

11261

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

CORRELACION ENTRE LA INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO
EJERCIDO POR *Leishmania mexicana mexicana* Y LA
SEVERIDAD DE LA LEISHMANIASIS EN EL HUMANO Y EN
MODELOS MURINOS.

T E S I S

Que para obtener el grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
-INMUNOLOGIA-
PRESENTA EL ALUMNO

JOSE SOTERO DELGADO DOMINGUEZ

ASESOR: DRA. INGEBOURG BECKER

275962

MEXICO, D. F. 2000





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOPARASITOLOGIA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM BAJO LA
ASESORIA DE LA DRA. INGEBORG BECKER F.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor y jefe Dra. Ingeborg Becker por brindarme esta oportunidad.

A mis co-asesores Dr. César González Bonilla y Dr. Enrique Ortega Soto por las sugerencias y críticas hechas durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Victoria Chagoya Hazas, Dr. José Luis Molinari Soriano, Dr. César González Bonilla y la Dra. Patricia Talamas Roana por la revisión y sugerencias de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Dr. Cripa, Laila, Miriam, Norma, Rocely, Adriana, Roxana, Augusto, Alfonso, Lucy, Rosy y Ricardo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por distinguirme como becario durante mis estudios de maestría.

CONTENIDO

RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
A) Leishmaniasis Cutánea Localizada	3
B) Leishmaniasis Cutánea Diseminada	4
C) Leishmaniasis Mucocutánea o Espundia	5
D) Leishmaniasis Cutánea Esporotricóide	6
E) Leishmaniasis Visceral	6
TAXONOMIA	8
CICLO BIOLÓGICO DE <i>LEISHMANIA</i>	8
MOLECULAS DE <i>LEISHMANIA</i> QUE INTERVIENEN EN LA FISIOPATOGENIA DE LA RELACION HUESPED PARASITO	10
GLICOPROTEINA Gp63	10
Funciones de Gp63	10
A) En la fagocitosis	10
B) Sobrevida intracelular	10
LIPOFOSFOGLICANO	11
Función de LPG	12
A) Resistencia al complemento	12
B) Sobrevida intracelular	13
RESPUESTA INMUNE HACIA LA <i>LEISHMANIA</i>	14
Respuesta inmune innata	14
Respuesta inmune específica	15
EL MACROFAGO	17
Características generales de los macrófagos	17
Funciones	17
- Fagocitosis	18
- Receptores presentes en la superficie de monocitos y macrófagos	18
- Célula secretora	20
- Mecanismos efectores del macrófago	20
El estallido oxidativo	20
Quimioluminiscencia	22
Protein Kinase C	23

PAPEL DEL ESTALLIDO OXIDATIVO DE MACROFAGOS EN LA LEISHMANIASIS	24
HIPOTESIS	26
OBJETIVOS	26
MATERIAL Y METODOS	28
RESULTADOS	34
DISCUSION Y CONCLUSION	57
BIBLIOGRAFIA	61

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la correlación entre la inhibición del estallido oxidativo que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos y la gravedad del cuadro clínico encontrado en el huésped. Se demostró que la inhibición del estallido oxidativo ejercida por *Leishmania mexicana mexicana* en monocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa (LCD) es de 48%, mientras que en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) es de 22% y en los monocitos de sujetos sanos *Leishmania mexicana mexicana* inhibe el estallido oxidativo un 29%. En pacientes con leishmaniasis cutánea la gravedad del cuadro clínico se correlacionó con el grado de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de sus monocitos. La diferencia entre pacientes con LCD y LCL es altamente significativa ($p < 0.0242$).

En el análisis de la inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratones susceptibles a la leishmaniasis (BALB/c) se encontró que hay una inhibición del estallido oxidativo de 29% y la inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratones resistentes a la leishmaniasis (C57Bl/6) es de 10%. Igual que en el humano, en el huésped murino se encontró una correlación entre la gravedad del cuadro clínico y el grado de inhibición del estallido oxidativo. Aquí también la diferencia es altamente significativa ($p < 0.005$).

Se analizó si esta inhibición del estallido oxidativo permite la sobrevivencia de amastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* y la propagación del padecimiento, encontrándose una correlación directa entre la sobrevivencia de amastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* con el grado de inhibición que ejerce el parásito sobre el estallido oxidativo del macrófago.

Adicionalmente se encontró que no existen diferencias en la capacidad de inhibición del estallido oxidativo ejercido por cepas de *Leishmania mexicana mexicana* que originan distintos cuadros clínicos, tanto en monocitos de humanos sanos como en macrófagos de modelos murinos.

Concluimos que la gravedad del cuadro clínico en pacientes con distintas formas clínicas de leishmaniasis se correlaciona directamente con el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre sus monocitos. Adicionalmente concluimos que el grado de inhibición del estallido oxidativo no depende de la cepa de *Leishmania mexicana mexicana* sino del fondo genético del huésped.

ANTECEDENTES

La leishmaniasis es una enfermedad producida por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. El parásito es transmitido por la picadura de moscos hematófagos pilosos del género *Phlebotomus* del viejo mundo y *Lutzomia* en el Nuevo Mundo (1).

La leishmaniasis es una parasitosis de amplia distribución geográfica, exceptuando Alaska y Australia. En la República Mexicana se han registrado casos en los estados como Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Jalisco, San Luis Potosí y Coahuila. El primer caso fue reportado en 1912 en el estado de Yucatán. De 1946 a 1951 se reportaron un promedio de 35 casos anualmente en todo el país y de 1987 a 1997 se han registrado un promedio de 800 casos anuales (2).

La leishmaniasis puede tener diferentes formas clínicas clasificadas en:

A) Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Se caracteriza por un nódulo único que tiende a ulcerarse. La ulceración es generalmente redonda, de bordes indurados, fondo limpio e indolora. Puede curar espontáneamente en un periodo de seis meses a dos años; sin embargo en la oreja la infección puede ser crónica y puede durar años, y puede llevar a la mutilación del pabellón auricular. La hipersensibilidad se desarrolla en forma temprana y los pacientes son positivos a la intradermoreacción con *Leishmania* (prueba de Montenegro). Los linfocitos del huésped tienen la capacidad de responder *in vitro* a este antígeno con la producción de interferón gama (INF- γ) e interleucina 2 (IL-2) y en las biopsias habitualmente se encuentran pocos parásitos en el interior del macrófago. En México esta forma clínica se conoce como úlcera de los chicleros, es causada por *Leishmania mexicana mexicana* (1,2,3) y tiene una distribución prácticamente en toda la República Mexicana (figura 1).



Figura 1.a) Lesión ulcerosa típica de leishmaniasis cutánea localizada

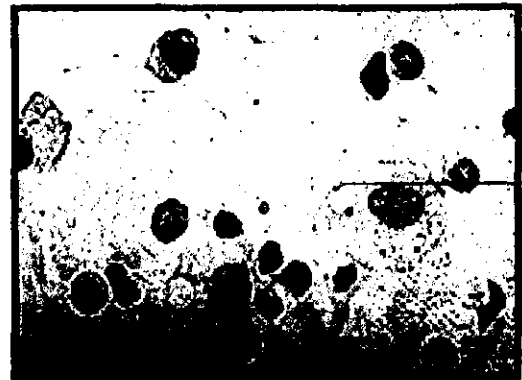


Figura 1.b) Biopsia con escasos parásitos intracelulares

B) Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)

Esta forma se caracteriza por iniciar con un nódulo que no se ulcera, la infección se disemina por vía linfática dando múltiples nódulos en la cara, extremidades inferiores y superiores, en el tórax y espalda, con excepción del cuero cabelludo, palmas de las manos y plantas de los pies. Esta enfermedad es de difícil tratamiento y generalmente es de desenlace fatal. La respuesta inmune celular se encuentra inhibida mientras que la respuesta humoral está aumentada sin embargo, no es protectora. La intradermoreacción es negativa. Esta forma clínica tiene una respuesta de tipo Th2, es decir la producción de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) están elevadas. En el análisis histopatológico se pueden observar abundantes parásitos dentro de macrófagos vacuolados. En México es causada por *Leishmania mexicana mexicana* (1,3), se han registrado casos en los estados de Tabasco, Veracruz y Coahuila (figura 2).



Figura 2. a) Lesiones nodulares en leishmaniasis cutánea difusa.



Figura 2.b) Biopsia con abundantes parásitos intracelulares

C) Leishmaniasis mucocutánea o Espundia (LMC)

Esta forma clínica presenta lesiones muy destructivas de mucosa nasal y orofaríngea, es de difícil tratamiento y puede producir la muerte por inanición y obstrucción de vías respiratorias. (figura 3).



Figura 3. Lesiones de la mucosa oral típica en leishmaniasis mucocutánea o espundia

D) Leishmaniasis cutánea esporotricóide o cutánea predifusa (LPD)

Esta forma clínica se manifiesta con pequeños nódulos subcutáneos subsecuentes que se diseminan por vía linfática y presenta similitud en la manifestación clínica con las lesiones ocasionadas por *Sporothrix shenckii* (4,5). La intradermoreacción es negativa y la presencia de parásitos en las biopsias es escasa. Se han reportado casos en el estado de Tabasco. (figura 4).



Figura 4. Lesiones nodulares continuas en leishmaniasis esporotricóide

E) Leishmaniasis visceral o Kala azar (LV)

Esta forma clínica de leishmaniasis es causada por *Leishmania donovani* y *Leishmania donovani chagasi* en el nuevo mundo. Tiene un periodo de incubación de dos meses a un año y afecta principalmente el bazo, hígado, mucosas del intestino, medula ósea y otros tejidos linfáticos (3). Los estados donde se han reportado casos son Puebla, Oaxaca, Chiapas y Morelos (figura 5).



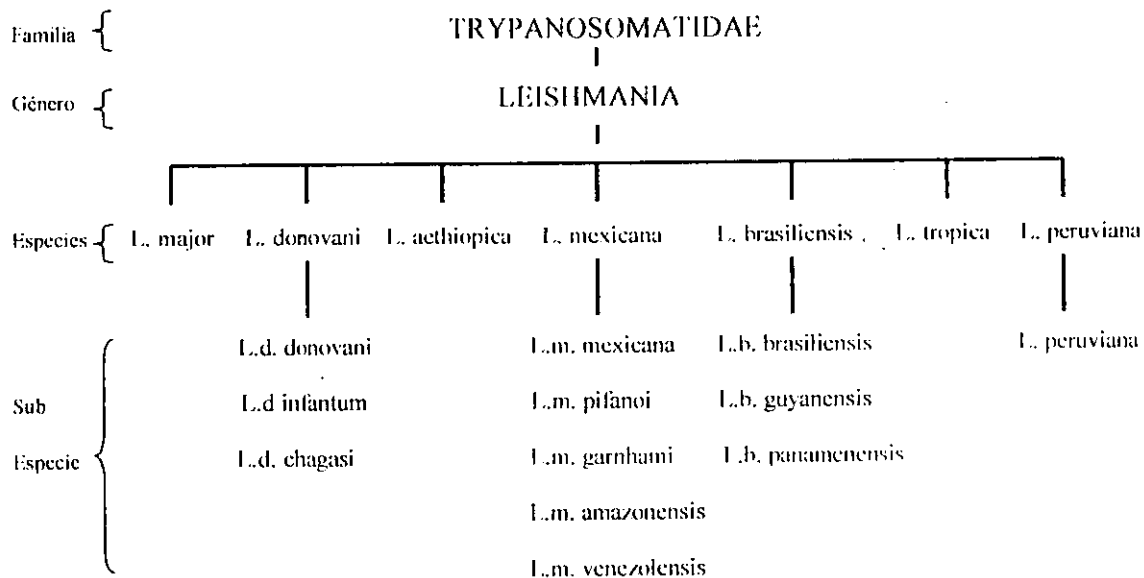
Figura 5. Hepatoesplenomegalia en leishmaniasis visceral.

Características diferenciales en tres formas clínicas de leishmaniasis cutánea en México.

	LCL	LCD	LPD
Lesión	Unica	Todo el cuerpo	Múltiple y subsecuente
Tipo de lesión	Úlcera	Nódulos	Nódulos subsecuentes
Vía de diseminación	Linfática	Tisular y linfática	Tisular y linfática
Diseminación a mucosas	Muy rara	Frecuentemente	No observada
Parásitos en improntas	Escasos	Muy abundantes	escasos
Respuesta a tratamiento	Cura con tratamiento	De difícil tratamiento	De difícil tratamiento
Intradermoreacción	Positiva	Negativa	Negativa

TAXONOMIA

La Organización Mundial de la Salud (OMS), distingue 7 especies de leishmanias: *L. major*, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. brasiliensis*, *L. tropica* y *L. peruviana* (3).

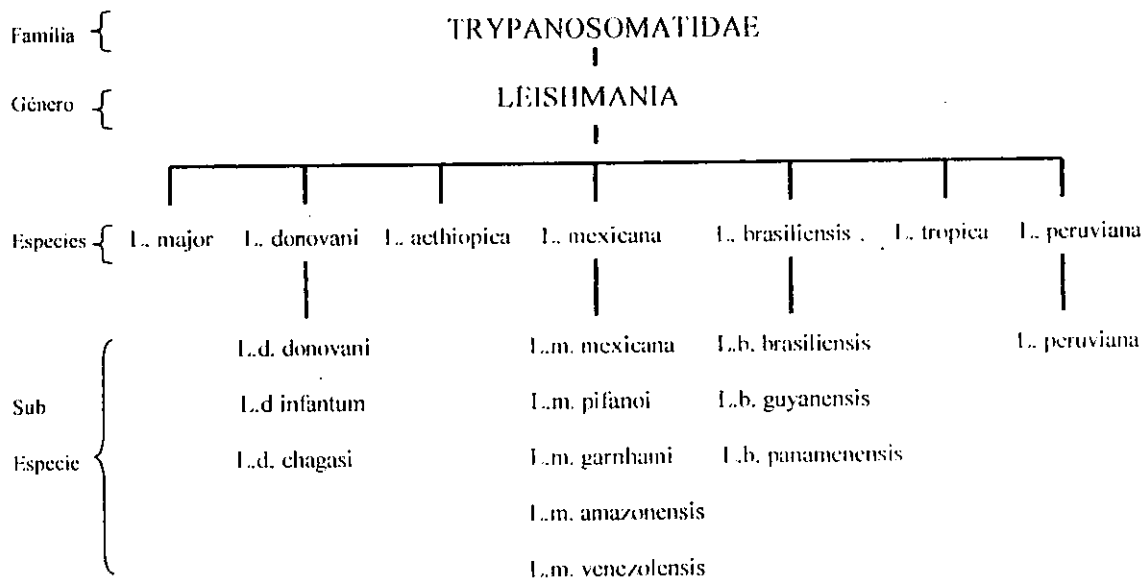


CICLO BIOLÓGICO DE *LEISHMANIA*

La infección por *Leishmania* inicia cuando un mosquito infectado con el promastigote, que es la fase móvil (de 15 a 20 micras de largo por 1.5 a 4 micras de ancho, presenta un núcleo central, flagelo anterior y que vive extracelularmente en el tracto digestivo del insecto) pica al huésped sano e inocula los promastigotes, los cuales son fagocitados por los macrófagos de la piel. En el interior del macrófago permanecen en el fagolisosoma y con las condiciones ácidas se transforman en amastigotes (forma oval de aproximadamente 5 micras de diámetro, con un núcleo excéntrico, un cinetoplasto y no posee flagelo). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, llevando a la lisis a la célula hospedera y los

TAXONOMIA

La Organización Mundial de la Salud (OMS), distingue 7 especies de leishmanias: *L. major*, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. brasiliensis*, *L. tropica* y *L. peruviana* (3).



CICLO BIOLÓGICO DE *LEISHMANIA*

La infección por *Leishmania* inicia cuando un mosquito infectado con el promastigote, que es la fase móvil (de 15 a 20 micras de largo por 1.5 a 4 micras de ancho, presenta un núcleo central, flagelo anterior y que vive extracelularmente en el tracto digestivo del insecto) pica al huésped sano e inocula los promastigotes, los cuales son fagocitados por los macrófagos de la piel. En el interior del macrófago permanecen en el fagolisosoma y con las condiciones ácidas se transforman en amastigotes (forma oval de aproximadamente 5 micras de diámetro, con un núcleo excéntrico, un cinetoplasto y no posee flagelo). Los amastigotes se multiplican por fisión binaria, llevando a la lisis a la célula hospedera y los

parásitos son liberados. Estos invaden a otras células fagocíticas donde vuelven a proliferar. Pueden circular por sangre o líquido tisular hasta que nuevamente son ingeridos por el mosquito y los amastigotes se transforman en promastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria en el tracto digestivo de mosquito. Los promastigotes maduros migran a la probóscide y al picar el mosquito, éste regurgita al parásito, infectando así a otras células del sistema fagocítico mononuclear, cerrándose el ciclo de vida (6). (figura 6).

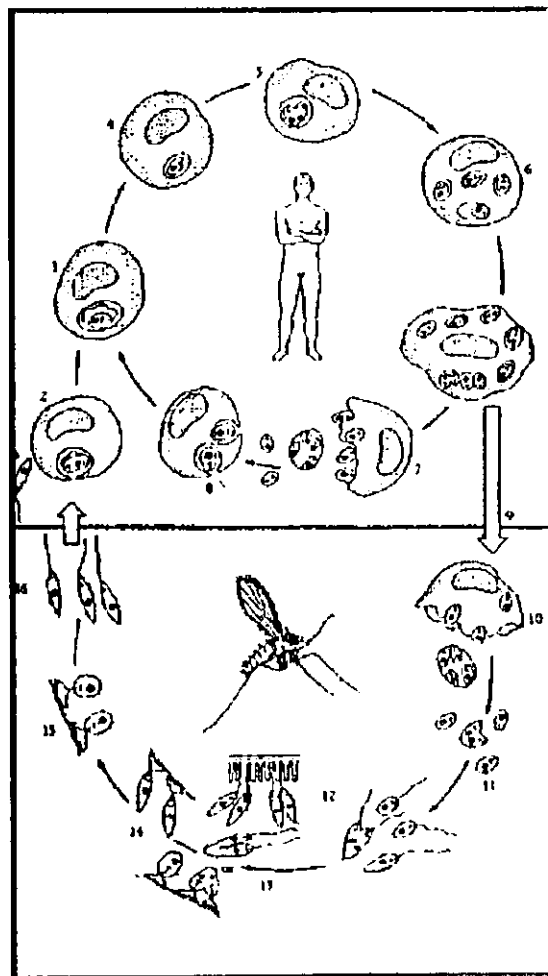


Figura 6. (1)inoculación de promastigote por picadura, (2)fagocitosis del promastigote, (3)fusión del fagolisosoma con el lisosoma del macrófago, (4)diferenciación del promastigote a la fase de amastigote, (5 y 6) multiplicación de amastigotes, (7)lisis del macrófago y liberación de amastigotes, (8) fagocitosis de amastigotes liberados, (9)ingestion de amastigotes por el vector. (10-16) desarrollo del promastigote dentro del vector.

MOLECULAS DE *LEISHMANIA* QUE INTERVIENEN EN LA FISIOPATOGENIA DE LA RELACION HUESPED-PARASITO:

La sobrevivencia del amastigote en el fagolisosoma del macrófago depende de los mecanismos de protección que el parásito posee. Existe evidencia de que esta protección está basada en dos moléculas, que se encuentran en la pared extracelular del parásito que son una glicoproteína de 63 kDa (gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG) (7).

GLICOPROTEINA Gp63

Una de las moléculas importantes que se encuentra en la superficie de *Leishmania* en los dos estadios del ciclo de vida del parásito es la glicoproteína de 63 kDa. Es una proteína anfifílica de superficie con aproximadamente 500,000 copias por promastigote, constituyendo así el 1% del total de las de las proteínas presentes del parásito (8,9).

Función de Gp63

A) En la fagocitosis.

La gp63 es una metaloenzima dependiente de zinc, que tiene una actividad proteolítica a un pH óptimo entre 3 y 4 (10,11). Se ha demostrado que esta glicoproteína tiene residuos N-acetilglucosamina, manosa y galactosamina que juegan un papel importante en la interacción parásito-macrófago, debido a que son reconocidos por los receptores manosa-fucosa y con los receptores Mac-1 (CR3) del macrófago (12,13).

B) Sobrevivencia intracelular

También se ha demostrado que la actividad proteolítica de la gp63 se ve aumentada en el interior del fagolisosoma, protegiendo al amastigote de la degradación intralisosomal ejercida por enzimas lisosomales, lo cual favorece a la sobrevivencia intracelular del parásito (14).

MOLECULAS DE *LEISHMANIA* QUE INTERVIENEN EN LA FISIOPATOGENIA DE LA RELACION HUESPED-PARASITO:

La sobrevivencia del amastigote en el fagolisosoma del macrófago depende de los mecanismos de protección que el parásito posee. Existe evidencia de que esta protección está basada en dos moléculas, que se encuentran en la pared extracelular del parásito que son una glicoproteína de 63 kDa (gp63) y los lipofosfoglicanos (LPG) (7).

GLICOPROTEINA Gp63

Una de las moléculas importantes que se encuentra en la superficie de *Leishmania* en los dos estadios del ciclo de vida del parásito es la glicoproteína de 63 kDa. Es una proteína anfífila de superficie con aproximadamente 500,000 copias por promastigote, constituyendo así el 1% del total de las de las proteínas presentes del parásito (8,9).

Función de Gp63

A) En la fagocitosis.

La gp63 es una metaloenzima dependiente de zinc, que tiene una actividad proteolítica a un pH óptimo entre 3 y 4 (10,11). Se ha demostrado que esta glicoproteína tiene residuos N-acetilglucosamina, manosa y galactosamina que juegan un papel importante en la interacción parásito-macrófago, debido a que son reconocidos por los receptores manosa-fucosa y con los receptores Mac-1 (CR3) del macrófago (12,13).

B) Sobrevivencia intracelular

También se ha demostrado que la actividad proteolítica de la gp63 se ve aumentada en el interior del fagolisosoma, protegiendo al amastigote de la degradación intralisosomal ejercida por enzimas lisosomales, lo cual favorece a la sobrevivencia intracelular del parásito (14).

LIPOFOSFOGLICANO

El LPG es sintetizado por todas las especies de *Leishmania*. Es el mayor glicoconjugado presente en la superficie del promastigote incluyendo el flagelo (15). Este glucolípido está formado por cuatro dominios principales:

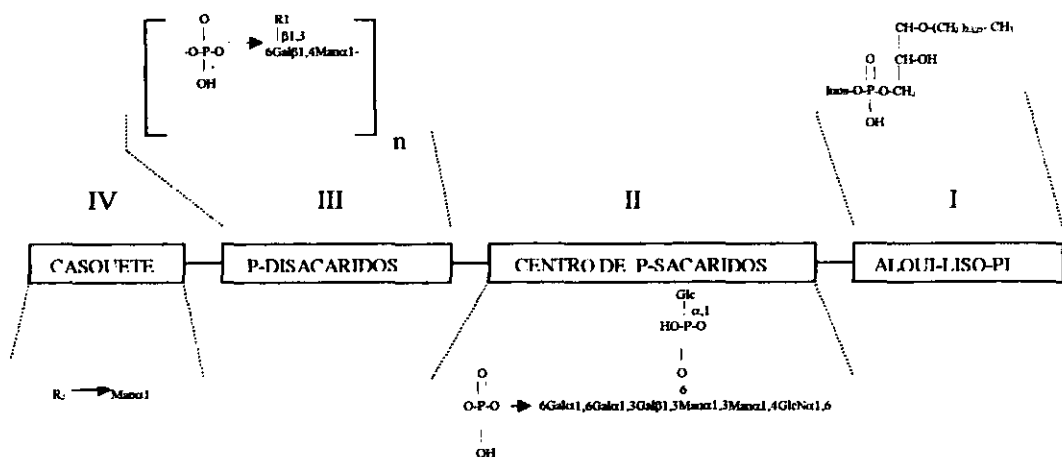
I) Región de anclaje 1-O-alkil-2-lisofosfatidilinositol.

II) Región central de fosfosacáridos constituida por glucosamina desacetilada, dos manosas, galactosa-6-fosfato, galactopiranososa y galactofuranosa.

III) Región de disacáridos fosforilados, esta región esta constituida por múltiples unidades repetidas de $PO_4^- \text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1)$.

IV) Región de oligosacáridos, esta región es el casquete terminal de la molécula que puede estar constituido por galactosa o furanosa. (16,17).

En la figura 7 se observan las principales diferencias en la estructura de LPG de tres especies de leishmanias.



	R ₁	R ₂
<i>L. donovani</i> (n=16)	-H	Manα1,2- Galβ1,4- Manα1,2[Galβ1,4]- Manα1,2 Manα1,2- Manα1,2 Manα1,2[Galβ1,4]-
<i>L. major</i> (n=27)	H Gal Araα1,2Gal Galβ1,3Gal- Glcβ1,3Gal- Araα1,2Galβ1,3Gal Galβ1,3Galβ1,3Gal Araα1,2 Galβ1,3Galβ1,3Gal-	Manα1,2
<i>L. mexicana</i> (n=16)	H Glc	Manα1,2 Manα1,2 Manα1,2- Manα1,2[Galβ1,4]-

Figura 7. Diferencias en la estructura de LPG en tres especies de *Leishmania*. Se encuentra una gran diversidad en las unidades de repetición sacarídicas de la molécula R₁ y los diferentes disacáridos y trisacáridos en R₂, en diferentes cepas y especies de *Leishmania*, dando por resultado una gran diversidad antigénica.

Función de LPG:

A) Resistencia al complemento

Entre el tiempo de inoculación y de infección del macrófago, el promastigote extracelular está expuesto a la lisis por la activación del complemento ya sea por la vía clásica o la vía alterna. Al activarse el factor C3 por alguna de estas dos vías y con la acción de la convertasa del C3, dará origen a los factores C3b y C3bi que son fijados por el LPG en la

membrana extracelular del parásito. Estos componentes del complemento una vez fijados por el parásito son reconocidos por los receptores del macrófago, CR1 para el factor C3b y el receptor Mac-1 (CR3 o receptor manosa-fucosa) para el factor C3bi y de esta forma el parásito es fagocitado por el macrófago. (18,19). Mediante esta opsonización la *Leishmania* es fagocitada por el macrófago y protegida de la lisis por complemento.

B) Sobrevida intracelular:

Una vez que el parásito es internalizado y se encuentra dentro del fagolisosoma se transforma en amastigote resistiendo a la acción de las enzimas hidrolíticas y los productos tóxicos de oxígeno, teniendo así la capacidad de sobrevida para seguir multiplicándose. Se ha estudiado la acción del LPG sobre cuatro enzimas hidrolíticas de macrófagos de ratón y se ha encontrado que LPG no afecta la actividad de la fosfatasa ácida, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosidasa, pero si se ve afectada en su actividad la enzima β -galactosidasa por acción de las cargas negativas de la LPG (20). Estudios *in vitro* han demostrado que *Leishmania* necesita por lo menos el 20% del total de moléculas de LPG intactas para lograr una sobrevida en el interior del fagolisosoma del macrófago. En la actualidad se siguen estudiando los mecanismos por los cuales LPG confiere protección al parásito ante los mecanismos microbicidas desencadenados por el macrófago (21).

Uno de los mecanismos más importantes que ha desarrollado la *Leishmania* para poder tener éxito en la sobrevida intracelular, es la inhibición de protein cinasa C (PKC), la cual es importante para desencadenar el estallido oxidativo que genera los compuestos tóxicos de oxígeno como es el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y el oxígeno singulete (18,22). Con PKC purificada de cerebro de rata se demostró la inhibición que ejerce el LPG sobre el estallido oxidativo de macrófagos. Este estudio reveló que el

LPG es un inhibidor competitivo del diacilglicerol (23). Estudios posteriores revelaron que el fragmento exhibido de LPG 1-O-alkilglicerol inhibe la acción de la PKC. Estos resultados sugieren que LPG interactúa con el dominio de regulación de PKC, el cual es el sitio de unión para el diacilglicerol, afectando así el papel de la PKC en la inducción del estallido oxidativo (24).

RESPUESTA INMUNE HACIA LA *LEISHMANIA*.

Respuesta inmune innata

Al penetrar la *Leishmania* al organismo se activan dos tipos de células importantes en la respuesta inmune natural inespecífica: las células NK (asesina natural) y los macrófagos. Los macrófagos juegan un papel central, primero fagocitan al parásito e inducen la respuesta inmune específica mediante la presentación del antígeno en combinación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con la activación de linfocitos CD4+ y con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) con activación de linfocitos CD8+. Adicionalmente liberan interleucinas como la interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12), las cuales a su vez son inductoras de la respuesta inmune específica. El papel de la IL-12 es crucial en la leishmaniasis debido a que activa un grupo de células productoras de interferón gamma (IFN γ), el cual es responsable de la activación subsecuente del macrófago y control de la enfermedad. Una de las células activadas por IL-12 es la célula NK. En modelos murinos Laskay encontró que la interacción temprana entre *Leishmania* y células NK es decisiva para la evolución del padecimiento, ya que la depleción de células NK durante las dos primeras semanas de la infección lleva a una exacerbación del padecimiento. El efecto

LPG es un inhibidor competitivo del diacilglicerol (23). Estudios posteriores revelaron que el fragmento exhibido de LPG 1-O-alkilglicerol inhibe la acción de la PKC. Estos resultados sugieren que LPG interactúa con el dominio de regulación de PKC, el cual es el sitio de unión para el diacilglicerol, afectando así el papel de la PKC en la inducción del estallido oxidativo (24).

RESPUESTA INMUNE HACIA LA *LEISHMANIA*.

Respuesta inmune innata

Al penetrar la *Leishmania* al organismo se activan dos tipos de células importantes en la respuesta inmune natural inespecífica: las células NK (asesina natural) y los macrófagos. Los macrófagos juegan un papel central, primero fagocitan al parásito e inducen la respuesta inmune específica mediante la presentación del antígeno en combinación con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II) con la activación de linfocitos CD4+ y con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) con activación de linfocitos CD8+. Adicionalmente liberan interleucinas como la interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12), las cuales a su vez son inductoras de la respuesta inmune específica. El papel de la IL-12 es crucial en la leishmaniasis debido a que activa un grupo de células productoras de interferón gama (IFN γ), el cual es responsable de la activación subsecuente del macrófago y control de la enfermedad. Una de las células activadas por IL-12 es la célula NK. En modelos murinos Laskay encontró que la interacción temprana entre *Leishmania* y células NK es decisiva para la evolución del padecimiento, ya que la depleción de células NK durante las dos primeras semanas de la infección lleva a una exacerbación del padecimiento. El efecto

protector ejercido por las células NK radica tanto en su actividad citotóxica como en la producción de IFN γ (25).

Respuesta inmune específica

Las infecciones por *Leishmania* desencadenan una respuesta inmune celular mediada por linfocitos T y una respuesta humoral mediada por linfocitos B.

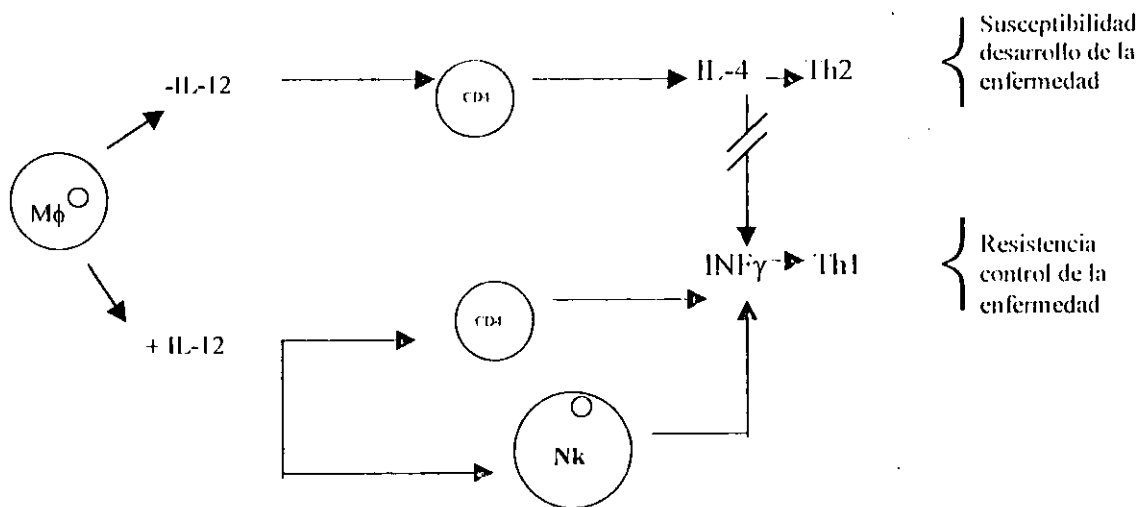
A) Respuesta inmune celular.

-Linfocitos T CD4+:

Se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ juegan un papel importante en la evolución de la enfermedad, en base al patrón de interleucinas que secretan. Estas células se pueden diferenciar en CD4+ tipo 1 (Th1) y CD4+ tipo 2 (Th2). Las células de tipo Th1 secretan interleucina 2 (IL-2), e IFN γ . La secreción de estas interleucinas lleva a la activación del macrófago. Las células de tipo Th2 liberan interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), e interleucina 10 (IL-10) (26). La presencia de IL-4 antagoniza la acción de IFN γ frente al macrófago. Aunque se desconoce mucho acerca de los factores responsables de la inducción hacia la respuesta Th1 ó Th2, se sabe actualmente que los niveles de IL-12 presentes en etapas tempranas del padecimiento son decisivos para el desenlace de la enfermedad. La capacidad del macrófago de secretar niveles altos de IL-12 se correlaciona con la inducción de la respuesta de tipo Th1. El papel de estas interleucinas se ha podido analizar en modelos murinos.

Los ratones naturalmente susceptibles a la *Leishmania* (BALB/c), cursan con una respuesta Th2 lo cual permite una multiplicación incontrolada del parásito y progresión del padecimiento.

En los ratones resistentes a la *Leishmania* (C57Bl/6) se desencadena una respuesta linfocitaria Th1, originando la liberación de IFN γ y la estimulación subsecuente del macrófago con el control de la enfermedad (27).



-Linfocitos T CD8+:

Los linfocitos T CD8+ son importantes células efectoras en el marco de la infección microbiana intracelular y se ha visto que los linfocitos T CD8+ juegan un papel esencial en la curación de reinfecciones por *L. major*. Los mecanismos de protección de los linfocitos T CD8+ pueden ser mediados por la producción de IFN γ o bien por su actividad como célula citotóxica, con la propiedad de lisar macrófagos infectados (28,29).

EL MACROFAGO

Características generales de los macrófagos.

Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear, dentro del cual se incluyen macrófagos del tejido, monocitos y promonocitos de sangre periférica, los cuales son derivados de promonocitos de médula ósea.

Los macrófagos son células grandes de aproximadamente 25 a 50 μm de diámetro y de superficie irregular. Tienen un núcleo en forma arriñonada. Presentan un citoesqueleto conformado por microtúbulos y microfilamentos que rodean al núcleo y se reparten por todo el citosol. En la cara interna de la membrana celular se encuentran filamentos de actina que intervienen en la formación de pseudópodos, en la movilidad celular y en los procesos de endocitosis. El citoplasma presenta un complejo de Golgi bien desarrollado, un número variable de vacuolas y vesículas pinocitarias, mitocondrias grandes y lisosomas asociadas a membranas (30).

Funciones

Los macrófagos intervienen en todas las fases de la respuesta inmune. Primeramente constituyen un mecanismo protector de acción rápida, que puede actuar antes de que se haya producido la amplificación mediada por las células T. Intervienen en las primeras fases de la activación de las células T, procesando y presentando los antígenos. Finalmente, tras ser activados por células T participan en la fase efectora, se comportan como células inflamatorias, antitumorales y antimicrobianas (31).

En forma general las funciones del macrófago se pueden resumir de la siguiente manera:

1. - Célula fagocítica
2. - Célula secretora de factores que pueden activar otros componentes del sistema inmune.

3. - Célula presentadora de antígenos a través de moléculas de clase I y II del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC).

4. - Célula efectora con eliminación de moléculas intracelulares.

Fagocitosis.

En el proceso de fagocitosis el macrófago ingiere partículas de más de $1\mu\text{m}$ de diámetro a través de pseudópodos formados por filamentos de actina. El proceso puede ser inhibido por citocalasina o bien por bajas temperaturas (4°C). Durante la fagocitosis el macrófago es activado, lo que conduce a un incremento en el consumo de oxígeno y la producción del anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Adicionalmente la activación lleva a la liberación de enzimas como la lisosima y la producción de varios factores quimiotácticos para neutrófilos. Se han descrito dos mecanismos de fagocitosis, en uno de ellos se rodea el material englobándolo con la membrana y en el otro el fagocito extiende un brazo que se enrolla a la partícula dando varias vueltas para la internalización del material con la posterior unión a las membranas. Es necesario un punto inicial de fusión a partir del cual las áreas restantes de la membrana se unan con sus contrapartes (modelo de zipper). La fagocitosis se clasifica como específica mediada por receptores e inespecífica cuando los receptores no se conocen. Los macrófagos poseen receptores para distintas moléculas del sistema inmune que median la fagocitosis como los receptores para las inmunoglobulinas y receptores para los componentes del complemento (31).

Receptores Presentes en la Superficie de Monocitos y Macrófagos:

1) Receptores para regiones Fc de inmunoglobulinas:

IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgE.

2) Receptores del complemento:

C3b, C3bi, C5a y C1q.

3) Receptores para interleucinas:

factor de inhibición de macrófagos (MIF), factor activador de macrófagos (MAF), factor de inhibición de la migración de leucocitos (LIF), factor de fusión de macrófagos (MFF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interferón α (IFN α), interferón β (IFN β), interferón γ (IFN γ), factor de estimulación de colonias (CSF).

4) Receptores para péptidos y moléculas pequeñas:

1,2,5-dihidroxi vitamina D₃, sustancia P, Arg-vasopresina.

5) Receptores para hormonas:

insulina, glucocorticosteroides y angiotensina

6) Receptores para transferrina y lactoferrina.

7) Receptores de lípidos y lipoproteínas:

lipoproteínas de baja densidad aniónica.

8) Receptor de coagulación y anticoagulantes:

fibrinógeno, factor de coagulación VII, α 1-antitrombina, heparina

9) Receptores de fibronectina.

10) Complejo de receptores para α ₂-macroglobulinas.

11) Otras:

agonistas colinérgicos, agonistas α 1-colinérgicos y agonistas β 2 adrenérgicos.

Célula secretora.

Los macrófagos son responsables de la secreción de muchas interleucinas que participan en el control de la respuesta inmune amplificando la respuesta local a la infección. Las interleucinas que se incluyen son interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

Mecanismos efectores del macrófago

Entre los mecanismos efectores más importantes del macrófago se encuentra la generación de reactivos intermediarios de oxígeno y de óxido nítrico generados durante el estallido oxidativo.

El estallido oxidativo.

La perturbación de la membrana del macrófago durante la fagocitosis induce al incremento de consumo de oxígeno, llamándose a este proceso estallido oxidativo. Durante este proceso la piridindinucleótido oxidasa (NADPH oxidasa) generara compuestos de oxígeno como son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2) y radicales hidroxilo ($^{\cdot}OH$) que son compuestos altamente microbicidas.

La NADPH oxidasa puede ser activada por diferentes partículas y agentes solubles; una vez activada la NADPH oxidasa, el citocromo b_{558} cataliza la transferencia de electrones generándose el O_2^- , el cual con ayuda de la superóxido dismutasa (SOD) dará origen al H_2O_2 . Este sustrato podrá ser reducido por tres mecanismos:

1.- Por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH) el H_2O_2 se convertirá en $H_2O + O_2$ (mecanismo de detoxificación).

2.- Por la acción de la mieloperoxidasa (MPO) el H_2O_2 se reducirá en ácido hipocloroso (HOCl) y como mecanismo de regulación el $\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2$ dará origen al $^1\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

3.- Por ultimo el H_2O_2 se catalizará por Fe^{2+} con generación $^{\cdot}\text{OH}$.

Todas estas moléculas serán generadas en las vacuolas fagocíticas con una gran actividad tóxica sobre los microorganismos (32,33).

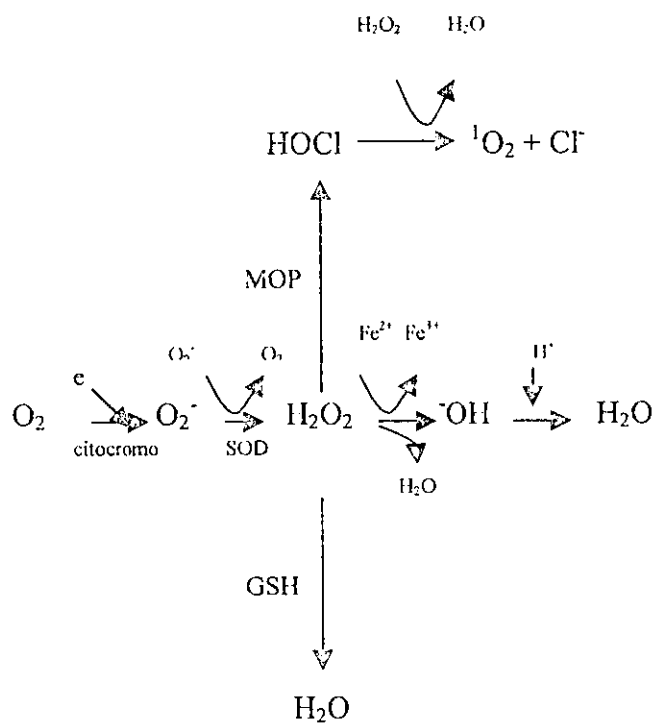


Figura 8. El estallido oxidativo inicia con el consumo de oxígeno generando así metabolitos tóxicos de oxígeno.

Se ha demostrado que también el acetato de forbol miristato (PMA) induce el estallido oxidativo mediante la activación de la protein cinasa C (PKC). Esto ocurre cuando el PMA induce la traslocación de la PKC desde el citosol hasta la membrana intracelular del

macrófago, donde es fosforilada (activada) y de esta forma es capaz de estimular a la NADPH oxidasa generando así todos los componentes tóxicos de oxígeno. (34,35,36).

Quimioluminiscencia.

La generación de moléculas reactivas como O_2^- , H_2O_2 , 1O_2 y $-OH$ como resultado del estallido oxidativo, son esenciales en la primera etapa de defensa contra los microorganismos desarrollada por el macrófago. La producción de estos metabolitos de oxígeno pueden ser medidos como emisión de luz llamada quimioluminiscencia nativa.

Esta emisión de luz nativa nos puede servir para determinar las características funcionales del macrófago en el proceso de fagocitosis. Esta producción de luz natural puede ser amplificada al adicionar luminol (5-amino-2,3-dihidro, 1-4-fetalazinedione). El luminol reacciona con las especies oxidantes produciendo así un aumento en la emisión de luz, la cual puede ser medida a aproximadamente 425 nm. De esta forma es posible monitorear la actividad de fagocitosis del macrófago con ayuda de un luminómetro (37,38).

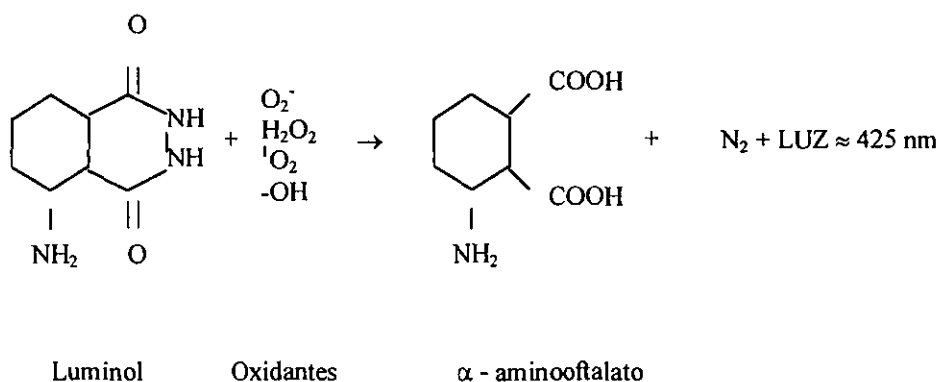


Figura 9. Reacción química del luminol con los metabolitos de oxígeno generando luminiscencia

Proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C (PKC) es una proteína serina/treonina cinasa dependiente de fosfolípidos. La actividad biológica de la PKC puede ser regulada por diacilglicerol (generado por el 4,5 difosfato) y también puede ser estimulada por promotores de tumores como los compuestos de forbol éster (36,39).

La PKC juega un papel importante en la regulación y proliferación celular, incluyendo producción de hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento (37,40).

En la actualidad se han reportado 11 isoformas de PKC las cuales se clasifican en tres grupos:

I) Convencional (PKCc): Este grupo requiere de fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+} para su activación y son PKC α , β 1, β 2

II) Nuevas (PKCn): Para su activación también requieren fosfatidilserina, diacilglicerol pero no de Ca^{2+} . A este grupo lo conforman la PKC γ , ϵ , η , θ y μ .

III) Atípicas PKC (PKCa) : Solo requieren Ca^{2+} para su activación, y son la PKC ξ y λ . (38,41).

PKC tiene una región amino terminal de regulación (de aproximadamente 20-40 kDa) y una región amino terminal catalítica (de 45 kD) y se ha encontrado que esta proteína tiene cuatro dominios muy conservados. El dominio C1 está formado por una región rica en cisteínas y este dominio es el lugar de unión para fosfolípidos, diacilglicerol y compuestos de forbol éster. El dominio C2 es el lugar de unión para el Ca^{2+} . Estos dos dominios son importantes para regular la actividad de PKC. El dominio C3 es el lugar catalítico de unión

para el ATP y por último el dominio C4 es el sitio de unión de la PKC al sustrato (41,42,43).

PAPEL DEL ESTALLIDO OXIDATIVO DE MACROFAGOS EN LA LEISHMANIASIS.

En modelos murinos se estableció la importancia del estallido oxidativo en el control de la leishmaniasis. En un estudio donde se usó *L. donovani* y *L. tropica* se demostró que el H_2O_2 y O_2^- juegan un papel importante en la actividad leishmanicida de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, ya que la inducción del estallido oxidativo con xantina oxidasa permitió que el macrófago podía destruir a los parásitos intracelulares debido a la generación de H_2O_2 y de O_2^- . Por otro lado macrófagos no estimulados y que por lo tanto no presentaban generación de estos compuestos oxidantes, no llegaban a eliminar a los parásitos intracelulares (44). En otro estudio se demostró la importancia del estallido oxidativo en macrófagos de ratones C57Bl/6, genéticamente resistentes a la leishmaniasis. Los macrófagos de estos animales fueron incubados con catalasa, llevando a una disminución en la generación de H_2O_2 y O_2^- lo cual permitió la sobrevida intracelular de amastigotes de *L. donovani* (45). En otros trabajos se habla que el destino de los amastigotes de *L. donovani* depende de la capacidad fagocítica de la célula y de la respuesta a generar H_2O_2 y O_2^- , esto es observado en la capacidad de monocitos humanos al matar en un 90% a los amastigotes de *L. donovani* y por el contrario este efecto no se observa en la línea celular J774G8 que tiene la capacidad de fagocitar pero no así de generar buenos niveles de H_2O_2 y O_2^- . Cuando estos dos tipos de células son parasitadas por amastigotes y se ponen en presencia de catalasa se observa que *L. donovani* es capaz de sobrevivir al efecto leishmanicida aun cuando éstas son estimuladas con interleucinas,

postulándose así que *L. donovani* es capaz de inmunoregular la respuesta de la célula hospedera (46). Posteriormente se demuestra que los mecanismos dependientes como los independientes de oxígeno en monocitos humanos sin estimular con interleucinas son incapaces de eliminar a los promastigotes y amastigotes de *L. donovani*. En este estudio se demuestra que los monocitos estimulados con interleucinas pueden generar un 50 % más de H_2O_2 y O_2^- que en los monocitos no estimulados ocasionando así que estos últimos no tengan una buena actividad leishmanicida (47).

En la actualidad se desconoce si la distinta gravedad del padecimiento en pacientes con leishmaniasis cutánea diseminada y pacientes con leishmaniasis cutánea localizada sea debido a distintos grados de inhibición del estallido oxidativo de los macrófagos por:

- 1) Infección por cepas con distinto grado de virulencia.
- 2) Distinta susceptibilidad de sus macrófagos a la acción inhibitoria de *Leishmania mexicana mexicana*.

Debido a que en México existen pacientes con una amplia gama de cuadros clínicos que se manifiestan con diferente intensidad y que varían desde un polo relativamente benigno como es la leishmaniasis cutánea localizada hasta el polo opuesto de evolución mortal como es la leishmaniasis cutánea difusa, se puede realizar un estudio comparativo de la susceptibilidad genética de los monocitos de pacientes con los distintos cuadros clínicos a ser inhibidos por leishmanias en una de sus funciones leishmanicidas más importantes, como es el estallido oxidativo.

Mediante el aislamiento de leishmanias de pacientes con LCD, LPD y LCL adicionalmente se puede realizar un estudio comparativo de la capacidad inhibidora sobre el estallido oxidativo que ejercen distintas cepas de parásitos.

HIPOTESIS

Existe una correlación entre el grado de inhibición del estallido oxidativo de macrófagos que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* y la gravedad del cuadro clínico encontrado en el huésped.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis cuantitativo y cualitativo del efecto que ejercen distintos aislados de *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de monocitos de pacientes con LCD, LCL y sujetos sanos como también de macrófagos peritoneales de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. - Evaluar el grado de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de monocitos purificados de pacientes con distintas formas clínicas de leishmaniasis (LCD, LCL) y de sujetos sanos.

HIPOTESIS

Existe una correlación entre el grado de inhibición del estallido oxidativo de macrófagos que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* y la gravedad del cuadro clínico encontrado en el huésped.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis cuantitativo y cualitativo del efecto que ejercen distintos aislados de *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de monocitos de pacientes con LCD, LCL y sujetos sanos como también de macrófagos peritoneales de ratones susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. - Evaluar el grado de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de monocitos purificados de pacientes con distintas formas clínicas de leishmaniasis (LCD, LCL) y de sujetos sanos.

2. - Evaluar el grado de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57Bl/6) a la leishmaniasis.
3. - Realizar un estudio comparativo del grado de inhibición del estallido oxidativo en monocitos humanos que ejercen distintas cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con distintos cuadros clínicos (LCD, LPD y LCL).
4. - Realizar un estudio comparativo del grado de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos murinos que ejercen distintas cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con distintos cuadros clínicos (LCD, LPD y LCL).
5. - Realizar un estudio comparativo de la sobrevivencia intracelular del parásito con el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57Bl/6) a la leishmaniasis.

Material y Métodos

Animales de laboratorio.

Ratones singénicos BALB/c de 8 semanas de edad.

Ratones C57Bl/6 de 8 semanas de edad, donados por el Dr. Raúl Mancilla del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomedicas UNAM.

Obtención de *Leishmania mexicana mexicana*

1.- Aislamiento del Parásito:

Para el aislamiento de *Leishmanias* de pacientes con LCD, LPD y LCL se seleccionó un nódulo no ulcerado, se desinfectó la zona con alcohol, se administró un anestésico local y se inyectaron 0.5 ml de solución salina estéril a la lesión y se aspiró bajo condiciones de esterilidad. El aspirado se cultivó en 5 ml de RPMI 1640 (GIBCO) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) a 25°C.

2.- Cultivo de Parásito (promastigote):

Del tubo de aislamiento, bajo condiciones de esterilidad se tomó una alícuota cada tercer día para verificar la proliferación y viabilidad del parásito. Una vez establecido el cultivo *in vitro* se obtuvieron los parásitos mediante centrifugación a 4000 r.p.m. por 10 min a 25°C. Adicionalmente se establecieron cultivos *in vivo* mediante la inoculación de 10⁶ promastigotes de cada uno de los aislados en el cojinete plantar izquierdo de ratones BALB/c de 8 semanas, para mantener la virulencia del parásito.

3.- Obtención de Macrófagos Peritoneales:

Se sacrificaron ratones mediante desnucamiento, y se eliminó la piel abdominal con la precaución de no romper el peritoneo. Se inyectaron 10 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) frío y estéril en la cavidad peritoneal del ratón (sin retirar la jeringa), se realizaron masajes sobre el abdomen del animal durante dos minutos y se aspiró el contenido peritoneal con la misma jeringa. El aspirado se colocó a un tubo cónico estéril y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. a 4°C. Se lavaron las células una vez en PBS y se resuspendieron en 1 ml. de RPMI 1640 con 10% SFB. Se realizó la cuenta en una cámara de Neubauer.

4.- Obtención de Monocitos Humanos:

De pacientes con distintas formas clínicas LCD y LCL se obtuvieron 10 ml de sangre periférica. Se purificaron las células mononucleares mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque 1007 (Sigma). Se diluyeron 10 ml de sangre en 50 ml de PBS estéril, pH 7.2 y cada 15 ml de sangre diluida se colocaron sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque 1007 y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 20 min a 20°C. Se aspiró la interfase y se lavó 2 veces en 10 ml de PBS estéril. El precipitado se resuspendió en 1 ml de RPMI 1640 con 10% de SFB y se realizó la cuenta de células en una cámara de Neubauer. El número de células por ml se calculó:

$\text{Células /ml} = \# \text{ de células} \times \text{factor de dilución} \times 10000 \times \text{volumen.}$

5.- Ensayos de Quimioluminiscencia.

Los ensayos de quimioluminiscencia se realizaron de acuerdo al método descrito por Frankenburg (48), donde se analiza la magnitud del estallido oxidativo inducido por acetato de forbol miristato (PMA), el cual activa la PKC e induce el estallido oxidativo.

El estallido oxidativo con la producción de metabolitos reactivos de oxígeno fué analizado mediante la quimioluminiscencia en presencia de 60 μM de luminol (Sigma) utilizando un luminómetro (Labsystem Finlandia) controlado a 37° C. El estallido oxidativo fue inducido con 5×10^{-4} M de PMA y fue monitoreado cada 40 segundos durante una hora. Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de parásitos utilizando una relación de 10×10^6 promastigotes por 1×10^6 macrófagos por pozo suspendidos en 40 μl de RPMI en presencia de 210 μl luminol y 60 μl de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

Las células utilizadas fueron monocitos de pacientes con distintas formas clínicas de leishmaniasis (LCD, LCL) y sujetos sanos así como macrófagos peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57Bl/6) a la leishmaniasis.

Procedimiento

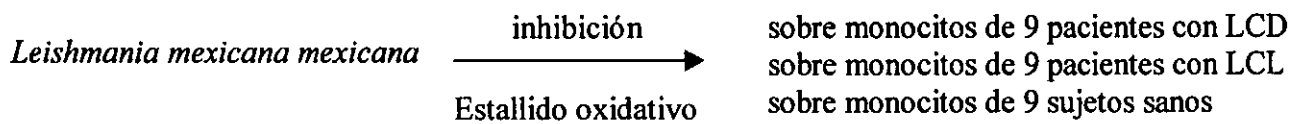
Las leishmanias utilizadas fueron cosechadas en fase logarítmica (4 días de cultivo).

Cada ensayo consistió en la inducción del estallido oxidativo de monocitos y macrófagos solos (control) y en presencia de leishmanias en relación 1:10 respectivamente (experimental).

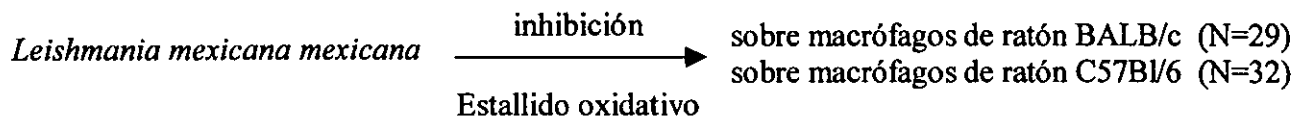
El pozo control consistió de células en ausencia de parásitos: 1×10^6 células resuspendidas en 40 μl de RPMI, 210 μl de Luminol y 60 μl de PMA. (vol. total 310 μl).

El pozo experimental consistió de 1×10^6 células resuspendidas en $20 \mu\text{l}$ de RPMI, en presencia de 10×10^6 parásitos resuspendidos en $20 \mu\text{l}$ de RPMI, $210 \mu\text{l}$ de luminol y $60 \mu\text{l}$ de PMA. (vol. total $310 \mu\text{l}$).

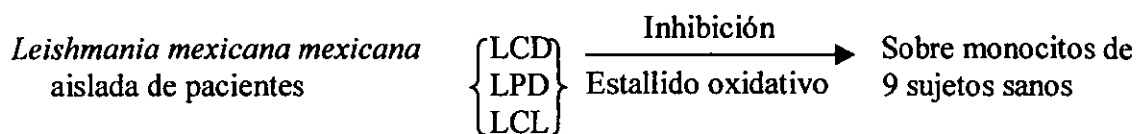
Inicialmente se realizaron experimentos en los cuales se analizó la inhibición del estallido oxidativo que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre monocitos purificados de pacientes con LCD, LCL y sujetos sanos referidos en el objetivo 1.



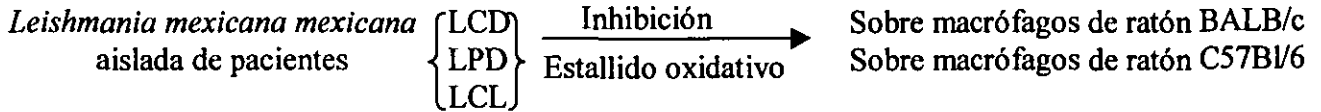
En otro grupo de experimentos se analizó la inhibición del estallido oxidativo que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57Bl/6) (objetivo 2).



Para el análisis comparativo entre distintas cepas (objetivo 3) se utilizaron cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con LCD, LPD y LCL.



Adicionalmente se realizó el mismo ensayo utilizando macrófagos de ratones susceptibles y resistentes (objetivo 4).



6. - Inhibición de Estallido Oxidativo.

Para determinar el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania* se emplea la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = (1-X) \times 100$$

Donde X es la lectura en mV obtenida por los macrófagos en presencia de *Leishmania* (pozo experimental), dividida por la lectura en mV obtenida por los macrófagos en ausencia del parásito (pozo control).

Para el análisis estadístico se empleó la prueba estadística de U de Mann-Whitney.

7. - Sobrevida de parásitos intracelulares.

Para el análisis de la efectividad del estallido oxidativo de los macrófagos de ratones BALB/c vs C57Bl/6 a la *Leishmania mexicana mexicana* (objetivo 5) se aislaron macrófagos peritoneales de ambas cepas de ratones.

Se purificaron los macrófagos mediante adherencia a cajas petri por 1 hora a 37°C, posteriormente se lavaron las cajas petri para eliminar células no adherentes. Estos macrófagos fueron infectados con *Leishmania mexicana mexicana* mediante la coincubación del parásito con las células por 4 horas a 28°C en relación 10:1. Para eliminar

el exceso de parásitos no fagocitados, se lavaron las cajas con PBS verificando al microscopio hasta obtener cajas libres de parásitos extracelulares.

Las cajas se incubaron en RPMI mas 10% SFB a 37°C en 5% CO₂ por 48 horas, para asegurar la muerte de los promastigotes extracelulares que no sobreviven a temperaturas mayores de 28°C permitiendo así únicamente la sobrevida de amatigotes intracelulares.

En estos macrófagos se indujo el estallido oxidativo con 60 µl de PMA durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se lavaron las células adherentes para eliminar el PMA.

Finalmente las placas se incubaron a 28°C en RPMI más 10% de SFB para facilitar la multiplicación intracelular y sobrevida de promastigotes.

Se realizó un monitoreo diario con conteo de leishmanias sobrevivientes y liberadas al medio de cultivo después de la inducción del estallido oxidativo de las células. El conteo se realizó hasta 24 horas después de iniciarse la liberación de parásitos al medio de cultivo.

Como grupos control se analizó la sobrevida de los promastigotes liberados en macrófagos de ambas cepas de ratones que no fueron sometidas al estallido oxidativo con PMA.

RESULTADOS

Los resultados de los objetivos 1 y 2 en los cuales se analizó la susceptibilidad a la inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de distintos huéspedes humanos y murinos, revelaron lo siguiente:

- en el caso del objetivo 1 donde se comparan ensayos del porcentaje de inhibición en el estallido oxidativo que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre monocitos de pacientes con LCD, LCL y sujetos sanos se observó:
 - a) Los monocitos de pacientes con LCD son inhibidos un 47.89%.
 - b) Los monocitos de pacientes con LCL son inhibidos un 21.88%.
 - c) Los monocitos de sujetos sanos son inhibidos un 28.55%.

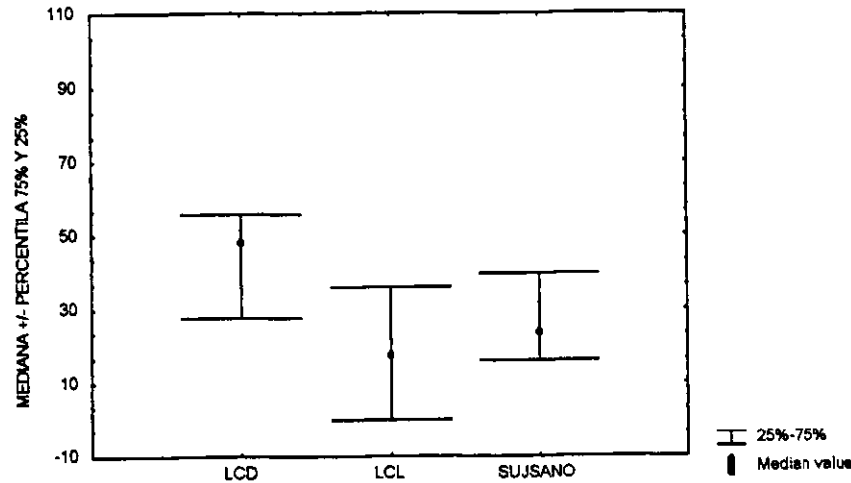
En la gráfica 1 se representan los valores de la mediana y percentila 25 y 75% (Gráfica 1.a), adicionalmente se graficó el promedio con desviación estándar de los mismos datos (Gráfica 1.b).

El análisis estadístico de U de Mann-Whitney mostró que las diferencias en el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo de pacientes con LCD vs LCL son altamente significativas ($p < 0.0242$); así mismo, las diferencias de inhibición entre sujetos sanos y pacientes con LCD son significativas ($p < 0.0379$). Interesantemente, las diferencias del porcentaje de inhibición del estallido oxidativo entre pacientes con LCL y sujetos sanos no fueron estadísticamente significativas, ya que se reportó una $p = 0.452$. En la cuadro 1.1 se representan los valores numéricos para estos ensayos de quimioluminiscencia de estos análisis.

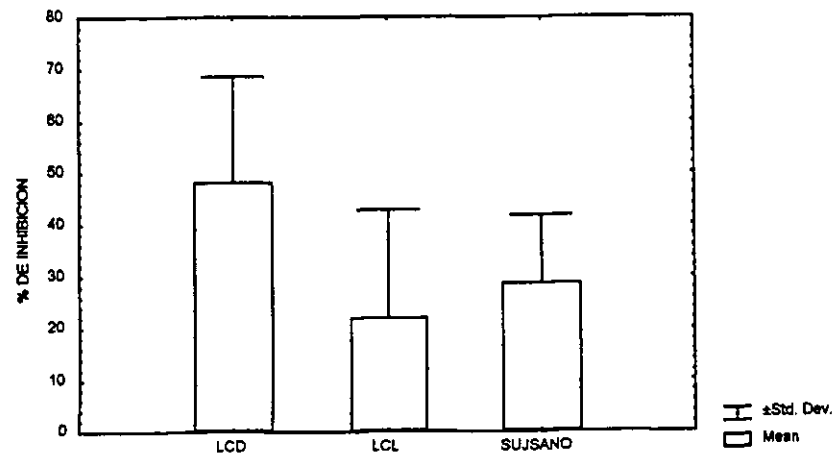
En resumen, se puede observar que en pacientes con leishmaniasis, la magnitud de la inhibición del estallido oxidativo de sus monocitos se correlaciona directamente con el cuadro clínico del paciente. Los pacientes con LCD presentan una inhibición significativamente mayor que pacientes con leishmaniasis cutánea localizada o de sujetos sanos.

INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO EJERCIDO POR *Leishmania mexicana mexicana* SOBRE MONOCITOS DE PACIENTES CON LCD, LCL Y MONOCITOS DE SUJETOS SANOS

Gráfica 1.a



Gráfica 1.b



Cuadro 1

PACIENTE	% DE INHIBICION
LCD	47.89
LCL	21.88
S.SANO	28.55
LCD vs LCL	p < 0.0242
LCD vs SANO	p < 0.0379
LCL vs SANO	p < 0.452

Gráfica 1

**LECTURAS OBTENIDAS EN LOS ENSAYOS DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE
MONOCITOS DE PACIENTES CON LCD, LCL Y SUJETOS SANOS CONFRONTADOS
CON *Leishmania mexicana mexicana*.**

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION			CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION			CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION		
9.41	4.90	47.94	329.40	153.70	53.34	8.26	4.69	43.25
3.72	0.51	86.35	358.40	346.20	3.40	11.89	6.79	42.91
23.00	16.64	27.65	298.50	170.00	43.05	23.27	12.75	45.20
2.60	1.52	41.63	93.80	87.28	6.95	2.03	1.29	36.30
2.92	1.30	55.68	198.10	201.50	0.00	4.18	3.51	16.09
0.58	0.21	64.35	71.40	72.40	0.00	7.05	5.62	20.29
52.70	43.09	18.24	74.26	41.68	43.87	1.17	1.02	12.48
81.48	35.92	55.92	79.70	65.75	17.50	1.05	0.87	17.19
113.20	75.49	33.31	111.97	79.67	28.85	4.44	3.40	23.48
LCD			LCL			S. SANO		

Cuadro 1.1

- Para el objetivo 2 donde se evaluó el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57Bl/6) a la leishmaniasis encontramos:

- a) El porcentaje de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratón BALB/c es de 28.83%.
- b) El porcentaje de inhibición que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratón C57Bl/6 es de 9.56%.

Las diferencias de inhibición del estallido oxidativo entre macrófagos de ambos huéspedes es altamente significativa con una $p < 0.005$.

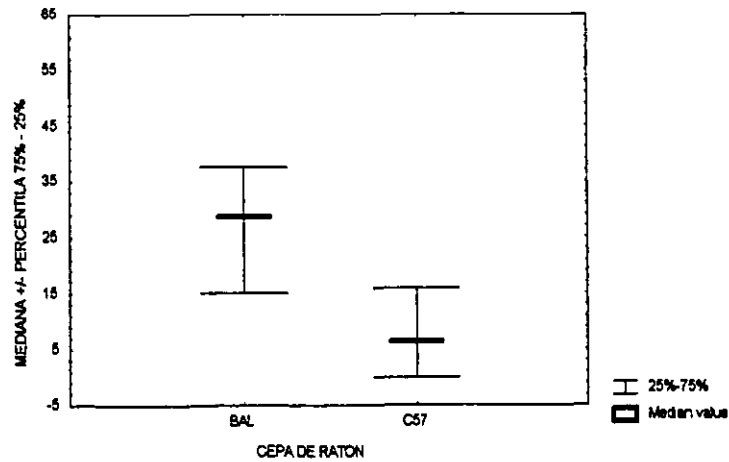
En la gráfica 2 se representan los valores de la mediana y percentila 75 y 25% (Gráfica 2.a), adicionalmente se graficó el promedio con su desviación estándar de los mismos datos (Gráfica 2.b).

Los valores numéricos para estos ensayos de quimioluminiscencia se muestran en el cuadro 2.1

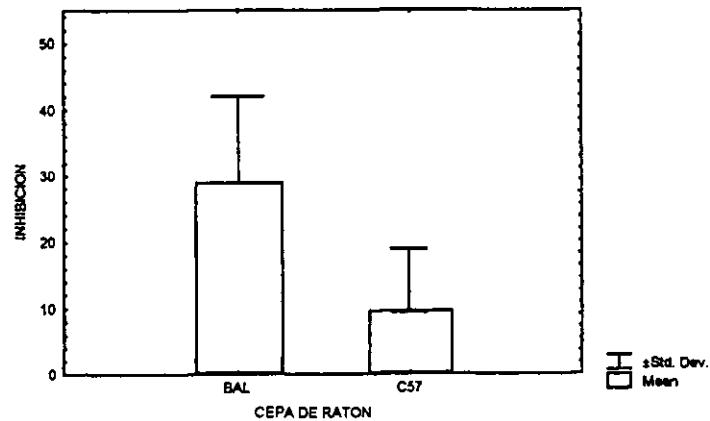
En el modelo murino observamos también que la gravedad del cuadro clínico se correlaciona directamente con la inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana*. Observamos que en ratones susceptibles BALB/c se presenta una inhibición significativamente mayor que en ratones resistentes C57Bl/6.

INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO EJERCIDO POR *Leishmania mexicana mexicana* SOBRE LOS MACROFAGOS DE DOS CEPAS DE RATON

Gráfica 2.a



Gráfica 2.b



Cuadro 2

AI SLADO	CEPA DE RATON	% DE INHIBICION
LCD	BALB/c	28.83
	C57BI/6	9.56

BALB/c vs C57BI/6 p < 0.005

Gráfica 2

LECTURAS OBTENIDAS EN EL ENSAYO DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE MACROFAGOS DE RATONES BALB/c y C57Bl/6 CONFRONTADOS CON EL AISLADO DE *Leishmania* LCD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

4.20	2.06	50.95
0.52	0.41	21.11
0.57	0.47	17.89
0.50	0.35	29.26
1.81	1.26	30.25
1.95	1.12	42.45
1.98	1.35	31.03
0.95	0.54	43.52
0.80	0.38	51.88
0.90	0.22	75.87
1.01	0.38	62.16
0.60	0.29	52.81
1.60	0.98	38.50
1.78	0.78	57.24
2.11	1.26	40.18
2.06	1.21	41.51
1.10	0.57	48.18
1.13	0.67	40.71
1.42	0.94	33.80
1.08	0.75	30.58
1.17	0.71	39.32
1.21	0.79	34.71
1.25	0.65	48.00
0.58	0.52	11.66
0.57	0.45	21.02
0.50	0.35	29.32
2.32	1.58	32.71
2.00	1.53	23.34
1.57	1.07	31.98

BALB/c

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

1.64	1.25	24.16
1.72	1.44	16.40
2.19	2.44	0.00
2.97	2.70	8.98
0.71	0.54	23.94
0.70	0.50	28.57
0.76	0.71	6.58
0.82	0.77	6.10
2.26	2.56	0.00
1.69	1.60	5.33
1.17	0.86	26.50
2.21	2.17	1.81
0.53	0.61	0.00
2.04	2.03	0.49
2.09	1.77	15.31
0.73	0.89	0.00
1.12	1.03	8.04
1.18	1.21	0.00

C57Bl/6

Para los resultados de los objetivos 3 y 4, en los cuales se realizó un estudio comparativo del grado de inhibición del estallido oxidativo que ejercen cepas de *Leishmania mexicana mexicana* que originan diferentes cuadros clínicos, se utilizó una cepa aislada de un paciente con un cuadro clínico muy grave (LCD), una cepa aislada de un paciente con un cuadro clínico de una gravedad intermedia (LPD) y una cepa aislada de un paciente con un cuadro clínico menos grave(LCL).

- En el objetivo 3 donde se analizó el grado de inhibición del estallido oxidativo que ejercen las cepas LCD, LPD y LCL sobre monocitos de sujetos sanos se encontró lo siguiente:

- a) La cepa aislada de pacientes con LCD inhibe el estallido oxidativo de monocitos un 28.55%
- b) La cepa aislada de pacientes con LPD inhibe el estallido oxidativo de monocitos un 10.1%
- c) la cepa aislada de pacientes con LCL inhibe el estallido oxidativo de monocitos un 28.50%.

Interesantemente no se encontraron diferencias en el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo de cepas productoras de LCD y LCL ya que los valores son casi idénticos ($p = 1$). Sin embargo, hay una diferencia significativa entre las cepas LCD y LCL vs LPD ($p < 0.0089$).

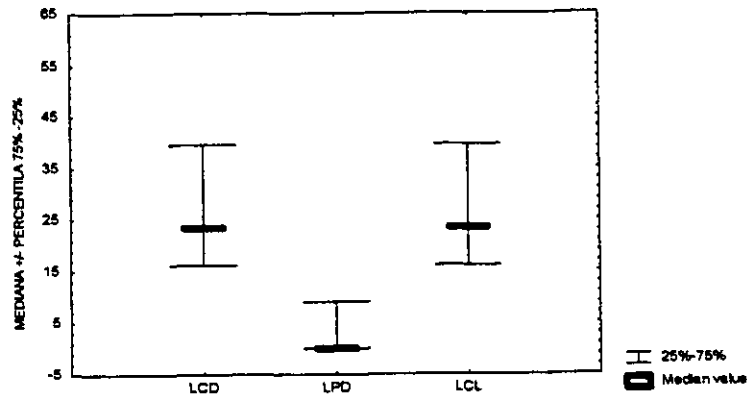
En la gráfica 3 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición del estallido oxidativo en monocitos de sujetos sanos ejercido por tres aislados de leishmanias que originan los cuadros clínicos LCD, LPD y LCL.

En la Gráfica 3-a se representan los valores de las medianas y percentilas 75 y 25 %.

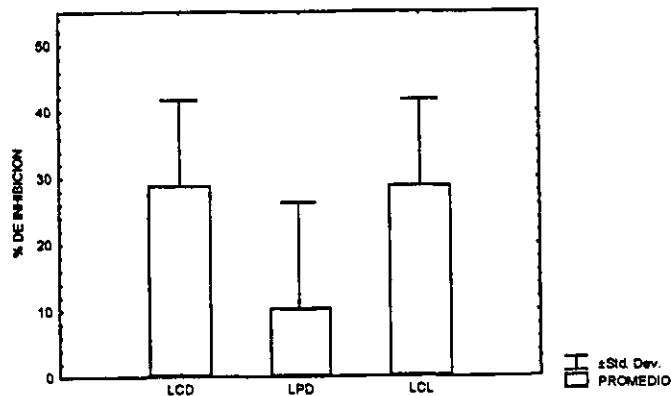
En la gráfica 3-b se analizan los valores promedio y su desviación estándar, en el cuadro 3.1 se muestran los valores numéricos obtenidos en estos ensayos de quimioluminiscencia. Estos resultados muestran que no existe correlación entre la cepa infectante de *Leishmania mexicana mexicana* y el grado de inhibición del estallido oxidativo de monocitos humanos. Cepas aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa presentan la misma inhibición que cepas aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada. Llama la atención que la cepa aislada de pacientes con leishmaniasis cutánea predifusa presente un grado de inhibición mucho menor que el de la cepa aislada de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y por lo tanto tampoco se correlaciona con el cuadro clínico.

INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO EJERCIDO POR CEPAS DE *Lesihmania mexicana mexicana* DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL SOBRE MONOCITOS DE SUJETOS SANOS

Gráfica 3.a



Gráfica 3.b



Cuadro 3

% DE INHIBICION	
AISLADO	
LCD	28.55
LPD	10.10
LCL	28.50

LCD vs LPD $p < 0.0089$

LCD vs LCL $p = 1$

LCL vs LPD $p < 0.0089$

LECTURAS OBTENIDAS EN LOS ENSAYOS DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE MONOCITOS DE SUJETOS SANOS CONFRONTADOS CON AISLADOS DE *Leishmania mexicana mexicana* OBTENIDAS DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

8.26	4.69	43.25
11.89	6.79	42.91
23.27	12.75	45.20
2.03	1.29	36.30
4.18	3.51	16.09
7.05	5.62	20.29
1.17	1.02	12.48
1.05	0.87	17.19
4.44	3.40	23.48

LCD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

0.53	3.96	0.00
21.72	18.11	16.62
0.30	2.46	0.00
1.27	2.31	0.00
1.46	2.22	0.00
1.73	2.06	0.00
41.00	17.59	57.10
33.64	30.40	9.63
27.63	25.31	8.40

LPD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

8.26	4.70	43.06
11.89	6.78	42.98
23.27	12.90	44.55
2.03	1.29	36.30
4.18	3.51	16.09
7.05	5.62	20.29
1.17	1.02	12.48
1.05	0.87	17.19
4.44	3.30	25.64

LCL

Cuadro 3.1

- En el objetivo 4 se realizó el estudio comparativo del grado de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos murinos que ejercen distintas cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con distintos cuadros clínicos LCD, LPD y LCL.

Al analizar el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo ejercido por cepas de leishmanias (LCD, LPD y LCL) sobre macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) se encontró que:

- a) La cepa aislada de pacientes con LCD inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c en un 28.83%.
- b) La cepa aislada de pacientes con LPD inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c en un 24.22%.
- c) La cepa aislada de pacientes con LCL inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c en un 38.34%.

Se observa una mayor inhibición del estallido oxidativo ejercida por el aislado LCL que por el aislado LCD. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.0301$). También se encontró que las diferencias en el porcentaje de inhibición del estallido oxidativo entre el aislado LCL vs LPD fue estadísticamente significativo ($p < 0.0062$). La comparación del grado de inhibición entre los aislados LCD y LPD reveló que no había diferencias significativas ($p = 0.2929$).

En la gráfica 4 se representan los resultados del porcentaje de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.

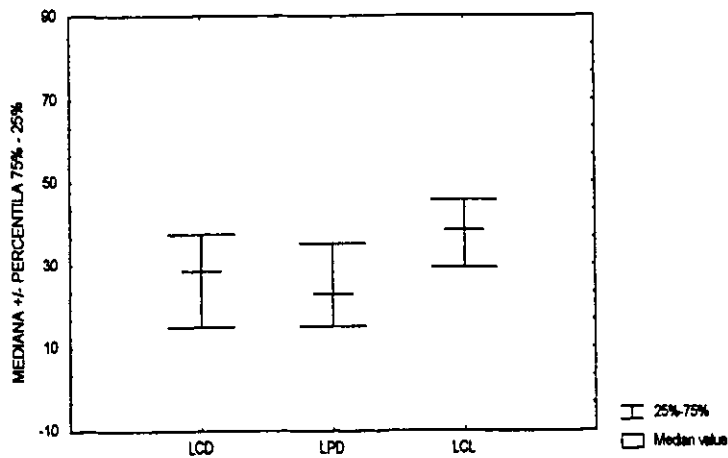
En la gráfica 4-a se muestran los valores de las medianas y percentilas 75 y 25 %.

En la gráfica 4-b se representan los valores promedio de inhibición y su desviación estándar, en el cuadro 4.1 se muestran los valores obtenidos en estos ensayos de quimioluminiscencia.

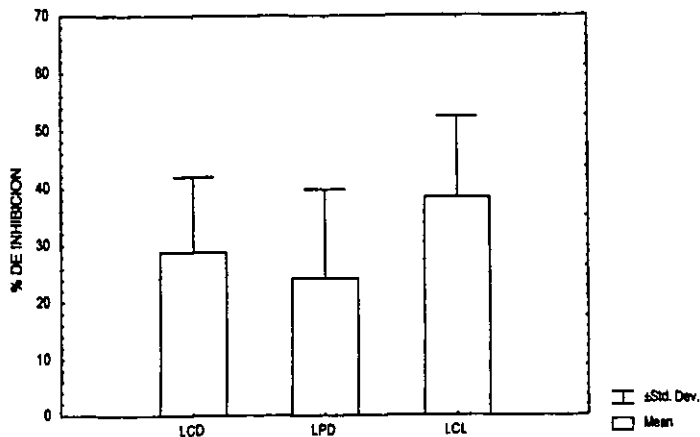
Al igual que en monocitos humanos en ratones BALB/c no existe correlación entre la cepa infectante y el grado de inhibición del estallido oxidativo que estas ejercen.

INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO EJERCIDO POR CEPAS DE *Leishmania mexicana mexicana* DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL SOBRE MACROFAGOS DE RATON BALB/c

Gráfica 4.a



Gráfica 4.b



Cuadro 4

% DE INHIBICION	
AISLADO	
LCD	28.83
LPD	24.22
LCL	38.34
LCL vs LCD p< 0.0301	
LCL vs LPD p< 0.0062	
LCD vs LPD p< 0.2929	

Gráfica 4.

LECTURAS OBTENIDAS EN LOS ENSAYOS DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE
 MACROFAGOS DE RATONES BALB/c CONFRONTADOS CON CEPAS DE
Leishmania mexicana mexicana AISLADAS DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION		
4.20	2.06	50.95
0.52	0.41	21.11
0.57	0.47	17.89
0.50	0.35	29.26
1.81	1.26	30.25
1.95	1.12	42.45
1.96	1.35	31.03
0.95	0.54	43.52
0.80	0.38	51.88
0.90	0.22	75.87
1.01	0.38	62.16
0.60	0.29	52.81
1.60	0.98	38.50
1.78	0.76	57.24
2.11	1.26	40.18
2.08	1.21	41.51
1.10	0.57	48.18
1.13	0.67	40.71
1.42	0.94	33.80
1.08	0.75	30.56
1.17	0.71	39.32
1.21	0.79	34.71
1.25	0.65	48.00
0.58	0.52	11.66
0.57	0.45	21.02
0.50	0.35	29.32
2.32	1.58	32.71
2.00	1.53	23.34
1.57	1.07	31.98

LCD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION		
0.33	2.67	0.00
0.44	0.33	23.91
0.40	0.33	18.20
0.47	0.41	12.66
0.46	0.39	15.15
0.54	0.41	24.81
0.54	0.42	23.11
0.46	0.30	35.29
0.08	0.07	16.87
0.10	0.08	17.71
1.67	0.74	55.46
1.08	1.05	2.32
1.47	1.05	28.55
1.27	0.72	43.68
1.34	0.73	45.69

LPD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION		
3.37	2.06	38.87
3.26	1.67	48.84
1.71	1.24	27.64
1.75	1.24	28.98
1.85	1.33	28.32
2.80	1.92	31.16
2.65	1.80	32.08
2.46	1.80	26.93
1.00	0.76	23.60
0.80	0.73	8.48
4.20	2.36	43.81
1.39	0.67	51.80
1.19	0.69	42.02
1.79	1.60	10.61
0.58	0.52	11.66
0.57	0.45	21.02
0.50	0.42	15.06
2.32	1.48	36.34
2.17	1.44	33.81
2.00	1.50	24.74
1.73	0.97	43.76
1.76	1.67	4.89

LCL

Cuadro 4.1

El análisis de la inhibición del estallido oxidativo ejercido sobre macrófagos peritoneales de ratón resistente (C57Bl/6) por cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con LCD, LPD y LCL reveló:

- a) La cepa aislada de pacientes con LCD inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón C57Bl/6 en un 9.56%.
- b) La cepa aislada de pacientes con LPD inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón C57Bl/6 en un 20.47%.
- c) La cepa aislada de pacientes con LCL inhibió el estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratón C57Bl/6 en un 10.46%.

En estos ensayos se observó un mayor grado de inhibición en el estallido oxidativo ejercido por el aislado LPD que por el aislado LCD. Esta diferencia es altamente significativa ($p < 0.036$), mientras que la diferencia en el grado de inhibición del estallido oxidativo entre los aislados LPD y LCL no es estadísticamente significativa ($p = 0.094$). Por último, también se observó que la diferencia en el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por los aislados LCD y LCL no son significativos ($p = 0.613$).

En la gráfica 5 se representan los resultados del porcentaje de inhibición del estallido oxidativo en macrófagos peritoneales de ratones C57Bl/6.

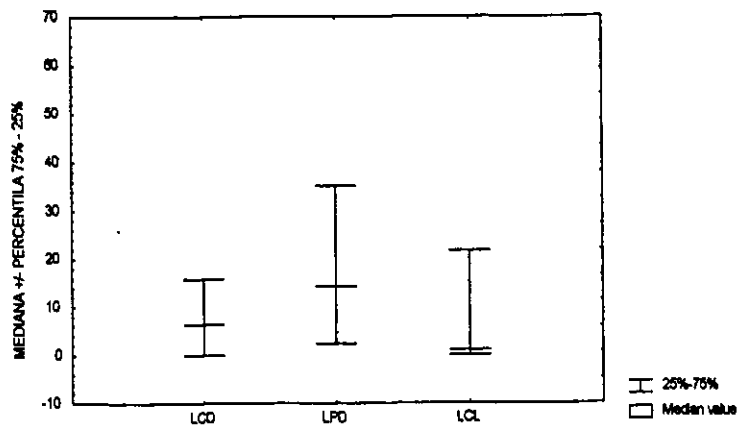
En la Gráfica 5-a se muestran los valores de las medianas y percentilas 75 y 25 %.

En la gráfica 5-b se representan los valores promedio de inhibición y su desviación estándar, en el cuadro 5.1 se muestran los valores obtenidos en estos ensayos de quimioluminiscencia para este análisis.

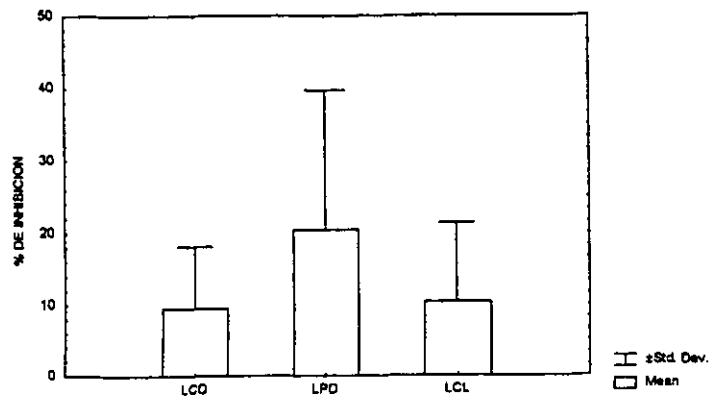
Al igual que en monocitos humanos y macrófagos de ratones susceptibles no existe correlación entre la cepa infectante y el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido sobre macrófagos de ratones C57Bl/6.

INHIBICION DEL ESTALLIDO OXIDATIVO EJERCIDO POR CEPAS DE *Leishmania mexicana mexicana* DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL SOBRE MACROFAGOS DE RATON C57BI/6

Gráfica 5.a



Gráfica 5.b



Cuadro 5

% DE INHIBICION	
AISLADO	
LCD	9.56
LPD	20.47
LCL	10.46

LCD vs LPD	$p < 0.036$
LCL vs LPD	$p < 0.094$
LCL vs LCD	$p < 0.613$

Gráfica 5

LECTURAS OBTENIDAS EN LOS ENSAYOS DE QUIMIOLUMINISCENCIA DE
MACROFAGOS DE RATONES C57BI/6 CONFRONTADOS CON CEPAS DE
Leishmania mexicana mexicana AISLADAS DE PACIENTES CON LCD, LPD Y LCL

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

1.64	1.25	24.16
1.72	1.44	16.40
2.19	2.44	0.00
2.97	2.70	8.96
0.71	0.54	23.94
0.70	0.50	28.57
0.76	0.71	6.58
0.82	0.77	6.10
2.26	2.56	0.00
1.69	1.60	5.33
1.17	0.86	26.50
2.21	2.17	1.81
0.53	0.61	0.00
2.04	2.03	0.49
2.09	1.77	15.31
0.73	0.89	0.00
1.12	1.03	8.04
1.18	1.21	0.00

LCD

Cuadro 5.5

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

0.88	0.60	31.16
0.83	0.74	10.29
0.79	0.73	8.69
0.83	0.63	24.43
0.92	0.61	33.55
0.85	0.67	21.28
0.71	0.48	32.26
0.85	0.83	2.46
0.73	0.82	0.00
0.69	0.34	51.24
0.83	0.74	10.29
0.79	0.73	8.69
0.85	0.67	21.28
0.85	0.83	2.46
0.73	0.82	0.00
0.12	0.11	7.50
0.85	0.61	28.13
0.71	0.54	23.98
0.85	0.78	9.04
0.12	0.11	8.33
0.12	0.14	0.00
0.88	0.51	42.12
0.83	0.51	38.74
0.79	0.50	37.03
0.83	0.36	56.20
0.92	0.30	67.43
0.85	0.61	28.13
0.71	0.54	23.98
0.85	0.78	9.04
0.73	0.38	47.11
0.69	0.44	35.37
0.63	0.40	35.89
0.53	0.18	66.03
0.39	0.48	0.00
0.46	0.30	35.13
0.55	0.27	51.36
1.40	1.26	10.20
1.78	1.81	0.00
1.48	1.23	16.75
2.07	1.77	14.28
1.19	1.42	0.00
2.13	2.19	0.00
0.39	0.36	3.60
0.42	0.45	0.00
0.60	0.54	9.06
0.48	0.48	0.00
0.52	0.53	0.00

LPD

CONTROL EXPERIMENTAL % INHIBICION

0.86	1.29	0.00
1.39	1.53	0.00
0.86	1.17	0.00
0.73	0.97	0.00
2.09	2.12	0.00
2.04	2.37	0.00
0.53	0.79	0.00
2.21	2.95	0.00
1.17	1.07	8.55
1.93	2.02	0.00
2.36	2.31	2.12
0.82	0.63	23.17
0.89	0.56	37.08
0.87	0.55	36.78
1.10	0.71	35.45
0.83	0.63	24.10
0.79	0.63	20.25
0.79	0.55	30.38
1.16	1.38	0.00
1.39	1.35	2.88
0.85	0.99	0.00
0.72	0.85	0.00
2.08	1.43	31.25
2.04	2.09	0.00
0.53	0.58	0.00
2.21	2.08	5.88
0.80	0.85	0.00
1.17	0.84	28.21
1.69	2.31	0.00
0.82	0.66	19.51
2.26	2.04	9.73
0.82	0.66	19.51

LCL

Los resultados del objetivo 5 en el cual se analizó la efectividad leishmanicida del estallido oxidativo de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c y C57Bl/6 revelaron lo siguiente:

- a) los macrófagos de ratón C57Bl/6 parasitados con amastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* no estimulados con PMA, presentaron una liberación promedio de 750200 parásitos mientras que macrófagos de C57Bl/6 estimulados con PMA presentaron un promedio de 104780 promastigotes. El estallido oxidativo inducido por PMA en macrófagos de ratones resistentes C57Bl/6 eliminan un 87.5% de parásitos intracelulares. Esto es altamente significativo ($p < 0.0001$).
- b) los macrófagos de ratón BALB/c que fueron parasitados con amastigotes de *Leishmania mexicana mexicana* no estimulados con PMA presentaron un promedio de 910160 parásitos, mientras que en los macrófagos estimulados con PMA se observó un promedio de 691300 parásitos. La estimulación con PMA de los macrófagos de ratón BALB/c únicamente llevó a un 26% de muerte del parásito intracelular, siendo esto estadísticamente significativo ($p < 0.01$).

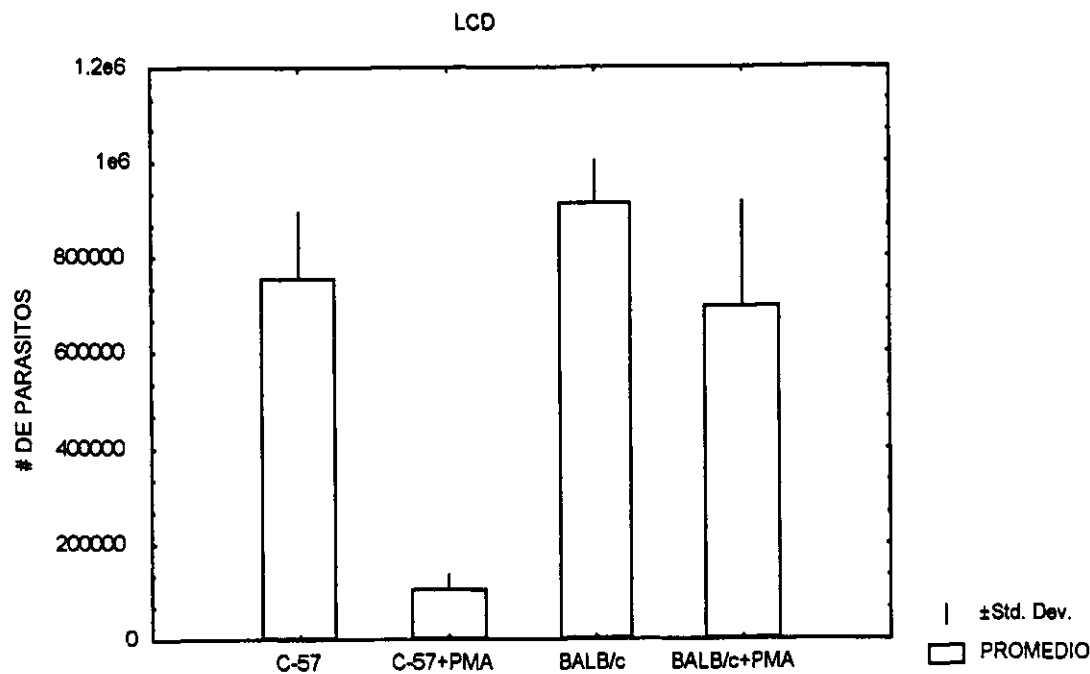
La sobrevivencia del parásito en macrófagos de ratones BALB/c estimulados con PMA es significativamente mayor que en macrófagos de ratones C57Bl/6 ($p < 0.000019$).

En ratones C57Bl/6 resistentes a la leishmaniasis el parásito únicamente inhibió un 9.56% el estallido oxidativo esto permitió que los macrófagos de estos ratones lograran la eliminación del 87.5% de los amastigotes intracelulares.

En cambio en ratones BALB/c susceptibles a la leishmaniasis, el parásito inhibió el estallido oxidativo de sus macrófagos en un 28.83%. esta inhibición se reflejó en una mayor sobrevivencia de amastigotes intracelulares, ya que únicamente se logró un 26% de muerte de amastigotes.

Se puede observar una correlación directa entre el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* en macrófagos de ratones BALB/c y la sobervida intracelular del parásito. Asimismo, en macrófagos de ratones C57Bl/6 *Leishmania mexicana mexicana* no induce una inhibición del estallido oxidativo tan severa como en macrófagos de ratones BALB/c y por lo tanto el estallido oxidativo es eficaz eliminando a un gran número de parásitos intracelulares. los resultados se presentan en la gráfica 6 y en el cuadro 6 se muestran los números obtenidos para este ensayo.

SOBREVIDA DE AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana mexicana* EN MACROFAGOS DE RATONES C57BI/6 Y BALB/c CON Y SIN PMA



C57BI/6 vs C57BI/6 con PMA $p < 0.0001$

BALB/c vs BALB/c con PMA $p < 0.010$

BALB/c con PMA vs C57BI/6 con PMA $p < 0.00019$

Gráfica 6

NUMERO DE PARASITOS LIBERADOS POR LOS MACROFAGOS DE RATONES C57BI/6 Y BALB/c ESTIMULADOS CON Y SIN PMA

RATONES C57BI/6		RATONES BALB/c	
# de parásitos	# de parásitos	# de parásitos	# de parásitos
892800	74400	725400	812200
806000	93000	843200	161200
613800	74400	967200	892800
793600	105400	849400	440200
458800	117800	868000	799800
961000	142600	1016800	682000
737800	68200	998200	812200
812200	155000	954800	775000
651000	86800	979600	812200
775000	130200	899000	725400
promedio =750200	promedio =104780	promedio =910160	promedio =691300
SIN PMA	CON PMA	SIN PMA	CON PMA

Cuadro 6

DISCUSION Y CONCLUSION

En este estudio se analizó el efecto que ejercen aislados de *Leishmania mexicana mexicana* sobre el estallido oxidativo de monocitos humanos y de macrófagos murinos. Los resultados aquí descritos apoyan nuestra hipótesis de que existe una correlación entre el grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* y la gravedad del cuadro clínico del huésped.

Los resultados sugieren que la inhibición del estallido oxidativo de macrófagos que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* es responsable de la propagación del padecimiento, ya que encontramos una correlación directa altamente significativa entre el grado de inhibición del estallido oxidativo de monocitos que ejerció el parásito y la gravedad del cuadro clínico del paciente. La inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre monocitos de pacientes con LCD es mayor en comparación a la inhibición que se presenta en los monocitos de pacientes con LCL y monocitos de sujetos sanos. Se observó que el efecto de inhibición que ejerció el parásito sobre los monocitos de pacientes con LCL es casi igual a la inhibición de los monocitos de sujetos sanos. Esto es sugestivo de que monocitos de los pacientes con LCL responden vigorosamente, con un estallido oxidativo adecuado que limita la sobrevida del parásito intracelular, para controlar la progresión de la enfermedad y de esta forma favorecer la curación.

En conclusión, monocitos de pacientes con LCD son inhibidos significativamente por *Leishmania mexicana mexicana*, esto permite la sobrevida del parásito y la progresión del padecimiento.

También en el modelo murino de leishmaniasis experimental encontramos una correlación directa altamente significativa entre el grado de inhibición del estallido oxidativo y la gravedad del padecimiento.

Cuando analizamos los resultados del grado de inhibición del estallido oxidativo ejercido por *Leishmania mexicana mexicana* sobre macrófagos de ratones susceptibles BALB/c pudimos observar que éste fue mucho mayor que el ejercido sobre los macrófagos de ratones resistentes a la infección por *Leishmania* que es el C57Bl/6.

Al estudiar el efecto que ejerce la inhibición del estallido oxidativo sobre la sobrevivencia intracelular del parásito encontramos una relación directa entre el grado de inhibición y la sobrevivencia del parásito. En el modelo murino se observó que *Leishmania mexicana mexicana* inhibió severamente el estallido oxidativo de macrófagos de ratones BALB/c, lo cual permitió una mayor sobrevivencia del parásito. Por el contrario, en macrófagos de ratones C57Bl/6 *Leishmania mexicana mexicana* no inhibió el estallido oxidativo tan drásticamente como en macrófagos de ratones BALB/c, por lo cual el parásito pudo ser eliminado debido a la adecuada generación de metabolitos de oxígeno.

Este estudio también reveló que no existen diferencias en la capacidad de inhibición del estallido oxidativo ejercido por cepas de *Leishmania mexicana mexicana* que originan distintos cuadros clínicos. Esto se observó tanto en monocitos de humanos sanos como en macrófagos murinos.

La cepa aislada del paciente con LCD no ejerció mayor inhibición sobre monocitos humanos ni macrófagos murinos, que las cepas aisladas de pacientes con cuadros clínicos de LPD o LCL. Encontramos que no existe correlación entre la cepa infectante y su capacidad de inhibición del estallido oxidativo.

Esto indica que la inhibición del estallido oxidativo depende de la susceptibilidad genética del huésped al parásito y no de la cepa infectante de *Leishmania mexicana mexicana*.

Estos resultados sugieren que *Leishmania mexicana mexicana* es capaz de modular una de las respuestas leishmanicidas más importantes del huésped, que es el estallido oxidativo y la magnitud de inhibición y por lo tanto, la susceptibilidad a la progresión del padecimiento, depende del fondo genético del huésped.

La inhibición temprana de la respuesta inmune innata que ejerce *Leishmania mexicana mexicana* se correlaciona directamente con el cuadro clínico y pronóstico, ya que en los monocitos de pacientes con LCD, el parásito logró una inhibición del estallido oxidativo más intensa que en monocitos de pacientes con cuadros clínicos menos graves.

Se ha demostrado que la susceptibilidad a la infección por *Leishmania* en el ratón está controlada genéticamente por el locus *Lsh* (*Ity* o *Bcg*), el cual se localiza en el cromosoma 1. Este gen codifica una proteína integral de membrana exclusiva de macrófagos denominada *Nramp1* (proteína de macrófagos asociada a la resistencia natural) (49). En el humano también se ha identificado a esta proteína la *NRAMP1*, que se localiza en el cromosoma 2q35 y que está asociada a la susceptibilidad a *Mycobacterium leprae* y a *Micobacterium tuberculosis*, pero se desconoce si *NRAMP1* tiene alguna relación con la susceptibilidad a *Leishmania* (50).

Una de las moléculas que pudieran ser responsables de la mayor susceptibilidad a la inhibición del estallido oxidativo por *Leishmania mexicana mexicana* en sujetos susceptibles a la leishmaniasis es la PKC. La PCK participa en la inducción del estallido oxidativo y se ha encontrado que la LPG de *Leishmania* la inhibe. Posiblemente el grado de inhibición se asocia con alguna de las 11 isoformas de la molécula. Sería interesante analizar si existen diferencias en la PKC presente en los macrófagos de pacientes con

mayor susceptibilidad a la leishmaniasis progresiva. Siendo la PKC una de las moléculas importantes para la activación del estallido oxidativo, alteraciones en esta molécula pudieran ser responsables de con una mayor susceptibilidad a la leishmaniasis progresiva observada en pacientes con LCD.

Hasta donde sabemos no hay antecedentes sobre el grado de inhibición del estallido oxidativo y su relación con la gravedad del cuadro clínico, tanto en el humano como en el modelo murino.

Adicionalmente se encontró que el grado de inhibición ejercido no depende del parásito sino del fondo genético del huésped.

BIBLIOGRAFIA

1. Velasco C. O. La magnitud de una infección endémica: las leishmaniasis. En: La seroepidemiología en México. Vol. I Pub. Tec.No. 9 Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Dirección General de Epidemiología en México. Secretaría de Salud México. 1991, 67-76.
2. Epidemiología, Diagnóstico, Tratamiento y Control de las leishmaniasis en América Latina. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud, 1994.
3. Velasco C. O. La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. SSA México, 1994.
4. Willems P., Schmidt S., Greer K., McCall C. and Pearson R. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis in a traveler. Southern Medical Journal. 1997, 90(3): 325-327.
5. Gaafar A., Fadl A. and Mahasin M. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* of different zymodemes in the Sudan and Saudi Arabia: a comparative study. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1994, 88: 552-554.
6. Chang K.P. and Fong D. Biology of *Leishmania* and leishmaniasis In: Leishmaniasis, human parasitic diseases. Vol. I Chang, K. P. and Bray, R. S., eds Elsevier Science Publishers, USA, 30. 1985.
7. Shankar A., Mitchen T., Hall L., Turco S. T. and Titus R. Reversion to virulence in *Leishmania major* correlates with expression of surface lipophosphoglycan. Molecular and Biochemical Parasitology. 1993, 61(2): 207-216.
8. Etges R., Bouvier J. and Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. The Journal of Biological Chemistry. 1986, 261(20): 9098-9101.
9. Medina A. E., Karess R. and Russell D. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. Molecular and Biochemical Parasitology. 1993, 57: 31-46.
10. Hon S., Orn A., Rusell D. and Cross G. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site specific neutral endopeptidase. Molecular and Biochemical Parasitology. 1990, 40:163-172.

11. Chaudhuri G., Chaudhuri M., Pan A. and Chang P. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. The Journal of Biological Chemistry. 1989, 264(13): 7483-7489.
12. Rusell D. and Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. The Journal of Immunology. 1986, 136(7): 2613- 2620.
13. Olafson R., Thomas J., Ferguson M., Dwek R., and Rademacher T. Structure of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. The Journal of Biological Chemistry. 1990, 265(21): 12240-12247.
14. Schneider P., Rosat J., Bouvier J., Louis J. and Bordier C. *Leishmania major*: Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. Experimental Parasitology. 1992, 75: 196-206.
15. Turco S.J. and Sacks D. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 1991, 45: 91-100.
16. Turco S.J. and Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania parasites*. Annual Review Microbiology. 1992, 46:65-94.
17. Turco S. J., Orlandi P., Homans S., Ferguson M., Dwek R. and Rademacher T. Structure of the phosphosaccharide-inositol core of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. The Journal of Biological Chemistry. 1989, 264(12): 6711-6715.
18. Puentes S., Dwyer D., Bates P. and Joner K. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. The Journal of Immunology. 1989, 143(11):3743-3749.
19. Mosser D., Springer T. and Diamond M. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). The Journal of Cell Biology. 1992, 116(2):511-520.
20. Descoteaux A. and Turco S.J. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. The Journal of Immunology. 1991, 146(8): 2747-2753.
21. MacNeely T. and Turco S.J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. The Journal of Immunology. 1990, 144(7): 2745-2750.
22. Pearson R. D., Harcus J. L., Roberts D. and Donowitz G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. The Journal of Immunology. 1983, 131(4): 1994-1999.

23. McNeely T. and Turco S. J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. Biochemical and Biophysical Research Communication. 1987, 148(2): 653-657.
24. McNeely T., Rosen G., Londner M.V. and Turco S. J. Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. Biochemical Journal. 1989, 15; 259(2): 601-4.
25. Laskay T, Röllinghoff M, and Solbach W. Natural killer cell participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. The Journal of Immunology. 1993, 23: 2237-2241.
26. Liew F. Y. Functional heterogeneity of CD4⁺T cells in leishmaniasis. Immunol Today. 1989, 10:40-44.
27. Bogdan C., Gessner A., Solbach W. and Röllinghoff M. Invasion, control and persistence of *Leishmania parasites*. Current Opinion in Immunology. 1996, 8: 517-525.
28. Müller I., Kropf P., Louis J. and Milon G. Expansion of gamma interferon producing CD8⁺ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. Infection and Immunity. 1994, 2576-2581
29. Müller I., Kropf P., Etges R. and Louis J. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. Infection and Immunity. 1993, 3730-3738.
30. Auger M. and Ross J. The Natural Immune System. The macrophage. Chapter 1. Edited by Lewis C. et al. Oxford. IRL Pres. 1992, 1-74.
31. Speert D. The Natural Immune System. The macrophage. Chapter 5. Edited by Lewis C. et al. Oxford. IRL Pres. 1992, 215-263.
32. Locksley R. and Klebanoff S. Oxygen dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. Journal of Cellular Biochemistry. 1983, 22:173-185.
33. Roitt I., Brostoff J. and Male D. "Inmunología" (Cuarta Edición). Grafos, S.A. Arte sobre papel, 1997,17.4-17.10.
34. Lundqvist H., Follin P., Khalfan L. and Dahlgren C. Phorbol myristate acetate induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: Only half the story has been told. Journal of Leukocyte Biology. 1996, 59: 270-279.

35. McNeely T. and Turco S. J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1987, 148: 653-657
36. Carreras M., Riobó N., Pargament G., Boveris A. and Poderoso J. Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. *Free Radical Research*. 1996, 26: 325-334.
37. The study of phagocytosis and opsonization using luminol enhanced chemiluminescence. *Luminescence Today*. Application Note 513.
38. Geeta B., Sodhi A. and Singh S. Studies on chemiluminescence and protein kinase-C activity of cisplatin treated mouse peritoneal exudate cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 1991, 13(1&2) 1-10.
39. Bareggi R., Grill V., Zweyer M., Narducci P. and Martelli A. Distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes in fetal organs of mice: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research*. 1995, 280:617-625.
40. Baier G., Telford D., Giampa L., and Altman A. Molecular cloning and characterization of KKCO, a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268(7): 4997-5004.
41. Tsao L. and Wang P. Translocation of protein kinase C isoform in rat neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997, 234: 412-418.
42. Hanks S. K. and Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb Journal*. 1995, 9(8): 576-596.
43. Walaas S. I. and Greengard P. Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacological Reviews*. 1991, 43(3): 299-349.
44. Murray H. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 1981, 153: 1302-1315.
45. Haidaris C. and Bonventre P. A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania donovani* tissue forms by activated macrophages. *The Journal of Immunology*. 1982, 129(2): 850-855.
46. Murray H. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 1982, 129:351-357.
47. Murray H. and Cartelli D. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*. 1983, 72:32-44.

48. Frankenburg S., Gross A. and Leibovici V. *Leishmania major* and *Leishmania donovani*: Effect of LPG-containing and LPG-deficient Strainson monocyte chemotaxis and chemiluminiscence. *Journal of Parasitology*. 1992, 75:442-447.
49. Vidal S. and Malo D. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Isolation of a candidate for Bcg. *Cell*. 1993, 73:469-485.
50. Liu J, Fujiwara T. M. Identification of polimorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *American Journal of Human Genetics*. 1995, 56(4):845-53.