

REVISIÓN DE TEMA

Respuesta inmune en infecciones humanas por *Leishmania* spp.

SONIA DEL PILAR AGUDELO, SARA M. ROBLEDO

LA PRESENTE REVISIÓN TIENE COMO OBJETIVO resumir la información más relevante acerca de la respuesta inmune que se desencadena durante la leishmaniosis, una enfermedad de gran importancia desde el punto de vista epidemiológico dado que es endémica en Colombia y otros países. Aunque la respuesta inmune en la leishmaniosis es un tema que se ha estudiado ampliamente en las infecciones por especies de *Leishmania* del Viejo Mundo, particularmente *Leishmania major* y *Leishmania donovani* y en el modelo murino, la presente revisión hace énfasis en la leishmaniosis humana. Algunos hallazgos importantes en el modelo murino también se mencionan. La información contenida en la revisión, en su mayoría, proviene de publicaciones derivadas de investigaciones, las cuales se seleccionaron con base en la calidad del trabajo realizado y en los aportes de sus resultados en el avance del conocimiento sobre las infecciones en humanos.

La síntesis de la información seleccionada nos permite concluir que la infección por *Leishmania* es un proceso complejo y coordinado que incluye la adherencia y entrada del parásito a la célula hospedera y su posterior supervivencia en el interior de la célula infectada. Los eventos que median el proceso de infección influyen en su

.....
SONIA DEL PILAR AGUDELO LÓPEZ, Bacterióloga, Ph.D. Profesora, Departamento de Microbiología y Parasitología. SARA MARÍA ROBLEDO RESTREPO, Bacterióloga, M.Sc,Ph.D.Profesora, Centro de Investigaciones Médicas; ambas de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

resultado en términos de eliminación del parásito o desarrollo de la enfermedad, a través de la inducción o no de una respuesta inmune específica efectiva que lleve a la activación de la célula hospedera y la muerte y destrucción del parásito.

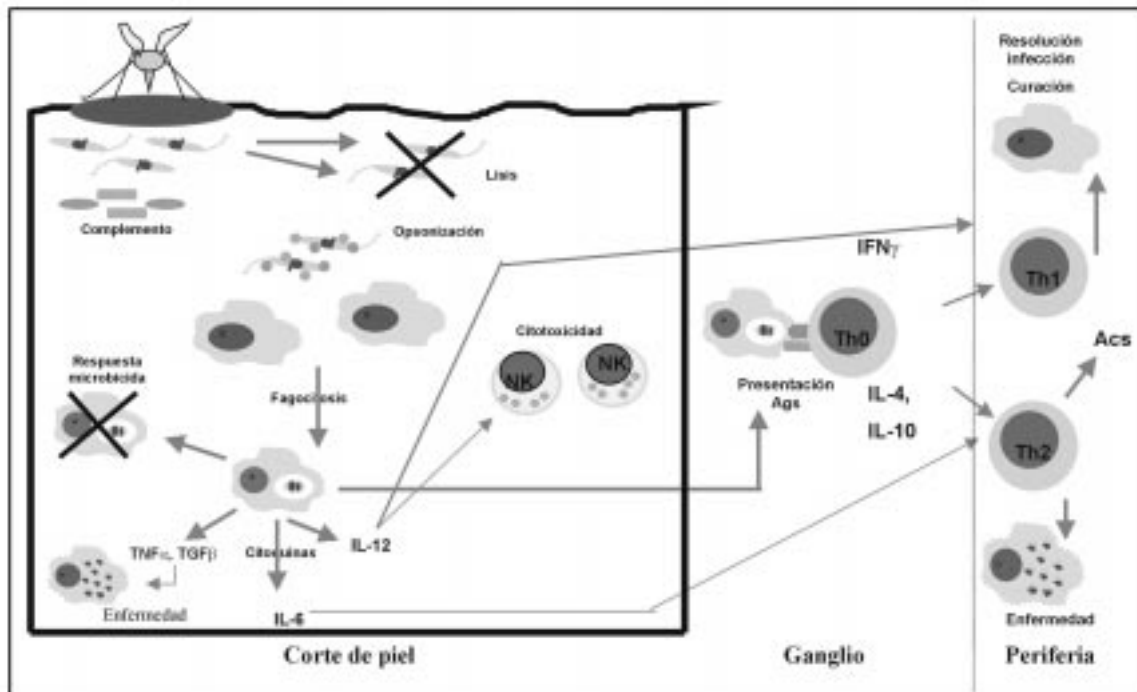
INTRODUCCIÓN

La infección por *Leishmania* generalmente induce una respuesta inmune muy compleja que varía dependiendo de diferentes factores: según la forma clínica de la enfermedad, la especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso y la cronicidad de la enfermedad, se genera un espectro de respuestas inmunes que incluyen desde mecanismos de inmunidad inespecífica (por ejemplo: reacciones

inflamatorias) hasta mecanismos de inmunidad específica mediados por células o por anticuerpos. Sin embargo, los diferentes mecanismos de respuesta inmune implicados durante la infección por *Leishmania* no siempre aparecen ni se desarrollan simultáneamente. La figura N° 1 ilustra en forma resumida la interacción de los diferentes componentes del sistema inmune que participan en la resolución de la infección por *Leishmania* o en el desarrollo de la enfermedad.

En términos generales se ha observado una fuerte respuesta mediada por células T para las formas cutánea y mucosa de la enfermedad y ausencia de ella en las formas cutánea difusa y visceral. La respuesta de células T se ha evidenciado por reacciones de hipersensibilidad retardada y proliferación

FIGURA N° 1



Diseno: Sara María Robledo R.

Mecanismos de respuesta inmune a *Leishmania* sp. El papel del complemento, la respuesta inflamatoria local y los macrófagos como células presentadoras de antígeno en la resolución de la infección o el desarrollo de la enfermedad.

de linfocitos in vitro frente a antígenos de Leishmania. Al contrario, los títulos de anticuerpos contra antígenos específicos de Leishmania, principalmente de tipo IgG, por lo general son bajos en el suero de pacientes con leishmaniosis cutánea y mucosa mientras que son moderados o altos en pacientes con leishmaniosis cutánea difusa y visceral. La producción de IgE específica se asocia con enfermedad cutánea crónica y mucosa y como marcador de enfermedad activa en leishmaniosis visceral, mientras que la producción de IgA se asocia con enfermedad mucosa. Tanto la respuesta inmune mediada por células T como los títulos de anticuerpos son mayores en individuos infectados con *L. (V) braziliensis* que en individuos infectados con *L. (V) panamensis*, independientemente del tiempo de duración de la lesión y la forma clínica de la enfermedad. Sin embargo, los pacientes con lesiones cutáneas crónicas o mucosas presentan mayores índices de respuesta inmune humoral o celular a antígenos de Leishmania que los índices de respuesta inmune mostrados por los pacientes con lesiones de corta duración (1-15).

La respuesta inflamatoria en la infección por Leishmania

El trauma ocasionado por la picadura del vector induce en el hospedero una respuesta inflamatoria que involucra la migración de diferentes células, principalmente macrófagos y linfocitos, hacia el sitio del trauma con el fin de reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Los dos tipos de células presentadoras de antígeno localizadas en la epidermis, las células de Langerhans y los queratinocitos (16,17), participan en el proceso inflamatorio al expresar moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase II y moléculas de adhesión que son necesarias para la migración y retención de las células inflamatorias (18).

En el sitio de la infección los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación, incluyendo el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF\alpha$), las interleuquinas (ILs) IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas C3 del Complemento (19). El $TNF\alpha$ y la IL-1 actúan como pirógenos endógenos y activan el endotelio vascular permitiendo la extravasación de leucocitos a través de la unidad perivascular dérmica y la subsecuente migración de estas células hacia el endotelio (20,21). La IL-6 participa en la respuesta de fase aguda y en el desarrollo de una respuesta inmune específica mediada por células β (22,23), mientras que la IL-12 constituye un potente activador de células asesinas naturales y estimula la diferenciación de las células T ayudadoras a células Th1 (24,25).

El papel del complemento en los procesos de lisis y fagocitosis de Leishmania

Una gran proporción de los promastigotes inoculados por el vector es destruida por el complemento extracelular con lo que se reduce la probabilidad de establecer una infección inicial (26). Así mismo, el complemento extracelular lisa los amastigotes liberados por macrófagos infectados (27) y en esta forma se limita la invasión de nuevas células vecinas y se evita la perpetuación de la infección y el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que los promastigotes de *L. (V) panamensis* y *L. (V) braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento y los promastigotes de varias especies resisten a la lisis por complemento (28, 29). Por otro lado, los amastigotes de las diferentes especies de Leishmania fijan en su membrana proteínas del complemento tales como C3b (30), favoreciendo así la entrada del parásito a la célula hospedera a través de los receptores para complemento (CR1 y CR3) presentes en la membrana de dichas células (31-33). Al

mismo tiempo, la entrada del parásito a través de los receptores CR favorece su supervivencia dentro del macrófago, ya que la ocupación de estos receptores no induce una respuesta oxidativa en los macrófagos (32,34). Es así como *Leishmania* no sólo evita la activación del complejo lítico del complemento sino que utiliza la proteína C3 para invadir en forma silenciosa al macrófago (35).

La respuesta humoral en infecciones por *Leishmania*

Aunque algunos antígenos de *Leishmania*, principalmente del tipo gp63, LPG y KMP-11 inducen la producción de anticuerpos específicos, principalmente de tipo IgM e IgG; las evidencias clínicas excluyen un papel protector para el humano (3,36). Los pacientes con cualquier forma clínica de leishmaniosis desarrollan una respuesta de anticuerpos desde una etapa temprana de la infección, que se mantiene durante el curso de la enfermedad y desaparece únicamente después de la eliminación de la mayoría de los parásitos (6).

Se ha observado que la producción de anticuerpos varía dependiendo de la forma clínica de la enfermedad, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección (6,8). *In vitro*, dichos anticuerpos tienen la capacidad de lisar promastigotes en presencia de proteínas del complemento (26,37), favorecer la fagocitosis de parásitos opsonizados por los mismos anticuerpos (38) y modular los antígenos de membrana en promastigotes y amastigotes (39).

Las formas cutánea y mucosa, que son infecciones intracelulares crónicas pueden producir en la fase temprana de la enfermedad una importante respuesta de inmunoglobulinas de tipo IgM y luego desarrollar una respuesta predominante de tipo IgG (7). Los niveles de anticuerpos específicos de tipo IgA e IgE son bajos (11,40). En la leishmaniosis visceral,

la gran cantidad de parásitos presentes en el hígado y en el bazo, dos órganos muy importantes en la iniciación y maduración de la respuesta de anticuerpos, inducen la aparición de una respuesta policlonal (41,42). La producción de anticuerpos es muy alta en esta forma clínica de leishmaniosis, lo que da un incremento de inmunoglobulinas inespecíficas, incluyendo autoanticuerpos (43), aunque también se han detectado altos títulos de anticuerpos específicos (44,45). En términos generales hay una fuerte respuesta humoral en las leishmaniosis visceral y cutánea difusa, con altos títulos de anticuerpos principalmente de la clase IgG (41,42), mientras que las leishmaniosis cutánea y mucosa cursan con bajos títulos de anticuerpos (7-9).

Recientemente se ha demostrado una gran diferencia entre las subclases de anticuerpos específicos de *Leishmania* en las distintas formas clínicas de la leishmaniosis (10). Es así como en la leishmaniosis cutánea predominan las subclases de inmunoglobulinas IgG1 y IgG3, en la leishmaniosis mucosa la subclase IgG3 (46), en la leishmaniosis cutánea difusa la subclase IgG4 y en la leishmaniosis visceral los anticuerpos predominantes son IgG1 (47). Esta producción selectiva de subclases de anticuerpos parece estar relacionada con las citoquinas secretadas por cada tipo de células (3). Existen evidencias sobre la relación entre la respuesta Th1 o Th2 y los isotipos y las subclases predominantes de las inmunoglobulinas específicas (48): las Th1 son inductoras de la producción de IgG2a, mientras que las Th2 inducen la producción de IgE y IgG1 (49,50).

La inmunidad mediada por células en infecciones por *Leishmania*

A diferencia de la respuesta inmune de tipo humoral, la respuesta mediada por células cumple un papel

protector contra las infecciones por *Leishmania*. La respuesta específica de células T es la que se asocia con el control de la infección y la resolución de las lesiones (51,52). Al parecer, las células que permanecen infectadas son las responsables de inducir la respuesta inmune específica puesto que ellas posiblemente presentan los antígenos de *Leishmania* a los linfocitos T (53). El linfocito T que interactúa con los antígenos presentes en la membrana de la célula infectada prolifera y produce IFN γ e IL-2. Estas citoquinas y otras producidas por las células infectadas tales como TNF α y el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/Macrófagos (GM-CSF) activan la célula infectada para que sea ella la que destruya y elimine los amastigotes que tiene en su interior (54,55).

Papel de las células T CD4+ en infección por *Leishmania*

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y dependiendo del tipo de célula presentadora de antígeno, de los niveles de citoquinas endógenas y de la naturaleza del antígeno reconocido, las células T ayudadoras CD4+ proliferan y secretan un patrón de citoquinas definidas que las diferencia en subpoblaciones de células Th1 y Th2, cada una de ellas con funciones efectoras diferentes (56-59).

Actualmente se desconocen los factores exactos que dirigen o determinan la expansión de una u otra subpoblación de células Th. Sin embargo, se ha observado que cuando existe una gran cantidad de antígeno, cuando éste es soluble, o cuando el linfocito B se comporta como célula presentadora de antígeno, la respuesta es de tipo Th2. Al contrario, la respuesta es de tipo Th1 cuando hay presencia de poco antígeno o la célula presentadora de antígeno es el macrófago o las células dendríticas (56,60-62). De igual manera, el patrón de citoquinas

presente en el sitio de la infección juega un papel decisivo en el desarrollo de células Th1/Th2 (63).

Las citoquinas de tipo Th1 participan en la regulación del granuloma y en la activación de macrófagos inflamatorios para aumentar su capacidad microbicida, mientras las citoquinas de tipo Th2 regulan la producción de anticuerpos por los linfocitos B y el desarrollo de una respuesta inmune de tipo humoral (64,65). En la leishmaniosis, la eliminación del parásito depende de la activación de la célula hospedera; por lo tanto, la producción de citoquinas activadoras de macrófagos se correlaciona con curación, mientras que la de citoquinas que desactivan el macrófago se correlaciona con enfermedad (66). En esta forma, el mecanismo por el cual se activan las células Th1 o Th2 es importante para dirigir la respuesta inmune hacia protección y curación o susceptibilidad y patogénesis.

Los linfocitos Th1 son productores de IL-2, IFN γ y Linfotoxina (LT), mientras que los Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (67,68). Sin embargo, a diferencia del modelo murino, la producción de IL-2, IL-6, IL-10 e IL-13 en el humano no está restringida a una subpoblación de células T (69).

Los estudios realizados en humanos para tratar de correlacionar los patrones de citoquinas producidas por células T y las formas clínicas de la leishmaniosis han mostrado un perfil mezclado de citoquinas. En los pacientes con leishmaniosis cutánea difusa hay un predominio de citoquinas tipo Th2, ya que no hay producción de IFN γ , ni IL-2, (70) pero sí presentan significativos niveles de IL-5 y TNF α (71,72). Sin embargo, el TNF α no parece contribuir a la curación de las lesiones en ausencia de una respuesta funcional de linfocitos T.

La leishmaniosis cutánea se caracteriza por un patrón de citoquinas tipo Th1 con producción de IL-2

e IFN γ en niveles significativos (15,56,73). La producción de IL-5 es mucho más baja que en los pacientes con leishmaniosis cutánea difusa y el TNF α se produce en buena cantidad, lo que sugiere su participación en la curación de las lesiones (71,74).

En la leishmaniosis mucosa se ha sugerido que el patrón de citoquinas es una mezcla de tipo Th1 y Th2; sin embargo, cuando se producen ambos patrones de citoquinas, la respuesta Th2 puede predominar sobre la Th1 y la enfermedad puede mantenerse en un estado crónico. Se ha observado que en esta forma clínica de la leishmaniosis se producen buenos niveles séricos de IL-2, IFN γ , TNF α e IL-5 (70,71,74).

La respuesta inmunológica mediada por células en la leishmaniosis visceral se caracteriza por una marcada disminución en la respuesta linfoproliferativa y por ausencia de producción de IL-2 e IFN γ (5,15,75). Se ha observado además, una moderada producción de IL-4 (76,77) la cual desaparece rápidamente, y altos niveles de IL-10 (73,78,79).

Un estudio reciente demuestra que existe una relación directa entre la producción de IFN γ , TNF α e IL-10 en individuos con infección asintomática y ausencia de dicha relación en individuos con antecedentes de leishmaniosis recurrente. Estos hallazgos sugieren que la relación observada en la producción de citoquinas permitiría distinguir una respuesta inmune efectiva o no, más que la misma presencia o ausencia de una citoquina o citoquinas en particular.

Papel de las células T CD8+ en infección por Leishmania

Tradicionalmente los linfocitos T CD8+ con función citotóxica se han asociado con resistencia a infec-

ciones virales. Sin embargo, actualmente existen evidencias que sugieren un papel importante en la respuesta inmune a *Leishmania* debido directamente a mecanismos citotóxicos o a través de la producción de IFN γ y TNF α , que son citoquinas activadoras de macrófagos y que por lo tanto favorecen la muerte del parásito en el interior de la célula (80-82). Así mismo, los macrófagos, los linfocitos β y otras células presentadoras de antígenos producen IL-12 la cual tiene mucho que ver con la regulación de la respuesta Th1/Th2. La IL-12 induce la producción de IFN γ por parte de los linfocitos β y células NK al tiempo que aumenta la actividad citotóxica de estas células y de los linfocitos T CD8+, induciendo una respuesta de tipo Th1 (83,84).

Las células asesinas naturales (NK)

El papel de las células NK en la respuesta inmune a infección por *Leishmania* se ha estudiado muy poco. Se ha observado que los ratones C57BL/6bg/bg que son deficientes en actividad de células NK son menos capaces de eliminar la infección por *L. (L.) donovani* que los ratones con fenotipo normal. Sin embargo, no se han observado diferencias en relación con el control de la infección por *L. (L.) major*. Estos hallazgos sugieren un compromiso de las células NK en la respuesta inmune sólo a leishmaniosis visceral (85). Estudios en humanos han demostrado que las biopsias de piel de pacientes con leishmaniosis cutánea presentan un alto porcentaje de las células con el fenotipo de las NK (86). Sin embargo, aún se desconoce su función.

Compromiso de los linfocitos T d/g en infección por Leishmania

Estudios realizados en pacientes infectados con *L. (V.) braziliensis* han demostrado que aproximadamente el 20% de las células T CD3+ de la piel son

células TcR d/g (87), mientras que sólo el 5% de estas últimas están presentes en la sangre periférica de los mismos pacientes o en pacientes con lesiones mucosas. Así mismo, se han encontrado células T d/g activadas en sangre periférica de pacientes con leishmaniosis visceral, productoras de citoquinas involucradas en el crecimiento, diferenciación y activación de células B (88). Sin embargo, no se ha definido el papel de las células T d/g en la leishmaniosis cutánea y visceral.

CONCLUSIONES

ES CLARO QUE EL REPERTORIO DE CÉLULAS y moléculas involucradas en la respuesta inmune a *Leishmania* constituye un componente importante en el resultado de la infección. El conocimiento de los componentes que determinan la inducción de una respuesta inmune asociada con protección nos brinda la oportunidad de disponer de posibles blancos que permitirán el diseño de vacunas y estrategias terapéuticas que conduzcan al control de la infección y por lo tanto se impida el desarrollo de la enfermedad.

SUMMARY

IMMUNE RESPONSE IN HUMAN LEISHMANIA INFECTIONS

This review summarizes relevant information about the immune response triggered during leishmaniosis, a disease of great importance from the epidemiological point of view, since it is endemic in Colombia and other countries. We emphasize on human leishmaniosis; nevertheless, some important findings in the murine model are also mentioned. This information allows to conclude that *Leishmania* infection is a complex and coordinated process,

which includes adhesion and entrance of the parasite into the host cells and its survival inside them. Events that mediate the infection process may influence its result in terms of elimination of the parasite or development of the disease, through induction or not of an effective specific immune response which involves host cell activation and parasite destruction.

BIBLIOGRAFÍA

1. HOWARD JG. Host immunity to leishmaniasis. In: Leishmaniasis. Chang KP, Bray RS, eds. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1985: 140-162.
2. MAUËL J, BEHIN R. Immunity: clinical and experimental. In: Peters W, Killick-Kendric R, eds. The Leishmaniases in biology and medicine. London: Academic Press; 1987; 2: 731-791
3. LIEW FY, O'DONNELL CA. Immunology of Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1993; 32: 161-259.
4. CASTÉS M, AGNELLI A, VERDE O, RONDÓN AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 1983; 27: 176-186.
5. CARVALHO EM, BARRAL A, PEDRAL-SAMPAIO D, BARRAL-NETO M, BADARO R, ROCHA H, et al. Immunological markers of clinical evolution in children recently infected with *L. chagasi*. *J Infect Dis* 1992; 165: 536-544.
6. CONVIT J, ULRICH M, FERNANDEZ CT, TAPIAS FJ, CÁCERES-DITTMAR G, CASTÉS M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 444-448.
7. LABRADA M, WEIGLE K, VALDERRAMA L, SARAVIA NG. Evaluación de la respuesta de isotipos de inmunoglobulinas específicas a *Leishmania* en leishmaniasis tegumentaria americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84: 409-416.

8. GUTIERREZ Y, SALINAS G, PALMA G, VALDERRAMA L, SANTRICH C, SARAVIA NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 281-289
9. GRIMALDI G JR, TESH R. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 230-250.
10. ULRICH M, RODRIGUEZ V, CENTENO M, CONVIT J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. *Clin Exp Med* 1995; 100: 54-58.
11. LYNCH NR, YARZABAL L, VERDEL O, AVILA JL, MONZON H, CONVIT J. Delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin E in American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 1982; 38: 877-881.
12. O'NEIL CE, LABRADA M, SARAVIA NG. *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis*-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 181-188.
13. ATTA AM, D'OLIVEIRA JR A, CORREA J, ATTA ML, ALMEIDA RP, CARVALHO EM. Anti-Leishmanial IgE antibodies: A marker of active disease in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 426-430.
14. SARAVIA NG, VALDERRAMA L, NABRADA M, HOLGUIN AF, NAVAS C, PALMA G, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J Infect Dis* 1989; 159: 725-735.
15. CARVALHO EM, JOHNSON WR, BARRETO E, MARSDEN PD, COSTA JLM, REED S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1985; 135: 4.144-4.148.
16. TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, ACUÑA L, MOSCA W. Epidermal Langerhans cell in infectious diseases. *Histol Histopath* 1989; 4: 499-508.
17. BREATHNACH SM, KATZ SI. Keratinocytes synthesize antigen in acute cutaneous graft-vs-host disease. *J Immunol* 1983; 131: 2.741-2.745.
18. TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, SÁNCHEZ MA, FERNÁNDEZ CT, RONDÓN AJ, CONVIT J. Adhesión molecules in lesion of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol* 1994; 3: 17-22.
19. TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, SÁNCHEZ MA. Epidermal immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. In: TAPIA F, CÁCERES-DITTMAR G, SÁNCHEZ MA, eds. *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. New York: Chapman and Hall; 1996: 139-152.
20. BEUTLER B, CERAMI A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 505-518.
21. VACHULA M, VAN EPPS DE. In vitro models of lymphocyte transendothelial migration. *Invasion and Metastasis* 1992; 12: 66-75.
22. AKIRA S, HIRANO T, TAGA T, KISHIMOTO T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4: 2.860-2.864.
23. HIRANO T, AKIRA S, TAGA T, KISHIMOTO T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990; 11: 443-449.
24. LUCSLEY RM. Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 5.879-5.880.
25. BRUNDA MJ. Interleukin 12. *J. Leukoc Biol* 1994; 55: 280-288.
26. MOSSER DM, EDELSON PJ. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *J Immunol* 1984; 132: 1.501-1.505.

27. HOOVER DL, NACY CA. Macrophage activation to kill *Leishmania tropica*: defective intracellular killing of amastigotes by macrophages elicited with sterile inflammatory agents. *J Immunol* 1984; 132: 1.487-1.493.
28. FRANKE ED, MCGREEVY PB, KATZ SP, SACKS DL. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol* 1985; 134: 2.713-2.718.
29. ALMEIDA MC, CUBA CUBA CA, DE SA CM, PHAROAH MM, HOWARD KM, MILES MA. Metacyclogenesis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in vitro: evidence that lentil lectin is a marker of complement resistance and enhanced infectivity. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 325-329.
30. MOSSER DM, WEDGEWOOD JF, EDELSON PJ. *Leishmania* amastigotes: resistance to complement mediated lysis is not due to a failure to fix C3. *J Immunol* 1985; 134: 4.128-4.231.
31. MOSSER DM, EDELSON PJ. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* 1987; 327: 329-331.
32. DA SILVA RP, HALL BF, JOINER KA, SACKS DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 1989; 143: 617-622.
33. MOSSER DM, SPRINGER TA, DIAMOND MS. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* 1992; 116: 511-520.
34. WRIGHT SD, SILVERSTEIN SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *J Exp Med* 1983; 158: 2.016-2.023.
35. BOGDAN C, RÖLLINGHOFF M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *J Parasitol* 1998; 28: 121-134.
36. BURNS JM, SCOTT JM, CARVALHO EM, RUSSO DM, MARCH CJ, VAN NESS KP, et al. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. *J Immunol* 1991; 146: 742-748.
37. PEARSON RD, STEIGBIGEL RT. Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol* 1980; 125: 2.195-2.201.
38. HERMAN R. Cytophilic and opsonic antibodies in visceral leishmaniasis in mice. *Infect Immun* 1980; 28: 585-593.
39. DWYER DM. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *J Immunol* 1976; 117: 2.081-2.091.
40. GUIMARAES MCS, FERREIRA AW, CARVALHO MB, CELESTE BJ, CUCÉ LC, BELDA W. Anti-*Leishmania* IgA immunoenzymatic assay in mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1984; 26: 353-356.
41. GALVAO-CASTRO B, SAFERREIRA JA, MARZOCHI KF, MARZOCHI MC, COUTINHO SG, LAMBERT PH. Polyclonal B-cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human visceral leishmaniasis. *Clinic Exp Immunol* 1984; 56: 58-66.
42. PEARSON RD, EVANS T, WHEELER DA. Humoral factors during South American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 80: 465-468.
43. ARGOV S, JAFFE CL, KRUPP M. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 190-197.
44. REZAI HR, Ardekali SM, Amirhakimi G, Kharazmi A. Immunological features of kala-azar. *Am J Trop Med Hyg* 1978; 27: 1.079-1.083.
45. BADARO R, REED SG, BARRAL A, ORGE G, JONES TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35: 72-78.

46. RODRIGUEZ V, CENTENO M, ULRICH M. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. *Parasite Immunol* 1996; 18: 341-345.
47. ULRICH M, RODRIGUEZ V, CENTENO M. The humoral response in leishmaniasis. In: Tapia FJ, Cáceres Dittmar G, Sánchez M, eds. *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. New York: Chapman and Hall; 1996: 189-202.
48. ISHIZAKA A, SAKIYAMA Y, NAKANISHI M, TOMIZAWA K, OSHIKA E, KOJIMA K, et al. The inductive effect of interleukin-4 on IgG4 and IgE synthesis in human peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 392-396.
49. COFFMAN RL, SEYMOUR BWP, LEBMAN DA, HIRAKI DD, CHRISTIANSEN JA, SHRADER B, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102: 5-28.
50. STEVENS TL, BOSSIE A, SANDERS VM, FERNANDEZ-BOTRAN R, COFFMAN RL, MOSMANN TR, et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 1988; 334: 255-258.
51. CASTES M, AGNELLI A, RONDON AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human american cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1984; 57: 279-286.
52. MENDOÇA SC, COUTINHO SG, AMENDOEIRA RR, MARZOCHI MCA, PIRMEZ C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol* 1986; 64: 269-276.
53. BERMAN JD, DWYER DH. Expression of *Leishmania* antigen on the surface of infected human macrophages in vitro. *Clin Exp Immunol* 1981; 44: 342-348.
54. BELOSEVIC M, DAVIS CE, MELTZER MS, NACY CA. Regulation of activated macrophage antimicrobial activities. Identification of lymphokines that cooperate with IFN-gamma for induction of resistance to infection. *J Immunol* 1988; 141: 890-896.
55. GREEN SJ, CRAWFORD RM, HOCKMEYER JT, MELTZER MS, NACY CA. *Leishmania* major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1990; 145: 4.290-4.297.
56. SCOTT P, NATOVITZ P, COFFMAN RL, PEARCE E, SHER A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 1988; 168: 1.675- 1.684.
57. SCOTT P, PEARCE E, CHEEVER AW, COFFMAN RL, SHER A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 1989; 112: 162-182.
58. SCOTT P. IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol* 1991; 147: 3.149-3.155.
59. ROSSI-BERGMANN B, MÜLLER I, GODINHO EB. Th1 and Th2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cell in murine leishmaniasis. *Infect Immun* 1993; 61: 2.266-2.269.
60. GAJEWSKI TF, SCHELL SR, NAW G, RITCH FW. Regulation of T cell activation differences among T cell subsets. *Immunol Rev* 1989; 111: 79- 110.
61. FIORENTINO DF, ZONICK A, VIERA P. IL-10 acts on the antigen presenting cells to inhibit cytokines reduction by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146: 3.444-3.451.
62. FISHMAN MA, PERELSON AS. Th1/Th2 cross regulation. *J Theor Biol* 1994; 170: 25-56.
63. TAPIA FJ, CÁCERES-DITTMAR G, SÁNCHEZ MA, FERNÁNDEZ CT, CONVIT J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol Res* 1993; 26: 239-247.

64. FINKELMAN FD, HOLMES J, KATONA IM, URBAN JF, BECKMANN MP JR, PARK LS et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann Rev Immunol* 1990; 8: 303-333.
65. COX FEG, LIEW FY. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 1992; 13: 445-448.
66. KEMP M, HANSEN MB, THEANDER TG. Recognition of Leishmania antigens by T lymphocytes from non-exposed individuals. *Infect Immun* 1992; 60: 2.246-2.251.
67. CHERWINSKI HM, SCHUMACHER JH, BROWN KD, MOSMANN TR. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987; 166: 1.229-1.244.
68. FIORENTINO DF, BOND MW, MOSMANN TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2.081-2.095.
69. MOSMANN TR, SAD S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146.
70. CASTÉS M, TRUJILLO D, CALCAGNO M, CACRERA M, CONVIT J. Response Th1/Th2 in human american cutaneous leishmaniasis: its possible relevance for the design of a vaccine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993a; 88: 42-43.
71. CASTÉS M, TRUJILLO D, ROJAS ME, FERNANDEZ CT, ARAYA L, CABRERA M, et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol Res* 1993b; 26: 233-238.
72. PISA P, GENNENE M, SODER O, OTTHENHOFF M, HANSSON M, KIESSLING R. Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis. *J Infect Dis* 1990; 161: 988-991.
73. PIRMEZ C, YAMAMURA M, UYEMURA K, PAES-OIIVEIRA M, CONCEICAO-SILVA F, MODLIN RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993; 91: 1.390- 1.395.
74. LIEW FY, YANG DM, SEVERN A, COX FEG. TNF- α reverses the disease-exacerbating effect of subcutaneous immunization against murine cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 1991; 74: 304-309.
75. SACKS DL, LATA LAL S, SHRIVASTAVA SN, BLACKWELL J, NEVA FA. 1987. An analysis of T cell responsiveness in Indian Kala-azar. *J Immunol* 1987; 138: 908-913.
76. ZWINGENBERGER K, HARMS G, PEDROSA C, OMENA S, SANDKRAMP B, NEIFER S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis. Evidence for predominance of endogeneous IL4 over IFN- γ production. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 57: 242- 249.
77. CARVALHO EM, BACELLAR O, BROWNELL C, REGIS T, COFFMAN RL, REED SG. Restoration of IFN- γ production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1994; 152: 5.949-5.956.
78. HOLADAY BJ, POMPEM ML, GERONIMO S, TEIXEIRA MJ, SOUZA AQ, VASCONCELOS AW, et al. Potencial role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala-azar. *J Clin Invest* 1993; 92: 2.626-2.632.
79. CÁCERES-DITTMAR G, TAPIA FJ, SANCHEZ M, YAMAMURA K, UYEMURA RL, MODLIN RL, et al. Determination of the cytokine profile in american cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 500-505.
80. KELSO A, GLASEBROOK AL. Secretion of interleukin 2, macrophage-activating factor, interferon, and colony-stimulating factor by alloreactive T lymphocyte clones. *J Immunol* 1984; 132: 2.924-2.931.
81. CHIPLUNKAR S, DE LIBERO G, KAUFMANN SHE. Mycobacterium leprae-specific Lyt-2⁺ T lymphocytes with cytolytic activity. *Infect Immun* 1986; 54: 793-797.
82. FONG TAT, MOSMANN TR. Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *J Immunol* 1990; 144: 1.744-1.752.

83. SYPEK JP, CHUNG CL, MAYOR SE, SUBRAMANYAN JM, GOLDMAN SJ, SIEBURT DS, et al. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T helper Type 1 immune response. *J Exp Med* 1993; 177: 1.797-1.802.
84. TRINCHIERI G. Cytokines acting on or secreted by macrophage during intracellular infection (IL-10, IL-12, INF gamma). *Curr Opin Immunol* 9: 1997; 17-23.
85. KIRKPATRICK CE, FARRELL JP. Splenic natural killer-cell activity in mice infected with *Leishmania donovani*. *Cell Immunol* 1984; 85: 201- 214.
86. RIDEL PR, ESTERRE P, DEDET JP, PADRINAUD R, SANTORO F, CAPRON A. Killer cells in human cutaneous leishmaniasis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 223-226.
87. MODLIN RL, PIRMEZ C, HOFMAN FM, TORIGIAN V, UYEMURA K, REA TH, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma-g T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesion. *Nature* 1989; 339: 544-548.
88. RAZIUDDIN S, TELMASANI AW, EL-AWAD MEH, AL-AMARI O, AL-JANADI M. Gamma-T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1.143-1.148.

