



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO DEL BIOSTIM EN LAS CÉLULAS
T- $\gamma\delta$ EN LA LEISHMANIASIS MURINA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

BEATRÍZ RUÍZ GARCÍA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTORA:
DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Ruíz
Apellido materno: García
Nombre(s): Beatríz
Teléfono: 57 77 59 86
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
No. de cuenta: 300253016

2. Datos del tutor

Grado: Dra.
Nombre(s): Ingeborg Dorothea
Apellido paterno: Becker
Apellido materno: Fauser

3. Datos del sinodal 1

Grado: M. en C.
Nombre(s): Isabel Cristina
Apellido paterno: Cañeda
Apellido materno: Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Grado: M. en C.
Nombre(s): José Sotero
Apellido paterno: Delgado
Apellido materno: Domínguez

5. Datos del sinodal 3

Grado: Dra.
Nombre(s): Laila
Apellido paterno: Gutiérrez
Apellido materno: Kobeh

6. Datos del sinodal 4

Grado: Dra.
Nombre(s): Ana María
Apellido paterno: Fernández
Apellido materno: Presas

7. Datos del trabajo escrito

Título: Efecto del Biostim en las células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis murina.
No. de páginas: 69
Año: 2009

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México, bajo la asesoría de la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser y la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

Este trabajo fue apoyado por los donativos: CONACYT: 45052-M y DGAPA: IN221806-3 y IN220109

DEDICATORIAS

A mis padres ya que con su apoyo, comprensión, esfuerzo, cariño, confianza y sacrificio hicieron este trabajo posible y por lo cual les viviré eternamente agradecida
.....LOS AMO.

A mi hermana por su compañía y espontaneidad lo cual la hace única. Nunca cambies enana y espero que dicho trabajo te sirva de motivación. Te quiero mil.

A mi novio Armando por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por su comprensión, cariño, confianza, respeto y apoyo..... Te amo mucho Bebé!!

A mis primas Gaby y Carol y a mi tía Silvia por sus consejos, compañía y cariño.

A mi tía Cristi y a mis abues que donde quiera que estén sé que estarían orgullosos de mí. Los quiero mucho y los llevo en mi corazón.

A mis tíos Fer, Elena, Hilda, Héctor, Clara, Elías, Rufí, Ramón y primos Güero, Teo, Ricardo, Rober y Luis; por los momentos que han compartido conmigo los cuales han sido geniales e inolvidables.

A la Sra. Isabel y al Sr. Manolo por sus consejos y apoyo los cuales me han servido de mucho.

A mi mejor amiga Bren por que siempre ha estado conmigo. Te quiero mucho y eres una amiga irremplazable.

A mi amigo Ivar que a pesar de no vernos con frecuencia, nuestra amistad no se ha perdido. Gracias por los momentos tan padres en la prepa.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán por su amistad, apoyo, consejos, dedicación y conocimientos, los cuales fueron de gran ayuda para la culminación de este trabajo. MIL GRACIAS!!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y especialmente a la Facultad de Ciencias por brindarme la oportunidad de estudiar una carrera tan maravillosa.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de mi tesis además de su tiempo invertido en dicho trabajo.

Al Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez del Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán” por la donación del Biostim.

A la M. en C. Adriana Ruíz Remigio por su apoyo en las técnicas de ELISA a lo largo de este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Ingeborg Becker, M. en C. Cristina Cañeda, M. en C. José Sotero Delgado, Dra. Laila Gutiérrez y a la Dra. Ana María Fernández por su dedicación, consejos y apoyo para la culminación de este trabajo.

A Erika por estar conmigo en todo este trabajo, sus risas, compañía, amistad y por los momentos en la Facultad de Ciencias y en el laboratorio.

A las personas que me brindaron su apoyo, confianza, amistad incondicional y las cuales me hicieron parte de un gran equipo. Emma, Cari, Berna y Gel de los cuales aprendí muchísimo estando en el Área de Difusión y Educación Ambiental de la CONAGUA.

A Daniela por su imagen del ciclo de vida, la cual incorporo en dicho trabajo al igual que la amistad brindada en todo este tiempo.

A mis amigos Ivan, Miguel, Juanillo, Leonardo, Gaby, Edher, Nancy y Jacky por su amistad, consejos, ánimos y por los momentos divertidos.

A todas las personas que integran el laboratorio de Inmunoparasitología de Medicina Experimental por su apoyo y enseñanzas.

A los encargados del Bioterio (Sr. Ricardo y Daniel) por su amistad, apoyo y cuidado de los ratones empleados en el experimento.

ÍNDICE

	Páginas
Resumen -----	V
1. INTRODUCCIÓN -----	1
1.1 La leishmaniasis -----	1
1.2 Formas clínicas de la leishmaniasis -----	3
1.2.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) -----	3
1.2.2 Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD) -----	3
1.2.3 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) -----	4
1.2.4 Leishmaniasis Visceral (LV) -----	4
1.3 El modelo murino en la leishmaniasis -----	6
1.4 Morfología de <i>Leishmania</i> -----	9
1.5 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> -----	11
1.6 Respuesta inmune a <i>Leishmania</i> -----	13
1.7 Las células T- $\gamma\delta$ -----	16
2. ANTECEDENTES -----	24
2.1 Inmunomoduladores en la leishmaniasis -----	24
2.2 Estudios realizados de células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis -----	26
3. HIPÓTESIS -----	29
4. OBJETIVOS -----	29
4.1 Objetivo general -----	29
4.2 Objetivos específicos -----	29

5. MATERIAL Y MÉTODOS -----	30
5.1 Animales -----	30
5.2 Cultivo de parásitos (<i>Leishmania mexicana</i>) -----	31
5.3 Tratamiento con el BIOSTIM (RU41740) -----	32
5.4 Medición del cojinete plantar -----	32
5.5 Obtención de células T- $\gamma\delta$ en bazo y timo -----	32
5.5.1 Obtención de células peritoneales -----	33
5.6 Cultivo de células peritoneales <i>in vitro</i> -----	33
5.7 Cuantificación de células T- $\gamma\delta$ por citometría de flujo -----	33
5.8 Determinación de la producción de IL-10 en células peritoneales por la Técnica de ELISA tipo sándwich -----	34
5.9 Análisis estadístico -----	35
6. RESULTADOS -----	36
6.1 Incremento del cojinete plantar en tres cepas de ratón (BALB/c, C57BL/6 Y C3HeB/FeJ) después de tres meses de infección con <i>Leishmania mexicana</i> -----	36
6.2 Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ -	37
6.3 Evaluación del efecto del Biostim sobre ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania mexicana</i> -----	40
6.4 Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo y bazo de ratones BALB/c tratados y no tratados con el Biostim -----	44
6.5 Producción de IL-10 por células peritoneales estimuladas <i>in vitro</i> con Biostim obtenidas de ratones BALB/c tratados previamente con el Biostim -----	47
6.6 Producción de IL-10 por células peritoneales y bazo de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ estimuladas <i>in vitro</i> con Biostim -----	48
7. DISCUSIÓN -----	50

8. CONCLUSIONES -----	56
9. BIBLIOGRAFÍA -----	57
APÉNDICE -----	64
Abreviaturas -----	68

LISTA DE FIGURAS

1. Formas clínicas de la leishmaniasis -----	5
2. <i>Lutzomyia spp.</i> -----	10
3. Macrófago infectado con amastigotes de <i>Leishmania spp.</i> -----	10
4. Promastigote de <i>Leishmania spp.</i> -----	10
5. Desarrollo de <i>Leishmania spp.</i> en la <i>Lutzomyia</i> -----	12
6. Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania spp.</i> -----	12
7. Célula T- $\gamma\delta$ con sus receptores y proteínas de superficie -----	18
8. Desarrollo de las poblaciones de células T- $\gamma\delta$, inducción funcional en la periferia y la participación en las diversas respuestas del Sistema Inmune Innato -----	22
9. Incremento del grosor del cojinete plantar en diferentes cepas de ratón --	37
10. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en diferentes órganos y cepas de ratón -----	39
11. Desarrollo de la lesión en ratones BALB/c infectados con <i>Leishmania mexicana</i> antes, durante y después del tratamiento con Biostim -----	40
12. Cojinete plantar de ratones BALB/c -----	41
13. Relación entre grosor del cojinete plantar y peso de la pata en ratones BALB/c -----	42
14. Cojinete plantar de ratones BALB/c a las 24 semanas de infección con un millón de Promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y diferentes dosis de Biostim -----	43
15. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo de ratones BALB/c con y sin tratamiento de Biostim -----	45

16. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en bazo de ratones BALB/c con y sin tratamiento de Biostim -----	46
17. Producción de IL-10 por células peritoneales de ratones BALB/c infectados y tratados con Biostim <i>in vitro</i> -----	47
18. Producción de IL-10 por células peritoneales y de bazo obtenidas de tres cepas de ratón y estimuladas <i>in vitro</i> con Biostim -----	49

LISTA DE CUADROS

1. Especies de <i>Leishmania</i> que causan enfermedades en humanos -----	2
2. Patrón de la enfermedad en cepas de ratones infectados con diferentes especies de <i>Leishmania</i> -----	8
3. Distribución de las células T- $\gamma\delta$ (% de linfocitos en cada órgano) -----	16
4. Expresión de células T- $\gamma\delta$ en humanos o en el modelo murino infectados con <i>Leishmania</i> -----	28
5. Grupos experimentales y su tratamiento con Biostim -----	31

RESUMEN

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por varias especies de *Leishmania* que presenta múltiples manifestaciones clínicas en el humano. En México, *Leishmania mexicana* es el agente causal de la leishmaniasis cutánea. Los antimoniales pentavalentes son algunos de los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, éstos son costosos y pueden tener efectos secundarios. Con el fin de encontrar alternativas terapéuticas para esta enfermedad, en el presente trabajo se analizó el efecto del Biostim tanto *in vivo* como *in vitro* en tres cepas de ratones (BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ) infectados con *Leishmania mexicana*. Pero no se conoce el papel de las células T- $\gamma\delta$ y la infección con *Leishmania mexicana* junto con el Biostim, por lo que se midió el cojinete plantar y se cuantificaron las células T- $\gamma\delta$ de timo y bazo por citometría de flujo así como la producción de IL-10 en células peritoneales por medio de ELISA.

En este trabajo observamos que el tamaño de la lesión en ratones infectados con *Leishmania mexicana* varía dependiendo de la cepa de ratón siendo más evidente en la cepa BALB/c; sin embargo estos ratones al ser tratados vía oral con Biostim presentaron una disminución en el peso y en el tamaño de la lesión. Por otra parte, el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ varió dependiendo del órgano (timo y bazo) así como de la cepa de ratón. En los ratones BALB/c tratados a diferentes dosis de Biostim el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ disminuyó. Finalmente, observamos que el Biostim incrementó la producción de IL-10 en todas las cepas de ratones tanto en sanos como infectados con *Leishmania*. Las células peritoneales de ratones BALB/c tratados con 10 μ g/ml de Biostim *in vitro*

incrementaron de dos a cuatro veces la producción de IL-10 con respecto al basal. La mayor producción de IL-10 se presentó en los ratones tratados con 0.3mg/ml y 0.6mg/ml

de Biostim. Por lo tanto, en este trabajo se demostró que el Biostim favorece la protección contra la infección por *Leishmania mexicana*, y que dicha protección se asocia con una reducción en células T- $\gamma\delta$ y con un incremento en IL-10. Estos resultados sugieren que el Biostim puede ser una alternativa terapéutica para el control de la leishmaniasis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad con varias manifestaciones clínicas causadas por varias especies de parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania* que afectan a la piel y vísceras del hombre y de animales vertebrados. Estos parásitos son transmitidos por la picadura de un mosquito hembra perteneciente a los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (Velasco, 1994; Alexander *et al.*, 1999). En el cuadro 1 se muestran las diferentes especies de *Leishmania*, así como las formas clínicas, el ciclo de transmisión y su distribución geográfica (Reithinger *et al.*, 2007).

Esta enfermedad tiene mayor prevalencia en el Sur de Europa, Asia Occidental, Medio Oriente y África (Herwaldt, 1999). En el Continente Americano se presenta en México, Centroamérica y Sudamérica (Rey, 2007) (Cuadro 1). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay aproximadamente 1.5 a 2 millones de nuevos casos y 70 000 muertes cada año. Adicionalmente 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (Reithinger *et al.*, 2007). En la actualidad cerca de 12 millones de personas están infectadas mundialmente en países tropicales y subtropicales (Tripathi *et al.*, 2007).

Cuadro 1: Especies de *Leishmania* que causan enfermedades en humanos

Especies	Patología Clínica	Ciclo de Transmisión	Distribución Geográfica
Nuevo Mundo			
<i>L (Viannia) braziliensis</i>	LCL, LMC	Zoonótica	América del Sur, partes de América Central, México
<i>L (Viannia) panamensis</i>	LCL, LMC	Zoonótica	Norte y Sur de América y el Sur de América Central
<i>L (Viannia) peruviana</i>	LCL	Zoonótica	Perú
<i>L (Viannia) guyanensis</i>	LCL	Zoonótica	América del Sur
<i>L (Viannia) lainsoni</i>	LCL	Zoonótica	América del Sur
<i>L (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Zoonótica	Sudamérica
<i>L (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	Zoonótica	América del Sur
<i>L (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	Zoonótica	América Central, México y Estados Unidos
<i>L (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	Zoonótica	América del Sur
<i>L (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Zoonótica	Sudamérica
Viejo Mundo			
<i>L (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, LCD	Zoonótica	Etiopía, Kenia
<i>L (Leishmania) killicki</i>	LCL	Zoonótica	Norte de África
<i>L (Leishmania) major</i>	LCL	Zoonótica	Asia Central, Norte de África, Medio Oriente y África Oriental
<i>L (Leishmania) tropica</i>	LCL	Antroponótica	Asia Central, Medio Oriente partes del Norte de África y Sudeste de Asia
<i>L (Leishmania) donovani</i>	LV, LCL	Antroponótica	África, Asia Central y Sudeste de Asia
<i>L (Leishmania) infantum</i>	LV, LCL	Zoonótica	Europa, Norte de África, América Central, América del Sur
<p>LCL= Leishmaniasis Cutánea Localizada. LCD= Leishmaniasis Cutánea Diseminada. LMC= Leishmaniasis Mucocutánea. LV= Leishmaniasis Visceral. El subgénero se indica en paréntesis. Sudeste de Asia incluye al subcontinente de la India y China Zoonótica: la infección se transmite de animales a humanos. Antroponótica: la infección se transmite de humano a humano.</p>			

Tomado de: Reithinger *et al.*, 2007.

1.2 Formas clínicas de la leishmaniasis

La leishmaniasis presenta un espectro de formas clínicas, que van desde lesiones ulcerativas, múltiples nódulos no ulcerativos, inflamación destructiva de las mucosas hasta la infección en vísceras (Fig.1) (Handman y Bullen, 2002; Reithinger *et al.*, 2007). Estas formas clínicas dependen de la especie de *Leishmania* así como de la respuesta inmune y genética del individuo (Alexander *et al.*, 1999).

1.2.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL). En México se conoce como úlcera de los chicleros. La LCL es causada principalmente por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Cuadro 1). El primer signo de la infección es un eritema pequeño indoloro en el sitio de la picadura del vector infectado que después se desarrolla en un nódulo que evoluciona a la forma clínica característica de la enfermedad, la ulceración. Esta ulceración es generalmente redonda e indolora que aparece aproximadamente de 15 a 20 días después de la picadura. Este tipo de infección tiende a la curación espontánea, de 6 meses a 2 años, excepto cuando se localiza en el pabellón auricular donde la enfermedad es crónica y mutilante (Fig.1A) (Andrade *et al.*, 2005; Velasco, 1994; Reithinger *et al.*, 2007).

1.2.2 Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD) o leishmaniasis leproide es causada principalmente por *L. aethiopica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*. La infección se inicia habitualmente por un nódulo que no se ulcera y se disemina del sitio inicial de infección de forma muy lenta por vía linfática, originando múltiples nódulos que pueden llegar a cubrir el cuerpo entero del paciente excepto palmas de las manos, plantas de los pies y cuero cabelludo. La gran

mayoría de pacientes con LCD son resistentes a los antimoniales, por lo cual esta enfermedad es difícil de tratar (Fig.1B) (Velasco, 1994; Reithinger *et al.*, 2007).

1.2.3 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) o espundia es causada principalmente por *L. braziliensis*; aunque se ha registrado otras especies como *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* y *L. infantum* (Reithinger *et al.*, 2007). Esta enfermedad se caracteriza por la capacidad del parásito de producir metástasis a tejidos mucosos por vía linfática. Típicamente comienza con una inflamación nasal, seguido de una ulceración de mucosa nasal y la perforación del tabique. En algunos casos, los labios, mejillas, el paladar, la faringe, o la laringe también están implicados. La LMC es muy difícil de tratar con infecciones bacterianas secundarias, y es potencialmente fatal (Fig.1C)(Velasco, 1994; Reithinger *et al.*, 2007).

1.2.4 Leishmaniasis Visceral (LV) o Kala-azar es causada por las especies *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum*. Esta última especie infecta en su mayoría a niños y a individuos inmunosuprimidos, mientras que *L. donovani* infecta a todos los grupos de edad (François *et al.*, 2007). Los pacientes con este cuadro clínico presentan fiebre, hepatoesplenomegalia y pancitopenia. No se cura espontáneamente y lleva a la muerte si no se trata adecuadamente en la mayoría de los pacientes (Fig.1D) (Velasco, 1994; Rosenthal y Marty, 2003).

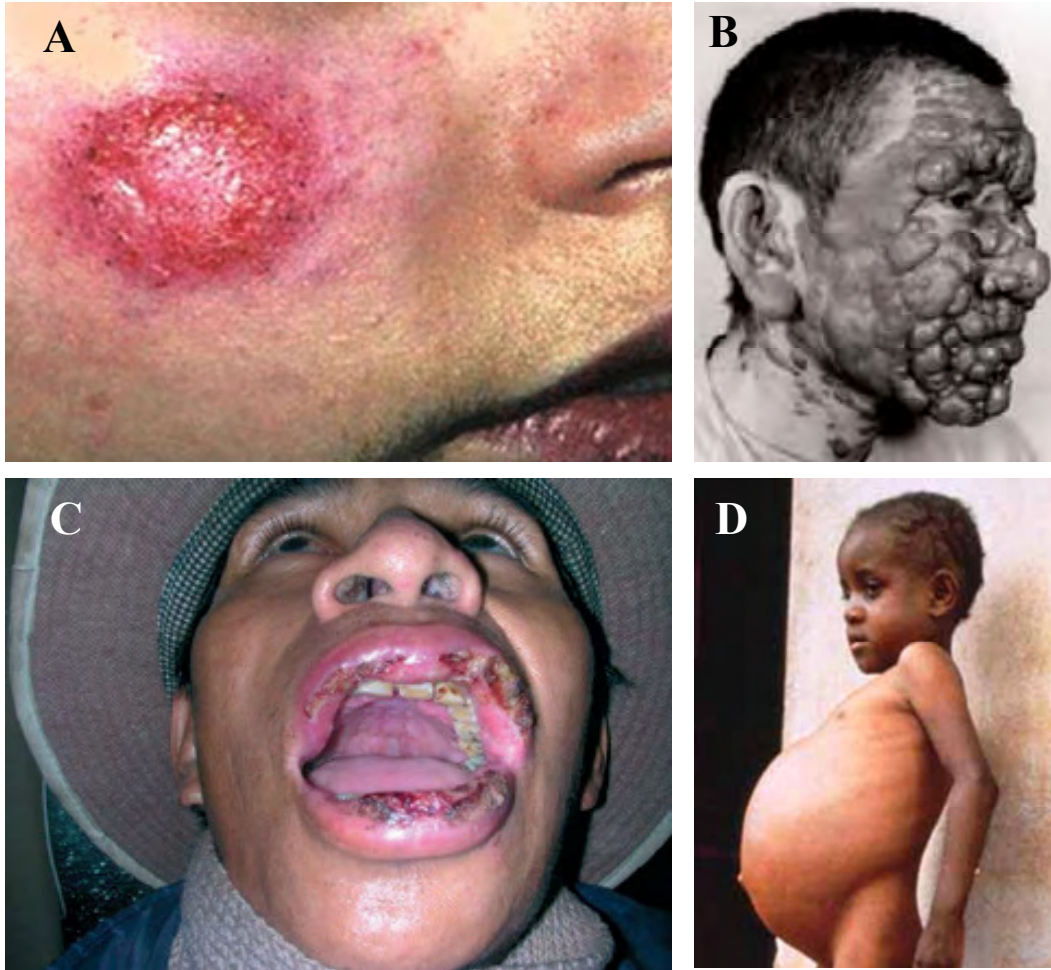


Fig.1 Formas clínicas de la leishmaniasis. **A:** Úlcera en paciente con LCL (Tomado de: www.nature.com/.../fig_tab/ncpneph0255_F4.html). **B:** Paciente con LCD (Tomado de: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2036/paginas/materia%2010-36.html>). **C:** Paciente de Bolivia con Leishmaniasis mucosal (Tomado de: Chappuis *et al.*, 2007). **D:** Leishmaniasis Visceral (Tomado de: <http://www.wehi.edu.a/facweb/indexresearch.php?id=12>).

1.3 El modelo murino en la leishmaniasis

El modelo murino puede representar algunas formas clínicas semejantes al humano (como Leishmaniasis Cutánea Localizada y Leishmaniasis Cutánea Diseminada); aunque dependiendo de la especie de *Leishmania*, la infección puede variar en las diferentes cepas de ratones (susceptibles y resistentes) (Awasthi *et al.*, 2004).

Los ratones BALB/c infectados con *L. major* son cepas genéticamente susceptibles que presentan lesiones ulcerosas en el sitio de la inoculación y una visceralización fatal. Pero los ratones C57BL/6 y CBA son relativamente resistentes a la infección con esta misma especie de *Leishmania*, desarrollando pequeñas lesiones en el sitio de inoculación que sana después de pocas semanas y posteriormente al contacto con parásitos virulentos son inmunes (Cuadro 2) (Sacks y Melby, 1998).

La susceptibilidad y resistencia a la infección de *Leishmania* en el modelo murino están asociadas con el desarrollo de un subtipo único de células T: las células T reguladoras (T_{reg}) y el nivel de citocina IL-10. Estas células T reguladoras (CD4⁺ CD25⁺) en ratones C57BL/6 infectados con *L. major* se acumulan en las lesiones de la piel causadas por la infección y producen IL-10 cuando son estimuladas *in vitro* con el antígeno del parásito. Esta IL-10 inhibe la producción de IFN- γ (Tripathi *et al.*, 2007) por lo cual persiste la infección.

Las cepas de ratones resistentes (C57BL/6, C3H, CBA) autolimitan la lesión en las enfermedades cutáneas causadas por *L. major*. En estos ratones, la respuesta inmune es mediada por las células Th1 que producen IFN- γ . Este IFN- γ induce la producción de

óxido nítrico (NO) en células fagocíticas (principalmente en los macrófagos) llevando a la destrucción del parásito. Pero los ratones BALB/c desarrollan una respuesta tipo Th2, que ha sido bien caracterizada por la ausencia de IL-12, IFN- γ y NO y la presencia de IL-10, IL-4 (Pérez-Santos y Talamás-Rohana, 2001); además de una elevación en los niveles de IgE que no se observa en ratones C57BL/6 (Tripathi *et al.*, 2007).

Durante la infección temprana con *L. major*, los ratones resistentes (C57BL/6) y susceptibles (BALB/c) muestran una respuesta mezclada de Th1/Th2 en poblaciones celulares CD4⁺ con producción de IL-2, IL-4 e IL-13 (Tripathi *et al.*, 2007); pero en la leishmaniasis visceral (LV), la resistencia y susceptibilidad no se relaciona estrictamente a este tipo de respuesta mezclada (Sacks y Melby, 1998). En resumen, *L. major* es la especie más estudiada en el modelo murino y la infección en las diferentes cepas de ratones depende de las distintas especies de *Leishmania*. En contraste, ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* o con *L. amazonensis* presentan lesiones progresivas que tienden a ser menos ulcerosas. Los ratones C57BL/6 y C3H infectados con estas especies de *Leishmania* controlan la progresión de las lesiones primarias pero no son capaces de sanar y posteriormente desarrollan metástasis en sitios distales (Cuadro 2) (Sacks y Melby, 1998).

Por otro lado, la infección con *L. donovani* en ratones BALB/c o C57BL/6 presentan aproximadamente un aumento de cien veces la carga parasitaria hepática durante dos semanas de infección. En cambio, en los ratones resistentes (DBA/2 o C3H/He) muestran un incremento menor a diez veces en la carga parasitaria a las dos semanas y posteriormente logran sanar (Sacks y Melby, 1998).

Cuadro 2. Patrón de la enfermedad en cepas de ratones infectados con diferentes especies de *Leishmania*

Cepas	Especies de <i>Leishmania</i>			
	<i>L. major</i>	<i>L. mexicana</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. donovani</i>
BALB/c	Progresiva	Progresiva	No hay lesión	Susceptibilidad aguda No cura
C3H	Curación	Crónica	ND	Resistencia aguda
C57BL/6	Curación	Crónica	ND	Susceptibilidad aguda Cura

ND= no determinado

Tomado de: Sacks y Melby, 1998.

1.4 Morfología de *Leishmania*

Las diferentes especies de *Leishmania* pasan por dos estadios en su ciclo de vida: el amastigote y el promastigote, los cuales se reproducen por fisión binaria tanto en el vector como en el hospedero vertebrado (Velasco, 1994).

El **amastigote** presenta una forma esférica de 2 a 5 μm de diámetro con núcleo esférico y excéntrico, cromatina granulosa y un cinetoplasto. Los amastigotes residen y se multiplican dentro de las vacuolas fagolisosomales de los macrófagos, su principal célula hospedera (Fig.3) (Velasco, 1994; Sacks y Kamhawi, 2001).

El **promastigote** presenta una forma fusiforme que mide aproximadamente de 12 a 20 μm , carece de membrana ondulante; posee un núcleo situado en la parte central del parásito y un flagelo que es anteronuclear. En este estadio se conocen dos fases principalmente: el promastigote procíclico (fase logarítmica o de crecimiento) que presenta un movimiento ligero y el promastigote metacíclico (fase estacionaria o infectiva) que se distingue por presentar una forma alargada, delgada y movilidad. Los promastigotes se encuentran en el intestino del vector. (Fig.4) (Velasco, 1994; Sacks y Kamhawi, 2001).



Fig.2 *Lutzomyia* spp. Tomado de: Chappuis *et al.*, 2007.

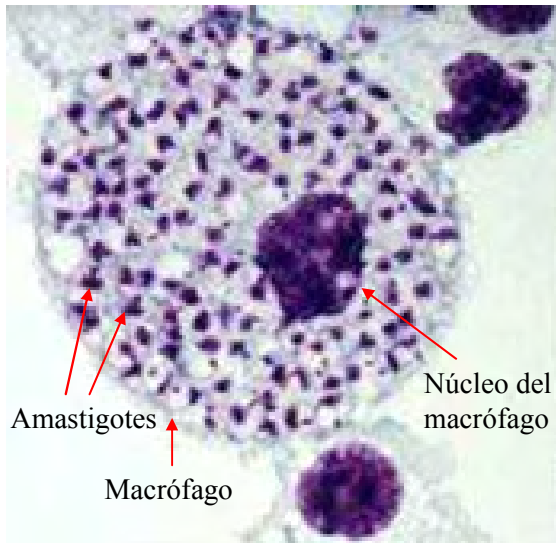


Fig.3 Macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania* spp. Tomado de: www.nature.com/.../fig_tab/ncpneph0255_F4.html



Fig.4 Promastigote de *Leishmania* spp. Tomado de: <http://www.ufr.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>

1.5 Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo de vida de *Leishmania spp.* necesita por lo menos dos hospederos: un hospedero invertebrado conocido como vector, el cual es un díptero (Fig.2) de la subfamilia Phlebotominae y solo las hembras transmiten la enfermedad y un vertebrado mamífero.

El ciclo comienza cuando el *Phlebotomus* o la *Lutzomyia* se alimenta de la sangre de un hospedero ingiriendo macrófagos con amastigotes. En el vector: **(a)** la sangre infectada entra al intestino y se mantiene en una membrana peritrófica (MP) bien definida, donde los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (aproximadamente un 30% de los amastigotes ingeridos), se multiplican y pasan por varios estadios hasta transformarse en promastigotes metacíclicos. **(b)** Los promastigotes metacíclicos se encuentran en la porción anterior del intestino y la membrana peritrófica se rompe. **(c)** Los promastigotes metacíclicos migran de la región anterior del intestino a la región del cardias hasta la faringe, donde se mantienen hasta la siguiente ingesta de sangre (Fig.5) (Sacks y Kamhawi, 2001). Cuando el vector se vuelve a alimentar de un hospedero vertebrado, este inocula promastigotes metacíclicos junto con la saliva. En el hospedero vertebrado, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos en donde sobreviven adaptándose al medio ácido del fagolisosoma, inmediatamente se transforman en amastigotes y se multiplican hasta lisis al macrófago. Los amastigotes liberados pueden ser fagocitados por otras células o bien tomadas por un nuevo vector comenzando nuevamente el ciclo (Fig.6) (Awasthi *et al.*, 2004; Rey, 2007; Handman y Bullen, 2002).

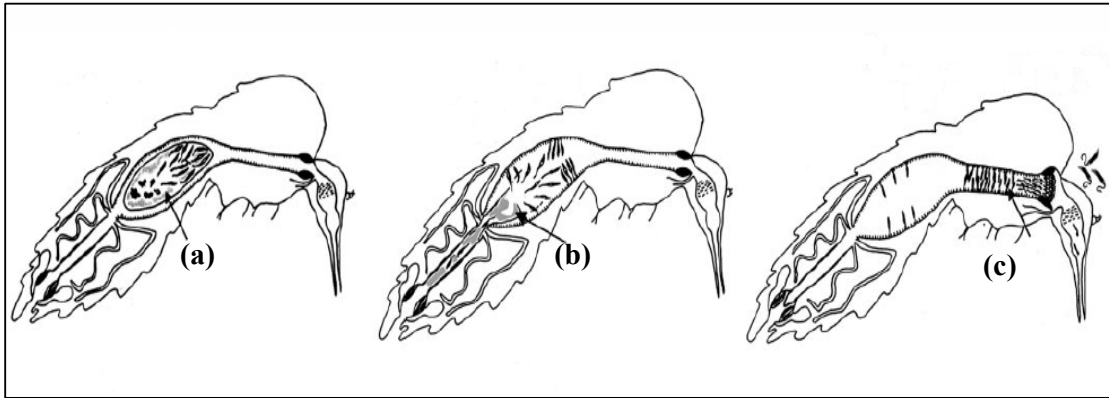


Fig.5 Desarrollo de *Leishmania spp.* en la *Lutzomyia*. (a) Los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos y metacíclicos. (b) La membrana peritrófica se rompe. (c) Migración de los promastigotes metacíclicos a la faringe. Tomado de: Sacks y Kamhawi, 2001.

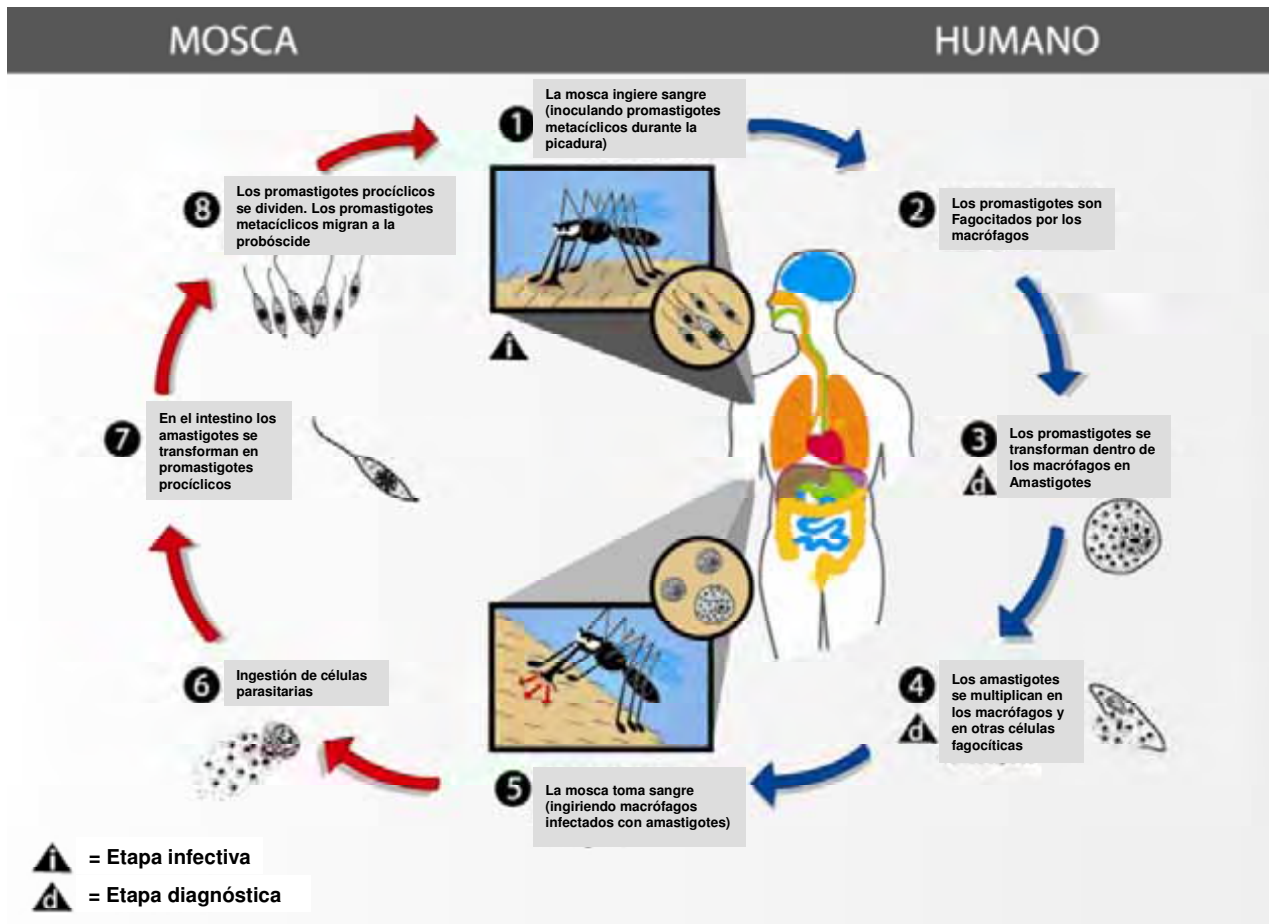


Fig.6 Ciclo de vida del parásito *Leishmania spp.* Modificado de: Rey, 2007

1.6 Respuesta inmune a *Leishmania*

El Sistema Inmune es una organización de células y moléculas con papeles especializados en la defensa contra infecciones que involucra dos tipos de respuesta. La Respuesta Inmune Innata y la Respuesta Inmune Adquirida.

La Respuesta Inmune Innata o natural constituye la primera línea de defensa contra las infecciones y es la más antigua filogenéticamente. Impide la infección del hospedero y, en muchos casos, es capaz de eliminar a los microorganismos con la ayuda de mecanismos efectores como péptidos antimicrobianos y la cascada de complemento. Participan células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) que poseen gran capacidad microbicida y bactericida y células que liberan mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos, eosinófilos).

Los promastigotes de *Leishmania spp.* son fagocitados por los macrófagos en donde sobreviven adaptándose al medio ácido del fagolisosoma (Zambrano-Villa *et al.*, 2002). Se defiende de la actividad leishmanicida de éste por las glicoproteínas que abundan en su superficie. La manosa es el componente más abundante de estas moléculas, allí se encuentran presentes varias moléculas de anclaje como: lipofosfoglicano (LPG), glicoinositolfosfolípidos (GIPLS), la gp63 y proteofosfoglicanos (PPGs). Estas moléculas desempeñan papeles importantes, por ejemplo la gp63 ayuda contra la lisis por la vía de complemento y junto con la LPG en la unión, entrada, sobrevivencia y división del parásito en el macrófago (Rodríguez, 2003).

Por otro lado, la saliva de la mosca ayuda manteniendo al parásito dentro del macrófago suprimiendo la actividad leishmanicida de éste, inhibiendo la producción de óxido nítrico (NO) y acelerando el desarrollo de la lesión (Alexander *et al.*, 1999).

Los amastigotes utilizan diversas estrategias para invadir nuevas células hospederas, por ejemplo los amastigotes de *L. major* y *L. mexicana* utilizan la opsonización con IgG para entrar a otros macrófagos por medio del receptor Fc (Alexander *et al.*, 1999; Handman y Bullen; 2002).

La presentación de antígenos por la molécula MHC clase II induce activación de células T CD4⁺. En caso de activación de CD4⁺ Th1; estas producen IFN- γ , lo cual favorece la protección contra la infección por *Leishmania*. *L. donovani* suprime la expresión de estas moléculas y la producción de prostaglandina PGE₂ en el macrófago (Alexander *et al.*, 1999).

La inducción de una inmunidad protectora contra *Leishmania* depende generalmente de la producción de la citocina IL-12 (esta citocina es producida por el macrófago y la célula dendrítica) desarrollando una respuesta Th1 e induce la producción de IFN- γ en células NK y células T (Alexander *et al.*, 1999). Una respuesta Th1 previene la infección crónica y es inducida por las células dendríticas presentadoras de antígenos a las células T CD4⁺ y CD8⁺, los cuales liberan citocinas proinflamatorias como IL-12, IFN- γ y TNF- α . Por otro lado, las células CD4⁺ Th2 liberan citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, inhibiendo la activación de macrófagos e impidiendo la producción de citocinas protectoras. Aunque este tipo de respuesta impide la extensa

destrucción tisular, promueve la infección intracelular, lo que origina la cronicidad de la infección con *Leishmania* (Reed y Scott, 1993; Reithinger *et al.*, 2007).

Algunos linfocitos, como las células NK, las NKT y las T- $\gamma\delta$ pueden ser activadas inmediatamente después de la infección, controlando la replicación del patógeno (Mackay y Rosen, 2005).

1.7 Las células T- $\gamma\delta$

Las células T- $\gamma\delta$, junto con las células T- $\alpha\beta$ y B representan los tres linajes de linfocitos que se encuentran en todas las especies de vertebrados. Las células T- $\gamma\delta$ constituyen sólo una pequeña proporción (del 1 al 5%) de los linfocitos que circulan en la sangre y en el timo adulto. Sin embargo, en el ratón se encuentran en mayor proporción en el epitelio (piel, intestino y tracto reproductivo) (Cuadro 3). Su desarrollo puede ser timo-dependiente o timo-independiente y no están restringidas al MHC; poseen la habilidad de reconocer proteínas solubles y antígenos no proteicos de origen endógeno (Carding y Egan, 2002; Andrew y Carding, 2005; Salerno y Dieli, 1998).

Cuadro 3. Distribución de las células T- $\gamma\delta$ (% de linfocitos en cada órgano)

	Humano	Ratón	Rata	Gallina	Ovinos	Bovinos
Sangre	0.5 - 16	0.5 - 2	2	15	15 - 50	15 - 40
Timo	ND	0.5 - 1.5	ND	10	1.0 - 4.0	1.0 - 5.0
Bazo	2.0 - 30	0.5 - 2	2	25	5.0 - 7.0	
Nódulos Linfoides	5	0.5 - 3	4	ND	1.0 - 6.0	1.0 - 3.0
Intestino	10	50	ND	ND	ND	ND

ND= no determinado

Tomado de: Haas, 1993.

El repertorio del receptor de antígenos de las células T- $\gamma\delta$ en humanos y ratón se caracteriza por la expresión de TCRs que son codificados por un solo gene V γ y V δ . El mecanismo responsable de esta diversidad funcional es desconocido. En el murino se presentan varios subtipos de células T- $\gamma\delta$, los cuales difieren en la ontogenia, la localización anatómica, el repertorio del TCR y la dependencia del timo. Cada subtipo puede expresar una proteína de adhesión única que es responsable de su comportamiento migratorio. Dos subtipos monoespecíficos son diseminados en el

epitelio, el subtipo V5 en la epidermis de la piel y el subtipo V6 en la mucosa del útero, vagina e intestino (Carding y Egan, 2002; Haas, 1993; Andrew y Carding, 2005).

Las células T- $\gamma\delta$ son muy heterogéneas, pueden o no expresar CD8 o CD4 y pueden tener subtipos de tipo innato y de tipo adaptativo. Por ejemplo, células T- $\gamma\delta$ CD8⁺ en el intestino expresan primariamente CD8 $\alpha\alpha$ similarmente a los linfocitos intraepiteliales $\alpha\beta$, que son considerados linfocitos innatos, mientras que las células T- $\gamma\delta$ CD8⁺ en el bazo expresan primariamente CD8 $\alpha\beta$, en este sentido se asemejan a las células T- $\alpha\beta$ convencionales, que son consideradas adaptativas (Carding y Egan, 2002; Haas, 1993; Andrew y Carding, 2005; Born *et al.*, 2007).

Varios ligandos bien definidos del TCR $\gamma\delta$ caen dentro de un grupo de moléculas que se inducen con el estrés celular, incluyendo CD1c, MIC-A o MIC-B, y F1-ATP sintasa en humanos y en ratón T10/22; antígenos mitocondriales, HSP-60 y el cardiolipin fosfolípido (CL) (Born *et al.*, 2006). La expresión de moléculas CD1 y HSP60 indican que las células T- $\gamma\delta$ pueden ser capaces de funcionar como células presentadoras de antígenos (Carding y Egan, 2002).

Las células T- $\gamma\delta$ expresan receptores scavenger, receptores tipo Toll (TLR2, TLR3), un receptor para quimiocinas (CCR7) y receptores de NK como la expresión de receptores Fc (en ratón Fc γ R α y en humanos Fc γ RIII también llamado CD16) que median la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Haas, 1993) (Fig.7). El receptor NKG2D funciona como un receptor coestimulador en la activación dependiente del TCR en las células T- $\alpha\beta$ CD8⁺ y en las células T- $\gamma\delta$. La activación a través de éste receptor induce la producción de TNF- α y la liberación de gránulos citolíticos, pero no la producción de IFN- γ en las células T- $\gamma\delta$ que expresan DAP10, un

mediador de la señalización de NKG2D (Born *et al.*, 2006; Moser y Brandes, 2006; Casetti y Martino, 2008).

Las células T- $\gamma\delta$ en bazo parecen estar constitutivamente activadas y estas tienen un activador o un fenotipo de células T de memoria, expresan receptores de IL-12 (Andrew y Carding, 2002).

Las células T- $\gamma\delta$ comparten con las células T- $\alpha\beta$ algunas proteínas de superficie celular como: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD16, CD25, CD28 o CD45, aunque la frecuencia de las células expresando una proteína particular y el nivel de expresión varía ampliamente no solo entre estas células sino también entre los subtipos de células T- $\gamma\delta$ y las células T- $\gamma\delta$ de diferentes especies (Fig.7). La única proteína de superficie de las células T- $\gamma\delta$ conocida es T19 o también llamada WC1 (Haas, 1993).

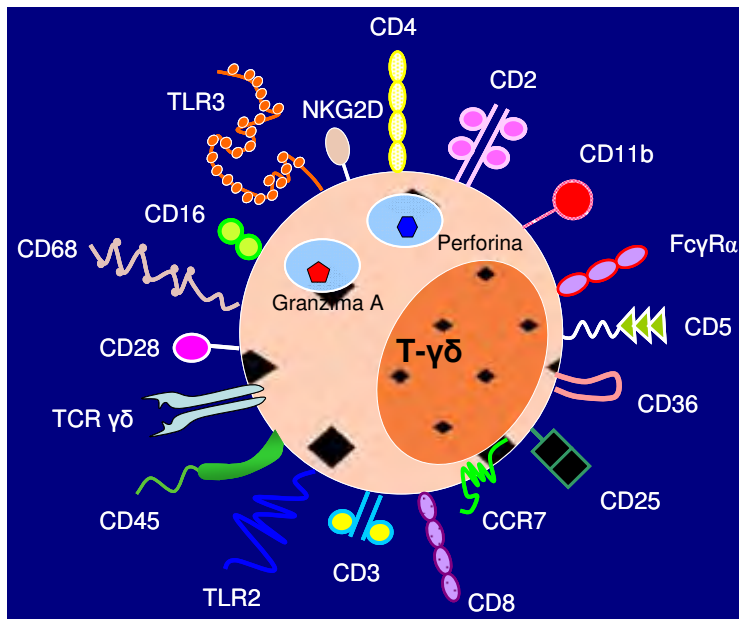


Fig.7 Célula T- $\gamma\delta$ con sus receptores y proteínas de superficie.

Los tipos de antígenos que son reconocidos por las líneas o clones de células T- $\gamma\delta$ pueden ser categorizados ampliamente; dentro de estos se encuentran los que son constitutivamente expresados en las células del hospedero y por patógenos microbianos, como los pirofosfatos no proteínicos (IPP), bifosfonatos que contienen nitrógeno (N-BPs), alquilaminas que son encontradas en bacterias, plantas o células animales. Otros antígenos son inducibles y pueden ser restringidos a ciertos tipos celulares como T10/22 o MICA, que son modulados o inducidos por el estrés, la inflamación o la infección y son restringidos a ciertos tipos celulares como el epitelio (Carding y Egan, 2002; Born *et al.*, 2006).

El reconocimiento de antígenos alquilaminados fosforilados y no fosforilados requiere de contacto célula-célula y de moléculas que aún no han sido bien identificadas que posiblemente presenten los fosfoantígenos al TCR de las células T- $\gamma\delta$ (Carding y Egan, 2002). Lo que si se ha identificado es la estructura cristalina del TCR $\gamma\delta$, la cual muestra tener acciones similares con las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, incluyendo la formación de una hendidura por el CDR3 que es similar al sitio de unión de las inmunoglobulinas, que reconocen pequeños compuestos de fosfatos, indicando que las células T- $\gamma\delta$ también pueden reconocer antígenos directamente de una manera similar a los anticuerpos (Carding y Egan, 2002).

Las células T- $\gamma\delta$ reconocen péptidos presentados por el MHC o proteínas similares a MHC en la superficie de macrófagos o células dendríticas (Haas, 1993). Unos pocos clones de células T- $\gamma\delta$ en humano y ratón han demostrado ser específicos para proteínas MHC clase I y II así como moléculas MHC clase Ib no clásicas. Algunos clones de células T- $\gamma\delta$ en humano han demostrado reconocer HLA-A2, HLA-A24,

HLA-DR7, HLA-DR3 o HLA DQA1/DQB1 heterodímeros (Haas, 1993; Salerno y Dieli, 1998).

En ratón específicamente dos clones de células T- $\gamma\delta$ derivados independientemente, G8 y KN6, reconocen moléculas clase 1b codificadas por genes en el locus TL. La expresión del MHC clase 1b puede ser inducido por el estrés celular y ser reconocido por las células T- $\gamma\delta$, independientemente de la presentación de antígenos exógenos (Hayday y Geng, 1997).

Las células T- $\gamma\delta$ realizan diferentes funciones involucradas en los diferentes estados de la respuesta inmune que son compatibles con la contribución de la iniciación o resolución de la respuesta inmune inducida por patógenos. Las células T- $\gamma\delta$ responden al reconocimiento antigénico como las células T- $\alpha\beta$ con proliferación, producción de citocinas y expresión de actividad citolítica o anergia (Fig.8) (Haas, 1993).

Las células T- $\gamma\delta$ producen citocinas Th1 pro-inflamatorias (IFN γ) y citocinas Th2 anti-inflamatorias (IL-4 o IL-10) al igual que la producción de IL-12 y del factor de crecimiento de queratinocitos (KGF). Por otro lado, lisan células blanco mediante la expresión de la perforina y la serina esterasa 1 y 2 mediante la ruta dependiente de granulicina, usando el receptor y ligando de muerte (Fas/Fas ligando) (Best *et al.*, 2008) y por la expresión del receptor CD16 que permite a las células T- $\gamma\delta$ reconocer IgG unidas a antígenos en la superficie de células blanco (Salerno y Dieli, 1998).

Además, diferentes poblaciones de células T- $\gamma\delta$ ayudan a resolver la respuesta inmune inflamatoria y promueven la reparación del tejido y la regeneración celular por la producción o secreción del factor de crecimiento de queratinocitos (Carding y Egan, 2002; Andrew y Carding, 2005).

Las células T- $\gamma\delta$ promueven la diferenciación de los monocitos y macrófagos y en el reclutamiento de macrófagos, no sólo en la inflamación infecciosa sino también durante la respuesta inflamatoria que acompaña a la cicatrización de heridas. Las células T- $\gamma\delta$ de la piel, reconocen queratinocitos y regulan su proliferación después de la herida e inducen la producción de hialuronanos por las células epiteliales y su depósito en la matriz extracelular, una parte esencial del proceso de reparación. El hialuronano está involucrado en el reclutamiento de macrófagos hacia la herida y las células T- $\gamma\delta$ son responsables indirectamente de su reclutamiento (Born *et al.*, 2006).

Las células T- $\gamma\delta$ adquieren funciones innatas como el procesamiento y la presentación antigénica, lo que las hace convertirse en APC altamente efectivas (Moser y Brandes, 2006).

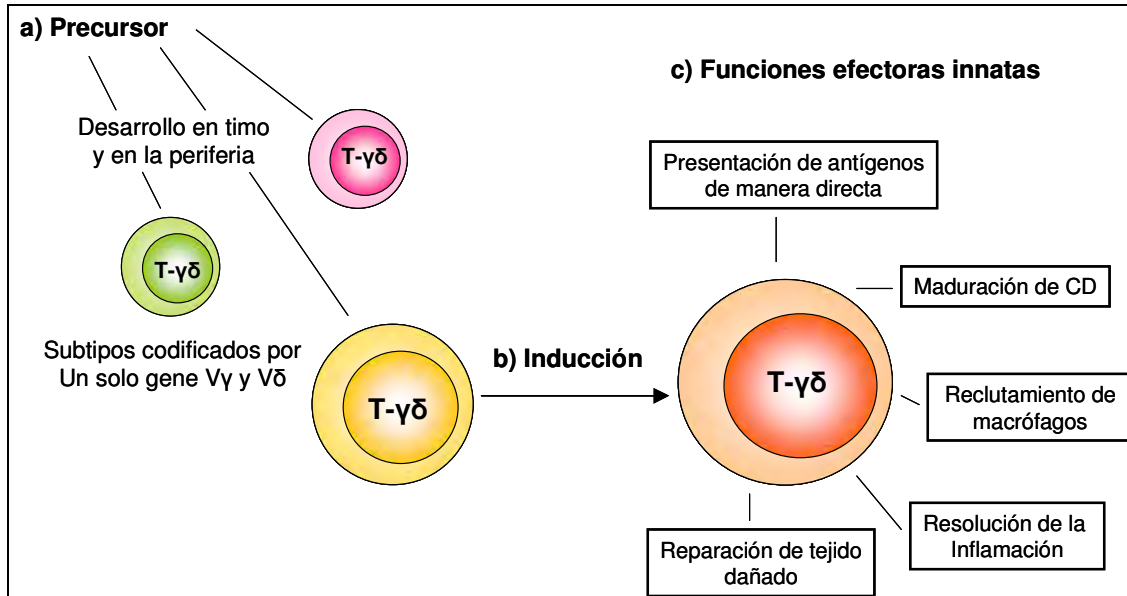


Fig.8 Desarrollo de las poblaciones de células T- $\gamma\delta$, inducción funcional en la periferia y la participación en las diversas respuestas del Sistema Inmune Innato. a) Diferenciación de las células T- $\gamma\delta$ y la segregación en subtipos especializados, comenzando en el timo y terminando en la periferia. **b)** Algunas células T- $\gamma\delta$ en la periferia requieren inducción (“preparación”) antes de participar en funciones efectoras. **c)** En su estado preparado o activado, las células T- $\gamma\delta$ son capaces de regular varias respuestas del Sistema Inmune Innato. Modificado de: Born *et al.*, 2006.

Estudios en modelos animales con bacterias intracelulares han demostrado que las células T- $\gamma\delta$ llegan antes que las células T- $\alpha\beta$ al sitio de infección, también se acumulan en sitios de infección por protozoarios y además son capaces de suprimir la replicación viral *in vitro* y ésta es dependiente del contacto celular (Salerno y Dieli, 1998). En células sanguíneas de pacientes con lupus eritematoso inducen la secreción de inmunoglobulinas en líneas celulares B (Haas, 1993) y pueden responder a células autólogas estresadas *in vivo* (Hayday y Geng, 1997).

Las células T- $\gamma\delta$ se incrementan de manera variable en los diferentes órganos en las enfermedades tumorales, autoinmunes y en las causadas por bacterias y protozoarios tanto en humanos como en ratones, por lo que estas células pueden jugar un papel importante en la respuesta inmune (Salerno y Dieli, 1998; Carding y Egan, 2002; Gajewski, 2007; Chien y Königshofer, 2007; Russo *et al.*, 1993).

2. ANTECEDENTES

La leishmaniasis constituye una de las seis enfermedades tropicales de mayor importancia para la OMS. El número de casos va en aumento debido a múltiples causas como son el desplazamiento de las poblaciones, la exposición de personas que no son inmunes a esta enfermedad, el deterioro de las condiciones sociales y económicas en las zonas urbanas periféricas, la malnutrición y la coinfección con el VIH. Entre los medicamentos que se utilizan para el tratamiento de esta enfermedad se incluyen los antimoniales pentavalentes como Pentostam y Glucantime; Anfotericina B, Pentamidina y Aminosidine (Gamboa-León *et al.*, 2007; Awasthi *et al.*, 2004). Sin embargo, la quimioterapia con dichos antimoniales requiere de tratamientos prolongados, costosos y pueden tener efectos secundarios.

Actualmente se utilizan diversos inmunomoduladores como una alternativa terapéutica en la profilaxis de diversas enfermedades. Estos inmunomoduladores forman un grupo heterogéneo de fármacos usualmente compuestos de lisados estandarizados o extractos de microorganismos de diferentes cepas o de plantas para la activación no específica del sistema inmune induciendo una respuesta innata y modificando la respuesta inmune adaptativa (Spisek *et al.*, 2004; Pedraza- Sánchez *et al.*, 2006).

2.1. Inmunomoduladores en la leishmaniasis

Algunos estudios han demostrado que las plantas presentan numerosos compuestos antileishmanicidas tanto para el promastigote como el amastigote de diferentes especies de *Leishmania*; inhibiendo la internalización y el crecimiento del parásito (Di Giorgio *et al.*, 2006; 2008; Costa *et al.*, 2007) o bien, incrementando la

producción de NO, la apoptosis y la actividad citotóxica lo cual reduce la parasitemia (Camacho, 2000; Dutta *et al.*, 2007, 2008).

En ratones BALB/c infectados con *L. major* se comprobó que el ajo (*Allium sativum*) induce cambios de una respuesta inmune tipo Th2 a una respuesta inmune Th1 llevando al control de la infección (Ghazanfari *et al.*, 2000). Por otro lado, Gamboa y colaboradores (2007) analizaron el efecto inmunoterapéutico del ajo en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, demostrando que participaban diferentes tipos celulares incluyendo las células T donde convergen principalmente en la activación del macrófago para producir NO (óxido nítrico) y de esta manera participar en la eliminación del parásito.

Los inmunomoduladores de extractos bacterianos han sido estudiados ya sea solos o combinados con quimioterapias tanto para la leishmaniasis cutáneas como la visceral, por ejemplo: el Z-100 es un polisacárido compuesto principalmente por arabinomananas obtenidas de *Mycobacterium tuberculosis*. Este compuesto muestra un efecto antileishmanicida contra *L. amazonensis in vitro* inhibiendo la producción de IL-4 e IL-10 y aumentando la producción de IL-12 e IFN- γ (Barroso *et al.*, 2007).

El Biostim (también llamado compuesto RU41740) es uno de los inmunomoduladores más ampliamente estudiados por su efecto protector en diferentes enfermedades crónicas respiratorias así como en infecciones causadas por hongos y virus. Este inmunomodulador es extraído de *Klebsiella pneumoniae*. Algunas de sus propiedades inmunoestimulantes son aumentar la actividad fagocítica *in vitro* de monocitos/macrófagos así como la citotoxicidad de las células NK; mejora la respuesta inmune mediada por células y la respuesta humoral (Estaquier *et al.*, 1998). La

administración oral del Biostim reduce la incidencia, la hipersensibilidad y la duración de episodios infecciosos en pacientes con infecciones recurrentes y en pacientes con cáncer (Estaquier *et al.*, 1998).

La actividad inmunomoduladora del Biostim varía en las diferentes células; en los esplenocitos aumenta los niveles de TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL12, IgG (IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃) (Nimier *et al.*, 1999). En las células NK aumenta la producción IL-1, IFN- β , TNF- α e IFN- γ además de aumentar su función citotóxica (Migliorati *et al.*, 1989; Pedraza *et al.*, 2006; Estaquier *et al.*, 1998).

2.2. Estudios realizados de células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis

En el cuadro 4, se muestra la variabilidad en porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en la infección con *Leishmania* en ratones y humanos realizados por diversos autores. Algunos estudios involucran la proliferación de células T- $\gamma\delta$ en pacientes con varias formas de Leishmaniasis así como la presencia de éstas células en las lesiones (Russo *et al.*, 1993; Lagler *et al.*, 2003; Rosat *et al.*, 1995).

Modlin y colaboradores en 1989 compararon la presencia de los linfocitos que muestran TCR $\gamma\delta$ ó TCR $\alpha\beta$ en infecciones por *Mycobacterium leprae* y *Leishmania braziliensis* en biopsias de piel con anticuerpos monoclonales específicos. Estos autores demostraron que los linfocitos TCR $\gamma\delta$ se encuentran en mayor porcentaje (25-35%) de células CD3⁺ en las lesiones de lepra y leishmaniasis comparado con un menor porcentaje (5%) de células CD3⁺ en órganos linfoides normales, sugiriendo que los linfocitos TCR $\gamma\delta$ pueden estar involucrados en el inicio de la respuesta granulomatosa

activa y que estas células o sus productos secretados pueden jugar un papel en el desarrollo de tales lesiones.

Russo *et al.* (1993) demostraron que pacientes con varias formas de leishmaniasis activa incrementan significativamente el número de células T- $\gamma\delta$ (25-60%) en sangre periférica y que proliferan *in vitro* en respuesta a lisados con promastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, incluyendo una proteína de choque térmico de *Leishmania* de 70 kDa recombinante (HSP70).

Rosat *et al.* (1993, 1995) reportaron que el porcentaje células T- $\gamma\delta$ varía entre cepas de ratones susceptibles y resistentes infectados con *L. major*. En los ratones BALB/c llegaron a presentar hasta un 35% de estas células y la cepa CBA/J sólo llegó a presentar un 12%. Además demostraron que existe una relación entre el número de células T- $\gamma\delta$ y el tamaño de la lesión, el tiempo de la infección y órgano analizado. Este porcentaje de células se puede reducir hasta un 50% con la administración del Glucantime.

Los estudios realizados con *L. infantum* y *L. donovani* han demostrado que las células T- $\gamma\delta$ produjeron altos niveles de IFN- γ y TNF- α , lo cual favorecen a una respuesta Th1 (Lagler *et al.*, 2003; Antonelli *et al.*, 2006). En pacientes con leishmaniasis visceral sólo el 10% de células T- $\gamma\delta$ producen IL-10, pero la mayoría secretan IFN- γ , IL-2 e IL-4 (Lagler *et al.*, 2003).

Hasta el momento no se han reportado trabajos que involucren al Biostim y a las células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis y también se desconoce el efecto que pueda tener el

Biostim en la leishmaniasis; por esto, se decidió analizar si el tratamiento por vía oral con Biostim modifica la infección y el número de células T- $\gamma\delta$ en ratones susceptibles BALB/c, infectados en el cojinete plantar con *L. mexicana*, así como cuantificar el número de células T- $\gamma\delta$ en ratones C57BL/6 y C3HeB/FeJ, sanos e infectados con *L. mexicana*.

Cuadro 4. EXPRESIÓN DE CÉLULAS T- $\gamma\delta$ EN HUMANOS O EN EL MODELO MURINO INFECTADOS CON *LEISHMANIA*

Células T- $\gamma\delta$ (%)	Analizado en:	Especie de <i>Leishmania</i>	Localización	Referencia
25-35	Pacientes con lepra y Leishmaniasis cutánea	<i>L. braziliensis</i>	Órganos linfoides	Modlin <i>et al.</i> , 1989
25-60	Pacientes con Leishmaniasis cutánea y mucosal	<i>L. braziliensis</i> <i>L. amazonensis</i>	Sangre periférica	Russo <i>et al.</i> , 1993
35	Ratón BALB/c	<i>L. major</i> (promastigotes)	Bazo	Rosat <i>et al.</i> , 1993
4	Ratón BALB/c	<i>L. major</i> (promastigotes)	Nódulo linfático	Rosat <i>et al.</i> , 1993
12	Ratón CBA/J	<i>L. major</i>	Bazo	Rosat <i>et al.</i> , 1993
3	Ratón CBA/J	<i>L. major</i>	nódulo linfático	Rosat <i>et al.</i> , 1993
3.8	Ratón BALB/c	<i>L. major</i> (promastigotes)	Hígado	Yamashita <i>et al.</i> , 1999
6-19	Sujetos sanos	<i>L. donovani</i> (amastigote)	Sangre periférica	Saha <i>et al.</i> , 1999
34	Sujetos sanos	<i>L. donovani</i> (antígeno)	Sangre periférica	Saha <i>et al.</i> , 1999
5.8	Paciente con Leishmaniasis visceral	<i>L. infantum</i>	Sangre periférica	Lagler <i>et al.</i> , 2003
6.4	Ratón BALB/c	<i>L. mexicana</i>	Timo	En este trabajo
3.4	Ratón BALB/c	<i>L. mexicana</i>	Bazo	En este trabajo
4.67	Ratón C57BL/6	<i>L. mexicana</i>	Timo	En este trabajo
4.2	Ratón C57BL/6	<i>L. mexicana</i>	Bazo	En este trabajo
1.9	Ratón C3HeB/FeJ	<i>L. mexicana</i>	Timo	En este trabajo
1.1	Ratón C3HeB/FeJ	<i>L. mexicana</i>	Bazo	En este trabajo

3. HIPÓTESIS

1. El incremento de células T- $\gamma\delta$ en bazos de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana* se asocia con susceptibilidad.
2. La reducción de células T- $\gamma\delta$ en bazo y timo de ratones BALB/c ejercido por Biostim favorece el control de la leishmaniasis.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Cuantificar las células T- $\gamma\delta$ de timo y bazo en ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con *Leishmania mexicana* y analizar si la administración del Biostim en ratones susceptibles BALB/c incrementa el número de células T- $\gamma\delta$ y modifica la evolución del padecimiento.

4.2 Objetivos específicos

- Medir el grosor del cojinete plantar de ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con 1×10^6 promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Cuantificar las células T- $\gamma\delta$ en bazo y timo de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ sanos y a los tres meses de infección con *Leishmania mexicana*.
- Analizar si el tratamiento por vía oral con Biostim modifica la infección en ratones susceptibles BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* mediante la medición del cojinete plantar.
- Analizar si el tratamiento con Biostim modifica el número de células T- $\gamma\delta$ en bazo y timo de ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*.
- Analizar la producción de IL-10 por células peritoneales estimuladas *in vitro* con Biostim de ratones susceptibles BALB/c tratados previamente con Biostim.
- Analizar la producción de IL-10 por células peritoneales y de bazo estimuladas *in vitro* con Biostim de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

En este estudio se utilizaron tres cepas de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ, los cuales se obtuvieron del bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM, con el objetivo de medir el desarrollo de la lesión, cuantificar las células T- $\gamma\delta$ y la producción de IL-10 en ratones sanos e infectados con *Leishmania mexicana*.

Se realizaron dos grupos de experimentos:

1.- Se analizaron las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ (6 ratones hembras por cepa, 3 sanos y 3 infectados con *Leishmania mexicana*) y sacrificados a los tres meses de infección.

2.- Se analizó la cepa BALB/c administrando diferentes dosis de Biostim.

Se utilizaron 15 ratones hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad; estos se distribuyeron en 5 grupos experimentales y 12 ratones fueron inoculados en el cojinete plantar con parásitos de *Leishmania mexicana* y posteriormente se les administró RU41740 (Biostim) de manera oral con una cánula a diferente dosis y tiempo (Cuadro 5). A estos ratones se les midió el cojinete plantar antes, durante y después del tratamiento. Se sacrificaron a las 24 semanas de infección.

Cuadro 5. Grupos experimentales y su tratamiento con Biostim

# de Ratones BALB/c	Inóculo (<i>Leishmania mexicana</i>)	Administración de Biostim	Tiempo de Tratamiento
3	_____	_____	_____
3	1x10 ⁶ parásitos	_____	_____
3	1x10 ⁶ parásitos	0.3 mg/ml ó (150 µl)	De lunes a viernes por cinco semanas
3	1x10 ⁶ parásitos	0.6 mg/ml ó (300 µl)	De lunes a viernes por dos semanas
3	1x10 ⁶ parásitos	0.6 mg/ml ó (300 µl)	Lunes, miércoles y viernes por tres semanas

5.2. Cultivo de parásitos (*Leishmania mexicana*)

Los ratones se infectaron subcutáneamente en el cojinete plantar con 1x10⁶ de promastigotes metacíclicos de *Leishmania mexicana* (MHOM/MX/92/UADY68) originalmente extraída de un paciente con LCL y mantenida en ratones BALB/c.

Una vez establecido el cultivo se sembraron 1x10⁶ parásitos en 1ml de RPMI y los parásitos metacíclicos se cosecharon al quinto día en la fase estacionaria, presentando forma alargada y un pH de 5.6.

5.3. Tratamiento con el Biostim (RU41740)

Para los ensayos *in vitro* se utilizó RU41740 (glicoproteína de *Klebsiella pneumoniae*) o también llamado Biostim. Stock con 1g/500ml donado por el Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez del Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición “Salvador Zubirán”.

5.4. Medición del cojinete plantar

A todos los ratones se les midió el cojinete plantar con un vernier de calibre (1-50mm) y en ratones BALB/c adicionalmente se pesó la pata infectada, después de ser sacrificados, en una balanza analítica para evaluar la evolución de la lesión.

5.5. Obtención células T- $\gamma\delta$ en bazo y timo

En condiciones estériles se sacrificaron los ratones de cada cepa o grupo experimental y se les extrajo el bazo y el timo colocándolos por separado en tubos de 15 ml con 3 ml de medio RPMI enriquecido con 10% SFB. Se perfundieron con una jeringa de 10 ml y se dejaron reposar por 8 min para retirar todo tipo de detritus. Después los tubos se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min a 4° C; se decantaron y se les agregó 5ml de solución lítica para eliminar eritrocitos. Se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min a 4° C y se decantaron. Los botones tanto de células de bazo como de timo se resuspendieron en 1ml de RPMI de donde se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad por exclusión con Azul Tripan a una dilución 1:20.

5.5.1. Obtención de células peritoneales

A los ratones sacrificados de cada grupo experimental o cepa se les inyectó en la cavidad peritoneal 10 ml de PBS 0.15M, pH 7.2 estéril frío, y tras unos golpes ligeros en el abdomen se extrajeron con la misma jeringa las células peritoneales y se colocaron en un tubo de 15 ml previamente rotulado. Se realizaron dos lavados centrifugando a 2000 rpm por 10 min a 4° C; en el último lavado se tomó una alícuota para realizar el conteo celular con Azul Tripan.

5.6. Cultivo de células peritoneales *in vitro*

Una vez obtenidas las células peritoneales se colocaron en una caja de 24 pozos, para cada condición se colocaron 2×10^6 células. Dichas células se dejaron reposar 1 hora en la estufa a 37° C con 5% de CO₂; posteriormente se estimularon *in vitro* con 10 µg/ml de Biostim por 24 hrs. a 37° C con 5% de CO₂. Las células se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 1200 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante para determinar la producción de IL-10 por la técnica de ELISA.

5.7. Cuantificación de células T- $\gamma\delta$ por citometría de flujo

Las células de bazo y timo (4×10^6) se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se fijaron con paraformaldehído al 2% por 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y se decantaron. El botón fue resuspendido en 47 y 48.5 µl de PBS 0.15M, pH 7.2 según la condición; al mismo tiempo se añadió 3 µl de anticuerpo R-Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Hamster Anti-Mouse $\gamma\delta$ T-Cell Receptor Monoclonal Antibody (BD

Biosciences, no. cat. 553178) ó 1.5 µl de anticuerpo R-Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Hamster IgG2*, κ Monoclonal Immunoglobulin Isotype Control (ANTI-KEYHOLE LIMPET HEMOCYANIN) (BD Biosciences, no. cat. 550085). Se incubaron durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente y finalmente se les agregaron 450 µl de PBS 0.15M, pH 7.2. Las muestras se leyeron en el citómetro de flujo con la ayuda del software CellQuest y posteriormente se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

5.8. Determinación de la producción de IL-10 en células peritoneales por la Técnica de ELISA tipo sándwich

En una placa de 96 pozos se colocaron 50 µl por pozo de anticuerpo de captura diluido en buffer de fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH=9.0; se incubó la placa a 4° C por un mínimo de 10 hrs; se lavó la placa 4 veces con una solución de PBS y 0.01% de Tween 80 en un lavador de placas de ELISA ELx50. Se le agregaron 200 µl por pozo de solución bloqueadora dejando incubar por 30 min a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces y se colocaron 100 µl por pozo tanto de la curva estándar como del sobrenadante de la muestra dejando incubar la placa por 2 hrs a temperatura ambiente. Se volvió a lavar la placa 4 veces y se agregaron 100 µl por pozo de anticuerpo de detección diluido en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20, se incubó 1 h a temperatura ambiente y se lavó 6 veces; se agregaron 100 µl por pozo de estreptavidina-fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20, se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente la placa se lavó 8 veces; se le agregaron a cada pozo 100 µl de solución reveladora la cual se compone de buffer de sustrato y sustrato de fosfatasa, se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad. La placa se leyó cada 5 min en un lector de ELISA para microplacas a una longitud de

onda de 405 nm y se obtuvieron las concentraciones de las citocinas de cada muestra por medio del programa KC4.

5.9. Análisis estadístico

Se analizaron los resultados mediante la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney y la correlación de Spearman. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

Los siguientes resultados muestran el desarrollo de las lesiones en ratones infectados con *Leishmania mexicana*, la cuantificación de células T- $\gamma\delta$ así como la producción de IL-10 en células peritoneales en tres cepas de ratón BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ. En la primera parte se cuantificaron las células T- $\gamma\delta$ de bazo de ratones sanos e infectados BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ. En la segunda parte analizaron las células T- $\gamma\delta$ en timo y bazo de ratones hembras BALB/c infectados y tratados con diferentes dosis de Biostim.

6.1. Incremento del cojinete plantar en tres cepas de ratón (BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ) después de tres meses de infección con *Leishmania mexicana*

Los ratones sanos BALB/c presentaron menor tamaño del cojinete plantar (2.53mm) que los ratones C57BL/6 (2.71mm) y C3HeB/FeJ (2.87mm); Sin embargo, al ser infectados con *Leishmania mexicana*, solamente incrementó significativamente el cojinete plantar de ratones BALB/c (Fig.9).

Las cepas C57BL/6 y C3HeB/FeJ presentaron un ligero aumento en el grosor del cojinete plantar al infectarse con *Leishmania mexicana* aunque no hay diferencias significativas en el grosor del cojinete plantar entre ratones sanos e infectados. La comparación del incremento del grosor de la pata infectada entre ratones BALB/c y C57BL/6 y entre BALB/c y C3HeB/FeJ mostró que las diferencias fueron significativas (Fig.9).

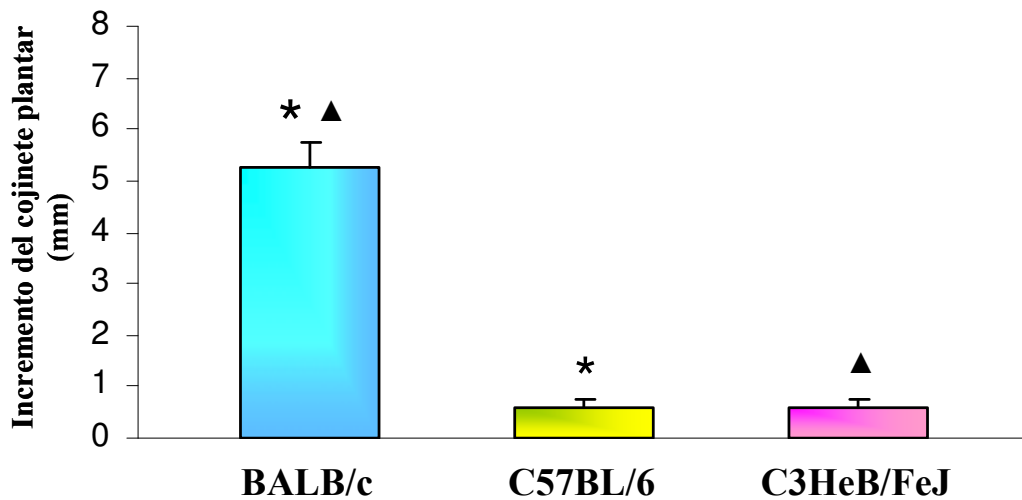


Fig.9 Incremento del grosor del cojinete plantar en diferentes cepas de ratón. De cada cepa se analizó un total de tres ratones. Las barras muestran el promedio \pm E.S. $\blacktriangle, * P \leq 0.05$.

6.2. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ

Analizamos el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo y bazo en tres cepas de ratón BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ, tanto en ratones sanos como en ratones infectados durante tres meses con *Leishmania mexicana* (n=3) (Fig.10).

En la Fig.10a se muestra el porcentaje de las células T- $\gamma\delta$ del timo en las tres cepas de ratones. En ratones sanos BALB/c observamos mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ (7.25%) que C57BL/6 (1.67%) y C3HeB/FeJ (1.03%), habiendo diferencias significativas entre BALB/c y C57BL/6, así mismo entre BALB/c y C3HeB/FeJ pero no entre C57BL/6 y C3HeB/FeJ. Los ratones BALB/c infectados presentaron mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ (6.4%) que C57BL/6 (4.67%) y C3HeB/FeJ (1.9%). No se observaron diferencias significativas entre ratones infectados BALB/c y C57BL/6, aunque si hubo una diferencia significativa entre ratones infectados BALB/c y C3HeB/FeJ. La infección de ratones BALB/c indujo una ligera disminución en el

porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo, mientras que en ratones C57BL/6 se observó un incremento de dichas células. Únicamente los ratones C3HeB/FeJ presentaron un incremento significativo en el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en el timo cuando estos fueron infectados.

En la Fig.10b se muestra el porcentaje de las células T- $\gamma\delta$ del bazo en las tres cepas de ratones sanos e infectados durante tres meses con *Leishmania mexicana*. En ratones sanos BALB/c se observó un menor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ (0.95%) que C57BL/6 (1.03%) y C3HeB/FeJ (2.4%), las diferencias no son significativas.

Los ratones infectados BALB/c (3.4%) y C57BL/6 (4.2%) presentaron un mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ el cual fue estadísticamente significativo en comparación con los ratones C3HeB/FeJ (1.1%). Hay diferencias significativas entre BALB/c y C3HeB/FeJ y entre C57BL/6 y C3HeB/FeJ pero no entre BALB/c y C57BL/6. En resumen, observamos que aumentan significativamente las células T- $\gamma\delta$ en bazo de ratones susceptibles BALB/c y C57BL/6 cuando estos son infectados con *Leishmania mexicana*, lo cual contrasta con ratones resistentes C3HeB/FeJn, donde las células T- $\gamma\delta$ disminuyen ligeramente durante la infección.

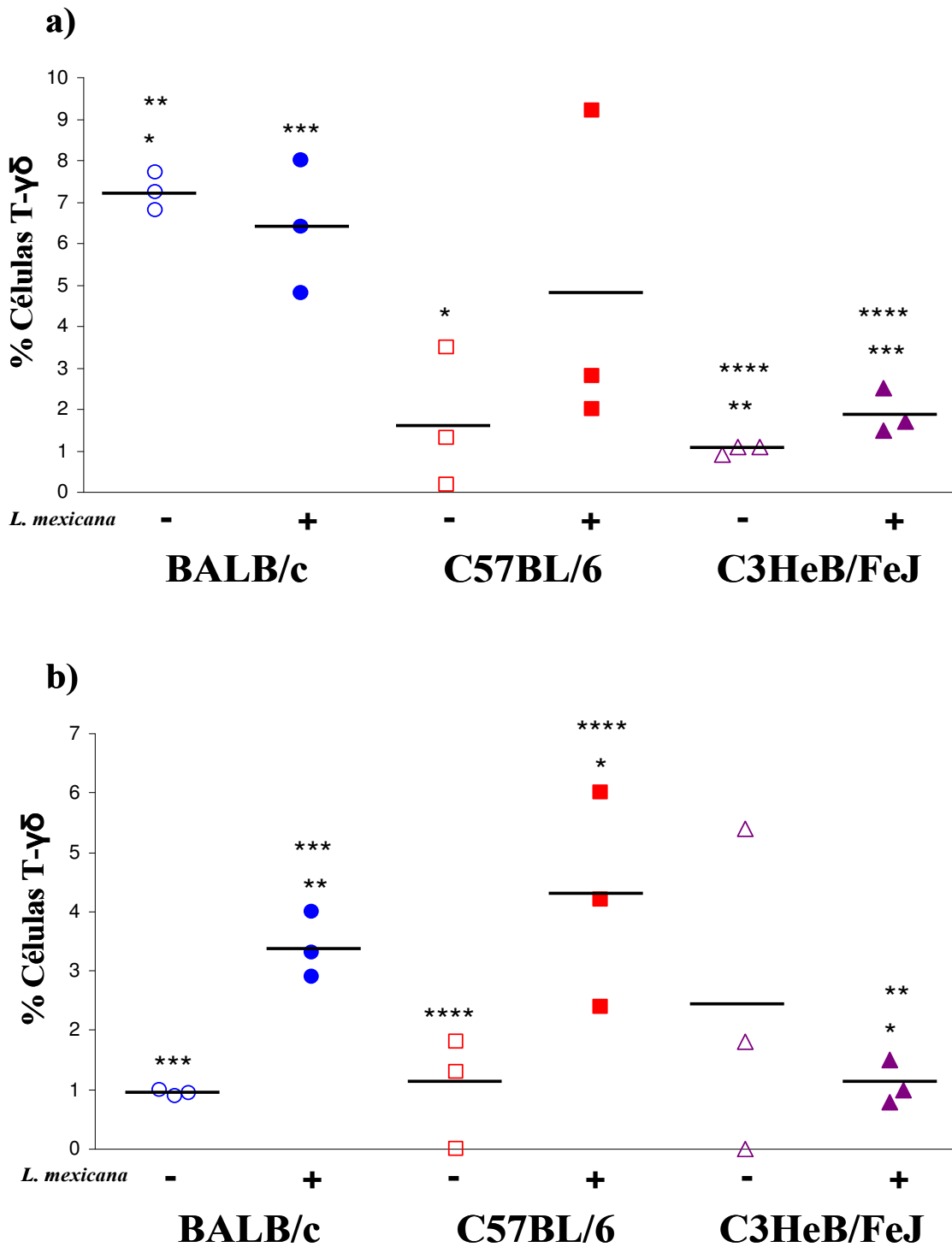


Fig.10 Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en diferentes órganos y cepas de ratón. a) Células T- $\gamma\delta$ en timo. b) Células T- $\gamma\delta$ en bazo. De cada una de las cepas se analizaron un total de 3 ratones. Cada símbolo representa un individuo. La línea horizontal indica el promedio. *, **, ***, **** $P < 0.05$.

6.3. Evaluación del efecto del Biostim sobre ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*

Para evaluar el efecto del Biostim se midió el cojinete plantar de los ratones. En la Fig.11 se muestra la evolución durante 24 semanas de infección con *Leishmania mexicana* en los diferentes grupos de ratones BALB/c, con y sin tratamiento de Biostim. El mayor grosor del cojinete plantar se observó en los ratones infectados con *L. mexicana* que no recibieron tratamiento con Biostim.

Los ratones que recibieron diferentes dosis de Biostim presentaron menor tamaño de la lesión que el grupo infectado con *L. mexicana* que no fue tratado.

Aunque no se observan diferencias significativas entre las diferentes dosis de Biostim, observamos que los ratones que recibieron Biostim de lunes a viernes con dosis de 0.6mg/ml presentaron menor grosor del cojinete plantar. En cambio, cuando se disminuyó la dosis al 50% el cojinete plantar aumentó ligeramente (Fig.12).

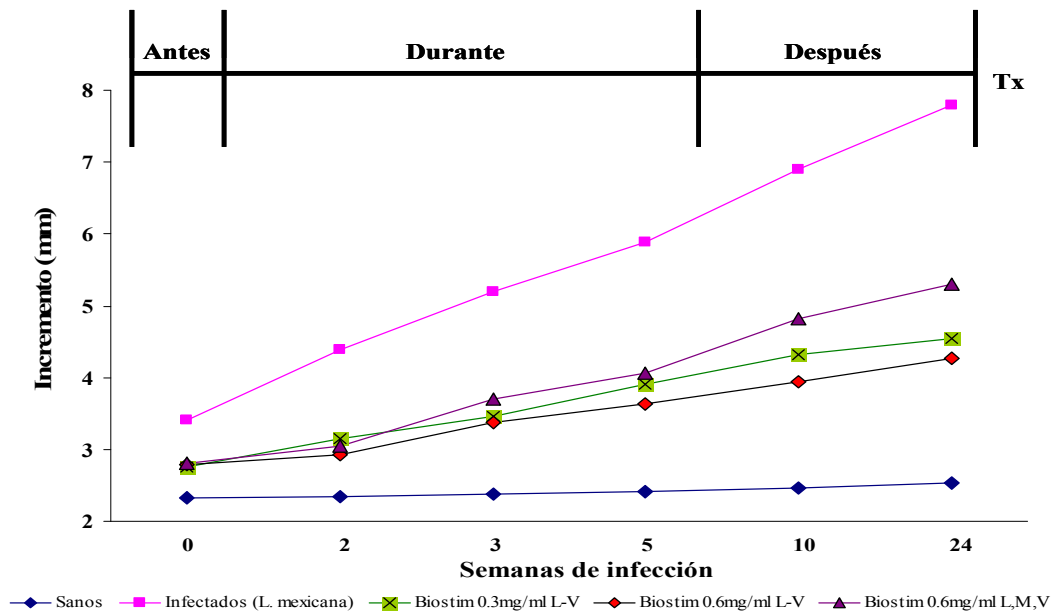


Fig.11. Desarrollo de la lesión en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* antes, durante y después del tratamiento con Biostim. Tx: tratamiento.

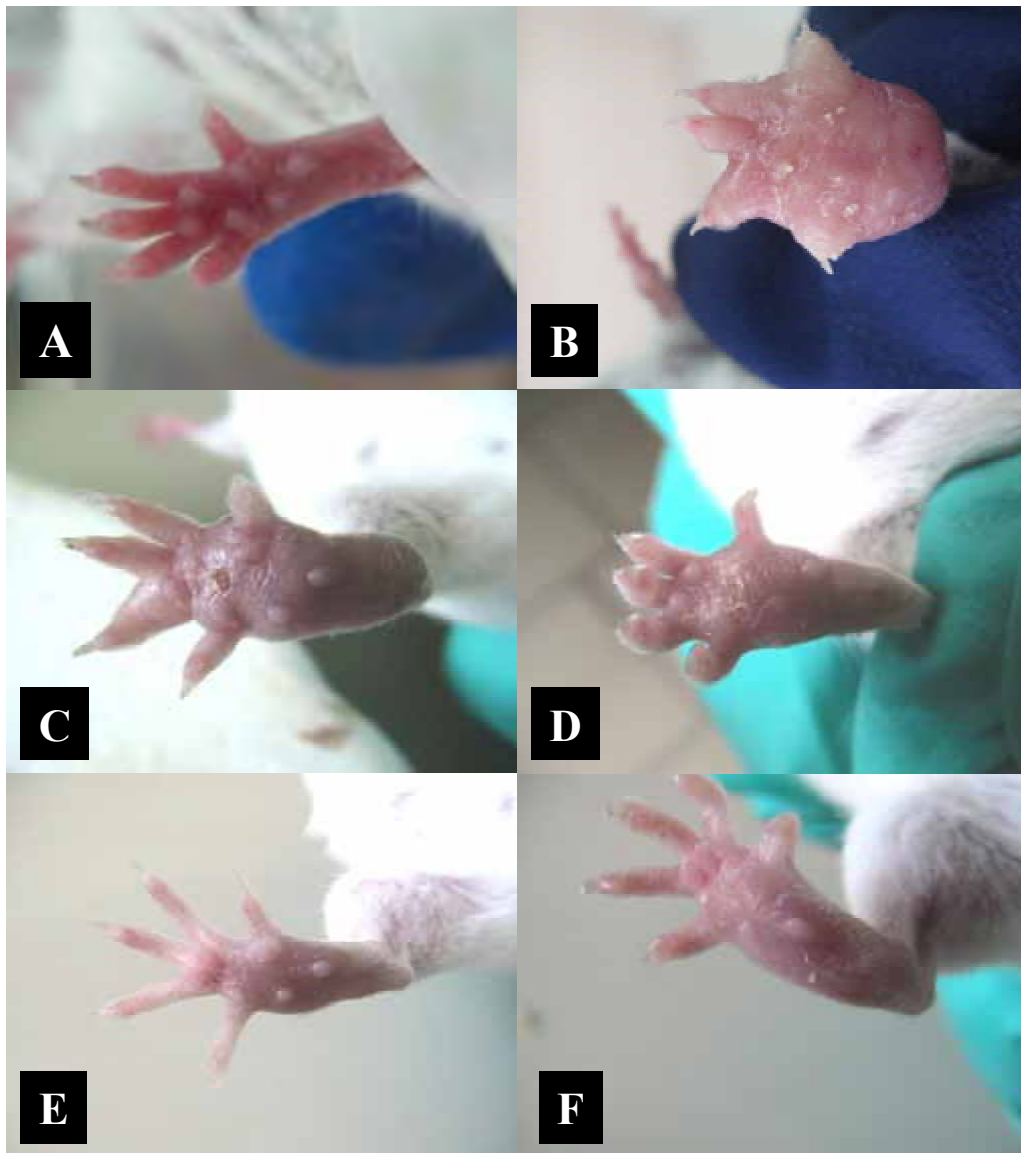


Fig.12. Cojinete plantar de ratones BALB/c. A: ratón sano. B-F: ratones infectados con un millón de promastigotes de *Leishmania mexicana* a los tres meses de infección. B: infectado solo con *L. mexicana*; C-F: ratones con diferente dosis de Biostim; C: 0.6 mg/ml administrado lunes, miércoles y viernes por 3 semanas; D: 0.3 mg/ml administrado de lunes a viernes por 5 semanas; E y F: 0.6 mg/ml administrado de lunes a viernes por dos semanas.

Al analizar el tamaño del cojinete plantar con su peso encontramos una correlación positiva ($R=0.89$; $P < 0.05$) en ratones BALB/c (Fig.13). Mostramos que los ratones infectados con *Leishmania mexicana* presentaron una pata con mayor peso y grosor del cojinete que los ratones tratados con diferentes dosis de Biostim (Fig.14).

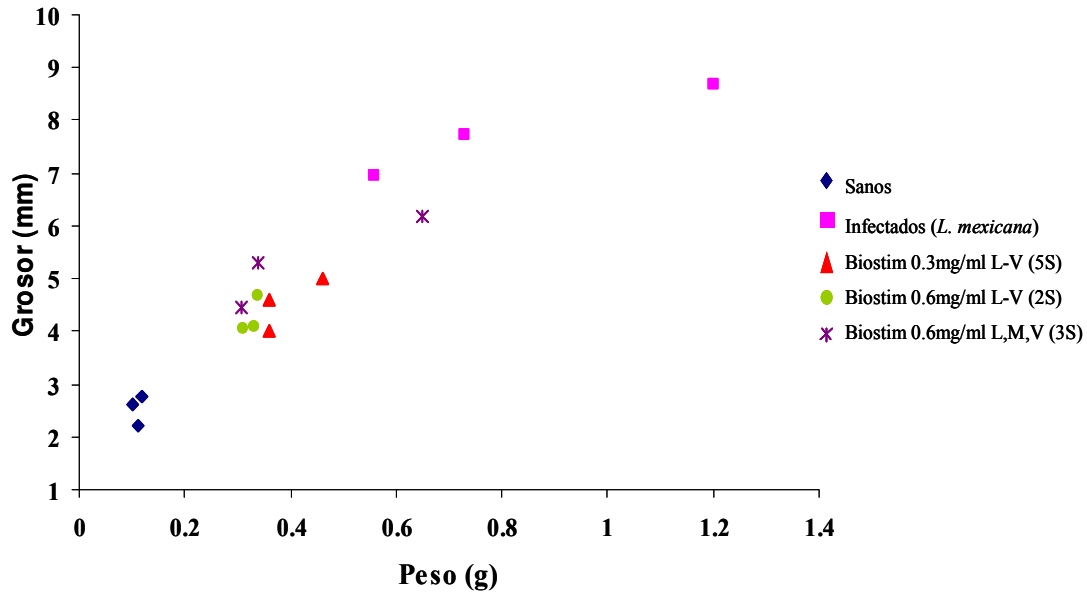


Fig.13. Relación entre grosor del cojinete plantar y peso de la pata en ratones BALB/c. En cada uno de los grupos se analizó un total de tres ratones. $R= 0.89$; $P < 0.05$

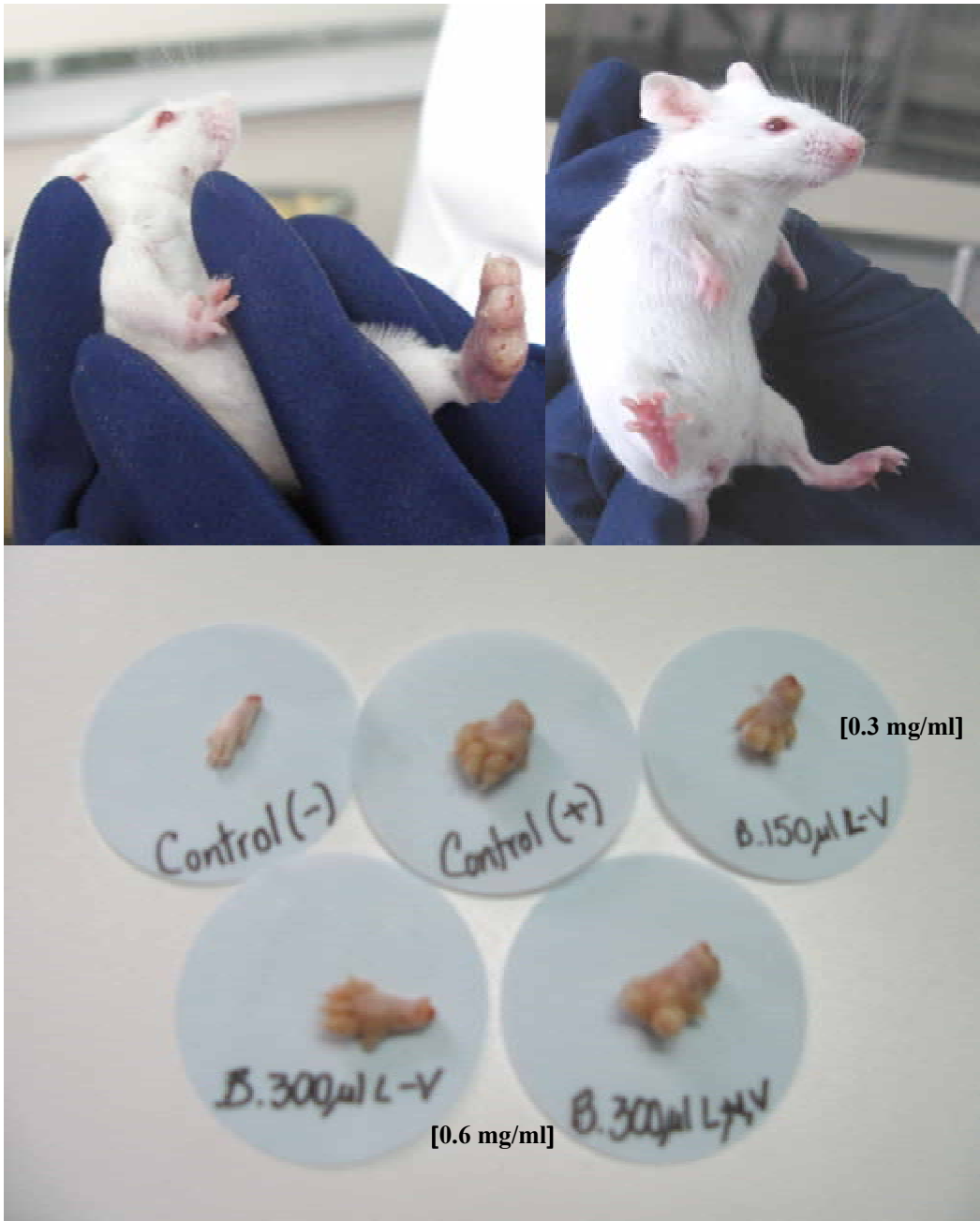


Fig.14. Cojinete plantar de ratones BALB/c a las 24 semanas de infección con un millón de promastigotes de *Leishmania mexicana* y diferentes dosis de Biostim (en corchetes se indica la concentración del Biostim).

6.4. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo y bazo de ratones BALB/c tratados y no tratados con el Biostim

El porcentaje de células T- $\gamma\delta$ varió en ratones BALB/c en bazo y timo. Los ratones no infectados presentaron mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en el timo que en el bazo.

Células T- $\gamma\delta$ en timo

En la Fig.15a y b se observa el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo. El mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ se encontró en ratones sanos (7%) y la infección no modificó el número de células T- $\gamma\delta$ en timo de estos ratones. En contraste, el tratamiento con Biostim a la dosis 0.6mg/ml aplicados en distintos esquemas, disminuyó significativamente el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en los ratones infectados con *Leishmania mexicana* (Fig.15b).

Células T- $\gamma\delta$ en bazo

En la Fig.16a y b se observa el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en bazo. La infección con *Leishmania mexicana* incrementó significativamente el número de células T- $\gamma\delta$ (3.4%) en bazo con respecto a ratones sanos (1%). El tratamiento de Biostim a diferentes dosis y esquemas de tratamiento disminuyó significativamente el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en bazo de ratones infectados con *Leishmania mexicana* (Fig.16b).

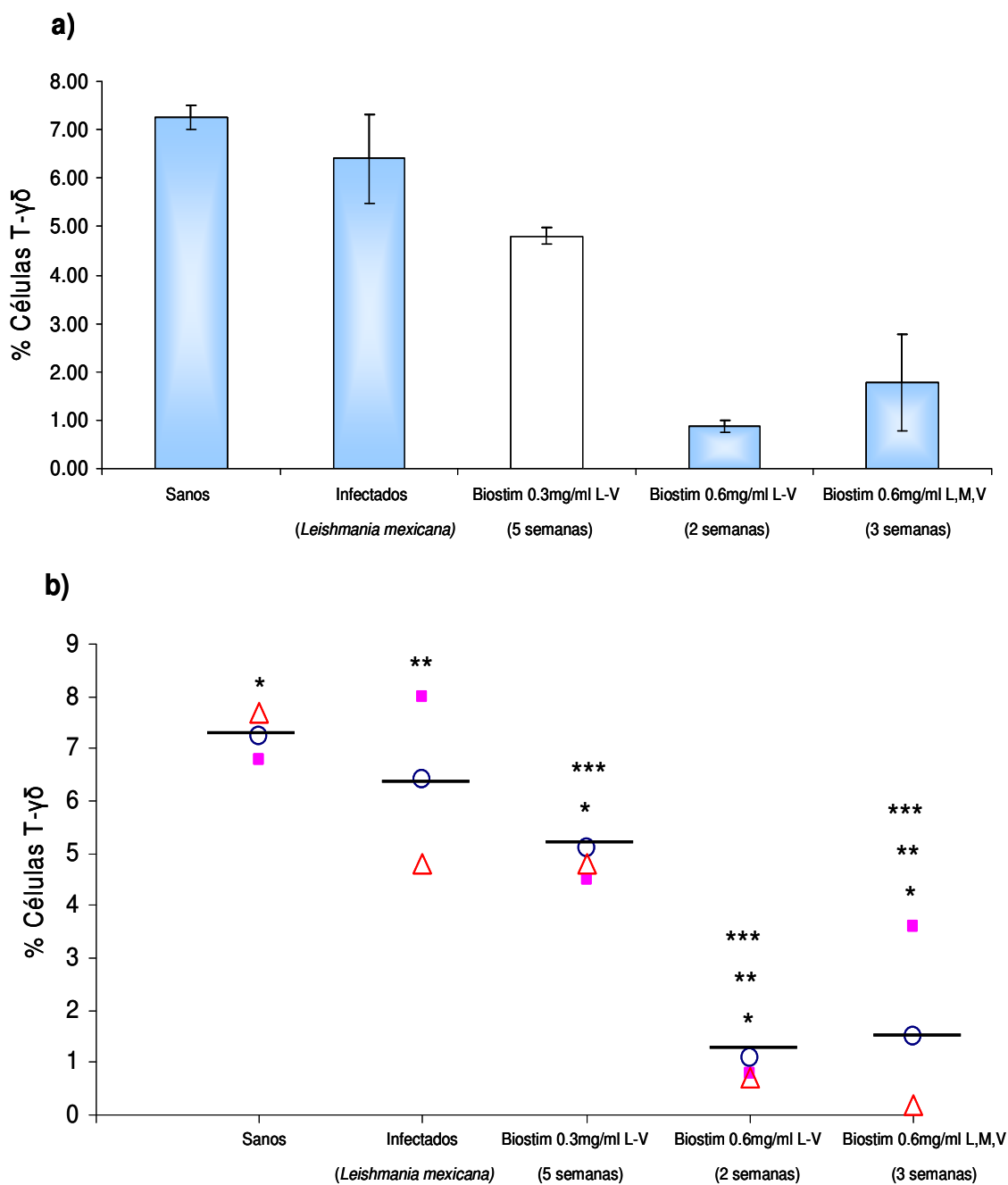


Fig.15. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en timo de ratones BALB/c con y sin tratamiento de Biostim. a) Las barras muestran el promedio \pm E.S. b) Se muestran los datos de cada uno de los ratones (n=3); la línea indica el valor promedio *, **, *** $P < 0.05$

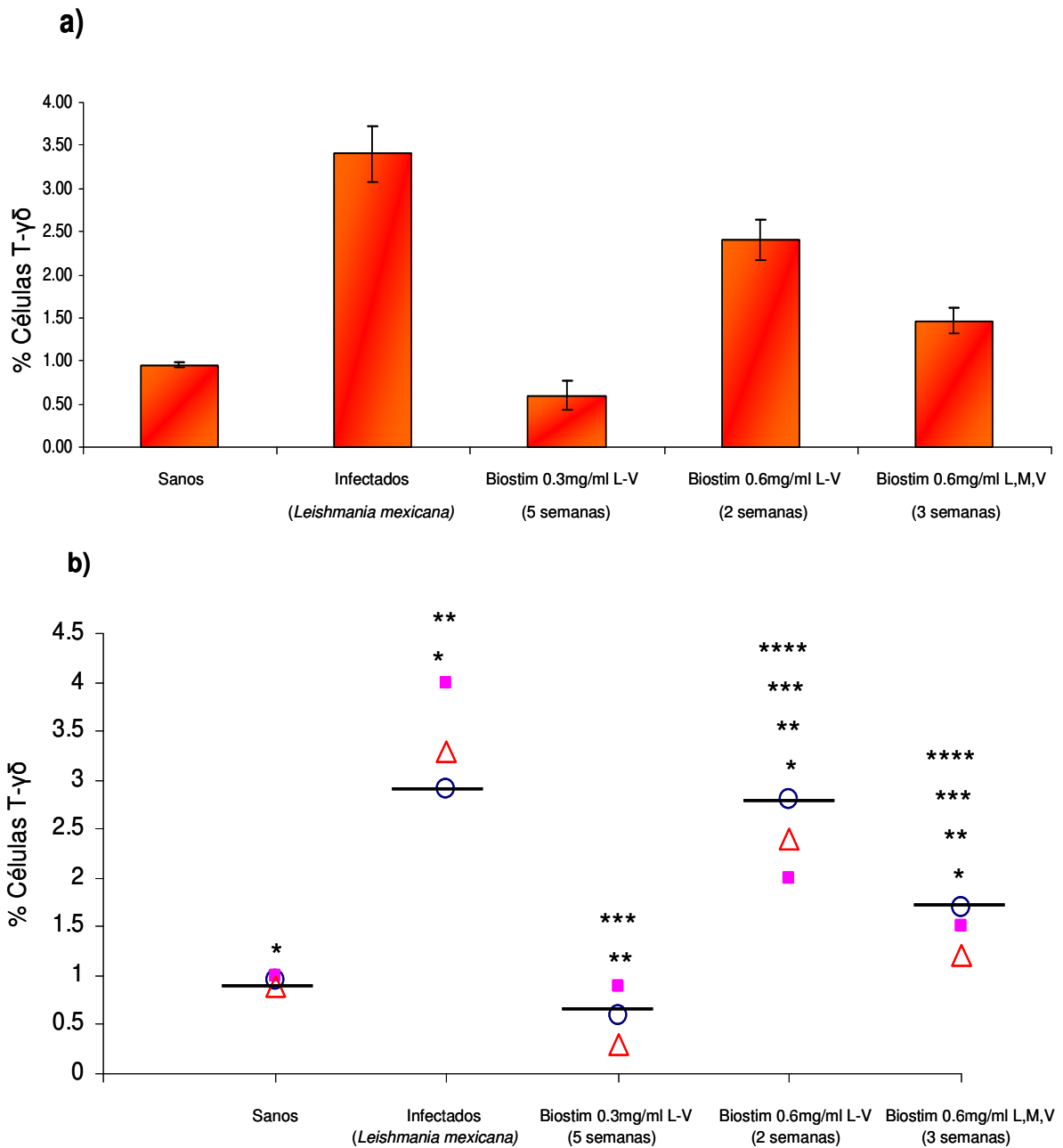


Fig.16. Porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en bazo de ratones BALB/c con y sin tratamiento de Biostim. a) Las barras muestran el promedio \pm E.S. b) Se muestran los datos de cada uno de los ratones (n=3); la línea indica el valor promedio *, **, ***, **** $P < 0.05$

6.5. Producción de IL-10 por células peritoneales estimuladas *in vitro* con Biostim obtenidas de ratones BALB/c tratados previamente con Biostim

Las células peritoneales de ratones infectados con *Leishmania mexicana*, que fueron previamente tratados con diferentes dosis y esquemas de Biostim, produjeron mayor producción de IL-10 cuando el ratón había recibido Biostim a la dosis de 0.3mg/ml de lunes a viernes por cinco semanas. En un segundo paso se re-estimularon las células peritoneales de todos los ratones *in vitro* con 10µg/ml de Biostim durante 24 hrs y se cuantificó su liberación de IL-10. Encontramos que el tratamiento *in vitro* de las células peritoneales con Biostim (10µg/ml) indujo un incremento de dos a cuatro veces la producción de IL-10 con respecto a las células peritoneales no tratados *in vitro* con Biostim (Fig.17).

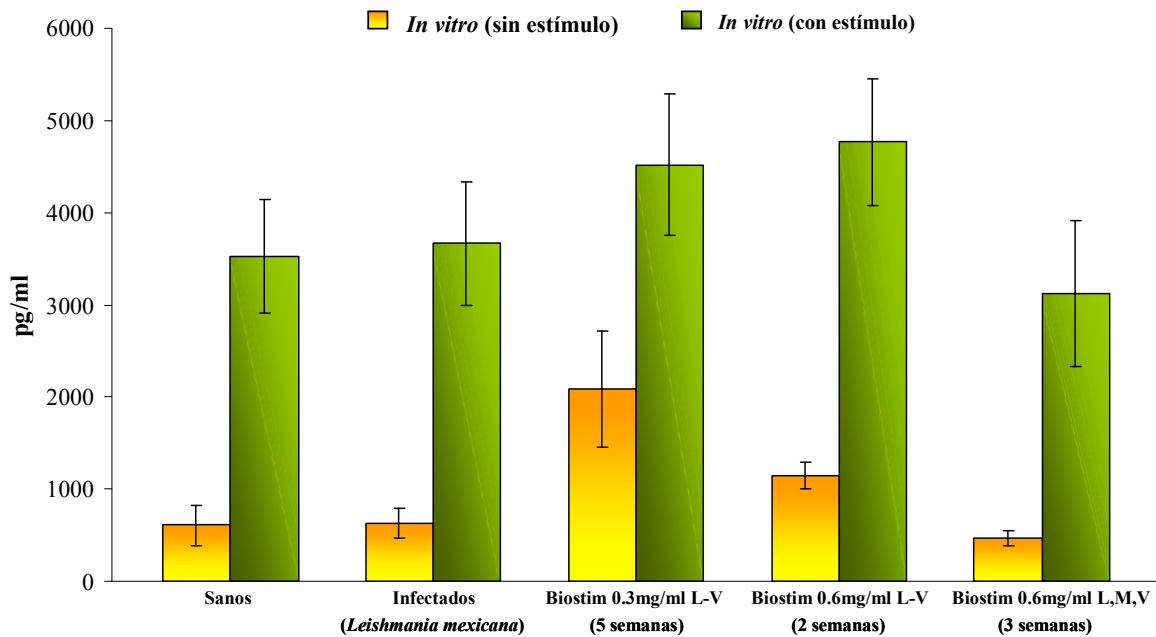


Fig.17. Producción de IL-10 por células peritoneales de ratones BALB/c infectados y tratados con Biostim con distintas dosis y esquemas de tratamiento *in vitro* (barras amarillas). Células peritoneales de los mismos ratones fueron re-estimuladas *in vitro* con 10 µg/ml de Biostim (barras verdes). En cada uno de los grupos se utilizó un total de tres ratones. Las barras muestran el promedio ± E.S.

6.6. Producción de IL-10 por células peritoneales y bazo de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ estimuladas *in vitro* con Biostim

La producción de IL-10 es diferente en peritoneo y bazo. En células peritoneales de las tres cepas de ratón se observó que el tratamiento *in vitro* con 10µg/ml de Biostim indujo la producción de IL-10, tanto en células de ratones sanos como infectados con *Leishmania mexicana*. Células peritoneales obtenidas de ratones C3HeB/FeJ, sanos o infectados, no produjeron IL-10 en estado basal, sin embargo el estímulo *in vitro* con Biostim indujo la producción de IL-10. En las tres cepas se observó que la producción de IL-10 incrementó en las células peritoneales estimuladas con Biostim con respecto a las no estimuladas, tanto en células obtenidas de ratones sanos como de ratones infectados con *Leishmania mexicana* (Fig.18a).

En la Fig.18b se observa la producción de IL-10 en células de bazo, donde se analizaron únicamente dos cepas de ratón (C57BL/6 y C3HeB/FeJ). En ratones sanos las células de bazo estimuladas con Biostim aumentaron más de 10 veces la producción de IL-10 con respecto al basal; sin embargo en los ratones infectados el incremento de IL-10 por células de bazo en los ratones tratados con Biostim no fue significativo.

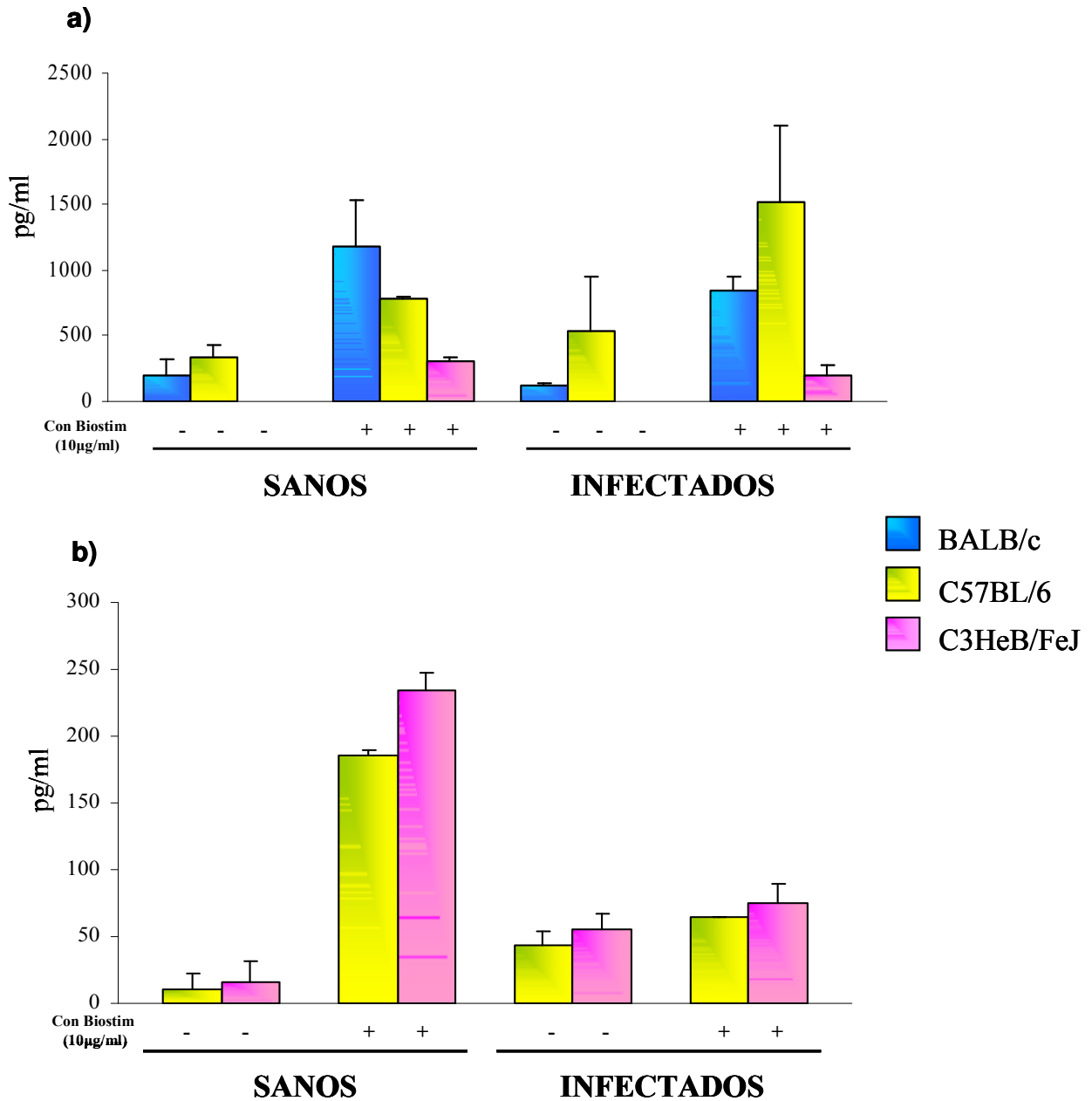


Fig.18. Producción de IL-10 por células peritoneales y de bazo obtenidas de tres cepas de ratón y estimuladas *in vitro* con Biostim. a) Producción de IL-10 en células peritoneales. b) Producción de IL-10 en células de bazo. De cada cepa se analizó un total de 3 ratones. Las barras muestran el promedio \pm E.S.

7. DISCUSIÓN

La leishmaniasis tiene un importante impacto en todo el mundo, afectando a niños, jóvenes y adultos que viven en zonas rurales, selváticas y desérticas. Se encuentra entre las enfermedades parasitarias con mayor número de casos de mortalidad a nivel mundial después de la malaria y forma parte de un importante problema de salud pública (Buxbaum, 2008). Las infecciones con las diferentes especies de *Leishmania* varían marcadamente entre individuo a individuo resultando una gran diversidad de formas clínicas (Awasthi *et al.*, 2004). Los antimoniales pentavalentes son algunos de los medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la leishmaniasis pero estos son poco accesibles, tóxicos y cada vez presentan mayor resistencia. Actualmente se utilizan diversos inmunomoduladores como una alternativa terapéutica aunado al estudio de diversos componentes del sistema inmune.

Dentro de las células que participan como primera línea de defensa en la leishmaniasis se consideran a las células T- $\gamma\delta$ (Saha *et al.*, 1999). Sin embargo, no se conoce la relación entre células T- $\gamma\delta$ y Biostim en la leishmaniasis. Por dicho motivo en el presente trabajo analizamos las células T- $\gamma\delta$ en tres cepas de ratones en estado basal y durante la infección con *Leishmania mexicana* y adicionalmente analizamos si la administración de un inmunomodulador como Biostim modifica la evolución del padecimiento en ratones susceptibles BALB/c infectados con *L. mexicana*.

El Biostim se ha utilizado como inmunomodulador por su efecto protector en diferentes enfermedades con infecciones crónicas respiratorias, infecciones causadas por hongos y virus excepto en protozoarios. En este trabajo se observó que el cojinete plantar de ratones hembras BALB/c infectadas con *Leishmania mexicana* disminuyó

con la administración del Biostim, aunque hubo ligeras variaciones dependientes de las diferentes dosis y tiempos administrados. Encontramos que el tamaño de la lesión y el peso de la pata infectada presentaron una correlación positiva, donde el mayor peso y grosor del cojinete plantar se registró en los ratones infectados con *Leishmania mexicana*. Ambos parámetros disminuyeron en los grupos de ratones infectados y tratados con diferentes dosis de Biostim. Sin embargo, queda por establecerse si ambos parámetros se reflejen en la carga parasitaria.

Nuestros resultados indican que el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ depende de su localización, cepa de ratón y tratamiento. Encontramos un mayor porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en el timo (6.4%) de los ratones BALB/c sanos o infectados que en el bazo (3.4%). Nuestros datos contrastan con la literatura (Rosat *et al.*, 1993), donde se reporta un alto porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c en el bazo (12%), incrementándose conforme pasaron los días de infección. Estos datos posiblemente se deban al número de parásitos inoculados y la especie de *Leishmania*. Estos mismos autores reportaron en ratones resistentes (CBA/J) a *L. major* entre 3 al 12% de células T- $\gamma\delta$. Nosotros encontramos entre 1 al 2% de estas células en ratones resistentes C3HeB/FeJ infectados con *Leishmania mexicana*. Nuestros datos también reflejan que la infección de ratones C57BL/6 con *Leishmania mexicana* incrementa los porcentajes de células T- $\gamma\delta$ tanto en el timo como en el bazo, mientras que en ratones C3HeB/FeJ la infección con *Leishmania mexicana* únicamente indujo un incremento de estas células en el timo y en ratones BALB/c incrementaron únicamente en bazo. Rosat *et al.*, (1993) reportaron que en las cepas resistentes hay un gran porcentaje de células T- $\gamma\delta$ (12%) alrededor del día 30 de infección, posteriormente este porcentaje disminuyó (2%) conforme la resolución de la lesión. Nuestros datos también demuestran que ratones resistentes a *Leishmania*

mexicana (C3HeB/FeJ) disminuyen el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en bazo durante el transcurso de la infección.

Nuestros datos de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c son similares a los reportados por Yamashita *et al.*, (1999) quienes registraron un 3.8% de células T- $\gamma\delta$ en hígado y también son similares a los de Rosat *et al.* (1993) quienes reportan un 4% de células T- $\gamma\delta$ en nódulos linfáticos de ratones susceptibles BALB/c, aunque es importante señalar que los estudios no fueron realizados en los mismos órganos.

Finalmente podemos decir que el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ se puede modificar con la administración de fármacos o inmunomoduladores. En nuestros datos, el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* disminuyó cuando se administró el Biostim, independientemente de su localización. Estos datos coinciden con Rosat *et al.* (1993), donde se demostró que los ratones BALB/c infectados con *L. major* y tratados con Glucantime reducen el porcentaje de estas células T- $\gamma\delta$ en bazo hasta un 50%.

Con respecto a la producción de IL-10, encontramos que el Biostim *in vitro* incrementó la producción de IL-10 en células de los diferentes órganos (peritoneo y bazo), independientemente de la cepa de ratón, tanto en los ratones sanos como en los infectados con *Leishmania mexicana*. La mayor producción de IL-10 se observó en aquellos ratones que recibieron tratamiento con mayor dosis (0.6mg/ml) de lunes a viernes. Estos resultados coinciden con lo reportado en 1990 por Nimier y colaboradores donde publicaron que la administración oral y la estimulación *in vitro* con 10 μ g/ml de Biostim aumentaron la producción de citocinas como la IL-10 en células de bazo y nódulo linfáticos de ratones DBA/2 infectados con diferentes

patógenos. La diferencia entre nuestro trabajo y el de Nimier fue la cepa de ratón (CBA/2).

En este trabajo encontramos que la cepa BALB/c es significativamente más susceptible a la infección por *Leishmania mexicana* que las cepas C57BL/6 y C3HeB/FeJ. Este dato contrasta con la literatura, donde se reporta que tanto ratones BALB/c como C57BL/6 son susceptibles a la infección por *Leishmania mexicana*, aunque en etapas iniciales C57BL/6 cursa con un control temporal de la enfermedad y en etapas tardías se vuelven igualmente susceptibles que BALB/c (Aguilar *et al.*, 2002). Nuestros datos posiblemente se deban a la corta duración del experimento durante la cual los ratones C57BL/6 aun logran controlar la infección por *Leishmania mexicana*. Además se encontró que hay una marcada diferencia en la respuesta de linfocitos T- $\gamma\delta$ a la infección por *Leishmania mexicana* entre las cepas susceptibles y resistentes a la leishmaniasis. Mientras que en ratones susceptibles BALB/c y C57BL/6 se observó un incremento de células T- $\gamma\delta$ en bazo durante la infección con *Leishmania mexicana*, en los ratones resistentes C3HeB/FeJ se observó una reducción significativa de las células T- $\gamma\delta$ en el bazo durante la infección. La correlación entre la susceptibilidad a la infección por *Leishmania mexicana* y el incremento en células T- $\gamma\delta$ en bazo de ratones también se pudo demostrar con la aplicación del inmunomodulador Biostim. La aplicación de distintas dosis y distintos esquemas de Biostim a ratones BALB/c infectados llevó a una reducción en el tamaño de la lesión del cojinete plantar y adicionalmente llevó a una disminución significativa en el número de células T- $\gamma\delta$ en los bazos de estos ratones, independientemente de las dosis y los esquemas de Biostim utilizados. Aun se desconocen los mecanismos mediante los cuales los linfocitos T- $\gamma\delta$ ejercen un efecto facilitador para la infección por *Leishmania mexicana*.

Adicionalmente no queda claro si el efecto protector del Biostim únicamente está mediado por su capacidad de reducir células T- $\gamma\delta$ o si existen mecanismos adicionales.

Llama la atención que el tratamiento con Biostim no únicamente redujo las células T- $\gamma\delta$ en bazo, sino que también disminuyó significativamente el porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en el timo de estos ratones. Este trabajo demuestra que el inmunomodulador Biostim modifica tanto las células T- $\gamma\delta$ en órganos linfoides secundarios, como es el bazo, y en órganos linfoides primarios, como es el timo.

Para analizar si la disminución de la lesión en ratones tratados con Biostim se asociaba con la producción de citocinas regulatorias de la respuesta inflamatoria se analizó la producción de IL-10 en esplenocitos y células peritoneales obtenidas de tres cepas de ratón, sanos e infectados con *Leishmania mexicana*, tratados *in vitro* con Biostim. En ambos grupos celulares encontramos que el Biostim induce la producción de IL-10. Adicionalmente encontramos que la incubación *in vitro* de células peritoneales, obtenidos de ratones BALB/c sanos o infectados con *L. mexicana* y previamente tratados con diferentes dosis y esquemas de Biostim, induce la producción de IL-10 en células peritoneales. Aun se desconoce que tipo de célula de bazo es responsable de la producción de IL-10 y si la disminución de células T- $\gamma\delta$ en ratones tratados con Biostim está relacionada con este fenómeno.

Queda por estudiarse si ambos fenómenos están relacionados entre si o si actúan de manera independiente. En caso de existir una asociación entre ambos fenómenos se pudiera especular que el incremento de IL-10 por Biostim pudiera ser causa o efecto de la disminución de las células T- $\gamma\delta$.

El efecto protector observado con Biostim posiblemente radique en el control de la inflamación que ha sido reportado como facilitador para la infección de *Leishmania mexicana* (Villaseñor-Cardoso *et al.*, 2008). La inducción de IL-10 regula negativamente la producción de citocinas proinflamatorias, limitando la afluencia de células que pudieran servir de refugio y santuario para el parásito. Será interesante analizar los mecanismos regulatorios de la inflamación que ejercen células T- $\gamma\delta$ en la leishmaniasis.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo observamos que:

- El porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones sanos e infectados con *Leishmania mexicana* depende de su localización, cepa de ratón y tratamiento.
- El tamaño de la lesión depende de la cepa de ratón.
- El peso y tamaño del cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* disminuyó con la administración del Biostim.
- El porcentaje de células T- $\gamma\delta$ en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana* disminuyó con la administración de Biostim.
- El tratamiento *in vitro* con Biostim de células de bazo o del peritoneo, obtenidos de tres cepas de ratones, sanos ó infectados, incrementó su producción de IL-10.
- El efecto protector, inducido por Biostim posiblemente se deba a una combinación entre la disminución del número de células T- $\gamma\delta$ y el aumento de IL-10. Ambas disminuyen la magnitud de la inflamación.
- El Biostim puede ser una alternativa terapéutica más accesible y menos riesgosa para los pacientes con Leishmaniasis.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, T. F., Laman, J. D., Van, M. M., Adorini, L., Muraille, E., and Carlier, Y. 2002. Endogenous interleukin-12 is critical for controlling the late but not the early stage of *Leishmania mexicana* infection in C57BL/6 mice. *Infect. Immun.* **70**(9): 5075-5080.
- Alexander, J., Satoskar, A. and Russell, D. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.* **112**: 2993-3002.
- Andrade-Narvaez, F. J., Medina-Peralta, S., Vargas-Gonzalez, A., Canto-Lara, S. B. and Estrada-Parra, S. 2005. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the yucatán peninsula, México. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* **47**(4): 191-194.
- Andrew, E. M., Carding, S. R. 2005. Murine $\gamma\delta$ T cells in infections: beneficial or deleterious?. *Microbes Infect.* **7**: 529-536.
- Antonelli, L. R. V., Dutra, W. O., Oliveira, R. R., Torres, K. C. L., Guimarães, L. H., Bacellar, O. and Gollob, K. J. 2006. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Infect. Immun.* **74**(11): 6317-6323.
- Awasthi, A., Mathur, R. K. and Saha, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* **119**: 238-258.
- Barroso, P. A., Marco, J. D., Calvopina, M., Kato, H., Korenaga, M., Hashiguchi, Y. 2007. A trial of immunotherapy against *Leishmania amazonensis* infection in vitro and in vivo with Z-100, a polysaccharide obtained from *Mycobacterium tuberculosis*, alone or combined with meglumine antimoniate. *J. Antimicrob. Chemoter.* **59**(6): 1123-1129.

- Born, W. K., Reardon, C. L. and O'Brien, R. L. 2006. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **18**: 31-38.
- Born, W. K., Jin, N., Aydintug, M. K., Wands, J. M., French, J. D., Roark, C. L. and O'Brien, R. L. 2007. $\gamma\delta$ T Lymphocytes-Selectable Cells Within the Innate System? *J. Clin. Immunol.* **27**(2): 133-144.
- Buxbaum, L. U. 2008. A detrimental role for IgG and Fc γ RIII in *Leishmania mexicana* infection. *Immunol. Res.* **42**(1-3): 197-209.
- Camacho, M. R., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Croft, S. L., Phillipson, J. D. 2000. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Med.* **66**(5): 478-480.
- Carding, S. R. and Egan, P. J. 2002. $\gamma\delta$ T CELLS: Functional plasticity and heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**(5): 336-345.
- Casetti, R. and Martino, A. 2008. The plasticity of $\gamma\delta$ T Cells: Innate Immunity, Antigen Presentation and New Immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* **5**(3): 161-170.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. and Boelaert, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat. Rev.* **5**: S7-S16.
- Chien, Y. and Konigshofer, Y. 2007. Antigen recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Immunol. Rev.* **215**: 46-58.
- Costa, J. F., Kiperstok, A. C., David, J. P., David, J. M., Giulietti, A. M., de Queiroz, L. P., dos Santos, R. R., Soares, M. B. 2007. Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. *Fitoterapia.* **78**(7-8): 510-514.

- Di Giorgio, C., Lamidi, M., Delmas, F., Balansard, G., Ollivier, E. 2006. Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from *Nauclea diderrichii*. *Planta Med.* **72**(15): 1396-1402.
- Di Giorgio, C., Delmas, F., Tueni, M., Cheble, E., Khalil, T., Balansard, G. 2008. Alternative and complementary antileishmanial treatments: assessment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *J. Altern Complement Med.* **14**(2): 157-162.
- Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., Chatterjee, M. 2007. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. 2007. *J. Med. Microbiol.* **56**(5): 629-636.
- Dutta, A., Sarkar, D., Gurib-Fakim, A., Mandal, C., Chatterjee, M. 2008. In vitro and in vivo activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol. Res.* **102**(6): 1235-1242.
- Estaquier J., Bloy C., Corallo F., Peron C., Ameisen J. C. 1998. The immunomodulating glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae* RU41740 exerts a suppressive effect on human monocyte death by apoptosis. *Immunopharm.* **39**(2): 157-164.
- Gajewski, T. F. 2007. The expanding universe of regulatory T cell subsets in cancer. *Immunity.* **27**: 185-187.
- Gamboa-León, M. R., Aranda-González, I., Mut-Martín, M., García-Miss, M. R. and Dumonteil, E. 2007. In vivo and In Vitro Control of *Leishmania mexicana* due to Garlic-induced NO Production. *Scand. J. Immunol.* **66**(5): 508-514.
- Ghazanfari, T., Hassan, Z. M., Ebtekar, M., Ahmadiani, A., Naderi, G. and Azar, A. 2000. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* **52**(5): 491-495

- Haas, W. 1993. Gamma/delta cells. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 637-685.
- Handman, E. and Bullen, D. V., R. 2002. Interaction of Leishmania with the host macrophage. *TRENDS Parasitol.* **18**(8): 332-334.
- Hayday, A. and Geng, L., 1997. $\gamma\delta$ cells regulate autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 884-889.
- Herwaldt, B. L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* **354**: 1191-1199.
- Kopacz, J. and Kumar, N. 1999. Murine $\gamma\delta$ T lymphocytes elicited during *Plasmodium yoelii* infection respond to *Plasmodium* Heat Shock Proteins. *Infect. Immun.* **67**(1): 57-63
- Lagler, H., Willheim, M., Traunmüller, F., Wahl, K., Winkler, H., Ramharter, M., Graninger, W. and Winkler, S. 2003. Cellular Profile of Cytokine Production in a Patient with Visceral Leishmaniasis: $\gamma\delta^+$ T cell express both type 1 cytokines and interleukin-10. *Scand. J. Immunol.* **57**: 291-295.
- Mackay, I. M. D. and Rosen, F. S. M. D. 2005. The immune system: First parts. *Adv. Immunol.* **343**(1): 37-48.
- Migliorati, G., Guidi, G., Cannarile, L. and Riccardi, C. 1989. Effect of Biostim (RU 41.740) on natural killer cell generation from bone marrow precursors. *Int. J. Immunopharmac.* **11**(1): 77-82.
- Modlin, R. L., Pirmez, C., Hofman, F. M., Torigian, V., Uyemura, K., Rea, T. H., Bloom, B. R. and Brenner, M. B. 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta$ T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature.* **339**: 544-548.

- Moser, B. and Brandes, M. 2006. $\gamma\delta$ T cells: an alternative type of professional APC. *TRENDS Immunol.* **27**(3): 112-118.
- Nimier, K., Wolff, F., Yves, A. P., Guy, G. D., Bloy, C. 1999. Protective effect of RU 41740, a bacterial immunomodulator, against experimental infections: induction of cytokine and immunoglobulin release in mice after oral administration. *Int. J. Immunopharmacol.* **21**: 561-574.
- Pedraza-Sánchez, S., González-Hernández, Y., Escobar-Gutiérrez, A., Ramachandra, L. 2006. The immunostimulant RU41740 from *Klebsiella pneumoniae* activates human cells in whole blood to potentially stimulate innate and adaptive immune responses. *Int. Immunopharmacol.* **6**: 635-646.
- Pérez-Santos, J. L. M. and Talamás-Rohana, P. 2001. *In vitro* indomethacin administration upregulates interleukin-12 production and polarizes the immune response towards a Th1 type in susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* **23**: 599-606.
- Reed, S. G. and Scott, P. 1993. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* **5**: 524-531.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **7**: 581-596.
- Rey, J. 2007. La leishmaniosis. Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. pp. 1-5.
- Rodríguez, N. 2003. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relación con el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatología Venezolana.* **41**(1): 3-9.
- Rosat, J. P., MacDonald, R. and Louis, J. 1993. A role for $\gamma\delta^+$ T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. *J. Immunol.* **150**(2): 550-555.

- Rosat, J. P., Conceição, S. F., Waanders, G., Beermann, F., Wilson, A., Owen, M., Hayday, A., Huang, S., Aguet, M., MacDonald, R. and Louis, J. 1995. Expansion of $\gamma\delta^+$ T cells in BALB/c mice infected with *Leishmania major* is dependent upon Th2-type CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.* **63**(8): 3000-3004.
- Rosenthal, E. and Marty, P. 2003. Recent understanding in the treatment of Visceral Leishmaniasis. *J. Post. Med.* **49**: 61-68.
- Russo, D. M., Armitage, R. J., Barral-Netto, M., Barral, A., Grabstein, K. H. and Reed, S. G. 1993. Antigen-reactive $\gamma\delta$ T cells in human Leishmaniasis. *J. Immunol.* **151**(7): 3712-3718.
- Sacks, D. L. and Melby, P. C. 1998. Animal models for the analysis of immune responses to Leishmaniasis. *Curr. Protocols Immunol.* 19.2.1-19.2.20.
- Sacks, D. and Kamhawi, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 453-483.
- Saha, A., Chakrabarti, G., Sen, S. and Bandyopadhyay, S. 1999. *Leishmaniasis donovani* parasites interact with γ/δ^+ human peripheral blood T cells and induce susceptibility to NK cell-mediated lysis. *Scand. J. Immunol.* **50**: 588-595.
- Salerno, A. and Dieli, F. 1998. Role of $\gamma\delta$ T lymphocytes in immune response in humans and mice. *Crit. Rev. Immunol.* **18**: 327-357.
- Spisek, R., Brazova, J., Rozkova, D., Zapletalova, K., Sediva, A., Bartunkova, J. 2004. Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. *Vaccine.* **22**: 2761-2768.
- Tripathi, P., Singh, V. and Naik, S. 2007. Immune response to Leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**: 229-242.

Velasco, O. 1994. La leishmaniasis con especial referencia a México. *Colección de cuadernos del INDRE*. SSA. México. pp. 1-59.

Villaseñor-Cardoso, M. I., Salaiza, N., Delgado, J., Gutiérrez-Kobeh, L., Pérez-Torres, A., and Becker, I. 2008. Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. *Parasite. Immunol.* **30**: 425-434.

Yamashita, T., Miyata, H., Miyaji, C., Watanabe, H., Abo, T., Kobayakawa, T., Kaneko, A., Sendo, F. 1999. CD4⁺ and/ or $\gamma\delta^+$ T cells in the liver spontaneously produce IL-4 in vitro during the early phase of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Acta Trop.* **73**: 109-119.

Zambrano-Villa, S., Rosales-Borjas, D., Carrero, J., C. and Ortiz-Ortiz, L. 2002. How protozoan parasites evade the immune response. *TRENDS Parasitol.* **18**(6): 272-278.

http://www.nature.com/.../fig_tab/ncpneph0255_F4.html

<http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2036/paginas/materia%2010-36.html>

<http://www.wehi.edu.au/facweb/indexresearch.php?id=12>

<http://www.ufr.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm>

APÉNDICE

ELISA tipo sandwich

a) Buffer de unión:

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0.1 M a pH= 9.0 (SIGMA, no. catálogo: S-7907)

Na_2HPO_4 : P.M. 142.0

1 M -----142 g ----- 1 lt de agua destilada

0.1 M ---- 14.2 g ---- 1 lt de agua destilada

Ajustar el pH con HCl concentrado a pH=9.0 filtrar y guardarse a 4°C.

b) Solución para lavar las placas: PBS 1X con 0.01% de Tween 80

Por cada litro de PBS 1X pH=7.2 a 7.4 se agregan 100 μl de Tween 80 y se agita suavemente; se filtra y se guarda a temperatura ambiente.

c) Solución bloqueadora:

Se preparan 100 ml de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH)

NaOH: P.M. 40.0

1 N ----40 g ---- 1 lt de agua destilada

0.1 N ----4 g ---- 1 lt de agua destilada

0.1 N ----0.4 g ---- 100 ml de agua destilada

Para disolver el NaOH en los 100 ml de agua se calienta (en un agitador con calor) y cuando empieza a hervir se agregan lentamente 5.0 g de caseína. Se agita lentamente hasta que la caseína se disuelva, cuando esto ocurre se apaga el calor y se van agregando lentamente 900 ml de PBS 0.15M pH= 7.2 a 7.4 mientras se sigue agitando. Una vez que la solución

se enfría se le ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado. Se hacen alícuotas de aproximadamente 40 ml y se congelan a -20°C.

La caseína es de marca SIGMA, con no. de catálogo A-7078 y se encuentra a 4°C.

d) Soluciones utilizadas para diluir el anticuerpo de detección:

1) Albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20:

Se disuelve 1 g de albúmina bovina en 100 ml de PBS 1X pH=7.2 a 7.4 y se agregan 50 µl de Tween 20. Se filtra y se guarda a 4°C. La albúmina bovina es de marca SIGMA, con no. de catálogo A- 7888 y esta a 4°C.

2) Albúmina humana:

1 % ---- 1 ml de albúmina ---- 100 ml de agua destilada

0.1 % ---- 0.1 ml de albúmina ---- 100 ml de agua destilada

0.1 % ----50 µl de albúmina ---- 50 ml de agua destilada

3) Tween 20 (SIGMA, no. catálogo: P-1379):

1 % ---- 1 ml de Tween 20 ---- 100 ml de agua destilada

0.05 % ---- 0.05 ml de Tween 20 ---- 100 ml de agua destilada

0.05 % ----25 µl de Tween 20 ---- 50 ml de agua destilada

e) Buffer de sustrato:

Pesar en un vaso de precipitado de plástico 10 g de dietanolamina, agregar 70 ml de agua destilada y 500 µl de una solución 0.1 M de cloruro de magnesio (MgCl₂), agitar y ajustar el pH 9.8 con HCl concentrado. Se filtra y se guarda a 4°C tapado con papel aluminio. La dietanolamina es de marca SIGMA, con no. de catálogo D-2286 y está a temperatura ambiente.

MgCl₂: P.M. 203.31

0.1 M ---- 20.331 g ---- 1 lt de agua destilada

0.1 M ---- 0.0203 g ---- 1 ml de agua destilada.

Citometría de Flujo

a) FACS (Becton Dickinson)

b) Anticuerpos

(BD Biosciences, no. cat. 553178) R-Phycoerythrin (R-PE)-Conjugated Hamster Anti-Mouse $\gamma\delta$ T-Cell Receptor Monoclonal Antibody.

(BD Biosciences, no. cat. 550085) R-PHYCOERYTHRIN (R-PE)-CONJUGATED HAMSTER IgG2*, κ MONOCLONAL IMMUNOGLOBULIN ISOTYPE CONTROL (ANTI-KEYHOLE LIMPET HEMOCYANIN)

c) Paraformaldehído al 2%

En un vaso de precipitados se diluye 4 g de paraformaldehído (SIGMA, no. catálogo: P6148-500G) en 200 ml de PBS 1X y se tapa con un papel aluminio; se agita y calienta al mismo tiempo. Cuando la mezcla se ve clara y transparente se coloca en hielo, se filtra en condiciones estériles y se guarda a 4°C.

Preparación celular

a) Medio RPMI 1640 (GIBCO, no. catálogo. 31800-014)

Para preparar 2 lt de medio para células se agregan .586 mg de Glutamina, 20 ml. de Penicilina (GIBCO, no catálogo: 15070) dos sobres de medio RPMI 1640 y 4 g de Bicarbonato de Sodio; se agita, se ajusta con HCl a un pH=7.2 y se filtra en condiciones estériles. Se colocan en botellas de 500 ml y se mantienen en el cuarto de temperatura constante.

b) Solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS)

c) Solución Lítica

Para preparar 500 ml se toman 4.14g de cloruro de amonio, 0.4g de bicarbonato de potasio, 0.02g de EDTA y se diluyen en 500 ml de agua MILLI Q; se lleva a un pH de 7.4 y se filtra en condiciones estériles. La solución se coloca en una botella de 500 ml y se mantiene a 4°C.

ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de antígenos
° C	Grados centígrados
CD	Cluster of differentiation
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
FasL	Ligando de Fas (induce apoptosis)
F1-ATP	Molécula de estrés celular
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos y macrófagos
gp63	glicoproteína 63
HSP-60	Proteína de choque térmico (molécula de estrés celular)
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniasis cutánea diseminada
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis visceral
M-CSF	Factor estimulador de citocinas de macrófagos
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
min	minutos
MIC-A	Molécula de estrés celular
MIC-B	Molécula de estrés celular
ml	mililitro
mm	milímetro
NK	Células asesinas naturales (Natural Killer)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio RPMI 1640
SFB	Suero fetal bovino
spp.	espécies
T-αβ	Células T alfa beta
T-γδ	Células T gamma delta
Th	Célula T ayudadora (T helper cell)
Th-1	Célula T ayudadora Tipo 1
Th-2	Célula T ayudadora Tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
T _{reg}	Célula T reguladora