló la presencia de granulomas estructuralmente organizados por macrófagos normales, macrófagos activados, neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, linfocitos degradados, monocitos y monocitos activados los cuales pudieran ser ubicados al menos en parte, dentro del identificado como granuloma tuberculoide de acuerdo a lo referido por los autores.

Es bien conocido que las *Leishmania* son parásitos intracelulares de fagocitos mononucleares que normalmente viven y se multiplican en los

fagolisosomas de los macrófagos, lo que provoca en el medio ambiente intracelular de estas células fagocíticas sufrir alteraciones, debido a la interacción que se establece entre los macrófagos y los productos de la respuesta inmune a efectos de la eliminación de los parásitos (Chang y cols., 1976).

Otros estudios han documentado el papel de la inmunidad mediada por células, particularmente por la relación antígeno-linfocitos - T sensibilizados, en la resolución de las infecciones leishmaniales (Garum y Humphrey, 1969; Dumonde, 1972), por lo que los productos solubles de los linfocitos sensibilizados pueden conferir a los macrófagos el aumento de la actividad antimicrobial contra una variedad de parásitos intracelulares obligados o facultativos.

Estos macrófagos microbicidas llamados macrófagos inmunológicamente activados pudieran ser, las células efectoras protectoras durante la respuesta del hospedador a una infección por *Leishmania* (Fowles y cols., 1973; Mauel y cols., 1978).

Algunos estudios han revelado que debido la activación de los macrófagos se produce por la generación de los linfocitos T los cuales segregan apropiadas citocinas, particularmente IFN- γ el cual le confiere la capacidad para la eliminación de los parásitos (Nacy y cols., 1985).

En este estudio fue frecuente la detección de una gran población de macrófagos tanto normales como activados en la piel de los dos grupos de ratones BALB/c, un grupo resistente a la infección con *L. braziliensis* y el otro susceptible a la infección con *L. mexicana* esta resistencia y susceptibilidad estarían condicionando la resolución o evolución de la infección cutánea (Pérez y cols., 1979).

Estos tipos de células fagocíticas estuvieron mayormente representados por los macrófagos normales y activados. Los resultados mostraron una alta proporción de McA (74.3% y 57.66 %) en los frotis de la piel inoculada con *L. braziliensis* y (60.5% y 41.5%) y en los inoculados con *L. mexicana*, a los 30min y 2h pi respectivamente.

Estos valores representaron casi el doble de este tipo de células, al compararlos con la proporción de McN observados en los mismos frotis de piel de los ratones BALB/c inoculados con leitos aislados y con el mismo tiempo de inoculación.

Aún cuando observamos la internalización de los parásitos a los 30 min y 2h pi, sin embargo algunos promastigotos permanecieron libres en el sitio de inoculación cutánea por un corto período de tiempo (30 min), otros parásitos mostraron evidentes signos de transformación hacia la forma amastigota redondeada, mientras que otro grupo de parásitos fueron observados con diferentes grados de degeneración.

Estas alteraciones morfológicas mostradas por los parásitos probablemente se deben a el desfavorable medio ambiente que crean las linfoquinas activadoras de macrófagos las cuales afectan a los organismos extracelulares (Bast y cols., 1974; Hemsworth y Kochan, 1978), o a la presencia de los productos solubles de la respuesta inmune utilizada en la activación de los macrófagos, lo cual induce una acelerada destrucción de

los parásitos en un medio ambiente intracelular inadecuado (Buchmuller y Mauel., 1979; Behin y cols., 1975).

Las observaciones realizadas en el material tisular tomado de la piel de los ratones BALB/c inoculados con *L. braziliensis*, difieren de las realizadas en las muestras de piel de los ratones inoculados con *L. mexicana*. La diferencia más notable estuvo relacionada con la proporción de McA estimados a los 5 días pi, la cual fue de 96.0% en la piel de los animales inoculados con *L. mexicana* con respecto a 23.67 % McA en los inoculados con *L. braziliensis*. Por otro lado, es importante mencionar que esta población celular mantuvo una proporción importante de 31.74% y 47.5% de McA en la piel de los ratones con 6 sem pi, inoculados con *L. braziliensis* y *L. mexicana* respectivamente.

Al revisar la proporción de linfocitos y de monocitos en las mismas muestras de piel pero en los animales infectados con *L. mexicana* notamos una elevada proporción de estos dos tipos de células en relación con la observada en la piel de los animales infectados con *L. braziliensis*, a las 2 y 6 sem pi.

Esta combinación macrófago-linfocito estaría presente por que se establece la cooperación entre estos dos tipos de células en contra de los parásitos de *Leishmania* (Skamene y cols., 1983). De tal forma, que la función de los linfocitos estaría principalmente relacionada con el reconocimiento de los macrófagos parasitados, lo que pudiera finalmente contribuir con la destrucción de estas células fagocíticas (Schurr y cols., 1987), por el contrario colabora con los macrófagos para eliminar intracelularmente al parásito (Mauel y cols., 1978).

La unión de linfocitos que son probablemente células T citotóxicas con los parásitos, indica la especificidad de estas células para atacar al parásito directamente.

En este estudio las condiciones y los mecanismos de destrucción de los parásitos no fueron revisados, sin embargo la detección de las células inflamatorias como los eosinófilos y neutrófilos en la piel inoculada con los diferentes aislados de *Leishmania*, señala el papel fagocítico de estas células sobre los parásitos, habida cuenta de que la presencia de los parásitos dentro de los eosinófilos presentes en las lesiones ha sido reportada en los estudios experimentales sobre leishmaniasis cutánea en ratones BALB/c (Barral-Netto y cols., 1987; McElrath y cols., 1987).

Investigaciones llevadas a cabo sobre leishmaniasis cutánea experimental han demostrado que los parásitos se mantienen vivos y son capaces de multiplicarse en la unión dermo-epidermal pero están ausentes en la epidermis (Axelrod y cols., 1994).

En este estudio, la observación de la reacción fluorescente en las secciones de piel de los ratones BALB/c infectados tanto con *L. braziliensis* como con *L. mexicana*, se evidenció tanto en el área de la unión dermo-epidermal como alrededor del área perivascular. Estas observaciones soportan el hecho de que los parásitos se han acumulado en estos sitios de la piel en los tiempos muy tempranos de la inoculación de los promastigotos, los cuales se dispersan posteriormente hacia las capas más profundas de la piel, tal como lo muestran las reacciones positivas en las secciones histológicas de la piel a las 6 semanas pi.

Por otro lado, a pesar de la presencia de amastigotos en el área dermal de la piel de los animales infectados, estos son detectados en las secciones histológicas coloreadas con Giemsa-colofonio y mediante la

reacción inmunocitoquímica, no notamos ningún tipo de induración palpable en el sitio de inoculación de los promastigotos durante el tiempo de observación de los ratones inoculados. Es especulable que tal fenómeno se deba posiblemente a la temprana activación de los macrófagos por las linfocinas lo que incrementa la resistencia a la infección, a diferencia de lo observado por Perez y cols. (1979), quienes detectaron nódulos palpables en el sitio de inoculación en los tarsos de ratones BALB/c con amastigotos del aislado AZV de *L. mexicana* con dos semanas pi.

Bajo ciertas condiciones patológicas las células de la piel con potencial función accesoria incluye tanto a los macrófagos dermales como a los epidermales, Thy-1-positivas, células dendríticas epidermales, CL y los keratinocitos. Algunos investigadores han sugerido que los macrófagos son las verdaderas células fagocíticas de la piel, mientras que las CL sólo son células capaces de degradar al antígeno por pinocitosis, el cual ha sido previamente procesado por los macrófagos o por los queratinocitos (Hamilos, 1988).

En tal sentido, algunas investigaciones han reportado que cuando ocurre la penetración de los parásitos dentro de la piel, los leucocitos polimorfonucleares salen de la circulación sanguínea y se adhieren sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos, debido a la acción de sustancias vasodilatadoras producidas por las células mastoideas, este tipo de células fueron observadas en forma abundantes en las capas profundas de la dermis de los ratones inoculados con *Leishmania*; o a los peptidos reguladores producidos tanto por los nervios cutáneos; como por los linfocitos (O'Dorisio y cols., 1985). Posteriormente los granulocitos pasan al área infectada y luego las células presentadoras de antígeno tales como,

las células de Langerhans y los macrófagos aparecen como células predominantes fagocitando y destruyendo al agente extraño.

Algunos trabajos relacionados con las lesiones de leishmaniasis tanto del Viejo como del nuevo Mundo, han reportado cambios epidérmicos en las infecciones por *Leishmania* (Zarr y cols., 1982; Grimaldi y cols., 1980). Nuestros resultados indican que las especies de *Leishmania* del nuevo Mundo pueden afectar la epidermis. En este estudio, fue frecuente la observación en la epidermis de vesículas epidérmicas o espongióticas junto a linfocitos y otras células mononucleares, keratinocitos además de otras alteraciones menores. La dermis mostró un desplazamiento hacia la epidermis y un moderado número de amastigotos, infiltración celular y formación de granuloma dermal.

Las células dendríticas localizadas en órganos no linfoides como las CL epidérmicas, son capaces de migrar por la vía linfática hacia las células T en los tejidos linfoides (Kripke y cols., 1990). Esta translocación provee un medio eficiente de transporte del antígeno desde el sitio de encuentro en la piel hacia los nódulos linfáticos para que se produzca el inicio de la respuesta inmune celular.

En los trabajos más recientes de infección por *L. major* in vitro, se ha demostrado que las células de Langerhans epidérmicas tienen capacidad fagocítica y actúan como células hospedadoras de los parásitos, los cuales son capturados en el compartimiento dermal (Blank y cols., 1993; Moll y cols., 1993).

En este estudio, la caracterización de las células de Langerhans en la epidermis separada de los ratones BABL/c inoculados con *L. braziliensis* y *L. mexicana*, utilizando procedimientos inmunocitoquímicos con el anticuerpo monoclonal NLDC-145, demostró que se produce un incremento

progresivo en el número de CL desde el inicio de la inoculación intradermal de los promastigotos de *L. braziliensis*, alcanzando un valor máximo a las 2 sem pi.

El significado del incremento de las células de Langerhans en diferentes desórdenes dermatológicos no ha sido bien dilucidado. Sin embargo, se ha sugerido que las CL pueden estar envueltas en el proceso patológico inicial. Esto puede ser el caso en la leishmaniasis donde las CL son un potencial blanco para los parásitos ((Dompmartin y cols., 1988), contribuyendo significativamente en el desarrollo de una respuesta inmune durante la fase temprana de la infección.

A diferencia de lo que ocurre en los ratones infectados con *L. braziliensis*, la cuantificación de las células de Langerhans en la epidermis separada de los ratones inoculados con *L. mexicana*, se detectó un gran número de ellas en la epidermis a los 30 min pi, produciéndose luego una caída brusca y un leve aumento en el número de las CL epidérmicas a las 6 sem pi.

Hasta el momento, no tenemos una explicación que nos permita discutir el significado de las diferencias observadas cuando cuantificamos las CL epidérmicas en la piel de ambos grupos de animales, es decir, cuando en un grupo animal se observan valores máximos en el otro este número cambia en sentido contrario.

Los conocimientos actuales señalan a las células dendríticas como un grupo fundamental en la generación de la respuesta inmunológica, con particular participación en el mantenimiento de la memoria, respondiendo a una estimulación antigénica continua (Tew y cols.,1980).

En el curso de infecciones con *L. major* Blank y cols. (1993) notaron una disminución significativa en el número de células de Langerhans en la

epidermis de lesiones cutáneas a partir de las 48 hr pi y posteriormente la epidermis apareció desprovista de éstas células en los estados tardíos de la infección crónica.

Estos autores consideraron que la pérdida de las células de Langerhans en el compartimiento epidermal fue concomitante con la aparición de células positivas al anticuerpo monoclonal NLDC-145 en la dermis, algunas de las cuales contenían parásitos. Estas observaciones explican que por si sola, la relación inversa que se presenta entre el número de CL en la dermis y la epidermis, demuestra el hecho de que en el modelo murino, utilizado en este estudio, se produzca una considerable pérdida de CL epidermales en el transcurso de la infección intradermal por *L. braziliensis* y *L. mexicana*.

Estos encuentros indican que en la leishmaniasis cutánea, las células de Langerhans migran desde la epidermis al sitio de infección en la dermis y en el infiltrado dermal tienen la capacidad de fagocitar los parásitos. En este contexto pudiéramos explicar el porqué de la disminución de CL epidermales con el transcurso de la infección experimental, situación que pudiera presentarse en humanos después de la deposición de los promastigotes por el insecto transmisor.

La evidencia experimental obtenida en el presente trabajo nos indica que diferentes factores pueden intervenir cuando se produce la inoculación intradermal de promastigotos de *Leishmania* en el modelo murino, tales como: la especie, edad de los animales y el tamaño del inóculo infectante. Estos factores determinarían el curso de la infección y la sobrevivencia de los parásitos en el hospedador. Por lo que podemos concluir que tanto las células de Langerhans como el resto de las células comprometidas en el desarrollo de la infección, juegan un papel importante en el procesamiento

y/o eliminación de los parásitos, expresando de este modo la capacidad hacia la resistencia o susceptibilidad del hospedador a una infección por *Leishmania*.

6. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Aguilar, C., Dávila, I., Pacheco, M. & Iscani, R. (1996) Parasitología. Escuela de Medicina de la Universidad de Carabobo Valencia, Venezuela. 161 - 171.
2. Alexander, J. (1981). *Leishmania mexicana*. Inhibition an stimulation of phagosome - lysosome fusion in infected macrophages. Exp. Parat., **52**:261 - 270.
3. Bast, R. C., Cleveland, R. P., Littman, B., Zbar, B. & Rapp, H. (1974). Acquired cellular immunity: extracellular killing of *listeria monocytogenes* by a product of immunologically activated macrophages. Cell. Immunol., **10**:248 - 250.
4. Barral-Netto, M., Freitas, L.A.R. & Andrade, Z. (1987). Histopathological changes induced by vaccination in experimental cutaneous leishamniasis of BALB/c mice. Ann. J. Pathol., **127**:271 - 278.
5. Behin, R., Mauel, J., Broum- Noerjasin, R. & Rowe, D.S. (1975). Mechanism of protective immunity experimental cutaneous leishamniasis of the guinea pig II. Selective destruction of different *Leishmania* species in activated guinea pig and mouse macrophages. Clin. Exp. Immunol., **20**: 351 - 353.

6. Blanck, C., Fucks, H. & Rapperberger, K. (1993). Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. J. Infect. Dis., **167**:418 - 425.
7. Bos, J. D. & Kapsenber, M. L. (1986). The skin immune system. Immunol. Today., **7**:235 - 239.
8. Buchmuller, Y. & Mauel, J. (1979). Studies on the mechanism of macrophage activation. II. Parasite destruction in macrophage activated by supernatants from concavalin A- stimulated lymphocytes. J. Exp. Med., **150**:359 - 61.
9. Bray, R. S. & Garnham, P. C. C. (1962) The Giemsa - Colophonium method for staining protozoa in tissue sections. Indian. J. Malar., **16**:153 - 156.
10. Brener, Z. (1961). Contribução do estado do terapêutico experimental do doença do Chagas tese. Fac. Odont. Univ. Minas. Gerais. Belo. Horizonte., **20**:191 - 208.
11. Cáceres, D., Sanchez, M. A., Rondon, A. J. & Tapia, F. J. (1992). Immunocytochemical characterization of epidermal cells in American cutaneous Leishmaniasis. Acta Microsc J., **1**:118 -121.
12. Carnevalli, M. & Scorza, J. V. (1982). Factores dérmicos que condicionan la infección de *Lutzomyia townsendi* en Venezuela, Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **77**:353 - 365.
13. Chang, K.P. & Dwyer, D. M. (1976). Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosome of hamster macrophages in vitro. Science., **193**:687 - 690.

14. Coutinho- Abath, E. & Coelho, M. (1965). Experimental cutaneous leishmaniasis. II. The pathology of leishmaniasis by *Leishmania mexicana*. Rev. Int. Med. Trop. Sao Paulo., **7**:145 -155.
15. Czermielewski, J. M., Vaigot, P. & Prunieras, M. (1985). Epidermal Langerhans cell a cycling cell population. J. Invest. Dermatol., **84**:424 -426.
16. Domp Martin, A., Healy, A. T., Nacy, C. A. Hauser, C. & Meltzer, M. S. (1988). *Leishmania major* infects and replicates within murine epidermal Langerhans cells. J. Invest. Dermatol., **91**:404 - 406.
17. Dumonde, C. (1972). Experimental cutaneous leishmaniasis III. Effect of thymectomy on the course of infection of CBA mice the *Leishmania tropical*. Clin. Exp. Immunol., **10**:337 - 339.
18. Dustin, M. L. & Springer, T. A. (1989). T cell receptor cross linking transiently stimulate adhesiveness through LFA. Nature., **341**:619 - 6.
19. Fowles, R. E., Fajardo, I. M., Leibowitch, J. L. & David, R. J. (1973). The enhancement of bacteriostasis by products of activated lymphocytes. J. Exp. Med., **148**:393 - 396.
20. Garnum, P.C.C. & Humphrey, J. H. (1969). Problems in leishmaniasis related to immunology. Curr. Trop. Microbiol. Immunol., **48**:29 - 31.
21. Grimaldi, G., Moriearty, F. & Hoft, R. (1980). *Leishmania mexicana*. Immunology and histopathology in C3h mice. Exp. Parasitol., **50**:45-56.
22. Gross, A., Weiss, E., Tapia, F., Aranzazu, N., Gallinoto, M. E. & Convit, J. (1988). Leucocyte subsets in the granulomatous response

produced after inoculation with *mycobacterium leprae*- BCG in lepromatous patients. Ann. J. Trop. Med. Hyg., **38**:608 - 612.

23. Hamilos, D. L. (1988). Immunocompetent dendritic cells year. Immunol., **3**:89 -118.
24. Hemsworth, G. H. & Kochan, I. (1979). Secretion of antimycobacterial fatty acids by normal and activated macrophages. Infect. Immunol., **19**: 170 - 175.
25. Iturbe, J. & González, E. (1917). Primer caso de leishmaniasis cutánea en Venezuela. Gac. Med. Caracas., **48**:292 - 299.
26. Kripker, M., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. & Bucana, C. (1990). Immunol., **145**:2833 - 836.
27. Lainson, R. & Shaw, J. (1972). Leishmaniasis of the new world: taxonomic problems. Brit. Med. J., **28**:44 - 45.
28. Lainson, R. (1983). The american leishmaniasis some observations on their ecology and epid. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **77**:569 - 596.
29. Lainson, R. & Shaw, J. (1987). Evolution classification and geographical distribution. In the leishmaniasis., Vol 1. Academic. Press. Inc. London., **1**:64 - 65.
30. Lugo de Yarbuh, A., Añez, N., Valera, M. & Moreno, E. (1996). Detección de títulos de anticuerpos, proteínas totales, albúmina y globulinas en casos de leishmaniasis cutánea tratados con Glucantime, Parasitol al día., **20**:20 - 26.

31. Magalhães A. V., Moraes, M. A. O., Raick, A. N. (1986). Immunology response in infection *Leishmania*. Rev. Med. Trop. Sao Paulo., **28**:253 -262.
32. Martínez, A., Tapia, F. J., Cáceres, D. G., Mosca, W., Valecillos, L. & Convit, J. (1991). Immunocytochemical characterisation of immune cell in lesion of American cutaneous Leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. **60**:241 - 248.
33. Martínez, A. & Pons, A. (1941). Citado en leishmaniasis en Venezuela. Scorza, J. V., Medina, R., Pérez, H. & Hernández, A. G. (1985). Leishmaniasis (Chang/ Bray, eds). Elsevier Science Publisher B. V. (Biomedical Division).
34. Mael, J., Buchmuller, Y. & Behin, R. (1978). Studies on mechanism of macrophage activation I. Destruction of intracellular *Leishmania enriettii* in macrophage activated by cocultivation with stimulated lymphocytes. J. Exp. Med., **148**:393 - 398.
35. McElrath, M. J., Kaplan, G., Nusrat, A. & Cohn, Z. A. (1987). Cutaneous leishmaniasis. The defect in cell influx in BALB/c mice. J. Exp. Med., **165**: 546 - 559.
36. Moldin, R. L., Hofman, F. M., Taylor, C. R. & Rea, T. H. (1983 a). T and lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. J. Ann. Acad. Dermatol., **8**:182 - 189.
37. Moll, H. (1993). Epidermal Langerhans cell are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis, Immunol Today., **23**:383 -386.

38. Moll, H., Fucks, H., Blansk, C. & Rollinghoff, M. (1993). Langerhans cell transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen specific T cell. *Eur. J. Immunol.* **23**:1595 -1601.
39. Mosser, D. & Edelson, P. (1985). The mouse macrophage of CR3 is major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol.*, **153**:2785 - 89.
40. Müller, J. T., Predrassinit, J. P. & Louis, J. A. (1989). T cell response and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**:561- 578.
41. Nacy, C. A., Fortier, A. H. & Meltzer, M.S. (1985). Macrophage activation to kill *Leishmania major*: Activation of macrophage for intracellular destruction the amastigotes can be induced by both recombinant interferon- γ and non- interferon lymphokines. *J. Immunol.*, **135**:3505 -3511.
42. Nickoloff, B. (1988). Role of interferon- γ in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Arch. Dermatol.*, **124**:1835 -1843.
43. Pérez, H., Labrador, F. & Torrealba, J. W. (1979). Variation in the response of five strain of mice *Leishmania mexicana*. *Int. J. Parasitol.*, **9**:27 - 32.
44. Pessoa, R.B. (1961). Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. *Arq. Hig. Saude. Publ.*, **26**:45 – 50.

45. Pifano, F. C. (1940). La leishmaniasis tegumentaria en el estado Yaracuy, Venezuela. Gac. Med. Caracas., **48**:292 - 299.
46. Robledo, S., Wozencraft, A., Valencia, Z. & Saravia, N. (1994). Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptor and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. The American Association of immunologist. J. Immunol., **152**:1265 - 69.
47. Romani, N., Koide, S., Crowley, M., Witner- Pack, M., Livingtone, A. M., Fathman, C. G., Inaba, K. & Steiman, R. M. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. In tages protein is presented best in immature epidermal Langerhans cells. J. Exp. Med., **169**:1169 -1178.
48. Salinas, G., Valderrama, L., Palma, G., Montes, G. & Saravia, N. (1989). Detección de amastigotos en leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpos monoclonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convecionales de diagnóstico. Men. Int. Oswaldo Cruz., **84**:53 - 60.
49. Sánchez, M., Cáceres- Dittmar, G., Oriol, O., Mosca, W., Kraal, G. & Tapia, F. (1993). Epidermal Langerhans cell and dendritic epidermal T cells in murine cutaneous leishmaniasis. Immunocytochemical study. Acta Microscópica., **2**:180 -187.
50. Schuler, G. & Steiman, R. M. (1985). Murine epidermal Langerhans cell nature into potent immunoestimulatory dendritic cell. in vitro. J. Exp. Med., **161**:526 - 546.

51. Scheffe, G. (1968). Introducción a la inferencia estadística. Mc Graw-Hill Book Company. Ed Castilla S Maestro Alonso, 23 Madrid, España. 223 - 28.
52. Scorza; J., Valero, M., de Scorza, C., Carnevali, M., Moreno, E. & Lugo Hernandez, A. (1979). A new species of *Leishmania* parasite from the Venezuelan Andes region. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **73**:293 –295.
53. Sells, P. & Burton, M. (1981). Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin tixes tissues by immunoperoxidasa staining. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., **75**:461- 468.
54. Shurr, E., Wunderlich, F. & Tadesse, G. (1987). Electron microscopical studies on cutaneous leishmaniasis in Ethiopia II. Parasite and host cell differences between the localized and diffuse form. Acta. Trop., **44**:395 -407.
55. Skamene, E. & Gross, P. (1983). Role of the macrophage in resistance against infectious diseases. Clin. Immunol., **3**:539 - 560.
56. Sprecher, E. & Becker, Y. (1991). Dendritic cell in the epidermis and lymph node a review in skin Langerhans dendritic cell in virus infection and Aids, ed. Y. Becker, P. I. Kluwer Academia Publishers London.,
57. Streilen, J. & Grammer, S. (1989). In vitro evidence that Langerhans cells can adopt two funcionally distinct forms capable of antigen presentation to T lymphocytes. J. Immunol., **155**:863 - 69.
58. Tapia F. J., Rojas E., Kraal G., Mosca, W. & Convit, J. (1988). Immunocytochemical analysis of Langerhans cells in murine

cutaneous leishmaniasis. The Langerhans cell. Ed. J. Thivolet, D. Schmit, Coloque INSERM (John Libbey Eurotest Ltd), **172**:479 - 490.

59. Tapia, F. J., Cáceres, D. C. Sánchez, M. & Bretaña, A. (1993). Células dendriticas y su importancia en la presentación antigénica. Int. Biom. Fac. Med. UCV.
60. Pizzi, T. (1957). Inmunología de la enfermedad de Chagas. Univ. Chile. Santiago., 182 – 184.
61. Tejera, E. (1919). La leishmaniasis americana en Venezuela. Memoria de la Acad. Med. Caracas., 46.
62. Tew, J. G., Phipps, R. P. & Mandel, T. (1980). The follicular dendritic cell long term antigen rejection during immunity. Immunol. Rev., **53**:29 - 34.
63. Valera, M., Moreno, E. & Scorza, J. V. (1978). Cincuenta y seis casos de leishmaniasis tegumentaria de la cuenca de los ríos chamamocotíes (Estado Mérida, Venezuela). Bol. Dir. Malariol. San. Amb., **18**:238 - 247.
64. Wilson, M. & Pearson , R. (1988). Role of CR3 and manose receptor in the attachment and ingestion of *L. donovani* by human mononuclear phagocytes. Infect. Immunol., **56**:363 - 68.
65. Wilson, M., Pearson, R. D. (1979). *L. braziliensis* and *L. mexicana*: Experimental cutaneous infections in golden hamsters. Exp. Parasitol., **47**:270 – 283.

66. Wrigth, S. & Silvertein, S. (1983). Receptor for C3b and C3bi promote phagocytosis but no release of toxic oxigen from human phagocyte. J. Exp. Med., **14**:197-200.

Zarr, K. & Wunderlich, F. (1982). Electronic microscopical studies on cutaneous leishamniasis in Ethiopia I. The diffuse form and its treatment with pentamidine. Ann. Trop. Med. Parasitol., **76**:595 - 605.

www.bdigital.ula.ve