

Las células dendríticas y su interacción con los parásitos de *Leishmania*

Dendritic cells and its interaction with *Leishmania* parasites

KATHERINE GILCHRIST, SARA MARÍA ROBLEDO • MEDELLÍN

Resumen

Objetivo: recopilar evidencias sobre el papel de las células dendríticas durante el proceso de infección y la respuesta inmune frente a *Leishmania* spp.

Fuente de los datos: se empleó la base de datos Pubmed (1989-2003) cruzando las palabras claves "células dendríticas" y "*Leishmania*" y artículos recopilados por los autores.

Selección del estudio: se analizaron 120 artículos; se seleccionaron 29 que sobre la biología de las células dendríticas y 28 que muestran evidencias del efecto de la interacción de las células dendríticas con los parásitos de *Leishmania* spp.

Extracción de los datos: los artículos se clasificaron de acuerdo con la metodología empleada para obtención de las células dendríticas, la especie de parásito y el efecto de la infección en el fenotipo y función de las células dendríticas.

Síntesis de los datos: las células dendríticas son células especializadas en la toma, procesamiento y presentación de antígenos y por lo tanto participan en la iniciación de la respuesta inmune primaria luego de la infección, dada su capacidad de estimular células T no sensibilizadas. Durante la infección por *Leishmania* se regulan procesos de la célula dendrítica tales como expresión de moléculas de membrana, activación, maduración, migración, producción de citoquinas y presentación antigénica.

Conclusión: las células dendríticas participan en la iniciación y regulación de la respuesta mediada por células T durante la infección por *Leishmania* spp. Sin embargo, el efecto de la infección en la activación y función de la célula dendrítica permanece aún por definirse. (**Acta Med Colomb 2003; 28: 117-126**)

Palabras claves: células dendríticas, *Leishmania*, infección, respuesta inmune primaria, célula presentadora de antígeno.

Abstract

Aim: to compile evidences about the role of dendritic cells during the infection and the immune response to parasites of the genus *Leishmania*.

Data source: pubmed data base was consulted (1989-2003) introducing as a key words "dendritic cells" and "*Leishmania*" and papers compiled by the authors.

Study selection: a group of 120 papers were reviewed, 29 were selected about biology of dendritic cells and 28 that shown evidences of the interaction between this cells and *Leishmania* parasites.

Data extraction: the papers were classified according to the methodology for the isolation and differentiation of dendritic cells, according to the parasite species and study objectives.

Data synthesis: dendritic cells are sentinel cells specializing in the uptake, processing and presentation of antigens. Indeed, these cells are potent stimulators of naïve T cells. Therefore, they participate in the initiation of primary immune response induced after *Leishmania* infection. The interaction between dendritic cell and *Leishmania* parasites induces the regulation of important

Katherine Gilchrist Ramelli: Bióloga, MSc. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia; Sara María Robledo Restrepo: Bacterióloga, MSc, PhD. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

Correspondencia: Sara María Robledo Restrepo. Bacterióloga, MSc, PhD. Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales-PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Dirección: Cra. 50 A No. 63-85, Medellín. Tel. 263 19 30, Fax: 516 26 75, e-mail: sara_robledo@yahoo.com
Recibido: 04/06/03. Aceptado: 10/07/03

dendritic cell processes such as surface membrane molecule expression, activation, maturation, cytokine production and antigen presentation.

Conclusion: dendritic cells play an important role in the initiation and regulation of mediated T cell immune response against Leishmania parasite infections. However, the effect of this infection in dendritic cell activation and function remains to be determined. (*Acta Med Colomb* 2003; 28: 117-126)

Key words: *dendritic cells, Leishmania infection, primary immune response, antigen presenting cell.*

Introducción

Las células dendríticas (DC) representan una población de células de origen hematopoyético, ampliamente distribuidas como células inmaduras en tejidos linfoides y no linfoides (principalmente piel, mucosas y ganglios linfáticos). Por su distribución multifocal en los diferentes tejidos corporales y su gran heterogeneidad y versatilidad tienen la capacidad de responder a múltiples estímulos endógenos o exógenos, migrar a través de los tejidos, internalizar antígenos (Ags) propios y no propios, procesarlos y presentarlos a las células T no sensibilizadas y de memoria, constituyéndose como células presentadoras de Ags (CPA) profesionales. La internalización de Ags extraños por las DC inmaduras induce su activación y maduración hacia DC inmunogénicas que pueden iniciar la respuesta inmune mediada por células T debido a que expresan abundantes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) HLA-I y HLA-II al igual que moléculas coestimuladoras. De esta forma, las DC desempeñan un papel determinante en la protección de los tejidos periféricos de la invasión por microorganismos patógenos y en la inducción de la tolerancia inmunológica. Sin embargo, es importante resaltar que aunque se reconoce la importancia de las DC en la iniciación y modulación de la respuesta inmune a infección y su participación en los procesos de tolerancia inmunológica, muchos aspectos fundamentales de su biología permanecen desconocidos hasta el presente. Al parecer, la capacidad que tienen las DC de inducir diferentes tipos de respuesta inmune mediada por células T depende de su linaje, su estado de maduración y señales de activación.

Hasta el presente se han descrito al menos dos subpoblaciones de DC humanas producidas en médula ósea a partir de una célula madre hematopoyética que da origen a una célula progenitora mielóide CD34+. La célula CD34+ (Figura 1) se diferencia en células CD14+, CD11c+ (monocitos) que producen DC inmaduras en respuesta a GM-CSF e IL-4 y macrófagos en respuesta a M-CSF. La célula progenitora mielóide CD34+ se diferencia también en células CD14-, CD11c+ que produce células de Langerhans en respuesta a factor estimulador de colonias de granulocito macrófago (GM-CSF), interleuquina 4 (IL-4) y factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) o macrófagos en respuesta a M-CSF. Una tercera subpoblación de DC se deriva aparentemente a partir de una célula progenitora también CD34+ pero de origen linfóide, la cual se diferencia en células

CD14-, CD11c-, IL3R α + también conocida como célula T plasmocitoide. Las subpoblaciones de origen mielóide y linfóide difieren no sólo en su fenotipo sino también en su localización anatómica y en su función. Es así como las DC mieloides se encuentran en los tejidos y mucosas como DC inmaduras y se caracterizan por una baja expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 y de abundantes moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) HLA-I y HLA-II en los compartimientos intracelulares (1). En su estadio inmaduro son células principalmente con capacidad fagocítica que responden rápidamente a la acción ejercida por las citoquinas inflamatorias y los productos microbianos, quienes las activan e inducen su maduración. Como DC maduras pierden capacidad endocítica y aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras y del CMH en la superficie de la membrana celular (1). Luego de capturar el Ag migran a órganos linfoides periféricos para iniciar el proceso de presentación antigénica a las células T no sensibilizadas (2). Estas DC de origen mielóide se pueden aislar como células maduras a partir de muestras de sangre periférica, nódulos linfoides, hígado, médula ósea, cordón umbilical y timo (3), o se pueden diferenciar a partir de monocitos de sangre periférica CD14+ y células precursoras mieloides CD34+ en presencia de GM-CSF e IL-4 (4-6) (Figura 1).

Por su parte, las DC linfoides se localizan en los órganos linfoides, en las mismas zonas donde se localizan las células T. Dado que tienen la capacidad de cargar péptidos derivados de Ags propios y de regular a las células T autorreactivas por medio de la producción de IL-10 o de la inducción de apoptosis vía la molécula FasL cumplen un papel importante en los fenómenos de regulación y tolerancia (2, 7, 8). Los progenitores de las DC linfoides se caracterizan por la expresión de bajos niveles de la molécula CD4 y carecer de los marcadores mieloides CD11c, CD11b/CR3, CD13, CD33 y CD45RO. En su estadio maduro expresan la molécula CD8 α (3) y la cadena α del receptor para IL-3 (citoquina necesaria para su diferenciación) y no expresan el receptor para GM-CSF (9). Actualmente es posible diferenciar las dos subpoblaciones de DC según la expresión de la molécula CD8 α , la cual se expresa como homodímero en las DC de linaje linfóide pero está ausente en las DC de linaje mielóide (10).

En la leishmaniasis, una enfermedad parasitaria transmitida por insectos vectores, el resultado clínico de la infección puede variar desde una forma cutánea localizada hasta una

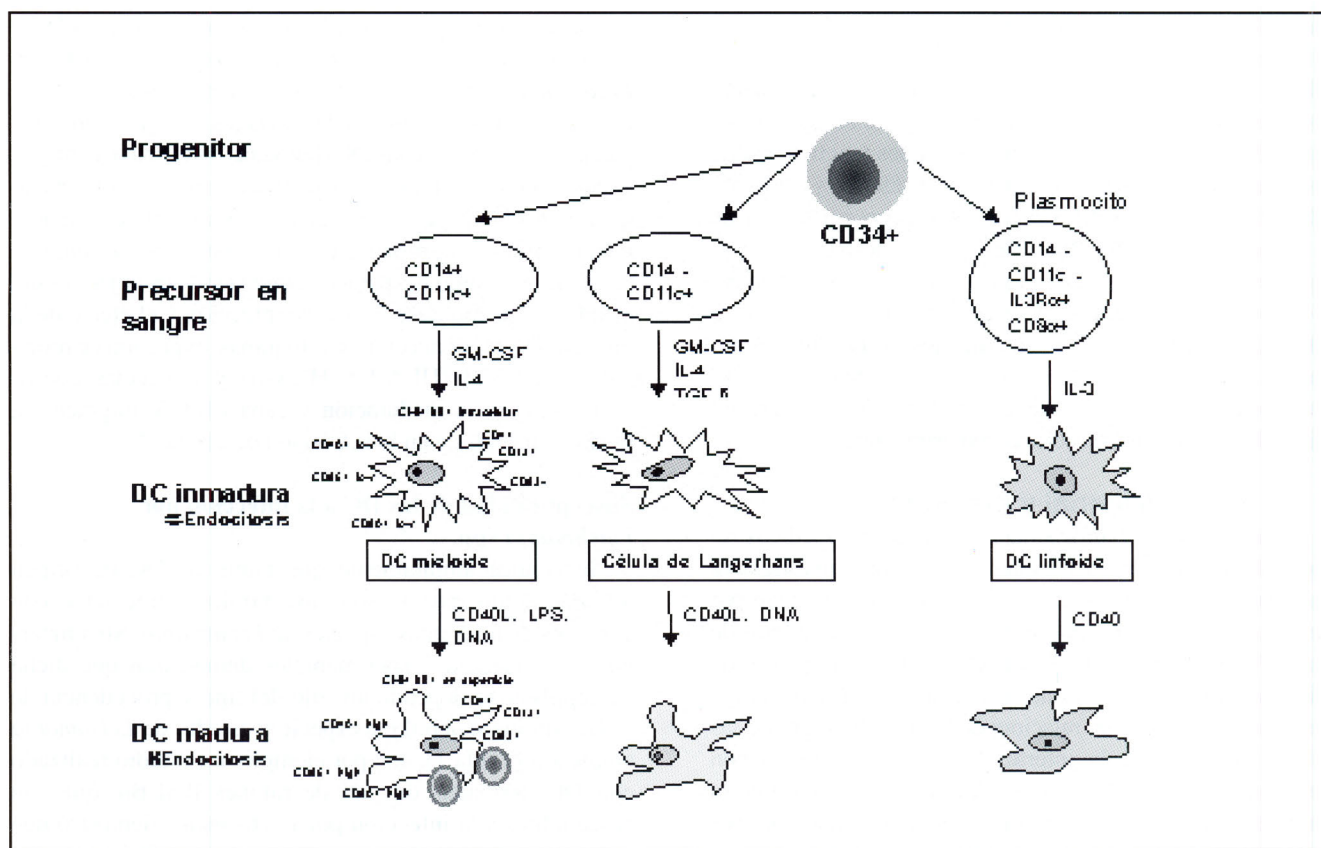


Figura 1. Ontogenia de las DC. Las DC se derivan de un precursor de médula ósea CD34+ y bajo el estímulo de citoquinas y factores de crecimiento apropiados dan origen a subpoblaciones de DC inmaduras conocidas como mieloides, Langerhans y linfoides que son diferentes en fenotipo y función.

forma mucosa y visceral, dependiendo tanto de la especie de *Leishmania* responsable de la infección como de la respuesta inmune específica inducida por los Ags del parásito. Para iniciar y mantener la infección dentro del hospedero mamífero los promastigotes inoculados por el vector invaden las células del sistema mononuclear fagocítico (monocitos/macrófagos) presentes en la piel o son fagocitados por dichas células; en su interior el promastigote se transforma en amastigote para así sobrevivir y multiplicarse dentro del compartimiento fagolisosomal de las células fagocíticas. Por lo tanto, la eliminación del parásito o el control de la infección dependerá de la capacidad innata o adquirida que posean los macrófagos para lograr la muerte y destrucción del parásito en el interior de la célula mientras que el desarrollo de la enfermedad dependerá de la capacidad del parásito para desactivar el macrófago. De esta forma, la respuesta inmune efectiva y protectora contra la infección por *Leishmania* se asocia con la producción de citoquinas por las células T, principalmente interferon γ (IFN γ), que activan el macrófago y permiten así la muerte del parásito en el interior de la célula (11).

Hasta hace poco se aceptaba ampliamente que el macrófago cumplía un papel central en las infecciones por especies de *Leishmania* puesto que no sólo servía como célula hospedera sino también como la célula presentadora

de Ag (CPA) responsable de la generación de las subpoblaciones de células T específicas a través de la producción o no de IL-12, mientras que a las DC se les consideraba como células accesorias que potenciaban la acción del macrófago durante la presentación del Ag. Sin embargo, la disponibilidad que se tiene actualmente de obtener, cultivar y manipular en el laboratorio DC tanto humanas como murinas ha permitido demostrar que las DC son CPA más potentes que los mismos macrófagos y que por lo tanto su interacción con el Ag y con las células T es determinante no sólo en la iniciación, mantenimiento y regulación de la respuesta inmune contra un microorganismo infeccioso en particular sino también en la inducción de la tolerancia inmunológica.

La piel es el sitio donde ocurre la inoculación del parásito por el vector; es un tejido rico en DC y es allí donde se da el establecimiento de la infección; por lo tanto, es posible pensar que estas células son las CPA que van a interactuar con los linfocitos T y por lo tanto determinan el tipo de respuesta inmune desencadenada contra *Leishmania* spp. Diferentes trabajos realizados en los últimos diez años con DC de origen humano y murino demuestran que son las DC de origen mielóide las que son susceptibles a infectarse por diferentes especies de *Leishmania* y por lo tanto pueden participar en el desarrollo de la respuesta inmune específica contra el parásito (12, 13). Sin embargo, los resultados obte-

nidos demuestran que el comportamiento de las DC frente a la infección por *Leishmania* en lo relacionado con susceptibilidad a la infección, expresión o regulación de las moléculas coestimuladoras y del CMH, producción de citoquinas, capacidad de migración a órganos linfoides y activación de las células T específicas varía en función del tipo y origen de DC utilizada (bazo, piel, médula ósea o sangre periférica), de la procedencia de las células (humanas o de ratón) y de la especie o estadio de parásito (amastigotes o promastigotes) (14). Por lo tanto, esta revisión se enfocará en describir la interacción entre las DC y los parásitos de *Leishmania* teniendo en cuenta las características de la población de DC estudiadas, su origen, la especie y el estadio del parásito utilizado durante las infecciones experimentales.

Material y métodos

Esta revisión se fundamenta en artículos biomédicos recopilados por los autores durante su trayectoria investigativa en el área de la respuesta inmune frente a la infección por *Leishmania* y en artículos obtenidos a través de la base de datos PubMed (1989-2003) introduciendo como patrón de búsqueda las palabras "células dendríticas" y "*Leishmania*". Se incluyeron artículos relacionados con la biología de las células dendríticas, la interacción de estas células con *Leishmania* y algunos artículos relevantes sobre la respuesta inmune conocida hasta ahora frente a la infección por *Leishmania*. En total se revisaron 120 artículos de los cuales

se seleccionaron 29 relacionados con la biología de las DC y 28 que muestran evidencias de la interacción de las DC con *Leishmania* y las consecuencias inmunológicas de dicha interacción. Los artículos seleccionados se clasificaron según la procedencia de las DC (humanas o murinas), el origen y la metodología empleada para el aislamiento y diferenciación de las DC a partir de órganos y tejidos (bazo, hígado, médula ósea, sangre periférica), la especie de *Leishmania* utilizada, el estadio del parásito empleado y los objetivos del estudio en cuanto a capacidad de infección y el efecto de la infección en la producción de citoquinas, expresión de moléculas del CMH (HLA-I y HLA-II) y moléculas coestimuladoras, en la maduración y capacidad de migración a órganos linfoides y en la activación de células T.

Susceptibilidad de las DC a la infección por *Leishmania* spp.

Se conoce ampliamente que tanto las DC de origen humano como murino son susceptibles a infectarse con parásitos de diferentes especies de *Leishmania*. Sin embargo, las evidencias experimentales demuestran que dicha susceptibilidad depende no sólo del tipo y procedencia de la DC sino también de la especie y estadio de *Leishmania* empleado (Tabla 1). Así por ejemplo, un estudio realizado con DC derivadas de piel de ratones BALB/c que son susceptibles a la infección por *L. (L) major* demostró que estas DC sólo se infectan con amastigotes (25%) pero no

Tabla 1. Evidencias experimentales de la variabilidad en el efecto de la infección de células dendríticas por *Leishmania* spp.

| Origen | Procedencia (Tejido) | <i>Leishmania</i> spp ^a | Estadio ^b (% Infección) | Hallazgos en características o función | Referencia |
|-------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|------------|
| Ratones BALB/c | Piel | <i>Lm</i> | A (25%) | No aplica | 15 |
| Ratones BALB/c y C3H | Bazo | <i>Lm</i> | P (33%) | Producción de IL-12 sin participación de CD40/CD40L | 16 |
| Ratones BALB/c y C57BL6 | Piel de feto | <i>Lm</i> | A (36%) P (7%) | Aumento en expresión de CD40, DC80 y CD86 y CMH clase I y II. Producción de IL-12 independiente de CD40/CD40L | 17, 18 |
| Ratones BALB/c y C3H | Médula ósea | <i>La</i> | A (60-70%) P (70-80%) | Aumento en expresión de CD40, DC80 y CD86 y CMH clase I y II. Aumento en producción de IL-4 en BALB/c. Producción de IL-12 dependiente de CD40/CD40L | 19 |
| Humanos | Sangre periférica | <i>Lm</i> | A (58%) P (38%) | Aumento en la expresión de las moléculas CD40, DC80 y CD86 y CMH clase I y II. Capacidad de estimular LT. Producción de IL-12 dependiente de CD40/CD40L | 22 |
| Ratones BALB/c y C57BL6 | Bazo | <i>Lm</i> | A y P | No aumento en expresión de las moléculas CD40, DC80 y CD86 y CMH clase II | 16, 21 |
| Ratones BALB/c y C3H | Piel | <i>Lm</i> | P | Regulación negativa de CD80 en BALB/c. | 34 |
| Ratones BALB/c | Piel | <i>Lm</i> | A | Transporte Ags a nódulos linfoides y estimulación de LT | 35 |
| Ratones BALB/c | Bazo | <i>Lm</i> | P | Retardo en migración al nódulo linfoide | 37 |
| Ratones BALB/c | Piel oreja | <i>Lm</i> | A | Aumento expresión de IL-4R | 47 |

^a *Lm*: *L. (L) major*; *La*: *L. (L) amazonensis*. ^b A: Amastigotes; P: Promastigotes; IL: interleuquina; CMH: complejo mayor de histocompatibilidad; Ags: antígenos; LT: linfocitos T.

con promastigotes de *L. (L) major* y que los parásitos pierden la capacidad de multiplicarse dentro de las DC cuando se mantienen en cultivo por seis días (15). Sin embargo, otro estudio realizado con DC derivadas de bazo de ratones de la cepa BALB/c (susceptibles) y de ratones de la cepa C3H (resistentes a la infección por *L. (L) major*) demostró que las DC derivadas de bazo se infectan con promastigotes (33%) y que igualmente pierden la capacidad de multiplicación intracelular (16). Cuando se evaluaron DC derivadas de piel de feto procedentes de ratones tanto susceptibles (cepa BALB/c) como resistentes (cepa C57BL/6) a la infección por *L. (L) major* se observó que células de ambas cepas son capaces de internalizar, con igual eficiencia, preferencialmente amastigotes (36%) que promastigotes (7%) (17, 18). Sin embargo, DC de ratones susceptibles (cepa BALB/c) y resistentes (C3H/HeJ) a la infección por *L. (L) major* pero derivadas de médula ósea se infectan tanto con amastigotes (60-70%) como con promastigotes de *L. (L) amazonensis* (70-80%) sin mostrar diferencias entre los dos estadios del parásito (19).

Al estudiarse el comportamiento frente a la infección por amastigotes de *L. (L) major* de tres subpoblaciones funcionalmente diferentes de DC derivadas de bazo de ratones de la cepa C57BL/6 a saber: DC CD4⁺ CD8a⁻ que corresponden a DC inmaduras de origen mieloide, DC CD4-CD8a⁻ que corresponden a DC maduras de origen mieloide y DC CD4-CD8a⁺ que corresponden a DC de origen linfóide (10, 20) se observó que las subpoblaciones de origen mieloide tanto maduras como inmaduras presentaron el mayor porcentaje de infección (30% y 24% respectivamente, mientras que la subpoblación de DC de origen linfóide presentaron el porcentaje de infección más bajo (11.7%) (21). Al parecer dichas diferencias en la susceptibilidad no se deben al grado de madurez de las DC ya que la expresión de las moléculas CMH clase II, CD40, CD80 y CD86 fue similar en todas las subpoblaciones de DC.

Por su parte, cuando se emplean DC humanas derivadas de monocitos de sangre periférica de individuos sanos cultivadas en presencia de citoquinas tales como IL-4 y GM-CSF se ha observado que el porcentaje de infección con amastigotes de *L. (L) major* se aumenta 1.5 veces más que cuando se hace la infección con promastigotes de esta misma especie (58% y 38% respectivamente). Cabe resaltar que el promedio de parásitos intracelulares obtenido es igual con los dos estadios del parásito. Adicionalmente, los parásitos conservan la capacidad de multiplicación puesto que el porcentaje de células infectadas y el promedio de parásitos intracelulares aumentó durante los tres días de cultivo (22).

Mecanismos de entrada de *Leishmania* spp a las DC

Las DC tienen la capacidad de capturar los Ags de un modo muy eficiente por endocitosis. Ellas pueden capturar Ags particulados (cuerpos apoptóticos, fragmentos celulares necróticos y microorganismos) por fagocitosis (23, 24).

A su vez, los Ags solubles son capturados por macropinocitosis (25). La fagocitosis generalmente está mediada por a) receptores de lectinas tipo C tales como el receptor para manosa (25), el DEC-205 (una proteína integral de membrana homóloga al receptor de manosa del macrófago capaz de unir carbohidratos y mediar endocitosis) (26) y el DC-SIGN (una proteína tipo II de 44 kDa que atraviesa membrana, que contiene un dominio de unión para lectinas tipo C y une las moléculas de adhesión ICAM-3 e ICAM-2 conocida como CD-209 (27, 28) y b) por receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (FcR), principalmente IgG e IgE tales como FcγR tipo I (CD64), tipo II (CD32) y tipo III (CD16) (29) y Fcε tipo I (30). Algunas subpoblaciones de DC como las DC de tipo intersticial poseen FcαR (CD89) (31). Las DC humanas derivadas de monocitos de sangre periférica expresan principalmente receptores Fcγ tipo II y receptores Fcα. Adicionalmente, las DC inmaduras expresan los receptores para complemento (CR) CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) pero no CR1 (CD35) y CR2 (CD21) (24). Un estudio realizado por Blank y colaboradores (1993) sugiere que la entrada de los parásitos de *Leishmania* a las DC ocurre por medio de la interacción entre el receptor CR3 y la molécula C3bi del complemento que se encuentra adherida a la membrana del parásito luego de la activación del complemento, ya que al bloquear en forma específica el receptor CR3 con un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-CR3 se redujo dramáticamente la proporción de DC infectadas (90% de inhibición de la infección) lo que no ocurrió al bloquear el receptor de manosa-fucosa (15). Adicionalmente, se ha demostrado que la molécula CR3 se expresa abundantemente en DC murinas derivadas de bazo infectadas por amastigotes de *L. (L) major* (21).

Recientemente se demostró que amastigotes axénicos de *L. (L) pifanoi* se unen al receptor de lectinas tipo C denominado DC-SIGN (CD209), que se expresa exclusivamente en las DC humanas derivadas de monocitos de sangre periférica y que media una fuerte adhesión entre la DC y la célula T a través de la interacción DC-SIGN y las moléculas de adhesión ICAM-2 e ICAM-3 (27, 28). Para asegurar que la entrada de los parásitos a las DC era por este receptor y no a través de CR y FcR se emplearon amastigotes axénicos cultivados en medio F29 a 31° (32).

Efecto de la infección por *Leishmania* spp en la expresión de moléculas CMH y moléculas coestimuladoras

La activación específica de las células T requiere de dos señales. La primera señal está dada por la interacción del complejo CMH-péptido con el receptor de la célula T (TCR) específico para el Ag. La segunda señal o señal coestimuladora se da cuando interactúan las moléculas C40, CD80 y CD86 presentes en la CPA con sus correspondientes receptores presentes en la célula T (33). Se ha observado que luego de la internalización del Ag por la DC se

inicia la maduración y activación de la DC, lo que conduce a cambios en el fenotipo de la célula, principalmente en la expresión de las moléculas coestimuladoras y del CMH HLA-I y HLA-II (1, 23). Una vez la DC ha capturado el Ag, comienza el proceso de maduración de la DC y empieza a disminuir su capacidad endocítica y simultáneamente comienza a ensamblar los complejos péptido antigénico molécula MHC clase II, para posteriormente ser presentados a las células T en el ganglio linfático.

Las evidencias que se tienen hasta ahora muestran que tanto los promastigotes como los amastigotes de *L. (L) major* y *L. (L) amazonensis* aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 y de las moléculas HLA-I y HLA-II en DC derivadas ya sea de piel de feto de ratones C57BL/6 (17) y BALB/c (18) al igual que en DC murinas derivadas de médula ósea de ratones BALB/c y C3H/HeJ (19) y en DC humanas derivadas de sangre periférica de individuos sanos (22). Sin embargo, dos estudios muestran que las DC de ratones BALB/c y C57BL/6 derivadas de bazo infectadas con amastigotes (21) o promastigotes (16) de *L. (L) major* no afectan la expresión de las moléculas HLA-II ni de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86. Adicionalmente, en un estudio realizado con DC de ratones BALB/c y C3H/HeJ derivadas de piel e infectadas con promastigotes de *L. (L) major* se observó una regulación negativa de la molécula CD80 únicamente en los ratones BALB/c y no en los C3H/HeJ. En las demás moléculas estudiadas no se observó cambio en la expresión luego de la infección (34).

Dado que tanto las moléculas HLA como las moléculas coestimuladoras son cruciales en la activación de las células T específicas para la respuesta inmune efectiva y protectora contra la infección por microorganismos infecciosos al regular el patrón de citoquinas que se produce luego de la infección, el nivel de expresión de estas moléculas en las CPAs puede representar un factor determinante en el curso clínico de la infección; por lo tanto, es importante esclarecer el efecto de la infección por *Leishmania* en la expresión de dichas moléculas.

Efecto de la infección por *Leishmania* spp en la capacidad de migración y activación de células T

Una de las principales propiedades de las DC es la capacidad para migrar desde el tejido hasta los nódulos linfoides regionales una vez se han encontrado con el Ag, un paso fundamental en la generación de una respuesta inmune protectora, ya que es en los órganos linfoides periféricos donde se activan las células T específicas para un Ag (35, 36). Un estudio *in vivo*, donde se evaluó la capacidad de macrófagos peritoneales y DC derivadas de piel de ratones BALB/c para migrar a los nódulos linfoides y estimular a las células T luego de la infección con amastigotes de *L. (L) major*, se observó que las DC derivadas de piel pero no los macrófagos infectados llegaron a los nodulos, sugiriendo que son las DC las que tienen la capa-

cidad de transportar los parásitos o sus Ags desde la piel a los nódulos linfoides (35). De igual manera se encontró que estas células tienen la capacidad de estimular a las células T evidenciado por ensayos de linfoproliferación. En otro estudio realizado con DC derivadas de monocitos de sangre periférica de pacientes con leishmaniasis cutánea producida por *L. (L) major* y cultivadas en presencia de células T antologas se demostró un aumento en la proliferación de las células T y la producción de IFN- γ , sugiriendo que las DC fueron capaces de procesar, presentar los Ags de *Leishmania* y activar a las células T específicas (22).

Como un posible mecanismo de evasión de la actividad inmunoestimuladora de las DC se ha visto que tanto los parásitos vivos como algunos de sus componentes estructurales o sus metabolitos pueden inhibir la capacidad de migrar de las DC. Es así como un estudio realizado *in vitro* permitió demostrar que tanto los promastigotes vivos de *L. (L) major* como los metabolitos de los parásitos contenidos en el medio de cultivo tienen la capacidad de inhibir la movilidad de las DC derivadas de bazo de ratones BALB/c en un 93%, en forma reversible y dependiente de la dosis (37). Por otra parte se observó que el lipofosfoglicano (LPG), el componente más abundante de la membrana de los promastigotes de *Leishmania*, aislado de parásitos de *L. (L) major* también tiene la capacidad de disminuir la migración de las DC hasta en un 40% (38). La disminución en la capacidad de migración se vio asociada a la disminución en la expresión de la integrina Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) la cual es una molécula de adhesión involucrada en la migración de los leucocitos. Estas observaciones cobran importancia para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia, ya que se deben buscar agentes terapéuticos que revertan el efecto inhibitorio que ejercen los parásitos sobre la migración y estimulen el movimiento de las DC que contengan Ags de *Leishmania* hacia los nodulos linfoides y de esta forma poder llevar a cabo el desarrollo de la respuesta inmune protectora a través de la presentación de Ags a las células T específicas.

Efecto de la infección por *Leishmania* spp en la producción de citoquinas

Los estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes modelos de infección han demostrado que las citoquinas presentes durante la estimulación primaria con el Ag son el principal factor en determinar la diferenciación de las células T no sensibilizadas. El poder demostrar que las células T CD4⁺ podían ser diferenciadas en dos subpoblaciones (Th1 y Th2) basado en el perfil de citoquinas que ellas producen ha sido de gran interés para el entendimiento del curso clínico de la infección por *Leishmania*, toda vez que el perfil de citoquinas para cada subpoblación se correlaciona con su función. De esta forma, las citoquinas de tipo Th1 (IFN γ , IL-2) inducen la respuesta inmune mediada por células T al activar los macrófagos para lograr la muerte intracelular del parásito mientras que las citoquinas

de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) aumentan la producción de anticuerpos (39). En el modelo murino de infección por *L. (L) major* se ha demostrado que la progresión de la infección está determinada por la población de células T ayudadoras (CD4+) y el patrón de citoquinas que se generen. Es así como en los ratones C57BL/6 y C3H/HeJ, resistentes a la infección por *L. (L) major*, predominan células Th1 productoras de IFN- γ necesario para la activación del macrófago y la muerte intracelular del parásito. A su vez, en los ratones BALB/c, susceptibles a la infección, predominan células Th2 que producen principalmente IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (40-42).

Al igual que en el modelo murino, las subpoblaciones de células Th1 y Th2 en el humano se distinguen también según el patrón de citoquinas que ellas producen, siendo las células efectoras de tipo Th1 las que se asocian con el control de la infección o respuesta cicatrizante, mientras que las células efectoras de tipo Th2 y sus citoquinas predominan en las formas severas de la enfermedad como la leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral (43-45). Sin embargo, a diferencia del modelo murino, en el humano la producción de citoquinas tales como IL-2, IL-6, IL-10 e IL-13 no está restringido a una sola subpoblación de células Th (46). Por lo tanto, los mecanismos por los cuales se activen preferencialmente las subpoblaciones de células Th1 o Th2 es importante para dirigir la respuesta inmune hacia protección y resolución de la infección vs susceptibilidad y patogénesis. En este sentido, los trabajos realizados con DC expuestas a la infección por parásitos de *Leishmania* han mostrado que la infección regula tanto la producción de las citoquinas como la expresión de los receptores. Así por ejemplo, la infección de DC derivadas de la piel de la oreja de ratones C57BL/6 y BALB/c con amastigotes de *L. (L) major* produce un aumento en la expresión del receptor para IL-4 en las DC de los ratones BALB/c (susceptibles) pero no en las DC de los ratones C57BL/6 (resistentes); para los demás receptores estudiados (IL-1R tipo I y II, TNFR tipo I y II e IFN- γ) no se encontraron diferencias en su expresión (47), sugiriendo entonces que la regulación positiva de la expresión del receptor para IL-4 en las DC de los ratones susceptibles contribuye a la inducción del desarrollo de la respuesta inmune tipo Th2. En forma similar, la infección de DC derivadas de médula ósea de ratones BALB/c y C3H/HeJ con amastigotes de *L. (L) amazonensis* induce la producción de IL-4 por las DC de los ratones BALB/c pero no por las DC de los ratones C3H/HeJ, luego del estímulo con el AcMo anti-CD40, lo cual concuerda con un patrón de células tipo Th2 en los ratones susceptibles pero no en los resistentes (19).

Otra vía de señalización aparentemente involucrada en la producción de IL-4 es la vía de señalización a través de CD86, ya que al bloquear esta vía con un AcMo neutralizante anti-CD86 en las DC derivadas de epidermis de ratones BALB/c se reducen significativamente (90%) los niveles de IL-4 producidos por las células T CD4+ específicas para

Ags de *L. (L) major*. Este efecto no se observó al bloquear la vía coestimuladora a través de CD80 (34).

Con respecto a la IL-12, una citoquina producida abundantemente por las DC y que está implicada en el desarrollo de una respuesta tipo Th1, los hallazgos son confusos y por ende poco concluyentes. Algunos estudios han demostrado el aumento en la producción de IL-12 por las DC luego de la infección por parásitos intracelulares como *Leishmania* y *Toxoplasma*; sin embargo, esta producción puede ser dependiente o independiente de la señal coestimuladora dada por la interacción de la molécula CD40 con su receptor CD40L presente en los linfocitos (48, 49). Así por ejemplo, varios estudios demuestran que las DC humanas derivadas de monocitos de sangre periférica de individuos sanos (22) y las DC murinas derivadas de médula ósea (19) infectadas con promastigotes de *L. (L) major* sólo producen IL-12 cuando son coestimuladas por la interacción de las moléculas CD40/CD40L. En el caso de las DC murinas la producción de IL-12 estuvo a cargo de las células obtenidas de ratones resistentes (cepa C3H/HeJ) pero no de los susceptibles (cepa BALB/c). Así mismo, al comparar la producción de IL-12 por DC humanas derivadas de monocitos de sangre periférica (50) luego de la infección por promastigotes de diferentes cepas de *Leishmania* tales como de *L. (L) major*, *L. (L) tropica* y *L. (L) donovani*, se encontró que sólo las DC infectadas con *L. (L) major* producen IL-12 luego de la interacción de CD40/CD40L, lo que sugiere que la producción de IL-12 por las DC es dependiente de la especie de *Leishmania*. Adicionalmente, hay evidencias en cuanto a que la producción de IL-12 por las DC también depende de la cepa utilizada en la infección, pues al infectar DC humanas derivadas de monocitos con diferentes cepas de *L. (L) major* se encontraron niveles variables de IL-12, en donde unas cepas inducen una alta producción de IL-12 (alrededor de 14000 pg/ml) mientras que con otras cepas los niveles eran significativamente más bajos (1500 pg/ml) (50).

Al comparar los niveles de ácido ribonucleico (ARN) mensajero de las subunidades p40 y p35 de la IL-12 se observó que los niveles del ARN para la subunidad p40 fue igual para las DC infectadas con las diferentes cepas y especies mientras que la subunidad p35 está regulada positivamente en las DC infectadas con algunas cepas de *L. (L) major*, resultados que son consistentes con los niveles de IL-12p70 (proteína activa) encontrados (50). El requerimiento del CD40L para la producción de IL-12 por las DC infectadas puede representar una ventaja para el establecimiento de la infección, ya que esta señal coestimuladora muy probablemente ocurre después de la migración de las DC a los órganos linfoides periféricos donde están los linfocitos capaces de dar dicha señal. Sin embargo, es importante resaltar que la vía de señalización a través de la interacción CD40/CD40L sólo amplifica la producción de IL-12 por las DC condicionadas por el estímulo microbiano,

ya que por sí sola no induce producción ni de IL-12p70 ni de ninguna de las dos subunidades que la componen p40 y p35 (51, 52).

Al igual que lo observado en otras características de las DC discutidas previamente la producción de IL-1 2 por estas células también varía en función de la especie de *Leishmania* y de la procedencia de las DC. El incremento en la producción de IL-1 2 sin el requerimiento de la señal coestimuladora CD40/CD40 L se ha visto en DC de ratones C3H/He J y BALB/ c derivadas de bazo infectadas por promastigotes de *L. (L) major* (16) y DC de ratones C57BL / 6 y BALB/ c derivadas de piel de feto infectadas con amastigotes de *L. (L) major* (17, 18). En ambos estudios se observó un aumento significativo en la producción de IL-12p40 18 horas después de la exposición a la infección. Por el contrario, no se observó aumento en la producción de IL-1 2 por los macrófagos (16, 17), lo que se relaciona con observaciones anteriores que muestran que los macrófagos murinos infectados por *L. (L) major* y *L. (L) donovani* producen IL-1 2 (53-55) y sugiere entonces que son las DC pero no los macrófagos las células responsables de la estimulación y diferenciación de las

células específicas para Ags de *Leishmania* spp por medio de la producción de IL-12.

Así mismo, al comparar subpoblaciones de DC murinas (de origen mieloide inmaduras, mieloide maduras y linfoides, caracterizadas según la expresión de las moléculas CD 4 y CD8 α) derivadas de bazo, se observó que las DC de origen linfóide producen mayor cantidad de IL-1 2 a pesar de ser las células que menos se infectan en comparación con las DC de origen mieloide tanto maduras como inmaduras que producen menos IL-1 2 pero que presentan una mayor capacidad de infección (21).

En estudios *in vivo* se ha observado que las células de Langerhans epidermales de ratones susceptibles (ALB / c) pulsadas con Ag tanto de *L. (L) major* (56) como de *L. (L) donovani* (55) y luego inyectadas en el ratón son la fuente de IL-1 2 frente a la infección. En el estudio de Flohé (56), se encontró además que estas células pulsadas con antígenos de *L. (L) major* indujeron un patrón de citoquinas tipo Th1 con altos niveles de IFN- γ y muy bajos niveles de IL- 4 e IL-1 0 y producían resistencia y protección a los ratones frente a la infección por *Leishmania*.

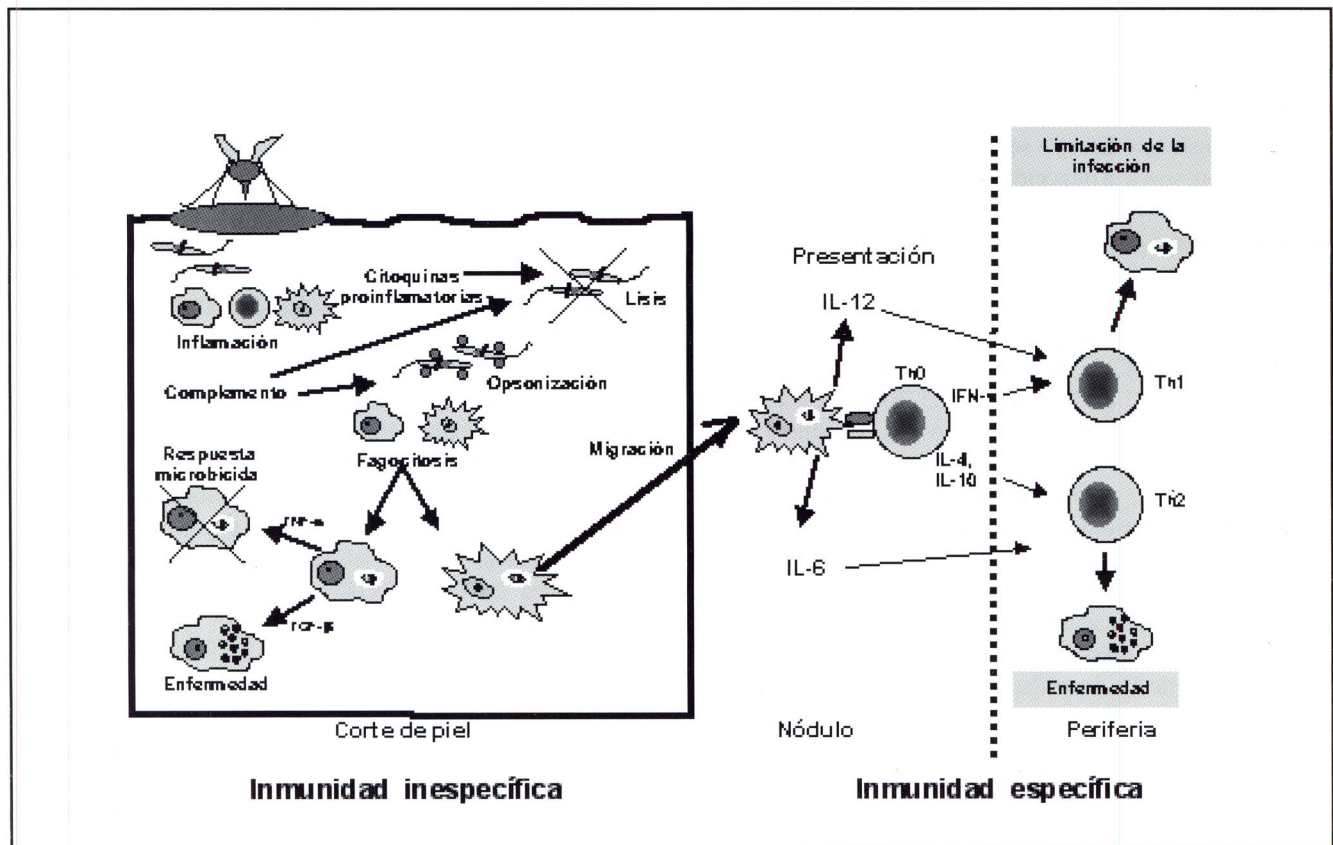


Figura 2. Mecanismos de respuesta inmune en infecciones por *Leishmania* spp. La inoculación de promastigotes en la piel por la picadura de *Lutzomyia* induce mecanismos de respuesta inmune tanto innata como adquirida que involucran esencialmente la producción de citoquinas activadoras o desactivadoras del macrófago. En las infecciones por *Leishmania* spp la inmunidad protectora se asocia con la producción de citoquinas, principalmente IFN- γ , por parte de los LT específicos que conducen a la activación del macrófago y permiten la muerte del parásito en el interior de la célula. De esta forma, la capacidad del hospedero para desarrollar una respuesta inmune efectiva dependerá de la capacidad de la CPA para activar la población adecuada de LT específicos. Actualmente se sugiere que en las infecciones por *Leishmania*, la DC es la célula responsable de iniciar y regular la respuesta inmune específica, mientras que el macrófago es la célula responsable de la eliminación de la infección cuando es activado por las citoquinas producidas por los LT específicos.

El hecho que las DC son susceptibles a infección por *Leishmania* spp, producen citoquinas reguladoras de la respuesta inmune específica luego de la infección tales como IL-12 y la IL-4 y tienen la capacidad de activar células para la proliferación de subpoblaciones específicas y producción de IFN- γ , llevan a sugerir que en la respuesta inmune específica contra la infección por *Leishmania* spp la DC es la principal CPA para la activación y diferenciación de las células y por ende de la respuesta inmune específica y protección mientras que el macrófago es la célula hospedera y efectora responsable de la muerte intracelular del parásito como consecuencia de la activación adecuada de las células (Figura 2). De esta forma se sustenta el uso potencial de las DC como vectores de vacunas y adyuvantes naturales en la inducción de una respuesta inmune protectora y duradera contra la infección por *Leishmania*, en donde la inmunidad conferida por una vacuna a base de DC pulsadas con Ags de *Leishmania* permitiría la generación de células de memoria específica contra el parásito (57).

Conclusión

En esta revisión se abordaron las principales características de la interacción de las DC con los parásitos de *Leishmania* teniendo en cuenta los principales pasos que se dan luego de la infección hasta la activación de las células por medio de la presentación antigénica. La información obtenida hasta ahora sugiere que en las infecciones por *Leishmania* las DC participan activamente en la iniciación y regulación de la respuesta inmune específica, mientras que el macrófago parece estar más involucrado en la eliminación de la infección cuando es activado por las citoquinas producidas por las células específicas luego de su interacción con las DC. Sin embargo el efecto de la infección por *Leishmania* en la activación y función de la DC permanece aún por definirse.

Debido a la variedad de especies de *Leishmania* involucradas en los cuadros clínicos y al espectro de formas clínicas producidas por este parásito es importante continuar con investigaciones que lleven a conclusiones más contundentes acerca de la interacción entre la DC y el parásito y la posterior interacción de la DC infectada con las células específicas responsables de la eliminación o no del parásito. Conociendo a profundidad los eventos que suceden durante y después de dichas interacciones se podrán identificar los componentes inmunológicos que pueden regular la generación de una respuesta inmune mediada por células Th1 o Th2, y así disponer de posibles blancos para una intervención inmunológica que permita el control de las infecciones por parásitos intracelulares como los del género *Leishmania*.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología en Colombia COLCIENCIAS (proyecto 1115-05-10130), Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología, Banco de la República (proyecto 1167) y al

Comité para el Desarrollo de la Investigación de la Universidad de Antioquia CODI (proyecto CPT-0110) por la financiación del proyecto de investigación que nos ha permitido ahondar en el tema de las DC y la infección por *Leishmania*.

Referencias

- Bancherea u J, Steinman MR. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**: 245-252.
- Steinman RM, Inaba . Myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 205-208.
- Banyer J, Hapel AJ. Myb-transformed hematopoietic cells as a model for monocyte differentiation into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 217-223.
- Chapuis S, Resenzwajg M, Yagell O M, Ekman N M, Biberfeld , Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 431-441.
- Palucka K, Taque t , Sanchez-Chapuis S, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998; **160**: 4587-4595.
- Cavanagh LL, Saal RJ, Grimmett KL, Thomas R. Proliferation in monocyte-derived dendritic cell cultures is caused by progenitor cells capable of myeloid differentiation. *Blood* 1998; **92**: 1598-1607.
- Ardavi N C. Thymine dendritic cells. *Immunology Today* 1997; **18**: 352-361.
- Santiago-Schwarz F. Positive and negative regulation of myeloid dendritic cell lineage. *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 209-219.
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard D G, Briere F, Malefyt R, Liu YJ. Reciprocal control of helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; **283**: 1183-1186.
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtype in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000; **164**: 2978-2986.
- Solbach W, Moll H, Rollinghoff M. Lymphocytes play the music but the macrophage calls the tune. *Immunology Today* 1991; **12**: 4-6.
- Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 1993; **14**: 383-387.
- Hart D. Dendritic cells: unique leukocyte population which control the primary immune response. *Blood* 1997; **90**: 3245-3287.
- Udey MC, von Stebut E, Mendez S, Sacks DL, Belkaid Y. Skin dendritic cells in murine cutaneous leishmaniasis. *Immunobiology* 2001; **204**: 509-594.
- Blank C, Fuchs H, Rappersberger , Rollinghoff M, Moll H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous Leishmaniasis with *Leishmania major*. *J Infect Dis* 1993; **167**: 418-425.
- Konecny P, Stagg AJ, Jebbari H, English N, Davidson RN, Knight S. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes produce IL-12p40 and stimulate primary cell proliferation *in vitro*. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 1803-1811.
- von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks D, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med* 1998; **188**: 1547-1552.
- von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen B, Cushing M, Sacks DL, Udey MC. *Leishmania major*-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 3498-3506.
- Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis* dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4+ cells *in vivo*. *J Immunol* 2001; **167**: 4534-4542.
- Hochrein , Shortman , Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keefe M. Differential production of IL-12, IFN- α , and INF- γ by mouse dendritic cell subtype. *J Immunol* 2001; **166**: 5448-5455.
- Henri S, Curtis J, Hochrein , Vremec D, Shortman K, Handman E. Hierarchy of susceptibility of dendritic cell subsets to infection by *Leishmania major*. Inverse relationship to interleukin-12 production. *Infection and Immunity* 2002; **70**: 3874-3880.
- Marovic M, McDowell MA, Thomas EK, Nutman TB. IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol* 2000; **164**: 5858-5865.
- Bancherea u J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Ann Rev Immunol* 2000; **18**: 767-811.
- Guernonprez P, Valledeu J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and cell simulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 621-667.
- Sallusto F, Celia M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen to the MHC

- class II compartment. Down-regulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 1995; **182**: 389-400.
26. Jiang W, Swiggard WJ, Heuffler G, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; **375**: 151-155.
 27. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 2000; **100**: 575-585.
 28. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alón R, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN-ICAM-2 Interaction Mediates Dendritic Cell Trafficking. *Nat Immunol* 2000; **1**: 353-357
 29. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fc-gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999; **189**: 371-380.
 30. Maurer D, Fiebiger E, Reininger B, Ebner C, Petzelbauer P, Shi GP, Chapman HA, Stingl G. Fc-epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation. *J Immunol* 1998; **161**: 2731-2739.
 31. Geissmann F, Launay P, Pasquier B, Lepelletier Y, Leborgne M, Lehen A, Brousse N, Monteiro RC. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation-upon cross-linking by IgA complexes *J Immunol* 2001; **166**: 346-352
 32. Colmenares M, Puig-Kroger A, Muñoz Pello O, Corbí AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 36766-36769.
 33. Zuluaga M, Trujillo CM, Patiño PJ, Robledo SM. CD28/CD152-B7 y CD40-CD40L. Dos vías coestimuladoras de importancia para la respuesta inmune adquirida. *Act Med Colomb* 2002; **27**: 125-133.
 34. Mbow ML, DeKrey GK, Titus RG. *Leishmania major* induces differential expression of costimulatory molecules on mouse epidermal cells. *Eur J Immunol* 2001; **31**: 1400-1409.
 35. Moll H, Fuchs H, Blank C, Rollonghoff M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 1595-1601.
 36. Stockwin LH, McGonagle D, Martin I, Blair E. Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol and Cell Biol* 2000; **78**: 91-102.
 37. Jebbari H, Stagg A, Davidson R, Knight SC. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility *in vitro*. *Infect and Immun* 2002; **70**: 1023-1026.
 38. Ponte-Sucre A, Heise D, Moll H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. *Immunology* 2001; **104**: 462-467.
 39. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; **7**: 145-173.
 40. Nancy CA, Nelson BJ, Meitzer MS, Green SJ. Cytokines that regulate macrophage production of nitric oxides and expression of antileishmanial activities. *Res Immunol* 1991; **7**: 573-576
 41. Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1993; **32**: 161-259
 42. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* 1995; **13**: 151-177.
 43. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; **254**: 279-281.
 44. Pirmze C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1390-1395.
 45. Cáceres-Dittmar G, Tapia FJ, Sanchez MA, Yamamura M, Uyemura K, Modlin RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993; **91**: 500-505.
 46. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; **17**: 138-146.
 47. Moll H, Scharner A, Kampgen E. Increase interleukin 4 (IL-4) receptor expressions and IL-4 induced decrease IL-12 production by Langerhans cells infected with *Leishmania major*. *Infect and Immun* 2002; **70** (3): 1627-1630.
 48. Scott P, Hunter CA. Dendritic cell and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Current Opinon in Immunol* 2002; **14**: 466-470.
 49. Sousa CR, Hieny, Scharton-Kersen T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 1997; **186**: 1819-1829.
 50. MacDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect and Immun* 2002; **70**: 3994-4001.
 51. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aleberti J, Manickasingham S, Sher A, Reis e Sousa C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12p70 production by dendritic cells *in vivo* requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000; **13**: 453-462.
 52. Reis e Sousa C, Edwards AD, Manickasingham SP, Schulz O. Conditioning of dendritic cells by pathogen-derived stimuli. *Immunobiol* 2001; **204**: 595-597.
 53. Reiner SL, Zheng S, Wang ZE, Stowring L, Locksley RM. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) inductions by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection. *J Exp Med* 1994; **179**: 447-456.
 54. Carrera L, Gazzinelli RT, Badolato R, Hieny S, Muller W, Kuhn R, Sacks DL. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. *J Exp Med* 1996; **183**: 515-526.
 55. Gorak PMA, Engwerda CR, Kaye PM. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 687-695.
 56. Flohé S, Bauer C, Flohé S, Moll H. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3800-3811.
 57. Moll H, Berberich C. Dendritic cell-based vaccination strategies: induction of protective immunity against leishmaniasis. *Immunobiol* 2001; **204**: 659-666.