

**Expresión de la cadena gamma del receptor
Fc y de los antígenos CD1 y LFA-1
en células de Langerhans:
Efecto del lipofosfoglicano de *Leishmania major***

***Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the expression
of the gamma chain of the Fc receptor, and the antigens CD1
and LFA-1 by Langerhans cells.**

Alicia Ponte-Sucre^{1*}, Anabel Scharner[&] y Heidrun Moll[§]

Palabras Clave: Células de Langerhans, auto vacunación, células presentadoras de antígenos,
inmunoterapia, *Leishmania sp.*

[§]Instituto de Biología Molecular de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Würzburg, Alemania, [&]Universidad Técnica de Munich, Alemania y ^{*}Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. ¹Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Apdo. 68256, Caracas 1062-A, Venezuela. Tel.: (0058)(212)(6627611). Fax: (0058)(212)(6934351). e-mail: aiponte@reacciun.ve

RESUMEN

Debido a la importancia demostrada de las células de Langerhans (LC) de la piel, que al ser expuestas a antígenos los fagocitan y adquieren la capacidad de presentarlos a los linfocitos T, en el presente trabajo exploramos si el lipofosfoglicano (LPG), el glicolípido más abundante en la superficie de *Leishmania* afecta la expresión de receptores de superficie asociados a la entrada de los parásitos a sus células hospederas. Los datos sugieren que la exposición de LC al LPG trae consecuencias que implican cambios en su función como célula presentadora de antígenos. La incubación de LC con LPG disminuye en pocas horas la expresión de la cadena gamma del receptor Fc y del antígeno CD1, sin afectar la expresión de las cadenas alfa y beta del receptor LFA-1. Estos cambios se producen también en LC expuestas a un medio condicionado por *Leishmania* lo cuál sugiere que los efectos pueden ser mediados por el dominio de carbohidratos del LPG, factor soluble liberado por el parásito al medio de cultivo al final de su fase de crecimiento. Los cambios en la expresión de las moléculas de superficie inducidos por la exposición de las LC al LPG, reflejan alteraciones en la capacidad fagocítica de la célula y sugieren una modificación en la capacidad de señalización de las LC desde la piel infectada. Estos resultados son extremadamente importantes a la luz del papel que las LC pudieran jugar en procesos de auto-vacunación e inmunoterapia.

ABSTRACT

Despite the immunological changes recognized to be produced during *Leishmania* infection and the central role played by Langerhans cells (LC), it is not known whether *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG), the most abundant glycolipid on the parasite surface, affects the maturation of Langerhans cells and their immune functions. Now, we provide evidence that exposure of LC to LPG has consequences for their maturation. Down-regulation of the gamma chain of the Fc receptor and antigens such as CD1 are observed after 4 h exposure of Langerhans cells to LPG. Many of the changes are also induced in LC incubated with *L. major*-conditioned medium, indicating that the observed effects may be mediated by soluble factors released by *L. major* into the culture, as it is the case for the carbohydrate moiety of LPG. Taken together, these results provide new insights into the immunoregulatory role of dendritic cells during *Leishmania* infection. The changes in surface molecule expression induced by the exposure of Langerhans cells to LPG might reflect changes in the maturation of the cells and in their signalling functions from the infected skin.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis, enfermedad que se presenta bajo distintas manifestaciones a nivel de piel, mucosas u órganos internos, engloba diversos síndromes, debidos a la variedad inmunogenética de los hospederos¹⁹ y a la diversidad de los parásitos que interactúan con las poblaciones humanas, los vectores y los reservorios^{13, 18}. La ausencia de medidas terapéuticas efectivas para su control, la toxicidad de las drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad, la existencia de quimio-resistencia, la ausencia de un control efectivo de los vectores y el costo de implementación de medidas de profilaxis y de diagnóstico preciso, han sido determinantes en el repunte de la leishmaniasis cutánea y muco cutánea en Sur-América; de allí que la comprensión de la fisiología del parásito y de su interacción con la(s) célula(s) hospedera(s) implicadas, constituye un reto fundamental a cumplir a fin de propiciar el diseño de estrategias que se traduzcan en un control efectivo de la enfermedad.

El agente etiológico de la leishmaniasis, el protozoario *Leishmania*, presenta durante su ciclo de vida dos formas fenotípicamente diferentes; el amastigote, inmóvil, de forma esférica y de vida intracelular en el fagolisosoma del macrófago y el promastigote, alargado, con un flagelo anterior y de vida extracelular en el tracto digestivo del insecto vector. El promastigote expresa sobre su superficie el lipofosfoglicano (LPG), glicolípido cuya densidad y características cambian a lo largo del ciclo de vida del parásito²³.

Los macrófagos y las células dendríticas (DC) de la piel constituyen las células hospederas por excelencia para *Leishmania*; así, la resolución de la infección ocurre debido a la muerte del parásito por los macrófagos infectados, mientras que las células de Langerhans (LC) son determinantes al inicio de la infección¹⁴. Esto se debe al rol protagónico adjudicado a las LC en el transporte de antígenos desde la piel a los nodos linfáticos¹⁶. Antes de ser expuestas a un agente infeccioso las LC presentan alta capacidad fagocítica y una función presentadora de antígenos muy baja, pero luego de ser expuestas al agente infeccioso se activan, pierden su capacidad fagocítica y adquieren un fenotipo característico de DC, i.e., aumenta su capacidad de expresar y presentar los antígenos transportados desde la periferia a las poblaciones de linfocitos T respondedores¹⁶.

Aun hoy en día no se sabe si el LPG modula el fenotipo de las LC y por ende su función como célula presentadora de antígenos. Por ejemplo, no se ha establecido si al igual que en leucocitos²², miembros de la familia de las integrinas como el C3 y el LFA-1 median la

interacción entre el LPG y las LC, o si la entrada del parásito a las LC está mediada por el receptor Fc, al igual que en linfocitos y macrófagos⁸. Debido a ello y a la importancia fundamental que las células dendríticas están cobrando como agentes de auto-vacunación e inmunoterapia⁴, en el presente trabajo hemos estudiado la acción del LPG purificado de *Leishmania (L.) major* sobre propiedades funcionales de las LC. Nuestro énfasis se ha volcado hacia el estudio de la expresión de receptores de superficie involucrados en la entrada del parásito a su célula hospedera, como la cadena gamma del receptor Fc (Fc γ), las cadenas alfa y beta del receptor LFA-1 (LFA-1 α y LFA-1 β) y el receptor para residuos hidrofóbicos, CD1. Los resultados encontrados sugieren que la exposición de LC de ratones BALB/c al LPG disminuye la expresión de las moléculas de superficie Fc γ y CD1. Estos cambios se evidencian adicionalmente cuando las LC se estimulan con un medio condicionado por *Leishmania*, lo cual sugiere que los efectos encontrados deben ser mediados por factores solubles liberados por el parásito al medio de cultivo, como el dominio de carbohidratos del LPG. Estos hallazgos enfatizan el papel fundamental de las LC en el desarrollo de estrategias de autovacunación e inmunoterapia en contra de enfermedades parasitarias como la leishmaniasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Crecimiento y mantenimiento de los parásitos

Los promastigotes de *L. major* (MHOM/IL/81/FE/BNI) se cultivaron en medio RPMI GIBCO a 26 °C, suplementado con Glutamina 2 mM, suero fetal bovino al 10 %, Hepes 10 mM pH 7,5, gentamicina 160 $\mu\text{g/ml}$, NaHCO_3^- 7,5% y 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M. Al llegar a la fase estacionaria de crecimiento se colectaron los parásitos, se lavaron 2 veces con PBS y se guardaron a -70°C hasta su procesamiento.

Purificación del lipofosfoglicano (LPG)

La purificación del LPG se realizó siguiendo el protocolo de McConville y col.¹⁵. El pellet de un pool de 10^{10} parásitos se resuspendió en 3,75 ml de cloroformo/metanol/agua (4:8:3). Esta suspensión se sonicó dos horas por períodos de 10 min con pausas de 5 min, a 4 °C, se centrifugó la suspensión a 1500 x g, 20 min, a 4°C, se repitió la extracción lipídica y se centrifugó de nuevo la suspensión. El pellet obtenido se resuspendió en 10 ml de agua saturada con butanol y se realizó una extracción butanólica con agitación, a 4°C, por 18 h. Seguidamente la suspensión se centrifugó a 10000 x g, 30 min y se desecó durante toda la noche. El residuo se resuspendió en 5 ml de acetato de amonio 0,1 M, pH 7,2, 5% propanol y se fraccionó en una columna hidrofóbica

de octyl-sepharosa, utilizando como fase móvil un gradiente de propanol de 15% a 60 % preparado en acetato de sodio 0,1 M, pH 7,2. Se colectaron fracciones de 3 ml a las cuales se les evaluó refractométricamente la concentración de 1-propanol, el contenido de proteínas y el contenido de carbohidratos^{3, 1}. Las muestras que contenían carbohidratos se reunieron y desecaron, se resuspendieron en agua desionizada a una concentración de 1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ y se guardaron a -20°C hasta su uso.

Obtención del medio condicionado con Leishmania (LCM)

El LCM se preparó según el método de Kierszenbaum & col.¹⁰. Suspensiones de *L. major* en fase estacionaria de crecimiento se ajustaron a una densidad de 2×10^7 cel ml^{-1} y se incubaron durante 24 h a 37°C , 5 % CO_2 . La suspensión de células se centrifugó a $2500 \times g$, 20 min, se pasó el sobrenadante a través de un filtro estéril de $0.22 \mu\text{m}$ a fin de eliminar todos los restos celulares y se almacenó a -20°C hasta su uso. El LCM preparado de esta manera se consideró al 100 % y se diluyó para los experimentos posteriores según la necesidad.

Aislamiento de las células de Langerhans (LC)

Las suspensiones de LC se prepararon a partir de piel de oreja de ratón BALB/c tripsinizada¹². Las mitades ventrales gruesas se incubaron a 37°C con 10 ml de tripsina 1 % en PBS, 90 min, mientras que las mitades dorsales delgadas se incubaron a 37°C con 10 ml de tripsina 0.6 % en PBS, 45min. Estas preparaciones contienen 3-5 % de LC absolutamente puras que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-clase II)⁹.

Diseño experimental

LC, 3×10^6 por pozo se incubaron toda la noche a 37°C , 5 % CO_2 en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de $100 \text{ ng } \text{ml}^{-1}$ LPS (LPS), o $3 \mu\text{g } \text{ml}^{-1}$ LPG (LPG) o 25 % LCM (LCM). A las 4 h y al día siguiente se recogieron cuidadosamente las células no adheridas y se utilizaron para evaluar la expresión de los marcadores de superficie.

Análisis de fluorescencia por citometría

Las LC recogidas se incubaron 30 min a 4°C con un anticuerpo anti ratón-I-A^d-biotinilado y rata-anti CD86 (B7-2) rata-anti CD1d, rata-anti CD16/CD32 (receptor $\text{Fc}\gamma\text{III/II}$), rata-anti LFA-1 α , rata-anti LFA-1 β y los isotipos respectivos a una dilución 1:100 en PBS, 2 % suero fetal de bovino. Seguidamente se tiñeron con streptavidina-FITC y asno-anti-rata-PE a una dilución 1:100 en PBS, 2 % suero fetal de bovino. Las células que expresaron el MHC clase II se analizaron para

la expresión del resto de los marcadores de superficie luego de establecer una ventana de adquisición en un sorteador de células por fluorescencia de Becton Dickson.

RESULTADOS

Nuestro interés fundamental en el presente trabajo ha sido estudiar la modulación de la expresión de receptores de superficie de LC involucrados en la entrada de *Leishmania* a sus células hospederas. Para ello escogimos evaluar la cinética de la expresión de la cadena gamma del receptor Fc, de las cadenas alfa y beta del receptor LFA-1 y del receptor CD1.

La estimulación de LC por 4 h con LPS (Fig. 1), no afecta la expresión de Fc γ , la cuál disminuye significativamente en células incubadas con LCM y LPG. La exposición de las LC toda la noche a LPS se traduce en una leve disminución de la expresión del Fc γ , y en la persistencia en el tiempo de la inhibición de la expresión evidenciada a las 4 h en células incubadas con LCM. Este efecto revierte a los niveles encontrados en células no estimuladas en LC incubadas toda la noche con LPG.

Por su parte (ver Fig. 1), la expresión del receptor CD1 en células estimuladas 4 h con LPS disminuye levemente y dramáticamente en células estimuladas 4 h con LCM o LPG; este efecto revierte a los valores encontrados en la expresión de CD1 en células no estimuladas, cuando las LC son incubadas toda la noche con LPS o LPG; la dramática inhibición ejercida por LCM sobre la expresión de CD1 se mantiene en células expuestas a este agente toda la noche. Estos datos indican que moléculas de superficie de los parásitos como el LPG, interactúan con receptores específicos de LC y modulan su expresión, y sugieren que cuando las LC son estimuladas con factores solubles liberados por el parásito al medio de cultivo, como el dominio de carbohidratos del LPG presente en el LCM, la modulación de la expresión se mantiene al menos por 24 h.

Al estudiar la expresión de LFA-1 α y LFA-1 β de LC (figura 2) encontramos que su expresión no se modifica significativamente en LC incubadas toda la noche en presencia de LPS, LCM o LPG, datos que sugieren que el receptor LFA-1 no parece interactuar con las moléculas de superficie del parásito como el LPG o aquellas liberadas al medio de incubación como el dominio de carbohidratos del LPG.

Finalmente, y a fin de explorar si el LPG afecta propiedades determinantes de la función clásica presentadora de antígenos de las LC, evaluamos la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad MHC clase II y de la molécula co-estimuladora CD86 en células expuestas toda la noche a LPS, LPG y LCM. En la figura 3 puede observarse cómo la estimulación de las

LC con LPS, aumenta la expresión del MHC clase II a niveles significativamente mayores que los encontrados en células incubadas toda la noche sin estimulación. Este hecho no se evidencia en las células incubadas con LPG y LCM donde la expresión del MHC clase II se mantiene similar al encontrado en células no estimuladas. La expresión del CD86 se mantienen dentro del mismo rango en todos los casos. Estos datos sugieren que la exposición de las LC a factores superficiales o solubles del parásito no afecta su capacidad de diferenciarse a célula presentadora de antígenos.

DISCUSIÓN

La densidad de LPG en la membrana de *Leishmania* aumenta durante la metaciclologénesis⁹. Debido a sus propiedades inmunogénicas se piensa que juega un papel esencial en la interacción del parásito y su célula hospedera⁷. Sin embargo, aunque el rol central jugado por las LC durante la infección con *Leishmania* se conoce ampliamente, no se sabe si el LPG afecta sus capacidades fagocíticas y su función presentadora de antígenos y por ende su capacidad de maduración y migración a los nódulos linfáticos. Estos datos pudieran resultar de extrema importancia debido al hecho de que las LC al ser pulsadas *in vivo* con antígenos específicos podrían actuar como agentes eficientes de auto-vacunación e inmunoterapia⁴.

En el trabajo aquí referido presentamos evidencias que sugieren que la exposición de LC de ratones BALB/c al LPG tiene consecuencias definitivas en la expresión de moléculas de superficie asociadas a la entrada de los parásitos a sus células hospederas. Luego de una incubación de 4 h con LPG 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ocurre una disminución en la expresión de moléculas de superficie como CD1 y Fc γ , ambas implicadas en la interacción del parásito con su célula hospedera^{6, 22}. Más sorprendente aún, este efecto se evidencia y se mantiene en el tiempo en células estimuladas con LCM, aunque revierte en células incubadas por 24 h en presencia de LPG. Estos datos sugieren que el LPG es fundamental para la consecución del efecto, pero que factores solubles excretados al medio por el parásito, como el dominio de carbohidratos de LPG²⁰, resultan más efectivos en lograr el mismo. El hecho de que todos estos cambios ocurran sin modificaciones apreciables en la expresión del MHC-clase II ni de la molécula co-estimuladora CD86 sugieren que la exposición de las LC al LPG no modifica la cinética de expresión de las moléculas de superficie cuya función está directamente vinculada a la presentación de antígenos y la co-estimulación de las células T.

En *Leishmania mexicana* se ha demostrado que la interacción entre el LPG y la célula no ocurre a través de receptores de la familia del LFA²² pero que células que no expresan el receptor Fc presentan resistencia a la infección¹¹. El receptor Fc γ es determinante en la entrada de amastigotes de *Leishmania major* a macrófagos⁶, sin embargo, como la estructura del LPG de los amastigotes no está claramente definida, no se conoce como ocurre la interacción entre esta molécula y el Fc γ . Esta molécula juega un papel fundamental en la incorporación a la célula de complejos inmunológicos; sin embargo, su desaparición de la superficie celular hacia los complejos inmunológicos intracelulares no inhibe completamente la entrada de los parásitos⁶. Contrariamente, podría suponerse que al adsorberse sobre la superficie celular de forma selectiva, pudieran propiciar el entrecruzamiento de los receptores, evento mandatorio para la activación celular.

Por otra parte, las moléculas CD1 que se expresan en la superficie de las células profesionales presentadoras de antígenos, son homólogas a las moléculas de los complejos de histocompatibilidad tipo I y II y en células T cumplen funciones presentadoras de antígenos bacterianos peptídicos y no peptídicos²⁴. Dentro de este contexto, la exposición *in vitro* de células dendríticas de ganglio linfático a complejos antígeno-anticuerpo inhibe simultáneamente y en breve tiempo la expresión de ambas moléculas, CD1 y Fc γ ²; estos hechos sugieren que la diferenciación de las LC a células presentadoras de antígenos podría involucrar la desaparición de la superficie celular de aquellos receptores directamente involucrados en la entrada del parásito a la célula².

Ratones BALB/c inyectados con un pool de LC pulsadas con antígenos totales de parásito -entre los cuáles debe estar el LPG- muestran un aumento de resistencia a ser infectados con *L. major*. El desarrollo de resistencia ocurre en forma paralela a una disminución en la parasitemia y a un aumento en la expresión de las citoquinas vinculadas a una respuesta TH1⁵. Los resultados aquí mostrados sugieren que la exposición de LC al LPG, aunque modifica la expresión de moléculas vinculadas a la entrada de los parásitos a la célula, no afecta su capacidad de presentar antígenos y por tanto su capacidad de señalar el inicio de la infección. Resultados mostrados por nosotros en trabajos anteriores sugieren además que la exposición de las LC al LPG disminuye la expresión de marcadores de superficie vinculados a su capacidad de migrar desde la piel hacia los ganglios²¹. En su conjunto estos datos sugieren entonces, tal y como ha sido expuesto por Moll & col.¹⁷ que las LC infectadas que se quedan en la piel presentan los antígenos

del parásito a células T efectoras que infiltran la lesión y de esta manera contribuyen a la regulación y el mantenimiento de la respuesta inmune local. Estos datos resultan en extremo interesantes ya que otorgan alternativas acerca del papel inmunoregulatorio de las células dendríticas durante la infección con *Leishmania* y su papel como agentes, posibles de ser usados en protocolos de auto-vacunación e inmunoterapéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el CDCH-Venezuela PI 09-33 (4356-99 y 4581-2000) y Ministerio de Investigación y Desarrollo, Alemania, N° KI8906/0. La Dra. Alicia Ponte-Sucre gozó de una beca de la Fundación Humboldt, Alemania y de una beca sabática del CDCH-UCV para visitar el laboratorio de la Dra. Heidrun Moll.

LEYENDAS DE FIGURAS

Figura 1. Cinética de la expresión de CD1 y Fc γ . LC, 3×10^6 por pozo se incubaron en ausencia de estimulantes (línea gruesa negra), o en presencia de 100 ng ml^{-1} LPS (LPS), o $3 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ LPG (LPG) o 25 % LCM (LCM) (línea gruesa gris). A las 4 h y al día siguiente (on) se recogieron cuidadosamente las células no adheridas y se utilizaron para evaluar la expresión de los marcadores de superficie escogidos. La línea delgada representa la expresión del marcador en células frescas. El valor de fluorescencia del isotipo se mantuvo en 30-50 unidades arbitrarias.

Figura 2. Expresión de las cadenas α y β del receptor LFA-1. LC, 3×10^6 por pozo se incubaron en ausencia de estimulantes (línea gruesa negra), o en presencia de 100 ng ml^{-1} LPS (LPS), o $3 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ LPG (LPG) o 25 % LCM (LCM) (línea gruesa gris). Al día siguiente se recogieron cuidadosamente las células no adheridas y se utilizaron para evaluar la expresión de los marcadores de superficie escogidos. La línea delgada representa la expresión del marcador en células frescas. El valor de fluorescencia del isotipo se mantuvo en 30-50 unidades arbitrarias.

Figura 3. Expresión de MHC-clase II y B7-2. LC, 3×10^6 por pozo se incubaron en ausencia de estimulantes o en presencia de 100 ng ml^{-1} LPS (LPS), o $3 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ LPG (LPG) o 25 % LCM (LCM). Al día siguiente se recogieron cuidadosamente las células no adheridas y se utilizaron para evaluar la expresión de los marcadores de superficie escogidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
2. Coughlan, S.N., Harkiss, G.D. & Hopkins, J. 1996. Fc gamma receptor on sheep afferent lymph dendritic cells and rapid modulation of cell surface phenotype following Fc gamma receptor engagement *in vitro* and *in vivo*. *Scand. J. Immunol.* 43:31-38.
3. Dubois, A., Gillies, H., Hamilton, N., Rebers, F. & Smith, D. 1956. Estimation of carbohydrate concentration in biological samples. *Anal. Biochem.* 28:50-53.

4. Faló, L.D. 1999. Targeting the skin for genetic immunization. *Proc. Assoc. Am. Physicians.* 111:211-219.
5. Flohe, S.B., Bauer, C., Flohe, S. & Moll, H. 1998. Antigen pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 28:3800-3811.
6. Guy, R.A. & Belosevic, M. 1993. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages *Infect. Immun.* 61:1553-1568.
7. Handman, E., Schnur, L.F., Spithill, T.W. & Mitchell, G.F. 1986. Passive transfer of *Leishmania* lipopolysaccharide confers parasite survival in macrophages. *J. Immunol.* 137:608-3613.
8. Heinzl, F.P., Sadick, M.D. & Locksley, R.M. 1988. *Leishmania major*: analysis of lymphocyte and macrophage cellular phenotypes during infection of susceptible and resistant mice. *Exp. Parasitol.* 65: 258-268.
9. Kampgen, E., Koch, N., Koch, F., Stoger, P., Heufler, C., Schuler, G. & Romani, N. 1991. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:3014-3018.
10. Kierszenbaum, F., Majumder, S., Paredes, P., Tanner, M.K. & Szein, M.B. 1998. The *Trypanosoma cruzi* immunosuppressive factor (TIF) targets a lymphocyte activation event subsequent to increased intracellular calcium ion concentration and translocation of protein kinase C but previous to cyclin D2 and cdk4 mRNA accumulation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 92:133-145.
11. Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J. & McMahon-Pratt, D. 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 191:1063-1068.
12. Koch, F., Heufler, C., Kampgen, E., Schneeweiss, D., Bock, G. & Schuler, G. 1990. Tumor necrosis factor alpha maintains the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrast to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, without inducing their functional maturation. *J. Exp. Med.* 171:159-1771.

13. Lainson, R. & Shaw, J.J. 1972. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br. Med. Bull.* 28:44-48.
14. Liew, F. Y., O'Donnel, C. A. 1993. Immunology of leishmaniasis *Adv. Parasitol.* 32:1672-1679.
15. McConville, M.J., Bacic, A., Mitchell, G.F. & Handman, E. 1987. Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:8941-8945.
16. Moll, H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today.* 14: 383-390.
17. Moll, H., Ritter, U., Flohe, S., Erb, K., Bauer, C., Blank, C. 1996. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 184:163-168.
18. Olliaro, P.L. & Bryceson, A. 1993. Practical progress and new drugs for changing patterns of Leishmaniasis. *Parasitol. Today* 9:323-328.
19. Pérez, H., Labrador, F., Torrealba, J. W. 1979. Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. *Internat. J. Parasitol.* 9: 27-32.
20. Peters, C., Stierhof, Y.D., Ilg, T. 1997. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect. Immun.* 65:783-786.
21. Ponte-Sucre, A.I., Scharner, A., & Moll, H. 2001. Modulación de la expresión de moléculas co-estimuladoras y de adhesión de las células de Langerhans por el lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major*. *Revista de la Facultad de Medicina* (enviado).
22. Talamas-Rohana, P., Wright, S.D., Lennartz, M.R. & Russell, D.G. 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the C3R, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J. Immunol.* 144: 4817-4824.
23. Turco, J. & Descoteaux A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:65-101.
24. Ulanova, M., Tarkowski, A., Hahn, Zoric, M., Hanson, L.A. 1999. Participation of CD1 molecules in the presentation of bacterial protein antigens in humans. *Scand. J. Immunol.* 50:387-393.





