

El estrés agudo promueve la cura de ratones resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*.

Nilka L. Díaz, Celsy M. Hernández, Richard Ramírez, Felix J. Tapia.

RESUMEN

El estrés es la suma de reacciones biológicas frente a estímulos adversos, tanto físicos, emocionales, internos o externos, que rompen la homeostasis del organismo. El organismo reacciona frente al estrés mediante la interacción entre los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico, los cuales poseen un mismo lenguaje químico, que les permite interactuar. La piel es un componente importante del eje neuro-endocrino-inmunológico. En el presente trabajo estudiamos el efecto del estrés por inmovilización (2 y 8 hr) sobre las células de Langerhans, Sustancia P (SP), polipéptido relacionado con el gen de la Calcitonina (CGRP) y el curso natural de la infección con *L. (L.) mexicana* en ratones resistentes C57BL/6. Los resultados mostraron una temprana aparición y rápida disminución de la lesión en el grupo de ratones sometidos a 8 hr de estrés, contrastando con lo observado previamente en ratones susceptibles BALB/c a la infección por *L. (L.) mexicana*, los cuales mostraron lesiones exacerbadas después del estrés por inmovilización. Los ratones C57BL/6 estresados presentaron un aumento en la densidad de células de Langerhans y la expresión de CGRP, que fue mayor en el grupo estresado durante 8hr. En estos animales, el estrés agudo y homotípico induce una respuesta adaptativa capaz de controlar mejor la infección. La comparación con un estudio anterior del grupo en ratones susceptibles, permite sugerir que el estrés por inmovilización es capaz de modificar la respuesta inmunológica predeterminada genéticamente frente al parásito *Leishmania*.

Palabras clave: Células de Langerhans, CGRP, estrés, inmunosupresión, leishmaniasis.

ABSTRACT

Acute stress promotes lesion healing in *Leishmania mexicana*-infected resistant C57BL/6 mice.

Stress is the sum of biological reactions against adverse stimuli such as physical, emotional, internal or external factors that break the homeostasis of the organism. The organism reacts to stress by means of interactions among the nervous, endocrine and immunological systems, which have a same chemical language. The skin is an important component of the neuro-endocrine-immunological axis. In the present work, we studied the effect of stress by immobilization (2 and 8 hr) on Langerhans cells, Substance P (SP), Calcitonin gene-related polypeptide (CGRP) and the natural course of infection in resistant C57BL/6 mice infected with *L. (L.) mexicana*. The

results showed an early appearance and fast decrease of the lesion size in the group of mice subjected to 8hr stress, contrasting with that observed previously in susceptible BALB/c mice infected with *L. (L.) mexicana*, which exacerbated their lesions after stress by immobilization. Stressed C57BL/6 mice showed an increase in Langerhans cell density and CGRP expression, which was marked in the 8hr stressed group. In these animals, acute and homotypic stress induces an adaptive response capable of better controlling the infection. The comparison with a previous study of the group in susceptible mice, allows to suggest that stress by immobilization may modulate the genetically predetermined immune response to *Leishmania* parasite.

Key words: Langerhans cells, CGRP, stress, inmunosupresión, leishmaniasis.

INTRODUCCIÓN

La respuesta de un organismo al estrés depende de una variedad de factores que incluyen especie, cepa, y sexo del animal. Por ejemplo, factores olfativos como feromonas producidas por animales estresados inducen citocinas Th2 en ratones BALB/c pero no así en ratones C57BL/6 (1-3). Igualmente, Dobbs et al. 1996 evaluaron la respuesta inmunológica en condiciones de confinamiento en tres cepas de ratones machos, C57BL/6, DBA/2 y C3H/HeN, infectados con el virus de influenza. Los resultados demostraron una disminución en los índices de supervivencia de los ratones DBA/2 (4), a pesar de presentar las tres especies, un aumento en la concentración de corticoesterona y disminución en la producción de la IL-2 virus-específica en el día 10 postinfección.

Otros estudios utilizando ratones genéticamente resistentes BALB/c.*Bcg^f* y susceptibles BALB/c.*Bcg^s* a infecciones por *Mycobacterium sp.*, respondieron en forma diferente al ser sometidos a estrés por confinamiento, presentando los animales susceptibles un aumento significativo de micobacterias en el riñón y los pulmones (5). Estos investigadores también demostraron que los macrófagos esplénicos provenientes de ratones susceptibles no expresaban moléculas MHC-II y fueron menos efectivos en internalizar *M. avium* (5,6).

Recientemente, nuestro grupo demostró que el estrés agudo por inmovilización induce un estado de inmunosupresión que favorece la invasión de *Leishmania mexicana* en ratones susceptibles BALB/c (7). Los animales estresados se hicieron más susceptibles a la infección parasitaria, lo cual se manifestó por una aceleración y exacerbación de las lesiones, alteraciones morfológicas y disminución de las células de Langerhans epidérmicas y aumento de la inmunoreactividad antídromica de CGRP (calcitonin gene-related peptide) y SP (Sustancia P). En el presente estudio presentamos los resultados del efecto del estrés agudo por inmovilización en ratones C57BL/6 resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*.

Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Felix J. Tapia.

E-mail: felix.tapia@gmail.com

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental.

Ratones hembras C57BL/6 (4-6 semanas de edad) fueron criados en el bioterio del Instituto de Biomedicina, a partir de pies de crías obtenidos originalmente de Taconic (Germantown, NY, EEUU). Los grupos experimentales fueron divididos siguiente manera: 1) Ratones sometidos a 2 hr de estrés por inmovilización previo a la infección por *Leishmania (L.) mexicana* (n=20) (ratones 2hr estrés + infección); 2) Ratones sometidos a 8 hr de estrés por inmovilización previo a la infección con *L. (L.) mexicana* (n=20) (ratones 8hr estrés + infección); 3) Ratones sanos sometidos a 2 hr de estrés por inmovilización (n=20) (control estrés); 4) Ratones no estresados pero infectados con *L.(L.) mexicana* (n=20) (control infección).

Procedimiento de estrés.

Los ratones fueron expuestos a un estresor homotípico antes de la inoculación de parásitos *Leishmania*. El estresor consistió en inmovilización por 2 u 8 horas en tubos para centrifugación plásticos de 50 ml (11x2,5x2,5 cm). Los animales control fueron mantenidos en jaulas convencionales. Durante las condiciones de estrés, los ratones no tuvieron acceso a comida o agua.

Infección por *Leishmania*.

Los ratones de los grupos 1, 2 y 4 fueron inoculados en la pata trasera izquierda por vía subcutánea con 10^3 amastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 en un volumen de 20 μ l y los ratones del grupo 3 fueron inoculados con el mismo volumen del vehículo (PBS). Brevemente, los amastigotes fueron extraídos de nódulos de la pata trasera de hámsters infectados un mes antes con 10^6 amastigotes. Los nódulos fueron disecados asepticamente y lavados con buffer fosfato-salino (PBS, pH 7,4) adicionado con antibióticos, y cortados finamente y macerados en placa de Petri con PBS frío. La suspensión fue filtrada a través de una malla estéril para remover debris y los parásitos contados en un hemocitómetro y ajustados a 4×10^4 por ml con PBS estéril.

El día de la infección y cada 4 semanas hasta la semana 12, se sacrificaron de 4 ratones de cada grupo por dislocación cervical y se disecó la almohadilla plantar. Estas muestras fueron incluidas en Cryomatrix™ (Shandon, Pittsburg, EEUU), congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido. Luego se realizaron cortes histológicos (4 μ m) en un criostato (ThermoShandon, Pittsburg, EEUU) a -30°C que fueron utilizados para la identificación de células de Langerhans y la caracterización de neuropéptidos mediante inmunohistología.

Evaluación de la lesión clínica.

La lesión cutánea fue evaluada midiendo el grosor de la almohadilla plantar con un micro-calibrador cada semana por 12 semanas. La presencia de parásitos fue confirmada por inmunotinción de los cortes de tejido infectado con anticuerpo policlonal anti-*Leishmania* producido en nuestro laboratorio.

Anticuerpos monoclonales.

Un anticuerpo monoclonal de rata fue utilizado para identificar células de Langerhans epidérmicas (CD205, NLDC-145 en dilución 1:300, donado por Georg Kraal, Universidad Libre de Ámsterdam, Países Bajos); Anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos a CGRP (PEPA27 en dilución 1:1000) y Sustancia P (PEPA40 en dilución 1:1000) fueron comprados a Serotec Inc, Oxford, Reino Unido.

Inmunohistología

Las células de Langerhans y los neuropéptidos CGRP y SP fueron caracterizados en cortes histológicos utilizando el sistema avidina-biotina-peroxidasa, el cual consiste en la incubación con el anticuerpo primario (CD205, CGRP y SP) por 90 minutos a temperatura ambiente; seguido del anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal biotinado anti IgG de rata producido en conejo, dilución 1/30) durante 30 minutos; luego la incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa durante 15 minutos. Finalmente la reacción enzimática y colorimétrica se efectuó utilizando NovaRed (Vector Laboratories, EEUU) siguiendo instrucciones del fabricante. Entre cada uno de estos pasos se realizó un lavado con PBS durante 5 minutos. Luego los cortes fueron lavados y contrastados con hematoxilina de Harris por 1 minuto, para posteriormente volver a lavar, deshidratar y montar con DPX. El control de la técnica consistió en la omisión del anticuerpo primario.

Cuantificación celular.

El conteo de células de Langerhans, se realizó bajo un microscopio óptico (Leica, Wetzlar, Alemania), equipado con un monitor de video (Panasonic ct1384y). Aquellas células con núcleo visible que presentaron una tinción roja fueron contadas como positivas. Se contaron 10 campos por cada corte histológico, utilizando un aumento de 400X.

La inervación peptidérgica se analizó cualitativamente, de acuerdo a la densidad como escasa, moderada y abundante.

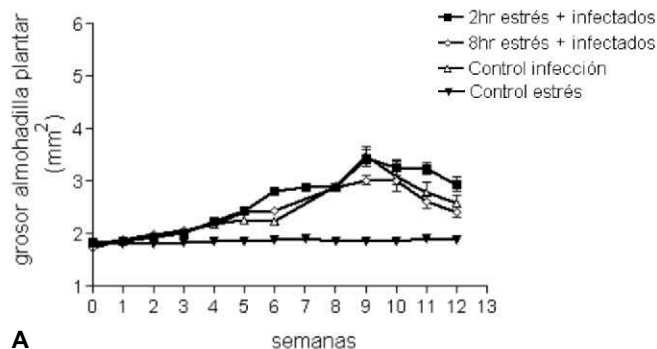
Análisis estadístico.

Los resultados de la caracterización inmunohistológica fueron expresados como la media \pm SEM (error estándar de la media). Las medias fueron calculadas en base a los valores individuales de cada ratón. La comparación entre los grupos se realizó aplicando el ensayo de Mann-Whitney y el análisis de varianza no paramétrico Kruskal-Wallis por medio del programa computarizado GraphPad 3.02 (GraphPad Software, San Diego California EEUU, www.graphpad.com). Valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Evaluación de la lesión cutánea

El tamaño de la lesión en los ratones control infección mostró un incremento progresivo y estadísticamente significativo (p 0,05) con respecto al grupo control sano, desde la primera hasta la novena semana posterior a la infección. A partir de la novena semana disminuyó el tamaño de la lesión en todos los



A Figura 1. (a) Progresión de la infección por *Leishmania (L.) mexicana* en los grupos experimentales de ratones C57BL/6. Los resultados se presentan como media \pm error estándar.

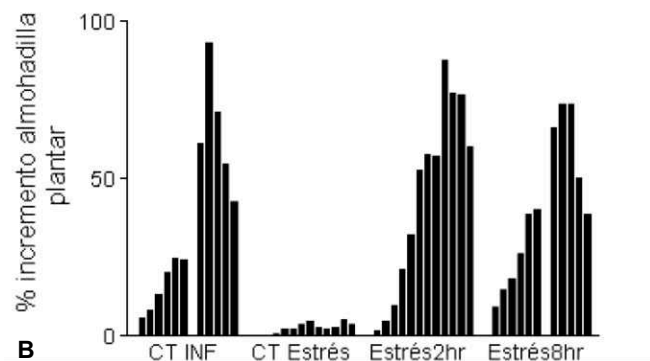


Figura 1. (b) Porcentaje de incremento partiendo del tamaño inicial de la almohadilla plantar durante las 12 semanas de evaluación en los grupos control infección (CT INF), control estrés (CT Estrés), estresados por 2hr e infectados (Estrés2hr) y estresados por 8hr e infectados (Estrés8hr).

grupos de ratones infectados (Fig 1 a y b). Durante las dos primeras semanas posteriores a la infección, el tamaño de la lesión en ratones 8hr estrés + infección fue mayor ($p < 0,05$) al de ratones control infección y control estrés. Entre la cuarta y séptima semana post infección los grupos de ratones 8hr y 2hr estrés + infección exhibieron un incremento en el tamaño de la lesión mayor al de ratones control infección. En la novena semana, el tamaño de la lesión en todos los grupos infectados alcanzó su valor máximo, siendo menor ($p < 0,05$) en ratones 8hr estrés + infección con respecto a ratones control infección y ratones 2hr estrés + infección.

En todos los grupos de ratones infectados, el tamaño de la lesión disminuye progresivamente a partir de la novena hasta la décimo segunda semana posterior a la infección. Esta disminución, aunque sin diferencias significativas fue más acelerada en ratones 8hr estrés + infección en comparación con ratones control infección, control sano y ratones 2hr estrés + infección.

El efecto del estrés sobre el tamaño de la lesión puede ser claramente apreciado cuando se compara el porcentaje de incremento con respecto al grosor inicial de la almohadilla plantar (Fig. 1b). El análisis estadístico usando ANOVA de estos porcentajes de incremento no arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales infectados. Sin embargo, se observaron correlaciones entre el grupo control infección y los ratones estresados por 8hr ($r = 0,9391$, $P = 0.0001$) y 2hr ($r = 0,9329$, $P = 0.0001$).

Densidad de las células de Langerhans

Inmediatamente después de someter a estrés e infectar los ratones con *L. (L.) mexicana*, todos los grupos experimentales estresados, incluyendo el control sano, mostraron una mayor densidad de células de Langerhans CD205+ con respecto al grupo control infección. Este aumento en la densidad de células dendríticas epidérmicas es significativo ($p < 0,05$) en los ratones con 8hr estrés + infección con respecto al resto de los grupos (Figs. 2 y 3a). En la cuarta semana post infección, todos los grupos de ratones infectados presentaron una mayor densidad ($p < 0,05$) de células de Langerhans CD205+ con respecto al control estrés. Siendo los ratones estresados los que mostraron un mayor aumento de estas células (Fig. 2 y Fig. 3b).

En la octava semana post infección, todos los grupos infectados presentaron una disminución de la densidad de las células de Langerhans CD205+ al compararse con los valores obtenidos en la cuarta semana respectivamente.

A partir de esta semana, las densidades de las células de Langerhans CD205+ en todos los grupos de ratones infectados no mostraron diferencias significativas entre ellas.

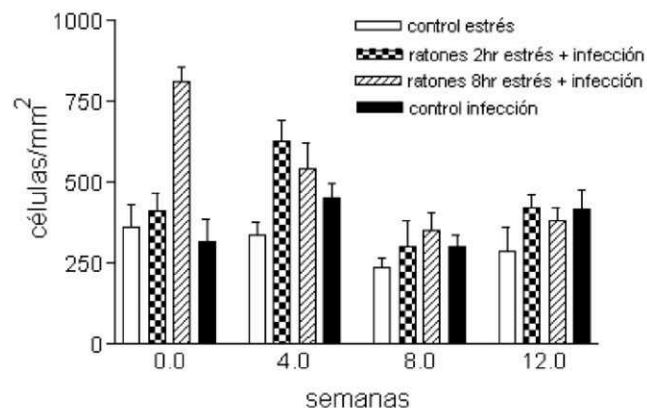
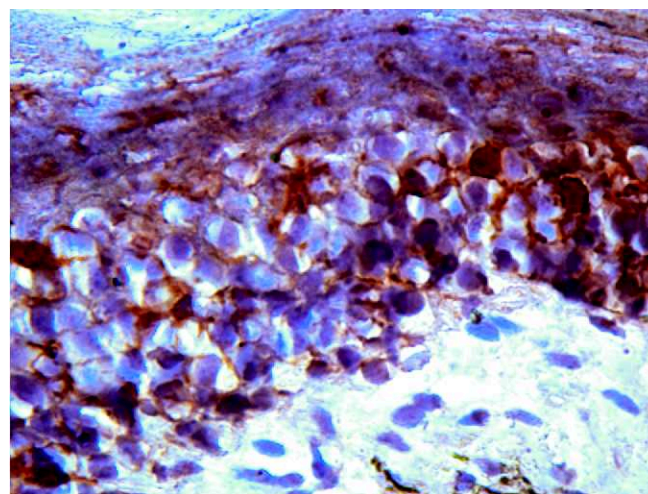
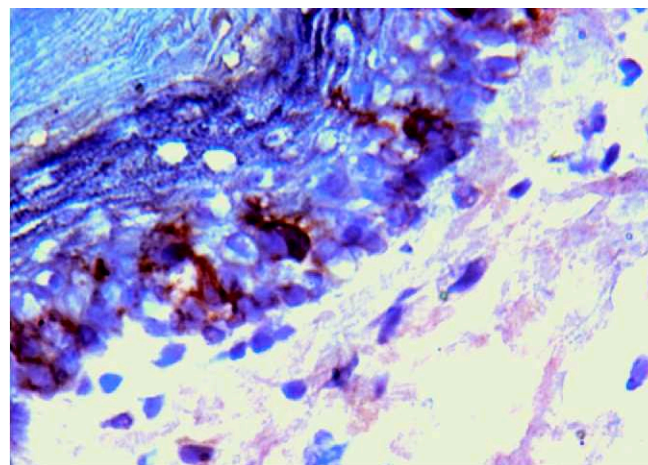


Figura 2. Densidad de células de Langerhans en los grupos experimentales de ratones C57BL/6 a las semanas 0, 4 y 8 de infección. Los resultados se presentan como media \pm error estándar.



A



B

Figura 3. Células de Langerhans CD205+ en la epidermis de ratones C57BL/6 infectados con *L. (L.) mexicana*. (A) Ratones estresados por 8hr e infectados, semana 0 de infección. (B) Ratones estresados por 2hr sin infección, semana 4 de infección. Avidina-biotina inmunoperoxidasa.

Sin embargo los ratones sometidos a 8hr de estrés presentaron una mayor densidad de células de Langerhans que los ratones control de infección en las semanas 0, 4 y 8 (Fig. 2).

Expresión de neuropéptidos CGRP y SP

Inmediatamente después de estresar e infectar a los ratones con *L.(L.) mexicana*, se observó la expresión de CGRP en todos los grupos experimentales. Esta inmunoreactividad de CGRP fue mayor en los ratones estresados e infectados, principalmente en ratones 8hr estrés + infección con respecto al grupo control positivo infección, observándose neurofibrillas positivas para CGRP en la epidermis, dermis papilar y alrededor de las glándulas sebáceas.

En la cuarta semana post infección, de igual forma se observó expresión de CGRP en todos los grupos experimentales. Los grupos de ratones infectados, presentaron un aumento de la inmunoreactividad para CGRP en la dermis, localizado principalmente alrededor del infiltrado inflamatorio. Los ratones del grupo control estrés no mostraron cambios en la expresión de CGRP con respecto a la semana 0 (Fig, 4).

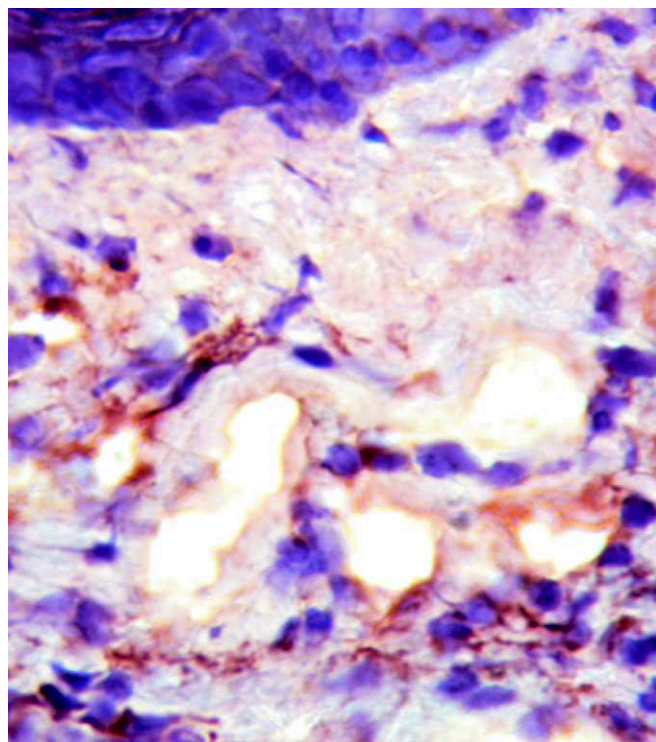


Figura 4. Inmunoreactividad para CGRP en la dermis de ratones C57BL/6 estresados por 2hr sin infección (control estrés). Semana 4. Avidina-biotina inmunoperoxidasa.

En la octava semana, la expresión de CGRP disminuyó en todos los grupos de ratones infectados en comparación con el grupo control estrés. Esta disminución de CGRP es mayor en ratones 8hr estrés + infección con respecto al resto de los grupos infectados.

En la semana 12 post infección, la expresión de CGRP se presentó disminuida con respecto a las semanas anteriores en todos los grupos infectados.

En esta semana, no se observaron diferencias significativas en la expresión de CGRP entre los diferentes grupos experimentales.

La expresión de SP inmediatamente después del estrés y la infección de ratones con *L.(L.) mexicana*, se observó escasa en todos los grupos experimentales. En la cuarta semana post infección, la inmunoreactividad para SP aumentó en todos los grupos infectados con respecto a la semana 0, localizándose principalmente en la dermis alrededor del infiltrado inflamatorio (Fig. 5). En las últimas semanas post infección los grupos experimentales infectados, presentaron poca inmunoreactividad para SP.

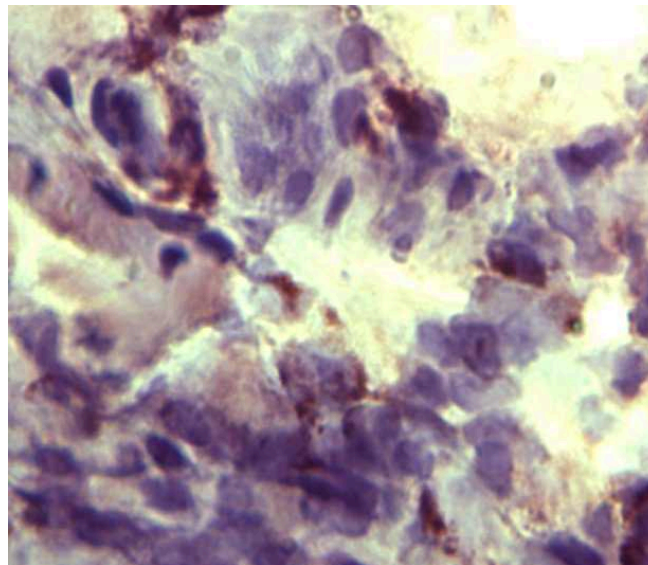


Figura 5. Inmunoreactividad para Sustancia P en la dermis de ratones C57BL/6 estresados por 2hr e infectados con *L.(L.) mexicana*. Semana 4 de infección. Avidina-biotina inmunoperoxidasa.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo estudiamos el efecto del estrés sobre el curso natural de la infección, las células de Langerhans y la inervación sensorial por CGRP y Sustancia P en el modelo murino de resistencia a la infección por *Leishmania (L.) mexicana*.

Los ratones sometidos a 8 hr de estrés por inmovilización se caracterizaron por una aparición temprana y de mayor tamaño de la lesión en la almohadilla plantar pero con una disminución progresiva a partir de la novena hasta la última semana de evaluación. Esta disminución fue más acelerada y con una lesión menor en ratones sometidos a 8hr estrés.

Estudios previos han demostrado que el estrés agudo antes de un desafío antigénico, conduce a una rápida y mayor respuesta de hipersensibilidad tardía (8,9). Algunos de los mediadores liberados por el estrés son capaces de inducir la migración de leucocitos hacia el endotelio vascular de ciertos compartimientos como la piel. La sobre-expresión de moléculas de adhesión por leucocitos y células endoteliales, generan un anidamiento específico a los sitios de injuria, donde pueden adquirir una segunda señal producto del desafío antigénico que permite la rápida iniciación de la respuesta inflamatoria (8-10). Además del reclutamiento leucocitario, los mediadores liberados durante el estrés agudo pueden inducir activación linfocitaria, eficiente presentación antigénica, funciones efectoras de macrófagos y células NK y la secreción de citocinas proinflamatorias por leucocitos y otras células del organismo (8-10). De este modo, el estrés agudo media la migración leucocitaria y la inducción de una respuesta de inmunidad innata, la cual es la primera barrera de

defensa del organismo capaz de responder frente a desafíos antigénicos (8).

En el presente estudio, los resultados mostraron una rápida disminución de la lesión y resolución de la infección en el grupo de ratones sometidos a 8 hr de estrés e infectados. Es posible que el aumento de la inmunidad celular inducida por el estrés agudo en la piel, sea responsable en gran medida de la aparición de una respuesta temprana de hipersensibilidad tardía y la acelerada resolución de la infección en ratones C57BL/6 estresados 8 hr e infectados con *L.(L.) mexicana*. Además, observamos que inmediatamente después de la aplicación del estrés por inmovilización, se produjo un aumento en la densidad de las células de Langerhans en todos los grupos de ratones C57BL/6 estresados, el cual fue mayor en el grupo sometidos a 8 hr de estrés. Estos animales, presentaron una mayor densidad de células de Langerhans en las primeras etapas de la infección.

En un trabajo anterior demostramos una disminución en la densidad de las células de Langerhans y aumento de la lesión clínica en ratones susceptibles BALB/c a la infección por *L.(L.) mexicana* sometidos al mismo estrés por inmovilización (7).

El contrastante efecto del estrés agudo por inmovilización sobre las células de Langerhans y la lesión entre ratones susceptibles y resistentes infectados con *L.(L.) mexicana*, sustenta la función primordial que juegan estas células al inicio de la infección disparando la respuesta inmunitaria (10), como eficientes células presentadoras de antígeno capturados en piel (11-13) y principal reservorio del antígeno parasitario necesario para el mantenimiento de la memoria inmunológica (14-17). Las alteraciones en la densidad de las células de Langerhans inducida por el estrés por inmovilización, podrían estar relacionadas con la liberación de glucocorticoides adrenales en respuesta al estrés, ya que se ha observado aumento del número de células en la médula ósea debido a la administración exógena de corticoesteroides, el cual es reducido considerablemente en animales adrenalectomizados (8,9). Resultados que sugieren que el aumento de las células de Langerhans representa un mecanismo adaptativo del eje neuro-endocrino-inmunológico para fortalecer la inmunovigilancia en órganos blancos como la piel y preparan al individuo para enfrentar potenciales amenazas durante o después del estrés, al igual que la migración y extravasación leucocitaria hacia los sitios de injuria antigénica (8,9,18).

En relación con la expresión de CGRP y SP en los ratones resistentes a la infección por *Leishmania*, nuestros resultados concuerdan con los observados por otros investigadores en reacciones de hipersensibilidad tardía (19), consistiendo en un aumento inicial de CGRP, seguido de una disminución progresiva alrededor del infiltrado inflamatorio. En contraste nuestros resultados anteriores sobre el efecto del estrés por inmovilización en ratones susceptibles a la infección por *L.(L.) mexicana*, demostraron una temprana disminución de CGRP durante el curso de la infección (7). Los resultados aquí presentados coinciden con los observados en ratones infectados con *L.(L.) major*, con un aumento seguido de una disminución de CGRP en ratones resistentes C57BL/6 y una disminución temprana de este neuropéptido en ratones susceptibles BALB/c (20). Esta diferencia en el contenido y en la expresión de CGRP entre ambas cepas de ratones, podría contribuir entre otros factores, a la susceptibilidad o resistencia a la infección, asociando al CGRP con la patogénesis de la leishmaniasis cutánea y la alteración en la nocicepción de las lesiones en esta enfermedad (20-22).

El CGRP es capaz de estimular el reclutamiento, adherencia y migración de los macrófagos al sitio de inoculación cutánea, lo cual representa, un paso inicial crítico del proceso inflamatorio en la leishmaniasis cutánea experimental (23). Esta acción del CGRP podría estar mediada por un efecto directo del neuropéptido sobre la microvasculatura, induciendo una rápida vasodilatación (24-26) y adherencia de leucocitos a las células endoteliales (23,27), con la consecuente formación de un pronunciado edema inflamatorio (27).

Además de las acciones proinflamatorias mediadas por el CGRP, se ha descrito una función reguladora que inhibe la presentación de antígenos a linfocitos T por parte de células de Langerhans y macrófagos (24,25). A través de esta función reguladora, el CGRP impide la generación de concentraciones apropiadas del complejo MHC-péptido antigénico asociadas con respuestas Th2, y favorece la presencia de concentraciones que inducen respuestas Th1, las cuales ayudan a eliminar el parásito en ratones y humanos (28). Así, la liberación de CGRP al sitio de presentación antigénica, pudiera representar un mecanismo homeostático que limite la respuesta inmunitaria en la piel (24). El CGRP impide el desarrollo de una respuesta inmunitaria exacerbada en ratones C57BL/6, los cuales en condiciones normales y patológicas, como es la infección por *L.(L.) mexicana*, muestran una mayor expresión de este neuropéptido con respecto a la exhibida por los ratones susceptibles BALB/c (20-22).

En relación con SP, observamos un aumento de su inmunoreactividad alrededor del infiltrado inflamatorio en la cuarta semana post infección en los grupos de ratones infectados, coincidiendo con lo observado anteriormente por nosotros en ratones susceptibles, lo cual confirma el papel modulador de este neuropéptido en la infección por *L.(L.) mexicana* (7).

Nuestros resultados sugieren que efectivamente el estrés altera el eje neuro-endocrino-inmunológico y por ende el sistema inmunitario cutáneo. En los ratones resistentes a *Leishmania*, el estrés induce una respuesta adaptativa, coordinada por la interacción de este eje y determinada por múltiples factores como el tipo, intensidad y duración del estrés, que activa la respuesta inmunitaria cutánea de tal manera que puede controlar en forma mas apropiada el proceso inflamatorio.

La comparación con nuestro trabajo anterior en ratones susceptibles, permite sugerir que el estrés por inmovilización es capaz de modificar la respuesta inmunológica predeterminada genéticamente frente al parásito *Leishmania*. Además y quizás mas importante, señala que los animales manejan un mismo estrés agudo y homotípico en forma distinta, pudiendo unos empeorar sus lesiones y otros mejorarlas en base al legado genético.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo del personal del bioterio del Instituto de Biomedicina en el trabajo con los animales. Este trabajo fue financiado en parte por el Fondo Pro-Salud de la Cámara Venezolana de Fabricantes de Cerveza (CAVEFACE), Galderma de Venezuela y Fundación Empresas Polar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cocke R, Moynihan JA, Cohen N et al. Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune responses in BALB/c mice. *Brain Behav Immun*. 1993; 7: 36-46.
2. Moynihan JA, Karp JD, Cohen N et al. Alterations in interleukin-4 and antibody production following pheromone exposure: role of glucocorticoids. *J Neuroimmunol* 1994; 54: 51-8.
3. Moynihan JA. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003; 17 Suppl 1: S11-6.
4. Dobbs CM, Feng N, Beck FM et al. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. *J Immunol* 1996; 157: 1870-7.
5. Brown DH, Sheridan J, Pearl D et al. Regulation of mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of *Mycobacterium bovis* BCG-resistant and -susceptible mice. *Infect Immun* 1993; 61: 4793-800.
6. Zwilling BS, Brown D, Christner R et al. Differential effect of restraint stress on MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. *Brain Behav Immun* 1990; 4: 330-8.
7. Ruiz MR, Quinones AG, Diaz NL et al. Acute immobilization stress induces clinical and neuroimmunological alterations in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology* 2003; 149: 731-8.
8. Dhabhar FS. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Ann NY Acad Sci* 1998; 840: 359-72.
9. Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 1059-64.
10. Tapia FJ, Fermin Z, Corado JA. Las células dendríticas de la piel: de Paul Langerhans al concepto de los inmunocitos viajeros. *Piel* 2000; 15: 419-27.
11. Moll H, Flohe S. Dendritic cells induce immunity to cutaneous leishmaniasis in mice. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417: 541-5.
12. Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 1980; 124: 445-53.
13. Stingl G, Katz SI, Clement L et al. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 1978; 121: 2005-13.
14. Caceres-Dittmar G, Sanchez MA, Oriol O et al. Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 95S-8S.
15. Sánchez MA, Caceres-Dittmar G, Oriol O et al. Epidermal Langerhans cells and dendritic epidermal T cells in murine cutaneous leishmaniasis. Immunocytochemical study. *Acta Microscopica* 1993; 2: 180-7.
16. Tapia FJ, Rojas E, Kraal G et al. Immunocytochemical analysis of Langerhans cells in murine cutaneous leishmaniasis. In: *The Langerhans Cell* (Thivolet J, Schmitt D, eds), Vol. 172. London: Colloques INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 1988: 479-89.
17. Moll H, Flohe S, Rollinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *Eur J Immunol* 1995; 25: 693-9.
18. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 1997; 11: 286-306.
19. Kawaguchi Y, Okada T, Konishi H et al. Reduction of the DTH response is related to morphological changes of Langerhans cells in mice exposed to acute immobilization stress. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 397-401.
20. Ahmed AA, Ahmed M, Theodorsson E et al. Decreased concentrations of CGRP in *Leishmania major* murine cutaneous leishmaniasis. *Neurosci Lett* 1998; 246: 149-52.
21. Kubba R, el-Hassan AM, Al-Gindan Y et al. Peripheral nerve involvement in cutaneous leishmaniasis (Old World). *Int J Dermatol* 1987; 26: 527-31.
22. Satti MB, el-Hassan AM, al-Gindan Y et al. Peripheral neural involvement in cutaneous leishmaniasis. A pathologic study of human and experimental animal lesions. *Int J Dermatol* 1989; 28: 243-7.
23. Ahmed AA, Wahbi A, Nordlind K et al. In vitro *Leishmania major* promastigote-induced macrophage migration is modulated by sensory and autonomic neuropeptides. *Scand J Immunol* 1998; 48: 79-85.
24. Asahina A, Hosoi J, Beissert S et al. Inhibition of the induction of delayed-type and contact hypersensitivity by calcitonin gene-related peptide. *J Immunol* 1995; 154: 3056-61.
25. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL et al. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 1993; 363: 159-63.
26. Pincelli C, Fantini F, Giannetti A. Neuropeptides and skin inflammation. *Dermatology* 1993; 187: 153-8.
27. Smith C, Barker, JN, Morris, RW, MacDonald, DM, Lee, TH. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *Journal of Immunology* 1993; 151: 3274-82.
28. Lohoff M, Gessner A, Bogdan C et al. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 191-202.