



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE CÉLULAS T NK1.1 EN LA INFECCIÓN
DE RATONES C57BL/6 POR *Leishmania mexicana* Y SU
MODULACIÓN POR GLICOCONJUGADOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

(B I O L O G O)

P R E S E N T A:

JAIME ZAMORA CHIMAL



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. INGBORG DOROTHEA BECKER
FAUSER
(2011)**



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

Zamora
Chimal
Jaime
015959554074
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de ciencias
Bilología
406080420

2. Datos del tutor

Dra.
Becker
Fauser
Ingeborg Dorothea

3. Datos sinodal 1

Dra.
Flisser
Steinbruch
Ana

4. Datos sinodal 2

Dra.
Gutiérrez
Kobeh
Laila

5. Datos sinodal 3

Dr.
Delgado
Domínguez
José Sotero

6. Datos sinodal 4

Dr.
Castell
Rodríguez
Andrés Eliú

Agradecimientos

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por todas las discusiones y el tiempo que dedico en mi formación profesional.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por su cotutoria en la realización de este trabajo de investigación.

A los miembros del jurado de examen profesional: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, Dra. Ana Flisser Steinbruch, Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Dr. José Sotero Delgado Domínguez y el Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez por la revisión de la tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Bioterio del Departamento de Medicina Experimental por suministrar los animales de laboratorio.

A todos los compañeros del Departamento de Medicina experimental por todas las enseñanzas, el ánimo y los consejos para la realización de este trabajo.

Dedicatoria

A mis padres por haberme apoyado en todo momento de mi vida, siempre los llevo conmigo, esto es por ustedes.

A mis hermanos por siempre escucharme y apoyarme en mis metas.

A mi novia Aratzeni Mercado Robledo, por escucharme siempre en los avances y las ideas que surgían al desarrollarse este trabajo, por su tiempo, por su apoyo, por su comprensión y por haberme enseñado tantas cosas.

Se agradece el apoyo de: PAPIIT IN220109 y CONACYT 83064, para la realización de este proyecto

Gracias

Índice General	V
RESUMEN	7
I. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Leishmaniasis	8
1.2. Clasificación de <i>Leishmania</i>	10
1.3. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	11
1.4. Cuadros clínicos de Leishmaniasis	14
1.4.1. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	14
1.4.2 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)	14
1.4.3. Leishmaniasis mucocutánea (MC)	15
1.4.4. Leishmaniasis visceral (LV)	16
1.5. Modelo murino de leishmaniasis	16
1.6. Respuesta inmune de células T en la leishmaniasis	17
1.7. Activación de la iNOS por el IFN γ	20
1.8. Expresión de las moléculas NK1.1 en las células de origen linfocitario	20
1.9. Activación del receptor NK1.1	21
1.10. Los glicoconjugados Biostim y Peptidoglicano Glicoproteína de 63kD (gp63) y LPG de <i>L. mexicana</i>	21
1.11. Biostim	21
1.12. Peptidoglicano	22
1.13. Glicoproteína de 63kD (gp63)	22
1.14. LPG de <i>L. mexicana</i>	23
II. JUSTIFICACIÓN	23
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo General	24
4.2. Objetivos Específicos	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1. Cultivo de <i>L. mexicana</i>	25
5.2. Infección con <i>Leishmania mexicana</i>	26
5.3. Obtención de células T de bazo	26
5.4. Enriquecimiento celular de linfocitos T	27

5.5. Estímulo <i>in vitro</i> de células T	28
5.6. Marcadores de superficie NK 1.1 en células CD8 y CD4	28
5.7. IFN γ intracelular de células T NK1.1	29
5.8. Aislamiento de los macrófagos peritoneales	29
5.9. Marcaje de los linfocitos T con el éster de succinimidil carboxi-fluoresceína diacetato (CFDA)	30
5.10. Análisis de proliferación celular de linfocitos T NK1.1 estimulados con macrófagos antógenos pulsados con gp63	30
5.11. Análisis estadístico	31
VI. RESULTADOS	31
6.1. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T de bazo	31
6.2. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD4 de bazo	33
6.3. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD8 de bazo	35
6.4. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD8 ⁻ CD4 ⁻ (dobles negativos DN) de bazo	37
6.5. Análisis de la expresión de IFN γ en células T NK1.1	38
6.6. Análisis de la expresión de IFN γ en células T CD8 NK1.1 y T CD4 NK1.1	39
6.7. Análisis de la expresión de IFN γ en células T CD8 ⁻ CD4 ⁻ NK1.1 ⁺	40
6.8. Análisis del efecto ejercido <i>in vitro</i> por glicoconjugados sobre células T de bazo de ratones C57BL/6 sanos e infectados y su relación con el aumento de la expresión de NK1.1 e IFN γ	41
6.9. Proliferación de células T NK1.1 estimulados con gp63 de <i>Leishmania mexicana</i>	43
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. PERSPECTIVAS	50
X. REFERENCIAS	51

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por parásitos protozoarios del gen *Leishmania*. En México el agente causal es *L. mexicana*, que origina distintos cuadros clínicos. En el modelo murino, la susceptibilidad o la resistencia a la leishmaniasis se correlaciona con el tipo de respuesta inmune que se establece durante la infección. Una respuesta celular Th1 productora de citocinas tales como IFN γ , junto con una actividad citotóxica adecuada, controlan la enfermedad. En la literatura se ha descrito que los linfocitos T y las células NK ayudan a eliminar a los macrófagos infectados con *L. mexicana*. Una de las moléculas que se ha asociado con la citotoxicidad es el marcador NK1.1 presente en las células NK y en los linfocitos T activados. En el presente trabajo se analizó el marcador NK1.1 en los linfocitos T de ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*. Se encontró un incremento significativo en la expresión del marcador NK1.1 y en la producción de IFN γ en las células T CD4, CD8 y dobles negativas (CD4⁻ CD8⁻). Por otra parte, en estudios *in vitro* encontramos que los glicoconjugados: LPG (lipofosfoglicano) de *Leishmania mexicana*, peptidoglicano y Biostim de *Klebsiella pneumoniae* pueden modular el número de células T NK1.1 así como la producción de IFN γ . Los resultados de nuestro trabajo sugieren que las células que incrementan la expresión del marcador NK1.1 posiblemente ayudan a resolver la infección por *L. mexicana* y que el estímulo con glicoconjugados aumenta y activa a las células T NK1.1.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad transmitida por la picadura de una mosca hembra de la subfamilia Phlebotominae. Afecta a algunos mamíferos, entre ellos, a los seres humanos. Esta enfermedad es una parasitosis causada por varias especies del género *Leishmania*. Diferentes especies de este parásito generan diferentes formas clínicas de la enfermedad. Algunas especies de *Leishmania* causan nódulos y úlceras en la piel (leishmaniasis cutánea), otras afectan las membranas mucosas (leishmaniasis mucocutánea) y otras causan daños a algunos órganos internos (leishmaniasis visceral) (1). La prevalencia mundial de la enfermedad es de 12 millones de personas y se estima que 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. Cada año se reportan 500 000 nuevos casos con leishmaniasis visceral y 1.5 millones de pacientes con leishmaniasis cutánea. Esta enfermedad afecta a 88 países, de los cuales 72 son países en desarrollo (Figura 1). La leishmaniasis se ha reportado en todos los países de Latinoamérica. En México se conoce su existencia desde la época prehispánica, así como la presencia de las diversas formas clínicas, principalmente la leishmaniasis cutánea. Los estados más afectados por este padecimiento son: (3) (Figura 2). La leishmaniasis permanece como un grave problema de salud pública, ya que su propagación está aumentando y los riesgos ambientales tales como el cambio climático, las migraciones masivas, la urbanización, factores individuales como el VIH, la mala nutrición y la genética del individuo son algunos de los factores asociados con esta enfermedad (2, 56).



Figura 2. Distribución de la leishmaniasis en México (3).

1.2. Clasificación de *Leishmania*

Anteriormente la clasificación de *Leishmania* se basó en factores ecobiológicos tales como el vector, la distribución geográfica, el tropismo, las propiedades antigénicas y las manifestaciones clínicas. Sin embargo, análisis bioquímicos y moleculares mostraron que estos criterios fueron inadecuados. En la actualidad se utilizan otros criterios para clasificar a *Leishmania* tales como son los marcadores de patrones polimórficos en el ADN del cinetoplasto, así como las proteínas y antígenos del parásito (Figura 3) (4).

dentro de las células fagocíticas por fisión binaria, llevando a la lisis de la célula hospedera y liberando a los amastigotes que también son opsonizados por componentes del suero, lo que facilita la fagocitosis. Las células infectadas pueden ser ingeridas por moscas al ingerir sangre, con lo cual se cierra el ciclo. Dentro del intestino de estas moscas se lisan los macrófagos, liberando a los parásitos que se transforman rápidamente en promastigotes. Estos promastigotes no infecciosos se adhieren a la pared del intestino medio de la mosca, e inician una migración y diferenciación a promastigotes metacíclicos (estadio infeccioso). Los promastigotes metacíclicos pueden ser transmitidos a otro mamífero cuando la mosca se alimente de otro individuo sano, iniciándose nuevamente el ciclo (5).

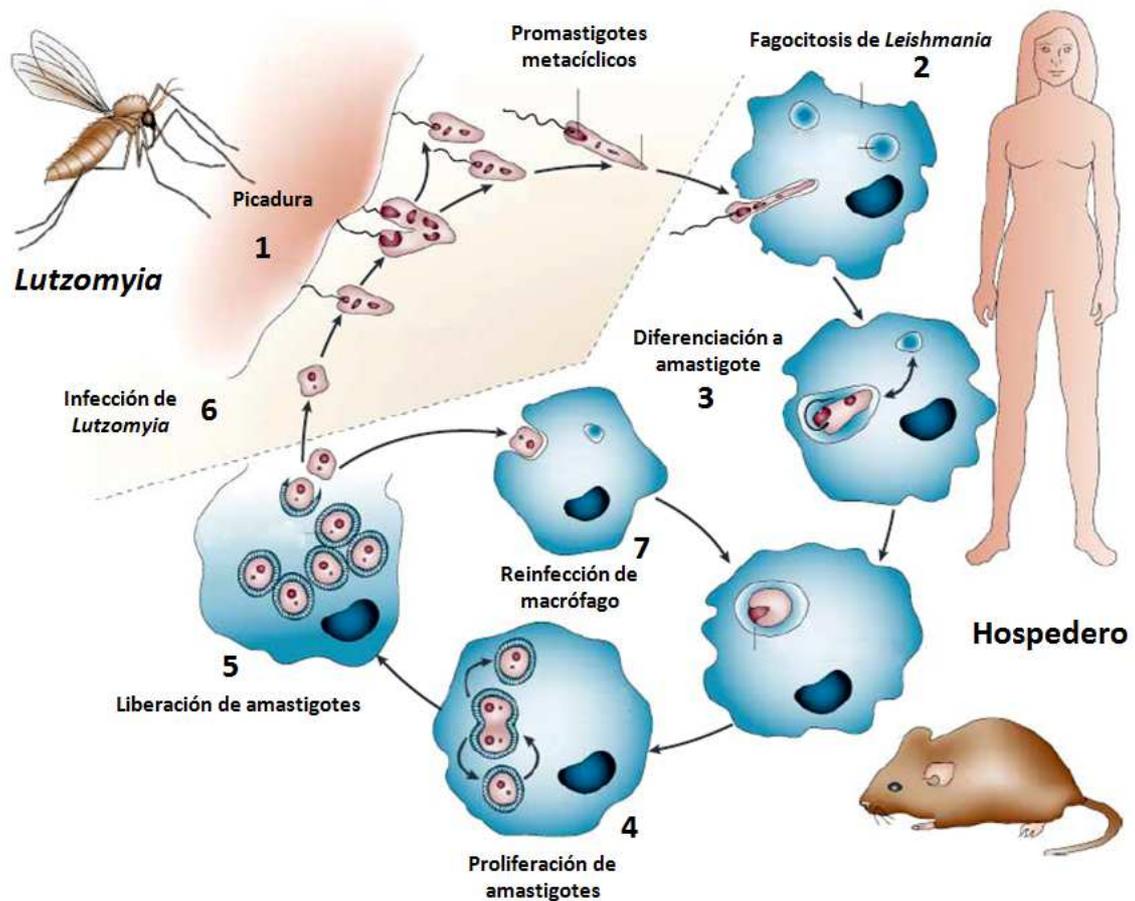


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*

1-Una mosca hembra pica a un mamífero e inocula los promastigotes metacíclicos. **2-** El macrófago fagocita a los promastigotes de *Leishmania*. **3-** Los promastigotes se diferencian a amastigotes en el interior del fagosoma. **4-** Los amastigotes proliferan por fisión binaria. **5-** El macrófago es lizado, liberando los amastigotes. **6-** El macrófago infectado puede ser ingerido por una mosca que posteriormente puede picar e infectar a otro sujeto sano o **7-** puede infectar a más macrófagos (5).

1.4. Cuadros clínicos de Leishmaniasis

1.4.1. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

En México, la manifestación clínica más común es la leishmaniasis cutánea localizada, conocida también como “úlceras del chiclero” y representa el 99% de los casos nuevos. El agente causal es *L. mexicana*. El cuadro clínico inicia con una pápula pequeña eritematosa e indolora, de crecimiento gradual, con infiltrado, ulceración central de fondo limpio y sin secreción purulenta (Figura 5). Es de fácil tratamiento con los compuestos antimoniales pentavalentes y ocasionalmente el paciente puede curarse sin tratamiento en un periodo de 6 meses a dos años (3).



Figura 5. Leishmaniasis cutánea localizada. Paciente con úlcera única (6).

1.4.2 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)

La leishmaniasis cutánea diseminada se caracteriza por abundantes lesiones nodulares que albergan un gran número de células infectadas, y que se encuentran diseminadas en prácticamente todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, regiones inguinal y axilar, genitales externos, plantas de los pies y palmas de las manos, aunque se han reportado algunas excepciones (Figura 6). La enfermedad es de curso crónico y

generalmente los enfermos presentan resistencia a los tratamientos. Esta forma clínica se asocia con recaídas e infecciones bacterianas secundarias (6).



Figura 6. Leishmaniasis cutánea diseminada. Paciente con múltiples nódulos (6).

1.4.3. Leishmaniasis mucocutánea (MC)

En Sudamérica a este cuadro clínico se le conoce como espundia. Las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses o años después de haberse resuelto la enfermedad cutánea; se deben a metástasis de lesiones cutáneas, aunque en un porcentaje de los casos no es posible identificar la lesión primaria. Las lesiones se inician principalmente en la mucosa nasal. Se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico, puede involucrar el labio superior, paladar, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea (Figura 7). Los cuadros severos se asocian con dificultad para respirar, deglutir, también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia (6).



Figura 7. Leishmaniasis mucocutánea. Lesión orofaríngea (6).

1.4.4. Leishmaniasis visceral (LV)

El 90% de los casos se han reportado en Bangladesh, India, Nepal y Sudán. Los agentes etiológicos pertenecen al complejo de *L. donovani*. Los síntomas aparecen generalmente a los tres meses de la infección. Los síntomas más frecuentes son fiebre nocturna, taquicardia, diarrea y tos. Se presenta esplenomegalia al tercer mes, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia son características constantes (Figura 8). Las manifestaciones tardías son edema, caquexia e hiperpigmentación. En niños la enfermedad es grave y lleva a la muerte en el 100% de los casos, si no son tratados (6).



Figura 8. Leishmaniasis visceral. Paciente con esplenomegalia (6).

1.5. Modelo murino de leishmaniasis

Diferentes especies de *Leishmania* pueden causar distintos cuadros clínicos y la gravedad de estos puede variar entre individuos. Por este motivo en la leishmaniasis experimental se han utilizado cepas singénicas de ratones para clasificar el estudio de la infección por *Leishmania* en cepas de ratones susceptibles y resistentes. Así se considera que para el modelo de *L. major* la cepa de ratones C57BL/6 es resistente mientras que la cepa BALB/c

es susceptible (5). En la infección experimental con *L. mexicana*, varios trabajos sugieren diferencias importantes en los factores que involucran la resistencia y la susceptibilidad de *L. major* y *L. mexicana*. En la cepa de ratones BALB/c hay una diseminación cutánea y visceral en la infección con *L. mexicana* y en el caso de los ratones C57BL/6 los ratones eliminaron al parásito de los nódulos linfoides, pero no fueron capaces de sanar la lesión cutánea primaria (52).

1.6. Respuesta inmune de células T en la leishmaniasis

Las células T generan especificidad y memoria contra infecciones parasitarias intracelulares y han sido caracterizadas extensivamente en la infección por *Leishmania* (11). En los modelos murinos (BALB/c y C57BL/6) se encontró que la susceptibilidad o la resistencia a la infección con *Leishmania major* se asocia a una respuesta tipo Th2 y Th1, respectivamente, y ambas se distinguen por el patrón citocinas que secretan (5). Durante la respuesta protectora contra la leishmaniasis, los macrófagos y células dendríticas secretan principalmente citocinas de tipo Th1 como IL-12, que activa linfocitos T CD4 induciendo su producción de IFN γ . Mientras que en la respuesta no protectora contra la leishmaniasis, los macrófagos y células dendríticas secretan citocinas de tipo Th2 como IL-10, que induce la producción de IL-4 por los linfocitos T CD4 (12, 13). Está bien documentado que el IFN γ induce la producción del óxido nítrico por inducir la transcripción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en el macrófago. Por lo cual permite la destrucción del parásito y el control de la enfermedad (Figura 9) (8).

Durante la infección por *L. major*, los ratones resistentes como los de la cepa C57BL/6 claramente desarrollan un fenotipo Th1 ante los antígenos del parásito. En contraste, los

ratones susceptibles BALB/c desarrollan una respuesta Th2, que favorece la progresión de la enfermedad (5).

Otro mecanismo leishmanicida que es favorecido con la producción de IFN γ es la citotoxicidad celular, en la cual los linfocitos T CD8 y las células NK lisan a las células fagocíticas infectadas por *Leishmania*. El IFN γ ayuda a la activación de las células NK y también aumenta la expresión de moléculas clase I mediante las cuales los linfocitos CD8 pueden reconocer antígenos extraños en una célula infectada (14,15).

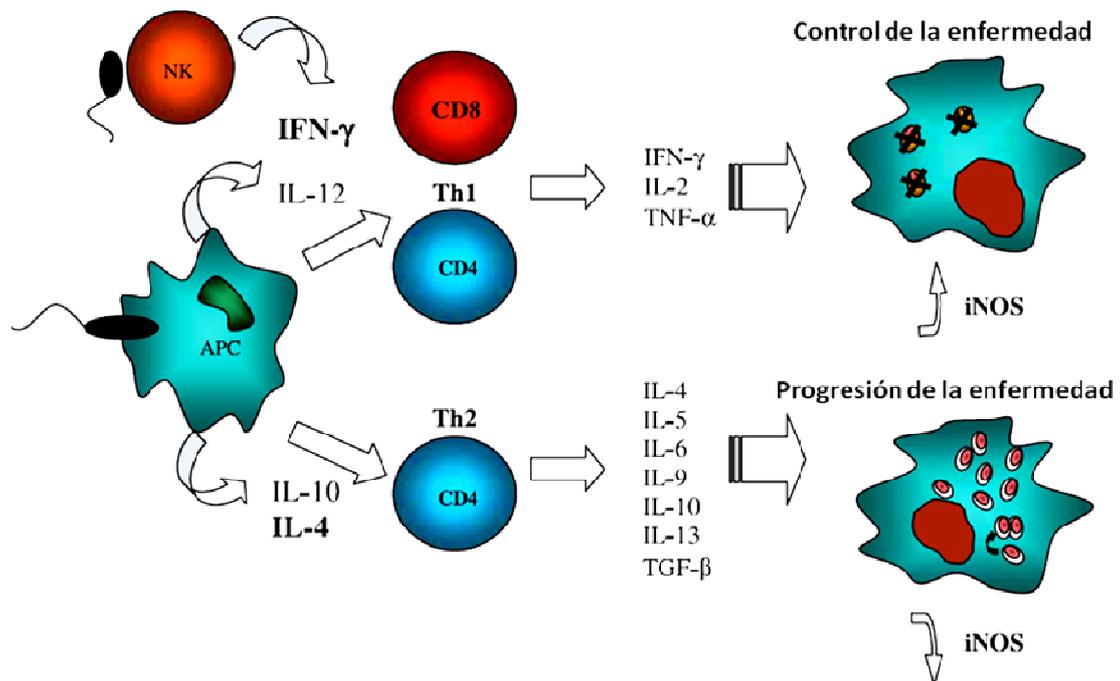


Figura 9. Respuesta Th1 y Th2 en leishmaniasis. El modelo murino de la infección con *Leishmania mexicana* señala que la susceptibilidad y la resistencia a la enfermedad dependen del tipo de citocinas producidas por los linfocitos T (15).

Otra subpoblación de linfocitos T que se encuentran en el umbral de la inmunidad innata y adaptativa son las células NKT, que se caracterizan por tener receptores de células NK (DX5, NK1.1) y poseer un TCR de cadena invariante V α 24J α 18 en humanos y V α 14J α 18 en ratón (16). Estas células se activan por antígenos de tipo lipídico presentados a través de CD1. Se han descrito al menos tres subtipos de células NKT tales como, NKT CD4⁺, NKT CD8⁺ y células NKT CD4⁻ CD8⁻. Estos subtipos se distribuyen en el timo, hígado, bazo y la médula ósea (21). Cada uno de estos subtipos ha sido involucrado con diferentes funciones efectoras. Las células NKT CD4⁺ han sido descritas como células productoras de IFN γ e IL-4, mientras que las células NKT CD8⁺ han sido descritas como productoras de IFN γ y como células citotóxicas independientes de la presentación por CD1d (50). En diabetes tipo 1 se ha descrito que las células NKT CD4⁻ CD8⁻ ayudan a mejorar la condición de los ratones debido a la producción de citocinas tales como IL-4 e IL-10 (51). El papel de las células NKT durante la respuesta inmune contra *Leishmania* es controversial, ya que se ha reportado que las células NKT de ratones C57BL/6 estimuladas *in vitro* con LPG de *L. major* generan una respuesta de tipo Th1 (17). En contraste, otros autores encontraron que las células NKT estimuladas con LPG de *L. donovani*, presentan una respuesta de tipo Th2 (18).

1.7. Activación de la iNOS por el IFN γ

La unión del IFN γ a su receptor en el macrófago activa la vía de señalización de las Janus cinasas 1 y 2 (JAK1/JAK2) y STAT 1. Durante esta activación las cinasas JAK fosforilan al factor de transcripción STAT 1, el cual se dimeriza y se transloca al núcleo en donde induce la expresión del factor de transcripción IRF (53). Este factor se une al promotor de la iNOS e induce la expresión génica de esta enzima que produce óxido nítrico a partir del aminoácido L- arginina y el oxígeno molecular (54). El óxido nítrico es un mecanismo leishmanicida efectivo ya que genera mutaciones en el DNA, altera la estructura de las proteínas por nitrosilización, además el óxido nítrico también puede interactuar con las especies reactivas de oxígeno y generar especies reactivas de nitrógeno con gran potencia microbicida (55).

1.8. Expresión de las moléculas NK1.1 en las células de origen linfoide

La molécula NK1.1 es un receptor de lectina tipo C que pertenece a la familia de receptores NKR-P1 (19). Se conocen 5 isoformas de la molécula NK1.1, pero en el ratón la más estudiada es la isoforma activadora NKRP1-C. Cabe señalar que no todas las cepas de ratones expresan NK1.1 C57BL/6 si la expresa, mientras que BALB/c no la expresa (20). Anteriormente, el marcador NK1.1 sólo se había reportado en los linfocitos NK y en las células NKT con TCR de cadena invariante (V α 14J α 18 en ratón) (21). Recientemente se ha reportado que, bajo ciertas condiciones, NK1.1 se expresa en prácticamente todas las células de origen linfoide. Por ejemplo se ha encontrado que la infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica induce un incremento en la expresión de NK1.1 en células CD4 y CD8 restringidas por MHC (22). También se ha demostrado que las células dendríticas de

origen linfoide con actividad citotóxica presentan la molécula NK1.1 en conjunto con CD11b (23). Adicionalmente los linfocitos T gama/delta de timo también expresan NK1.1 (24).

1.9. Activación del receptor NK1.1

Se ha descrito que NK1.1 es un receptor de carbohidratos con preferencia por *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) > *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) > Fucosa (Fuc) > Galactosa (Gal) > Manosa(Man) (25). Estos carbohidratos son reconocidos por NK1.1 y siguen una vía de señalización dependiente de la presencia del receptor Fc gama (FcR γ), la cual activa a la tirosin cinasa (Syk), que desencadena una vía de señalización que termina en la producción de IFN γ con la activación de la citotoxicidad en las células NK (26).

1.10. Los glicoconjugados Biostim, Peptidoglicano, Glicoproteína de 63kD (gp63) y LPG de *L. mexicana*

1.11. Biostim

El compuesto RU 41.740, también llamado Biostim, es un extracto purificado de glicoproteínas de *Klebsiella pneumoniae* de la cepa K201. Pruebas *in vitro* han mostrado que este extracto ejerce un efecto inmunoestimulante sobre múltiples mecanismos inmunes tales como: ejercer un efecto quimioattractante sobre neutrófilos, inducir la generación de iones superóxido, promover la liberación de enzimas lisosomales de macrófagos y de leucocitos polimorfonucleares. También modula mecanismos efectores de las células T y B e incluso se demostró que induce la citotoxicidad y la producción de IL-1 *in vitro* por las

células NK de pacientes con carcinoma hepatocelular (27). El principio activo consiste de dos subunidades repetidas de glicoproteínas, la primera conocida como la subunidad P1 que tiene un peso molecular de 95 kDa y que proviene de la cápsula de la bacteria y la segunda subunidad conocida como F1 con un peso de 350 kDa y que proviene de la membrana externa de la bacteria (28).

1.12. Peptidoglicano

El 90% de la pared celular de las bacterias Gram positivas está compuesta por peptidoglicanos, los cuales están constituidos por dos repeticiones de disacáridos N-acetil: N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico (29). Se ha demostrado que el peptidoglicano es un buen agonista de TLR2, e induce la translocación de NF- κ B al núcleo (30). Otros estudios han demostrado que la estimulación *in vitro* de células NK humanas con 10 μ g/ml de peptidoglicano por 72 horas induce la producción de IFN γ (1000pg/ml) por estas células (31).

1.13. Glicoproteína de 63kD (gp63)

La gp63 de *Leishmania mexicana* es una glicoproteína con actividad de proteasa y participa en la resistencia del parásito a la lisis por complemento. También es de importancia en la adhesión del parásito a la célula hospedera (32). En *L. mexicana amazonensis* se encontró que esta glicoproteína contiene 4 azúcares principales; glucosa1 manosa6 N-acetilglucosamina2 (Glc1Man6GlcNAc2), manosa6 N-acetilglucosamina2, (Man6GlcNAc2), manosa5 N-acetilglucosamina2 (Man5GlcNAc2) y manosa4 N-

acetilglucosamina² (Man₄GlcNAc₂). Las variaciones en los glicoconjugados de *Leishmania* juegan un papel importante en la virulencia del parásito (33).

1.14. LPG de *L. mexicana*

El lipofosfogliano LPG es el glicoconjugado más abundante en la superficie, de los promastigotes de *Leishmania*. El LPG de *L. mexicana* está compuesto por los oligosacáridos fosforilados: fosfato-6-galactosa-1-manosa-1 y fosfato-6-[glucosa-3]-galactosa-1-4manosa-1, los cuales se unen a las cadenas lineales por enlaces fosfodiéster. Cada cadena lineal consta de unidades repetidas unidas a la parte central con la estructura de fosfato-6-galactosa-3galactosa-3[glucosa 1- fosfato-6]-manosa-1-3manosa-1-4glucosamina-1-6-inositol. La parte terminal de la estructura está formada por cadenas repetidas de oligosacáridos neutrales manosa-1-2manosa, manosa-1-2 manosa-1-2manosa o manosa-1-2[galactosa 1-4]-manosa. Se ha demostrado que el LPG inhibe varias cascadas de señalización que desencadenan especies reactivas de oxígeno (34), y por otro lado se ha visto que activa al TLR2 en las células NK (35).

II. JUSTIFICACIÓN

La cepa de ratones C57BL/6 es una cepa que controla la infección por *L. major*. En los últimos años se han analizado algunas moléculas de estos ratones relacionadas con el control de la infección por *Leishmania*. Una molécula conocida como NK1.1, que es expresada en el cromosoma 6 dentro del *loci NK1*, ha sido mencionada por Sacks *et al.* (2002) como un marcador relacionado con la resistencia a la infección por *L. major*. Esta molécula ha llamado la atención por aumentar su expresión y ayudar a resolver otras

enfermedades infecciosas y cáncer (22,36,37). Se ha demostrado que este receptor desencadena una vía de activación en los linfocitos que termina en la producción de IFN γ y en el incremento de la citotoxicidad celular (38) El análisis de la modulación de NK1.1 en los linfocitos T ejercida por *Leishmania mexicana* y por algunos glicoconjugados, asociado a un estudio del posible efecto en el control de la enfermedad podrían contribuir al entendimiento de la resistencia a la leishmaniasis de ratones C57BL/6, por lo que se plantea la siguiente hipótesis:

III. HIPÓTESIS

Leishmania mexicana y los glicoconjugados Biostim, peptidoglicano y LPG aumentan la expresión de la molécula NK 1.1 en las células T de bazo de ratones C57BL/6, lo cual se asocia con la producción de IFN γ y con el control de la enfermedad.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar si la infección por *L. mexicana* y los estímulos con los glicoconjugados Biostim, peptidoglicano y LPG modulan la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T de bazo de ratones C57BL/6 y analizar si este efecto se asocia con la producción de IFN γ .

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T de bazo de los ratones C57BL/6 sanos e infectados con *L. mexicana*.
2. Analizar la producción de IFN γ por las células T NK1.1 de bazo de ratones C57BL/6 sanos e infectados con *L. mexicana*.
3. Analizar si el estímulo por los glicoconjugados (Biostim, peptidoglicano y LPG de *L. mexicana*) modula la expresión de la molécula NK1.1 y la producción de IFN γ en los linfocitos T de bazo de ratones C57BL/6 sanos e infectados con *L. mexicana*.
5. Determinar la proliferación de las células T NK1.1 debido al reconocimiento de la glicoproteína de 63 kDa (gp63) de *L. mexicana*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de *L. mexicana*

Para el aislamiento de amastigotes de *L. mexicana* se sacrificó un ratón BALB/c infectado con la cepa Solís (aislada originalmente de un paciente con LCD de Tabasco). Se seleccionó el cojinete plantar lesionado, al cual se le inyectó 50 μ L de buffer de fosfatos 0.1 M y pH de 7.4 (PBS). Posteriormente se realizó un aspirado de la lesión, que se colocó en un tubo cónico con 5 ml de RPMI 1460 (GIBCO) al 10% de suero fetal bovino (SFB) a temperatura ambiente (25° C). Del tubo de aislamiento se tomó una alícuota cada tercer día para analizar la viabilidad y proliferación del parásito. Una vez establecido el cultivo *in vitro*, se cosecharon los parásitos en el día 5 de cultivo por centrifugación a 3220 x g por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente los parásitos se cultivaron en condiciones axénicas.

5.2. Infección con *Leishmania mexicana*

De un cultivo de *L. mexicana* se cosecharon los promastigotes del quinto día (fase estacionaria), se centrifugaron a 3220 x g, el botón se lavó dos veces en 10 ml de PBS y se resuspendieron 10×10^6 parásitos en 10 μ L de PBS. Con una jeringa de insulina se inocularon en el cojinete plantar de ratones C57BL/6.

Se infectaron ratones C57BL/6 hembras de 8 semanas: a 3 ratones se les inocularon 10×10^6 parásitos y a otros 3 se les inocularon 20×10^6 parásitos. Como controles negativos se utilizaron 3 ratones sin infección, inoculados con 20 μ L de PBS. El tiempo de infección fue de 7 semanas.

5.3. Obtención de células T de bazo

Se sacrificaron 3 ratones C57BL/6 sanos e infectados por dislocación cervical y los bazos de estos animales fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Cada uno de ellos se colocó en tubos cónicos de 15 ml que contenían 5 ml de medio RPMI-1640-SFB 10%. Cada bazo se maceró y se filtró a través de una malla con poros de 180 μ m. El extracto de los bazos se colocó en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a 805 x g por 10 minutos a 20° C, el botón se resuspendió en 7 ml de PBS. Por otro lado en un tubo cónico de 15 ml se colocaron 3 ml de HISTOPAQUE® (densidad de 1.077 +/- 0.001 SIGMA-ALDRICH). Sobre la solución de HISTOPAQUE® se añadieron los 7 ml de la suspensión celular, se centrifugaron a 805 x g durante 20 minutos a 20° C. La interfase que resultó del gradiente de densidades entre la solución de HISTOPAQUE® y la suspensión de células se colocó en un tubo cónico de 15 ml y se lavó 2 veces con PBS. Al final del último lavado se

resuspendió el botón en 5 ml de PBS y se contaron las células vivas mediante la exclusión del colorante azul de Tripán 0.4% (GIBCO, Cat. No. 15250-061) en una cámara de Neubauer.

5.4. Enriquecimiento celular de linfocitos T

El enriquecimiento de la población de linfocitos T se realizó por selección negativa con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos (Kit Pan T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec Cat. No. 130-090-861). El Kit consta de dos anticuerpos, un primario que tiene un coctel de anticuerpos monoclonales biotinilados que reconocen moléculas de superficie de las células que no son linfocitos T (CD11b, CD445R, DX5 y Ter-119) y un anticuerpo anti-biotina acoplado a perlas magnéticas. Para el enriquecimiento de células T se incubaron 1×10^6 células con 1 μ L del anticuerpo primario y 4 μ L de PBS frío a 4° C durante 10 minutos. Posteriormente se agregó el anticuerpo anti-biotina (por cada 1×10^6 células se agregaron 2 μ L del anticuerpo anti-biotina y 3 μ L de PBS). Nuevamente se resuspendió la mezcla y se incubó por 15 minutos a 4°C. Después se agregaron 10 volúmenes de PBS frío, en relación al volumen con que finalizó la marca de anticuerpo primario y secundario. Se centrifugó a 805 x g por 10 minutos a 4°C. El botón celular se lavó dos veces, después del último lavado se resuspendieron las células en 2 mL de PBS. Por otro lado en una columna magnética se acopló una columna de separación celular MACS® COLUMN MS (Miltenyi Biotec Cat. No.130 042 201). La columna se hidrató con 1 ml de PBS, se agregaron los dos mililitros de suspensión celular marcados con los anticuerpos. Las células que no fueron fijadas por la columna (selección negativa) se colectaron en un tubo cónico de 15 ml, se lavaron dos veces y se cuantificó el número de células vivas con el colorante vital Azul Tripán

mediante una cámara de Neubauer. Este enriquecido de células T de bazo fue utilizado para todos los ensayos.

5.5. Estímulo *in vitro* de células T

En una placa de cultivo de 24 pozos COSTAR® (Corning Incorporated, Cat No. 3524) se colocaron 1×10^6 células T de bazo con 1ml de medio RPMI-1640-SFB10%. Estas células fueron estimuladas por separado con Biostim 50 µg/ml, peptidoglicano (peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*, Fluka Cat. No. 77140) 10 µg/ml o LPG de *L.mexicana* 10 µg/ml, también se dejó un control negativo sin estímulo. Las células se incubaron a 37° C y CO₂ al 5%. Después de 24 horas las células se cosecharon en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se lavaron con PBS y se fijaron en 100 µL de paraformaldehído al 2%.

5.6. Marcadores de superficie NK 1.1 en células CD8 y CD4

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se colocaron 1×10^6 linfocitos T de bazo en 47 µL de PBS, después se añadieron en relación 1:50 los anticuerpos: anti-NK1.1 [PE conjugated Anti-mouse NK1.1 (NKR-P1C, Ly55), eBioscience Cat. No. 12-5941], anti-CD8 (PerCP-Cy5.5 Rat anti-mouse CD8a, BD Cat. No. 551162) y anti- CD4 (PE-Cy7 Rat Anti-mouse CD4, BD 552775). Como control negativo, a muestras paralelas se les adicionó la misma relación de anticuerpos de isotipo (BD Cat. No. 553930, BD Cat. No. 551162 y BD CD4 Cat. No. 552715). Posteriormente las células se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente, para que se llevara la unión antígeno anticuerpo. Al finalizar se llevó a un volumen de 0.3

ml con PBS. La expresión de los marcadores se determinó mediante citometría de flujo (FACS canto II, Beckton Dickinson BD) usando el programa BD FACSDiVa 6.0.

5.7. IFN γ intracelular de células T NK1.1

Para la tinción intracelular del IFN γ previamente a la estimulación las células se incubaron con 1 μ l/ml de GolgiPlugTM (BD, Cat. No.555029), para inhibir la secreción de IFN γ . Después del estímulo y de marcar las moléculas de superficie (NK 1.1, CD8 y CD4), las células fueron suspendidas en 150 μ l de Cytotfix/Cytoperm BD, Cat. No. 554722 (este reactivo hace permeable a la célula y al mismo tiempo la fija para que no pierda su estructura) e incubadas a 4°C por 10 minutos. Posteriormente las muestras se lavaron dos veces con 200 μ l de PermWash 1X BD, Cat. No. 554723. La permeabilización por saponina es un proceso reversible, así que este reactivo no permite que la permeabilización de la célula se pierda con los lavados. Después se resuspendieron en 49 μ l de PermWash Buffer y se añadió 1 μ l de anticuerpo anti-IFN γ (BD, Cat. No. 554411). En otra condición se marcó un control negativo con anticuerpo de Isotipo (BD Cat. No. 554684). Ambas condiciones se dejaron incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente las muestras se llevaron a un volumen de 0.3 ml con PBS. La expresión de IFN γ se determinó mediante citometría de flujo (FACS canto II, Beckton Dickinson BD) usando el programa BD FACSDiVa 6.0.

5.8. Aislamiento de los macrófagos peritoneales

Se sacrificaron ratones infectados con *L. mexicana* por dislocación cervical, se cortó la piel del vientre del ratón dejando al descubierto la membrana peritoneal, se inyectaron 10 ml de

PBS frío al peritoneo y se agitó moderadamente el vientre del ratón. Se extrajo el PBS del peritoneo, se colocó en un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó a $290 \times g$ a 4°C . Finalmente se realizaron dos lavados y se determinó el número de células vivas con el colorante vital Azul Tripán y mediante el conteo en una cámara de Neubauer.

5.9. Marcaje de los linfocitos T con el éster de succinimidil carboxi-fluoresceína diacetato (CFDA)

Para marcar a los linfocitos T con CFDA se resuspendieron 7×10^6 de linfocitos T de bazo en 0.5 mL de PBS. Por otro lado en un tubo Eppendorf se colocaron 0.5 mL de PBS con $1 \mu\text{l}$ de CFDA-SE 5mM, (Invitrogen detection technologies, Cat. No C1157). La suspensión de células T y el CFDA se mezclaron, se incubaron a 25°C por 15 minutos, se realizaron 3 lavados y el botón celular se resuspendió en RPMI-1640-SFB10%.

5.10. Análisis de proliferación celular de linfocitos T NK1.1 estimulados con macrófagos antológicos pulsados con gp63

En placas de 24 pozos se colocaron 1.5×10^6 macrófagos peritoneales de ratones infectados con *L. mexicana* en 1 ml de RPMI-1640-SFB10%. Se dejaron adherir los macrófagos por una hora a 37°C y CO_2 al 5%. Posteriormente se estimularon con $10 \mu\text{g}$ de gp63 de *L. mexicana* toda la noche a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Al día siguiente se añadieron linfocitos T de bazo, marcados con CFDA y se coincubaron por 96 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Después de 4 días se cosecharon las células y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se lavaron dos veces y se marcaron con anticuerpo anti-NK1.1. La muestra se llevó a un volumen de 0.3 ml y se colocó en un tubo de citometría.

Finalmente la proliferación celular se determinó por la disminución de la fluorescencia del CFDA. La técnica del CFDA se basa en que durante la división celular el CFDA se va diluyendo de las células progenitoras a las células hijas, lo cual se determinó mediante citometría de flujo (FACS canto II, Beckton Dickinson BD) usando el programa BD FACSDiVa 6.0.

5.11. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar. La evaluación estadística de los datos se realizó mediante la prueba de U de Mann-Whitney, prueba para datos no paramétricos. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

VI. RESULTADOS

6.1. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T de bazo

Encontramos que en los ratones C57BL/6 sanos el 5.1 % de los linfocitos T de bazo expresaron la molécula NK1.1. La infección con 10 millones de *L. mexicana* produjo una tendencia a disminuir estas células (3.6%). En contraste, la infección con 20 millones de parásitos aumentó esta población celular (12.4%) (Figura 10). También se detectó de igual manera que la infección con los promastigotes de *L. mexicana* aumentó el número de moléculas NK1.1 por célula: en la infección con 10 millones aumentó 1.24 veces ($P <$

0.036), mientras que en la infección con 20 millones aumentó 1.52 veces ($P < 0.036$), en relación a los ratones sanos (Figura 11).

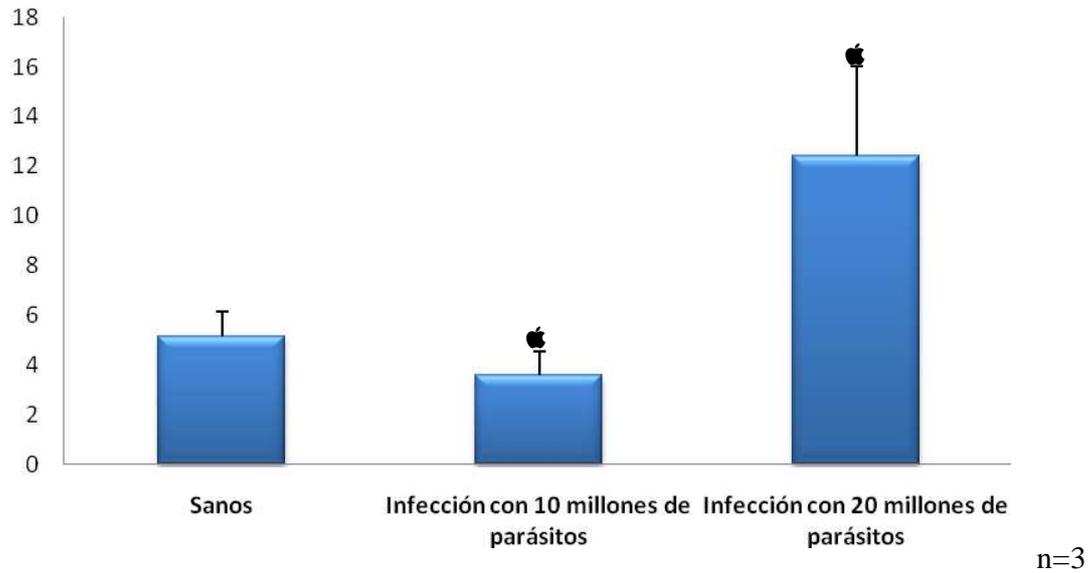


Figura 10. Porcentaje de células T NK1.1 en los linfocitos T de bazo. La infección con 20 millones de parásitos aumentó al 12.4% la población de linfocitos T NK1.1, contrario a la infección con 10 millones que disminuyó a 3.6%.

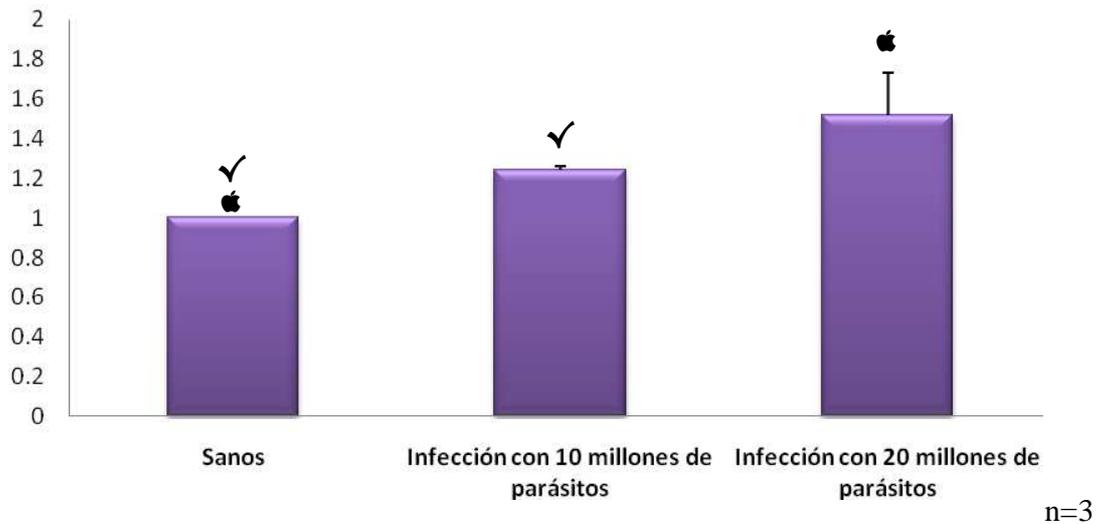


Figura 11. Normalización a 1 de la mediana de fluorescencia de NK1.1 en los linfocitos T. La infección con 10 y 20 millones de parásitos produjo un incremento de 1.24 y 1.52 veces la expresión del marcador NK1.1 por célula, respectivamente, en los linfocitos T de bazo ($P < 0.036$).

Posteriormente se analizó el fenotipo de linfocitos T (CD4 y CD8) de células T totales que expresan el marcador NK1.1.

6.2. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD4 de bazo

Cuando se analizó la subpoblación de linfocitos T CD4 de los ratones sanos, se encontró que sólo el 2.2% de estas células expresan la molécula NK1.1 (Figura 12). En la infección con 10 millones de promastigotes de *L. mexicana* se observó una disminución de células CD4 NK1.1, ya que sólo el 1% de la población de células T CD4 expresaban NK1.1. Por otra parte, se encontró que en la infección con 20 millones de parásitos incrementó el número de células CD4 que expresan NK1.1 a 6.4 %.

Cuando se normalizó la mediana de fluorescencia de NK1.1 en los linfocitos T CD4 se detectó que con la infección con *L. mexicana* aumentó el número de moléculas NK1.1 por célula, observándose que en la infección con 10 millones aumentó 1.18 veces y en la infección con 20 millones aumentó 1.67 veces, con respecto a los ratones sanos ($P < 0.036$) (Figura 13).

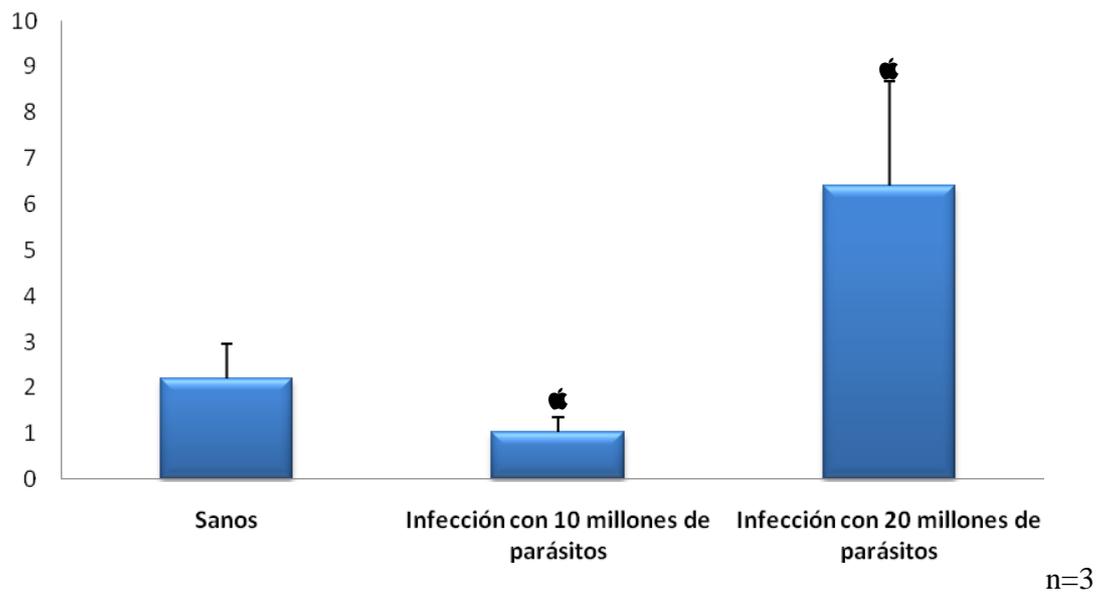


Figura 12. Porcentaje de células T CD4 NK1.1 en los linfocitos T de bazo. Se observó que en la infección con 20 millones de *L. mexicana* aumentó a 6.4% la población de linfocitos T CD4 NK1.1, por lo contrario en la infección con 10 millones de parásitos se observó que disminuyó al 1%.

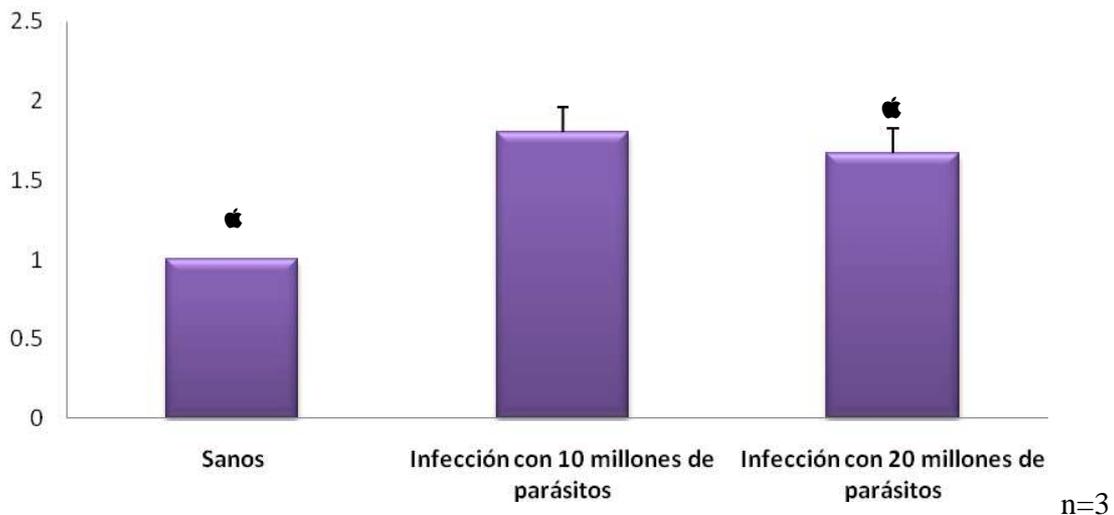


Figura 13. Normalización a 1 de la mediana de fluorescencia de NK1.1 en los linfocitos T CD4. Se encontró que la infección con 20 millones incrementó la expresión de moléculas NK1.1 en los linfocitos T CD4 NK1.1 ($P < 0.036$).

6.3. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD8 de bazo

Cuando se analizó la subpoblación de linfocitos T CD8 de los ratones C57BL/6 sanos se encontró que el 2.9% de estas células expresaban la molécula NK1.1 en condiciones basales (Figura 14). La infección con 10 millones de promastigotes de *L. mexicana* redujo la población de células T CD8 que expresan NK1.1 a 0.56%, mientras que la infección con 20 millones de parásitos incrementó la población de CD8 NK1.1 al 4.16 %.

Al normalizar la mediana de fluorescencia de NK1.1 en los linfocitos T CD8 se identificó que la infección con *L. mexicana* aumentó el número de moléculas NK1.1 por célula, observándose que en la infección con 10 millones de parásitos aumentó 1.91 veces ($P = 0.036$) y en la infección con 20 millones aumentó 2.62 veces ($P < 0.036$) con respecto a los ratones sanos (Figura 15).

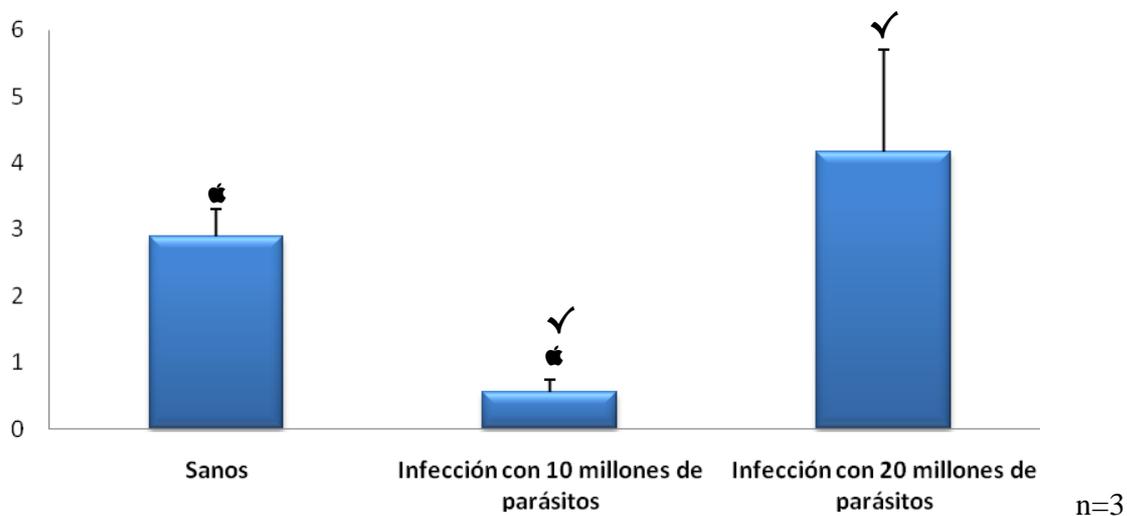


Figura 14. Porcentaje de células T CD8 NK1.1 en los linfocitos T de bazo. La infección con 20 millones de parásitos aumentó la población de linfocitos T CD8 NK1.1 al 4.1%, contrario a la infección con 10 millones que la disminuyó al 0.56% ($P < 0.046$).

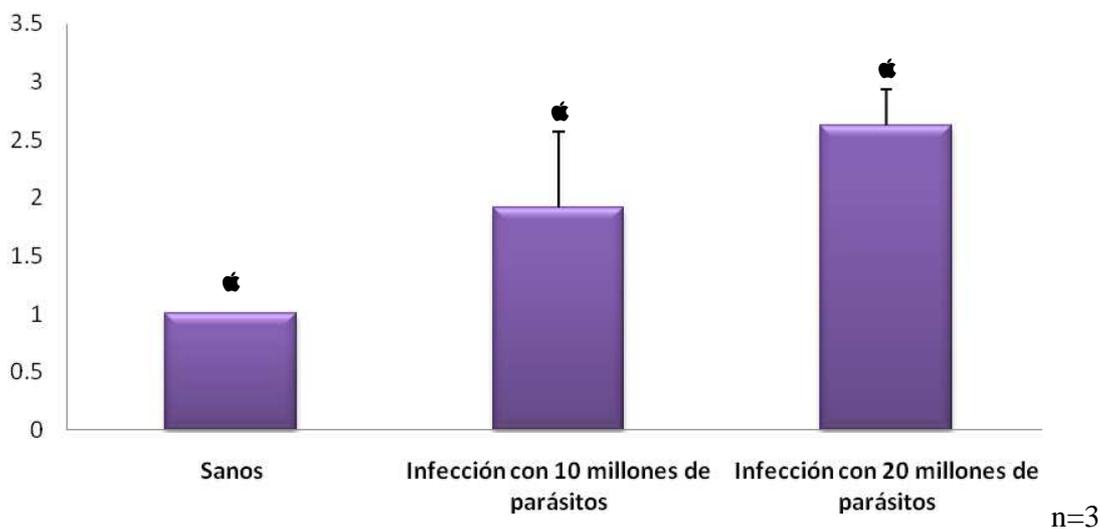


Figura 15. Normalización a 1 de la mediana de fluorescencia de NK1.1 en los linfocitos T CD8. Se encontró que la infección con 10 y 20 millones de *L. mexicana* incrementó 1.91

y 2.62 veces la expresión de NK1.1, respectivamente, en la subpoblación de linfocitos T CD8⁻ CD4⁻ ($P < 0.036$).

Adicionalmente se analizaron células doble negativas con expresión de NK1.1, que posiblemente correspondieron a un subgrupo de células NKT.

6.4. Análisis de la expresión de la molécula NK1.1 en los linfocitos T CD8⁻ CD4⁻ (dobles negativos DN) de bazo

Encontramos que el 0.1% de la subpoblación de linfocitos T CD8⁻ CD4⁻ de ratones C57BL/6 sanos expresan la molécula NK1.1 (Figura 16). Interesantemente se observó que las infecciones con 10 y 20 millones de *L. mexicana* incrementaron significativamente la población de células T CD8⁻ CD4⁻ NK1.1 en un 2% y 1.8%, respectivamente, con respecto a los ratones sanos ($P < 0.046$ para ambos casos).

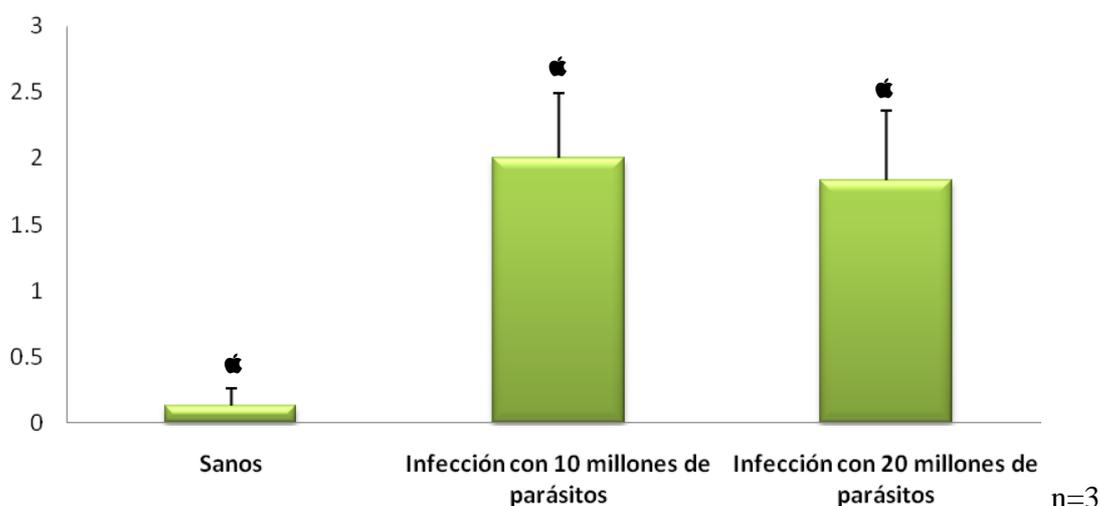


Figura 16. Porcentaje de células T CD8⁻ CD4⁻ NK1.1 en linfocitos T de bazo. La infección con 10 y 20 millones de parásitos incrementó la población de linfocitos T CD8⁻ CD4⁻ NK1.1 con respecto a los ratones sanos ($P < 0.046$).

6.5. Análisis de la expresión de IFN γ en células T NK1.1

Cuando se analizó la producción de IFN γ por las células T NK1.1 se encontró que la infección por *L. mexicana* incrementó el porcentaje de células productoras de IFN γ con respecto a los ratones sanos (4.5%), siendo 1.8 veces (8.1%) para el caso de la infección con 10 millones de *L. mexicana* y 5.4 (24.5%) veces para el caso de la infección con 20 millones de parásitos, lo cual fue significativo ($P < 0.046$) (Figura 17).



Figura 17. Población de IFN- γ intracelular en los linfocitos T NK1.1 de bazo de ratones C57BL/6. La infección con 20 millones de parásitos aumentó de manera significativa ($P < 0.046$) la población de células productoras de IFN- γ en los linfocitos T NK1.1. La infección con 10 millones de parásitos mostró una tendencia de aumento de células T NK1.1 productoras de IFN γ .

6.6. Análisis de la expresión de IFN γ en células T CD8 NK1.1 y T CD4 NK1.1

El análisis de la producción de IFN γ por la subpoblación de células T CD4 NK1.1 en los ratones sanos mostró que no produjeron IFN γ estas células. En los ratones infectados con 10 millones de *L. mexicana* se encontró que el 2% de las células T CD4 NK1.1 producían IFN γ (Figura 18) y en la infección con 20 millones de parásitos encontramos un incremento significativo del 6.2% en células T CD4 NK1.1 productoras de IFN γ ($P < 0.049$).

Por otra parte al analizar la subpoblación de células T CD8 NK1.1 tampoco se detectó producción de IFN γ por estas células en los ratones sanos. En los ratones infectados con 10 millones de parásitos la subpoblación de los linfocitos T CD8 NK1.1 productores de IFN γ fue sólo del 1.8%, mientras que en la infección con 20 millones de parásitos se observó un número significativamente mayor de células T CD8 NK1.1 que producían IFN γ (7.1%) ($P < 0.049$).

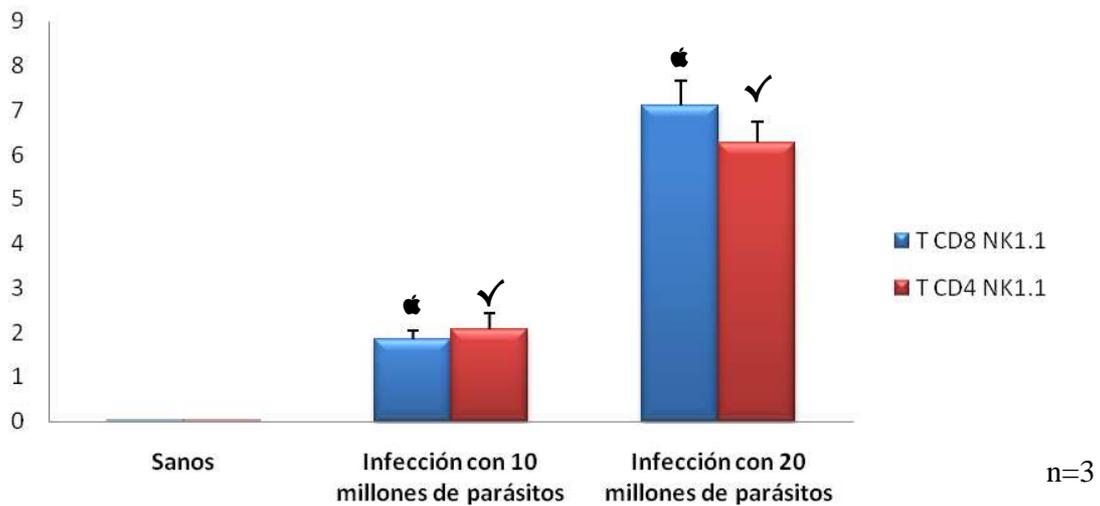


Figura 18. Porcentaje de células T NK1.1 CD4 o CD8 productoras de IFN γ con la infección por *L. mexicana*. Se encontró que la infección con 20 millones de parásitos tuvo

un incremento significativo en las células T CD4⁻ NK1.1 (6.2%) y T CD8⁻ NK1.1 (7.1%) con respecto a la infección con 10 millones de parásitos ($P < 0.049$).

6.7. Análisis de la expresión de IFN γ en células T CD8⁻ CD4⁻ NK1.1⁺

Cuando se analizó la producción de IFN γ en la subpoblación de linfocitos T DN se observó que ambos inóculos de infección incrementaron significativamente la subpoblación de células T CD8⁻ CD4⁻ NK1.1⁺ productoras de IFN γ : en el caso de la infección con 10 millones de parásitos fue de 6% y en el caso de la infección con 20 millones fue de 12.4%, con respecto a los ratones sanos (Figura 19) ($P < 0.049$ en ambos casos).

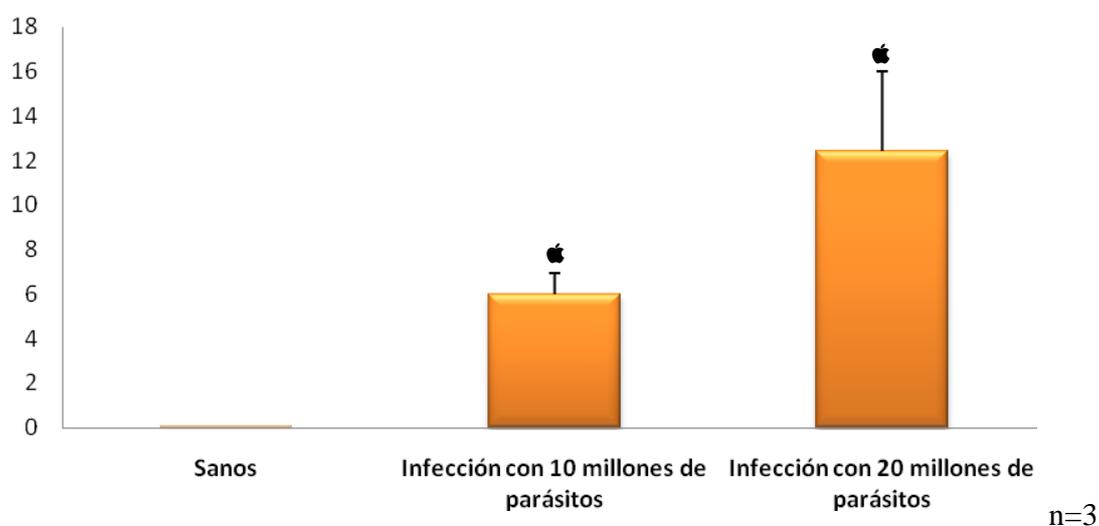


Figura 19. Porcentaje de la subpoblación celular de linfocitos T CD4⁻ o CD8⁻ NK1.1 productoras de IFN γ por la infección por *L. mexicana*. Se encontró que con respecto a los ratones sanos (0%) la infección con 10 y 20 millones de parásitos incrementó a 6% y 12.4%, respectivamente, la subpoblación celular de linfocitos T NK1.1 CD4⁻ CD8⁻ productores de IFN γ , siendo este incremento estadísticamente significativo ($P < 0.049$).

Dado que la infección con *Leishmania mexicana* incrementó el número de células T CD4 NK1.1, T CD8 NK1.1 y T CD4- o CD8- NK1.1 así como la expresión del marcador NK1.1 por célula en las 3 poblaciones celulares y adicionalmente provocó un aumento significativo en la producción de IFN γ en los 3 tipos de células, decidimos analizar si diversos glicoconjugados podían modificar la expresión del marcador NK1.1 y modular la producción de IFN γ en los distintos subtipos de células.

6.8. Análisis del efecto ejercido *in vitro* por glicoconjugados sobre células T de bazo de ratones C57BL/6 sanos e infectados y su relación con el aumento de la expresión de NK1.1 e IFN γ

Los estímulos por glicoconjugados tuvieron un efecto sobre el tamaño de la población de células T NK1.1 y en el número de células productoras de IFN γ (Tabla 1). En los ratones sanos se encontró que el estímulo con el Biostim y el peptidoglicano aumentó significativamente las células T NK1.1 a 1.8 y 1.3 veces, respectivamente ($P < 0.05$). Al analizar las células productoras de IFN γ en la infección con 10 y 20 millones de parásitos se observó un incremento de 6.9 y 10.1 veces de las células productoras de IFN γ , respectivamente ($P < 0.05$). Por otra parte, en linfocitos T de bazo obtenidos de ratones infectados con 10 millones de parásitos se encontró que el estímulo con peptidoglicano aumentó significativamente la población de linfocitos T NK1.1 en 1.52 veces ($P < 0.05$) y las células productoras de IFN γ en 1.61 veces ($P < 0.05$) en relación a los ratones sanos. Mientras que en la infección con 20 millones de parásitos también se observó una tendencia a incrementar la población de células T NK1.1 y en aumentar las células productoras de IFN γ , pero no se encontró ninguna diferencia significativa. El estímulo con LPG de

Leishmania mexicana incrementó ligeramente el número de células T NK1.1 en ratones sanos o infectados, e incrementó significativamente el número de células T NK1.1 productoras de IFN γ en ratones sanos (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del incremento de la población de células T NK1.1 y T NK1.1 productoras de IFN γ de bazo de ratones sanos e infectados, estimulados *in vitro* con diversos glicoconjugados.

	SANOS		INFECTADOS 10x10 ⁶ parásitos		INFECTADOS 20x10 ⁶ parásitos	
	T NK1.1	IFN γ	T NK1.1	IFN γ	T NK1.1	IFN γ
BASAL	1	1	1	1	1	1
BIOSTIM	1.8*	6.9*	1.59	1.42*	1.94	1
PEPTIDOGLICANO	1.3*	13.7*	1.52*	1.61*	1.15	0.99
LPG	1.2	10.1*	1.3	1.08	2.55	4.45

n=3

La tabla 1 muestra los datos de los linfocitos T de bazo de ratones sanos e infectados con 10 y 20 millones de *L. mexicana* y estimulados *in vitro* con glicoconjugados. Se muestra el incremento de la población de células T NK1.1 (normalizado a 1), al igual que el incremento en la población de células T NK1.1 productoras de IFN γ . El estímulo ejercido

por Biostim y peptidoglicano indujo un incremento significativo de células T NK1.1 y también aumento significativamente la producción de $IFN\gamma$ por estas mismas células, tanto en ratones sanos como en los ratones infectados con 10 millones de parásitos (* $P < 0.05$).

Adicionalmente se analizó si las células T NK1.1 de bazo de ratones sanos tenían la capacidad de reconocer y proliferar ante la glicoproteína gp63 de *Leishmania mexicana* presentada por los macrófagos autólogos.

6.9. Proliferación de células T NK1.1 estimulados con gp63 de *Leishmania mexicana*

Encontramos que el 15 % de linfocitos T NK1.1 proliferaron durante 96 horas cuando fueron coincubados con los macrófagos autólogos pulsados con la gp63 de *Leishmania mexicana* (Figura 20).

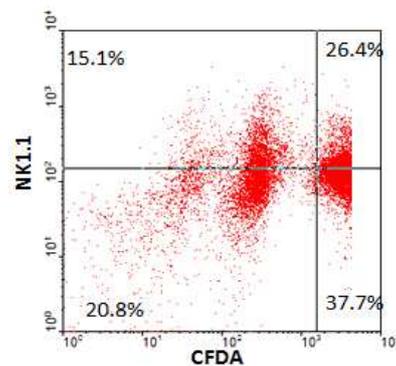


Figura 20. Proliferación de células T NK 1.1. La gráfica de puntos muestra que el 15% de las células T NK1.1 proliferan por el estímulo de gp63 de *Leishmania mexicana*.

VII. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta al humano y a diversos mamíferos. La inmunidad en esta enfermedad está mediada por una respuesta celular tipo Th1 (5). Las células T CD4 y T CD8 son células efectoras que liberan citocinas tales como IFN γ y, en el caso de los linfocitos T CD8, también son citotóxicos contra células infectadas por *Leishmania* (11, 39). Las células NKT también son importantes en la leishmaniasis murina, ya que se han encontrado que estas poblaciones celulares incrementan durante la infección por *Leishmania* (17,18). Una característica importante de las células T es que todas pueden expresar marcadores de células NK tales como el marcador NK1.1 (Tabla 2) bajo ciertas condiciones. El marcador NK1.1 ha sido descrito como un receptor que desencadena la liberación de IFN γ y citotoxicidad.

La tabla 2. Principales poblaciones de linfocitos T de bazo de ratones C57BL/6 junto con sus distintos fenotipos y la expresión de NK1.1.

Subpoblaciones de

Linfocitos T	T $\gamma\delta$	NKT	CD8 $\alpha\beta$	CD4 $\alpha\beta$
NK1.1	+	+	+	+
Restricción	CD1/?	CD1	MHC I	MHC II
Referencias	40	41	42	22

En el presente trabajo analizamos la expresión del marcador NK1.1 en los linfocitos T de bazo y analizamos la producción de IFN γ por estas células durante la infección por *L. mexicana*. Encontramos que durante la infección por *Leishmania mexicana* aumenta tanto

el número de las células T NK1.1 así como la intensidad del marcador NK1.1 en las células T de bazo de ratones C57BL/6 (Figuras 10, 11). En un ratón sano sólo el 3% de las células T expresan el marcador NK1.1 y son conocidas como los linfocitos NKT (21). Encontramos que la infección con 20 millones de promastigotes de *L. mexicana* incrementó el número de las células T NK1.1 aproximadamente 2 veces, mientras que durante la infección con 10 millones de promastigotes no se observó un cambio en el número de células T NK1.1, aunque en ambas infecciones incrementó la intensidad de la expresión del marcador NK1.1 en las células T. Estos datos coinciden con la literatura, donde se ha descrito que las células NKT de hígado incrementaron de 1.5 a 2 veces con la infección de *L. major*, mientras que con *L. donovani* se observó que las NKT de hígado incrementaron casi 3 veces (18).

Se reportó que los linfocitos T CD8 restringidos por MHC I adquieren el fenotipo de las células NK con la expresión del marcador de superficie NK1.1 cuando se infectaron ratones con el virus de la influenza A (42). Estos autores observaron que en el lapso de 7 a 14 días de infección, las células T CD8 NK1.1 que reconocieron antígenos del virus a través de MHC I aumentaron e incrementaron su producción de IFN γ intracelular.

Un incremento en la expresión de NK1.1 en los linfocitos T puede tener implicaciones importantes, ya que se ha demostrado que es un marcador de citotoxicidad en los linfocitos T (43). Esto podría indicar que las células T NK1.1 encontradas en nuestro estudio posiblemente correspondan a células citotóxicas y que aproximadamente el 25% de estas células también son productoras de IFN γ , una citocina importante para la producción de óxido nítrico (11, 44, 54). La producción de IFN γ se ha asociado con la protección en leishmaniasis, ya que favorece la muerte de células infectadas mediante el aumento en la

presentación de antígenos por MHC y adicionalmente estimula la citotoxicidad en las células NK (45).

Una de las dudas que se generaron en este estudio fue la identificación del subtipo de linfocitos T que incrementó el marcador NK1.1 en los ratones C57BL/6 infectados con *Leishmania mexicana*. Al analizar las subpoblaciones de células que expresaron el NK1.1 pudimos identificar que eran T CD4, T CD8 o DN y que los cambios en el número de estas subpoblaciones fueron similares, ya que todas incrementaron con la infección por *L. mexicana*. En el caso de los linfocitos T de bazo de ratones sanos encontramos una expresión basal del 2.2 % de las células T CD4 NK1.1. La infección con 20 millones de promastigotes de *L. mexicana* incrementó el número de células T CD4 NK1.1, mientras que la infección con 10 millones de parásitos redujo el porcentaje de células T CD4 NK1.1. Interesantemente en ambas infecciones encontramos un incremento en el número de moléculas NK1.1 por célula en la subpoblación de linfocitos CD4 NK1.1 (Figuras 12, 13). En el caso de los linfocitos T CD8 NK1.1 ocurrió algo similar. Los ratones sanos tenían una población basal del 2.9 % de células CD8 NK1.1 y se observó que los ratones infectados con 20 millones de parásitos incrementaron el tamaño de esta población, mientras que la infección con 10 millones de parásitos redujo esta población significativamente (Figuras 14, 15). En el caso de la infección con 20 millones posiblemente lo que estamos observando es que parte de la población de linfocitos T que incrementó son células NKT, ya sea NKT CD4⁺ o NKT CD8⁺ (46).

Por otro lado encontramos una subpoblación de linfocitos DN que expresan NK1.1. Nuestros resultados mostraron que esta población comprende el 0.1% de los linfocitos T de bazo en ratones sanos. Interesantemente, se pudo observar un incremento a un 2%, tanto en

infecciones con 10 como con 20 millones de promastigotes de *L. mexicana* (Figura 16). Estos resultados sugieren que estas células podrían ser una subpoblación de células NKT (CD4⁺ o CD8⁺) o bien células T $\gamma\delta$, ya que estas células también pueden expresar el fenotipo de células DN (40).

Al analizar las células productoras de IFN γ encontramos que todas las células CD4, CD8 y DN, que expresaron el marcador NK1.1, también produjeron IFN γ (Figuras 18, 19), por lo que todas estas células adquirieron un fenotipo de célula Th1, transformándose en células relevantes para el control de la infección por *L. mexicana* (7).

Otro dato que observamos fue que las células T NK1.1 que incrementaron durante la infección por *L. mexicana* también presentaron la capacidad de reconocer y proliferar ante el estímulo de la molécula gp63 del parásito (Figura 20). Este dato nos podría estar indicando una especificidad de esta subpoblación de linfocitos T hacia este antígeno del parásito. Sería interesante analizar la subpoblación de células que proliferó y definir la vía de presentación de la molécula gp63, ya que la glicoproteína pudo haber sido presentado por MHC II o por CD1 activando distintos subtipos celulares.

En este trabajo se analizó adicionalmente si diversos glicoconjugados tienen la capacidad de modular el marcador NK1.1 y la producción de IFN γ de células T NK1.1. Se analizaron dos glicoconjugados no relacionados con *Leishmania* (Biostim y peptidoglicano) y un glicoconjugado de *Leishmania mexicana* (LPG). Encontramos que el número de células T NK1.1 incrementa de manera significativa después de 24 horas de estímulo (Tabla 1). Adicionalmente encontramos que el porcentaje de células productoras de IFN γ también incrementó con los estímulos ejercidos por el peptidoglicano. Esto nos confirma que la

expresión de NK1.1 y la producción de IFN γ por las células T de bazo de ratón pueden ser moduladas por glicoconjugados.

Cabe resaltar que en el caso de la infección con 20 millones de parásitos, las células T NK1.1 productoras de IFN γ no aumentaron (salvo un caso aislado con LPG pero no fue estadísticamente significativo). Posiblemente esto se deba a la carga excesiva del inóculo que pudo haber ejercido un intenso estímulo asociado a una sobre-producción de la citocina durante la fase inicial y que esto ya no permitió un sobre-estímulo subsecuente.

Queda por establecerse si estos glicoconjugados podrían unirse directamente a este receptor de tipo lectina (NK1.1). El caso de peptidoglicano es de relevancia, ya que este glicoconjugado consta de dos repeticiones de disacáridos N- acetil, el N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico (47) que son agonistas de TLR 2. Adicionalmente se ha demostrado que N-acetilglucosamina es un ligando de NK1.1 (25). Estos antecedentes podrían estar indicando que la estimulación de linfocitos T por peptidoglicano podría estar ocurriendo por activación de TLR2 y posiblemente también por unión a NK1.1, ambos de los cuales están presentes en linfocitos T (26, 48). Por otra parte, el estímulo ejercido por LPG probablemente haya sido a través de TLR2, ya que ha sido demostrado ser uno de los ligandos específicos de este receptor (35).

El tercer glicoconjugado que moduló a las células T NK1.1 fue Biostim. A la fecha se desconoce el receptor que es activado por Biostim, que es un extracto compuesto de múltiples glicoconjugados obtenidos de *Klebsiella*. Es posible que, como en el caso de peptidoglicano, podrían estar participando ambos receptores el NK1.1 y TLR2. En ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* se ha observado que el tratamiento con Biostim ejerce un efecto protector (49). Los resultados del presente trabajo arrojan novedosos datos acerca

de los posibles mecanismos protectores inducidos por Biostim ya que incrementa la expresión de NK1.1 en los linfocitos T de bazo así como la producción de IFN γ por estas células y ambos eventos favorecen el control de la enfermedad. El aumento de NK1.1 pudiera estar asociado a una mayor actividad citotóxica, mientras que el aumento de IFN γ induce mecanismos leishmanicidas del macrófago.

En resumen, el presente trabajo nos aporta nuevos conocimientos sobre los efectos inmunomoduladores ejercidos por *Leishmania mexicana* y los glicoconjugados Biostim, peptidoglicano y LPG sobre células T NK1.1, incrementando el número y el marcador NK1.1 en estas células, al igual que su producción de IFN γ . Queda por establecerse si su posible participación en el control de la enfermedad sea debido a su actividad citotóxica, su producción de IFN γ o una combinación de ambos.

VIII. CONCLUSIONES

El control de la infección por *Leishmania mexicana* se asocia con un incremento en el número de células T NK1.1 y en su producción de IFN γ , lo cual podría ser indicativo de que las células T NK1.1 pueden ser importantes para la resolución de la leishmaniasis en ratones C57BL/6.

Las células T NK1.1 tienen la capacidad de responder a glicoconjugados y adicionalmente al reconocimiento de antígenos de *Leishmania mexicana*.

El glicoconjugado Biostim incrementa la expresión del receptor de tipo lectina NK1.1 y la producción de IFN γ en células T de bazo de ratones C57BL/6, lo cual puede ser una posible explicación de su efecto protector reportado en esta parasitosis.

IX. PERSPECTIVAS

Sería importante definir si las células T NK1.1 son células restringidas por MHC o por CD1d. La posible marca de estas células con un anticuerpo contra la cadena invariante de las células NKT podría ayudar a caracterizar mejor esta población celular.

Dado que las células T NK1.1 se han asociado con la protección en leishmaniasis murina, será importante estudiar si el efecto protector radica en la producción de IFN γ o si también tiene que ver el efecto citotóxico hacia células infectadas con *L. mexicana*.

Sería importante estudiar a las células T NK 1.1 en pacientes con LCL y LCD para definir su papel en la enfermedad.

X. REFERENCIAS

- 1 The Center for Food Security & Public Health. <http://www.cfsph.iastate.edu/>
- 2 Organización Mundial de la Salud (OMS). <http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Leishmaniasis.pdf>
- 3 Zetina, J. L. J. (2008). "Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México." Dermatología Rev Mex **52**(1).
- 4 Banuls, A. L., M. Hide, et al. (2007). "*Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." Adv Parasitol **64**: 1-109.
- 5 Sacks, D. and N. Noben-Trauth (2002). "The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice." Nat Rev Immunol **2**(11): 845-58.
- 6 Uribarren Berrueta. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/leishmaniosis.php>.
- 7 Sharma, U. and S. Singh (2009). "Immunobiology of leishmaniasis." Indian J Exp Biol **47**(6): 412-23.

- 8 Olivier, M., D. J. Gregory, et al. (2005). "Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view." Clin Microbiol Rev **18**(2): 293-305.
- 9 Grigore, D. and J. C. Meade (2006). "A COOH-terminal domain regulates the activity of *Leishmania* proton pumps LDH1A and LDH1B." Int J Parasitol **36**(4): 381-93.
- 10 Delgado-Dominguez, J., H. Gonzalez-Aguilar, et al. "*Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC alpha-induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice." Parasite Immunol **32**(6): 440-9.
- 11 Awasthi, A., R. K. Mathur, et al. (2004). "Immune response to *Leishmania* infection." Indian J Med Res **119**(6): 238-58.
- 12 Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.
- 13 Mills, C. D., K. Kincaid, et al. (2000). "M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm." J Immunol **164**(12): 6166-73.
- 14 Schleicher, U., J. Liese, et al. (2007). "NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs." J Exp Med **204**(4): 893-906.

- 15 Joselín Hernández-Ruiz and I. Becker (2006). "Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea." Salud Pública **48**: 430-439.
- 16 Yang, Y., A. Ueno, et al. (2003). "Control of NKT cell differentiation by tissue-specific microenvironments." J Immunol **171**(11): 5913-20.
- 17 Mattner, J., N. Donhauser, et al. (2006). "NKT cells mediate organ-specific resistance against *Leishmania major* infection." Microbes Infect **8**(2): 354-62.
- 18 Stanley, A. C., Y. Zhou, et al. (2008). "Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis." PLoS Pathog **4**(2): e1000028.
- 19 Arase, N., H. Arase, et al. (1997). "Association with FcR gamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells." J Exp Med **186**(12): 1957-63.
- 20 Kumar, V. and M. E. McNerney (2005). "A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance." Nat Rev Immunol **5**(5): 363-74.
- 21 Godfrey, D. I., K. J. Hammond, et al. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today **21**(11): 573-83.
- 22 Mark K. Slifka, R. R. P., and J. Lindsay Whitton (2000). "NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD81 and CD41 T Cells" The Journal of Immunology **164**: 2009–2015.

- 23 Terme, M., G. Mignot, et al. (2009). "The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells." Cancer Res **69**(16): 6590-7.
- 24 Jan D. Haas , F. H. M. G., S. Schmitz, et al. (2009). "CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN- γ -producing and (ES γ ?) effector T cells." Eur. J. Immunol. **39**: 3488–3497.
- 25 Bezouska, K., G. Vlahas, et al. (1994). "Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein." J Biol Chem **269**(24): 16945-52.
- 26 McMahon, C. W. and D. H. Raulet (2001). "Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells." Curr Opin Immunol **13**(4): 465-70.
- 27 Herman, J., M. C. Kew, et al. (1986). "The effect of RU 41.740 (Biostim) on the production of interleukin-1 by monocytes and enriched large granular lymphocytes in normals and patients with hepatocellular carcinoma." Cancer Immunol Immunother **21**(1): 26-30.
- 28 Estaquier, J., C. Bloy, et al. (1998). "The immunomodulating glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae* RU 41740 exerts a suppressive effect on human monocyte death by apoptosis." Immunopharmacology **39**(2): 157-64.

- 29 Silhavy, T. J., D. Kahne, et al (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000414.
- 30 Takeda, K. and S. Akira (2004). "TLR signaling pathways." Semin Immunol **16**(1): 3-9.
- 31 Eriksson, M., S. K. Meadows, et al. (2006). "TLRs mediate IFN-gamma production by human uterine NK cells in endometrium." J Immunol **176**(10): 6219-24.
- 32 Hajmova, M., K. P. Chang, et al. (2004). "Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*." Microbes Infect **6**(7): 646-9.
- 33 Olafson, R. W., J. R. Thomas, et al. (1990). "Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*(ES MEXICANA O AMAZONENSIS? O ASI VA?)." J Biol Chem **265**(21): 12240-7.
- 34 Ilg, T., R. Etges, et al. (1992). "Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan." J Biol Chem **267**(10): 6834-40.
- 35 Becker, I., N. Salaiza, et al. (2003). "*Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 65-74.
- 36 Rowley, J., A. Monie, et al. (2008). "Inhibition of tumor growth by NK1.1+ cells and CD8+ T cells activated by IL-15 through receptor beta/common gamma signaling in trans." J Immunol **181**(12): 8237-47.

- 37 Pied, S., J. Roland, et al. (2000). "Liver CD4-CD8- NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro." J Immunol **164**(3): 1463-9.
- 38 Ljutic, B., J. R. Carlyle, et al. (2005). "Functional requirements for signaling through the stimulatory and inhibitory mouse NKR-P1 (CD161) NK cell receptors." J Immunol **174**(8): 4789-96.
- 39 Hernandez-Ruiz, J., N. Salaiza-Suazo, et al. (2010). "CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e871.
- 40 Haas, J. D., F. H. Gonzalez, et al. (2009). "CCR6 and NK1.1 distinguish between IL-17A and IFN-gamma-producing gammadelta effector T cells." Eur J Immunol **39**(12): 3488-97.
- 41 Seino, K. and M. Taniguchi (2005). "Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes." J Exp Med **202**(12): 1623-6.
- 42 Kambayashi, T., E. Assarsson, et al. (2000). "Emergence of CD8+ T cells expressing NK cell receptors in influenza A virus-infected mice." J Immunol **165**(9): 4964-9.

- 43 Trop, S., D. Samsonov, et al. (1999). "Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model." Hepatology **29**(3): 746-55.
- 44 Laskay, T., A. Diefenbach, et al. (1995). "Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection." Eur J Immunol **25**(8): 2220-7.
- 45 Yang, Y., Z. Xiang, et al. (1995). "Upregulation of class I major histocompatibility complex antigens by interferon gamma is necessary for T-cell-mediated elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7257-61.
- 46 Bendelac, A., P. B. Savage, et al. (2007). "The biology of NKT cells." Annu Rev Immunol **25**: 297-336.
- 47 Silhavy, T. J., D. Kahne, et al (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(5): a000414.
- 48 Komai-Koma, M., L. Jones, et al. (2004). "TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3029-34.
- 49 Tesis de licenciatura 2009. Luis García Erika
- 50 Stremmel, C., M. Exley, et al. (2001). "Characterization of the phenotype and function of CD8(+), alpha / beta(+) NKT cells from tumor-bearing mice that show a natural killer cell activity and lyse multiple tumor targets." Eur J Immunol **31**(9): 2818-28.

- 51 Seino, K. and M. Taniguchi (2005). "Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes." J Exp Med **202**(12): 1623-6.
- 52 Aguilar Torrentera, F., M. A. Lambot, et al. (2002). "Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*." Am J Trop Med Hyg **66**(3): 273-9.
- 53 Gough, D. J., D. E. Levy, et al. (2008). "IFN γ signaling-does it mean JAK-STAT?" Cytokine Growth Factor Rev **19**(5-6): 383-94.
- 54 Liew, F. Y., X. Q. Wei, et al. (1997). "Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1359): 1311-5.
- 55 Ascenzi, P., A. Bocedi, et al. (2003). "The anti-parasitic effects of nitric oxide." IUBMB Life **55**(10-11): 573-8.

56 Gonzalez, C., O. Wang, et al. "Climate change and risk of leishmaniasis in north america: predictions from ecological niche models of vector and reservoir species." PLoS Negl Trop Dis 4(1): e585.