

## Estudio del interferón en pacientes con leishmaniasis cutánea americana

M. CASTÉS,<sup>1</sup> D. TRUJILLO,<sup>1</sup> M. CABRERA<sup>1</sup> Y M. LIMONTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina, Escuela J. M. Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.

Recibido en febrero de 1988

### RESUMEN

Se investigaron algunos aspectos sobre el efecto inmunomodulador del interferón  $\alpha$  en la respuesta linfoproliferativa frente a mitógenos y antígenos de *Leishmania*, de las células mononucleares provenientes de los pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea mucosa (LCM). Asimismo se evaluó la producción de IFN  $\gamma$  en sobrenadantes estimulados con PHA y antígenos del parásito, preparados a partir de las células de estos mismos pacientes.

Nuestros resultados sugieren que los pacientes con LCM no parecen ser susceptibles al efecto modulador del IFN  $\alpha$  en respuesta a mitógenos y antígenos, como sí parecen serlo los pacientes con LCL.

Además, se encontró que los pacientes con LCL y LCM producen niveles significativos de IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes estimulados con PHA y antígenos parasitarios, comparados con los sobrenadantes no estimulados. Sin embargo, la producción de IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes de los pacientes con LCM fue significativamente mayor que en los pacientes con LCL.

Estos resultados pueden ayudar a explicar parcialmente el estado de hipersensibilidad y daño en las mucosas que presentan los pacientes con LCM.

### SUMMARY

Various aspects of the immunomodulatory effect of  $\alpha$ -interferon on the lymphoproliferative response to mitogens and *Leishmania* antigens of the mononuclear cells from patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and mucocutaneous patients (LCM) were studied. The production of  $\gamma$ -interferon was also examined in the supernatants of cells from the same patients stimulated by PHA or the parasite antigens.

Our results suggest that in contrast to patients with LCL, those with LCM are not susceptible to the modulatory effect of  $\alpha$ -IFN on the response to mitogens and antigens. Also, it was found that both LCL and LCM patients produce significant levels of IFN  $\gamma$  in the supernatants from cells stimulated with PHA or *Leishmania* antigens, compared with unstimulated controls. The production of  $\gamma$  IFN was, however, significantly greater in the LCM patients.

These results could help to partially explain the hypersensitivity and mucosal damage presented by LCM patients.

## INTRODUCCION

La leishmaniasis cutánea americana (LCA) es una enfermedad producida por la infección de un protozoo flagelado que invade y crece dentro de los macrófagos. Se manifiesta en tres formas clínicas generales: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), en la cual se desarrolla una lesión dérmica ulcerada simple (u ocasionalmente múltiple), que puede regresar espontáneamente luego de un período variable de tiempo; leishmaniasis cutánea mucosa (LCM), con lesiones que contienen pocos parásitos, pero que progresan y a menudo causan daño histopatológico, anatómico y funcional de las membranas mucosas orales, nasales, faríngeas o laríngeas; y leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que se caracteriza por la presencia de nódulos no ulcerados, ricos en parásitos y que pueden extenderse por toda la superficie corporal.

En trabajos previos (Castés *et al.*, 1983,1984), hemos demostrado que los pacientes con LCD presentan una falta de respuesta *in vivo* e *in vitro* a los antígenos de *Leishmania* y presentan una marcada supresión de las respuestas mitogénicas *in vitro*, inducida por el antígeno de *Leishmania*. En contraste, pacientes con LCM presentan una hiperrespuesta al antígeno del parásito, y no demuestran actividad supresora. Los pacientes con LCL, que generalmente controlan su infección, presentan moderadas respuestas a los antígenos de *Leishmania*, y parecen haber establecido un balance entre actividades supresoras y estimuladoras.

También se investigaron en estos pacientes aspectos de regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las prostaglandinas y sensible a la indometacina (Castés *et al.*, 1987).

Los interferones son proteínas que, además de su capacidad para interferir con la replicación viral, pueden ejercer un gran número de efectos que pueden ser clasificados como efectos antiproliferativos (Vilcek *et al.*, 1980), lo que ha conducido al uso del interferón en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas (Gresser y Bourali, 1970) y efectos inmunorreguladores tales como: aumento de la actividad de las células NK (Heron *et al.*, 1970), activación del sistema del complemento (Yefenof y Mc. Connell, 1982), modulación de la respuesta primaria y secundaria de anticuerpos (Brodeur y Merigan, 1984), entre otros.

Además, recientemente se ha reportado un papel crítico para el IFN  $\gamma$  como la principal linfoquina que media la activación macrofágica, lo cual permite la destrucción de *Leishmania in vitro* (Passwell *et al.*, 1986; Sadick *et al.*, 1986). Por lo tanto, en el presente trabajo decidimos examinar el aspecto inmunomodulador del IFN  $\gamma$ -IFN  $\alpha$  en la respuesta linfoproliferativa frente a mitógenos y antígenos de *Leishmania*, en los pacientes con LCL y LCM, así como una evaluación preliminar de la producción de interferón en sobrenadantes de células estimulados con PHA y antígenos de *Leishmania*, en este mismo tipo de pacientes y un grupo de controles.

## MATERIALES Y METODOS

### Pacientes

En el Instituto de Biomedicina fueron evaluados 44 pacientes (24 hombres y 20 mujeres), con diagnóstico de LCA.

A partir de criterios clínicos, histopatológicos y parasitológicos (Convit y Pinardi, 1984) fueron clasificados como pacientes de LCL, con una o más lesiones, 38 pacientes, y de LCM, 6 pacientes. Ninguno había recibido tratamiento durante el período inmediatamente anterior a la evaluación. El período medio de evolución de la infección en el grupo con LCL fue de 12,0 + 7,8 semanas, y el del grupo con LCM de 20,8 + 18,6 meses. La edad promedio de los pacientes fue de 32,9 + 18,3 años para el grupo con LCL, y de 30,7 + 16,0 para el grupo con LCM.

## Controles normales

Fueron estudiados 20 individuos (16 hombres y 4 mujeres; edad promedio: 30,7 + 8,3 años), provenientes del Banco Municipal de Sangre del Hospital "Vargas", Caracas, o personal del Instituto de Biomedicina.

## Preparación de antígenos

Los parásitos de la cepa *L. mexicana pifanoi* 7940 (L.m) fueron mantenidos en medio mínimo esencial que contenía 2,5% de suero fetal de ternera (Gibco, Grand Island, NY, USA). Los promastigotes fueron recolectados por centrifugación (1 800 g, 20 min) a 4°C, lavados dos veces con PBS, resuspendidos a concentración de  $25 \cdot 10^6$  parásitos/mililitro, y autoclavados 125°C, 15 min).

## Transformación linfoblástica

Las células mononucleares fueron separadas de la sangre heparinizada por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, lavadas tres veces y cultivadas por triplicado en placas de microcultivo a una concentración de  $2 \cdot 10^5$  células/porzo.

Se utilizó el medio RPMI-1640 (Grand Island Biological Company, NY, USA) cuyo contenido era de 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, suplementado con suero humano AB inactivado al 5%. Luego de tres días de exposición al mitógeno, o seis días al antígeno, se agregó a cada pozo 1 µCi de timidina ( $H^3$ ), seis horas antes de la recolección de las células en filtro de fibra de vidrio y contados en un instrumento de centelleo líquido.

## Mitógeno, antígeno e interferón

La fitohemaglutinina (PHA, grado B, Calbiochem, San Diego, Ca.), fue utilizada a concentración de 2,5 µg/ml. El antígeno de *L. mexicana* fue probado a una concentración de  $12,5 \cdot 10^6$  parásitos/porzo.

El IFN  $\alpha$  fue gentilmente cedido por el doctor M.Limonta, del Instituto de Investigaciones Biológicas, La Habana, Cuba, y fue utilizado a las concentraciones fisiológicas de 500 y 5 000 U/ml.

Los resultados fueron expresados como índices de estimulación (IE), definidos como la media de las cpm en presencia de antígeno o mitógeno/media de las cpm de los cultivos controles.

## Determinación de interferón $\gamma$

La determinación de interferón  $\gamma$  se realizó mediante el ensayo convencional de inhibición del efecto citopático, usando una línea celular humana (WISH) como células indicadoras, y el virus de la estomatitis vesicular como virus infectante (Stewart, 1981). La actividad antiviral fue estimada usando un estándar de interferón preparado en el laboratorio, el cual fue calibrado contra un estándar de referencia internacional del Instituto Nacional de Salud, Bethesda, USA (HuIFN- $\gamma$  4 000 unidades referencia/ampolla).

La actividad antiviral, expresada en unidades de IFN, se calculó como el recíproco de la mayor dilución de la muestra que reduce el número de placas virales en el 50%. Paralelamente se evaluaron algunas muestras utilizando un radioinmunoensayo que emplea dos anticuerpos monoclonales específicos para IFN humano (Le *et al.*, 1984) desarrollado por Centocor Malvern, PH (IMR-IFN-RIA). Los resultados obtenidos por ambos métodos presentaron una correlación altamente significativa ( $r = 0,94$ ;  $p < 0,001$ ), por lo tanto podemos asegurar que se estaba midiendo interferón  $\gamma$  en dichos sobrenadantes (resultados no presentados).

## Análisis estadístico

Se utilizó la prueba "t" de Student, convencional o apareada, para comparar los grupos, mediante un programa computarizado.

# RESULTADOS

## Efecto del interferón $\alpha$ en la respuesta linfoproliferativa frente a mitógeno y antígeno de *Leishmania*

En la tabla 1 se muestran los resultados de la media de los IE en respuesta a la PHA (2,5 µg/ml) en presencia y ausencia de IFN  $\alpha$  (500 y 5 000 U/ml) para los grupos de pacientes con LCL, LCM y los controles. Los resultados demuestran que tanto el grupo de pacientes como el grupo de los controles, disminuyen significativamente sus respuestas en presencia de ambas concentraciones de interferón  $\alpha$ , no así el grupo de pacientes con LCM. Es interesante

señalar que la respuesta a la PHA de los pacientes con LCM es significativamente menor ( $p < 0,01$ ) que la de los pacientes con LCL y los controles, como había sido demostrado en trabajos anteriores (Castés *et al.*, 1983).

**Tabla 1**  
EFECTO DEL INTERFERON  $\alpha$  EN LA RESPUESTA A LA PHA

<i>Individuos</i>	<i>Sin IFN <math>\alpha</math></i>	<i>p &lt;</i>	<i>+IFN <math>\alpha</math></i> <i>(500 U/ml)</i>	<i>p &lt;</i>	<i>+IFN <math>\alpha</math></i> <i>(5 000 U/ml)</i>
Controles (19)	47,8 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>	0,012	30,7 $\pm$ 6,6	0,004	33,0 $\pm$ 5,4
LCL (36)	40,1 $\pm$ 4,5	0,001	24,5 $\pm$ 3,6	0,002	26,1 $\pm$ 3,7
LCM (16)	22,4 $\pm$ 3,4	NS	25,6 $\pm$ 4,1	NS	20,1 $\pm$ 2,2

<sup>a</sup> Media del índice de estimulación  $\pm$  desviación estándar.

Los resultados de la tabla 2 demuestran que la respuesta al antígeno de *Leishmania* disminuye significativamente sólo en los pacientes con LCL en presencia de ambas concentraciones de IFN  $\alpha$ , no así en los controles y en los pacientes con LCM. La respuesta de los pacientes frente al antígeno de *Leishmania* y en ausencia de IFN  $\alpha$  es significativamente mayor en los pacientes con LCM ( $p < 0,005$ ), seguida de los pacientes con LCL ( $p < 0,01$ ), y negativa en los controles, tal como habíamos demostrado previamente (Castés *et al.*, 1983).

**Tabla 2**  
EFECTO DEL INTERFERON  $\alpha$  EN LA RESPUESTA AL ANTIGENO DE LEISHMANIA (L.m)

<i>Individuos</i>	<i>Sin IFN <math>\alpha</math></i>	<i>p &lt;</i>	<i>+IFN <math>\alpha</math></i> <i>(500 U/ml)</i>	<i>p &lt;</i>	<i>+IFN <math>\alpha</math></i> <i>(5 000 U/ml)</i>
Controles (18)	4,6 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	NS	2,2 $\pm$ 0,8	NS	3,7 $\pm$ 1,8
LCL (38)	13,0 $\pm$ 2,8	0,009	6,8 $\pm$ 1,9	0,020	7,0 $\pm$ 2,7
LCM (6)	21,3 $\pm$ 4,5	NS	11,1 $\pm$ 5,0	NS	17,1 $\pm$ 9,8

<sup>a</sup> Media del índice de estimulación  $\pm$  desviación estándar.

### Producción de IFN $\gamma$

Se evaluó la producción de IFN  $\gamma$  en sobrenadantes de células estimuladas con PHA y antígenos de *Leishmania* recolectados 120 horas después de la estimulación. Los resultados se muestran en la tabla 3.

En los sobrenadantes de células estimuladas con PHA se encontró que los controles y pacientes con LCL y LCM, producían significativamente más IFN  $\gamma$  que los cultivos no estimulados. Además, se encontraron niveles significativamente mayores de IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes de los pacientes con LCM cuando se compararon con los de los pacientes con LCL y los controles.

Tabla 3  
 PRODUCCION DE INTERFERON  $\gamma$  EN SOBRENADANTES ESTIMULADOS CON PHA  
 Y ANTIGENOS DE LEISHMANIA

Individuos	Sobrenadantes no estimulados	Interferón $\gamma$ (U/ml) en sobrenadantes estimulados con	
		PHA	Ag. L.m
Controles (4)	3,7 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	480,0 $\pm$ 113 <sup>b</sup>	10,0 $\pm$ 4,0
LCL (10)	2,8 $\pm$ 1,5	142,0 $\pm$ 29 <sup>b</sup>	45,7 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
LCM (5)	2,5 $\pm$ 2,2	2 000,0 $\pm$ 500 <sup>b</sup>	176,0 $\pm$ 62,6 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Media del índice de estimulación  $\pm$  desviación estándar

<sup>b</sup>  $p < 0,001-0,05$  para diferencias entre sobrenadantes estimulados con PHA y antígenos de *Leishmania*, comparado con los sobrenadantes no estimulados

Cuando las células fueron estimuladas con el antígeno de *Leishmania*, se encontró 10 veces menos IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes de los pacientes y controles con respecto a los sobrenadantes estimulados con PHA, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01-0,05$ ). Sin embargo, los niveles de IFN  $\gamma$  en los sobrenadantes de los pacientes con LCL y LCM, fueron significativamente mayores que los de los sobrenadantes no estimulados, lo que no se comportó de la misma forma en el caso de los controles. De igual forma, los niveles de IFN  $\gamma$  fueron mayores en los pacientes con LCM, que en pacientes con LCL, aunque esa diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa.

## DISCUSION

En modelos experimentales y en un número limitado de estudios clínicos, ha sido demostrado que la respuesta a la infección leishmánica puede ser modulada por diversos factores, entre los que pueden incluirse: supresión de linfocitos con receptores para el antígeno (Liew *et al.*, 1982); factores séricos (Pearson y Steigbigel, 1980); carga parasitaria (Preston y Dumonde, 1976); constitución genética (Howard *et al.*, 1981), y más recientemente, la síntesis de prostaglandinas (Castés *et al.*, 1986).

Por otra parte, ha sido demostrado que los interferones, y particularmente el IFN  $\alpha$ , inhiben la activación mitogénica de los linfocitos y la proliferación en un cultivo mixto de linfocitos (Heron y Berg, 1979; Heron *et al.*, 1976). También se ha reportado que el comportamiento del IFN  $\gamma$ , el cual es producido por linfocitos T estimulados por antígenos específicos o por mitógenos de células T, se aproxima más al de una linfoquina y se le ha atribuido una importante acción leishmanicida, tanto en modelos experimentales (Sadick *et al.*, 1986) como en humanos (Murray *et al.*, 1984).

Por esta razón, en nuestro trabajo se evaluaron, tanto los posibles efectos inmunomoduladores del IFN  $\alpha$  sobre la respuesta linfoproliferativa de pacientes con LCL y LCM frente a mitógenos y antígenos de *Leishmania*, como la producción de IFN  $\gamma$  en sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de estos pacientes, estimulados con PHA y antígenos parasitarios.

Se encontró que la estimulación mitogénica *in vitro*, por PHA de las células mononucleares de los pacientes con LCL y los controles, fue significativamente disminuida por el IFN  $\alpha$ , no así la de los pacientes con LCM. Es importante señalar en este sentido que la respuesta a la PHA de los pacientes con LCM se encontraba significativamente disminuida, en comparación con la de los pacientes con LCL y los controles.

Se conoce que bajo estimulación con PHA, las células CD4 proliferan en mayor proporción que las células CD8 (Reinherz *et al.*, 1982), sin embargo, también se ha reportado que el IFN  $\alpha$  tiene un efecto inhibitorio específico de las células CD4 en presencia de mitógenos (Hokland *et al.*, 1983), lo cual es la causa de una disminución de la respuesta a la PHA. Esto pudiera ser una explicación al efecto observado del IFN  $\alpha$  en la respuesta de los pacientes con LCL y los controles. Sin embargo, los pacientes con LCM parecen no ser sensibles al efecto del IFN  $\alpha$  en respuesta a la PHA.

Nosotros hemos demostrado en trabajos anteriores que los pacientes con LCM presentan respuestas disminuidas a la PHA (Castés *et al.*, 1983), y posteriormente (Castés *et al.*, 1984; Carvalho *et al.*, 1985), demostraron además que estos pacientes tienen un porcentaje de células CD4 disminuidas, en condiciones de no estimulación y también en células estimuladas con PHA. Esto podría explicar parcialmente la falta de sensibilidad de los pacientes con LCM al efecto del IFN  $\alpha$  bajo estimulación mitogénica.

Al considerar las respuestas específicas a los antígenos de *Leishmania* demostramos, como en trabajos anteriores (Castés *et al.*, 1983), que estas están significativamente aumentadas en los pacientes con LCL y LCM, comparadas con los controles.

En presencia de IFN  $\alpha$  las respuestas linfoproliferativas se encontraron significativamente disminuidas en los pacientes con LCL, no así en los controles y en los pacientes con LCM. En este sentido, es relevante señalar que los pacientes con LCM tienen altas respuestas proliferativas específicas *in vitro* y un menor grado de supresión específica comparado con los otros grupos estudiados (Castés *et al.*, 1984). Además, hemos reportado que los pacientes con LCM tienen un alto porcentaje de células con receptores para la IL-2 (Tac +) en respuesta al antígeno *Leishmania* junto con una disminución de las células CD4+ (Castés *et al.*, 1988). Se conoce que el IFN  $\alpha$  no elimina la proliferación de todas las células CD4, sino sólo una fracción de ellas (Hokland *et al.*, 1983). Es posible, por lo tanto, que la fracción de células CD4 sensibles al efecto del IFN  $\alpha$  sean las que se encuentren disminuidas en estos pacientes.

Resultados similares fueron encontrados al estudiar aspectos de regulación de la respuesta inmune, mediada por prostaglandinas (PGs) y sensible a la indometacina. En efecto, un mecanismo supresor dependiente de las PGs operaba en los pacientes con LCL, no así en los pacientes con LCM. Es posible que estos mecanismos de inmunomodulación y otros no estudiados hasta el momento, sean los responsables en los pacientes con LCL de la modulación de la respuesta inmunológica contra el parásito. Por el contrario, en los pacientes con LCM, donde este mecanismo modulador aparentemente no es funcional, la respuesta del parásito es intensa y una posible consecuencia de esto es el daño al tejido.

Como un estudio complementario al anterior, y como ha sido demostrado que los macrófagos humanos y murinos son capaces de eliminar al parásito *Leishmania in vitro* en presencia de sobrenadantes de linfocitos activados, y que el IFN  $\gamma$  está considerado como la linfoquina que media esta activación macrofágica (Passqell *et al.*, 1986), en el presente trabajo se determinó, además, la producción de IFN  $\gamma$  en sobrenadantes de células de pacientes estimulados con PHA y antígenos de *Leishmania*. Esto se realizó mediante un ensayo

biológico convencional y un radioinmunoensayo específico para IFN  $\gamma$ . Como los resultados de ambos presentaron una alta correlación, se usó el ensayo biológico para evaluar la mayoría de los sobrenadantes.

Se demostró que los pacientes con LCM producían altas cantidades de IFN  $\gamma$ , bajo estimulación mitogénica y antigénica, cuando se compararon con los cultivos no estimulados, y que el nivel IFN  $\gamma$  en ambos tipos de sobrenadantes era significativamente mayor que en los pacientes con LCL.

Estos resultados fundamentan nuestra sugerencia previa de que los pacientes con LCM tienen hipersensibilidad frente a la infección leishmánica. Dichos pacientes tienen una exagerada respuesta inmune con respecto al largo período de tiempo a que han estado expuestos al parásito (Carvalho *et al.*, 1985), pero son incapaces de eliminar completamente la infección, y carecen de una adecuada inmunorregulación (Castés *et al.*, 1984). Esto podría originar una exagerada expansión clonal de las células T reactivas, las cuales pueden estimular la producción de IFN  $\gamma$ .

Es posible que el IFN  $\gamma$  desempeñe un papel no sólo en la activación macrófaga para eliminar el parásito, sino que también puede participar en la patogénesis de la enfermedad.

Los pacientes con LCL que controlan su infección sin recibir extenso daño en el tejido y que presentan moderadas respuestas *in vivo* e *in vitro* frente al antígeno de *Leishmania*, muestran una significativa pero moderada producción de IFN  $\gamma$  en respuesta a estímulos mitogénicos y antigénicos. Esto podría permitir una respuesta inmunológica protectora y efectiva en contra del parásito, donde la participación del IFN  $\gamma$  probablemente es fundamental.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los pacientes con LCM no parecen ser sensibles al efecto modulador del IFN  $\alpha$ , en respuesta a mitógenos y antígenos de *Leishmania*, como sí parecen serlo los pacientes con LCL. Además, estos pacientes con LCM presentaron una elevada producción de IFN  $\gamma$  en comparación con los pacientes con LCL, que posiblemente esté desempeñando un papel en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, se requieren posteriores estudios para confirmar este aspecto.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado con el proyecto M.09.16/86 del CDCH/UCV.

Algunos aspectos de este estudio fueron realizados en la Unidad de Inmunología Clínica del "Princess Margaret Hospital for Children", Perth, Australia, y durante ese período M. Castés recibió una beca de las Naciones Unidas.

Se agradece, además, la colaboración de la licenciada Zoila Moros en el análisis estadístico de los resultados y de la doctora Alejandra Corao en el trabajo secretarial.

## REFERENCIAS

- BRODEUR, B. R. y T. C. MERIGAN (1974). *Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice.* J. Immunol., **113**: 1319-1325.
- CARVALHO, E. M.; W. D. JOHNSON; E. BARRETO; P. M. MARSDEN; J. L. M. COSTA; S. REED y H. ROCHA (1985). *Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis.* J. Immunol., **135**: 4144-4148.
- CASTES, M.; A. AGNELLI; O. VERDE y A. J. RONDON (1983). *Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis.* Clin. Immunol. Immunopathol., **27**: 176-186.
- CASTES, M.; A. AGNELLI y A. J. RONDON (1984). *Mechanisms associated with immunoregulation in human American Cutaneous leishmaniasis.* Clin. Exp. Immunol., **57**: 279-286.

- CASTES, M.; D. TRUJILLO; O. SCOTT y A. J. RONDON (1987). *Demonstration of an indomethacin sensitive mechanism regulating immune reactivity in American cutaneous leishmaniasis patients*. Clin. Exp. Immunol., **69**: 280-290.
- CASTES, M.; M. CABRERA; D. TRUJILLO y T. CONVIT (1988). *T cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor and production of IL-2 and interferon  $\gamma$  in human American cutaneous leishmaniasis* (enviado a publicación a J. Clin. Microbiol.).
- CONVIT, J. y M. E. PINARDI (1974). *Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunopathological spectrum in South America*. Ciba Foundation Symposium, **20**: 160-163.
- GISLER, R. H.; P. LINDHAL e I. GRESSER (1974). *Effects of interferon on antibody synthesis in vitro*. J. Immunol., **113**: 438-444.
- GRESSER, I. y C. F. BOURALI (1970). *Antitumor effect of interferon preparations in mice*. J. Nat. Cancer. Inst., **45**: 365-368.
- HERON, I.; K. BERG y K. CANTELL (1976). *Regulatory effects of interferon on T cells in vitro*. J. Immunol., **111**: 1370-1375.
- HERON, I.; M. HOKLAND; A. MOLLER-LARSEN y K. BERG (1979). *The effect of interferon on lymphocyte-mediated effector cell functions; selective enhancement of natural killer cells*. Cell. Immunol., **42**: 183-187.
- HERON, I. y K. BERG (1979). *Human leucocyte interferon: analysis of effect on MLC and effector's cell generation*. Scand. J. Immunol., **9**: 517-526.
- HOKLAND, M.; P. HOKLAND; I. HERON y S. F. SCHLOSSMAN (1983). *Selective effects of  $\alpha$  interferon on human T lymphocyte subsets during mixed lymphocyte cultures*. Scand. J. Immunol., pp. 559-567.
- HOWARD, J. G.; C. HALE y F. Y. LIEW (1981). *Genetically determined susceptibility to Leishmania tropica infection is expressed by haematopoietic donor cells in mouse radiation chimeras*. Nature **228**: 161-162.
- LE, J.; B. S. BARROWDOUGH y J. VILCEK (1984). *Monoclonal antibodies to human immune interferon and their application for affinity chromatography*. J. Immunol. Methods., **69**: 61-70.
- LIEW, F. Y.; C. HALE y J. G. HOWARD (1982). *Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis V. Characterization of effector and specific suppressor T cells*. J. Immunol., **128**: 1918-1922.
- MURRAY, H.; B. RUBIN; S. CARREIRO y A. ACOSTA (1984). *Reversible defect in antigen-induced lymphokine and interferon generation in cutaneous leishmaniasis*. J. Immunol., **13**: 2250-2254.
- PASSWELL, J. H.; R. SHOR y J. SHOHAM (1986). *The enhancing effect of interferon  $\alpha$  and  $\gamma$  on the killing of Leishmania tropica major in human mononuclear phagocytes in vitro*. J. Immunol., **136**: 3062-3066.
- PEARSON, R. D. y R. T. STEIGBIGEL (1980). *Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani*. J. Immunol., **125**: 2195-2198.
- PRESTON, P. y D. C. DUMONDE (1976). "Immunology of clinical and experimental leishmaniasis". En: *Immunology of Parasitic Infections*. (Eds. S. Cohen and E. H. Sadun), p. 167. Blackwell Scientific, Oxford.
- REINHERZ, E. L.; C. MORIMOTO; K. A. FITZGERALD; R. E. HUSSEY; J. F. DALEY y S. F. SCHLOSSMAN (1982). *Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody, that delineates two functional subpopulations*. J. Immunol., **128**: 463-467.
- SADICK, M. D.; R. M. LOCKSLEY; C. TUBBS y H. V. RAFF (1986). *Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon  $\gamma$  in response to Leishmania antigens in vitro*. J. Immunol., **136**: 655-661.
- STEWART, W. E. (1981). *The interferon system*. Second Edition, Springer Verlag, New York, pp. 13-14.
- VILCEK, J.; I. GRESSER y T. C. MERIGAN (1980). *Regulatory functions of interferons*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **350**: 1.
- YEFENOF, E. e I. McCONNELL (1982). *Interferon amplifies complement activation by Burkitt lymphoma cells*. Nature, **313**: 21, 684-685.