



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“PAPEL DEL GENERO EN LA PRODUCCION DE CITOCINAS Y EXPRESION DE TLR-2 POR MACROFAGOS DE RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A Leishmania mexicana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

HECTOR RUBEN MAYA PINEDA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

2005

m. 343218

DIRECTORA DE TESIS: DRA. INGEBOG DOROTHEA BECKER FAUSER



FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Héctor Rubén Maya Pineda

FECHA: 18.04.05.

FIRMA: [Signature]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Papel del género en la producción de citocinas y expresión de TLR-2 por macrófagos de ratones susceptibles y resistentes a *Leishmania mexicana*"

Realizado por **Héctor Rubén Maya Pineda**

Con número de cuenta **09636225-5**, quien cubrió los créditos de la carrera de **Biología**.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

**Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser**

[Signature]

Propietario

**Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar**

[Signature]

Propietario

**Dra. Gladis Del Carmen Fragozo González**

[Signature]

Suplente

**Dr. Alejandro Padilla Trejo**

[Signature]

Suplente

**M. en C. Joselín Hernández Ruiz**

[Signature]

FACULTAD DE CIENCIAS



Consejo Departamental de Biología

[Signature]  
M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CHAVEZ. UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi especial agradecimiento a la Dra. Ingeborg Becker, por permitirme realizar esta investigación y a su equipo de trabajo, así como a la Dra. Miriam Berzunza e Ivette Ramírez por su asesoría y colaboración en la realización de este trabajo.

También quiero dar gracias a la Dra. Patricia Tato, a la Dra. Gladis Fragoso, al Dr. Alejandro Padilla y al M. en C Joselín Hernández, por sus sugerencias que contribuyeron al mejoramiento de este trabajo.

Esta investigación fue apoyada por CONACYT con el proyecto CONACyT 37538-M y por DGAPA con el proyecto DGAPA IN231602-3.

A mis Padres y mi  
Hermano.....

# ÍNDICE

	Páginas
Índice de figuras	III
Abreviaciones	IV
Resumen	V
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
A. Leishmaniasis	8
a) Generalidades	8
b) Ciclo biológico	9
c) Cuadros clínicos	10
D. Interacción del género y la <i>Leishmania</i> con el sistema inmune	12
E. Receptores tipo Toll	14
F. TLR-2	17
G. Activación del macrófago	18
H. Género y respuesta inmune a la infección por <i>Leishmania</i>	19
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
A. Objetivo general	22
B. Objetivos particulares	22
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
A. Animales	23
B. Gonadectomía	23
C. Infección	23
D. Obtención de células	23
E. Ensayos de estimulación	24
F. Producción de citocinas	24
G. Expresión de TLR-2	25
H. Ensayo de proliferación de esplenocitos	25
I. Estadística	25

<b>V. RESULTADOS</b>	26
A. Tamaño de la lesión	26
B. Análisis de citocinas	29
a) TNF	29
b) IL-12p40	32
c) IL-10	36
C. TLR-2	39
D. Proliferación de células de bazo.	40
a) Estímulo específico con LPG	40
b) Estímulo inespecífico con ConA	42
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	43
A. Lesión	43
B. Citocinas	45
C. TLR-2	46
D. Linfoproliferación	47
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	49
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<b>Taxonomía de <i>Leishmania</i>.</b>	8
Figura 2	<b>Ciclo de vida la <i>Leishmania</i></b>	9
Figura 3	<b>Estructura esquematizada del LPG de promastigotes de <i>Leishmania</i></b>	14
Figura 4	<b>Ligandos reconocidos por TLRs</b>	15
Figura 5	<b>Receptor tipo toll (TLR)</b>	16
Figura 6	<b>Reconocimiento de ligandos vía TLR2 por la formación de heterodímeros con TLR1 y TLR6</b>	17
Figura 7	<b>Evolución de las lesiones de los 8 grupos de animales a lo largo de 28 semanas</b>	27
Figura 8	<b>Incremento en el grosor del cojinete plantar tamaño de lesión</b>	28
Figura 9	<b>Producción de TNF-<math>\alpha</math> por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con <i>L. mexicana</i></b>	30
Figura 10	<b>Producción de IL-12p40 por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con <i>L. mexicana</i></b>	34
Figura 11	<b>Producción de IL-10 por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con <i>L. mexicana</i></b>	38
Figura 12	<b>Expresión de TLR-2 en ratones BALB/c</b>	39
Figura 13	<b>Proliferación de células de bazo estimuladas con lipofosfoglicano (LPG) de <i>L. Mexicana</i></b>	41
Figura 14	<b>Proliferación de células de bazo de ratones infectados con <i>L. Mexicana</i> estimuladas con ConA</b>	42

## ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ECD	Ectodominios
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HSP65	Proteína Heat-Shock de 65KDa
IFN	Interferón
IL	Interleucina
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL-1
Jak	Janus tyrosine kinases
KDa	Kilo Daltones
LCD	Leishmaniasis cutánea diseminada
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LPKAC	Leishmaniasis post-kala-azar cutánea
LPS	Lipopolisacárido
LR	Leishmaniasis recidivans
LRR	Regiones ricas en leucina
LV	Leishmaniasis Visceral
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
min	Minutos
μl	Microlitros
ml	Mililitros
MyD88	Proteína de diferenciación mieloide 88
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer cells
NKT	Natural killer T cells
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintasa inflamatoria
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución buffer de fosfatos
pNPP	p-nitrofenil fosfato
PTX	Toxina pertussis
RMT	Receptores de membrana para testosterona
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio RPMI 1640
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TGF-β.	Transforming growth factor b



<b>Th</b>	Célula T ayudadora (T helper cell)
<b>TIR</b>	Dominio del receptor de la familia Toll/IL-1
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TRAF</b>	Factor asociado al receptor de TNF

## RESUMEN

La leishmaniasis es producida por un parásito protozoario flagelado, del género *Leishmania*, que infecta macrófagos. Estudios en ratones machos DBA/2 muestran que los machos son más susceptibles a la infección subcutánea con *L. mexicana* que las hembras, y que la susceptibilidad depende fuertemente de los niveles hormonales, que a su vez regulan la expresión de diferentes citocinas. En ratones hembras gonadectomizadas DBA/2 disminuye la resistencia a la infección por *L. mexicana*. Sin embargo, los efectos protectores de los estrógenos no son aplicables a todos los modelos experimentales con *Leishmania*. Se desconoce el efecto del género en la infección de ratones BALB/c y C57BL/6 con *L. mexicana*. En el presente trabajo se analizó el efecto del género sobre la producción de citocinas y la expresión de TLR2 en macrófagos, así como las características de linfoproliferación de esplenocitos en ratones de distinto fondo genético como BALB/c y C57BL/6, estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*.

En BALB/c, los machos presentaron lesiones mayores a las hembras, y en ratones C57BL/6 ocurrió el efecto contrario, siendo las hembras más susceptibles que los machos. El efecto de la gonadectomía tuvo efectos contrarios en machos y en hembras. Mientras que los machos gonadectomizados no presentaron cambios en la evolución del padecimiento, las hembras de ambas cepas modificaron su susceptibilidad a *Leishmania*. La resistencia a la infección por *Leishmania* de hembras BALB/c se correlacionó con un incremento en TNF- $\alpha$ , IL-12 y TLR2. La susceptibilidad en hembras C57BL/6 se correlacionó con un aumento de IL-10 y ausencia de producción de IL-12. Macrófagos de machos BALB/c, estimulados con LPG, incrementan su expresión de TLR2, lo cual fue mayor en machos gonadectomizados. En macrófagos de hembras BALB/c, el estímulo con LPG incrementó la expresión de TLR-2, al ser gonadectomizadas, disminuye significativamente la expresión de TLR2, tanto en estado basal como estimuladas con LPG. Los ensayos de linfoproliferación de los esplenocitos mostraron que los machos presentan mayor proliferación que las hembras de ambas cepas de ratón, cuando son estimulados con LPG de *Leishmania*. Al ser gonadectomizados, los machos y las hembras disminuyeron su capacidad de proliferar. El estímulo del mitógeno ConA indujo mayor proliferación en machos BALB/c que en hembras. Al ser gonadectomizados, machos y hembras disminuyeron su índice proliferativo.

Dependiendo del fondo genético del hospedero, los estrógenos ejercen un efecto estimulante (BALB/c) o inhibitorio (C57BL/6) sobre células del sistema inmune innato, modificando la evolución clínica de la infección con *Leishmania mexicana*. La testosterona no modifica la evolución clínica en machos BALB/c y C57BL/6. La resistencia significativa de las hembras BALB/c a la infección por *L. mexicana* se asocia con un incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-12 y TLR2 por sus macrófagos. La susceptibilidad significativa de hembras C57BL/6 a la infección por *L. mexicana* se asocia con un incremento de IL-10 y disminución de IL-12 por sus macrófagos. La linfoproliferación de esplenocitos inducida por LPG posiblemente corresponda a células NKT, que reconocen a glicolípidos presentados por moléculas CD1, y que pueden producir tanto citocinas Th1 como Th2. Las hormonas sexuales femeninas posiblemente modulen a las células NKT de manera distinta, dependiendo del fondo genético.

## I. INTRODUCCIÓN

## A. Leishmaniasis

### a) Generalidades

La leishmaniasis es una enfermedad provocada por un organismo protozoo flagelado perteneciente al género *Leishmania* (parásito intracelular obligatorio que infecta macrófagos), cuyas distintas manifestaciones clínicas dependen tanto de la especie de *Leishmania* (Fig. 1) que está infectando como de la respuesta inmune del huésped. La transmisión de la enfermedad ocurre a través de la picadura de una mosca infectada con parásitos de *Leishmania*.

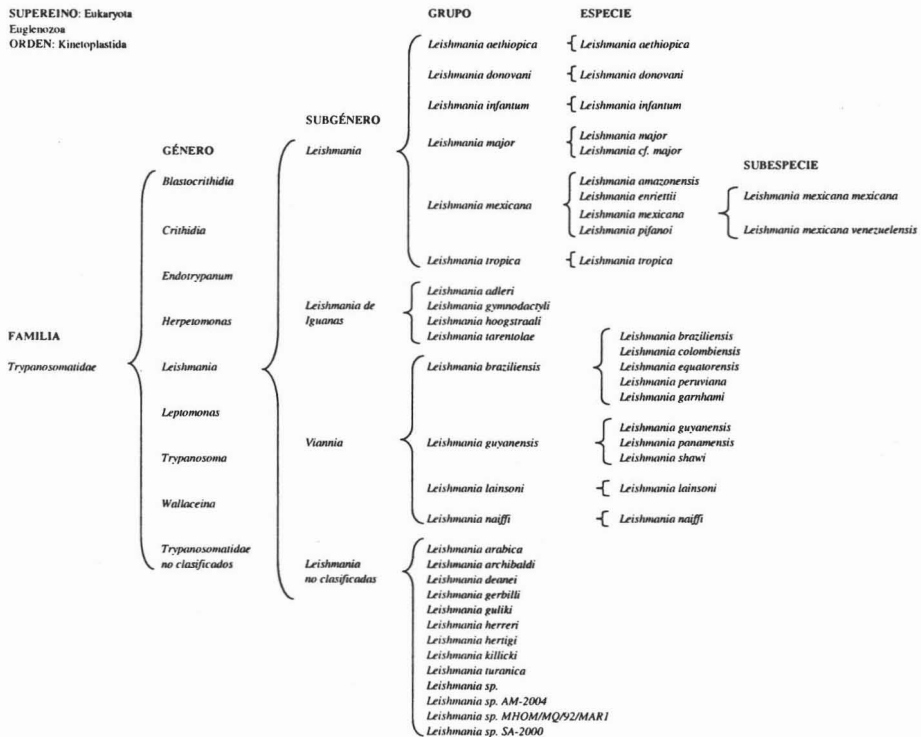


Fig. 1.- Taxonomía de *Leishmania*. Tomado de www.ncbi.nlm.nih.gov

## B. Ciclo biológico

En la infección con *Leishmania*, es necesaria la presencia de un vector que en el caso del viejo mundo son moscas pertenecientes al género *Phlebotomus*, y en el nuevo mundo son del género *Lutzomyia* y también aunque no tan común, *Psychodopygus*; en ambos casos es la hembra la portadora del parásito (Grevelink y Lerner, 1996).

Existen dos razones por las cuales se cree que es necesaria la presencia de la mosca y no otro artrópodo para la transmisión de la *Leishmania*. En primer lugar es debido a que las condiciones del tracto digestivo de la mosca tienen las características adecuadas para el desarrollo de una fase del ciclo de vida del parásito, así como también debido a que ciertos componentes de la saliva como un péptido vaso dilatador llamado Maxadilan, permiten el desarrollo de la lesión por *Leishmania*. En la naturaleza, una mosca puede inducir una lesión inoculando entre 10 y 100 parásitos en el 75% de los casos, y entre 100 y 1000 parásitos el 20%, así como entre 1000 y 3000 en el porcentaje restante, además de la saliva (Warburg y Schlein, 1986).

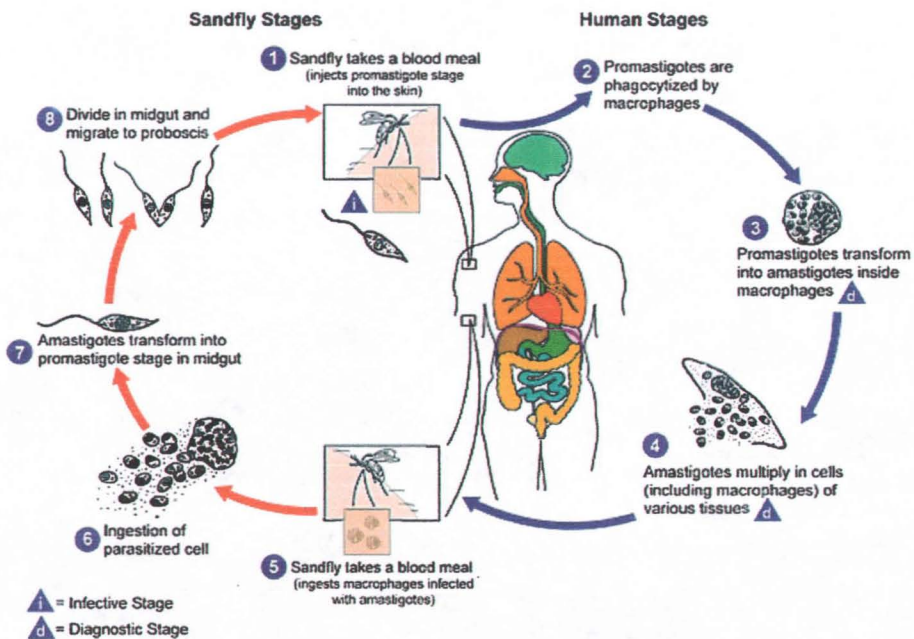


Fig.2.- Ciclo de vida la *Leishmania*. Tomado del Center for Disease Control

El ciclo biológico de la *Leishmania* está vinculado íntimamente con el ciclo de transmisión de la infección, ya que requiere de un artrópodo como vector, en este caso la mosca hembra de los géneros anteriormente mencionados y un reservorio zoonótico mamífero, donde se incluyen mamíferos domésticos y silvestres dentro de los cuales se encuentran perezosos, mapaches, tejones, tlacuaches, roedores, osos hormigueros, zorros y perros, y donde el humano es un hospedero accidental (Lezama e Isaac, 1995).

El parásito tiene dos formas distintas durante su ciclo de vida, una forma extracelular flagelada llamada promastigote y otra forma no flagelada, intracelular obligada, llamada amastigote. Durante la picadura, la mosca inyecta su saliva conteniendo la forma infectante de la *Leishmania*, el promastigote. El promastigote es fagocitado por los macrófagos, donde el parásito reside en el fagolisosoma, ahí se transforma en la forma redonda no flagelada llamada amastigote y prolifera por fisión binaria a pesar de la presencia de enzimas lisosomales.

Cuando otra mosca se alimenta de un huésped infectado, los amastigotes presentes en los macrófagos de la sangre son introducidos al tracto digestivo de la mosca en donde se transforma una vez más en promastigote, continuando así el ciclo (Grevelink y Lerner, 1996).

### **C. Cuadros clínicos**

Dependiendo de la especie o subespecie de *Leishmania*, así como de la respuesta inmune del huésped, se puede producir una infección cutánea, mucotánea o visceral. La infección puede estar restringida a la piel en la leishmaniasis cutánea, también limitada a la membrana mucosa en la leishmaniasis mucosa, o bien, dispersa sobre el sistema reticuloendotelial como en la leishmaniasis visceral.

La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente del padecimiento, puede presentarse en cuatro formas clínicas de características inmunológicas y de pronósticos opuestos.

#### **➤ Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL).**

En México se le conoce como la “úlcera de los chicleros”, afecta principalmente las zonas descubiertas del cuerpo como los brazos, el cuello y la cara. La leishmaniasis del nuevo mundo se presenta comúnmente con una lesión solitaria ó lesiones múltiples que tiende a ulcerarse en forma redondeada y de bordes hipertróficos, su base es granulomatosa e indolora y de bordes indurados, que aparece en promedio de una a semana a 3 meses después de la incubación. Los pacientes con LCL ocasionalmente curan espontáneamente en un lapso de 6

meses a dos años, excepto cuando la lesión se da en el pabellón auricular, donde es crónica y mutilante. Este padecimiento es causado principalmente por *L. b. braziliensis*, *L. b. guyanensis*, *L. b. panamensis*, *L. m. mexicana*, *L. m. amazonensis* y *L. donovani chagasi* (Grevelink y Lerner, 1996).

#### ➤ **Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)**

Es una variante anérgica de la leishmaniasis cutánea, ya que se caracteriza por la falta de respuesta del sistema inmune celular hacia antígenos de *Leishmania*, permitiendo la diseminación del parásito en toda la piel a través del desarrollo de lesiones nodulares llenas de parásitos, (similar a lepra lepromatosa) con excepción del cuero cabelludo. En esta forma clínica, el parásito se disemina lentamente por el líquido tisular, por la linfa o por la vía sanguínea. La enfermedad no invade órganos internos y responde parcialmente al tratamiento, sin embargo frecuentemente se vuelve crónica; esta enfermedad es provocada por *L. mexicana*, *L. m. amazonensis* y *L. m. pifanoi* (Grevelink y Lerner, 1996).

#### ➤ **Leishmaniasis Recidivans (LR)**

La leishmaniasis recidivans o leishmaniasis recurrente, se refiere al desarrollo de nuevas lesiones en el centro o la periferia de una cicatriz de una lesión aguda de leishmaniasis ya sanada que comúnmente presentan pápulas eritematosas. La actividad de la enfermedad está confinada a la cicatriz y áreas contiguas.

Las lesiones tienden a ser resistentes al tratamiento y convertirse en crónicas. El mecanismo postulado para la enfermedad recurrente es la reactivación de organismos “latentes”, con un periodo de dormancia de entre 1 y 15 años (Grevelink y Lerner, 1996). Sin embargo se ha encontrado que en 50% de los casos reportados de la enfermedad recurrente, la cepa infectante es diferente de la cepa inicial, lo cual sugiere una reinfección exógena en la reactivación de la enfermedad. Es originada principalmente por *L. braziliensis* (Grevelink y Lerner, 1996).

#### ➤ **Leishmaniasis mucocutánea (LMC)**

El 50 % de los pacientes inician con lesiones mucocutáneas dentro de los 2 años de la lesión cutánea inicial, y un 90% en 10 años. La leishmaniasis mucocutánea se presenta inicialmente como una lesión cutánea que posteriormente se disemina. Se caracteriza por la aparición en el septum nasal, el cual se inflama, se infiltra y subsecuentemente se perfora. La enfermedad tiene una predilección por la parte distal del cartílago de la nariz, la invasión del tracto

respiratorio, incluyendo la laringe, la traquea y los bronquiolos, donde pueden desencadenar una respiración difícil, así como dificultad para pasar alimentos. De hecho la malnutrición y neumonía aguda son las principales causas de muerte en pacientes con LMC. Los factores que se encuentran asociados con el desarrollo de la infección son el género masculino, grandes o múltiples lesiones primarias que pueden durar más de un año, así como un inadecuado tratamiento de las lesiones primarias en la piel. Está reportada en el nuevo mundo y es *L. braziliensis braziliensis* su principal agente etiológico (Grevelink y Lerner, 1996).

#### ➤ **Leishmaniasis Visceral (LV)**

También conocida como Kala-azar, es una enfermedad sistémica causada por la diseminación de *L. donovani* a través del sistema reticuloendotelial. Las principales señales y síntomas incluyen fiebre, linfadenopatía, emaciación, pancitopenia e hipergamaglobulinemia (Velasco *et al*, 1991).

La lesión primaria de la LV es una pequeña pápula visible en piernas, hay oscurecimiento de la piel por ello se la llama también enfermedad negra, aunque en pacientes mexicanos no se ha reportado esta variante. La enfermedad no cura espontáneamente y lleva a la muerte si no se trata adecuadamente, en caso contrario se recuperan entre el 95 y el 98% de los pacientes con tratamiento adecuado (Grevelink y Lerner, 1996).

#### ➤ **Leishmaniasis post-kala-azar cutanea (LPKAC)**

Es causada principalmente por *L. donovani* y es endémica de India y África, afecta diferentes partes del cuerpo dependiendo de la región en la que se presente el caso, por ejemplo en África se afectan principalmente la cara y las extremidades del cuerpo, en cambio en India se presenta principalmente en partes de la cara, el tronco y los genitales y en menor medida en las extremidades (Grevelink y Lerner, 1996).

### **D. Interacción del género y la *Leishmania* con el sistema inmune**

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades que despliegan un amplio rango de manifestaciones clínicas en humanos, dependiendo en parte de la especie de parásito que inicia la infección así como varios factores relacionados a la salud en general y el componente genético del huésped.

Se han hecho varios modelos experimentales con ratones resistentes y susceptibles. El término resistencia se ha aplicado a ratones que pueden controlar el desarrollo progresivo de

la lesión ya sea que de hecho se curen o simplemente se reduzca la carga parasitaria con el tiempo. En el caso de la susceptibilidad, se refiere a la inhabilidad de responder adecuadamente a la infección.

La eliminación eficaz de los parásitos de *Leishmania* intracelulares requiere de la participación de células y citocinas de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las lesiones que sanan espontáneamente están asociadas con una respuesta antígeno-específica positiva en células T. Las enfermedades cutáneas difusas y viscerales se asocian con la respuesta negativa de las células T y la enfermedad mucocutánea con una hiperrespuesta de las células T (Grevelink y Lerner, 1996).

El macrófago y las células de Langerhans en la piel son las primeras que entran en contacto con la *Leishmania*. A pesar de una efectiva fagocitosis de la *Leishmania*, esto no activa al macrófago y su habilidad para producir interleucina 12 (IL-12) en respuesta a un fuerte estímulo pro-inflamatorio (Reiner, *et al.* 1994).

El macrófago activado desempeña una triple función: célula hospedera, presentadora de antígenos y célula efectora, con capacidad de eliminar el parásito principalmente mediante la producción de óxido nítrico (NO). Los macrófagos fagocitan al parásito mediante receptores que reconocen estructuras moleculares asociadas a organismos patógenos (PAMPs). En la *Leishmania*, el más importante es el lipofosfoglicano (LPG) (Fig. 3), que consiste de un anclaje de membrana de un glucosil fosfatidilinositol (GPI) tipo 2 (motivo  $\text{Man}\alpha 1\text{-3Man}\alpha 1\text{-4GlcN}\alpha 1\text{-6PI}$ ) (Ferguson, 1999), que se adhiere a un largo dominio de disacáridos fosforilados repetidos, que contiene modificaciones especie-específicas y es complementado por un oligosacárido neutral (Becker *et al.* 2003). La característica sobresaliente del LPG, (Fig. 3) es la región repetida de disacáridos fosforilados que contiene en su estructura múltiples unidades de  $\text{PO}_4\text{-6Gal} (\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1)$  unidos por medio de un centro de fosfosacáridos a un anclaje 1-*O*-alkil-2-*lyso*-fosfatidil(*myo*)inositol (Becker *et al.* 2003). Los receptores que participan durante esta fase incluyen los receptores fagocíticos. Los receptores TLR-2 (receptor tipo Toll 2) también reconocen LPG y activan genes de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-1) (Becker *et al.* 2003).



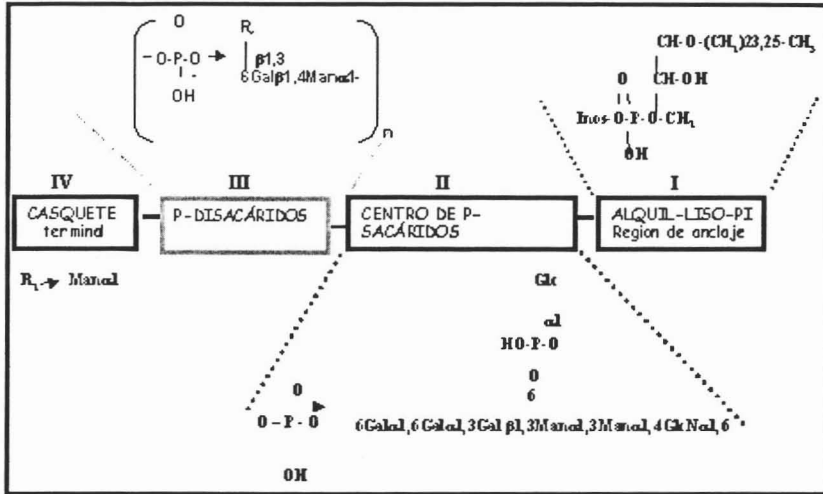


Fig. 3.- Estructura esquematizada del LPG de promastigotes de *Leishmani*. Tomado de Turco y Descoteaux, 1992.

## E. Receptores tipo Toll

El descubrimiento de la familia de los TLRs comienza con la identificación del receptor Toll, un receptor que es expresado por insectos y fue encontrado por ser esencial para el establecimiento del eje dorso-ventral durante la embriogénesis en *Drosophila*. Si algún componente está ausente durante este proceso genético, no se desarrollan los tipos celulares laterales o ventrales. Estudios subsiguientes revelaron que Toll también tiene un papel esencial en la respuesta inmune innata de los insectos contra infecciones fúngicas en etapas adultas. El papel de Toll en la señalización de la respuesta inmune de *Drosophila* es inducir una respuesta contra infecciones microbianas y una de ellas es la inducción transcripcional de una serie de genes codificadores de péptidos antimicrobianos, que incluyen elementos κB, y sugieren que proteínas como NF-κB/Rel podrían ser activadores de la respuesta inmune en insectos. Dorsal, Dif y Relish son proteínas nucleares en *Drosophila*, que regulan la transcripción a través de sitios κB, por lo que se consideran proteínas activadoras en respuesta a infecciones. Experimentos subsiguientes mostraron que proteínas como: Spätzle, Toll, Pelle, Tube y Cactus son requeridas para la rápida inducción transcripcional de la codificación de genes para un péptido antimicrobiano, Drosomicina, en respuesta a infecciones. (Akira, S. 2003).

Los TLR (Toll-like receptor) son receptores celulares iniciadores de respuestas inflamatorias contra patógenos (Fig.4). Hasta la fecha han sido identificados once receptores tipo toll en mamíferos. Estos receptores fueron relacionados con la señalización hacia el factor de transcripción  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) que regula la transcripción de varios genes envueltos en la respuesta inmune, por esto son considerados importantes reguladores de la inmunidad. Se demostró la función de los TLRs como receptores de reconocimiento ante diversos patógenos y ligandos virales, así como el control de numerosos aspectos de la respuesta inmunes innata y adaptativa. (Lemaitre, B. 2004).

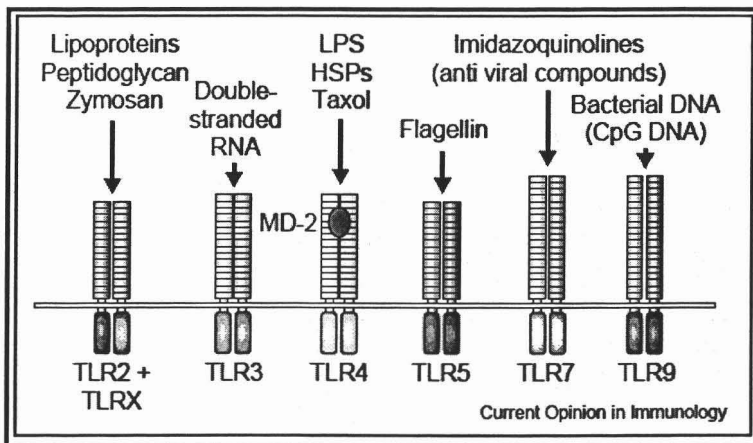


Fig. 4.- Ligandos reconocidos por TLRs. Tomado de Lemaitre, 2004.

Los receptores TLR son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1 con pesos moleculares de entre 90 y 115 KDa. Algunos son localizados sobre la superficie celular como el TLR-2,1, 4 y 6 mientras que, otros como el TLR-7 y 9 se encuentran secuestrados en compartimentos intracelulares.

A excepción del TLR-8 y 10, ya han sido identificados ligandos específicos para los diferentes receptores tipo toll, por ejemplo: lipoproteínas triaciladas para el TLR-1, peptidoglicanos, en su mayoría componentes de pared en bacterias Gram-positivas para TLR-2, ARN de doble cadena, el cual se generó en el ciclo de vida de virus de ARN, para TLR-3. Lipopolisacáridos (LPS), componente de la pared de bacterias Gram-negativas, son ligandos para TLR-4; flagelina, un componente del flagelo bacterial, para TLR-5; lipoproteínas diaciladas para TLR-6; imidazoquinolina, una droga antiviral y su derivado R-848, para TLR7 y CpG de ADN no metilado bacteriano para TLR9. (Akira, S. 2003).

Los TLRs reconocen sustancias patogénicas a través de sus ectodominios (ECDs), los cuales comprenden de 19 a 25 copias en tandem de un motivo conocido como regiones ricas en leucina (LRR) (Figura 5). Esta característica de los ECDs llama la atención en los TLRs, dado que las LRR se caracterizan por estructuras amino y carboxilo terminal que median el reconocimiento de PAMPs y dependiendo de los cambios en estas regiones, se les atribuye el reconocimiento de ligandos específicos a cada uno de los receptores TLR. Algunos ECD de los TLRs pueden tener su cara al exterior de la célula o en el lumen de un compartimento intracelular donde estos pueden reconocer al patógeno.

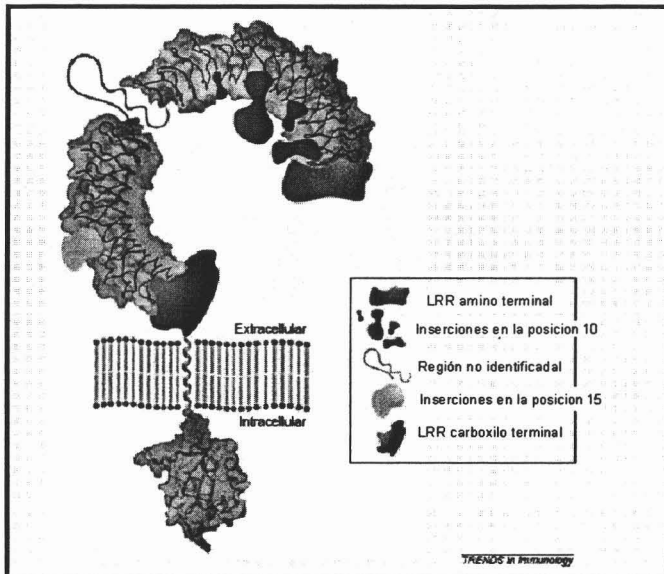


Fig. 5 Receptor tipo toll (TLR) Tomado de Bell, *et al.* 2003

Se ha sugerido que los TLRs están formados por un esqueleto básico en forma de herradura solenoide que contiene hojas  $\beta$ -plegadas sobre su superficie, así como numerosas inserciones de unión a ligandos (Figura 5). Estas inserciones junto con las hojas  $\beta$ -plegadas podrían propiciar una superficie de unión que está 10 veces más plegada en área que las superficies de unión en otro tipo de receptores.

Además de las regiones LRR, los TLRs se caracterizan por la presencia de una región intracelular o citoplasmática denominada Toll/IL-1 receptor family (TIR), dado este nombre por la homología que esta región tiene con el receptor de IL-1.

La estimulación de los TLRs por estos ligandos activa una cascada de señalización, la cual culmina en la producción de citocinas pro-inflamatorias y la subsecuente respuesta inmune. La cascada de señalización río abajo de TLR es generada por su dominio TIR. (Akira, S. 2003).

## F. TLR-2

Particularmente TLR-2 reconoce diversos componentes microbianos, incluyendo peptidoglicanos de bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, lipoproteínas, lipoarabinomananos de *Mycobacterium tuberculosis*, lipopéptidos de bacterias, anclajes de fosfatidilinositol de *Trypanosoma cruzi*, porinas de *Neisseria meningitidis*, lipofosfatidilserina de *S. mansoni*, componentes de la pared celular de levaduras como el zymosan y lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania major*. (Becker *et al.* 2003).

Se ha sugerido que el reconocimiento de diversos PAMPs por este receptor sea gracias a la formación de heterodímeros entre TLR-2 y otros TLRs como TLR-1 y TLR-6 que reconocen las diferencias estructurales entre lipopéptidos bacterianos y lipopéptidos de hongos. Los peptidoglicanos pueden ser reconocidos por un homodímero de TLR-2 o un heterodímero de TLR-2 y un TLR desconocido (Figura 6). (Yamamoto, *et al.* 2003).

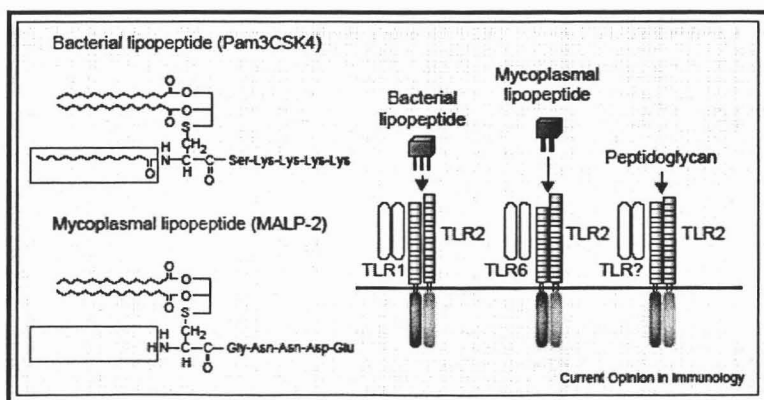


Fig. 6 Reconocimiento de ligandos vía TLR2 por la formación de heterodímeros con TLR1 y TLR6. Tomado de Yamamoto, *et al.* 2003.

En macrófagos, la activación de TLR-2, envía una señal de transducción a componentes de la cascada de señalización como MyD88, IRAK y TRAF6, entre otros, que resulta en la producción de IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y NO (Arbibe, *et al.* 2000). El

temprano reconocimiento de patógenos por las células capaces de sintetizar IL-12 y TNF- $\alpha$  es crucial para el adecuado control de patógenos intracelulares como *L. major* (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

### **G. Activación del macrófago.**

El análisis de las citocinas en tres diferentes formas clínicas de LC sugiere que el sistema inmune del huésped juega un papel inmunoregulatorio en la expresión de la enfermedad. En la LCL la citocina importante es la IL-12 así como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), mientras que en la LMC y la LCD, las citocinas que predominan son IL-4 e IL-10 (Grevelink y Lerner, 1996).. Estos datos se relacionan con estudios de leishmaniasis en modelos murinos donde la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  median la curación de la enfermedad mientras que IL-4 e IL-10 están asociadas con la progresión y diseminación de la enfermedad (Grevelink y Lerner, 1996). Se ha encontrado también que la LPG induce en el macrófago la producción de grandes cantidades de IL-10 y suprime la producción de IL-12, al igual que en enfermedades crónicas (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

Luego del contacto con los antígenos expresados en la membrana del macrófago infectado con el parásito, y dependiendo del tipo de célula presentadora de antígeno, de los niveles de citocinas endógenas y de la naturaleza del antígeno reconocido, las células T ayudadoras CD4+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas que las diferencia en subpoblaciones de células Th1 y Th2. Cada una de ellas tiene funciones efectoras diferentes (Scott, 1991; Rossi-Bergmann *et al.* 1993). Se sabe que la cantidad de antígeno o la forma de presentación de éste y el tipo de célula presentadora pueden definir el tipo de respuesta inmune. Sin embargo aún se desconocen los factores exactos que dirigen o determinan la expansión de una u otra subpoblación de células T ayudadoras (Th).

El subtipo de células, llamadas células T ayudadoras tipo 1 (Th1), producen IL-12 (que inhibe la respuesta Th2 temprana), IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que participan en la regulación del granuloma y aumentan la respuesta inmune mediada por células. Además del TNF- $\alpha$ , receptores como IFN- $\gamma$ R, factores de transcripción como T-bet y STAT4 o moléculas co-estimuladoras (CD40-CD40L), promueven la curación de la lesión. Alguna falla en esta respuesta, ya sea en la expresión del receptor de IL-12 o porque el parásito se disemina por tejidos que preferentemente desarrollan una respuesta Th2, la respuesta Th2 se

mantiene y domina la evolución clínica de la enfermedad, aunque también ayudan la presencia de citocinas de tipo  $T_H2$  como la IL-10, que es lo que marca la susceptibilidad a *L. major* en ratones BALB/c (Sacks y Noben-Trauth, 2002).

En contraste, las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (Cox y Liew, 1992) las cuales aumentan la respuesta humoral e inhiben algunas respuestas mediadas por células, resultando en la diseminación de la enfermedad.

Es común que en humanos, las células de tipo Th2 predominen durante la etapa temprana de la infección, mientras que las células de tipo Th1 son más importantes en la fase de curación. Esto podría indicar que la inmunidad protectora en contra de la *Leishmania* es dependiente de la citocina IL-12, así como de IFN- $\gamma$  que proporciona protección al estimular la expresión de la óxido nítrico sintasa inflamatoria (NOS2) y producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos (Solbach y Laskay, 2000).

Se conoce que las moléculas de superóxido producidas por los macrófagos son importantes para la respuesta del huésped a la *Leishmania*, y se sabe que la forma inducible de NO sintetasa (iNOS) está asociada con la resistencia a la infección por *Leishmania* en ratones y que el NO mismo es leishmanicida. Algunos estudios mencionan el papel que juega una respuesta Th2 y la producción de IL-4 en la inhibición de la producción de INF- $\gamma$ , así como IL-10 y TGF- $\beta$ . La inhabilidad de generar una respuesta Th1 resulta en una susceptibilidad a la enfermedad (Solbach y Laskay, 2000).

## **H. Género y respuesta inmune a la infección por *Leishmania***

Estudios epidemiológicos indican que la leishmaniasis ocurre más frecuentemente entre el género masculino que en el género femenino (Armijos, *et al.* 1997; Jones, *et al.* 1987). Por lo general, el hombre está reportado que adquiere leishmaniasis cutánea o visceral mas frecuentemente que las mujeres (Magill, 1995), es decir que el género puede influir en el curso de la infección con especies de *Leishmania* y que tanto las hormonas femeninas como masculinas pueden mediar la resistencia o susceptibilidad a la infección, indicando una modulación en la respuesta Th1-Th2 influenciada por las hormonas sexuales masculinas y femeninas. Se ha encontrado que las hormonas influyen la función de todas las células del sistema inmune, como por ejemplo los eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y células NK (Craig, *et al.* 2001).

Resulta interesante el efecto que poseen los esteroides sexuales como la testosterona en infecciones parasitarias, por ejemplo en machos prevalece la mayoría de las infecciones provocadas por *Leishmania* con respecto a las hembras (Craig, *et al.* 2001).

En modelos de ratones y hámsters, se ha encontrado que los machos son más susceptibles que las hembras a la infección por *Leishmania*. También se ha reportado que la testosterona tiene un efecto inhibitor sobre la producción de INF- $\gamma$ , la cual es requerida para la activación del macrófago y la subsecuente curación de la infección por *Leishmania* (Grevelink y Lerner, 1996).

Por otra parte, las funciones efectoras en macrófagos influenciadas por estrógenos incluyen a la fagocitosis, la cual es estimulada por esta hormona así como la producción de intermediarios reactivos de oxígeno, al contrario de intermediarios de nitrógeno, los cuales son desregulados.

Los macrófagos como células procesadoras o presentadoras de antígenos, juegan un papel muy importante en el sistema inmune y se piensa que son responsables del dimorfismo relacionado a las hormonas sexuales en la respuesta inmune, como células blanco de los esteroides sexuales (Unanue y Allen 1987).

Hay experimentos en los que macrófagos de grupos tratados con testosterona mostraron un incremento en la fagocitosis del parásito *L. donovani* y tuvo mayores niveles de infección que los controles no tratados (Zhang, *et al.* 2001). Sin embargo estudios previos muestran pocos o ningún receptor para testosterona en los macrófagos (Gulshan *et al.* 1990; Benten *et al.* 1997), por lo que se creía que la testosterona podría unirse a receptores de membrana no convencionales de los macrófagos (Benten *et al.* 1997,1999), lo cual ha sido demostrado al encontrarse que los macrófagos responden a receptores de membrana para testosterona (RMT ó mAR en inglés), los cuales están acoplados a la fosfolipasa C por medio de proteínas G sensibles a la toxina pertussis (PTX). La testosterona hace que las células respondan con un rápido incremento en las concentraciones de calcio inducido [ $Ca^{2+}$ ](i) (Wunderlich, *et al.* 2002; Benten, *et al.* 2004).

Esto apoya la idea de que la testosterona ejerce un efecto directo sobre el macrófago para modular su infección por *L. donovani* y no por el efecto directo de la *L. donovani* sobre el macrófago (Zhang, *et al.* 2001).

También se ha encontrado que los macrófagos murinos después de ser estimulados con LPS y tratados con  $17\beta$ -estradiol, han mostrado menor producción de IL- $1\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , mientras que IL-10 e IL-12, así como la producción de proteínas proinflamatorias en

macrófagos, fue inalterada. Estos efectos se cree, están asociados con un decremento en la unión de NFκB inducido por LPS (Craig, *et al.* 2001).

Hay evidencias que indican que los estrógenos inhiben la producción de las citocinas proinflamatorias Th1, tales como IL-12, TNF-alfa e IFN-gamma, mientras que estimulan la producción Th2 de las citocinas antiinflamatorias, tales como IL-10, IL-4, y TGF-beta (Salem, 2004).

Ratones DBA/2 machos mostraron una mayor susceptibilidad a la infección subcutánea con *L. mexicana* que las hembras (Alexander, 1988). Otros estudios muestran que la susceptibilidad a *L. major* o *L. mexicana* depende fuertemente de los niveles hormonales que a su vez regulan la expresión de diferentes citocinas (Alexander y Stimson, 1988; Krishnan, *et al.* 1996; Satoskar, *et al.* 1998). La resistencia relativa de las hembras a *L. mexicana* comparada con los machos se relaciona con la sobreexpresión de interferón gamma (INF-γ) (Satoskar, *et al.* 1998).

En ratones DBA/2 hembras ganadectomizadas se encontró que se incrementa la susceptibilidad a la infección por *L. mexicana*, la cual puede ser suprimida por un reemplazamiento hormonal. Sin embargo los efectos protectores de los estrógenos no aplican a todos los modelos experimentales con *Leishmania* (Alexander, y Stimson. 1988).

En hámsters se ha encontrado que los machos son más susceptibles a la infección con *Leishmania (viannia)* que las hembras (Travi, *et al.* 2002).

También, se encontró que existe un papel promotor de la testosterona en el desarrollo de la infección al comparar la lesión entre hámsters juveniles (pre-púberes) y adultos, en cambio el papel de los estrógenos fue menos claro, ya que no se encontró diferencia significativa entre hembras juveniles (pre-púberes) y adultas (Travi, *et al.* 2002).

Estos antecedentes muestran que la presencia de altos niveles de andrógenos más que bajos niveles de estrógenos, son los responsables de una enfermedad más severa en los animales machos. También se encontró que la severidad de la lesión en hámsters machos no se debe al decremento en la expresión de INF-γ, sino con una sobreexpresión de las citocinas contraprotectivas IL-4, IL-10 y TGF-β (Travi, *et al.* 2002).

A pesar de que se ha encontrado una mayor susceptibilidad a la leishmaniasis asociada al género masculino, aun se sabe muy poco sobre las alteraciones de la respuesta inmune innata asociada al género en ratones susceptibles y resistentes a la infección *Leishmania mexicana*.



## II. HIPÓTESIS

Los ratones machos son más susceptibles a la infección por *Leishmania mexicana* que las hembras por lo que la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de TLR-2 posiblemente estén disminuidos cuando sus macrófagos son estimulados con lipofosfoglicano del parásito.

## III. OBJETIVOS

### A. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación del género en la respuesta inmune innata a la infección por *Leishmania mexicana* en ratones resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c).

### B. OBJETIVOS PARTICULARES

- Gonadectomizar a un grupo de ratones machos y hembras BALB/c y C57BL/6 a las 4 semanas de edad.
- Realizar una cinética del tamaño de la lesión en ratones BALB/c y C57BL/6, machos y hembras, normales y gonactomizados, infectados con *Leishmania mexicana*.
- Estimular a macrófagos peritoneales obtenidos de los distintos grupos de ratones con lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania mexicana*.
- Analizar la producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-12 p-40 e IL-10 en sobrenadantes de macrófagos peritoneales obtenidos de los distintos grupos de ratones.
- Analizar la expresión de TLR-2 de macrófagos peritoneales obtenidos de los distintos grupos de ratones.
- Analizar el efecto que ejerce LPG sobre la proliferación de esplenocitos obtenidos de los distintos grupos de ratones.

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

- A. Animales:** Se utilizaron 3 grupos de ratones machos y hembras de las cepas BALB/c y C57BL/6. Un grupo de 4 semanas de edad, fue gonadectomizado. Otro grupo fue el testigo no gonadectomizado, los ratones fueron sacrificados a los 7 meses post-infección. Ambos grupos fueron infectados a las 8 semanas de edad. Un tercer grupo se utilizó como testigo no infectado.
- B. Gonadectomía:** Ratones recién destetados machos y hembras de las cepas BALB/c y C57BL/6, de 4 semanas de edad, fueron sometidos a una gonadectomía. Fueron anestesiados con Pentobarbital a una dilución de 1:10, la cual fue suministrada con una inyección por vía intraperitoneal a dosis de entre 80 – 100  $\mu$ l por ratón. Una vez anestesiado el ratón, se procedió a la gonadectomía, después de la cual se suturó con hilo CATGUT reabsorbible y después se dejaron 2 semanas en convalecencia.
- C. Infección:** Se utilizaron promastigotes metacíclicos de *L. mexicana*, crecidos en medio NNN además de medio Schneider complementado con suero fetal bovino al 5%. Los promastigotes ( $10^6$ ) fueron lavados 3 veces en PBS, e inoculados intradérmicamente en el cojinete plantar de ratones machos y hembras de las cepas BALB/c y C57BL/6 gonadectomizados y no gonadectomizados de 8 semanas de edad. Se inoculó  $1 \times 10^6$  promastigotes de *L. mexicana* en 20 $\mu$ l de PBS y se analizó el tamaño de la lesión mediante la medición del cojinete plantar por un vernier durante 28 semanas de infección.
- D. Obtención de células:** Se inyectaron 10ml de PBS frío estéril en la cavidad peritoneal dando un masaje suave para desprender las células peritoneales. Con la misma jeringa se extrajo el PBS nuevamente, obteniendo así las células. Se centrifugaron a 1200-1400rpm durante 10 min a 4° C. El botón conteniendo las células se resuspendió en medio RPMI enriquecido con suero fetal bovino al 10%. Se colocaron  $1 \times 10^6$  células suspendidas en 1 ml en cajas de Petri tratadas y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 hrs. Posteriormente se desprendieron las células y se lavaron con PBS, centrifugando a 1200-1400rpm durante 10 min a 4° C. Se resuspendieron las células a una concentración de  $1 \times 10^6$  céls/ml de RPMI y se utilizaron para los ensayos de estimulación con LPG y LPS.

E. **Ensayos de estimulación:** Para los ensayos de estimulación se incubaron  $1 \times 10^6$  de células adherentes con  $10 \mu\text{g/ml}$  de LPG de *Leishmania mexicana* suspendido en 1ml de RPMI durante 24 hrs a  $37^\circ\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$ , un segundo grupo de células adherentes fueron estimuladas con  $100 \text{ ng/ml}$  de LPS y un tercer grupo no recibió estímulo.

- $\text{M}\phi$
- $\text{M}\phi + \text{LPG}$
- $\text{M}\phi + \text{LPS}$

Posteriormente se centrifugaron las células a 4000 rpm por 5 min y se congeló el sobrenadante en tubos Eppendorf estériles a  $-70^\circ\text{C}$ . El botón celular se resuspendió en Trizol y se congeló a  $-70^\circ\text{C}$ .

F. **Producción de citocinas:** Se analizó la secreción de las citocinas en el sobrenadante TNF-alfa, IL-10 e IL-12p40 mediante ELISA tipo sándwich con un kit comercial. Se utilizan las siguientes concentraciones dependiendo de la citocina, TNF- $\alpha$  [ $4 \mu\text{l} / \text{ml}$ ] en amortiguador de unión a pH 6, IL-10 [ $2.5 \mu\text{l} / \text{ml}$ ] e IL-12 [ $1 \mu\text{l} / \text{ml}$ ] en amortiguador de unión a pH 9, en un volumen de  $50 \mu\text{l/pozo}$  y se deja durante un día a  $4^\circ\text{C}$ , la placa se lava 4 veces con una solución de PBS-Tween 80 al 0.01%, después la placa se bloquea con una solución 1N de NaOH y 5g de caseína colocando  $200 \mu\text{l/pozo}$  a temperatura ambiente durante 30 min. Al término la placa es lavada 3 veces y se coloca en la placa la curva estándar y las muestras problema agregando  $100 \mu\text{l/pozo}$  dejándose un día a  $4^\circ\text{C}$  ó 2 hr a temperatura ambiente, la placa se lava una vez más 4 veces y se coloca el anticuerpo de detección colocando las siguientes concentraciones según la citocina TNF $\alpha$  [ $4 \mu\text{l} / \text{ml}$ ], IL-10 [ $1 \mu\text{l} / \text{ml}$ ] e IL-12 [ $0.5 \mu\text{l} / \text{ml}$ ] diluido en Albúmina Bovina al 1%, colocando  $100 \mu\text{l/pozo}$  y se deja 1 hr a temperatura ambiente, después la placa es lavada 6 veces y se coloca estreptavidina fosfatasa alcalina a una dilución 1:2000 en Albúmina al 1%, en  $100 \mu\text{l/pozo}$  durante 30min. Se lava la placa 8 veces para retirar el exceso de estreptavidina fosfatasa alcalina y se coloca por último la solución reveladora compuesta por buffer de sustrato (dietanolamina,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MgCl}_2$  0.1M a pH 9.8) y p-nitrofenil fosfato (pNPP) en una relación de una pastilla de 5mg de pNPP / 5ml de Buffer de Sustrato. La placa es leída por un lector de ELISA (312e BIO-TEK Instruments) a una longitud de onda de 405 nm.

- G. Expresión de TLR-2:** De los macrófagos congelados en Trizol, se extrajo ARN total, y se realizó un RT-PCR, para obtener ADNc. Este ADNc fue amplificado con primers específicos para TLR-2, primer 5` CTGCAAGAGCTCTATATTTCC 3`, 3` AACCAGGATTTGAGCCAGAGC 5`. Se corrió en un gel de agarosa a 1.5% con TBE, se analizó la expresión del TLR-2 por medio de un análisis de la densidad de las bandas por densitometría.
- H. Ensayo de proliferación de esplenocitos:** Para la obtención de esplenocitos se extrajo el bazo se colocó en una placa de Petri en 3-4 ml de RPMI completo (suplementado con suero fetal bovino 10%, descomplementado a 56°C/30 min.). Se profundió el bazo con 5 ml de RPMI y se obtuvieron las células. Se utilizaron 20 x10<sup>6</sup> células/4ml los cuales se colocaron en placas de 96 a una concentración de 5x10<sup>5</sup> células por pozo.
- Para el análisis de la proliferación con el estímulo de LPG se agregó 3µl de LPG de *L. mexicana* a una concentración de 1µg/ml que se ajustó a 100 µl con de RPMI completo. El análisis se realizó por triplicado y se incluyeron 3 pozos con RPMI completo como control. Después de 5 días de cultivo se pulsaron las células con [3H]-timidina (Amersham farmacia) durante 16-18 horas antes de la cosecha.
- Para el análisis del estímulo con mitógenos se agregaron 5µg de ConA en 100µg de medio, por triplicado a los esplenocitos. Se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 3 días. Después de 2 días se pulsaron las células con [3H]-timidina en iguales condiciones durante 16-18 horas antes de ser cosechadas.
- La cosecha de las células se realizó sobre papel Wattman que se dejó secar cubierto con papel aluminio. Se cortaron en círculos y se depositaron en viales con 5ml de líquido de centelleo. Se cuantificó la incorporación de timidina en un contador beta.
- I. Estadística:** Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos, mediante la prueba U de Mann-Whitney p<0.05

## V. RESULTADOS

**G. Expresión de TLR-2:** De los macrófagos congelados en Trizol, se extrajo ARN total, y se realizó un RT-PCR, para obtener ADNc. Este ADNc fue amplificado con primers específicos para TLR-2, primer 5` CTGCAAGAGCTCTATATTCC 3`, 3` AACCAGGATTTGAGCCAGAGC 5`. Se corrió en un gel de agarosa a 1.5% con TBE, se analizó la expresión del TLR-2 por medio de un análisis de la densidad de las bandas por densitometría.

**H. Ensayo de proliferación de esplenocitos:** Para la obtención de esplenocitos se extrajo el bazo se colocó en una placa de Petri en 3-4 ml de RPMI completo (suplementado con suero fetal bovino 10%, descomplementado a 56°C/30 min.). Se prefundió el bazo con 5 ml de RPMI y se obtuvieron las células. Se utilizaron 20 x10<sup>6</sup> células/4ml los cuales se colocaron en placas de 96 a una concentración de 5x10<sup>5</sup> células por pozo.

Para el análisis de la proliferación con el estímulo de LPG se agregó 3µl de LPG de *L. mexicana* a una concentración de 1µg/ml que se ajustó a 100 µl con de RPMI completo. El análisis se realizó por triplicado y se incluyeron 3 pozos con RPMI completo como control. Después de 5 días de cultivo se pulsaron las células con [3H]-timidina (Amersham farmacia) durante 16-18 horas antes de la cosecha.

Para el análisis del estímulo con mitógenos se agregaron 5µg de ConA en 100µg de medio, por triplicado a los esplenocitos. Se incubaron a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda durante 3 días. Después de 2 días se pulsaron las células con [3H]-timidina en iguales condiciones durante 16-18 horas antes de ser cosechadas.

La cosecha de las células se realizó sobre papel Wattman que se dejó secar cubierto con papel aluminio. Se cortaron en círculos y se depositaron en viales con 5ml de líquido de centelleo. Se cuantificó la incorporación de timidina en un contador beta.

**I. Estadística:** Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos, mediante la prueba U de Mann-Whitney p<0.05

## V. RESULTADOS

Se analizó el desarrollo de la infección, la producción de citocinas TNF-alfa, IL-10 e IL-12p40, la expresión de TLR-2 y la respuesta linfoproliferativa, en macrófagos peritoneales de ratones a los 7 meses de infección con *Leishmania mexicana*. Ser analizaron comparativamente a ratones machos y hembras, normales y gonadectomizados de cepas resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c) a la leishmaniasis. El análisis se realizó en condiciones basales y en células estimuladas con LPG.

### **A. Tamaño de la lesión.**

Se encontró que los animales se podían diferenciar en 2 grupos, según el tamaño promedio de sus lesiones.

El primer grupo comprendió a animales que tenían las lesiones más grandes, entre los cuales se encuentran (en orden del tamaño de la lesión):

- 1.-machos BALB/c
- 2.-machos BALB/c gonadectomizados
- 3.-hembras BALB/c gonadectomizadas
- 4.-hembras C57BL/6

El segundo grupo de animales presentó lesiones menos grandes que los animales del grupo 1, aunque muy parecidos entre si. Este segundo grupo estaba formado por:

- 5.-hembras BALB/c
- 6.-machos C57BL/6
- 7.-machos C57BL/6 gonadectomizados
- 8.-hembras C57BL/6 gonadectomizadas

GROSOR DEL COJINETE PLANTAR EN RATONES HEMBRAS Y MACHOS  
BALB/c Y C57BL/6 DURANTE SU INFECCIÓN CON *L. MEXICANA*

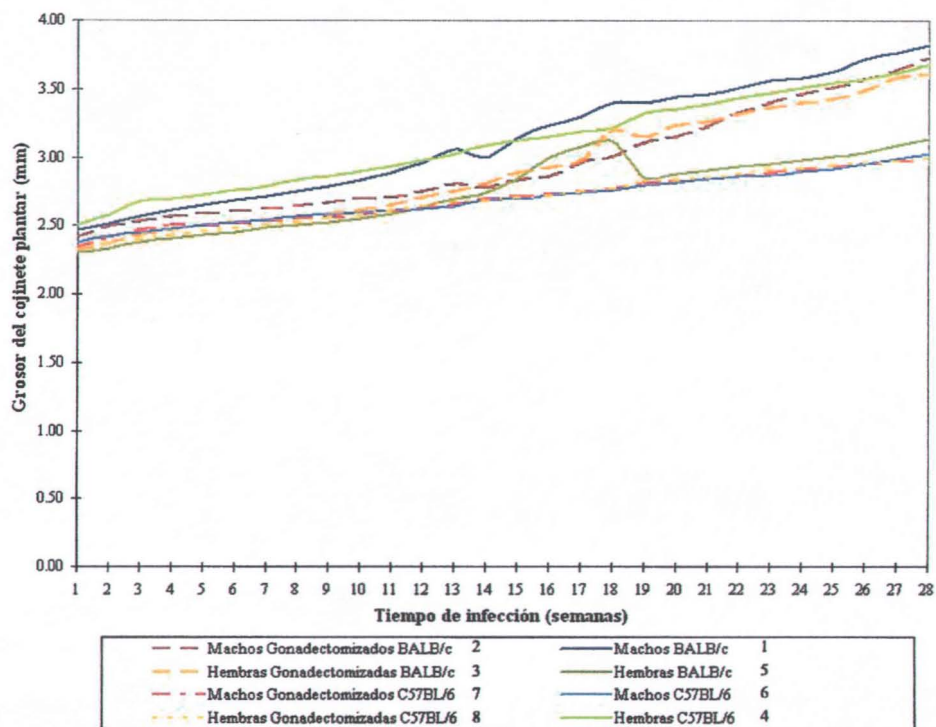


Fig. 7.- Evolución de las lesiones en el cojinete plantar de los 8 grupos de ratones a lo largo de 28 semanas de infección.

**INCREMENTO DEL GROSOR DEL COJINETE PLANTAR EN RATONES  
HEMBRAS Y MACHOS BALB/c Y C57BL/6 A LOS 7 MESES DE INFECCIÓN  
CON *L. mexicana***

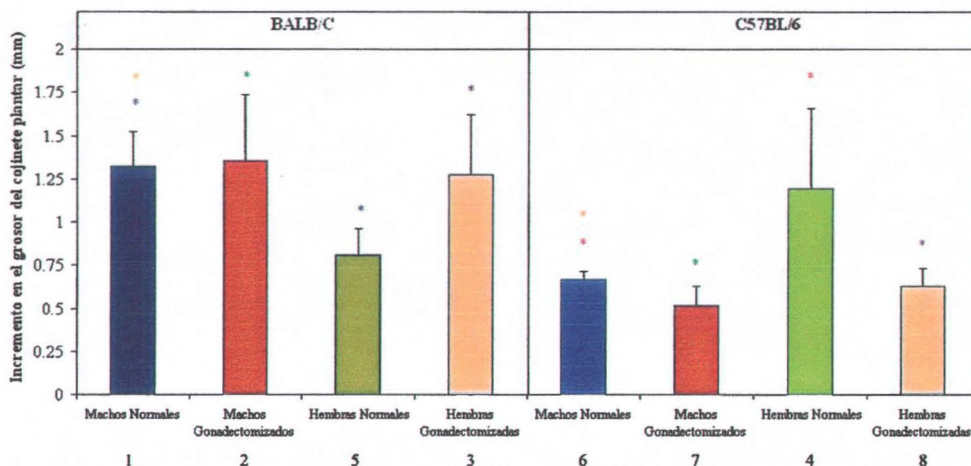


Fig. 8.- Incremento en el grosor del cojinete plantar tamaño de lesión. \*p<0.05

<b>ÍNDICE SIGNIFICATIVO DEL INCREMENTO</b>
<b>BALB/c</b>
MACHOS (1) VS HEMBRAS (5)
<b>C57BL/6</b>
HEMBRAS (4) VS MACHOS (6)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
MACHOS (1) VS MACHOS (6)
MACHOS G. (2) VS MACHOS G. (7)
HEMBRAS G. (3) VS HEMBRAS G. (8)

Tabla 1.- Análisis estadístico entre los distintos grupos de animales. \*p<0.05

En resumen se encontró que hay diferencias en el tamaño de las lesiones asociadas al fondo genético de los ratones, ya que por lo general las lesiones de los ratones susceptibles BALB/c son mayores que las de los ratones C57BL/6, que son resistentes a la leishmaniasis. Además del fondo genético, el género femenino participa de manera determinante en la evolución del padecimiento. Por un lado, las hembras BALB/c son significativamente más resistentes que los machos BALB/c y por otro lado las hembras C57BL/6 son más significativamente más



susceptibles que los machos C57BL/6. Ambos fenómenos son abolidos con la gonadectomía de las hembras, lo cual revela que hormonas sexuales femeninas ejercen efectos sobre la resistencia o susceptibilidad, dependiendo del fondo genético del ratón.

## B. Análisis de citocinas

### a) TNF $\alpha$

En el caso de TNF- $\alpha$  se encontró que los machos gonadectomizados y no gonadectomizados en BALB/c no presentaron niveles de producción distintos entre si.

Los macrófagos de machos BALB/c y C57BL/6 producen significativamente más TNF- $\alpha$  que las hembras de ambas cepas de ratón, tanto en estado basal como en estimulados con LPG. Esta relación se mantiene aún en los gonadectomizados.

Los macrófagos de las hembras en BALB/c y C57BL/6 al ser estimuladas con LPG, tuvieron un incremento significativamente mayor en la producción de TNF- $\alpha$  que los machos.

Al gonadectomizar las hembras de ambas cepas de ratón, observamos que macrófagos de hembras C57BL/6 producen significativamente más TNF- $\alpha$ , tanto en estado basal como en estimulado con LPG, que hembras BALB/c. Esto concuerda con los datos observados con el tamaño de la lesión ya que las hembras gonadectomizadas BALB/c son más susceptibles que las hembras gonadectomizadas C57BL/6.

		BALB/c							
		TNF $\alpha$ (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONAECTOMIZADOS		NORMALES		GONAECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		1693.64	1944.30	1535.33	2023.46	110.54	941.67	57.77	110.54
		1720.03	1917.92	1759.60	1456.18	163.31	994.44	84.15	374.39
		1548.52	1192.32	1601.29	1693.64	268.85	862.51	97.34	532.70
Prom.		1654.06	1684.85	1632.08	1724.42	180.90	932.87	79.75	339.21
Desv. Est.		92.35	426.74	115.26	284.89	80.61	66.40	20.15	213.27

Tabla 2.-Datos de la producción de TNF- $\alpha$  en la cepa BALB/c.

		C57BL/6							
		TNF $\alpha$ (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONADECTOMIZADOS		NORMALES		GONADECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		2669.40	2196.48	2903.23	2883.05	92.68	705.47	1656.96	1835.10
		2747.41	2261.60	2992.20	2980.35	88.04	696.50	1687.51	1864.73
		798.32	695.56	847.88	830.15	233.64	408.91	600.62	657.74
Prom.		2071.71	1717.88	2247.77	2231.18	138.12	603.63	1315.03	1452.52
Desv. Est.		1103.47	885.95	1213.16	1214.31	82.75	168.69	618.89	688.46

Tabla 3.-Datos de la producción de TNF- $\alpha$  en la cepa C57BL/6.

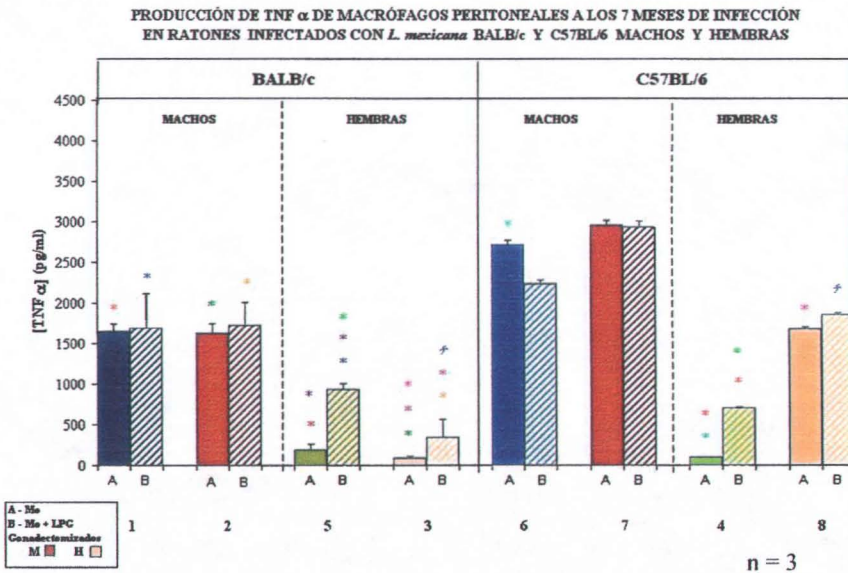


Fig. 9.- Producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con *L. mexicana* en ratones resistentes y susceptibles, normales y gonadectomizados, tanto hembras como machos. \* $p < 0.05$

<b>PRODUCCIÓN DE TNF <math>\alpha</math></b>
<b>BALB/c</b>
MACHOS (1A) VS HEMBRAS (5*) MACHOS (1B) VS HEMBRAS (5B) MACHOS G. (2A) VS HEMBRAS G. (3A) MACHOS G. (2B) VS HEMBRAS G. (3B) HEMBRAS (5B) VS HEMBRAS (5*) HEMBRAS G. (3B) VS HEMBRAS G. (3A)
<b>C57BL/6</b>
MACHOS (6A) VS HEMBRAS (4*) HEMBRAS (4B) VS HEMBRAS (4*)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
HEMBRAS (5B) VS HEMBRAS (4B) HEMBRAS G. (8A) VS HEMBRAS G. (3A) HEMBRAS G. (8B) VS HEMBRAS G. (3B)

Tabla 4.-Análisis estadístico de las variables significativas en la producción de TNF- $\alpha$

\*  $p < 0.05$

<b>INDICE DE PRODUCCIÓN DE TNF-<math>\alpha</math></b>
<b>BALB/c</b>
HEMBRAS (5) VS MACHOS (1) HEMBRAS G. (3) VS MACHOS G. (2)
<b>C57BL/6</b>
HEMBRAS (4) VS MACHOS (6) HEMBRAS G. (8) VS MACHOS G. (7) HEMBRAS (4) VS HEMBRAS (8)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
HEMBRAS G.(3) VS HEMBRAS G. (8)

Tabla 5.- Índice de incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , así como el análisis estadístico de las variables \* $p < 0.05$

		BALB/c				C57/BL6			
		M	MG	H	HG	M	MG	H	HG
TNF- $\alpha$		+	+	++++	++	-	-	+++	+
		Protección				Infección			

Tabla 6.- Resumen del incremento en la producción de TNF- $\alpha$ .

En resumen se encontró que la producción basal de TNF- $\alpha$  por macrófagos de machos BALB/c y C57BL/6 es significativamente mayor que la de las hembras de ambas cepas (Tabla 4). Sin embargo, al ser estimulados con LPG, los macrófagos de hembras BALB/c y de hembras C57BL/6, normales y gonadectomizadas, presentan un incremento significativamente mayor de TNF- $\alpha$  que los machos de ambas cepas (Tabla 5). Estos datos revelan que el TNF- $\alpha$  posiblemente no participe en la resistencia, ya que hembras de ambas cepas se comportaron igual con respecto a la producción de esta citocina y sin embargo la hembra BALB/c es más resistente a la leishmaniasis que la hembra C57BL/6. Sin embargo, llama la atención que en la cepa C57BL/6 las hormonas sexuales femeninas aparentemente inhiben la producción de TNF- $\alpha$  en mayor grado que en ratones BALB/c (Tabla 6), ya que la gonadectomía incrementó la producción de esta citocina significativamente mas en hembras C57BL/6 que en hembras BALB/c. Interesantemente, los niveles elevados de TNF- $\alpha$  en hembras C57BL/6 gonadectomizadas aparentemente si tienen un efecto protector, ya que estos animales presentaban lesiones significativamente menores que las hembras BALB/c gonadectomizadas. Por otro lado, la testosterona no parece tener efecto sobre la producción de esta citocina en ninguna de las cepas de ratón.

#### b) IL-12p40

Los macrófagos de ratones BALB/c machos no producen IL-12p40 en estado basal ni estimulados con LPG. Sin embargo, la gonadectomía incrementa su producción significativamente, tanto en condiciones basales como en estimulados con LPG. Así mismo, las hembras BALB/c producen significativamente más IL-12p40 que los machos, tanto en condiciones basales como estimulados con LPG. Sin embargo, cuando son gonadectomizadas las hembras BALB/c, sus macrófagos dejan de sintetizar IL-12p40. La producción de IL-12p40 en ratones BALB/c correlaciona con la resistencia, ya que las hembras producen más IL-12p40 que los machos. En esta cepa de ratón, las hormonas sexuales femeninas inducen la producción de IL-12p40 mientras que la testosterona inhibe su producción. Al eliminar las

hormonas sexuales femeninas en hembras gonadectomizadas, se reduce significativamente la producción de IL-12p40 y por otro lado al eliminar la testosterona, se incrementa significativamente la producción de IL-12p40 en los machos gonadectomizados.

En macrófagos de ratones C57BL/6 machos normales observamos un incremento significativo en su producción de IL-12p40 al ser estimulados con LPG. Al ser gonadectomizados, incrementa significativamente la producción de IL-12p40, tanto en estado basal como estimulados con LPG. También en esta cepa de ratón, la testosterona parece ejercer una acción inhibitoria sobre la producción de IL-12p40, ya que al gonadectomizar los machos, se incrementa significativamente la producción de IL-12 p40 por sus macrófagos.

En macrófagos de hembras C57BL/6 no se registró la producción de IL-12p40, tanto en condiciones basales, como en estimulados con LPG.

Los macrófagos de machos C57BL/6 producen más IL-12p40 que en machos BALB/c tanto en condiciones basales como en estimulados y este fenómeno persiste después de la gonadectomía. La resistencia a la leishmaniasis observada en ratones machos C57BL/6 parece correlacionarse con su capacidad de producir IL-12p40, ya que es significativamente mayor que la de los machos BALB/c y asimismo sus lesiones son significativamente menores que las de los machos BALB/c. Al eliminar la testosterona con la gonadectomía se incrementa la producción de IL-12 p40 en los machos C57BL/6 y así mismo se reduce significativamente el tamaño de las lesiones.

Las hembras BALB/c producen significativamente más IL-12p40 que las hembras C57BL/6, e interesantemente las hembras BALB/c también son mas resistentes a la leishmaniasis, que las hembras C57BL/6. Al eliminar el estímulo que ejercen las hormonas sexuales femeninas sobre la producción de IL-12 p40 en hembras BALB/c gonadectomizadas, también se hacen más susceptibles a la leishmaniasis.

		BALB/c							
		IL-12p40 (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONAECTOMIZADOS		NORMALES		GONAECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		15.00	15.00	123.14	96.80	101.45	120.82	15.00	15.00
		15.00	15.00	133.98	73.57	68.92	145.60	15.00	15.00
		15.00	15.00	37.94	71.24	90.61	136.31	15.00	15.00
Prom.		15.00	15.00	98.35	80.54	86.99	134.24	15.00	15.00
Desv. Est.		0.00	0.00	52.60	14.13	16.56	12.52	0.00	0.00

Tabla 7.-Datos de la producción de IL-12p40 en la cepa BALB/c.

		C57BL/6							
		IL-12p40 (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONADECTOMIZADOS		NORMALES		GONADECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		174.72	426.66	778.20	1000.84	15.00	15.00	15.00	15.00
		69.26	280.18	819.21	942.25	15.00	15.00	15.00	15.00
		75.12	321.20	1018.42	901.24	15.00	15.00	15.00	15.00
Prom.		106.37	342.68	871.94	948.11	15.00	15.00	15.00	15.00
Desv. Est.		59.27	75.56	128.50	50.06	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 8.-Datos de la producción de IL-12p40 en la cepa C57BL/6.

PRODUCCIÓN DE IL-12p40 DE MACRÓFAGOS PERITONEALES A LOS 7 MESES DE INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *L. mexicana* BALB/c Y C57BL/6 MACHOS Y HEMBRAS

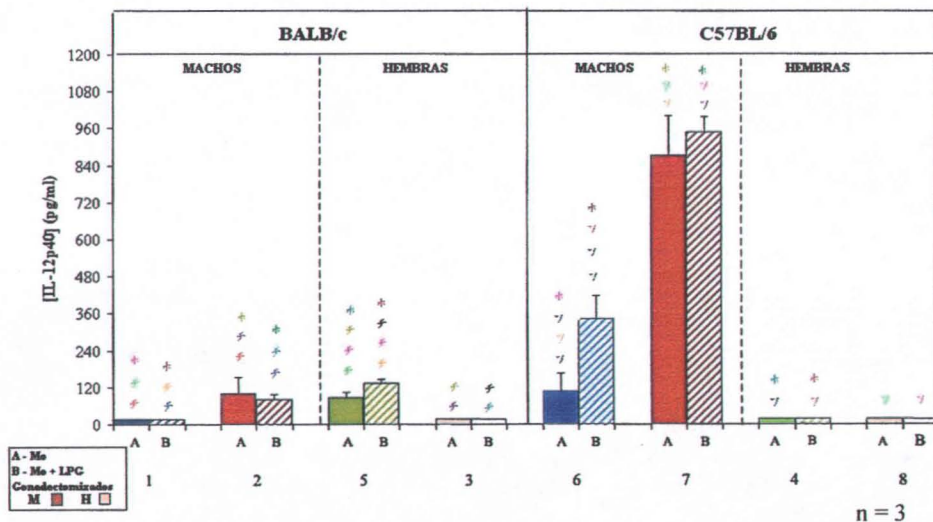


Fig. 10.-Producción de IL-12p40 por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con *L. mexicana* en ratones resistentes y susceptibles normales y gonadectomizados, tanto hembras como machos. \*p<0.05

<b>PRODUCCIÓN DE IL-12p40</b>
<b>BALB/c</b>
MACHOS G. (2A) VS MACHOS (1A) MACHOS G. (2B) VS MACHOS (1B) HEMBRAS (5A) VS MACHOS (1A) HEMBRAS (5B) VS MACHOS (1B) MACHOS G. (2A) VS HEMBRAS G. (3A) MACHOS G. (2B) VS HEMBRAS G. (3B) HEMBRAS (5B) VS HEMBRAS (5A) HEMBRAS (5A) VS HEMBRAS G. (3A) HEMBRAS (5B) VS HEMBRAS G. (3B)
<b>C57BL/6</b>
MACHOS (6B) VS MACHOS (6A) MACHOS G. (7A) VS MACHOS (6A) MACHOS G. (7B) VS MACHOS (6B) MACHOS (6A) VS HEMBRAS (4A) MACHOS (6B) VS HEMBRAS (4B) MACHOS G. (7A) VS HEMBRAS G. (8A) MACHOS G. (7B) VS HEMBRAS G. (8B)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
MACHOS (6A) VS MACHOS (1A) MACHOS (6B) VS MACHOS (1B) MACHOS G. (7A) VS MACHOS G. (2A) MACHOS G. (7B) VS MACHOS G. (2B) HEMBRAS (5A) VS HEMBRAS (4A) HEMBRAS (5B) VS HEMBRAS (4B)

Tabla 9.-Análisis estadístico de las variables significativas en la producción de IL-12p40 \*\*  
p<0.05

INDICE DE PRODUCCIÓN DE IL-12p40	
<b>BALB/c</b>	
HEMBRAS (5) VS MACHOS (1) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS G. (3)	
<b>C57BL/6</b>	
MACHOS (7) VS MACHOS G. (6) MACHOS (6) VS HEMBRAS (4)	
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>	
MACHOS (6) VS MACHOS (1) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS (4)	

Tabla 10.- Índice de incremento en la producción de IL-12p40, así como el análisis estadístico de las variables \*p<0.05

		BALB/c				C57/BL6			
		M	MG	H	HG	M	MG	H	HG
IL-12		-	-	+	-	++	+	-	-
		Protección				Infección			

Tabla 11.- Resumen del incremento en la producción de IL-12.

En resumen, se observa que la producción de IL-12 p40 es inducida por hormonas sexuales femeninas en ratones con fondo genético BALB/c e inhibidas por testosterona y la gonadectomía es determinante para la producción de IL-12p40 en machos al contrario de las hembras (Tabla 11). La producción de IL-12p40 parece correlacionarse a la resistencia a la leishmaniasis observada en hembras BALB/c y machos C57BL/6.

### c) IL-10

En macrófagos de ratones BALB/c no se detectó la producción de IL-10 en machos ni en hembras.

Por otro lado, en macrófagos de ratones C57BL/6 machos, observamos que la producción de IL-10 es significativamente mayor en macrófagos de gonadectomizados sobre machos normales. En ratones con fondo genético C57BL/6 la testosterona inhibe significativamente la producción de IL-10, ya que ratones machos gonadectomizados producen significativamente más IL-10, que machos normales.



La producción de IL-10 es mayor en hembras C57BL/6 normales estimuladas que en hembras gonadectomizadas estimuladas. Adicionalmente la producción de IL-10 en C57BL/6 es significativamente mayor en machos gonadectomizados que en hembras gonadectomizadas bajo condiciones basales y estimuladas con LPG. En ratones con fondo genético C57BL/6, los estrógenos inducen la producción de IL-10.

		BALB/c							
		IL-10 (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONADECTOMIZADOS		NORMALES		GONADECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	189.98	15.00
		15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	114.86	15.00	15.00
		15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Prom.		15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	48.29	73.33	15.00
Desv. Est.		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	57.66	101.03	0.00

Tabla 12.-Datos de la producción de IL-10 en la cepa BALB/c.

		C57BL/6							
		IL-10 (pg/ml)							
		MACHOS				HEMBRAS			
		NORMALES		GONADECTOMIZADOS		NORMALES		GONADECTOMIZADOS	
		Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG	Mo	LPG
		15.00	15.00	359.76	814.30	587.03	132.48	15.00	284.00
		15.00	15.00	1193.09	15.00	15.00	662.79	284.00	15.00
		15.00	15.00	359.76	738.55	15.00	1950.67	284.00	15.00
Prom.		15.00	15.00	637.54	522.62	205.68	915.31	194.33	104.67
Desv. Est.		0.00	0.00	481.13	441.24	330.26	935.03	155.31	155.31

Tabla 13.-Datos de la producción de IL-10 en la cepa C57BL/6.

<b>INDICE DE PRODUCCIÓN DE IL-10</b>
<b>No hubo datos significativos</b>

Tabla 14.- Índice de incremento en la producción de IL-10, así como el análisis estadístico de las variables \* $p < 0.05$

PRODUCCIÓN DE IL-10 DE MACRÓFAGOS PERITONEALES A LOS 7 MESES DE INFECCIÓN EN RATONES INFECTADOS CON *L. mexicana* BALB/c Y C57BL/6 MACHOS Y HEMBRAS

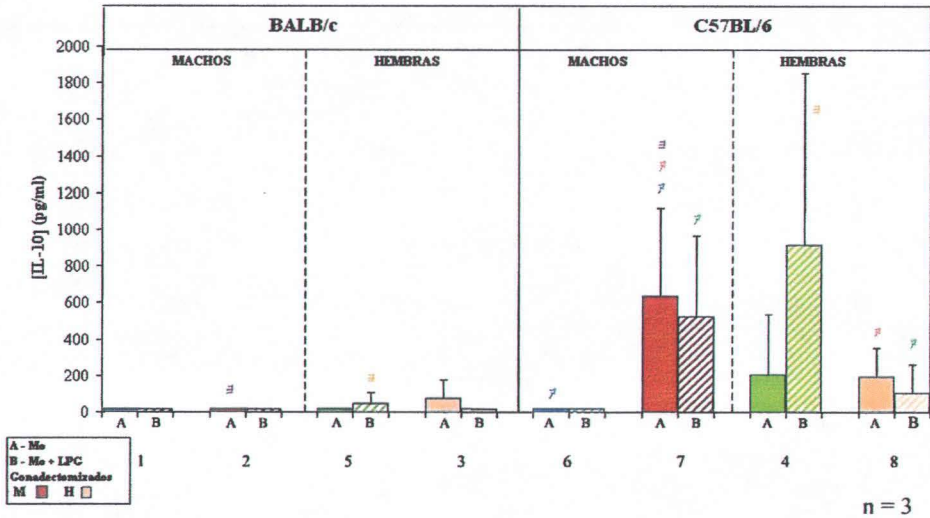


Fig. 11.-Producción de IL-10 por macrófagos peritoneales a los 7 meses de infección con *L. mexicana* en ratones resistentes y susceptibles normales y gonadectomizados tanto hembras como machos. \* $p < 0.05$

PRODUCCIÓN DE IL-10
BALB/c
C57BL/6
MACHOS G. (7A) VS MACHOS (6A)
MACHOS G. (7A) VS HEMBRAS G. (8A)
MACHOS G. (7B) VS HEMBRAS G. (8B)
BALB/c VS C57BL/6
MACHOS G. (7A) VS MACHOS G. (2A)
HEMRAS (4B) VS HEMBRAS (5B)

Tabla 15.-Análisis estadístico de las variables significativas en la producción de IL-10 \* $p < 0.05$

IL-10	BALB/c				C57/BL6			
	M	MG	H	HG	M	MG	H	HG
	-	-	-	-	-	-	++	-
	Protección				Infección			

Tabla 16.- Resumen del incremento en la producción de IL-10.

En resumen, la producción de IL-10 por macrófagos de las hembras C57BL/6 se correlaciona con la susceptibilidad a la leishmaniasis, ya que tienen significativamente mayor producción que las hembras BALB/c a adicionalmente lesiones de mayor tamaño (Tabla 16). Asimismo, la gonadectomía de las hembras C57BL/6 reduce la producción de IL-10 y adicionalmente reduce el tamaño de las lesiones.

### C. TLR-2

En los macrófagos de ratones BALB/c machos normales hubo mayor expresión de TLR-2 que en los machos gonadectomizados. En ambos casos, el estímulo con LPG incrementó la expresión de TLR-2. Los macrófagos de hembras BALB/c expresaron el doble de TLR-2 que los macrófagos de hembras gonadectomizadas. El estímulo con LPG incrementó la expresión de TLR-2 en ambos grupos de hembras.

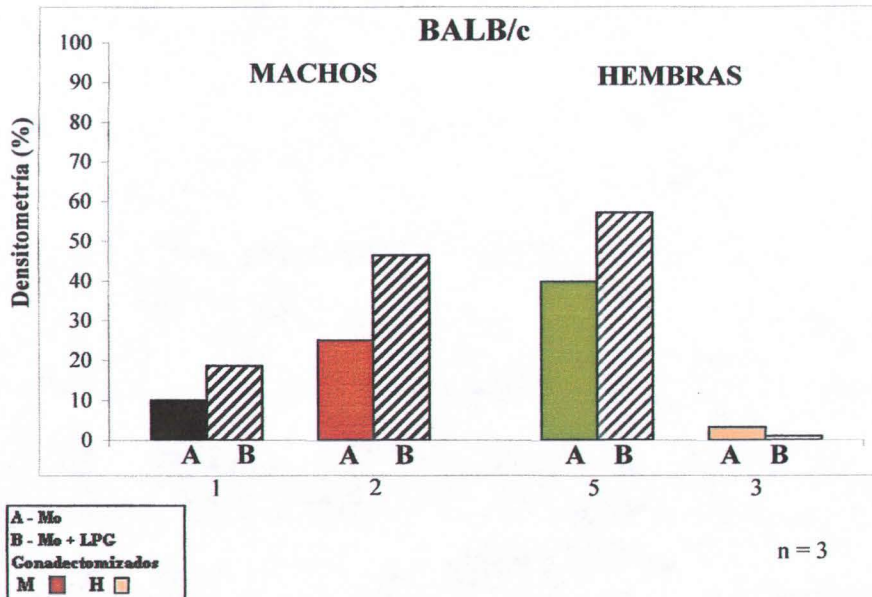


Fig.12.-Expresión de TLR-2 en ratones BALB/c machos y hembras normales y gonadectomizados, estimulados y no estimulados.

Se encontró que la expresión de TLR-2 en ratones BALB/c machos es menor que en las hembras, sin embargo al someter a ratones de ambos géneros a la gonadectomía ocurren

fenómenos contrarios entre los géneros. Mientras que en machos incrementa la expresión de TLR2, tanto en estado basal como estimulado, en hembras la gonadectomía disminuye su expresión. Sin embargo en todos los casos al ser estimulados con LPG hay un incremento en la expresión de TLR-2, siendo similar el incremento en machos gonadectomizados y hembras normales lo cual muestra un fenómeno nunca antes reportado en el cual se demuestra, que en ratones BALB/c, la presencia de hormonas sexuales femeninas y la ausencia de hormonas sexuales masculinas incrementa o favorece la expresión de TLR-2 y por el contrario la ausencia de hormonas sexuales femeninas disminuye la expresión de TLR-2.

En resumen, aparentemente las hormonas sexuales femeninas inducen la expresión de TLR-2, mientras que la testosterona la inhibe. Adicionalmente se correlaciona la resistencia de las hembras con la expresión aumentada de TLR-2.

#### **D. Proliferación de células de bazo.**

En este trabajo, utilizando los grupos de ratones antes mencionados, se analizó la proliferación de esplenocitos ante un estímulo específico (LPG) y uno inespecífico (ConA), para ver si el género determinaba las características proliferativas de esplenocitos y la existencia de alguna relación entre la proliferación de esplenocitos con el desarrollo de la infección.

##### **a) Estímulo específico con LPG**

Ante un estímulo específico (LPG) se observó mayor proliferación de esplenocitos en ratones C57BL/6 que en BALB/c.

En ratones BALB/c hubo mayor proliferación de esplenocitos en machos que en hembras tanto normales como gonadectomizados.

En ratones C57BL/6 normales se observó un incremento significativo en la linfoproliferación de esplenocitos de las hembras sobre los machos, lo cual se revierte con la gonadectomía de ambos, ya que en los machos gonadectomizados hubo mayor proliferación que en los normales, y en las hembras no hubo diferencias en la proliferación de esplenocitos entre gonadectomizadas y normales.

**PROLIFERACIÓN DE CÉL. DE BAZO DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS  
BALB/c Y C57BL/6 INFECTADOS CON *L. mexicana* ESTIMULADAS CON LPG**

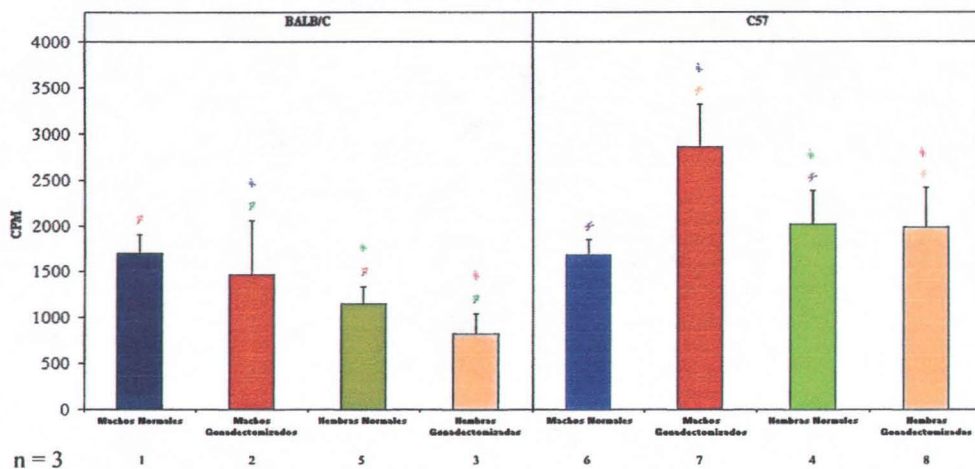


Fig. 13.-Proliferación de células de bazo estimuladas con liposfoglicano (LPG) de *L. Mexicana*. \*p<0.05

PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS ESTIMULADOS CON LPG
<b>BALB/c</b>
MACHOS (1) VS HEMBRAS (5)
MACHOS G. (2) VS HEMBRAS G. (3)
<b>C57BL/6</b>
HEMRAS (4) VS MACHOS (6)
MACHOS G. (7) VS HEMBRAS G. (8)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
MACHOS G. (7) VS MACHOS G. (2)
HEMRAS (4) VS HEMBRAS (5)
HEMRAS G. (8) VS HEMBRAS G. (3)

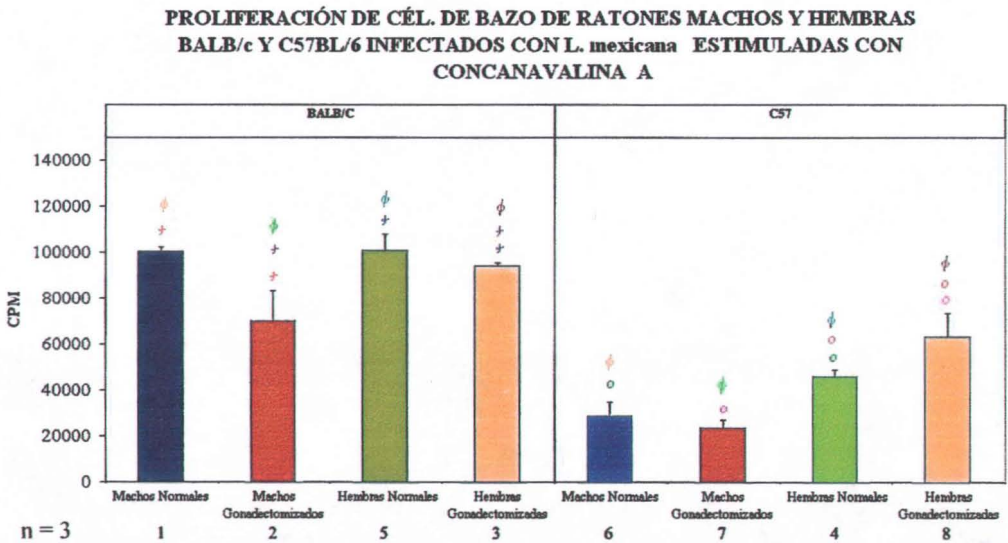
Tabla.-17. Análisis estadístico de la proliferación de esplenocitos estimulados con LPG entre los distintos grupos de animales \*p<0.05

En resumen se puede decir que la linfoproliferación se asocia de manera directa con la susceptibilidad la leishmaniasis en ratones BALB/c.

**b) Estímulo inespecífico con ConA**

Ante un estímulo inespecífico (ConA), al contrario de LPG, se observó mayor proliferación de esplenocitos en ratones BALB/c que en C57BL/6. Los ratones machos gonadectomizados, tanto en BALB/c como C57BL/6, presentan menor proliferación de esplenocitos que los machos normales.

Las hembras BALB/c normales presentan mayor proliferación de esplenocitos que las hembras gonadectomizadas. Las hembras C57BL/6 gonadectomizadas tienen mayor proliferación de esplenocitos que las hembras normales.



**Fig. 14.-** Proliferación de células de bazo de ratones resistentes y susceptibles tanto machos como hembras normales y gonadectomizados infectados con *L. Mexicana* estimuladas con ConA. \*p<0.05

<b>PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS ESTIMULADOS CON ConA</b>
<b>BALB/c</b>
MACHOS (1) VS MACHO G.(2) HEMBRAS G. (3) VS MACHOS G. (2) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS G. (3)
<b>C57BL/6</b>
HEMBRAS (4) VS MACHOS (6) HEMBRAS G. (8) VS MACHOS G. (7) HEMBRAS G. (8) VS HEMBRAS (4)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
MACHOS (1) VS MACHOS (6) MACHOS G. (2) VS MACHOS G. (7) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS (4) HEMBRAS G. (3) VS HEMBRAS G. (8)

Tabla.-18. Análisis estadístico de la proliferación de esplenocitos estimulados con ConA entre los distintos grupos de animales \* $p < 0.05$

Se encontró que la proliferación de esplenocitos ante un estímulo inespecífico como es el caso ConA es mayor en la cepa BALB/c que en la cepa C57BL/6. Cabe resaltar, que en estas cepas la respuesta ante Con A es contraria a la presentada ante LPG.

En machos gonadectomizados tanto BALB/c como C57BL/6 hay un decremento en la proliferación de esplenocitos. En BALB/c al ser gonadectomizadas tienen un decremento en la proliferación celular. Por su parte en C57BL/6 las hembras gonadectomizadas tienen un incremento en su proliferación celular.

## VI. DISCUSIÓN

### A. Lesión

Se ha encontrado que las hormonas influyen sobre la función de las células del sistema inmune, como por ejemplo los eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y células NK (Craig, *et al.* 2001) y se ha encontrado que en algunas enfermedades hay susceptibilidad variable, dependiendo del fondo genético. En la leishmaniasis, se ha observado que el hombre

<b>PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS ESTIMULADOS CON ConA</b>
<b>BALB/c</b>
MACHOS (1) VS MACHO G.(2) HEMBRAS G. (3) VS MACHOS G. (2) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS G. (3)
<b>C57BL/6</b>
HEMBRAS (4) VS MACHOS (6) HEMBRAS G. (8) VS MACHOS G. (7) HEMBRAS G. (8) VS HEMBRAS (4)
<b>BALB/c VS C57BL/6</b>
MACHOS (1) VS MACHOS (6) MACHOS G. (2) VS MACHOS G. (7) HEMBRAS (5) VS HEMBRAS (4) HEMBRAS G. (3) VS HEMBRAS G. (8)

Tabla.-18. Análisis estadístico de la proliferación de esplenocitos estimulados con ConA entre los distintos grupos de animales \* $p < 0.05$

Se encontró que la proliferación de esplenocitos ante un estímulo inespecífico como es el caso ConA es mayor en la cepa BALB/c que en la cepa C57BL/6. Cabe resaltar, que en estas cepas la respuesta ante Con A es contraria a la presentada ante LPG.

En machos gonadectomizados tanto BALB/c como C57BL/6 hay un decremento en la proliferación de esplenocitos. En BALB/c al ser gonadectomizadas tienen un decremento en la proliferación celular. Por su parte en C57BL/6 las hembras gonadectomizadas tienen un incremento en su proliferación celular.

## VI. DISCUSIÓN

### A. Lesión

Se ha encontrado que las hormonas influyen sobre la función de las células del sistema inmune, como por ejemplo los eosinófilos, macrófagos, células dendríticas y células NK (Craig, *et al.* 2001) y se ha encontrado que en algunas enfermedades hay susceptibilidad variable, dependiendo del fondo genético. En la leishmaniasis, se ha observado que el hombre



adquiere leishmaniasis cutánea o visceral más frecuentemente que las mujeres (Magill, 1995). Esta observación se ha podido reproducir en modelos animales. En ratones DBA/2 y BALB/c se encontró que las hembras, al contrario de los machos, no desarrollan lesiones al ser inoculados en forma subcutánea con *L. mexicana*. (Alexander, 1988). Al realizar un reemplazo hormonal usando ratones gonadectomizados e implantes subcutáneos de estrógenos o testosterona, se demostró que la resistencia de ratones DBA/2 a *L. mexicana* es estrógeno dependiente (Alexander, *et al.* 1988). La presencia de estrógenos se asocia con un incremento en la expresión de IFN- $\gamma$  en hembras DBA/2 (Satoskar, 1995,1998). IFN- $\gamma$  induce la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-12, y su modulación por los estrógenos ocurre mediante la regulación del gen *Scl-2* en la región del cromosoma 4 de la cepa DBA/2, que es homóloga a la región de Janus tyrosine kinases 1 y 2 (Jak1 y Jak2 kinasas) en humanos (Roberts, *et al.* 1990). Estas kinasas fosforilan a STAT1, que se inserta en el gen promotor. Este efecto posiblemente esté mediado por receptores intracelulares a estrógenos, como los receptores de estrógeno ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Lambert, *et al.* 2004).

Hasta la fecha no hay reportes del efecto que ejercen hormonas sexuales masculinas y femeninas sobre receptores de células del sistema inmune innato estimuladas con moléculas de *Leishmania*. En el presente estudio se analizó el papel del género en la producción de citocinas y en la expresión de TLR-2 de macrófagos estimulados con LPG de *Leishmania mexicana*. Se analizó este efecto en macrófagos de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis.

Inicialmente logramos reproducir los modelos reportados en la literatura, encontrando que los machos BALB/c, normales y gonadectomizados, son más susceptibles a la leishmaniasis que las hembras BALB/c, y que la gonadectomía de las hembras las hace más susceptibles. Hasta la fecha no existen reportes acerca del papel del género en la resistencia de ratones C57BL/6. Nuestros datos revelaron que las hembras de ratones C57BL/6 son más susceptibles a la infección que los machos y al gonadectomizarlas, su susceptibilidad disminuye. Este es el primer reporte sobre la incrementada susceptibilidad de la hembra C57BL/6 sobre el macho, lo cual es contrario a lo establecido en otras cepas de ratón, como es el DBA/2 y BALB/c, en los cuales el macho es más susceptible. En resumen, en este trabajo observamos que hay diferencias en el tamaño de las lesiones dependientes del fondo genético de los ratones, ya que por lo general las lesiones de los ratones susceptibles BALB/c son mayores que las de los ratones C57BL/6, que son resistentes a la leishmaniasis. Adicionalmente encontramos que además del fondo genético, el género femenino participa de manera determinante en la evolución del padecimiento. Por un lado las hembras BALB/c son significativamente más

resistentes que los machos BALB/c y por otro lado las hembras C57BL/6 son significativamente más susceptibles que los machos C57BL/6. Ambos fenómenos son abolidos con la gonadectomía de las hembras, lo cual revela que hormonas sexuales femeninas ejercen efectos sobre la resistencia o susceptibilidad, dependiendo del fondo genético del ratón. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que participan en el desarrollo de la enfermedad.

Una manera mediante la cual las hormonas sexuales podrían estar interviniendo en el desarrollo de la lesión es mediante la modulación de la producción del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). MIF induce un incremento en la inflamación y la infiltración de células proinflamatorias. En ratones BALB/c se ha reportado que los estrógenos modulan la curación de lesiones cutáneas al inhibir de manera local la expresión de MIF (Ashcroft, *et al* 2003) y este fenómeno es reversible al gonadectomizar a las hembras. Lo anterior concuerda con los datos obtenidos en este trabajo, ya que las hembras BALB/c presentaron menor tamaño de lesión que las hembras BALB/c gonadectomizadas.

En el caso de las hembras C57BL/6, aun se desconocen los factores responsables de la susceptibilidad. En el presente trabajo analizamos citocinas y receptores TLR-2 en macrófagos de ratones de distinto fondo genético y género, para analizar si estos factores influyen la inmunomodulación ejercida por LPG de *Leishmania*.

## **B. Citocinas**

El análisis de la citocina TNF- $\alpha$  reveló que la producción basal por macrófagos de machos BALB/c y C57BL/6 es significativamente mayor que la de las hembras de ambas cepas. Sin embargo, las hembras de ambas cepas responden más intensamente al estímulo con LPG, incrementando su producción de TNF- $\alpha$  a niveles significativamente mayores que los machos de ambas cepas. Dado que las hembras de ambas cepas de ratón produjeron la misma cantidad de esta citocina, pensamos que TNF- $\alpha$  posiblemente no participe en la resistencia a la leishmaniasis, ya que las hembras C57BL/6 son más susceptible a la leishmaniasis que las hembras BALB/c a pesar de que ambas producen la misma cantidad de TNF- $\alpha$ . Llama la atención que en la cepa C57BL/6, las hormonas sexuales femeninas aparentemente inhiben la producción de TNF- $\alpha$  en mayor grado que en ratones BALB/c, ya que la gonadectomía incrementó la producción de esta citocina significativamente más en hembras C57BL/6 que en hembras BALB/c. Al gonadectomizar a la hembras C57BL/6, el efecto inhibitorio es eliminado y los niveles de TNF- $\alpha$  incrementan mucho, induciendo un efecto protector ya que hembras C57BL/6 gonadectomizadas presentaban lesiones significativamente menores que

las hembras BALB/c gonadectomizadas. Aparentemente los niveles incrementados de TNF- $\alpha$  en hembras C57BL/6 gonadectomizadas se asocian con la protección de estos animales. En resumen, hormonas sexuales femeninas inhiben la producción de TNF- $\alpha$  por macrófagos, y esta inhibición es mas intensa en hembras C57BL/6 y posiblemente sea la causa de la susceptibilidad aumentada a la leishmaniasis. La gonadectomía elimina a las hormonas sexuales, incrementa la producción de TNF- $\alpha$  y reduce la susceptibilidad del ratón a la leishmaniasis.

A diferencia de esto, el análisis de IL-12 p40 reveló que esta citocina es inducida por hormonas sexuales femeninas en ratones con fondo genético BALB/c. Es inhibida por testosterona, ya que la gonadectomía de los machos incrementó la producción de IL-12 p40. La producción de IL-12 p40 parece correlacionarse con la resistencia a la leishmaniasis observada en hembras BALB/c y machos C57BL/6.

Por otro lado, la incrementada producción de IL-10 por macrófagos de las hembras C57BL/6 se correlaciona con su susceptibilidad a la leishmaniasis, ya que tienen significativamente mayor producción que las hembras BALB/c, aunado a lesiones de mayor tamaño. Aparentemente en hembras C57BL/6 las hormonas sexuales femeninas estimulan la producción de IL-10 ya que la gonadectomía de las hembras C57BL/6 reduce la producción de IL-10 y adicionalmente reduce el tamaño de las lesiones.

### C. TLR-2

El análisis de TLR-2 reveló que aparentemente hormonas sexuales femeninas inducen la expresión de TLR-2 en hembras BALB/c, ya que la gonadectomía de las hembras inhibe su expresión. Por otro lado, la testosterona inhibe la expresión de TLR-2 y la gonadectomía de los machos estimula su expresión, igualándola a la de las hembras. En resumen, aparentemente las hormonas sexuales femeninas inducen la expresión de TLR-2 en ratones hembras BALB/c, lo cual se correlaciona con su resistencia mientras que testosterona inhibe la expresión de TLR-2, lo cual se correlaciona directamente con la susceptibilidad de los machos BALB/c a la leishmaniasis. Será interesante analizar estos receptores en la cepa resistente C57BL/6.

Receptores de reconocimiento de patrones moleculares, como los receptores tipo Toll (TLRs) en vertebrados, están íntimamente relacionados en la mediación de la respuesta inmune innata del hospedero (Klein, *et al.* 2004). También se relacionan con la infección y sirven como un puente entre la inmunidad innata y la adquirida. Hasta la fecha no existen reportes sobre la expresión de TLR-2 en ambos géneros así como el efecto que ejerce el género sobre la

expresión. Se ha postulado su posible influencia de la respuesta dimórfica observada en esta infección (Klein, *et al.* 2004).

En este estudio se observó que la estimulación de TLR-2 con LPG incrementa su expresión, lo cual concuerda con datos reportados en la literatura (Becker, *et al.* 2003). Sin embargo, el presente trabajo permitió ampliar los conocimientos en este campo, ya que encontramos que hormonas sexuales femeninas participan en la inducción de la expresión. Adicionalmente encontramos que la expresión incrementada de TLR-2 en hembras BALB/c se correlaciona con la mayor producción de IL-12p40 y una mayor resistencia a la infección por *Leishmania*. Se ha descrito que la activación de TLR-2 desencadena una cascada de señalización que provoca la fosforilación de factores de transcripción como NFκ-B lo cual promueve la transcripción de citocinas proinflamatorias. Sería importante analizar si las diferencias en la expresión de TLR-2 asociada a las hormonas sexuales también se asocian a alteraciones en la vía de señalización. Todo parece indicar que los estrógenos son el factor determinante en la modulación de la expresión de TLR-2. Interesantemente, en los machos gonadectomizados la expresión de TLR-2 aumenta con respecto a machos normales y esto correlaciona con un incremento en la producción de IL-12p40 y con una mayor resistencia a la infección.

#### **D. Linfoproliferación**

En este trabajo, adicionalmente se analizó la proliferación de esplenocitos para ver si el género determinaba las características proliferativas de esplenocitos, así como la existencia de alguna relación entre la proliferación de esplenocitos y el desarrollo de la infección.

Se ha sugerido que las hormonas esteroides sexuales juegan un papel importante en la respuesta inmune regulando la proliferación y/o activación linfocitaria a través de receptores nucleares, lo que depende del tipo, el número de receptores expresados y la estabilidad de su unión al ligando (Johnson, *et al.* 1997, Verthelyi, 2001).

Nuestros resultados mostraron que en la cepa BALB/c, la proliferación de esplenocitos fue mayor en machos que en hembras al ser estimulados con un estímulo específico. En el caso de C57BL/6 no se observa una respuesta diferenciada entre hembras y machos. La linfoproliferación inducida por LPG posiblemente esté asociada con las células CD4+ NKT, que pueden reconocer glicolípidos presentados por moléculas CD1 a través de sus receptores Tγδ. Se ha observado que las células NKT son esenciales para la protección contra la infección a *L. major* en ratones genéticamente resistentes DBA/2 y C57BL/6 (Ishikawa, *et al.* 2000). Las moléculas CD1d son las únicas moléculas en ratón descritas hasta el momento capaces de presentar lípidos (Amprey, *et al.* 2004). Estas moléculas se encuentran en células

dendríticas y en menor medida en macrófagos y células B (Park y Bendelac 2000). Existen reportes del reconocimiento por parte de las moléculas CD1d de LPG de *Leishmania donovani* en hígado de ratón de hembras BALB/c y C57BL/6 (Amprey, *et al.* 2004). La activación de las células NKT inducen la producción de IFN- $\gamma$ , esto produciría una respuesta antileishmania de tipo Th1 en las cepas infectadas (Amprey, *et al.* 2004). Esto concuerda con los resultados obtenidos en la cepa C57BL/6, ya que presenta altos niveles de proliferación celular, que posiblemente son células NKT. En BALB/c se sabe que las células NKT inducen el progreso de la infección, al menos en *L. major* mediante la secreción de IL-4, lo que induciría una respuesta Th2 (Ishikawa, *et al.* 2000). En nuestro estudio la proliferación celular fue mayor en machos, los cuales fueron más susceptibles. Queda por explorarse si la linfoproliferación observada en machos BALB/c está asociada con una mayor secreción de IL-4.

Otra característica importante de las células NKT es la producción de la proteína Heat-Shock de 65 kDa (HSP65), cuya mayor expresión es esencial para la resistencia de las cepas DBA/2 y C57BL/6 (Ishikawa, *et al.* 2000). Se sabe que varias proteínas Heat-Shock pueden inducir la activación de TLR-2 (Akira, 2003). En BALB/c esta proteína se expresa a bajos niveles. En macrófagos esta proteína es esencial para iniciar una inmunidad protectora contra patógenos intracelulares como *L. major* previniendo la apoptosis de los macrófagos infectados (Ishikawa, *et al.* 2000). Esto también podría ser un factor modulador en la respuesta a la infección.

Con los datos obtenidos en este trabajo podemos llegar a las siguientes conclusiones:

## VII. CONCLUSIONES

- Dependiendo del fondo genético del hospedero, los estrógenos pueden ejercer un efecto estimulante (BALB/c) o inhibitorio (C57BL/6) sobre células del sistema inmune innato, modificando la evolución clínica de ratones infectados con *Leishmania mexicana*.
- La testosterona no modifica la evolución clínica en machos de ambas cepas de ratón (BALB/c y C57BL/6).
- La resistencia significativa de las hembras BALB/c a la infección por *L. mexicana* se asocia con un incremento significativo en la producción de IL-12p40 y TLR2 por sus macrófagos.
- La susceptibilidad significativa de hembras C57BL/6 a la infección por *L. mexicana* se asocia con un incremento de IL-10 y disminución de IL-12p40 por sus macrófagos.
- La resistencia de hembras C57BL/6 gonadectomizadas se asocia con un incremento significativo de TNF- $\alpha$  y disminución de IL-10.
- La linfoproliferación de esplenocitos inducida por LPG posiblemente corresponda a células NKT, que reconocen a glicolípidos presentados por moléculas CD1, y que pueden producir tanto citocinas Th1 como Th2.
- Las hormonas sexuales femeninas posiblemente modulen a las células NKT de manera distinta, dependiendo del fondo genético.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Akira, S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinión in Immunology* 15:5-11.
- Alexander, J. 1988. Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. *Parasitology* 96:297-302.
- Alexander, J. y W. H. Stimson. 1988. Sex Hormones and the Course of Parasitic Infection. *Parasitology Today*. Vol. 4 No. 7 pp.189-193.
- Amprey, J.L. *et al.* 2004. A Subset of Liver NK T Cells Is Activated during *Leishmania donovani* Infection by CD1d-bound Lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* Vol. 200 No. 7 895-904.
- Arbibe, L. *et al.* 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF- $\kappa$ B activation requires a Rac-1-dependent pathway. *Nature Immunol.* 1, 533-40.
- Armijos R.X. *et al.* 1997. The epidemiology of cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador. *Trop Med Int Health.* Feb;2 (2):140-52.
- Ashcroft, G.S. *et al.* 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J. Clin. Inv.* Vol. 111 No. 9 pp. 1309-1318.
- Becker, I. *et al.* 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Bioch. Parasitol.* 130, 1-10.
- Bell, J. *et al.* 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24, 528-33.
- Benten W.P. *et al.* 1997. Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* Apr 28;407 (2):211-4.
- Benten, W.P. *et al.* 1999. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell.* Oct;10 (10):3113-23.
- Benten, W.P. *et al.* 2004. Rapid effects of androgens in macrophages. *Steroids.* 69(8-9):585-590.
- Colmenares, M. *et al.* 2003. Perforin and Gamma Interferon Are Critical CD8<sup>+</sup> T-Cell-Mediated Responses in Vaccine-Induced Immunity against *Leishmania amazonensis* Infection. *Inf. and Imm* Vol. 71 No. 6 p.3172-3182.
- Cox F.E. y Liew F.Y. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today.* 1992 Nov;13(11):445-8.
- Craig, W.R. *et al.* 2001. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin. Microbiology Rev.* Vol. 14 No. 3 p.476-488.
- Ferguson, M. 1999. The structure, biogenesis and functions of glucosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell. Sci.* 112 pp. 2799–2809.

- Grevelink, S. y Lerner, E. 1996.** Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34, 257-72.
- Gulshan et al. 1990.** Oestrogen receptors in macrophages. *Scand J Immunol.* Jun; 31 (6): 691-7.
- Hiroyuki Ishikawa. et al. 2000.** CD4<sup>+</sup> V $\alpha$ 14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int. Imm.* Vol. 12 No. 9 pp. 1267-1274.
- Johnson RW. et al. 1997.** Hormones, lymphohemopoietic cytokines and the neuroimmune axis. *Comparative Biochem Phys.* 3: 183-201.
- Jones, T.C. et al. 1987.** Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis.* Jul;156(1):73-83.
- Klein, S.L. 2004.** Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* (26) 247-264.
- Krishnan, L. et al. 1996.** Pregnancy impairs resistance of C57Bl/6 mice to *Leishmania major* infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *J. Immunol.* 156:644-652.
- Lambert KC. et al. 2004.** Estrogen receptor- $\alpha$  deficiency promotes increased TNF- $\alpha$  secretion and bacterial killing by murine macrophages in response to microbial stimuli in vitro. *J. Leukocyte Biology* Vol. 75 pp.1166-1172.
- Lemaitre, B. 2004.** The road to Toll. *Nature Immunol. Rev.* 4, 521-27.
- Lezama, D.C. e Isaac, M.A. 1995.** Inmunobiología de las leishmaniosis. Universidad Autónoma de Campeche. México. 115 pp.
- Magill, A.J. 1995.** Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol Clin.* Jul;13(3):505-23. Review.
- Park, Se-Ho y Bendelac A. 2000.** CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature.* Vol. 406 pp.788-792.
- Reiner, S.L. et al. 1994.** *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4<sup>+</sup> T cells during initiation of infection. *J Exp Med.* Feb 1;179(2):447-56.
- Roberts, C.W. et al. 1990.** Genetic análisis of *Leishmania mexicana* infection in mice: single gene (Scl-2) controlled predisposition to cutaneous lesion development. *J. Immunogenet.* 17:89-100.
- Rossi-Bergmann et al. 1993.** TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. *Infect Immun.* May;61(5):2266-9.
- Sacks, D. y Noben-Trauth N. 2002.** The Immunology of Susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature rev.* Vol. 2 p.845-858.



**Salem, M.L. 2004.** Estrogen, a double-edged sword: modulation of TH1- and TH2-mediated inflammations by differential regulation of TH1/TH2 cytokine production. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* Mar;3 (1):97-104. Review.

**Satoskar, A. et al. 1998.** Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a TH1-like response and IFN-gamma production by female but not male DBA/2 mice. *Immunol. Cell Biol.* 76:159-166.

**Satoskar, A. y Alexander, J.1995.** Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma production and TNF-alpha mRNA expresión in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology* 84:1-4.

**Scott, P. 1991.** IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* Nov 1;147(9):3149-55.

**Solbach, W. y Laskay, T. 2000.** The Host Response to *Leishmania* Infection. *Advances in Immunology* Vol.74 pp.275-317.

**Travi, B.L. et al. 2002.** Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with *Leishmania* spp. *Infection and Immunity* Vol. 70 No. 5. p. 2288-2296.

**Unanue, E.R. y Allen, P.M. 1987.** The immunoregulatory role of the macrophage. *Hosp Pract* Apr 15;22(4):87-98, 102-4.

**Velasco, O. 1994.** La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de cuadernos del INDRE. SSA. México. pp. 1-28.

**Verthelyi, D. 2001.** Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int. Immunopharmacol* 1: 983-993.

**Warburg, A. y Schlein, Y. 1986.** The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Sep;35(5):926-30.

**Wunderlich, F. et al. 2002.** Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids* (67) 535-538.

**Yamamoto, M. 2003.** TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* 40, 861-68.

**Zhang, H. et al. 2001.** Effect of testosterone on *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res* 87: 674-676.