

**„Modulación de la expresión del asa de regulación hierro libre-óxido nítrico
sintetasa de células dendríticas por quelantes de hierro”**

Alicia Ponte-Sucre

Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de
Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Correspondencia: Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina
Experimental, Universidad Central de Venezuela, Apdo. 68256, Caracas 1062-A,
Venezuela.

Tel.: (0058)(212)(6053665)

Fax: (0058)(212)(6934351)

e-mail: aiponte@reacciun.ve

Resumen

El papel de las células dendríticas es fundamental en la señalización de la infección por *Leishmania* desde la piel hasta los ganglios linfáticos; sin embargo, la proliferación de *Leishmania* en estas células está restringida. En el macrófago, célula hospedera de *Leishmania* por excelencia, los parásitos proliferan irrestrictamente y el control de la infección depende directamente de los niveles de óxido nítrico. Debido a que la disponibilidad de hierro celular modula la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa del macrófago y para analizar las causas de la restricción de la proliferación de *Leishmania* en células dendríticas, en este trabajo evaluamos la influencia del hierro libre intracelular sobre la funcionalidad de células de dendríticas y la infección por *Leishmania major*. Los resultados demuestran que en células de Langerhans de la piel expuestas a quelantes de hierro la infección por *Leishmania major* y la expresión del receptor de transferrina

disminuyen, sin alterar la producción de óxido nítrico y otras propiedades funcionales de la célula. La incubación de células dendríticas de médula ósea con quelantes de hierro no afecta la infección por *Leishmania major* ni la producción de óxido nítrico de la célula. Estos resultados demuestran que la restricción de la proliferación de *Leishmania* en células dendríticas es independiente de los niveles de hierro celular y de los niveles de óxido nítrico.

Introducción

La infección experimental de ratones con *Leishmania major* ha permitido precisar factores involucrados en la respuesta inmune contra *Leishmania*. Los macrófagos y las células de Langerhans (LC) de la piel fagocitan los parásitos y la resolución de la infección ocurre debido a la muerte del parásito por los macrófagos activados (Liew y col., 1993). Las LC de la piel fagocitan parásitos, restringen su replicación y están implicadas en la señalización de la infección desde la piel a los nodos linfáticos y en la activación de células T (Moll, 1993).

Aunque líneas celulares de macrófagos deficientes en los mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno eliminan los amastigotes de *Leishmania* (Scott y col., 1985) y controlan la infección, compuestos tipo superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales oxhidrilos y el óxido nítrico (NO) son cruciales en la defensa del hospedero en contra de *Leishmania* (Miller y Britigan, 1997). La producción de NO es el mecanismo más eficiente de eliminación de *Leishmania* (Green y col., 1990) y en el modelo murino de ratones BALB/c, macrófagos activados por interferón gamma (IFN- γ) aumentan significativamente su producción de NO (Ding y col., 1988; Green y col., 1990; Nathan y Hibbs, 1991).

Múltiples funciones efectoras de los macrófagos están reguladas por el status férrico celular (Kemp, 1993). Por ejemplo, la activación de macrófagos por IFN- γ aumenta los niveles de hierro secuestrado por moléculas distintas a ferritina, la expresión de la enzima

NO sintetasa (iNOS) y la producción de NO y de neopterinina (Miller y Britigan, 1997), molécula implicada en la toxicidad antimicrobica mediada por radicales libres, peróxidos y cloruros. Por su parte, el aumento de los niveles de hierro libre inhiben la producción basal de NO, disminuye la activación de los monocitos mediada por IFN- γ , la expresión de complejo de histocompatibilidad (MHC) II, la formación de neopterinina, la producción de factor de necrosis tumoral, la transcripción de iNOS y producción de NO, y la citotoxicidad contra microorganismos invasores (Weiss y col., 1995, 1997, Harhaji y col., 2004). Los quelantes de hierro tipo desferroxamina aumentan la activación mediada por IFN- γ en estas células (Weiss y col., 1992). LC aisladas de piel no expresan la enzima iNOS y la adición de donadores de NO o el uso de inhibidores de iNOS no altera la tasa de infección (Blank y col., 1996). Estos resultados sugieren que LC de piel de ratón no expresan iNOS y que un mecanismo alternativo controla la replicación del parásito. Debido a ello, y con el fin de evaluar en LC el asa de regulación hierro libre-expresión de iNOS, en este trabajo analizamos la influencia de quelantes de hierro como desferroxamina, pyridoxalisonicotinoyl-hidrazona y salicylaldehido-isonicotinoyl-hidrazona sobre la funcionalidad de células de dendríticas y la infección por *Leishmania major*.

Los resultados demuestran que la exposición de LC a quelantes de hierro reduce la infección por *Leishmania major*, sin alterar otras propiedades funcionales, incluyendo la producción de NO. En células dendríticas de médula ósea (BMDC) los quelantes de hierro no afectan la infección por *Leishmania major* ni la producción de NO. Estos resultados sugieren que el control de la infección con *Leishmania* en células dendríticas es independiente de los niveles de hierro libre intracelular y de NO.

Materiales y Métodos

Parásitos

Promastigotes de *Leishmania (L.) major* (MHOM/IL/81/FE/BNI) se cultivaron en

medio RPMI 1640, a 26 °C, suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal bovino (SFB) al 10 %, Hepes 10 mM pH 7,5, gentamicina 160 µg/ml, NaHCO₃⁻ 7,5 % y 2-mercaptoetanol 5x10⁻⁵ M (medio completo) (Sigma-Aldrich Chemikalien, Taufkirchen, Alemania). Para generar las formas amastigotes, promastigotes en fase estacionaria de crecimiento se inyectaron en la base de la cola de ratones BALB/c (Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld, Alemania). Para aislar los amastigotes, las lesiones desarrolladas en la base de la cola se cortaron estérilmente, homogeneizaron y pasaron a través de un tamiz de metal. La suspensión celular se centrifugó a 350, 700 y 1000 x g, 10 min a temperatura ambiente (TA). Los parásitos se colectaron en el pellet de 1000 x g y resuspendieron en medio completo, se estimó su densidad y se usaron inmediatamente.

Aislamiento de las células de Langerhans y de las células dendríticas de médula ósea

Las suspensiones de LC se prepararon a partir de piel de oreja de ratón BALB/c tripsinizada (Koch y col., 1990). Las mitades ventrales gruesas se incubaron a 37 °C con 10 ml de tripsina 1 % (Sigma-Aldrich Chemikalien), en solución salina fosfatada (PBS), 90 min, mientras que las mitades dorsales delgadas se incubaron a 37 °C con 10 ml de tripsina 0.6 % en PBS, 45 min. Estas preparaciones contienen 3-5 % de LC puras que expresan el MHC II (Kampgen y col., 1991).

Las células dendríticas (BMDC) se aislaron de médula ósea de ratones BALB/c (Lutz y col, 1999) y cultivaron en cápsulas de Petri a 37 °C, 5 % CO₂ (2 10⁶ células en 10 ml de medio completo y 200 U ml⁻¹ de GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) (PeproTech, London, Gran Bretaña) fresco. Al día 0, 3 y 6 de comenzar el cultivo, se añadieron 5 ml de medio completo y 200 U ml⁻¹ de GM-CSF. Las células se colectaron al día 10 y se resuspendieron a una densidad de 1 x 10⁶ ml⁻¹ en medio completo.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la infección

LC o DC, 3 x 10⁶ por pozo se incubaron 24 h, a 37 °C, 5 % CO₂ en platos de 12

pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS (Sigma-Aldrich Chemikalien), o 50 μM desferroxamina (DFO) (Sigma-Aldrich Chemikalien), pyridoxal-isonicotinoyl-hidrazona (PIH) o salicylaldehido-isonicotinoyl-hidrazona (SIH) y se infectaron con 3 x 10⁷ amastigotes de *L. major*. La carga parasitaria se estimó coloreando las células infectadas según la metodología de Channon y col. (1984).

Efecto de los quelantes de hierro sobre la migración de las células de Langerhans

Para evaluar la migración de LC, las orejas de ratón se escindieron y se colocaron sobre medio completo y se incubaron a 37 °C, 5 % CO₂ en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS, o 50 μM DFO, PIH o SIH. Al cabo de tres días el medio de cultivo se colectó y se estimó la densidad de células dendríticas presentes.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la expresión de marcadores de superficie

LC, 3 x 10⁶ por pozo se incubaron 24 h, 37 °C, 5 % CO₂ en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS, o 50 μM DFO, PIH o SIH. Al día siguiente se colectaron las células no adheridas. La expresión de los marcadores de superficie se evaluó en las LC colectadas. Estas se incubaron 30 min a 4 °C con un anticuerpo anti ratón-I-A^d-biotinilado (BD Biosciences Pharmingen, Wiesbaden, Alemania) y los anticuerpos contra factores co-estimulatorios rata-anti CD80 (B7-1) y rata-anti CD86 (BD Biosciences Pharmingen), o contra el receptor de transferrina rata-anti-CD71 (BD Biosciences Pharmingen), o contra los receptores para IL-1β rata-anti IL-1 RI y rata-anti-IL-1 RII (BD Biosciences Pharmingen) y los isotipos respectivos a una dilución 1:100 en PBS, 2 % SFB. Seguidamente se marcaron con estreptavidina-FITC (BD Biosciences Pharmingen) y asno-anti-rata-PE (BD Biosciences Pharmingen), a una dilución 1:100 en PBS, 2 % SFB. La expresión de los marcadores de superficie se realizó en células positivas para MHC II, luego de establecer una ventana de adquisición en un sorteador de células por fluorescencia de Becton Dickson.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la producción de óxido nítrico

LC o DC, 3×10^6 por pozo se incubaron 24 h, a 37 °C, 5 % CO₂ en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS, o 50 μM DFO, PIH o SIH y se infectaron con 3×10^7 amastigotes de *L. major*. Al final del período de incubación el sobrenadante de los cultivos se colectó y almacenó a -20°C. El nivel de NO producido se evaluó al determinar la concentración de nitritos presente en el sobrenadante del medio de cultivo. Para ello se incubaron 100 μl del sobrenadante del medio de cultivo con 100 μl de reactivo de Griess (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, 2.5% ácido fosfórico) (Sigma-Aldrich Chemikalien), 10 min a TA de acuerdo con la metodología de Granger y col. (1996). La absorbancia del producto de reacción se midió en un lector de ELISA a 540/630 nm. La concentración de NO₂⁻ se determinó utilizando nitrito de sodio como solución Standard.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la expresión de la NO sintetasa

Los niveles de iNOS se cuantificaron mediante Western blot. Alícuotas de citosol de células dendríticas sembradas en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS, o 50 μM PIH o SIH fueron sometidas a PAGE y transferidas a papel de nitrocelulosa. Los sitios de unión no específica se bloquearon con albúmina de suero bovino al 10 % en Tris 100 mM, pH 7.0, 0.05% Tween 20 (TBST), 24 h, a 4 °C. El papel de nitrocelulosa se incubó en presencia del anticuerpo policlonal contra iNOS (Sigma-Aldrich Chemikalien) (1:250 en TBST), 4 h, a TA, seguidamente se incubó 4 h, a TA en presencia del anticuerpo de detección, anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich Chemikalien) (1:500 en TBS) acoplado a fosfatasa alcalina. La detección de las bandas de proteína se logró al añadir el substrato de fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich Chemikalien) y obtener el desarrollo de color.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la producción de IL-1 β e IL-12

LC o DC, 3×10^6 por pozo se incubaron 24 h, a 37 °C, 5 % CO₂ en platos de 12 pozos en ausencia de estimulantes, o en presencia de 100 ng ml⁻¹ LPS, o 50 μ M DFO, PIH o SIH y se infectaron con 3×10^7 amastigotes de *L. major*. Al final del período de incubación el sobrenadante de los cultivos se colectó y almacenó a -20°C. Los niveles de IL-1 β e IL-12 en los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron mediante un kit inmunoabsorbente “sandwich ELISA” de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD Biosciences Pharmingen y R&D Systems, Wiesbaden, Germany). Platos para Elisa de base plana se incubaron toda la noche a 4 °C con anticuerpos monoclonales en contra de la respectiva citoquina disuelta en 0.1 M NaHCO₃, pH 9.0, 50 μ l por pozo. Los sitios de unión no específica se bloquearon con albúmina de suero bovino al 10 % en TBS, 100 μ l por pozo por dos horas a TA. Los platos se lavaron extensivamente con TBS. Las muestras y los blancos se añadieron (100 μ l por pozo) y una curva Standard se construyó para cada plato utilizando diluciones seriadas de la citoquina recombinante. Los platos se incubaron 24 h, a 4 °C, se agregó el anticuerpo monoclonal contra la citoquina correspondiente (1:500 en TBS, 100 μ l por pozo), se incubó una h, a TA, se añadió 100 μ l de fosfatasa alcalina (1:100 en TBS) y los platos se incubaron 90 min, a TA. Para detectar la presencia de las citoquinas el substrato de fosfatasa alcalina se añadió a las muestras y se leyó la densidad óptica 405/490 nm usando un lector de ELISA.

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm el error tipo de la media. Para los datos de infección, expresión de marcadores de superficie, secreción de NO, e iNOS se realizaron de 3 a 7 experimentos independientes. Los datos de migración y secreción de IL-1 β , IL-12 y NO de LC representan los valores obtenidos de 9 réplicas. Las diferencias entre los diferentes tratamientos experimentales fueron analizados para significancia estadística

mediante el modelo de ANOVA de dos vías y post análisis de Bonferroni, utilizando el paquete estadístico GraphPad-4[®]. La intensidad de las bandas en el Western blot fueron analizadas mediante el programa Lab Image.

Resultados

Efecto de los quelantes de hierro sobre la función de las células de Langerhans

El efecto de los quelantes de hierro sobre la función de las LC se determinó al evaluar la infección, expresión de marcadores de superficie, secreción de IL-1 β e IL-12 y secreción de NO en LC aisladas de oreja de ratón incubadas en presencia de los diferentes quelantes de hierro. El tratamiento de LC con LPS se utilizó como control positivo. Como parámetro adicional de la funcionalidad de LC se evaluó su capacidad de migración desde mitades de orejas incubadas bajo las diferentes condiciones experimentales.

La fig. 1 muestra la infección de LC por *L. major* y su capacidad de migración (como células no infectadas). La incubación con LPS aumentó la infección de LC por *L. major*, mientras que la incubación con DFO y PIH la disminuyó. Por otra parte, la migración de LC desde mitades de orejas al medio de cultivo fue similar en todas las condiciones experimentales. Finalmente, la expresión del MHC-clase II y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, parámetros indicativos de la maduración de LC alcanzaron valores equivalentes en todas las condiciones experimentales (Tabla I). Estos resultados sugieren que el tratamiento de LC con quelantes de hierro disminuye la infección de LC por *L. major* sin afectar las propiedades migratorias y de presentación antigénica de las LC.

Los niveles de IL-1 β e IL-12 se evaluaron en sobrenadantes de cultivo de orejas de ratón (Fig. 2) incubadas en presencia de DFO aumentaron (no significativamente) en comparación con los niveles detectados en LC no tratadas; la producción de óxido nítrico en todas las condiciones experimentales fue de unos 40 μ M (datos no mostrados). Finalmente (Fig. 3), el tratamiento con los quelantes de hierro afectó significativamente la expresión de

los marcadores de superficie evaluados ($p < 0.001$). Así, en comparación con los niveles detectados en LC incubadas durante 24 horas sin tratamiento, la expresión del receptor de transferrina B71 disminuyó significativamente en LC incubadas en presencia de DFO ($p < 0.001$), mientras que la expresión del receptor IL-1 β R-II aumentó significativamente ($p < 0.001$); la expresión de este receptor disminuyó significativamente en LC incubadas en presencia de PIH ($p < 0.001$) en comparación con los niveles detectados en LC incubadas durante 24 horas sin tratamiento. Estos resultados sugieren que los quelantes de hierro disminuyen la infección de LC por *L. major* mediante mecanismos independientes del asa de regulación hierro libre-producción de NO.

Efecto de los quelantes de hierro sobre la función de las células dendríticas de médula ósea

Una de las principales desventajas metodológicas de las preparaciones de piel de oreja de ratón es el bajo rendimiento en LC puras. Debido a ello, y a fin de confirmar los datos aquí presentados para LC, estudiamos el efecto de los quelantes de hierro sobre la infección, la producción de IL-1 β , IL-12 y NO y la expresión de iNOS en células dendríticas aisladas de médula ósea de ratones BALB/c.

La Fig. 4a muestra la infección por *L. major* y los niveles de NO en sobrenadantes de cultivos de BMDC sometidas a diferentes condiciones experimentales. El porcentaje de infección en BMDC tratadas con quelantes de hierro fue similar al encontrado en BMDC no tratadas y los niveles de NO fueron equivalentes en todas las condiciones; estos datos sugieren que en BMDC de ratones BALB/c, la infección por *L. major* y la producción de NO son independientes de los niveles intracelulares de hierro. Un análisis de Western blot (Fig. 4b) confirmó la presencia de la enzima iNOS en células dendríticas de médula ósea sujetas a los diferentes tratamientos. Los niveles de enzima en células no tratadas aumentaron en células incubadas en presencia de LPS y disminuyeron significativamente en células incubadas en presencia de PIH ($p < 0.005$), mas no de SIH. Finalmente, en

comparación con BMDC no tratadas, la producción IL-12 no cambió significativamente en DC tratadas con quelantes de hierro e infectadas con *L. major*, aunque la producción IL-1 β aumentó significativamente ($p < 0.005$) (Fig. 5).

Discusión

A diferencia de lo que ocurre en los macrófagos, la proliferación de *Leishmania* en las células dendríticas está restringida; el papel fundamental de estas células es la señalización de la infección desde la piel hasta los ganglios linfáticos. En el macrófago, los parásitos proliferan y el control de la infección depende directamente de los niveles de NO. La disponibilidad de hierro celular modula la funcionalidad celular del macrófago incluyendo actividad de la enzima NO sintetasa (Weiss y col., 1995, 1997, Harhaji y col., 2004). Para evaluar si un control similar ocurre en células dendríticas, en el presente trabajo evaluamos la influencia del hierro libre intracelular sobre la fisiología de células dendríticas de piel y médula ósea y la infección por *Leishmania*. Los resultados demuestran que la exposición de LC a quelantes de hierro disminuye la infección por *L. major* y la expresión del receptor de transferrina, no altera sus propiedades funcionales de migración y presentación antigénica, y no afecta la producción de NO. La incubación de BMDC con quelantes de hierro no afecta la infección por *L. major* ni la producción de NO, y aumenta la secreción de IL-1 β . Estos resultados sugieren que el control de la infección de células dendríticas por *Leishmania* es independiente del asa de regulación iNOS-hierro libre.

Bisti y col. (2000) demostraron que los quelantes de hierro inhiben el crecimiento *in vitro* de *Leishmania*; el tratamiento de ratones BALB/c con DFO retarda la aparición de lesiones en ratones infectados y el tratamiento sistémico de ratones infectados con hierro disminuye significativamente el desarrollo de las lesiones. El presente trabajo confirma parcialmente estos resultados en LC y BMDC aisladas de ratones BALB/c, incubadas en presencia de DFO, PIH y SIH e infectadas con *L. major*. Adicionalmente demuestra que la

expresión de iNOS disminuye significativamente en BMDC incubadas con quelantes de hierro. Estos resultados sugieren que un mecanismo alternativo al asa de regulación iNOS-hierro libre es responsable del control de la replicación del parásito en estas células.

Al estudiar las funciones inherentes a su condición de células dendríticas encontramos que el tratamiento de LC con quelantes de hierro no altera su migración desde mitades de orejas de ratón BALB/c, la expresión de marcadores de superficie como MHC-II, CD80 y CD86 o niveles de citoquinas implicadas en la activación celular como IL-1 β e IL-12.

Sólo cambian la expresión del receptor de transferrina y del receptor de IL-1 β -II. La relación entre la expresión del receptor de transferrina y la activación de células T ha sido previamente descrita (Chaudhri y col., 1988) en linfocitos tratados con quelantes de hierro y estimuladas con esteres de forbol e ionomicina. La expresión del receptor de transferrina CD71 aumenta en células incubadas en presencia de DFO (Kroos y col., 1996) pero en macrófagos estimulados con diversas citoquinas y tratados con LPS, la expresión de CD71 disminuye (Weiss y col., 1997) y, en células K562 transfectadas con un receptor de transferrina denominado TfR2, su expresión disminuye en condiciones de agotamiento de hierro o en presencia de quelantes de hierro (Kawabata y col., 2000).

Nuestros experimentos confirman estos resultados ya que la expresión de CD71 disminuye en presencia de LPS y de los quelantes de hierro. Por otra parte, el papel regulador del hierro en la producción de IL-1 β ha sido descrito en macrófagos alveolares (O'Brien y col., 1998) y tejido completo (O'Brien y col., 2000). En este trabajo se demuestra la correlación negativa que existe entre los niveles de hierro libre intracelular y la producción de IL-1 β y el aumento significativo (hasta de 20 veces) de la capacidad de secretar IL-1 β de macrófagos alveolares tratados con DFO. Nuestros resultados experimentales sugieren una correlación similar entre los niveles de hierro libre

intracelulares y la secreción de IL-1 β en células dendríticas.

De los resultados presentados en este trabajo puede concluirse que la regulación del metabolismo de hierro en BMDC es extremadamente compleja y no parece estar vinculada a la producción de NO, adicionalmente los resultados sugieren que en BMDC de ratones BALB/c, las funciones celulares son independientes de los niveles de hierro intracelular.

Agradecimientos

Los autores agradecen en carecidamente a la Dra. Heidrun Moll la donación de los quelantes de hierro isonicotinoyl-hidrazona y salicylaldehido-isonicotinoyl-hidrazona y los ratones BALB/c. Este proyecto ha sido parcialmente financiado por el CDCH, PI-09.33.5520.2003. AI 09-00-5783-2005.

Referencias

Bisti S, Konidou G, Papageorgiou F, Milon G, Boelaert JR, Soteriadou K. The outcome of *Leishmania major* experimental infection in BALB/c mice can be modulated by exogenously delivered iron. Eur. J. Immunol. 2000. 30: 3732-3740.

Blank C, Bogdan C, Bauer C, Erb K, Moll H. Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase. Eur. J. Immunol. 1996. 26: 792-796.

Channon J, Roberts M, Blackwell J. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. Immunol. 1984. 53: 345-355.

Chaudhri G, Hunt NH, Clark IA, Ceredig R. Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin. Cell Immunol. 1988. 115: 204-213.

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 1988. 141: 2407-2412.

Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs Jr, JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Meth. Enzymol.* 1996. 268: 142-151.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Nacy CA. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-Arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 1990. 144: 278-283.

Harhaji L, Vuckovic O, Miljkovic D, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Iron down-regulates macrophage anti-tumour activity by blocking nitric oxide production. *Clin. Exp. Immunol.* 2004. 137: 109-116.

Kampgen E, Koch N, Koch F, Stoger P, Heufler C, Schuler G, Romani N. 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.* 1991. 88:3014-3018.

Kawabata H, Germain RS, Vuong PT, Nakamaki T, Said JW, Koeffler HP. Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 2000. 275: 16618-25.

Kemp JD. The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J. Clin. Investig.* 1993. 13: 81-91.

Koch F, Heufler C, Kampgen E, Schneeweiss D, Bock G, Schuler G. 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.* 1990. 171: 1759-1771.

Kroos MJ, Starreveld JS, Verrijt CE, van Eijk HG, van Dijk JP. Regulation of transferrin receptor synthesis by human cytotrophoblast cells in culture. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1996. 65: 231-234.

Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv. in Parasitol.* 1993. 32: 162-259.

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.* 1999. 223: 77-92.

Miller R, Britigan B. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997. 1-18.

Moll H. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today.* 1993.14: 383-387.

Nathan CF, Hibbs Jr. JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immuno.* 1991. 3: 65-70.

O'Brien-Ladner AR, Blumer BM, Wesselius LJ. Differential regulation of human alveolar macrophage-derived interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by iron. *J. Lab. Clin. Med.* 1998. 132: 497-506.

O'Brien-Ladner AR, Nelson SR, Murphy WJ, Blumer BM, Wesselius LJ. Iron is a regulatory component of human IL-1beta production. Support for regional variability in the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000. 23: 112-119.

Scott P, James S, Sher A. The respiratory burst is not required for killing of intracellular and extracellular parasites by a lymphokine-activated macrophage cell line. *Eur. J. Immunol.* 1985. 15: 553-8

Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Iron modulates interferon gamma effects in human myelomonocytic cell line THP-1. *Experiment. Hematol.* 1992. 20: 605-610.

Weiss G, Wachter H, Fuchs D, Linkage of cell mediated immunity to iron metabolism. *Immunol. Today.* 1995. 16: 495-499.

Weiss G, Bogdan C, Hentze MW. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the antiinflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol.* 1997. 158: 420-425.

TABLA 1

Modulación de la expresión de CD80, CD86 y MHC clase II

	Fluorescencia media		
	MHC clase II	CD80	CD86
Sin drogas	3909.0 ± 1.90	110.0 ± 0.11	675.0 ± 0.69
DFO	4209.0 ± 0.97	106.0 ± 0.11	616.0 ± 1.91
PIH	4135.00 ± 0.62	111.0 ± 0.05	607.0 ± 1.18

Leyendas de figuras

Figura 1. Efecto del LPS y de los quelantes de hierro DFO, PIH y SIH sobre la infección de LC por *L. major* y la migración de LC desde mitades de orejas al medio de cultivo. LC 3×10^6 por pozo se incubaron 24 h, en ausencia de estimulantes, o en presencia de los mismos y se infectaron con 3×10^7 amastigotes de *L. major*. La carga parasitaria se estimó coloreando las células infectadas según la metodología descrita en materiales y métodos. La migración de LC se evaluó en orejas de ratón escindidas, colocadas sobre medio completo e incubadas en ausencia de estimulantes, o en presencia de los mismos. Al cabo de tres días el medio de cultivo se colectó y se estimó la densidad de células dendríticas presentes.

Figura 2. Niveles de IL-1 β e IL-12 en pg ml⁻¹ en sobrenadantes de cultivo de orejas de ratón incubadas en presencia de los quelantes de hierro DFO, PIH y SIH tal y como se describió para la figura 1.

Figura 3. Expresión del receptor de transferrina (B71) y de los receptores de IL-1 β -I e IL-1 β -II en LC purificadas e incubadas en presencia de LPS, DFO y PIH. LC, 3 x 10⁶ por pozo se incubaron en ausencia de estimulantes, o en presencia de los mismos. Al día siguiente se colectaron las células no adheridas. La expresión de los marcadores de superficie se evaluó en las LC colectadas.

Figura 4. (a) Efecto del LPS y de los quelantes de hierro PIH y SIH sobre la infección de DC por *L. major* y la producción de NO. BMDC 3 x 10⁶ por pozo se incubaron 24 h, en ausencia de estimulantes, o en presencia de los mismos y se infectaron con 3 x 10⁷ amastigotes de *L. major*. La carga parasitaria se estimó coloreando las células infectadas según la metodología descrita en materiales y métodos. Al final del período de incubación el sobrenadante de los cultivos se colectó y almacenó a -20°C. El nivel de NO producido se evaluó al determinar la concentración de nitritos presente en el sobrenadante del medio de cultivo mediante la metodología descrita en materiales y métodos. (b) Regulación de la expresión de iNOS en BMDC de ratón incubadas en las diversas condiciones experimentales. Los niveles de iNOS se cuantificaron mediante Western blot. La intensidad de las bandas se analizó mediante el programa Lab Image.

Figura 5. Niveles de IL-1 β y IL-12 en pg ml⁻¹ en sobrenadantes de BMDC de ratón incubadas en los quelantes de hierro DFO, PIH y SIH tal y como se describió para la figura 1. ^{1,2} p < 0.005.

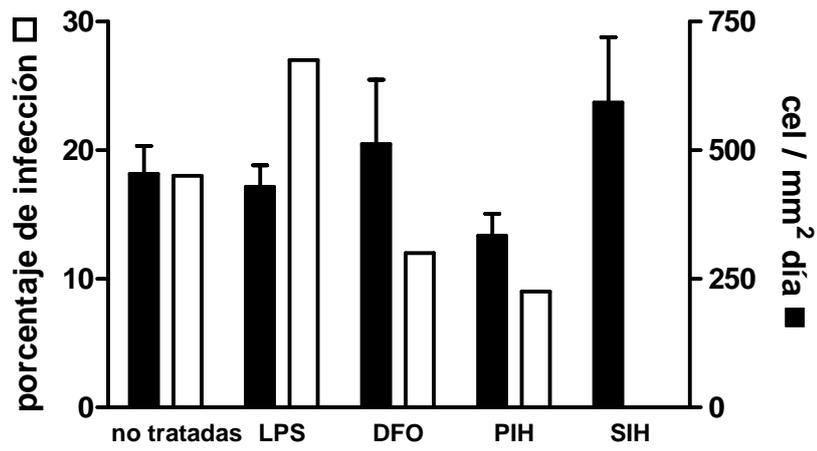


FIGURA 1

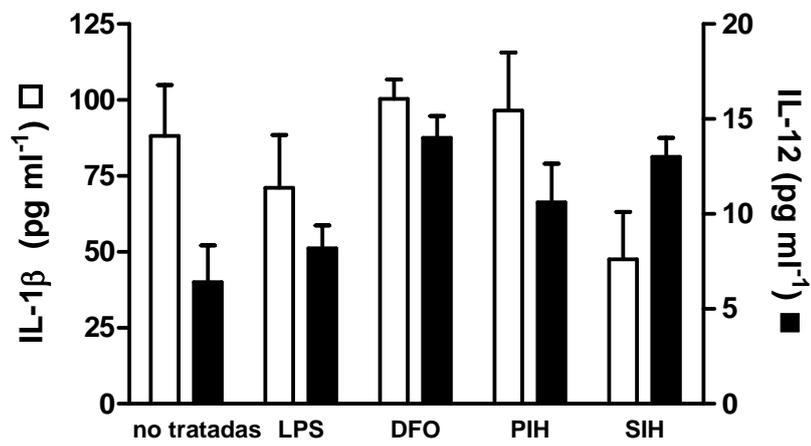


FIGURA 2

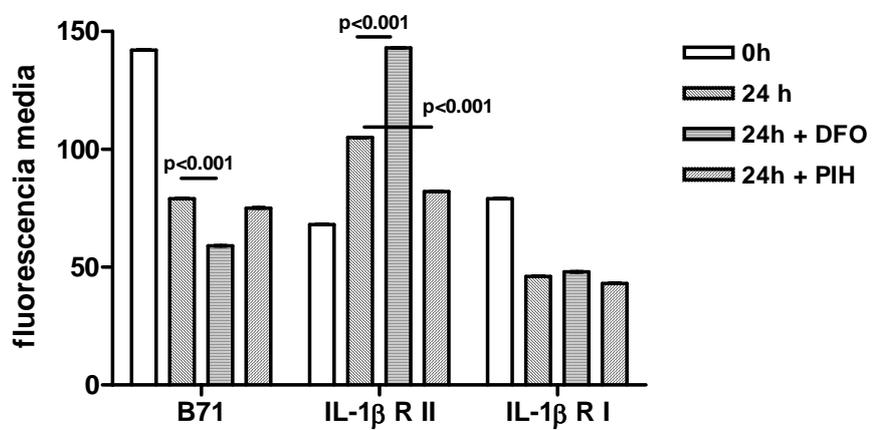


FIGURA 3

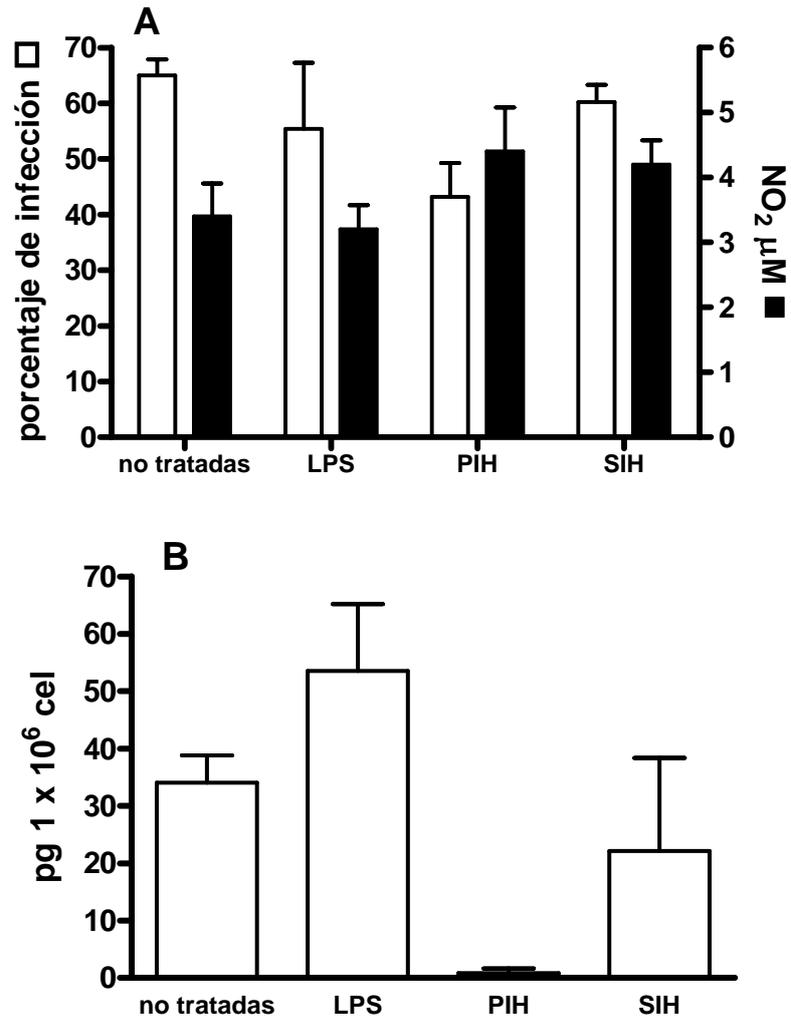


FIGURA 4

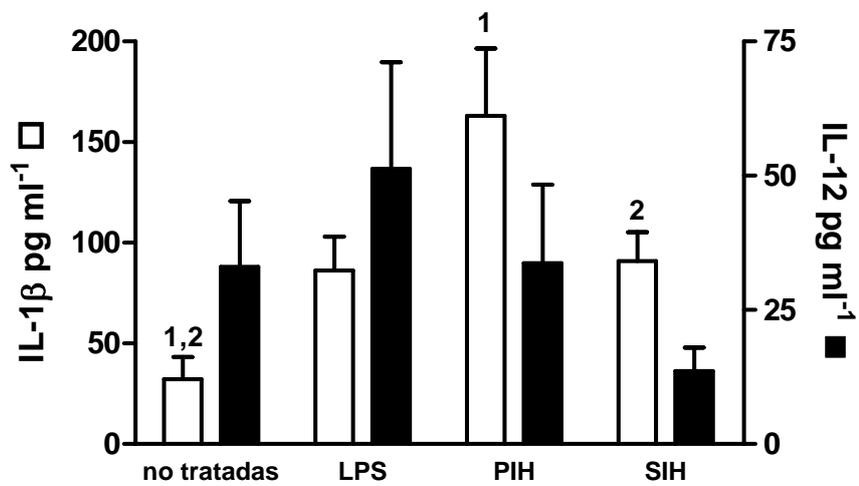


FIGURA 5