

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE *Leishmania
mexicana* SOBRE CÉLULAS NK DE PACIENTES CON
LEISHMANIASIS CUTÁNEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

ROCELY BUENAVENTURA CERVANTES SARABIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. INGEBORG BECKER FAUSER.

MEXICO, D. F.

JULIO DEL 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Exp. núm. 55
V. A. DEP. 05

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
COORDINADOR DEL PROGRAMA DEL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Presente.

En contestación a su OFICIO FCIE/DEP/0027/04 de fecha 12 de enero de 2004

_____, me permito informarle que después de haber revisado el
trabajo presentado por el(a) alumna Rocely Buenaventura Cervantes
Sarabia

titulado "Análisis del efecto que ejerce *L. mexicana* sobre
células NK de pacientes con leishmaniasis cutánea"

considero que SI reúne los méritos necesarios para obtener el grado de SI/NO
en Ciencias Biología Celular

Atentamente.

Dra. Ingeborg D. Becker Fauser

Grado, nombre completo y firma

UNAM, Facultad de Medicina, Depto. Medicina Experimental

Lugar de trabajo

Fecha 2 de febrero de 2004



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Exp. núm. 55
V. A. DEP. 05

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
COORDINADOR DEL PROGRAMA DEL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Presente.

En contestación a su OFICIO FCIE/DEP/0027/04 de fecha 12 DE ENERO 2004

_____, me permito informarle que después de haber revisado el
trabajo presentado por el(a) ALUMNA ROCELY BUENAVENTURA CERVANTES
SARABÍA

titulado "ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE *L. mexicana* SOBRE
CÉLULAS NK DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA"

considero que SI reúne los méritos necesarios para obtener el grado de MAESTRA
SI/NO en Ciencias (BIOLOGÍA CELULAR)

Atentamente.

DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Grado, nombre completo y firma

UNAM, FACULTAD DE MEDICINA, DEPTO. DE BIOLOGÍA CELULAR Y TI-
Lugar de trabajo SULAR

Fecha 2 DE FEBRERO DE 2004



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Exp. núm. 55
V. A. DEP. 05

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
COORDINADOR DEL PROGRAMA DEL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Presente.

En contestación a su OFICIO FCIE/DEP/0027/04 de fecha 12 DE ENERO DE 2004

_____, me permito informarle que después de haber revisado el
trabajo presentado por el(a) ALUMNA ROCELY BUENAVENTURA CERVANTES
SARABIA

titulado "ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE *L. mexicana* SOBRE
CÉLULAS NK DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA"

considero que SI reúne los méritos necesarios para obtener el grado de ____
Maestra SI/NO en Ciencias (Biología Celular)

Atentamente.

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
Grado, nombre completo y firma

UNAM, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, DEPTO. DE IN-
Lugar de trabajo MUNOLOGÍA

Fecha 2 DE FEBRERO DE 2004



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Exp. núm. 55
V. A. DEP. 05

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
COORDINADOR DEL PROGRAMA DEL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Presente.

En contestación a su OFICIO FCIE/DEP/0027/04 de fecha 12 DE ENERO DE 2004

_____, me permito informarle que después de haber revisado el
trabajo presentado por el(a) ALUMNA ROCELY BUENAVENTURA CERVANTES
SARABIA

titulado "ANÁLISIS DEL EFECTO QUE EJERCE *L. mexicana* SOBRE
CÉLULAS NK DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA"

considero que Si reúne los méritos necesarios para obtener el grado de Maestra
SI/NO
en Ciencias (Biología Celular)

Atentamente.

DR. ANDRÉS ELIU CASTELL RODRÍGUEZ
Grado, nombre completo y firma

UNAM, FACULTAD DE MEDICINA, DEPTO. DE BIOLOGIA CELULAR Y TI-
Lugar de trabajo SULAR

Fecha 2 DE FEBRERO DE 2004



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Exp. núm. 55
V. A. DEP. 05

DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
COORDINADOR DEL PROGRAMA DEL
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Presente.

En contestación a su OFICIO FCIE/DEP/0027/04 de fecha 12 de enero de 2004

_____, me permito informarle que después de haber revisado el
trabajo presentado por el(a) alumna Rocely Buenaventura Cervantes
Sarabia

titulado "Análisis del efecto que ejerce *L. mexicana* sobre
células NK de pacientes con leishmaniasis cutánea"

considero que SI reúne los méritos necesarios para obtener el grado de SI/NO
en Ciencias Biología Celular.

Atentamente.

Dra. Laila Gutiérrez Kobeh

Grado, nombre completo y firma

UNAM, Facultad de Medicina, Depto. Medicina Experimental

Lugar de trabajo

Fecha 2 de febrero de 2004

DEDICATORIA

A Dios por darme el regalo de la vida e iluminarme día con día.

A la memoria de mis padres y en especial a mi madre por haberme inculcado el amor al trabajo y por no escatimar esfuerzos en educarme.

A mis hermanos, en especial a mi hermana Mildred por el apoyo incondicional que siempre me ha dado, su gran amor y paciencia.

A mis sobrinos por que son la alegría de mi vida.

A mi hija Sáasil por ser el tesoro más bello que albergo y por haber sido fuente de motivación para concluir este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de México y en especial a la Facultad de ciencias por darme la oportunidad de pertenecer a ella.

A la Dra. Ingeborg por su asesoría en la parte experimental y escrita, así como su confianza y enorme paciencia.

A los revisores de esta tesis: Dra. Ingeborg Becker, Dr. Armando Pérez, Dr. Andres Castell, Dra Laila Gutiérrez y Dra Gladis Fragoso por el tiempo que invirtieron en leer y corregir este escrito.

A José Sotero por el apoyo técnico en la parte de quimioluminiscencia.

A Marco Gudiño por el apoyo en computación.

A los compañeros del laboratorio de Inmunoparasitología: José, Miriam, Norma, Adriana, Laila, Magda, Ivette, Cristina, Alma, Iraís, Edith, Héctor, Leonardo, Jesús, Lucy, Rosy y a la Sra Susana por la ayuda recibida para la elaboración de esta tesis.

A mis amigas por brindarme uno de los dones más bellos de la vida que es la “amistad” .

A Arturo por el apoyo emocional que me ha dado en la parte final de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Generalidades sobre la leishmaniasis	8
1.2 Taxonomía	8
1.3 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	10
1.4 Formas clínicas	12
1.4.a Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	12
1.4.b Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	13
1.4.c Leishmaniasis mucocutánea o espundia (LMC)	14
1.4.d Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)	14
1.4.e Leishmaniasis visceral (LV)	15
2. MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCION HUÉSPED PARÁSITO	17
2.1 gp63	17
2.2 LPG	17
2.2.1 Función de la LPG	18
2.2.2 Resistencia al complemento	18
2.2.3 Sobrevida intracelular	18
3 INMUNOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS	20

3.1 Respuesta inmune humoral	20
3.2 Respuesta inmune celular	21
3.3 Respuesta inmune innata	22
3.3.1 Macrófagos	23
3.3.1.a Estallido oxidativo	24
3.3.2 Células NK (asesinas naturales).	26
4 HIPÓTESIS	33
5 OBJETIVO GENERAL	33
6 OBJETIVOS PARTICULARES	33
7 MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1 Purificación de células NK	34
7.2 Análisis de la producción de IFN- γ por células NK	35
7.3 Ensayos de citotoxicidad	36
7.4 Ensayos de quimioluminiscencia	38
8 RESULTADOS	40
8.1 Producción de IFN- γ	40
8.2 Actividad citotóxica de células NK	42
8.3 Producción de radicales libres	44
9 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	66
10 BIBLIOGRAFÍA	74

RESUMEN

L. mexicana puede generar dos cuadros clínicos polarmente opuestos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Pacientes con LCL cursan con una evolución benigna asociada a una intensa respuesta inmune celular y pacientes con LCD presentan una anergia en la respuesta inmune celular hacia antígenos de *Leishmania*. Se desconoce la causa que genera una respuesta tipo Th-2 en pacientes con LCD y actualmente se considera que el sistema inmune innato determina el curso de la enfermedad. Una de las células del sistema inmune innato que participa en la inducción de una respuesta temprana tipo Th-1 es la célula NK por la secreción de interferón gama (IFN- γ). Adicionalmente las células NK tienen actividad citotóxica sobre células que presenten cambios cuantitativos o cualitativos de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I), tal como ocurre en infecciones virales o en tumores. Recientemente demostramos que células NK pueden reconocer directamente a lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* a través del receptor TLR2, lo cual activa la secreción de citocinas. Se desconoce si *Leishmania* también puede modular la capacidad citotóxica de células NK y si esto se asocia con los distintos cuadros clínicos. En este trabajo se analizó el efecto que ejerce *Leishmania mexicana* sobre la actividad citotóxica y producción de IFN- γ de células NK de sujetos sanos y pacientes con LCL y LCD *in vitro*. Encontramos que *L. mexicana* tiende a inducir la producción de IFN- γ de células NK, en sujetos control (1.7 X) y en pacientes con LCL (7.8 X), pero no en pacientes con LCD. Al activar las células NK *in vitro* con IL-2 para transformarlas en células LAK (lymphokine-activated killer cells), encontramos que *L. mexicana* incrementó 2.1 veces la producción de IFN- γ de células LAK de sujetos control, mientras que en células LAK de pacientes con LCL y LCD el incremento de la producción fue de 1.16 y 1.17 veces, respectivamente.

A diferencia de esto, *L. mexicana* inhibió la actividad citotóxica de células NK, tanto en sujetos control (2.2 X), pacientes con LCL (3.4 X) y LCD, (9.1 X). Esta inhibición también se observó en las células LAK de sujetos control (1.9 X) y de pacientes con LCL (2.4 X) y LCD (2.7 X). Con el objetivo de determinar si la inhibición de la actividad citotóxica en células NK era debido a una posible inhibición de PKC- α por LPG descrita en *L. donovani*, se analizó el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la producción de radicales hidroxilo por células NK estimuladas con acetato de forbol miristato (PMA). En pacientes con LCL se encontró que *L. mexicana* activó la generación de radicales hidroxilo, mientras en pacientes con LCD inhibió la generación de radicales hidroxilo. Estos datos sugieren que el incremento en la producción de IFN- γ asociado a la producción de radicales hidroxilo ejercido por *L. mexicana* en células NK de pacientes con LCL pudiera ser sea a través de TLR2, ya que estos receptores han sido descritos como activadores de la producción de citocinas y como activadores de PKC. El estímulo activador aparentemente ocurre por una vía independiente de la vía que participa en la citotoxicidad, la cual fue inhibida por *L. mexicana* en los pacientes con LCL. A diferencia de esto, *L. mexicana* no indujo la producción de IFN- γ ni de radicales hidroxilo en células NK de pacientes con LCD aunque también inhibió la actividad citotóxica de estas células. Esto sugiere que uno de los posibles defectos de las células NK de pacientes con LCD pudiera ser una disminución o disfunción de receptores TLR2 en las células NK, ya que la ausencia de una señal activadora evitó la producción de IFN- γ y de radicales hidroxilo, permitiendo así un efecto inhibitorio intensificado de LPG sobre la actividad citotóxica. Nuestros datos sugieren que *L. mexicana* posiblemente modula las funciones efectoras de células NK a través de distintas vías y la intensidad de la modulación correlaciona con la severidad del cuadro clínico.

ABSTRACT

L. mexicana can produce two opposite forms of the disease: localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). Whereas patients with LCL have a benign evolution associated with an intense cellular immune response, patients with DCL are anergic towards *Leishmania* antigens. Even though the cause of the type Th-2 response in DCL patients remains unknown, it is considered that the innate immune response determines the disease outcome. One of the cells of the innate immune system that participates in the induction of an early type Th-1 response is the NK cell, due to its secretion of interferon gamma (IFN- γ). Additionally, NK cells are cytotoxic for cells that present qualitative or quantitative changes in molecules of the type I Major Histocompatibility Complex (MHC I), which occur in tumors or viral infections. We recently demonstrated that NK cells can also recognize *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) directly through the TLR2 receptor, leading to their activation and cytokine production. Yet it is unknown whether *Leishmania* also modulates the cytotoxic capacity of NK cells and if this modulation correlates with the different clinical forms.

In the present work we analyzed the effect that *L. mexicana* exerts on the *in vitro* cytotoxicity and cytokine production of NK cells from healthy donors and from patients with LCL and DCL. We found that *L. mexicana* tends to induce the production of IFN- γ in NK cells of healthy donors (1.7 X) and of patients with LCL (7.8 X) but not of patients with DCL. After the *in vitro* activation of NK cells with IL-2, transforming them to LAK (lymphokine activated killer cells) cells, we found that *L. mexicana* was able to increase the IFN- γ production of LAK cells from healthy donors 2.1 times, whereas in patients with LCL and DCL the increase was 1.16 and 1.17 times, respectively. In contrast, *L. mexicana* inhibited the cytotoxic activity of NK cells of

healthy donors (2.2 X), of patients with LCL (3.4 X) and of patients with DCL (9.1 X). This inhibition was also observed in LAK cells of healthy donors (1.9 X) and of patients with LCL (2.4 X) and DCL (2.7 X).

In order to determine whether the inhibition of the cytotoxic capacity of NK cells was due to a possible inhibition of PKC- α by LPG, as has been described for *L. donovani*, we analyzed the effect that *L. mexicana* had on the production of hydroxyl radicals produced by NK cells stimulated with phorbol myristate acetate (PMA). In patients with LCL, *L. mexicana* increased the production of hydroxyl radicals whereas in patients with DCL it was diminished. These data suggest that the stimulating effect that *L. mexicana* has on the IFN- γ and hydroxyl radical production of NK cells from patients with LCL could be through TLR2, since these receptors have been shown to stimulate cytokine production and to activate PKC.

This activating stimulus possibly occurs through a different signalling pathway than that of the cytotoxic activity, since this one was inhibited by *L. mexicana* in patients with LCL. In contrast, *L. mexicana* did not increase the IFN- γ or hydrogen radical production in NK cells of patients with DCL, even though it also inhibited the cytotoxic activity in these cells. These data suggest that one of the possible defects present on NK cells of DCL patients could be a reduction or dysfunction of the TLR2 receptor, since the absence of an activating signal reduced the IFN- γ and hydrogen radical production in these cells, thus permitting an intensified inhibition of the cytotoxic activity by LPG. Our data suggest that *L. mexicana* possibly modulates the different effector functions of NK cells through different pathways and that the intensity of the modulation correlates with the disease severity.

ABREVIATURAS

LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea o espudía
LCPD	Leishmaniasis cutánea pseudodifusa
LV	Leishmaniasis visceral
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
LPG	Lipofosfoglicano
gp63	Glicoproteína 63
TLR 2	Toll like receptor 2
PAMP's	Patrones moleculares asociados
LPS	Lipopolisacarido
IFN- γ	Interferón gama
IFN- α	Interferón alfa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos y macrófagos
IL-1	Interleucina-1

IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-18
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenin- dinucleótido reducido
O ₂	Oxígeno molecular
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
SOD	Superóxido dismutasa
GSH	Glutación peroxidasa
MPO	Mieloperoxidasa
HOCL	Ácido hipocloroso
PMA	Acetato de forbol miristato
PKC	Proteín cinasa C
NK	Natural killer
LAK	Lymphokine activated killer
(X)	Veces
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
KIR	Receptor inhibitory killer
KAR	Killer activating receptor

ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
DAG	Diacilglicerol
IP3	Inositol trifosfato
SDS	Duodecil sulfato de sodio
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IL-2R	Receptor de IL-2
rIL-2	IL-2 recombinante

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades sobre la leishmaniasis

Las leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. Son zoonosis de distribución cosmopolita que se presentan en forma endémica, preferentemente en las zonas tropicales y subtropicales (1). Las leishmaniasis son parasitosis con amplia distribución geográfica presente en todos los continentes excepto en Australia y en la Antártida (2).

El parásito es transmitido por la picadura de moscos hematófagos pilosos del género *Phlebotomus* del viejo mundo (Europa) y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (América) (3). *Leishmania* produce un amplio espectro de enfermedades en el humano y otros mamíferos, afectando principalmente la piel y las vísceras (4).

1.2 Taxonomía del género *Leishmania*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue 6 especies de *Leishmania*:

L. major, *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, y *L. tropica*

(5) (Fig. 1).

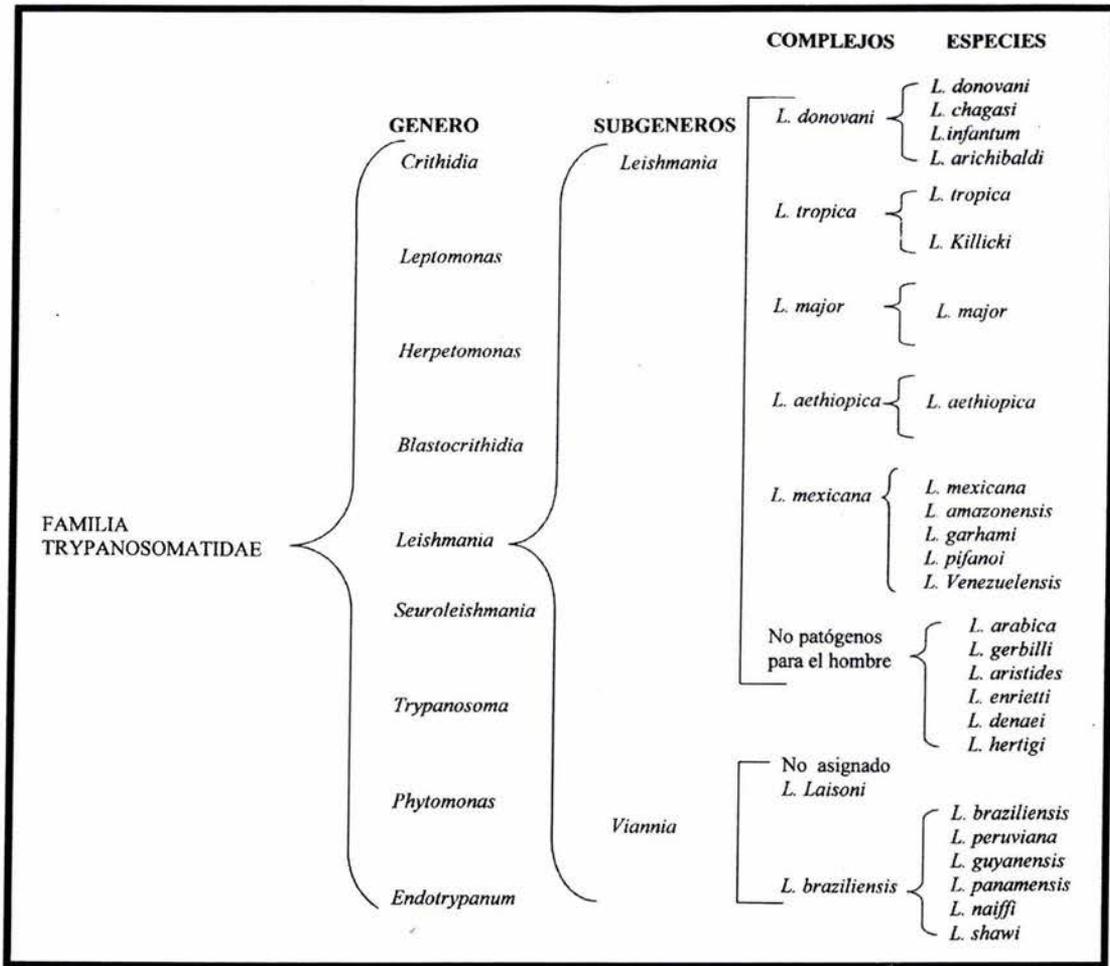


Figura 1. Clasificación taxonómica de *Leishmania* (1)

1.3 Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo de transmisión de *Leishmania* requiere de un vector artrópodo y de un reservorio mamífero. Los parásitos asumen dos formas durante el ciclo de vida: el amastigote y el promastigote (prociclico y metaciclico). El primero tiene forma redonda u oval, es aflagelado, intracelular, mide de 4 a 6 μm y sólo se observa en los tejidos de los vertebrados parasitados. El promastigote es la forma que se encuentra en el vector, es extracelular, carece de membrana ondulante, es flagelado y mide de 12 a 14 μm . La infección por *Leishmania* inicia cuando un mosquito infectado con el promastigote 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, cuyas condiciones ácidas lo transforman en amastigotes. 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 estar localizado en el 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 del mosquito. Los promastigotes maduros migran a la probóscide y cuando el mosquito pica a otro reservorio mamífero, el promastigote es regurgitado, infectando otras células del sistema fagocítico mononuclear, cerrándose así el ciclo de vida (6) (Fig. 2).

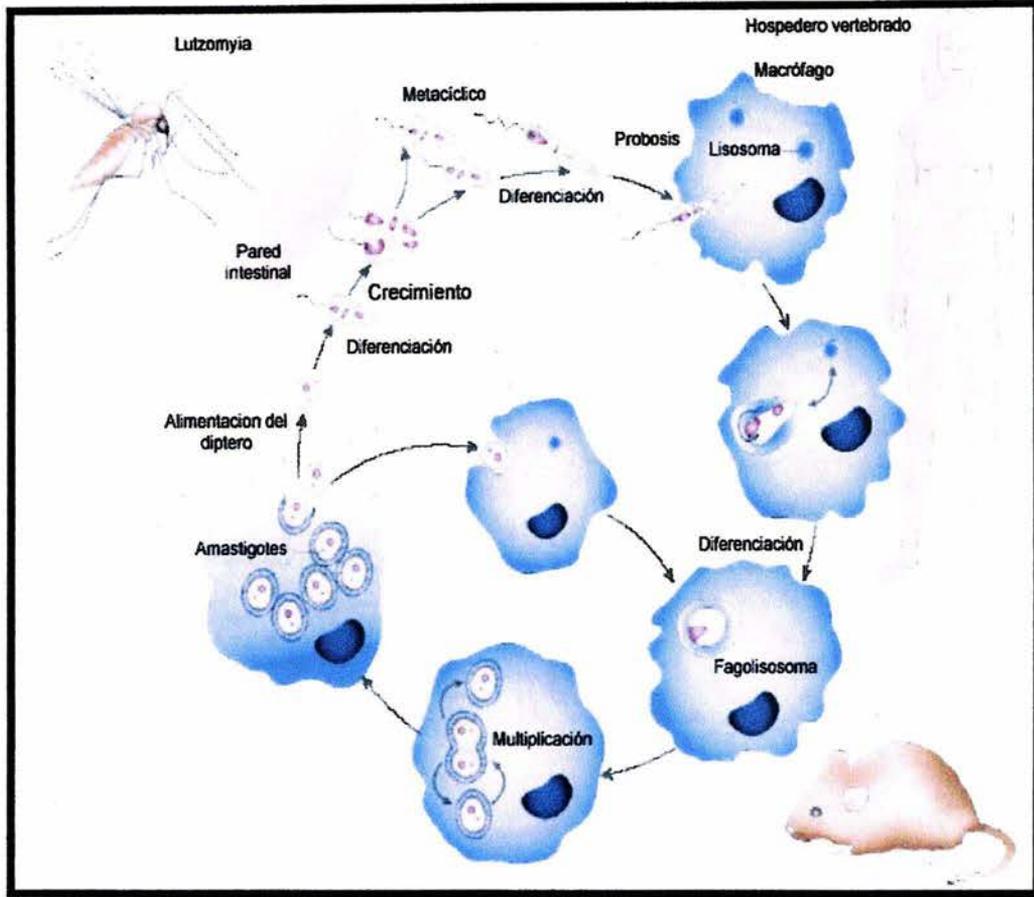


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania*

1.4 Formas clínicas

Las leishmaniasis se ha clasificado en diferentes formas clínicas dependiendo de la especie del parásito infectante:

1.4.a Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Esta forma de leishmaniasis es causada por diversas especies tanto en el viejo mundo como en el nuevo mundo. Se caracteriza por lesiones localizadas, únicas o múltiples en zonas expuestas de la piel, que comienzan como un nódulo en el sitio de inoculación que posteriormente se ulcera (1, 7). La ulceración generalmente es redonda, de bordes indurados, fondo limpio e indolora. Puede curar espontáneamente en un período de seis meses a dos años. Sin embargo, la infección en la oreja puede ser crónica, durar años y llevar a la mutilación del pabellón auricular. La hipersensibilidad se desarrolla en forma temprana y los pacientes son positivos a la intradermoreacción con leishmanina (prueba de Montenegro). En estos pacientes los linfocitos tienen la capacidad de responder *in vitro* a la leishmanina y producen IFN- γ e interleucina 2 (IL-2). En las biopsias se encuentran pocos parásitos en el interior del macrófago. En México esta forma clínica se conoce como la úlcera de los chicleros, es causada por *Leishmania mexicana mexicana* y se distribuye prácticamente en toda la República Mexicana (1, 2, 3) (Fig. 3).



Figura 3. Lesión característica de la LCL

1.4.b Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Es una variante anérgica de la leishmaniasis cutánea en la cual las lesiones son difusas. Empiezan con una lesión inicial primaria la cual se disemina hacia otras áreas de la piel como el rostro, tórax, espalda, extremidades inferiores y superiores, con excepción del cuero cabelludo, palma 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 y la respuesta humoral está aumentada, pero ésta es incapaz de erradicar al parásito. Por otro lado en esta forma clínica de leishmaniasis no hay una respuesta a la prueba de intradermoreacción a la leishmanina. La LCD se caracteriza por una respuesta de tipo Th-2 con producción de interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). En el análisis histopatológico se pueden observar abundantes parásitos dentro de macrófagos vacuolados. En México, la LCD es causada por *L. mexicana* y se han registrado casos en los estados de Tabasco, Veracruz y Coahuila (1, 3) (Fig. 4).



Figura 4. Nódulos característicos en los pacientes con LCD

1.4.c Leishmaniasis mucocutánea o espudía (LMC)

Esta forma clínica se manifiesta por la destrucción de la mucosa nasofaríngea con severa destrucción de los tejidos, es de difícil tratamiento y puede producir la muerte por inanición y obstrucción de vías respiratorias. Esta forma clínica es causada por *Leishmania braziliensis* (Fig. 5).

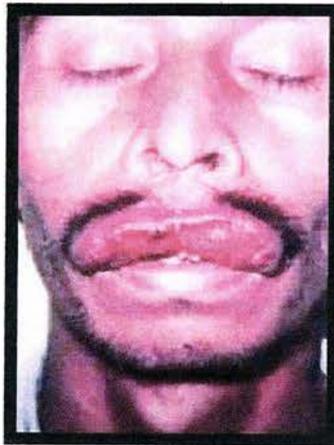


Figura 5. Destrucción de mucosas en un paciente con LMC

1.4.d Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)

Esta forma clínica se manifiesta con pequeños nódulos subcutáneos que siguen la trayectoria de vasos linfáticos y presenta similitud en la manifestación clínica con las

lesiones ocasionadas por *Sporothrix shenckii* (8, 9). La intradermoreacción a la leishmanina es positiva y la presencia de parásitos en las biopsias es escasa. Se han reportado casos en el estado de Tabasco (Fig. 6).

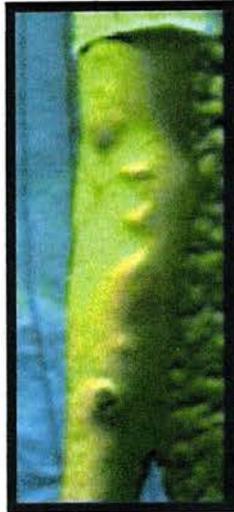


Figura 6. Nódulos subcutáneos en un paciente con LCPD

1.4.e Leishmaniasis visceral (LV)

Esta forma clínica de leishmaniasis es causada por *Leishmania donovani* en el viejo mundo y *Leishmania donovani chagasi* en el Nuevo Mundo. Tiene un período de incubación de dos meses a un año y afecta principalmente el bazo, hígado, mucosas del intestino, médula ósea y otros tejidos linfáticos (3). Los estados donde se han reportado casos son Puebla, Oaxaca, Chiapas y Morelos (Fig. 7).



Figura 7. Hepatoesplenomegalia en un paciente con LV

2 MOLÉCULAS QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCIÓN HUÉSPED PARÁSITO

Las principales moléculas sobre la superficie de *Leishmania* que participan en la interacción con el hospedero son la glicoproteína de 63 kDa (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG). En ambas moléculas se encuentran ligandos específicos para los factores de complemento C3b y C3bi. Una vez que estos dos factores se han unido a *Leishmania*, son reconocidos y fijados por los receptores CR1 (para C3b) y CR3 (para C3bi) del macrófago, produciéndose la fagocitosis del parásito (10, 11).

2.1 gp63

Esta molécula está en ambos estadios de desarrollo del parásito: promastigote (metacíclico y procíclico) y amastigote, sufriendo cambios moleculares durante la diferenciación del parásito. La gp63 es una glicoproteína con actividad de proteasa (12, 13). El promastigote tiene cerca de 500,000 copias de gp63 en su superficie. La gp63 está altamente conservada en varias especies de leishmanias (8-9) y se activa a un pH entre 3 y 4. Esta glucoproteína 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 por los receptores Mac-1(CR3b) del macrófago (14). La gp63 se encuentra aumentada en los amastigotes y tiene actividad proteolítica, con capacidad de degradar enzimas lisosomales dentro del fagolisosoma del macrófago lo cual permite la proliferación del amastigote.

2.2 LPG

Es el mayor glicoconjugado localizado en la superficie de los promastigotes, incluyendo el flagelo (15).

Este lipofosfoglicano está formado por cuatro dominios principales:

- I) Región de anclaje 1-0-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 está constituida por múltiples unidades repetidas de PO₄ gal (β1,4) man (α1).
- IV) Región de oligosacáridos que forma el casquete terminal de la molécula y que puede estar constituido por galactosa o furanosa (16, 17).

2.2.1 Función de la LPG

2.2.1.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 por la vía alterna. Cuando el factor C3 es degradado por alguna de las vías, origina a los factores C3b y C3bi que son fijados por el LPG en la membrana extracelular del parásito. Estos componentes del complemento son reconocidos por los receptores CR1 y CR3 del macrófago, lo cual lleva a la fagocitosis del parásito y de esta manera queda protegido de la lisis del complemento (17, 18).

2.2.1.b Sobrevida intracelular

Una vez que el parásito es internalizado y se encuentra dentro del fagolisosoma se transforma en amastigote, que resiste a la acción de las enzimas hidrolíticas y de esta manera puede sobrevivir a los productos tóxicos de oxígeno, teniendo así la capacidad de sobrevida para seguir multiplicándose. Estudios *in vitro* han demostrado que

Leishmania necesita por lo menos el 20% del total de moléculas de LPG intactas para lograr una sobrevivida en el interior del fagolisosoma del macrófago (19).

Uno de los mecanismos que ha desarrollado *Leishmania* para lograr sobrevivir en el fagolisosoma, es la inhibición de proteína cinasa C (PKC), la cual es importante para desencadenar el estallido oxidativo que genera los compuestos tóxicos de oxígeno (20). Estudios realizados con PKC purificada de cerebro de rata demostraron que LPG es un inhibidor competitivo del diacilglicerol (17, 21). 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 (22).

La PKC participa importantemente en la regulación y proliferación celular. Se han reportado 12 isoenzimas de PKC en tejido de mamíferos dependiendo de la respuesta de activación diferencial, distribución celular y la especificidad del sustrato. Se han dividido en tres grandes grupos.

1. Convencionales (PKCs): este grupo requiere de fosfatidilserina, diacilglicerol y Ca^{2+} para su activación y son (α , β I, β II y γ).
2. Nuevas (PKCn): para su activación requiere de fosfatidilserina, diacilglicerol pero no de Ca^{2+} , en este grupo se encuentran (δ , ϵ , η , y θ).
3. Atípicas (PKCa): este grupo lo conforman (ζ , λ , μ , y ι) (23)

Los tres grupos participan en señales de transducción (23).

En estudios realizados en monocitos humanos por el grupo de Qing Li, establecen que las PKCs dependientes de Ca^{2+} (las PKC α) se encuentran involucradas en el proceso de producción de O_2^- y se requieren para la lipoxidación por monocitos activados (23).

Alteraciones en estado de fosforilación de PKC son importantes para su activación y la activación de isoformas de PKC está asociada con la translocación de fracciones particuladas a solubles.

La fosforilación la proteína de membrana MARCKS (sustratos miristilados de cinasa C ricos en alanina) asociada con la movilidad de actina y con el tráfico de membrana es regulada por PKC- α , MARCKS y proteína relacionada a los MARCKS. Estas son miembros de una familia de mayor sustrato de PKC establecidas en una gran variedad de células, incluyendo macrófagos. La PKC- α dependiente de la fosforilación de MARCKS puede participar en el movimiento de fagosomas y lisosomas sobre microtúbulos.

Muchos mecanismos efectores del macrófago requeridos para la eliminación de *Leishmania* requieren de la actividad de PKC. Estudios realizados en fases tempranas de la infección demostraron que *Leishmania* disminuye la actividad de PKC de células infectadas y que la LPG de *L. donovani* inhibe la actividad de PKC en macrófagos intactos (24). Recientemente el uso de clones de macrófagos deficientes en actividad de PKC- α confirman la importancia de esta cinasa para inhibir la replicación intracelular de *L. donovani* (24).

3 INMUNOLOGÍA DE LA LEISHMANIASIS

3.1 Respuesta inmune humoral

En la Leishmaniasis, la respuesta inmune humoral juega un papel secundario ya que los anticuerpos específicos actúan como opsoninas que facilitan la fagocitosis por el macrófago mediante receptores Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. Los pacientes con LCD habitualmente cursan con hipergamaglobulinemia, sin embargo, los anticuerpos en estos

pacientes no tienen una función de erradicación ya que los pacientes presentan una enfermedad progresiva.

3.2 Respuesta inmune celular

Los macrófagos juegan un papel central en la leishmaniasis. Fagocitan al parásito e inducen una respuesta inmune específica por la presentación de antígenos de leishmania en el contexto con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) para activar a linfocitos CD4⁺ y en el contexto de MHC-I para la activación de linfocitos CD8⁺.

En la leishmaniasis están involucrados dos tipos de linfocitos CD4⁺ (Th-1) y CD4⁺ (Th-2), que se diferencian con base en el patrón de citocinas que producen. Las células Th-1 producen IFN- γ y TNF- α . Estas citocinas juegan un papel protector en la leishmaniasis debido a que activan al macrófago al aumentar el estallido oxidativo, la producción de NO (óxido nítrico), la expresión de moléculas MHC-II y la capacidad fagocítica. En contraste, las células Th-2 producen interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) (25). Estas citocinas ejercen un efecto antagonista sobre las citocinas Th-1 y tienen capacidad inhibitoria sobre el macrófago, llevando a la progresión del padecimiento. El papel de las citocinas de las respuestas Th-1 y Th-2 se ha estudiado en modelos murinos. Las cepas de ratón resistentes a la infección por leishmanias como los C3H/HeJ y C57BL/6 presentan una respuesta celular dominante tipo Th-1 (26). A diferencia de esto, los ratones BALB/c exhiben una respuesta celular tipo Th-2 y cursan con una infección progresiva y mortal. Uno de los factores desencadenantes hacia una respuesta Th-1 o Th-2 es la presencia de IFN- γ o IL-4, respectivamente (27).

Adicionalmente, los linfocitos T CD8+ participan en la respuesta inmune celular contra *Leishmania* mediante dos mecanismos:

- 1) Secreción de citocinas como IFN- γ y TNF- α que activan al macrófago.
- 2) Lisis de células infectadas con *Leishmania* (28, 29).

Los linfocitos CD8+ reconocen antígenos asociados a moléculas MHC-I presentados por macrófagos. En la leishmaniasis murina experimental se ha encontrado que los linfocitos CD8+ juegan un papel importante en la protección, ya que pueden sustituir a linfocitos CD4+ en la producción de IFN- γ (30). Actualmente existe controversia acerca del mecanismo de reconocimiento del linfocito CD8+, ya que las leishmanias fagocitadas se encuentran en el compartimiento fagosomal y los antígenos procesados en este compartimiento no son presentados por MHC-I. Sin embargo, podrían operar algunas de las dos vías alternas de presentación de antígenos restringidos por moléculas MHC-I:

- 1) Regurgitamiento (31)

Consiste en una posible expulsión de péptidos de los fagosomas hacia la superficie de la célula, los cuales se unen a moléculas MHC- I en la superficie de la célula.

- 2) Escape fagosoma- lisosoma (32)

Involucra el escape de antígenos del compartimiento endosomal al citosol en donde son procesados por la vía convencional de moléculas MHC- I.

3.3 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato se distingue por poseer un mecanismo de defensa rápido ante microorganismos patógenos. Este sistema no cursa con memoria inmunológica del agente infeccioso. Participan mecanismos de defensa como son las

barreras físicas (piel, mucosas), células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y macrófagos), células NK y otras moléculas solubles como complemento y proteínas de fase aguda.

3.3.1 Macrófagos.

Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear, dentro del cual se incluyen macrófagos tisulares y monocitos de la sangre. Los macrófagos son células grandes de aproximadamente 25 a 50 μm de diámetro, de superficie irregular e intervienen en todas las fases de la respuesta inmune. Desempeñan un papel triple en la leishmaniasis ya que son células fagocíticas, hospederas y presentadoras de antígenos activadoras de linfocitos T. Así mismo, son células efectoras con capacidad de eliminar a leishmanias fagocitadas. Uno de los mecanismos efectores más importantes del macrófago consiste en la generación de especies reactivas de oxígeno y NO, generados durante el estallido oxidativo. Esta función leishmanicida depende de la presencia de citocinas activadoras como IFN- γ (33). Los macrófagos cuentan con múltiples receptores que participan en la respuesta inmune innata, entre los que se encuentran:

1.- Receptores para regiones Fc de inmunoglobulinas:

Fc γ RI, Fc γ RII-A, Fc γ RII-B2, Fc γ RIII y FC α RI

2.-Receptores para factores del complemento

CR1: C3b >iC3b, C4b

CR3: iC3b

CR4: iC3b

3.- Receptores para interleucinas:

IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IFN- α , IFN- γ , factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF)

4.- Receptor de manosa

5.- Receptor Scavenger (SRs)

6.- Receptor de Clq

7.- CD14 (24, 33, 34)

8.- Receptores TLR (1 – 10) (24)

9.- Receptores de 7 dominios transmembranales

a) Receptores para N-formilmetionil péptido

b) Receptores para IL-8

c) Receptores para C5a

Adicionalmente los macrófagos secretan grandes cantidades de citocinas entre las cuales se encuentran: IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IL-13, IL-15 e IL-18 (33, 35).

Durante la fagocitosis, el macrófago libera citocinas proinflamatorias como IL-12 e IL-18, las cuales activan a células efectoras de la inmunidad innata como las células NK (35). Las células NK activadas son productoras de IFN- γ , el cual es responsable de la activación subsecuente del macrófago y del control de la enfermedad (36).

3.3.1.a Estallido oxidativo.

El estallido oxidativo es una respuesta antimicrobial de células fagocíticas tales como macrófagos y neutrófilos (24). La enzima responsable para que se lleve a cabo este evento es la NADPH oxidasa (fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido reducido) que genera compuestos de oxígeno como son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno molecular (1O_2) y radicales hidroxilo (OH \cdot), que

son compuestos altamente microbicidas, son altamente reactivos y pueden ser detectados fácilmente con luminol debido a la emisión de luz (quimioluminiscencia) (37).

La NADPH oxidasa puede ser activada por diferentes moléculas (ej. antígenos de bacterias, parásitos); una vez activada la NADPH oxidasa, el citocromo b558 cataliza la transferencia de electrones generándose el O_2^- , al cual posteriormente la superóxido dismutasa (SOD) adicionará hidrógenos para producir H_2O_2 . Este sustrato puede ser reducido por tres mecanismos:

- 1.- Por la acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH) el H_2O_2 se convierte en $H_2O + O_2$ (mecanismo de detoxificación).
- 2.- Por la acción de la mieloperoxidasa (MPO) el H_2O_2 se reduce en ácido hipocloroso (HOCl) y como mecanismo de regulación el $HOCl + H_2O_2$ dará origen al $^1O_2 + H_2O$.
- 3.- Por último el H_2O_2 es catalizado por Fe^{2+} con generación de ^-OH . Todas estas moléculas son generadas en las vesículas fagocíticas con una gran actividad tóxica sobre los microorganismos (38, 39).

Uno de los mecanismos inductores del estallido oxidativo es mediante el PMA, que lleva a la activación de PKC, una proteína serina/treonina cinasa dependiente de fosfolípidos (40). Esto ocurre cuando el PMA induce la translocación de la PKC desde el citosol hasta la membrana celular del macrófago donde es fosforilada (activada) y de esta forma es capaz de estimular a la NADPH oxidasa y con ello, la consecuente generación de todos los componentes tóxicos del oxígeno (41, 42, 43).

3.3.2 Células NK (asesinas naturales)

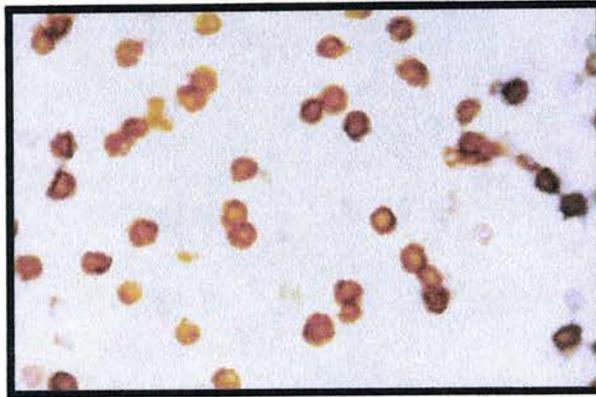


Figura 8. Células NK teñidas con el anticuerpo anti-CD56 y reveladas con peroxidasa.

Las células NK son una subpoblación de linfocitos que nacen de una célula precursora en la médula ósea, están presentes en sangre, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y timo (Fig. 8). Las células NK son una línea claramente distinta de los linfocitos T y B (44, 45). En los individuos normales, las células NK comprenden del 10 al 15 % de los linfocitos en sangre periférica y del 1 al 2% de los linfocitos en bazo (44, 45). Las células NK no son adherentes, no son fagocíticas, no poseen memoria inmunológica (46), sin embargo poseen capacidad citolítica espontánea en contra de tumores. Las células NK humanas son llamadas linfocitos granulares grandes por tener abundante citoplasma, un núcleo grande, y gránulos azurófilos citoplasmáticos, los cuales se tiñen de púrpura con el colorante de Giemsa (colorante de Romanovsky) (47). Las células NK se pueden definir como células citotóxicas que tienen una morfología predominante de linfocitos granulares grandes, que no expresan el complejo CD3 y tampoco expresan las cadenas asociadas al receptor de linfocitos T (α , β , γ y δ) (48). Las células NK poseen gránulos citolíticos que contiene una gran variedad de moléculas, incluyendo a la familia de granzimas (proteasa serina-esterasa), que actúan a pH neutro dependiendo del tipo de sustrato. Adicionalmente contienen perforinas, proteínas de 70

kDa, involucradas en la perforación de la membrana de la célula blanco, y componentes lisosomales como β -hexosamidasa, β -glucuronidasa, y arilsulfatasa, que participan en la lisis de la célula blanco (49, 50). Las células NK son linfocitos del sistema inmune innato que no expresan receptores específicos para antígenos en su superficie. Originalmente fueron descritas como células capaces de lisar algunas células tumorales y células infectadas por virus en ausencia de una estimulación previa (51). En años recientes se ha incrementado el interés en el papel que ejercen en la respuesta inmune innata así como en la inmunidad específica. Se ha estudiado extensamente su mecanismo de acción y en particular los mecanismos moleculares que le permiten discriminar entre células normales y células tumorales. Las células NK pueden lisar células autólogas mediante citotoxicidad natural así como por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Las células NK expresan receptores en su superficie celular que detectan alteraciones en moléculas del complejo MHC-I de las células blanco.

Se han descubierto varios receptores de moléculas MHC-I que participan en la citotoxicidad de células NK. Estos receptores se dividen en receptores que inhiben la citotoxicidad y aquellos que la activan. Entre los receptores que inhiben la citotoxicidad se encuentran:

- 1) Receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas que incluyen el receptor KIR (killer inhibitory receptor) y el receptor LIR (leukocyte inhibitory receptor) que reconocen moléculas del MHC-I, incluyendo haplotipos clásicos y no clásicos.
- 2) Receptores que contienen dominios de lectinas tipo-C y que reconocen carbohidratos, como los receptores NKG2/CD94. El receptor homólogo en el ratón es Ly-49 (52).

Estos receptores transducen señales inhibitorias a menos que las células hayan perdido o expresen cantidades insuficientes o modificadas de moléculas MHC-I. El

dominio citoplasmático de KIR contiene el motivo de ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif), el cual transduce una señal inhibitoria reclutando a una proteína tirosina fosfatasa (53).

Entre los receptores activadores de citotoxicidad o KAR (killer activating receptors) se encuentran los receptores de citotoxicidad natural NKp46, NKp30 y NKp44. Estos receptores son miembros novedosos de la superfamilia de las inmunoglobulinas que no tienen homología entre ellos y poca homología con otras moléculas humanas conocidas. Estos receptores están acoplados a la maquinaria de transducción de señales citoplasmáticas mediante la activación de ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (54).

La mayoría de las células NK también expresan el receptor Fc γ RIIIA (CD16), que reconoce la fracción Fc de las IgG y mediante el cual se lleva a cabo la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos.

Adicionalmente las células NK expresan integrinas como LFA-1 (CD11a/CD18), VLA (CD49d/CD29) y moléculas de adhesión como CD2 (LFA-2) y CD56 (NCAM) que es una isoforma de moléculas de adhesión presentes en neuronas (52).

Aún se sabe poco sobre las señales que llevan a la activación de células NK y se ha propuesto que el inicio de la respuesta inmune en células NK ocurre debido a múltiples señales generadas por moléculas co-estimuladoras o de adhesión, más que de un solo receptor (55).

Las células NK pueden ser activadas por citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- α , así como por la interacción de sus receptores de superficie, como CD16, con complejos inmunes o bien por la interacción de sus receptores que detectan cambios en moléculas MHC-1 de las células blanco. Se ha visto que IL-2 sensibiliza a

las células NK hacia IL-12 aumentando sus receptores para IL-12 así como sus receptores KIR (52). IL-12 actúa como un regulador de la actividad de células NK al igual que IL-1 β , IL-15, TNF- α e IL-18, secretados por macrófagos (55). Se ha encontrado que IL-12 sinergiza con IL-18 para activar a células NK, aumentando su producción de IFN- γ así como su actividad citotóxica. IL-15 interviene en el desarrollo y maduración de células NK en médula ósea. Las células LAK (lymphokine-activated killer) fueron descritas algunos años atrás como células efectoras capaces de lisar una gran variedad de células malignas pero no normales (56). Sin embargo estudios recientes indican que LAK son células (CD3⁻ CD56⁺), inducidas por citocinas (57). El proceso de activación seguido por la producción de citocinas, la sobrerregulación de la función citolítica y proliferación subsecuente es iniciada cuando la célula NK interactúa con varios ligandos, incluyendo citocinas a través de los receptores expresados sobre la superficie de la célula.

Las células NK responden intensamente a IL-2 (entre otras citocinas) porque estas expresan el receptor de afinidad intermedia para IL-2 (IL-2R) y sobrerregulan la alta afinidad de IL-2R en presencia de IL-2 (58).

Las células NK producen citocinas como IFN- γ y TNF- α así como quimiocinas tales como IL-8 y MIP-1 α (proteína inflamatoria del macrófago), proteínas quimiotácticas para los neutrófilos y macrófagos, respectivamente. Adicionalmente producen las citocinas GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), M-CSF (factor estimulador de macrófagos), IL-3 (55) e IL-10 (59).

Se sabe poco sobre la participación de células NK en leishmaniasis a pesar de que estas células son potencialmente decisivas en la evolución del padecimiento por su producción temprana de las citocinas IFN- γ y TNF- α , activadoras de macrófagos. Se ha demostrado que IFN- γ es un mediador crucial de la resistencia innata a infecciones

tempranas por *Leishmania*, y en modelos animales se detectó que la fuente temprana de IFN- γ son las células NK (60). Adicionalmente se encontró que las células NK participan en la cura de pacientes con leishmaniasis cutánea infectados con *L. aethiopica* (61). En nuestro laboratorio encontramos que las células NK poseen receptores TLR-2 que pueden reconocer directamente a LPG de *Leishmania*, lo cual lleva a su activación y producción de IFN- γ y TNF- α (62). De esta manera, la célula NK participa como un puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Su poder de interactuar directamente con patógenos y producir citocinas pro-inflamatorias en las fases tempranas de la infección con patógenos intracelulares, la transforma en una célula crítica en la respuesta inmune contra leishmania. Sin embargo, aun se desconoce si las células NK también participan como células citotóxicas en la leishmaniasis.

La actividad citotóxica de las células NK es mediada principalmente por perforina, que es liberada de los gránulos en forma de monómeros que se insertan en la membrana plasmática de las células blanco y se polimerizan para formar agregados formadores de poros. Esto permite que granzimas penetren a la célula e induzcan la muerte de la célula blanco mediante apoptosis, por activación de la caspasa 8 (55). Otras moléculas de las células NK que participan en la citotoxicidad son Fas (CD95) y TNF- α . Ambas moléculas se unen a sus receptores Fas-L y TNF-R1 en la célula blanco e inducen la muerte por apoptosis (63).

Se ha descrito que durante la exocitosis de gránulos por las células NK participan las vías de PKC y proteínas G (64). Se encontró que la unión de células NK a células tumorales resultaba en una rápida activación de fosfolipasa C, lo cual a su vez llevaba a la producción de inositol trifosfato (IP3) y diacilglicereol (DAG) como segundos mensajeros. Esto incrementa el calcio intracelular libre y activa a PKC. La activación de PKC puede ser inducida por DAG o bien por PMA. PKC activado regula

la producción de LTB₄, la cual es una molécula crítica para la actividad citotóxica de células NK (65). La LTB₄ se produce mediante la peroxidación lipídica de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico (66, 67, 68). Durante la producción de LTB₄ estimulada por PKC, se incrementa la exocitosis de los gránulos responsables de la actividad citotóxica y durante este proceso se generan radicales hidroxilo (OH) (69). La inhibición de la vía de la lipoxigenasa inhibe también la actividad citotóxica de la célula NK (70). Adicionalmente, se ha reportado que los inhibidores de radicales hidroxilos también inhiben la actividad citotóxica de células NK (71), mientras que la catalasa, que inhibe H₂O₂ no tienen efecto inhibitorio sobre la actividad citotóxica de células NK (72).

La formación de los radicales hidroxilo ocurre mediante la reacción de Haber-Weiss H.



La generación de radicales hidroxilo producido durante el metabolismo de las lipoxigenasas puede ser analizada mediante quimioluminiscencia amplificada por luminol (74). Adicionalmente se ha reportado que la generación de productos de la oxidación del ácido araquidónico generados por la lipoxigenasa, son esenciales para la función de las LAK (75).

El análisis cuantitativo de la quimioluminiscencia de células NK activadas por PMA permite analizar si las diferencias encontradas en la actividad citotóxica de células NK de pacientes con LCL y LCD, coinubadas con *L. mexicana*, se deben a distinto grado de activación de las PKC en las células NK.

Aunque en ensayos en modelos murinos se ha encontrado que la presencia de células NK al inicio de la infección es indispensable para la protección adecuada contra la leishmaniasis, no existen estudios sobre la participación de células NK en pacientes

con distintas formas clínicas de leishmaniasis. Uno de los grandes enigmas que persiste en la leishmaniasis, es la causa de la diseminación del parásito en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa. Siendo las células NK una de las primeras células de la respuesta inmune innata que entran en contacto con el parásito, resulta muy interesante analizar el papel que desempeñan estas células en pacientes con cuadros de leishmaniasis de distinta severidad como son pacientes con LCL y LCD. El estudiar de manera comparativa el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre los mecanismos efectores de las células NK de estos pacientes, tanto en su capacidad de producir IFN- γ como en su capacidad citotóxica, posiblemente permitirá entender mejor la causa de la diseminación del padecimiento.

4 HIPÓTESIS

L. mexicana ejerce un efecto modulador sobre la producción de IFN- γ y la capacidad citotóxica de células NK humanas. Este efecto se correlaciona con la severidad del cuadro clínico en pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y difusa.

5 OBJETIVO GENERAL

Analizar de manera comparativa el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la capacidad efectora de células NK de sujetos control y de pacientes con LCL y LCD.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1 Investigar el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la producción de IFN- γ en células NK.
- 2 Determinar el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la capacidad citotóxica de células NK sobre células tumorales K-562 .
- 3 Estudiar el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la producción IFN- γ de células NK activadas por IL-2 (LAK).
- 4 Investigar el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la capacidad citotóxica que tienen las células NK activadas por IL-2 (LAK) sobre células tumorales K-562.
- 5 Analizar la magnitud de producción de radicales hidroxilo en células NK de sujetos control y pacientes con LCL y LCD, estimulados con PMA.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Purificación de células NK

Se obtuvieron 25 ml de sangre periférica de pacientes con LCL, LCD y sujetos control. para aislar células mononucleares mediante un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque 1.007 (Sigma). La sangre se diluyó con PBS estéril pH 7.4 en una relación 1:3 y se colocaron 7 ml de la sangre diluida sobre 3 ml de Ficoll-Hypaque. Se centrifugó a 2000 revoluciones por min (rpm). durante 20 min a 20°C. Se aspiró la interfase y se lavó dos veces con 30 ml de PBS estéril. El precipitado se resuspendió en 10 ml de RPMI 1640 (Sigma) con 10% de suero fetal bovino (Gibco). Se realizó la cuenta celular en una cámara de Neubauer y se calculó el número de células por ml: # de células x factor de dilución x 10,000 x volumen.

Para la purificación de células NK se eliminaron los monocitos mediante adhesión a placas de petri tratadas de polystyrene(Corning) durante 24 h a 37 °C. De las células no adherentes se purificaron las células NK empleando un kit con inmunomagnetos (Miltenyi Biotec) que incluye un sistema de marcaje indirecto usando un coctel primario de anticuerpos monoclonales conjugados con haptenos y un anticuerpo antihapteno acoplados a los MACS (magnetic cell sorting) para la depleción de células T, células B, basófilos y células dendríticas. Las células con marcadores CD3, CD4, CD19, y CD33 se eliminaron mediante adhesión a la columna magnética y las células NK se obtuvieron por selección negativa. Para el análisis de pureza se realizó una tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-CD56, obteniéndose una pureza del 85-90 %.

7.2 Análisis de la producción de IFN- γ por células NK

Se cuantificó la producción de IFN- γ de células NK de 4 sujetos control, 7 pacientes con LCL y 3 pacientes con LCD, tanto en condiciones basales como en presencia de promastigotes de *L. mexicana* en relación 1:10 (células/parásitos). Inicialmente se incubaron durante 3 h a 28 °C en 1 ml de RPMI. Posteriormente se incubaron a 37 °C con 5 % CO₂ durante 15 h para favorecer la sobrevivencia de los parásitos, ya que son sensibles a la temperatura de 37 °C. Se analizó la producción de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA empleando un kit comercial Quantikine (R&D systems). Para la técnica de ELISA se colocaron 200 μ l del sobrenadante sobre una placa de 96 pozos con fondo plano recubierta con el antígeno específico para IFN γ , y se incubaron durante 2.5 h a temperatura ambiente (TA), se lavaron 3 veces con PBS y se le agregaron 200 μ l del anticuerpo policlonal contra IFN- γ conjugado a peroxidasa. Se incubaron durante dos horas a TA y se lavaron 3 veces con PBS. Se agregaron 200 μ l del sustrato, se incubaron 20 min. y posteriormente se agregaron 50 μ l de ácido sulfúrico 2N para detener la reacción. Se leyeron en un lector de ELISA a 450 nm y se obtuvieron los valores en pg/ml utilizando una curva estándar. Se calcularon las concentraciones de las citocinas mediante un análisis de regresión de los valores promedios de la absorbancia de 3 lecturas por muestra. Se analizaron los resultados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

Adicionalmente se analizó el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre células NK activadas con IL-2, transformándolas en células LAK obtenidas por preincubación de las células NK con rIL-2 (12,000 U/ml) (Interleukine) durante 3 h a 37 °C. Estas células

activadas posteriormente se incubaron con promastigotes de *L. mexicana* y se repitió el ensayo descrito anteriormente.

7.3 Ensayos de citotoxicidad

Preparación de células efectoras:

Se purificaron células NK de sangre periférica de 20 sujetos sanos, 5 pacientes con LCL y 3 pacientes con LCD según la metodología descrita anteriormente. Las células NK se incubaron con *L. mexicana* disueltos en RPMI una relación 1:10 (células/parásitos) durante 3 h a 28 °C y luego durante 15 h a 37 °C con 5 % CO₂. Otro grupo de células NK fueron pre-estimuladas con rIL-2 (12,000 U/ml) (LAK) disuelta en RPMI durante 3 h a 37 °C con 5 % de CO₂ previo a la incubación con *L. mexicana* y posteriormente se incubaron con *L. mexicana* durante 3 h a 28 °C y 12 h a 37 °C.

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo en placas de 96 pozos con fondo redondo. Inicialmente se colocaron 100 µl de RPMI en cada pozo. Posteriormente se colocaron 2x10⁶ células NK lavadas, disueltas en 100 µl de RPMI en la primera hilera de pozos (12 pozos), de manera que en estos pozos quedaron 2x10⁶ células NK disueltas en 200 µl de RPMI. Estas células NK se diluyeron 1:2 en 4 diluciones sucesivas. Para lograr esto, se tomaron alícuotas de 100 µl de la primera hilera de pozos, los cuales se depositaron en la segunda hilera de la placa que contenía 100 µl de RPMI. Con esto, la primera hilera quedó con 1x10⁶ células NK disueltas en 100 µl de RPMI. La segunda hilera recibió 1x10⁶ células NK en 100 µl, quedando un volumen final de 200 µl. De esta segunda hilera nuevamente se tomó una alícuota de 100 µl conteniendo 5x10⁵ células que fueron depositadas a la tercer hilera de pozos. Este procedimiento se repitió en total 4 veces, obteniéndose así 4 hileras de 12 pozos que contenían 1x10⁶, 0.5x10⁶, 0.25x10⁶ y 0.125x10⁶ células NK, respectivamente, disueltas en 100 µl de RPMI.

El ensayo de citotoxicidad se realizó con una línea tumoral eritromieloide humana K562 que es sensible a la lisis por células NK. Las células K562 se premarcaron durante 1 h con 100 μCi de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (Cr^{51}) (Du Pont NEN) y se lavaron extensamente. Se agregaron 1×10^4 células K562 marcadas disueltas en 100 μl de RPMI a cada uno de los 96 pozos de la placa que contenía las células NK diluidas previamente.

Por triplicado se colocaron:

- 1) Células NK + K562
- 2) Células NK incubadas con *L. mexicana* + K562
- 3) Células NK estimuladas con IL-2 (12,000 U/ml) + K562
- 4) Células NK estimuladas con IL-2 e incubadas con *L. mexicana* + K562
- 5) Células K562 como control negativo para medir liberación espontánea de células K562
- 6) Células K562 incubadas con 100 μl de SDS (duodecil sulfato de sodio).al 5% como control positivo con liberación total.

Para el control de liberación espontánea se emplearon 1×10^4 células K562 marcadas con Cr^{51} en RPMI. Para el control de liberación total se incubaron 1×10^4 células K562 marcadas con Cr^{51} con 100 μl de SDS.al 5 %

Para el ensayo de citotoxicidad, el tiempo de incubación fue de 4 h a 37 °C con 5% CO_2 . Para cuantificar la citotoxicidad se midió Cr^{51} liberado por las células lisadas. Se centrifugaron las placas a 500 r.p.m durante 5 min y se aspiraron 100 μl del sobrenadante, evitando entrar en contacto con las células. Para cuantificar el Cr^{51} liberado al sobrenadante por las células K562, que lisadas por células NK, mediante un contador gama. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera.

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{liberación experimental (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación total (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}$$

cpm= cuentas por minuto

Se analizaron los resultados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney y los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

7.4 Ensayos de quimioluminiscencia

Los ensayos de quimioluminiscencia se realizaron de acuerdo al método descrito por Frankenburg (76).

La producción de metabolitos reactivos de oxígeno fue analizado mediante la quimioluminiscencia, utilizando un luminómetro (Labsystem Finlandia) controlado a 37° C. Se analizó la liberación de radicales hidroxilo de células NK suspendidas en 40 μ l de RPMI enriquecido con 10 % de suero fetal bovino. Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de parásitos utilizando una relación de 1:10 (1×10^6 de células NK y 10×10^6 promastigotes de *L. mexicana* obtenidos en fase logarítmica a los 4 días de cultivo). La liberación de radicales libres se indujo con 60 μ l de PMA (10 μ g/ml) y 210 μ l de luminol (1mg/ml) (Sigma). La quimioluminiscencia fue registrada en miliVolts (mV). Se utilizaron células NK de sujetos control y de pacientes con las distintas formas clínicas de leishmaniasis (LCL, LCD). Dicho análisis se realizó a diferentes tiempos (0, 30, 60 y 90 min).

Para determinar el índice de inhibición en la generación de radicales hidroxilo por *L. mexicana* sobre células NK, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de radicales libres} = \frac{\text{Experimental (mV)}}{\text{Control (mV)}}$$

El experimental está dado por la lectura en mV obtenida por las NK en presencia de *L. mexicana* entre el valor del control obtenido de NK en ausencia del parásito. Para el estudio estadístico se empleó la prueba estadística U de Mann-Whitney.

8 RESULTADOS

8.1 Producción de IFN- γ .

El promedio de producción basal de IFN- γ por células NK de 4 sujetos control fue de 21.47 pg/ml. La incubación de estas células con *L. mexicana* aumentó su producción de IFN- γ a un promedio de 38 pg/ml. Este aumento no fue estadísticamente significativo ($P < 0.312$) (Tabla 1). Las LAK normales tuvieron una producción basal de IFN- γ de 218 pg/ml. La incubación de estas células con *L. mexicana* también incrementó su producción de IFN- γ a 460 pg/ml. Este incremento tampoco fue significativo ($P < 0.553$) (Tabla 2).

La producción basal de IFN- γ por células NK de los 7 pacientes con LCL fue de un promedio de 5.9 pg/ml, el intervalo de esta citocina fue de 3.9 como mínimo a 16.8 pg/ml como máximo, sin embargo la tendencia de los valores en estado basal de esta citocina fue de 3.9 pg/ml. La incubación con *L. mexicana* incrementó la producción promedio a 46.6 pg/ml ($P < 0.898$) (Tabla 1). El intervalo en este grupo de pacientes tuvo 3.9 pg/ml como mínimo y 313 pg/ml como máximo. La tendencia hacia el incremento en la producción de IFN- γ solo se observó en 2 de 7 pacientes con LCL. Las LAK de pacientes con LCL tuvieron una producción basal de IFN- γ a un promedio de 170 pg/ml ($P < 0.018$). La incubación de estas células activadas con *L. mexicana* incrementó su producción promedio de IFN- γ a 197 pg/ml ($P < 0.668$) (Tabla 2).

Por otro lado, la producción basal promedio de IFN- γ por células NK purificadas de 3 pacientes con LCD fue de 3.9 pg/ml y la coincubación de estas células con *L. mexicana* no modificó su producción de IFN- γ , quedándose en un promedio de 3.9 pg/ml (Tabla 1). Las LAK de pacientes con LCD incrementaron su producción basal de IFN- γ a un promedio de 54 pg/ml. La coincubación con *L. mexicana* de las células NK activadas

incrementó ligeramente la producción de la citocina a 63 pg/ml ($P<1.0$) (Tabla 2, Fig. 9 y 9.1).

En la tabla 3 se resume el factor promedio de estimulación en la producción de IFN- γ por células NK estimuladas por *L. mexicana* en los 3 grupos de pacientes. En sujetos control se observó un factor de estimulación de 1.7 y en pacientes con LCL fue de 7.8. A diferencia de esto, en pacientes con LCD no hubo producción basal ni hubo respuesta al estímulo con *L. mexicana*.

Las LAK de sujetos control aumentaron su producción basal de IFN- γ 10 veces, de 21 pg/ml a 218 pg/ml ($P<0.193$). En estas condiciones de activación, las células LAK de sujetos control también fueron susceptibles a ser activadas por el parásito con un factor de 2.1. La preincubación de células NK de pacientes con LCL con IL-2 incrementó su producción basal de IFN- γ 28.9 veces, de 5.9 pg/ml a 170 pg/ml ($P<0.018$). Las células LAK de pacientes con LCL incrementaron su producción de IFN- γ por un factor de 1.16 cuando fueron incubadas con *L. mexicana*. Interesantemente, la preincubación de células NK de pacientes con LCD con IL-2 logró incrementar su producción basal de IFN- γ 20 veces, de 3.9 pg/ml a 54 pg/ml. En estas condiciones de activación, las células LAK de pacientes con LCD respondieron al estímulo con *L. mexicana* incrementando en promedio su producción de IFN- γ 1.17 veces, de 54 pg/ml a 63 pg/ml (el intervalo de los valores de esta citocina es de 3.9 como mínimo a 178.2 pg/ml como máximo).

En conclusión, las células NK de sujetos control y de algunos pacientes con LCL respondieron al estímulo con *L. mexicana* incrementando en promedio su producción de IFN- γ . Por el contrario las células NK de pacientes con LCD no respondieron al estímulo con *L. mexicana*, y únicamente su preactivación con IL-2 las hizo ligeramente responsivas

al estímulo del parásito. Esta falta de respuesta de células NK de pacientes con LCD contrasta fuertemente con la respuesta que presentan pacientes con LCL. Posiblemente la falta de producción de IFN- γ por células NK de pacientes con LCD pudiera participar como factor contribuyente a la diseminación del parásito en estos pacientes.

8.2 Actividad citotóxica de células NK

El análisis de la actividad citotóxica de las células NK y las LAK de sujetos control y de pacientes con distintos cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea reveló que las células NK de 20 sujetos control presentaron un promedio de actividad citotóxica del 26.77 %. La presencia de *L. mexicana* redujo significativamente la actividad citotóxica de estas células a 12.27 % ($P < 0.015$) (Tabla 4, Fig. 10).

La preactivación de células NK de 20 sujetos control con IL-2 incrementó significativamente ($P < 0.00001$) (Fig. 10) su promedio de actividad citotóxica a 79.99 % con respecto a células no activadas. También en estas células LAK, la coincubación con *L. mexicana* disminuyó significativamente su actividad citotóxica en todos los sujetos con un promedio de 43.28 % ($P < 0.000035$).

El promedio de actividad citotóxica de las células NK de 5 pacientes con LCL fue de 19.37 % y la coincubación con el parásito disminuyó significativamente dicha actividad citotóxica a un promedio de 5.72 % ($P < 0.047$) (Tabla 4, Fig. 10).

La preactivación de las células NK con IL-2 de pacientes con LCL incrementó significativamente ($P < 0.016$) su promedio de actividad citotóxica a 79.84 % con respecto al valor de células no estimuladas con IL-2. La coincubación de estas células activadas (LAK)

con *L. mexicana* disminuyó significativamente en todos los individuos su actividad citotóxica a un promedio de 33.46 % ($P<0.047$) (Tabla 4).

El promedio de actividad citotóxica de células NK de 3 pacientes con LCD fue de 24.7 % y la coincubación con *L. mexicana* redujo significativamente dicha actividad citotóxica a un promedio de 2.71 % ($P<0.049$) (Tabla 4, Fig. 10).

La preactivación de las células NK de pacientes con LCD con IL-2 incrementó su citotoxicidad a un promedio de 87.31 % ($P<0.126$) con respecto a células no estimuladas con IL-2. La coincubación de estas células LAK con *L. mexicana* disminuyó su actividad citotóxica a un promedio de 32.63 % ($P<0.126$) (Tabla 4, Fig. 10).

El análisis del factor de inhibición de actividad citotóxica que ejerce *L. mexicana* sobre células NK de los 3 grupos analizados reveló que la inhibición se correlacionaba directamente con la severidad del cuadro clínico. El factor de inhibición sobre células NK de sujetos control fue de 2.2, mientras que sobre células NK de pacientes con LCL fue de 3.4 y en pacientes con LCD fue de 9.1. La activación previa de células NK con IL-2, transformándolas en células LAK, redujo el efecto inhibitorio que ejerce *L. mexicana* sobre su actividad citotóxica. Sin embargo, aun en células LAK se observó que persiste una inhibición de la actividad citotóxica que se correlaciona con la severidad del cuadro clínico, ya que en sujetos control el factor de inhibición fue de 1.8, en pacientes con LCL fue de 2.4 y en pacientes con LCD fue de 2.7 (Tabla 5).

8.3 Producción de radicales libres

Se cuantificó la generación de radicales libres por células NK de sujetos control, pacientes con LCL y LCD estimulados con PMA en ausencia y presencia de *L. mexicana* en relación 1:10 (célula:parásito). Para este análisis se realizó una cinética de tiempo de coincubación de *L. mexicana* con células NK que incluyeron los tiempos: 0, 30, 60 y 90 min.

Se encontró que al tiempo 0, las células NK de sujetos control presentaron una quimioluminiscencia promedio de 16 mV y la coincubación con *Leishmania* redujo la magnitud de la quimioluminiscencia a 13 mV ($P < 0.362$). Pacientes con LCL presentaron un valor basal de 52 mV y la incubación con *L. mexicana* no redujo significativamente el valor a 49 mV ($P < 0.752$). Células NK de pacientes con LCD presentaron un valor basal mínimo de 1.2 mV y la incubación con *L. mexicana* redujo este valor aun más a un valor de 0.9 mV ($P < 0.4$) (Tabla 6, Fig. 11). La disminución de la magnitud de quimioluminiscencia basal de células NK de pacientes con LCD con respecto a sujetos control fue altamente significativo ($P < 0.0026$), asimismo la diferencia entre los valores basales de pacientes con LCD y LCL fue muy significativo ($P < 0.0052$). La quimioluminiscencia generada por células NK de pacientes con LCD incubadas con *L. mexicana* también fue significativamente menor que la de las células NK de pacientes con LCL y de sujetos control incubadas con *L. mexicana* ($P < 0.0093$ y $P < 0.0031$).

La Figura 11 muestra que la coincubación de células NK de sujetos control y pacientes con LCL durante 30, 60 y 90 min. con *L. mexicana* invierte la respuesta de las células con respecto a lo observado al tiempo 0, ya que se observa un ligero efecto activador, el cual no es estadísticamente significativo. Esto contrasta con los datos de pacientes con LCD, ya que las células de éstos pacientes no responden al estímulo con *L.*

mexicana en ninguno de los tiempos estudiados. Las diferencias en la magnitud de estimulación de células NK de pacientes con LCL y LCD estimuladas con *L. mexicana* fue altamente significativo durante los 30 y 60 min ($P < 0.0357$, $P < 0.01$), respectivamente (Tablas 7, 8).

La cinética adicionalmente mostró que la magnitud de los valores de quimioluminiscencia de sujetos control y de pacientes con LCL tienden a disminuir con el tiempo, tanto en condiciones basales como estimulados con *L. mexicana*. (Figura 11, Tablas 6, 7, 8, 9 y 10). El análisis del promedio de los 4 tiempos de coincubación (Tabla 11, Fig. 12) reveló que en sujetos control el parásito disminuyó la quimioluminiscencia de células NK de 13 mV a 11 mV ($P < 0.52$), mientras que en pacientes con LCL hubo un incremento en el valor promedio de 28 mV a 34 mV ($P < 0.64$). Las células NK de pacientes con LCD no respondieron en ninguno de los tiempos estudiados. Los valores basales de células NK de sujetos control y de pacientes con LCL fueron significativamente mayores que los de pacientes con LCD ($P < 0.000001$, $P < 0.000109$). Asimismo, los valores de quimioluminiscencia obtenidos en células NK estimuladas con *L. mexicana* fueron significativamente mayores en sujetos control ($P < 0.000001$) y pacientes con LCL ($P < 0.000003$) que en pacientes con LCD.

En resumen, mientras que en pacientes con LCL y en sujetos control las células NK reaccionan a PMA en estado basal generando una señal de quimioluminiscencia, las células NK de pacientes con LCD no responden a PMA. La coincubación de células NK de sujetos control con *Leishmania* disminuyó ligeramente la quimioluminiscencia inducida con PMA, mientras que en pacientes con LCL *Leishmania* incrementó ligeramente los valores de quimioluminiscencia de células NK aunque las células NK de pacientes con LCD prácticamente no respondieron al estímulo con PMA, esta mínima respuesta también fue

inhibida por *L. mexicana* en todos los tiempos estudiados. Como muestra la tabla 12 en sujetos controles y pacientes con LCD, *L. mexicana* inhibió la generación de radicales hidroxilo, siendo el factor promedio de la inhibición 1.2 y 1.4, respectivamente únicamente en pacientes con LCL se detectó una tendencia hacia la estimulación de la quimioluminiscencia cuando se incuban las células NK con *L. mexicana*.

Sujetos control

	NK	NK + <i>Leishmania</i>
1	3.9	3.9
2	18	44.8
3	38	28.6
4	26	74.2
Σ	85.9	151.5
X	21.47	37.87
DS	14.312	29.483
	1	2

Pacientes con LCL

	NK	NK + <i>Leishmania</i>
1	3.9	3.9
2	5.2	313.7
3	16.8	12
4	3.9	3.9
5	3.9	3.9
6	3.9	3.9
7	3.9	3.9
Σ	41.5	345.20
X	5.9	46.57
DS	4.82	117.88
	3	4

Pacientes con LCD

	NK	NK + <i>Leishmania</i>
1	3.9	3.9
2	3.9	3.9
3	3.9	3.9
Σ	11.7	11.7
X	3.9	3.9
DS	0	0
	5	6

Tabla 1. Producción de IFN- γ (pg/ml) por células NK incubadas con *L. mexicana*

Sujetos control

	NK + IL-2	NK + IL-2 + <i>Leishmania</i>
1	3.9	10.72
2	784	802
3	44.8	28.6
4	338.8	1000
Σ	1171.5	1841.32
X	217.87	460.33
DS	359.796	515.274
	7	8

Pacientes con LCL

	NK +IL-2	NK +IL-2 + <i>Leishmania</i>
1	22.8	11.3
2	500	972
3	352	121.8
4	26.4	15.6
5	3.9	3.9
6	118.6	58.4
Σ	1022.7	1183
X	170.45	197.16
DS	207.59	382.53
	9	10

Pacientes con LCD

	NK +IL-2	NK +IL-2 + <i>Leishmania</i>
1	3.9	3.9
2	14.1	8.5
3	144.8	178.2
Σ	167.80	190.6
X	54.26	63.53
DS	79.823	100.502
	11	12

Tabla 2. Producción de IFN- γ (pg/ml) por células NK pre-estimuladas con IL-2 (12,000 U/ml) e incubadas con *L. mexicana*.

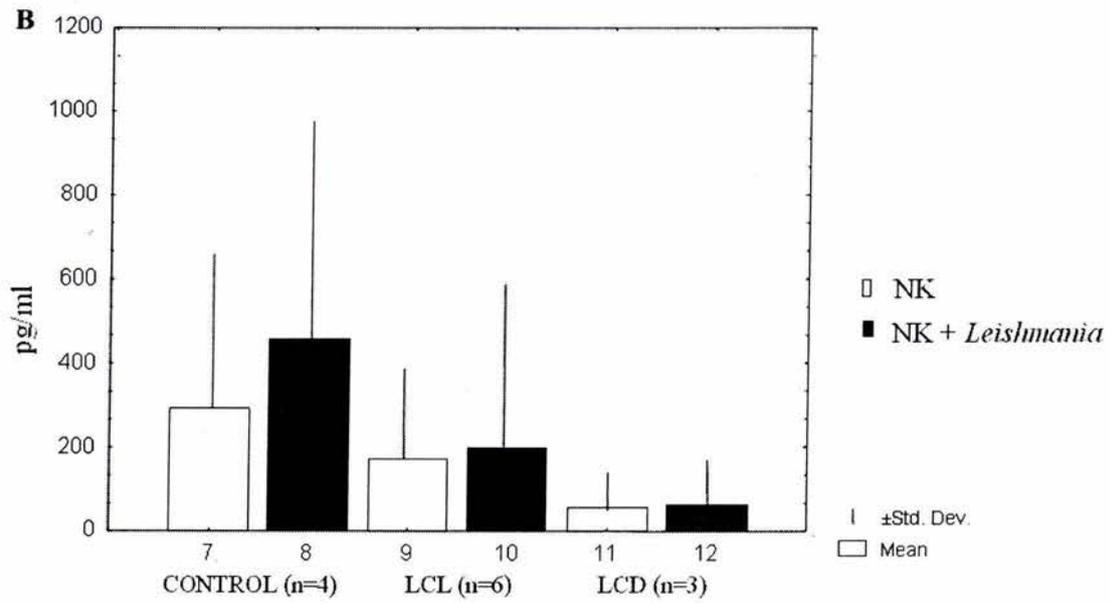
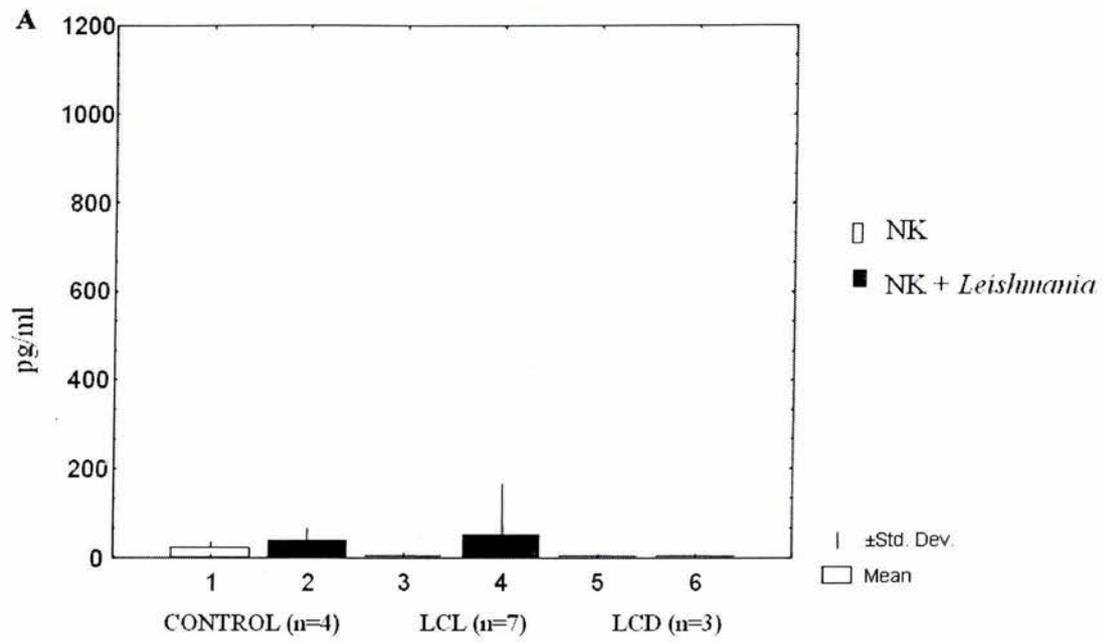


Figura 9. Producción de IFN- γ por células NK. (A) en presencia de *L. mexicana*. (B) *L. mexicana* + IL-2 (12,000 U/ml).

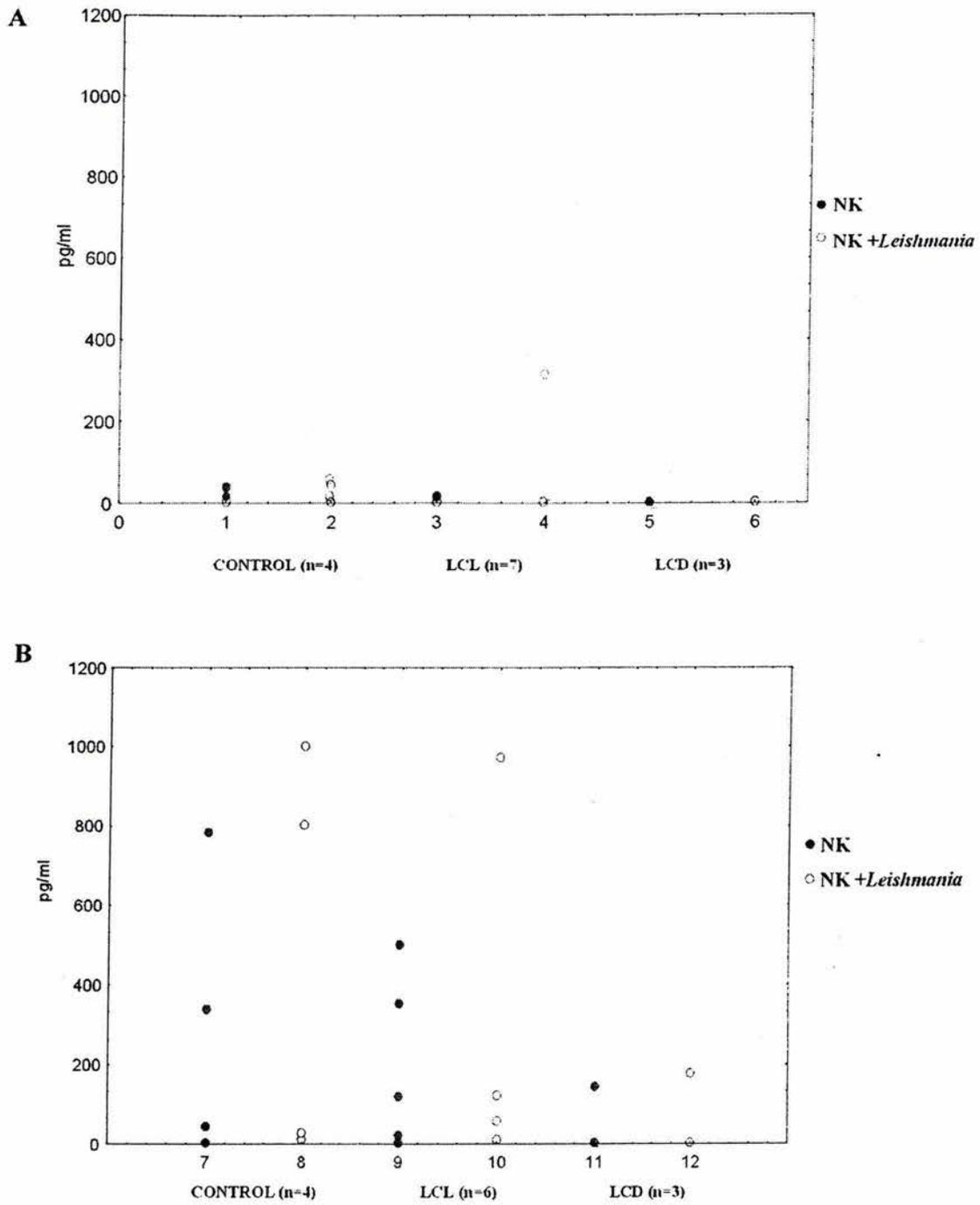


Figura 9.1. Producción de IFN- γ por células NK. (A) en presencia de *Leishmania mexicana*. (B) *Leishmania mexicana* + IL-2 (12,000 U/ml).

Tabla 3. Factor Promedio de estimulación de IFN- γ .

$P < 0.05$

NK	NK LCL	NK LCD	NK + IL-2	NK + IL-2 LCL	NK + IL-2 LCD
1.7	7.8	1	2.1	1.16	1.17
$P=0.312$	$P=0.898$	$P=1.0$	$P=0.553$	$P=0.068$	$P=1.0$

El factor promedio de estimulación fue calculado dividiendo el promedio de los valores (pg/ml) de los experimentales, de los sujetos control, pacientes con LCL y LCD entre los controles de estos mismos grupos.

$P=$ Es la comparación entre NK (control) y NK incubadas con *L. mexicana* (experimental).

Tabla 4. Porcentaje de citotoxicidad de células NK en condiciones basales en presencia de *L mexicana* de sujetos control y pacientes con la formas clínicas de LCL y LCD

	Sujetos control		LCL		LCD	
	NK	NK+ <i>Leishmania</i>	NK	NK + <i>Leishmania</i>	NK	NK+ <i>Leishmania</i>
	11.38	11.38	12	5.45	44.66	3.76
	43.18	8.86	44.66	3.76	5.2	2.19
	27.66	21	27.04	13.85	24.34	2.18
	35.71	16.27	7.7	2.1		
	42.8	20.26	5.53	3.48		
	14.16	8				
	21.23	13.99				
	39.11	21				
	7.9	2.3				
	3	1.3				
	8.23	1.7				
	6.57	5.44				
	11.54	1.9				
	18.18	9.71				
	69.77	11.36				
	6.9	1.83				
	10.74	2.98				
	32.82	11.5				
	75.73	43.65				
	48.89	30.97				
Σ	535.5	245.4	96.93	28.64	74.2	8.13
X	26.77	12.27	19.37	5.72	24.7	2.71
DS	21.178	10.33	16.43	4.694	19.73	0.909
	1	2	3	4	5	6

Tabla de datos de porcentajes de citotoxicidad de células NK estimuladas con IL-2 (12,000 U/ml) y en presencia de *L mexicana* de sujetos control y pacientes con las formas clínicas de LCL y LCD.

	Sujetos control		LCL		LCD	
	NK	NK+ <i>Leishmania</i>	NK	NK + <i>Leishmania</i>	NK	NK+ <i>Leishmania</i>
	77.5	27.28	86.96	24.59	84.34	75.93
	76.62	40.04	84.34	75.93	28.31	13.83
	96.82	91.29	61.76	34.18	149.3	8.13
	87.91	71.81	33.49	22.04		
	87.38	73.91	13267	10.56		
	99.69	37.45				
	44.77	29.93				
	90.47	56.98				
	48.09	22.62				
	89.87	31.93				
	82.95	19.23				
	46.9	11.25				
	90.23	26.64				
	55.91	47.92				
	85.43	49.42				
	91.54	48.26				
	66.45	34.96				
	66.2	40.19				
	89.24	27.63				
	125.15	76.8				
Σ	1599.8	865.6	399.2	167.3	261.93	97.89
X	79.99	43.28	79.84	33.46	87.31	32.63
DS	20.14	21.37	36.53	25.19	6.54	37.6
	7	8	9	10	11	12

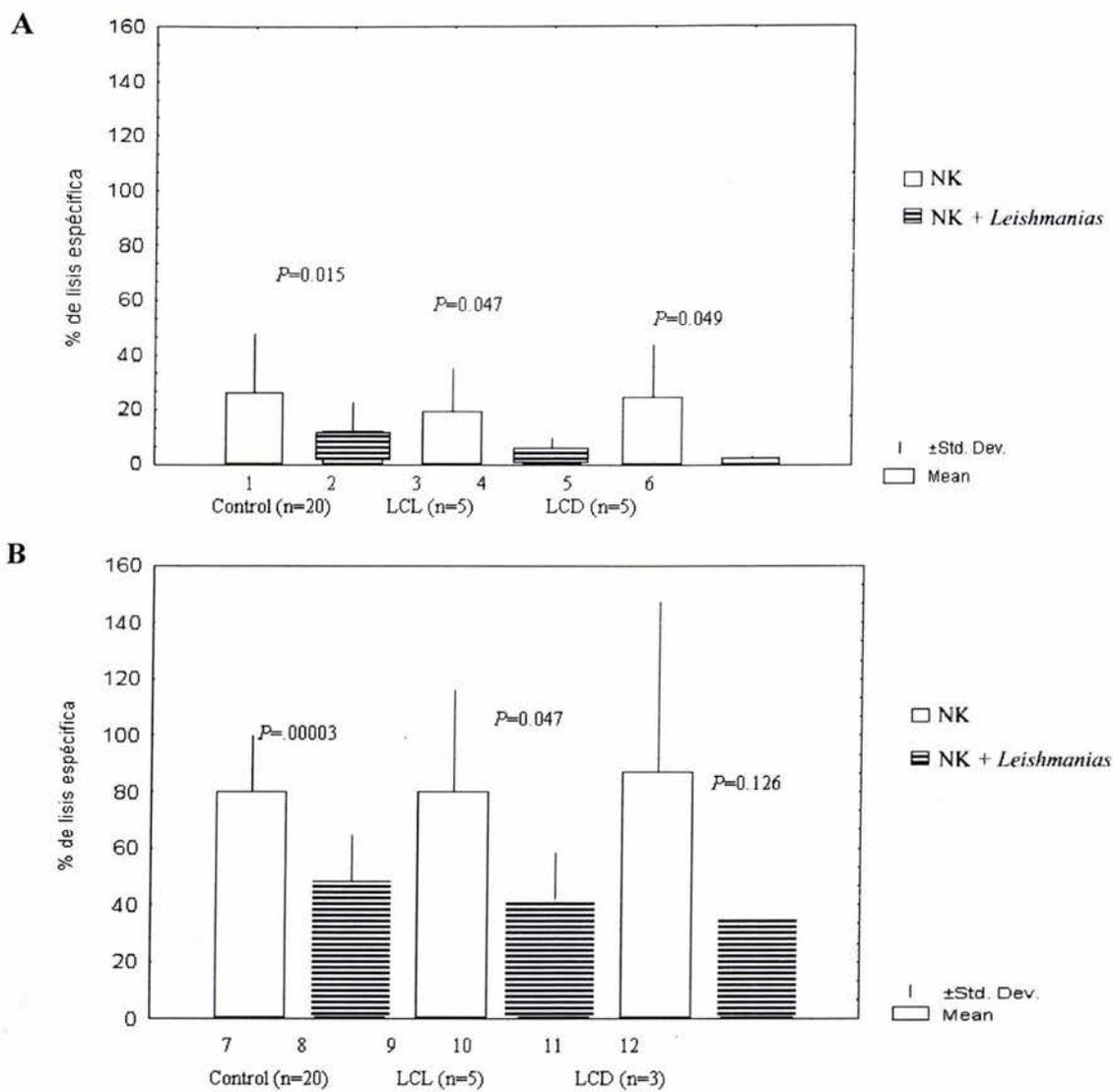


Figura 10. Porcentaje de citototoxicidad de células NK sobre K562. (A) coincubadas con *L. mexicana*. (B) *L. mexicana* + IL-2 (12,000 U/ml).

Tabla 5. Factor promedio de inhibición de citotoxicidad.

$P < 0.05$

NK	NK LCL	NK LCD	NK + IL-2	NK + IL-2 LCL	NK + IL-2 LCD
2.2	3.4	9.1	1.8	2.4	2.7
$P=0.015$	$P=0.047$	$P=0.049$	$P=0.00003$	$P=0.047$	$P=0.126$

El factor promedio de inhibición de citotoxicidad fue calculado dividiendo el promedio de los valores pg/ml del control de sujetos control, pacientes con LCL y LCD entre el experimental de estos mismos grupos.

	Sujetos control		LCL		LCD	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
	5.23	5.52	160.8	154.7	0.947	0.525
	1.61	0.62	57.74	58.44	0.515	0.167
	0.35	0.19	6.2	3.08	0.245	0.26
	0.45	0.35	86.08	83.77	2.607	2.455
	5.1	2.81	92.13	78.67	1.57	1.034
	0.58	0.43	2.92	2.82	2.111	1.209
	0.59	0.4	0.66	0.11	1.159	0.651
	35.58	26.94	13.55	14.58	1.16	1.07
	5.41	4.83			0.93	1.06
	4.35	4.45				
	15.81	12.21				
	14.29	6.46				
	85.75	65.16				
	24.43	23.58				
	11.2	9.58				
	28.27	0.073				
	26.91	23.26				
	14.57	8.67				
	61.97	55.07				
	6.52	4.11				
	0.84	0.99				
	19.75	15.6				
	5.1	4.13				
	24.46	23.5				
	18.13	19.08				
	36.33	35.67				
	50.91	42.71				
	25.64	20.11				
	23.45	19.23				
	2.5	1.93				
	1.92	3.81				
	0.6	0.84				
	5.84	3.37				
	9.45	7.17				
	1.13	1.97				
Σ	575.02	454.823	420.08	396.17	11.244	8.431
X	16.429	12.995	52.51	49.521	1.249	0.937
DS	19.419	16.072	57.645	54.987	0.745	0.682
	1	2	3	4	5	6

Tabla 6. Milivolts (mV) registrados durante la liberación de radicales libres en células NK de sujetos control, pacientes con las formas clínicas de LCL y LCD incubadas con *L. mexicana* (tiempo 0 minutos).

	Sujetos control		LCL		LCD	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
	3.43	5.09	117	121.1	0.595	0.696
	1.71	1.74	37.47	36.76	0.556	0.205
	0.26	0.34	4.66	5.28	0.125	0.115
	0.35	0.28	13.46	20.97	1.69	1.314
	2.52	1.56	62.84	77.58	0.86	0.357
	0.36	0.29	0.58	0.26	1.657	0.678
	25.84	21.57	0.31	0.276	1.4	1.12
	5.93	4.35	10.87	13.47	0.96	1.05
	3.58	3				
	22.41	14.32				
	26.65	41.58				
	22.58	14.56				
	0.637	0.126				
	28.26	0.16				
	14.72	13.07				
	43.58	27.7				
	49.67	33.33				
	30.38	18.88				
	2.53	2.31				
	2.55	3.58				
	0.6	0.46				
	8.19	8.17				
	8.02	7.4				
Σ	306.797	230.646	247.19	275.696	7.843	5.535
X	12.783	9.610	30.899	34.462	0.980	0.692
DS	14.731	11.507	40.928	43.397	0.562	0.444
	7	8	9	10	11	12

Tabla 7. Milivolts (mV) registrados durante la liberación de radicales libres en células NK de sujetos control, pacientes con las formas clínicas de LCL y LCD incubadas con *L. mexicana* (tiempo de 30 minutos).

	Sujetos control		LCL		LCD	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
	0.37	0.24	59.97	141.13	0.48	0.317
	1.74	1.65	50.33	74.96	0.317	0.199
	0.13	0.04	4	2.15	0.061	0.063
	0.59	0.59	7.59	8.46	1.43	1.017
	28.1	16.59	2.31	16.81	1.017	0.615
	5.52	2.84	0.363	0.37	1.79	1.05
	1.72	2.52	0.408	0.92	0.96	0.49
	22.86	8.72	7.98	8.45		
	21.41	62.4				
	22.94	12.59				
	4.78	7.52				
	23.76	28.74				
	2.05	1.42				
	3.43	3.52				
	0.3	0.55				
	7.78	6.2				
	7.95	6.25				
	0.96	8.96				
Σ	156.39	171.34	132.951	253.25	6.055	3.751
X	8.688	9.519	16.619	31.656	0.865	0.536
DS	10.009	15.039	24.092	50.640	0.619	0.385
	13	14	15	16	17	18

Tabla 8. Milivolts (mV) registrados durante la liberación de radicales libres en células NK de sujetos control, pacientes con las formas clínicas de LCL y LCD incubadas con *L. mexicana* (tiempo de 60 minutos).

	Sujetos control		LCL		LCD	
	Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
	0.25	0.13	62.01	77.89	0.1	0.062
	1.07	0.97	12.61	34.65	1.31	0.669
	0.19	0.09	1.82	2.58	1.261	0.826
	24.22	23.88	0.37	1	1.32	1.21
	4.34	3.9	0.81	1.5	0.76	1.18
			0.21	0.6		
Σ	30.07	28.97	80.13	122.19	4.751	3.947
X	6.014	5.794	11.447	17.456	0.950	0.789
DS	10.318	10.230	22.717	29.327	0.530	0.468
	19	20	21	22	23	24

Tabla 9. Milivolts (mV) registrados durante la liberación de radicales libres en células NK de sujetos sanos, pacientes con las formas clínicas de LCL y LCD incubadas con *L. mexicana* (tiempo 90 minutos).

Figura 11. Milivoltios (mV) registrados durante la liberación de radicales libres en células NK.

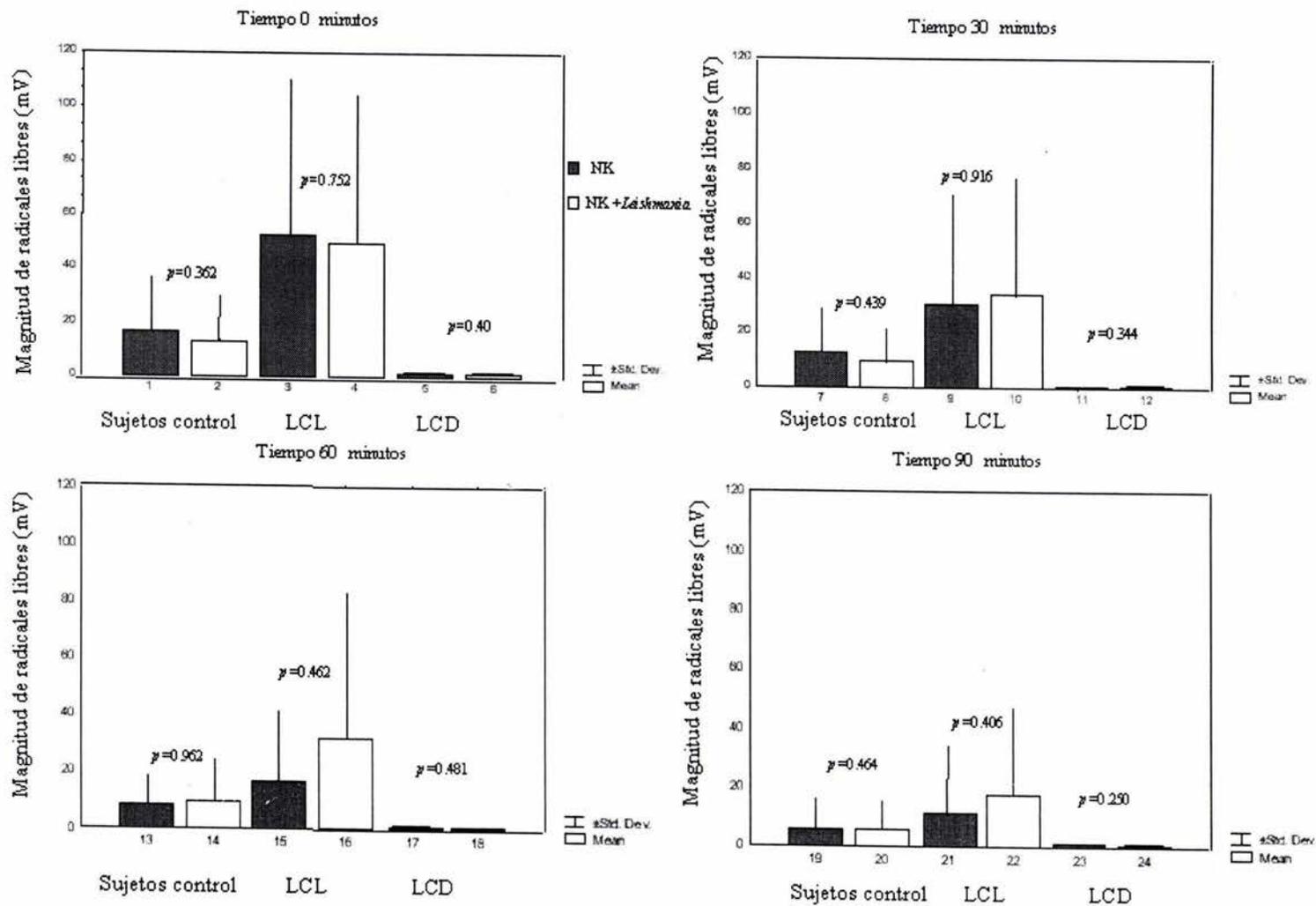


Tabla 10. Factor de inhibición en la generación de radicales libres generadas por células NK estimuladas con PMA e incubadas con *L. mexicana*.

Tiempo: 0 minutos

$P < 0.05$

NK Sujetos sanos	NK LCL	NK LCD
1.3	1.1	1.3
$P=0.36$	$P=0.75$	$P=0.4$

Tiempo: 30 minutos

NK Sujetos sanos	NK LCL	NK LCD
1.33	0.9	1.4
$P=0.439$	$P=0.916$	$P=0.344$

Tiempo: 60 minutos

NK Sujetos sanos	NK LCL	NK LCD
0.9	0.5	1.6
$P=0.96$	$P=0.46$	$P=0.48$

Tiempo: 90 minutos

NK Sujetos control	NK LCL	NK LCD
1.03	0.7	1.2
$P=0.46$	$P=0.4$	$P=0.25$

El factor promedio de inhibición de radicales libres fue calculado dividiendo el promedio de los valores (mV) del control de sujetos control, pacientes con LCL y LCD entre el experimental de estos mismos grupos.

Sujetos control		LCL		LCD	
Control	Experimental	Control	Experimental	Control	Experimental
5.23	5.52	160.8	154.7	0.947	0.525
1.61	0.62	57.74	58.44	0.515	0.167
0.348	0.19	6.2	3.08	0.245	0.26
0.451	0.35	86.08	83.77	2.607	2.455
5.055	2.81	92.13	78.67	1.57	1.034
0.575	0.43	2.92	2.82	2.111	1.209
0.592	0.4	0.66	0.11	1.159	0.651
35.58	26.94	13.55	14.58	1.16	1.07
5.41	4.83	117	121.1	0.93	1.06
4.35	4.45	37.47	36.1	0.595	0.696
15.81	12.21	4.66	5.28	0.556	0.205
14.29	6.46	13.46	20.97	0.125	0.115
85.75	65.16	62.84	77.58	1.69	1.314
24.43	23.58	0.58	0.26	0.86	0.357
11.2	9.58	0.31	0.276	1.657	0.678
28.27	0.073	10.87	13.47	1.4	1.12
26.91	23.26	59.97	141.13	0.96	1.05
14.57	8.67	50.33	74.96	0.48	0.317
61.97	55.07	4	2.15	0.317	0.199
6.52	4.11	7.59	8.46	0.061	0.063
0.84	0.99	2.31	16.81	1.43	1.017
19.75	15.6	0.363	0.37	1.017	0.615
5.1	4.13	0.408	0.92	1.79	1.05
24.46	23.5	7.98	8.45	0.96	0.49
18.13	19.08	62.01	77.89	0.1	0.062
36.33	35.67	12.61	34.65	1.31	0.669
50.91	42.71	1.82	2.58	1.261	0.826
25.64	20.11	0.37	1	1.32	1.21
23.45	19.23	0.81	1.5	0.76	1.18
2.5	1.93	0.21	0.6		
1.92	3.807	2.3	3.97		
0.6	0.841				
5.84	3.373				
9.45	7.171				
1.13	1.97				
3.43	5.09				
1.71	1.74				
0.263	0.34				
0.35	0.28				
2.52	1.56				
0.364	0.29				
25.84	21.57				
5.93	4.35				
3.58	3				
22.41	14.32				
26.65	41.58				
22.58	14.56				
0.637	0.126				

	28.26	0.16				
	14.72	13.07				
	43.58	27.7				
	49.67	33.33				
	30.38	18.88				
	2.53	2.31				
	2.55	3.58				
	0.6	0.46				
	8.19	8.17				
	8.02	7.4				
	2.04	6.78				
	0.037	0.24				
	1.74	1.65				
	0.13	0.04				
	0.59	0.59				
	28.1	16.59				
	5.52	2.84				
	1.72	2.52				
	22.86	8.72				
	21.41	62.4				
	22.94	12.59				
	4.782	7.52				
	23.76	28.74				
	2.05	1.42				
	3.43	3.52				
	0.3	0.55				
	7.78	6.2				
	7.95	6.25				
	0.96	8.96				
	0.25	0.13				
	1.07	0.97				
	0.19	0.09				
	24.22	23.88				
	4.34	3.9				
Σ	1067.904	885.781	880.351	1046.646	29.893	21.664
X	13.023	10.802	28.398	33.763	1.0308	0.747
DS	16.091	14.3	40.812	45.219	0.620	0.519
	1	2	3	4	5	6

Tabla 11. Valor promedio de los 4 tiempos de los Milivolts (Mv) registrados durante la liberación de radicales libres en célula NK de sujetos control y pacientes con LCL y LCD, solos y en presencia de *L. mexicana*.

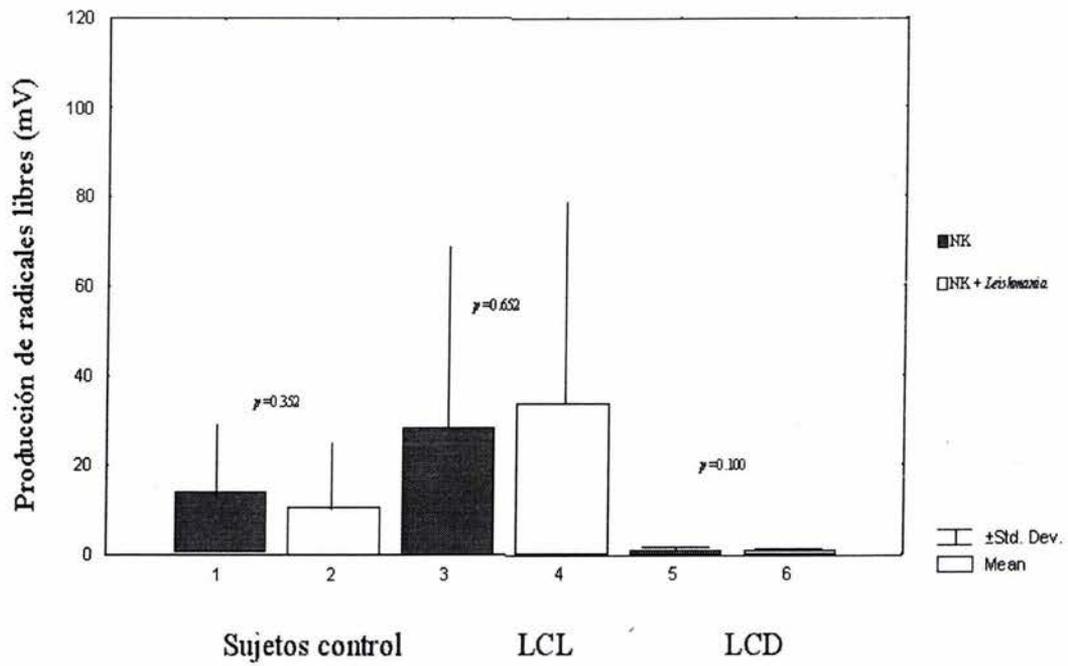


Figura 12. Promedio de los cuatro tiempos de la producción de radicales libres en milivolts (mV) por células NK de sujetos control, pacientes con LCL y LCD, solos y en presencia de *L. mexicana*

$P < 0.05$

NK Sujetos control	NK LCL	NK LCD
1.2	0.8	1.4
$P=0.35$	$P=0.65$	$P=0.10$

Tabla 12. Promedio de los cuatro tiempos (0, 30, 60 y 90 minutos) del factor de inhibición en la generación de radicales libres generados por células NK estimuladas con PMA

$P < 0.05$

1 vs 2	0.015	2 vs 9	0.017	4 vs 7	0.001	6 vs 8	0.006	8 vs 9	0.029
1 vs 4	0.008	2 vs 10	0.001	4 vs 8	0.001	6 vs 9	0.025	9 vs 10	0.047
1 vs 6	0.008	2 vs 11	0.011	4 vs 9	0.009	6 vs 10	0.025		
1 vs 7	0.000	3 vs 4	0.047	4 vs 10	0.016	6 vs 11	0.049		
1 vs 9	0.005	3 vs 6	0.025	4 vs 11	0.025	6 vs 12	0.049		
1 vs 11	0.0045	3 vs 7	0.001	5 vs 7	0.006	7 vs 8	0.000		
2 vs 7	0.000	3 vs 8	0.025	6 vs 5	0.049	7 vs 10	0.003		
2 vs 8	0.000	3 vs 9	0.016	6 vs 7	0.006	7 vs 12	0.028		

Estadística de la tabla 4.

1 vs 5	0.0026	4 vs 5	0.0093	9 vs 11	0.046	14 vs 17	0.0182
1 vs 6	0.0007	7 vs 11	0.0046	9 vs 12	0.027	15 vs 17	0.0372
2 vs 6	0.0031	7 vs 12	0.00267	10 vs 12	0.0357	15 vs 18	0.0206
3 vs 5	0.0052	8 vs 11	0.0236	13 vs 17	0.027	16 vs 17	0.027
3 vs 6	0.0028	8 vs 12	0.0102	13 vs 18	0.0092	16 vs 18	0.010

Estadística de las tablas 6, 7, 8 y 9.

1 vs 5	0.000001	3 vs 6	0.000013
1 vs 6	0.000	4 vs 5	0.000021
2 vs 5	0.000009	4 vs 6	0.000003
2 vs 6	0.000001		
3 vs 5	0.000109		

Estadística de la tabla 11.

9 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este estudio se analizó el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la producción de IFN- γ y la capacidad citotóxica de células NK obtenidas de pacientes con leishmaniasis cutánea de distinta severidad como son la leishmaniasis cutánea localizada y difusa.

Las células NK son células de la respuesta inmune innata que tienen la capacidad de producir citocinas tales como IFN- γ y TNF- α durante las infecciones. Desempeñan un papel importante en la activación del macrófago por su producción de IFN- γ y adicionalmente poseen actividad citotóxica que les permite eliminar células infectadas con virus, bacterias y células tumorales. En la leishmaniasis se ha reportado que las células NK desempeñan un papel decisivo durante las fases tempranas de la infección experimental (77), sin embargo no hay estudios previos sobre su participación como célula citotóxica en la leishmaniasis y tampoco existen datos sobre células NK obtenidas de pacientes de cuadros clínicos de distinta severidad.

Nuestros resultados muestran que *L. mexicana* induce un ligero estímulo en las células NK llevando a un incremento en su producción de IFN- γ . Esto se observó en células NK de sujetos control y de pacientes con LCL, mientras que células NK de pacientes con LCD no responden al estímulo. En estado basal, las células NK de sujetos control producen un promedio de 21 pg/ml, mientras que células NK de pacientes con LCL únicamente producen 5.9 y pacientes con LCD no producen IFN- γ . La co-incubación con *L. mexicana* incrementó la producción 1.7 veces de IFN- γ por células NK de sujetos control y 7.9 veces en pacientes con LCL. A diferencia de esto, las células NK de pacientes con LCD no secretaron IFN- γ en condiciones basales y tampoco respondieron al estímulo con *L. mexicana*.

Se activaron las células NK con IL-2 para transformarlas en células LAK y poder analizar si las células NK de pacientes con LCD eran capaces de responder a estímulos de citocinas. Encontramos que la estimulación de células NK de sujetos control con IL-2 incrementó su producción basal de IFN- γ de 21 pg/ml a 218 pg/ml. La incubación de estas células LAK con *L. mexicana* logró incrementar el estímulo 2.1 veces. En células NK de pacientes con LCL, el estímulo con IL-2 también incrementó su producción basal de IFN- γ de 5.9 pg/ml a 170 pg/ml y la incubación con el parásito únicamente estimuló la producción de IFN- γ 1.15 veces. Interesantemente, el estímulo con IL-2 de las células NK de pacientes con LCD logró inducir una producción basal de IFN- γ de 54 pg/ml, lo cual representa el 25-30 % de los valores obtenidos en células NK de sujetos control y pacientes con LCL, respectivamente. En estas condiciones de pre-estímulo, las células NK de pacientes con LCD pudieron responder a la presencia del parásito con un ligero incremento en su producción de IFN- γ de 1.17 veces, llegando a producir 63 pg/ml.

La preactivación de las células NK con rIL-2 no únicamente incrementó la producción basal de células NK de sujetos control (10X) y de pacientes con LCL (29X), sino que también indujo la respuesta basal de IFN- γ (54 pg/ml) en células NK de pacientes con LCD.

En resumen, mientras que las células NK de sujetos control y pacientes con LCL producen IFN- γ en estado basal y tienden a incrementar su producción con *L. mexicana*, las células NK de pacientes con LCD no producen IFN- γ en estado basal y requieren de un pre-estímulo con IL-2 para iniciar su producción de IFN- γ y responder a la presencia del parásito. Esta falta de respuesta de las células NK de pacientes con LCD pudiera deberse a múltiples factores que incluyen una posible disminución en los receptores de citocinas y/o fallas en la transducción de señales de los receptores. Adicionalmente, la

ausencia de respuesta en las células NK de pacientes con LCD al estímulo con *L. mexicana* también sugiere una falta de reconocimiento del parásito por estas células. En el laboratorio hemos descrito que LPG de *L. mexicana* es reconocido por receptores TLR-2 en células NK (62). Este reconocimiento directo del parásito por células NK incrementa su papel regulador en la leishmaniasis, generando un puente entre la respuesta inmune innata y la adquirida.

El diferente grado de activación observado en células NK de pacientes con LCL y LCD posiblemente sea debido a diferencias en el número y/o función de estos receptores en pacientes con LCD. La preincubación de las células NK de estos pacientes con IL-2 reestablece parcialmente su capacidad de responder al estímulo con *L. mexicana*. Sería interesante estudiar el efecto que ejerce IL-2 sobre receptores TLR-2.

A diferencia de lo observado con la producción de citocinas, el efecto que ejerce *L. mexicana* sobre la capacidad citotóxica de las células NK es radicalmente opuesta. Encontramos que el parásito inhibe significativamente la capacidad citotóxica en los 3 grupos estudiados. En células NK de sujetos control, *L. mexicana* reduce la capacidad citotóxica 2.2 veces ($P=0.015$), mientras en pacientes con LCL la reduce 3.4 ($P=0.047$) y en pacientes con LCD la reduce 9.1 veces ($P=0.049$). Aunque la capacidad inhibitoria fue significativa en los tres grupos de pacientes, llama la atención la mayor sensibilidad de las células NK de pacientes con LCD a ser inhibidas por el parásito. Para analizar si esta susceptibilidad era reversible en células transformadas a LAK, se estimularon las células NK de los 3 grupos de pacientes con IL-2. Encontramos que *L. mexicana* conserva esta capacidad inhibitoria aún sobre células NK activadas a LAK. *L. mexicana* reduce la capacidad citotóxica de células LAK de sujetos control 1.8 veces ($P=0.00003$), mientras que en pacientes con LCL la reduce 2.4 veces ($P=0.047$) y en pacientes con LCD 2.7 veces ($P=0.126$). También las células LAK de pacientes con

LCD son más susceptibles a ser inhibidas que células de pacientes con LCL o de sujetos control.

La actividad citotóxica ejercida por células NK se debe a la liberación de gránulos que contienen granzimas y perforinas, las cuales inducen la muerte en la células blanco por activación de caspasa 8 por granzimas y la consecuente apoptosis de la célula blanco (55). La liberación de gránulos citotóxicos es regulada por PKC, activada por fosfolipasa C al entrar en contacto con la célula blanco. La regulación de PKC sobre LTB4 es directamente responsable de la exocitosis de gránulos citotóxicos que se asocia con la generación de radicales hidroxilo (66). Se ha descrito que LPG de *Leishmania* es capaz inhibir a PKC en macrófagos, llevando a una inhibición del estallido oxidativo en éstas células (18, 78). Adicionalmente, se ha identificado que LPG inhibe directamente a PKC- α unida a la membrana celular (79). Recientemente también se reportó que LPG puede unirse a TLR-2, activando a las células NK e induciendo la producción de citocinas como TNF- α e IFN- γ (62). TLR-2 a su vez puede activar a PKC mediante la activación de fosfatidilinositol-3 cinasa (PI 3K), la cual activa fosfolipasa C y ésta a su vez activa PKC (80) De esta manera, además de incrementar la producción de IFN- γ por la activación de NF- κ B y la vía de JAK/STAT, la interacción de los receptores TLR-2 de las células NK con LPG de *Leishmania* puede activar a PKC llevando a un incremento en LTB4 con la liberación de gránulos citotóxicos e induciendo la producción de radicales hidroxilo.

La interacción de LPG con PKC de la célula aparentemente representa un evento central en la regulación de la célula NK y sin embargo existen datos contradictorios sobre el efecto ejercido. Por un lado, la interacción de LPG con TLR-2 induce un efecto activador sobre la célula y por otro lado su interacción con PKC- α induce un efecto inhibitorio sobre la célula (62, 79).

Aún no se ha definido si estos efectos contradictorios que ejerce LPG únicamente dependen de la molécula con la cual se une en la célula blanco: PKC- α vs TLR-2 o si posiblemente pudieran deberse a que distintas regiones de LPG actúen específicamente sobre PKC- α o sobre TLR-2, induciendo efectos biológicamente opuestos. El resultado final de los efectos ejercidos por ambos estímulos posiblemente está determinado por la magnitud del efecto ejercido individualmente por cada uno de ellos. La cantidad de moléculas TLR-2 presentes en la membrana celular puede ser variable, ya que este receptor es inducible. Uno de los estímulos que incrementa su expresión en la membrana es la unión de LPG purificado de la fase metacíclica de promastigotes de *L. major* (que contiene residuos de glucosa y arabinosa) a TLR-2 (62). Por el contrario la LPG obtenida de promastigotes de la fase procíclica del parásito contiene galactosa que sustituye a glucosa y a arabinosa, disminuye su efecto estimulador sobre TLR-2 (62). Dadas las observaciones anteriores, se podría especular que posiblemente el número de receptores TLR-2 presentes en la membrana de la célula NK, sea un componente decisivo sobre el estado de activación o inhibición que pueda ejercer LPG de *Leishmania* en una célula. Un tercer componente que pudiera participar en los efectos contradictorios observados con el estímulo de LPG pudiera ser que las isoformas de PKC asociadas a las vías de señalización de TLR-2 fueran diferentes a la de PKC- α asociada a la membrana y que LPG tuviera distintos efecto sobre las isoformas de PCK. Esto explicaría que el efecto de LPG sobre la actividad citotóxica no necesariamente deba coincidir con su efecto sobre la producción de citocinas o sobre la generación de radicales hidroxilo en una célula.

El estudio de la capacidad citotóxica de células NK de sujetos control y de pacientes con LCL y LCD estimuladas con *L. mexicana* reveló que en sujetos control, *L. mexicana* inhibe la capacidad citotóxica de la célula. Además se encontró que el

parásito inhibe la producción de radicales hidroxilo de células NK cuando son estimuladas con PMA. Este hallazgo coincide con los datos reportados en la literatura sobre la capacidad inhibitoria que ejerce LPG sobre PKC, y por lo tanto sobre la capacidad citotóxica y sobre la generación de radicales hidroxilo de la célula (67, 68).

A diferencia de esto, en células NK de pacientes con LCL encontramos una aparente discrepancia ya que se observó una inhibición significativa de la actividad citotóxica ejercida por *L. mexicana*, y por otro lado un ligero incremento en la generación de radicales hidroxilo. Esta discrepancia pudiera deberse a que en las células NK de estos pacientes, además de factores inhibitorios sobre PKC, también hay potentes mecanismos activadores. Posiblemente en pacientes con LCL hay un incremento de TLR-2 en células NK responsables de la activación de algunas de las isoformas de PKC por LPG, lo cual lleva al incremento en la producción de IFN- γ y al ligero aumento en radicales hidroxilo. Sin embargo la inhibición directa de LPG sobre PKC- α en membrana pudiera ser la responsable de la inhibición de la citotoxicidad. Esta observación especulativa implicaría distintas funciones para las distintas isoformas de PKC y sería interesante profundizar en el análisis sobre el efecto que ejerce LPG sobre las distintas isoformas de PKC y sus repercusiones sobre la biología celular.

En las células NK de pacientes con LCD se observó que hay una capacidad citotóxica basal comparable a la de sujetos control y de pacientes con LCL, sin embargo se encontró una mayor susceptibilidad de ser inhibida por *L. mexicana*. Por otro lado no hay producción basal de IFN- γ y no hay producción de radicales hidroxilo al ser estimuladas con PMA. Esto podría deberse a una posible disminución del número de receptores TLR-2 en membrana y/a defectos en las vías de señalización. Alteraciones cuantitativas de TLR-2 o deficiencias en la vía de señalización pudieran traducirse en una disminución en la producción de citocinas y en la generación de radicales hidroxilo.

La citotoxicidad disminuida en pacientes con LCD posiblemente sea debida a la falta de estimulación por TLR-2 en estas células, las hace más susceptibles al efecto inhibitor de la actividad citotóxica ejercido por la interacción LPG-PKC- α

En los pacientes con LCD, el parásito logra inmunomodular muy severamente a las células NK, ya que por un lado inhibe su producción de IFN- γ y adicionalmente inhibe más severamente su actividad citotóxica. Ambos efectos favorecen la sobrevida del parásito dentro de su célula hospedera, el macrófago. La falta de IFN- γ en estadios tempranos, aunado a la inhibición de la citotoxicidad que las células NK pudieran tener sobre macrófagos autólogos infectados, favorece la sobrevida y proliferación del parásito en estos pacientes.

En el presente trabajo demostramos que el efecto modulador que ejerce *L. mexicana* sobre los mecanismos efectores de las células NK es más severo en pacientes con LCD que en pacientes con LCL o en sujetos control. Es posible que esta inhibición selectiva sobre 2 mecanismos importantes que tiene la célula NK para contender y eliminar al parásito favorezca la progresión incontrolada de *L. mexicana* en pacientes con LCD.

Este estudio no únicamente demostró el importante papel protector que desempeña la célula NK en la respuesta inmune innata en contra de *L. mexicana*, sino que también permitió encontrar una novedosa estrategia de evasión de la respuesta inmune innata utilizada por el parásito. La inhibición de la capacidad citotóxica de células NK por *L. mexicana* no había sido estudiada anteriormente.

Los datos encontrados en este trabajo sugieren que *L. mexicana* modula la capacidad efectora de células NK y esta modulación se correlaciona con la severidad del cuadro clínico. El aumento a la leishmaniasis en pacientes con LCD pudiera deberse a una disminución en el número de receptores TLR-2 en las células NK o bien a un

problema en la vía de transducción de señales. Será interesante analizar el número de receptores TLR-2 e intensificar el estudio de las vías de transducción relacionadas con estos receptores en pacientes con LCD.

Nuestros datos sugieren que *L. mexicana* posiblemente modula las funciones efectoras de células NK a través de distintas vías y la intensidad de la modulación correlaciona con la severidad del cuadro clínico.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Velasco, C.O. La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos técnicos del INDRE. SSA México, 1994.
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 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.
4. Chang, K.P. and Gautam, Ch. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annu. Rev. Microbiol. 1990, 44: 449-529.
5. 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. Scien. Publisher. USA, 30. 1985.
6. Velasco, CO. Leishmaniasis in Mexico. Rev. Latin. Microbiol. 1987, 29(2) : 119- 26.
7. WHO, Geneva, The leishmaniasis Report. Thecnn. Rep. Series 701. 1984.
8. Willems, P., Schmidt, S., Greer K., McCall, C. and Pearson, R. Sporotrichoid Cutaneous Leishmaniasis in a Trav. Sour. Med. J. 1997, 90 (3): 325-327.
9. 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. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.. 1994, 88: 552-554.

10. Bogdan, C., M. Rollinghoff and W. Solbach. Evasion strategies of leishmania parasites. *Parasitol. Today*. 1990, 6: 183-191.
11. Locksley, Richard M. and Jaques, A. Louis. Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* 1992, 4: 413-418.
12. Etges, R., Bouvier, J. and Borler, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol. Chem.* 1986, 261 (20): 9098-9101.
13. Hon, S., Orn, A., Rusell, O. and Cross, G. *Leishmania mexicana mexicana* gp63 is a site specific neutral endopeptidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, 40: 163-172.
14. Scheider, P., Rosat J., Bouvier J., Louis J. and Bordier C. *Leishmania major* : Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp. Parasitol.* 1992, 75: 196-206.
15. Turco, S.J. and Sacks, S. Expresión of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991, 45: 91-100.
16. Turco, S.J. and Descoteaux, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 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. *J. Biol. Chem.* 1989, 2648 (12) : 6711-6715.
18. Puentes, S., Dwyer, D., Bate, P. and Joner, K. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 1989, 143 (11) : 3743-3749.
19. Descoteaux, A. and Turco, S.J. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal in macrophages. *J. Immunol.* 1991, 146 (8) 2747-2753.

20. MacNealy, T. and Turco, S.J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *J. Immunol.* 1990, 144 (7): 2745-2750.
21. Pearson, R. D., Hargus, J. L., Roberts, D. and Donawitz, G. R. Differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *J. Immunol.* 1983, 131 (4): 1994-1999.
22. MacNeely, T. and Turco, S. J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1987, 148 (2): 653-657.
23. Li, Q., Subbulakshmi, V., Fields, A., Murray, N. and Cathcart M. Protein kinase C α regulates human monocyte O_2^- Production and low density lipoprotein lipid oxidation**J. Biol. Chem.* 1999, 274:3764-3771.
24. Stafford, J.L., Neuman NF and Belosevia, M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. Microbiol.* 2002, 28 (3): 187-248.
25. Liew, F. Functional heterogeneity of CD4⁺ T cells in leishmanias. *Immunol. Today.* 1989, 10: 40-44.
26. Bogdan, C, Gessner, A, Solbach, W. and Rollighoff, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 1996, 8: 517-525.
27. Scharon., M. and Scott., P. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* 1993, 178: 567-577.
28. Muller, I., Kropf, P., Louis., J. A. and Milon, G. Expansion of gamma interferon producing CD8⁺ T Cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*, *Infect. Immun.* 1994, 62: 2575-2581.

29. Muller, I., Kroft, P., Etges, R. and Louis, J. A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8⁺ T cells. *Infect. Immun.* 1993, 61:3730-3738.
30. Muller, I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J., Millon, J. Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int. Immunol.* 1991, 3:587-597.
31. Harding, CV., Song, R. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I molecules. *J. Immunol.* 1994, 153: 4925-4939.
32. Rui, S., Harding, C.V. Roles of proteosomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta-2 microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J. Immunol.* 1996, 156: 4182-4190.
33. Auge, M. and Ross, J. The natural immune system. The macrophage. Chapter I. Edited by Lewis C. et al. Oxford. IRL Pres. 1992, 1-74.
34. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Capra, D. *Immunobiology*. 1999, 4ta edición.
35. Fehniger, TA., Shah, MH, Turner, MJ., VanDeusen, JB., Withman, SP., Cooper, MA., Suzuki, K, Wechser, M., Goodasid, F, Caligiuri, MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL15 in combination with IL-12: Implications for the innate immune response. *J. Immunol*, 1999, 162: 4511-4520
36. Nylén, S., Maasho, K., Soderström, K., ILG, T. & Akuffo, H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol* 2003; 131; 457-467.

37. Helfand, S., Werkemeister, J. and Roder., J. Chemiluminescence response of human natural killer cells. I. The relationship between target cell binding, chemiluminescence and cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1982, 156: 492-505.
38. Lockesley R, and Klebanoff S. Oxygen dependent microbial systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *J. Cell. Biochem.* 1983, 22: 173-185.
39. Roitt, I., Brastoff J. and Male D. "Inmunología" (Cuarta edición). Grafos, S.A. Arte sobre papel, 1997, 17.4-17.10
40. 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 Tissue Res.* 1995, 280: 617-625
41. Lundquist, H., Folling, P., Khalfan, L. and Dahlgren C. Phorbol myristate acetate induced NADPH oxidase activity in human neutrophils: only half the story has been told. *J. Leuk. Biol.* 1996, 59: 270-279.
42. Mc Neely, T. and Turco, S.J. Inhibition of protein kinase C activity by the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 148: 653-657
43. 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 Res.* 1996, 26: 325-334.
44. Stites, D., Fudenberg, H., y Stobo, J. *Inmunología Básica y Clínica.* 1989, Edición: 6ta. Pág. 74-76.
45. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. *Inmunología Celular y Molecular.* 1995, 2da Edición:308-311.

46. Dennert, G., Yogeewaran., G. and Yamagata, S. Cloned cell lines with natural killer activity specificity, function, and cell surface markers. *J. Exp. Med.* 1981, 153:545-556.
47. Timonen, T., Ortaldo, J. R, and Herberman, R. B. Characteristics of Human Large Granular Lymphocytes and Relationship to Natural Killer and Cells. *J. Exp. Med.* 1981, 153: 169-582.
48. Scott, P. and Trinchieri, G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7:34-40
49. Trapani, J. A., Sutton, V. R and Smyth, M. J. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunology Today.* 1999, 20(8):351-6
50. Lieberman, Judy. The ABCs of Granule-mediated cytotoxicity: New Weapons in the Arsenal. *Rev.* 2003, 3: 361-370.
51. Lanier, L., Corliss, B. and Phillips, J. Arousal and inhibition of human NK cell. *Immunol. Rev.* 1997, 155: 145-154.
52. Colonna, M., Moretta, A., Vely, F., Vivier E. A high-resolution view of NK cell receptors. *Immunology Today* 21, 2000, (9): 428-431.
53. Liu, C.C., Perussia, B., Young, J.D. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunology Today* 21, 2000 (9): 420-422.
54. Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, A. Human NK-cell receptors. *Immunology Today* 21, 2000 (9): 420-422.
55. Stepp, S.E., Mathew, P.A., Bennett, M., de Saint Basile, G., Kumar, V. Perforin: more than just an effector molecule. *Immunology Today* 21, 2000 (6): 254-255.
56. Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., and Rosenberg. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid

- tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1982. 155: 1823-1841.
57. Ortaldo, J.R., Mason, A., and Overton, R. Lymphokine-activated killer cells: analysis of progenitors and effectors. *J. Exp. Med.* 1986. 164: 1193-1198.
58. Caligiuri, M.A., Zmuidzinas, A., Manley, T., Levine, H., Smith, K.A., and Ritz. Functional consequences of IL-2 receptor expression on resting human lymphocytes: identification of a novel NK cell subset. *J. Exp. Med.* 1990. 171: 1509-1526.
59. Mentink, K. M. and Mosser, M. D. The Role of IL-10 in Promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 2001, 166: 1141-1147
60. Scharon-Kersten, T. and Sher, A. role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr. Opin. Immunol.* 1997, 9:44-51.
61. Maasho, K., Sanchez, F., Schurr, E., Hailu, A. and Akuffo., H. Indication of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect. Immun.* 1998, 66: 2698-704
62. Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, LG., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, AP., Cabrera, N., Gonzalez, A., Maldonado, C., Isibasi, A. *Leishmania* lipophosphoglycano (LPG) activates NK cells through toll-like receptor 2. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 130:565-74
63. Carsten, G. K., Lüder Carsten., Gross, U. and Lopes, F. M. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Rev. Trends Parasitol.* 2001, 17: 80-86.
64. Ting, AT., Schoon, RA., Abraham, RT., Leibson, PJ. Interaction between protein kinase C-dependent and G protein-dependent pathways in the regulation

- of natural killer cell granule exocytosis. *J. Biol. Chem.* 1992, 267 (33): 23957-62.
65. Shamsuddin, M., Hsueh, W, Smith, LJ. Production of leukotrienes and thromboxane by resident and activated rat alveolar macrophages: a possible role of protein kinase C. *J. Lab. Clin. Med.* 1992, 120(3):434-43.
66. Liles, WC., Meier, KE., Henderson, WR. Phorbol myristate acetate and the calcium ionophore A23187 synergistically induce release of LTB₄ by human neutrophils: involvement of protein kinase C activation in regulation of the 5-lipoxygenase pathway. *J. Immunol.* 1987, 138(10): 3396-402.
67. Powell, WS., Zhang, Y., Gravel, S. Effects of phorbol myristate acetate on the synthesis of 5-oxo-6, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem.* 1994, 33(13) 3927-33.
68. Yoss, EB., Spannhake, EW., Flynn, JT., Fish, JE. and Peters, SP. Arachidonic acid metabolism in normal human alveolar macrophages: Stimulus specificity for mediator release and phospholipid metabolism, and pharmacologic modulation *in vitro* and *in vivo*. *J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1990, 2(1). 69-80.
69. Rossi, P., Lindgren, JA., Kullmann, C. and Jondal, M. Products of the lipoxygenase pathway in human natural killer cell cytotoxicity. *Cell Immunol.* 1985, 93(1): 1-8
70. Melinn, M., McLaughlin, H. Hydroxyl radical scavengers inhibit human lectin-dependent cellular cytotoxicity. *Immunol.* 1986, 58(2).197-202.
71. Suthantiran, M., Solomon, SD., Williams, PS., Rubin, AL., Novogrodsky, A. and Stenzel, KH. Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature.* 1984 307(5948): 276-8.

72. Duwe, AK., Roder, JC. Involvement of hydroxyl free radical, but not superoxide, in the cytolytic pathway of natural killer cells. Revision of an earlier hypothesis. *Med. Biol.* 1984, 62(2). 95:100.
73. O'Brien, PJ., Hulett, LG. Hydroxyl radical involvement in the luminol chemiluminescence from the reaction of arachidonic acid with sheep vesicular gland microsomes. *Prostaglandins.* 1980, 19(5): 683-91.
74. Hadjimitova, V., Traykov, T., Mileva M. and Ribarov S. Effect of some psychotropic drugs on luminol-dependent chemiluminescence induced by O₂-, *OH, HOCl. *Z Naturforsch* 2002, 57(11-12): 1066-71
75. Sibbitt, WL Jr., Imir, T. and Bankhurst AD. Reversible inhibition of lymphokine-activated killer cell activity by lipoxygenase-pathway inhibitors. *Int. J. Cancer.* 1986, 38(4):517-21
76. Frankenburg, S., Gross, A. and Leibovici V. *Leishmania major* and *Leishmania donovani*: Effect of LPG-containing and LPG-deficient strain on monocyte chemotaxis and chemiluminescence. *J. Parasitol.* 1992, 75: 442-447.
77. Laskay T, Röllinghoff M, and Solbach W. Natural Killer Cell participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *J. Immunol.* 1993, 23: 2237-2241.
78. Mosser, D., Springer, T. and Diamond, M. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the serum leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell. Biol.* 1992, 116 (2):511-520.
79. Giorgione, JR., Turco, SJ. and Espanol PM. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *PNAS.* 1996, 93: 11634-11639.

80. Farnell, MB., He, H., Genovese, K and Kogut, MH. Pharmacological analysis of signal transduction pathways required for oxidative burst in chicken heterophils stimulated by a toll-like receptor 2 agonist. *Int. Immunopharmacol.* 2003, 3(12): 1677-84.