



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio de la participación del factor
inhibidor de la migración de
macrófagos (MIF) y STAT-6 en la
infección por *Leishmania mexicana*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
FERNANDO LEYVA HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

POR MÍ SE VA HASTA LA CIUDAD DOLIENTE,
POR MÍ SE VA AL ETERNO SUFRIMIENTO,
POR MÍ SE VA A LA GENTE CONDENADA.

LA JUSTICIA MOVIÓ A MI ALTO ARQUITECTO.
HÍZOME LA DIVINA POTESTAD,
EL SABER SUMO Y EL AMOR PRIMERO.

ANTES DE MÍ NO FUE COSA CREADA
SINO LO ETERNO Y DURO ETERNAMENTE.
DEJAD, LOS QUE AQUÍ ENTRÁIS, TODA ESPERANZA

Dedicatorias

Quiere dedicar la presente a:

Mamá: Por estar siempre a mi lado en los momentos de éxito y fracaso, por tus sabios consejos, por todo el cariño y amor que me has dado, por la paciencia y por darme la fortaleza y apoyo para concluir este logro. Te amo.

Papá: Por la formación que me hace ser quien soy, por tu confianza, los momentos felices que he pasado a tu lado, los consejos que siempre me has dado y en especial por la lista de cómo conquistar a una chica que siempre me hizo reír. Te amo.

Hermanos: Por todas las tardes que compartimos, los momentos felices que me han dado. Charlo, por apoyarme incondicionalmente, por todos los momentos de alegría que hemos compartido y por todos los consejos que me has dado. Te quiero.

Claus, por compartir conmigo todas tus ideas, por estar a mi lado en los momentos felices y tristes y sobre todo por darme tu cariño. Te quiero.

Abuelos: Por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A mi abuelita Gaby, por compartirme sus experiencias, por su cariño y el apoyo que me has brindado toda mi vida. Te quiero.

En memoria de mi abuelito Berna, por el cariño y la ternura que me diste, por las anécdotas que me contabas y por recibirme en tu casa siempre con una sonrisa. Siempre te recordaré, Te quiero.

A mi abuelita Manuelita, por todas las tardes que me cuidaste cuando era pequeño, por el amor que me has dado y por escucharme siempre. Te quiero.

Familia: A todos ustedes que por cuestiones de espacio no puedo mencionar a cada uno les dedico esta tesis. Muchas gracias por el apoyo que me han dado a lo largo de mi vida.

Novia: Rebe, por estar siempre conmigo, por apoyarme en todas mis locuras, escucharme, darme consejos, por tenerme paciencia y por convencerme de adoptar a nuestra hija más peluda "Kyra". Te amo.

Agradecimientos

Con todo cariño y respeto para mi directora de Tesis Dra. Miriam Rodríguez Sosa, por la oportunidad que me brindó en el laboratorio que tiene a su cargo, para poder concluir con éxito esta parte importante de mi vida. Gracias por la confianza que me otorgó.

Al Dr. Ignacio Terrazas Valdés por los comentarios oportunos que me brindó y por su confianza.

Al Dr. Abhay Satoskar por facilitarnos la cepa de *Leishmania mexicana*.

A Miriam Romero Grijalva, por todo su apoyo en la realización de mi tesis y por su amistad.

A Imelda Juárez Avelar, por su paciencia, confianza y amistad. Gracias

A mis sinodales por el asesoramiento en la realización de la tesis. Gracias por todos sus comentarios y observaciones:

Dr. Santiago Martínez Calvillo

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dr. Ignacio Terrazas Valdés

Biol. Miriam Romero Grijalva

Al Bioterio de la FES Iztacala por facilitarme los ratones que se requirieron en este proyecto.

A los profesores de la FES Iztacala que tuve a lo largo de mi trayectoria académica, a los cuales siempre vi con admiración y respeto.

A mis compañeros de los laboratorios 5 y 8, por los días que pasamos juntos, por siempre enseñarme cosas nuevas.

A Llarai por su amistad y por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente

A mis amigos Víctor y Michele, por esas tardes de fiesta y por todos los momentos buenos que pasamos, un día les voy a enseñar chavos.

Contenido

Contenido

Abreviaturas

Resumen

1. Introducción	1
1.1 Respuesta inmune innata	1
1.2 Respuesta inmune adaptativa	2
1.3 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	3
1.3.1 MIF en enfermedades parasitarias	4
1.4 Transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT)	6
1.4.1 STAT-6	8
1.4.2 STAT-6 en enfermedades parasitarias	8
1.5 <i>Leishmania</i> y leishmaniosis	9
1.5.1 Distribución de la Leishmaniosis	11
1.5.2 Ciclo de vida de <i>L. mexicana</i>	13
1.5.3 Respuesta Inmune en la infección por <i>L. mexicana</i>	15
2. Justificación	20
3. Objetivo General	20
3.1 Objetivos particulares	20
4. Hipótesis	20
5. Material y Métodos	21
5.1 Animales	21
5.2 Confirmación del genotipo por PCR	21
5.3 Amplificación del gen (PCR)	21
5.4 Electroforesis	22
5.5 Parásitos	22
5.6 Infección	23
5.7 Monitoreo del tamaño de inflamación	23
5.8 Determinación de parásitos por PCR punto final	23
5.9 Carga parasitaria por dilución limitante	24
5.10 Obtención de Suero	25
5.11 Detección de citocinas en sueros por la técnica de ELISA	25
5.12 Cuantificación de antígeno total de <i>L. mexicana</i>	26
5.13 Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal	27
5.14 Determinación de óxido nítrico (NO) en sobrenadantes de cultivo de macrófago.	28
5.15 Histología	28
5.16 Análisis estadístico	28

6	Estrategia experimental	29
7	Resultados	30
8	Discusión	53
9	Conclusión	56
10	Apéndice 1	57
11	Apéndice 2	58
12	Referencias	59

Abreviaturas

IL-	Interleucina
NK	Células asesinas naturales
TLR	Receptores tipo Toll
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
LPS	Lipopolisacáridos
CPA	Células presentadoras de antígeno
CTL	lifocitos T citotóxicos
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
ON	Óxido nítrico
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
STAT	Transductor de señales y activadores de la transcripción
JAK	Janus Tirosina Cinasa
IL-4R	Receptor de la IL-4
IL-4R α	La cadena alfa del receptor de IL-4
LC	Leishmaniosis cutánea
LM	Leishmaniosis mucocutánea
LV	Leishmaniosis visceral
OMS	Organización Mundial de la Salud
LPG	Lipofosfoglicanos
GPI	glicosilfosfatidilinositol
MBL	Lectina de unión a la manosa

LCF	Factor quimiotáctico de Leishmania
MIP-1 β	Proteína inflamatoria del macrófago
iNOs	NO sintasa
PECs	Células del exudado peritoneal
M \emptyset	Macrófagos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa

Resumen

La leishmaniosis es una parasitosis de distribución mundial causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. En México esta parasitosis es causada principalmente por *L. mexicana* y produce lesiones cutáneas. Se ha sugerido que para su control es necesario el desarrollo de respuesta inmune celular, citocinas pro-inflamatorias y la actividad citotóxica de las células NK. La participación de la respuesta tipo Th1 en el control de esta enfermedad aún debe definirse completamente. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina con acción pleiotrópica que es producida por células tanto inmunes como no inmunes y promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL β . Se ha reconocido que esta citocina juega un papel fundamental en la patogénesis de algunas enfermedades, tales como la artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del pulmón y también se ha establecido su participación en la respuesta inmune protectora contra algunos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Taenia crassiceps* y *Leishmania major*.

Por otra parte STAT-6 es un factor de transcripción para la correcta activación de citocinas anti-inflamatorias como IL-13 e IL-4 favoreciendo la respuesta tipo Th2. Este factor de transcripción también se ha visto involucrado en el desarrollo de algunas enfermedades atópicas tal como la hiperreactividad bronquial después de la provocación con un alérgeno. Por otra parte STAT-6 se ha visto involucrada en la susceptibilidad contra algunas enfermedades parasitarias como las producidas por *T. cruzi* y *L. mexicana*.

Si bien la inmunidad contra la *Leishmania* es principalmente mediada por células T, y varias investigaciones con *L. major* apoyan al paradigma en el cual una respuesta con células tipo Th1 está asociada con una inmunidad protectora y resolución de la enfermedad, mientras una respuesta tipo Th2 está asociada con la susceptibilidad y una exacerbación de la enfermedad. Sin embargo, en la infección por *L. mexicana* no está bien establecida la respuesta inmune protectora. Conociendo esto, en el presente trabajo se examinó el grado de participación de la respuesta inflamatoria en la infección causada por *L. mexicana* en un modelo murino.

Se utilizaron ratones ♂ con fondo genético BALB/c deficientes en los genes STAT-6 (STAT-6^{-/-}), MIF (MIF^{-/-}) y MIF/STAT6 [MIF/STAT6^(-/-)] y como controles se utilizaron ratones "silvestres" del mismo fondo genético. Se infectaron los ratones con 2×10^6 parásitos de *L. mexicana* (MNYC/BZ/M379) de manera subcutánea. Se registró semanalmente el tamaño de la lesión en el sitio de inoculación, se cuantificó la carga parasitaria en las semanas 5 y 9 post-infección por dilución limitante y también se cuantificó por PCR los parásitos, se realizaron cortes histológicos para observar la lesión a las 5 y 9 semanas post-infección. Se obtuvieron sueros para la determinación de citocinas

pro-inflamatorias tales como TNF- α , INF- γ e IL-12 y de igual manera para la citocina anti-inflamatorias IL-4 por medio de ELISA sándwich. Se realizó un cultivo de macrófagos del peritoneo a la semana 5 y 9 post-infección y se midió en óxido nítrico en el sobrenadante del cultivo.

Los ratones MIF/STAT-6 $-/-$ resultaron con menor tamaño de inflamación en el área de la lesión al igual que una menor carga parasitaria que se comprobó con poca existencia de DNA parasitario que se midió por medio de PCR. En la histología llevada a cabo a la 5 y 9 semana post-infección, los ratones deficientes para STAT-6 y para ambos genes resultaron con menor daño en el tejido y menor infiltración celular. En lo que respecta a las citocinas pro-inflamatorias los ratones con deficiencia en ambos genes tuvieron mayores niveles de estas apeándose más a una respuesta tipo Th1 que a una respuesta tipo Th2. En la medición de óxido nítrico tanto los ratones STAT-6 $-/-$ y los MIF/STAT-6 $-/-$ tuvieron mayor concentración a la semana 9 post-infección que los ratones silvestres y MIF $-/-$.

En conclusión la ausencia simultánea de los genes MIF y STAT-6 favorece el pronóstico para combatir la infección por *L. mexicana*, produciendo una alta expresión de citocinas relacionadas a una respuesta tipo Th1, al igual que la señalización vía STAT-6 juega un papel importante en la susceptibilidad contra la infección causada por *L. mexicana*, por otra parte MIF está relacionado con la replicación del parásito.

1. Introducción

Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune y la respuesta global y coordinada tras la introducción de sustancias extrañas es la respuesta inmune, por lo cual se considera a la inmunidad como una serie de reacciones a sustancias extrañas, incluyendo microorganismos así como a macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, sin que dicha reacción tenga una repercusión fisiológica o patológica en el organismo [4].

La inmunidad ha sido dividida en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Las principales diferencias entre ambas respuestas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento del antígeno. Las señales producidas por la inmunidad innata, controlan aspectos de la inmunidad adaptativa. De igual manera, la respuesta adaptativa puede dirigir a la respuesta innata contra agentes infecciosos, como en el caso de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Ambas respuestas inmunes son reguladas en gran parte por un grupo de proteínas llamadas Interleucinas (ILs-) o citocinas [23].

1.1 Respuesta inmune innata

La inmunidad innata es el primer mecanismo de defensa contra un agente extraño, la cual se caracteriza por no conferir memoria inmunológica [15]. Las características de la inmunidad innata se limitan a la capacidad para discriminar un organismo de otro, los elementos que intervienen en la inmunidad innata son: las barreras físicas y químicas, como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial; las proteínas sanguíneas en las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y células fagocíticas como, los macrófagos, neutrófilos, células NK (asesinas naturales) y granulocíticas como, eosinófilos y basófilos [4].

La detección inicial de patógenos se lleva a cabo por las células centinelas del sistema inmune innato, tales como los macrófagos y las células dendríticas, que se encuentra en los tejidos que están en contacto con el entorno natural del huésped, y luego mediante las células granulocíticas que están en circulación y los monocitos que son rápidamente reclutados al sitio de infección [8]. Todas estas células expresan en su superficie receptores de la familia tipo Toll (TLRs, del inglés-Toll-like receptors) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en un gran grupo de organismos. El ejemplo más conocido de PAMPs incluye el LPS (lipopolisacárido) de las bacterias gram-negativas y el peptidoglicano de las bacterias gram-positivas [24].

Estos PAMPs son reconocidos por TLRs en la membrana de los macrófagos, activándolos para que fagociten y destruyan la bacteria. Los macrófagos funcionan también como células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), las cuales inducirán la secreción de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α (Factor de necrosis tumoral) que sirven para iniciar una respuesta inflamatoria y para definir, la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica [23].

1.2 Respuesta inmune adaptativa

Esta respuesta comienza cuando el antígeno es fagocitado por las células profesionales presentadoras de antígeno (CPA) inmaduras llamadas células dendríticas (CD). Estas células profesionales fagocíticas son residentes de la mayoría de los tejidos y migran a través de la linfa para interactuar con los linfocitos vírgenes recirculantes [4]. Esta respuesta es mediada por linfocitos T y B que tienen receptores de antígeno, la especificidades de estos receptores son generados por mecanismos somáticos [35].

Los linfocitos B provenientes de la médula ósea son las únicas células capaces de producir anticuerpos específicos para cada patógeno cuando estas se encuentran activadas como células plasmáticas, ayudadas por CPA y moléculas del complejo principal de Histocompatibilidad MHC I y MHC II, reconocidas por linfocitos CD8+ y CD4+ respectivamente.

Los linfocitos T, también provienen de la médula ósea, pero maduran en el timo y cuando son activados, pueden activar a otras células como linfocitos B y macrófagos [4]. Los linfocitos T se subdividen a su vez en linfocitos T citotóxicos (CTL) (células con el marcador de membrana CD8), encargada de eliminar células infectadas por virus o tumorígenas y linfocitos T cooperadores (células con el marcador de membrana CD4), los cuales se pueden diferenciar en subtipos: célula T cooperadora tipo 1 (Th1) que secretan IL-2 e IFN- γ pero no interleucinas 4, 5, 6, IL-13, célula T cooperadora tipo 2 (Th2) que secreta interleucinas 4, 5, 6 y 13 pero no IL-2 o IFN- γ , células T reguladoras (Treg), que tienen un papel anti-inflamatorio y ayudan a prevenir las enfermedades autoinmunes, secretan principalmente IL-10 [8] y las células Th17 caracterizadas por la producción de citocinas principalmente IL-17 e IL-6 [65].

Las citocinas tienen un papel central en la respuesta inmune, ya que tienen influencia en el tipo de respuesta inmune necesario para la protección contra tipos particulares de agentes infecciosos. Por ejemplo, la liberación de IL-12 por células presentadoras de antígeno estimula la producción de IFN- γ y TNF- α por células Th1 [15]. Estas citocinas activan y reclutan eficientemente a los macrófagos para que produzcan Óxido Nítrico (ON)

el cual puede atravesar la pared celular eliminando organismos intracelulares [4]. Por lo tanto, la producción de citocinas tipo Th1 favorece la inmunidad mediada por células como es la activación de macrófagos, mientras que las células tipo Th2 producen una inflamación eosinofílica y anticuerpos de la clase IgE, que favorecen una respuesta humoral [15]. Sin embargo, un desbalance en la respuestas Th1/Th2 puede resultar condiciones patológicas. Por ejemplo una polarizada respuesta tipo Th1 puede causar enfermedades inflamatorias o autoinmunes como hepatitis fulminante, diabetes mellitus insulino-dependiente, colitis ulcerativa. En contraste con una respuesta exagerada tipo Th2 que puede llevar a enfermedades alérgicas como dermatitis atópica y asma bronquial [63].

Ambos tipos de respuestas Th1 y Th2 pueden inhibirse una a la otra por medio de citocinas. El IFN- γ tiene la habilidad de inducir la respuesta Th1 e inhibir la diferenciación de la respuesta tipo Th2 [49], por otra parte la IL-4 puede disminuir la producción de IL-12, IFN- γ e inhibir la producción de ON en macrófagos [6].

Regularmente la respuesta inmune celular mediada por Th1 controla las infecciones intracelulares como algunos tipos de leishmaniosis y tuberculosis, mientras que la respuesta inmune Th2 mediada por anticuerpos resulta más adecuada contra patógenos extracelulares, como los gusanos intestinales [47].

Adicionalmente, las Treg pueden regular la respuesta Th1 inducida por las células dendríticas maduras y permitir una polarización hacia una respuesta tipo Th2, por la acción principalmente de la citocina IL-10 [34], mientras que las Th17 puede contra regular la acción de las T reg, inhibiendo la inducción de Foxp3 [26].

1.3 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue descubierto hace más de 40 años durante los estudios de la respuesta de hipersensibilidad retardada siendo una de las primeras citocinas descubiertas [12,32]. Históricamente, las células T activadas fueron consideradas como la fuente de MIF y las poblaciones de monocitos/macrófagos por ser el blanco de sus efectos inhibitorios en la migración azarosa [14]. Estudios posteriores han establecido que los monocitos/macrófagos son el sitio primario de la producción de MIF después de la exposición del huésped frente las endo y exotoxinas bacteriales (LPS, exotoxina estreptocócica pirogénica) o citocinas (TNF- α e INF- γ). Una vez liberado, MIF nivela la expresión de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos, y es un componente importante en la activación de células T [36].

MIF es una citocina con acción pleiotrópica [46] y es constitutivamente expresada en una variedad de células tanto inmunes como no inmunes y se ha sugerido que su

distribución tisular es casi ubicua [31]. En las células inmunes es expresada por monocitos/macrófagos, células T, células B, células dendríticas, neutrófilos y mastocitos, mientras que en las células no inmunes es expresada por células de la glándula pituitaria, células β del páncreas, células de Kupffer (en el hígado), astrocitos (en el cerebro), células epiteliales de la córnea del ojo [12]. Además, se ha observado que MIF tiene capacidad enzimática, es capaz de catalizar la tautomerización de D-dopacromo en ácido 5, 6 dihidroxilo-2 carboxílico *in vitro* [25].

MIF actúa contra regulando los efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores de los glucocorticoides en macrófagos y células T [13,25]. También se ha sugerido que MIF es el mediador inflamatorio inicial que ayuda a estimular la expresión de citocinas como TNF- α , IL-1 β [36], IL-6, IFN- γ [27]. En colaboración con otras citocinas como IFN- γ , MIF promueve la liberación de óxido nítrico en macrófagos y su función fagocítica [25,39].

Hasta el momento no se ha identificado un receptor específico para MIF y se ha descrito que el modo de acción de MIF es a través la unión a la molécula CD74 (cadena invariante de MHC-II) e implica los mecanismos de señalización intracelular regulada por moléculas miembros de la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (ERK, JNK y p38), dependiente del estímulo y del contexto celular [12]. Como no todas las células blanco de MIF expresan CD74 (por ejemplo, los neutrófilos), posiblemente existan otros receptores para MIF. Se ha demostrado que MIF es un ligando no convencional de los receptores de las quimiocinas CXCR2 y CXCR4, a través de éstos MIF promueve el reclutamiento aterogénico de monocitos/macrófagos y de células T [9,52] Las vías de señalización se desconocen, pero estudios de inhibición sugieren la vía AKT.

1.3.1 MIF en enfermedades parasitarias

Como se mencionó en un principio, la descripción original de MIF se centró en su capacidad para prevenir la migración al azar de macrófagos, pero desde su clonación a mediados de la década de 1990 evidenció una gama más amplia de sus acciones pro-inflamatorias [37]. Los estudios posteriores muestran un papel importante de MIF junto con otras citocinas pro-inflamatorias en el desarrollo de numerosas enfermedades inflamatorias e inmunes incluyendo el choque endotóxico [13], artritis reumatoide [37], enfermedades inflamatorias del pulmón donde MIF está presente en los espacios aéreos alveolares de los pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda [17], entre otras enfermedades. Sin embargo, su participación en infecciones parasitarias es aún poco clara.

En la infección causada por *Plasmodium chabaudi*, MIF es liberado por los macrófagos y podría ser un factor relevante en la anemia de la malaria, ya puede sinergizar con TNF- α y/o IL-12 agravando la anemia. Se ha demostrado que el TNF- α induce la

eritrofagocitosis mientras que la IL-12 incrementa el hematocrito. Por lo tanto MIF podría ser un factor importante en la inducción de cambios ultra-estructurales en la medula ósea, actuar localmente para amplificar las respuestas pro-inflamatorias del macrófago, y en sinergia con otras citocinas aumentar el daño mediado por los fagocitos [33].

En el caso de la cisticercosis causada por *Taenia crassiceps* se surge que a diferencia de otros helmintos, la respuesta tipo Th2 no es esencial para la mediación de una inmunidad protectora, por otro lado MIF juega un papel importante en la resistencia murina contra este parásito, aunque aún no se establecen bien los mecanismos en los que interviene. Esto se confirmó en un estudio usando ratones deficientes para el gen que codifica para MIF (-/-), los cuales fueron más susceptibles a este parásito. Se relacionó con niveles bajos en los factores asociados a macrófagos como son: IL-12, TNF- α y NO. Por lo que se surge que MIF es necesario para la activación óptima de los macrófagos para inducir respuestas inflamatorias para el control de la cisticercosis murina [46].

Utilizando los mismos ratones MIF-/- se observó que también fueron más susceptibles a la enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, ya que tuvieron mayores niveles de parasitemia e inflamación cardíaca. Dejando claro que MIF juega un papel importante en el control de la infección causada por *T. cruzi*. Nuevamente, la alta susceptibilidad de los ratones MIF-/- fue asociada a una deficiente producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-1 β ; lo que sugirió que MIF participa en la activación de la inmunidad innata para inducir una pronta respuesta de citocinas inflamatorias contra la infección de *T. cruzi* [43].

La importancia de MIF en la toxoplasmosis también ha sido comprobada. Esta enfermedad es una infección clínicamente asintomática en la mayoría de los individuos pero puede ser fatal en hospederos inmunocomprometidos, la cual es causada por el parásito protozoario *Toxoplasma gondii*. Esta infección induce una fuerte respuesta Th1 y producción de citocinas inflamatorias como IL-12, IL-18, TNF- α e IFN- γ . Estas citocinas son críticas controlando el crecimiento del parásito en el cerebro y en otros órganos, pero también inducen daño tisular responsable de la mortalidad. Los ratones deficientes para el gen que codifica para MIF tuvieron una menor expresión en las citocinas anteriormente mencionadas y mayor cantidad de parásitos alojados en el cerebro. Se comprobó que MIF tiene un papel en la modulación de la inmunidad innata tras la infección por *T. gondii* vía oral afectando la maduración de las células dendríticas y la producción de IL-12 [60]. Además la alteración de la expresión de MIF en el cerebro de pacientes muertos por encefalitis Toxoplásmica surge que MIF puede intervenir confiriendo resistencia en humanos [18].

Es bien aceptado que la capacidad de los ratones genéticamente resistentes a la infección cutánea causada por *L. major* está asociada al desarrollo de IL-12 inducida por la respuesta tipo Th1 y la producción de IFN- γ . Se le ha atribuido a IFN- γ la habilidad de inducir la respuesta tipo Th1, inhibiendo la diferenciación de TH2 y aumentando la actividad leishmanicida del macrófago. Por lo tanto en un estudio en donde se usaron ratones C57BL/6 resistentes a *L. major*, se observó que aquellos que se les había bloqueado MIF resultaron ser susceptibles a la infección cutánea causada por el parásito antes mencionado. Demostrando nuevamente que MIF participa de manera importante en el desarrollo de la inmunidad protectora contra este parásito intracelular a través de una regulación de la activación leishmanicida de los macrófagos [51].

1.4 Transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT)

Las citocinas coordinan la respuesta biológica mediante la reprogramación de la expresión génica en las células que llevan sus receptores afines. Este fenómeno es evidente durante la formación de los linajes hematopoyéticos y linfocíticos en vertebrados. Las células a menudo presentan receptores de membrana para más de una citocina y un evento clave resultado de la unión del ligando al receptor es la oligomerización acompañada de la formación de complejos heteroméricos. Después de la oligomerización estos receptores activan la tirosina-cinasa perteneciente a la familia llamada genéricamente JAK (Janus Tirosina Cinasa). Así, alguna de las cuatro JAK cinasas (JAK1, JAK2, JAK3, Tyk2) dependiendo del ligando cataliza la fosforilación de una clase de factores de transcripción denominado transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) [41,55]; muchas citocinas utilizan esta vía para inducir respuestas en la célula diana y diferentes citocinas activan distintas combinaciones de JAK y STAT. La familia de los STATs son proteínas y está formada por siete miembros (STAT 1-6 incluyendo dos genes para STAT-5) [53]. Su tamaño va de aproximadamente 750-900 aminoácidos de largo y poseen una organización común de estructuras muy conservadas importantes para ejercer una correcta función: un bloque de conservación de cerca de 125 aminoácidos en el extremo amino terminal, una gran región con varios bloques de absoluta secuencia idéntica, dominio de unión al DNA y un dominio altamente conservado SH2 [41]. Este último dominio es el más altamente conservado en la familia STAT y está formado por unos 100 aminoácidos que sirven para dos funciones fundamentales: la de la unión de la molécula de STAT al receptor de citocina fosforilado y la de ser fosforilado en los residuos tirosina conservados por las tirosinas cinasas y además resulta importante en la formación de la estructura necesaria para la unión de DNA [54]. La fosforilación de STAT resulta en la

formación de factores diméricos de transcripción que rápidamente se translocan del citoplasma al núcleo y llevan a cabo la transcripción de sus genes, es por esto que las proteínas STAT representan las primeras candidatas para la mediar la actividad de reprogramación genética provocada por citocinas [55] (Figura 1).

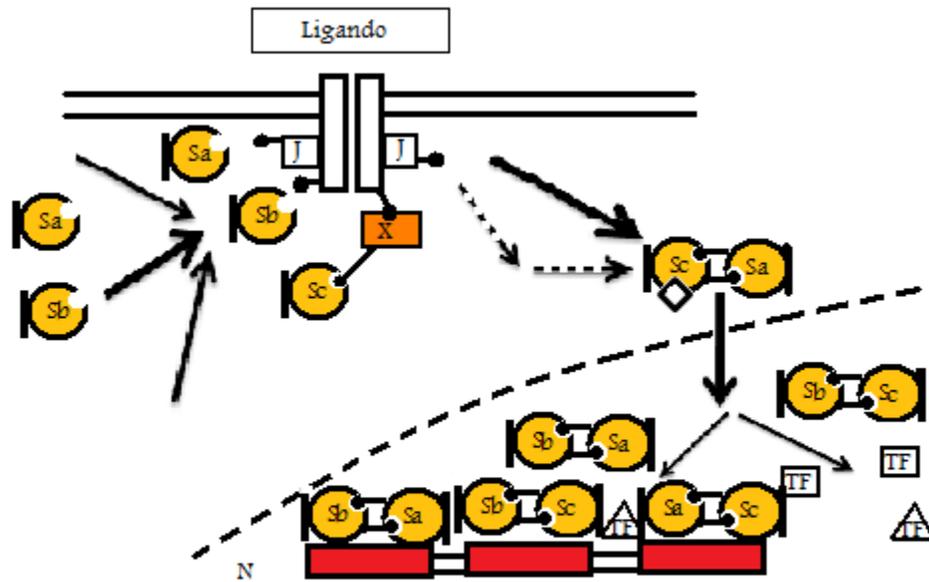


Figura 1. Representación esquemática de la activación de STAT a través de receptores de citocina/Complejos JAK. Las enzimas JAK inactivas están unidas débilmente a los dominios citoplasmáticos de los receptores de citocinas. Cuando se juntan dos moléculas de receptor por la unión de una molécula de citocina causa dimerización u oligomerización de los componentes del receptor, lo que lleva a cabo a la activación de JAK (J) mediante transfosforilación y la fosforilación de residuos de tirosina en las porciones citoplasmáticas de los receptores agrupados. Esto conduce al reclutamiento de STAT (Sa, Sb,Sc) y otros componentes de señalización (X) al receptor activado a través de la interacción del dominio SH2 de una proteína STAT que es capaz de unirse a residuos fosfotirosina de otra proteína STAT . STAT se convierten en tirosina fosforilada y posiblemente serina fosforilada. La fosforilación de la tirosina se representa por puntos negros, fosforilación en serina/treonina por un diamante. La fosforilación de la tirosina de los STATs dispara su dimerización y translocación al núcleo (N). Los dímeros de STAT pueden asociar a otros dímeros de STAT a través de su dominio de oligomerización amino-terminal (barras negras) o por otros factores de transcripción. Los complejos contenidos de STAT se unen a secuencias específicas de DNA [41].

1.4.1 STAT-6

STAT-6 al igual que las otras proteínas de STAT debe de ser fosforilado por las JAK cinasas a través de la dimerización de los dominios SH2 y posteriormente su translocación al núcleo. Es conocido por ser un mediador importante en la vía de activación de las citocinas IL-4/IL-13 esencial para el cambio de clase de la inmunoglobulina IgE y es necesario para la diferenciación de linfocitos T a Th2 y promueve la supervivencia y proliferación de los linfocitos B [19]. La activación de STAT-6 es principalmente por el ligando al receptor de IL-4 (IL-4R). El IL-4R está formado por dos cadenas, la cadena α de 140 kD (IL-4R α) la cual tiene gran afinidad para la IL-4 y la cadena común γ que se comparte con varios receptores de citocinas. Las JAK cinasas, JAK 1 y JAK3, son capaces de unirse a las cadenas α y γ respectivamente y son responsables de la posterior fosforilación del IL-4R así como de STAT-6. La IL-13 es capaz de activar STAT-6 en algunas circunstancias mediante la subunidad del receptor IL-4R α y comparte muchas funciones biológicas con la IL-4 [63]. Se ha visto que STAT-6 regula la expresión de factores de transcripción GATA-3 y c-Maf, dos factores de transcripción envueltos en la correcta función de Th2 así como en la remodelación de la cromatina en el locus de IL-4 [63]. STAT-6 se encuentra relacionado en el desarrollo de enfermedades atópicas de muchas maneras [51], por ejemplo se ha demostrado que los ratones deficientes de STAT-6 fallan en el desarrollo de hiperreactividad bronquial después de la provocación con un alérgeno [28] por otra parte, no son capaces de montar una respuesta inmune contra la mayoría de los parásitos helmintos y por lo tanto son incapaces de eliminar estas infecciones [63].

1.4.2 STAT-6 en enfermedades parasitarias

Si bien en la mayoría de infecciones causadas por helmintos una respuesta tipo Th2 ha sido asociada a una inmunidad protectora, en el caso de la cisticercosis murina es una excepción a esta regla. Al infectar ratones STAT-6 $^{-/-}$ con *Taenia crassiceps* estos produjeron altos niveles de IL-12, IFN- γ y ON y reduciendo el número de cisticercos de *T. crassiceps*. En contraste, los ratones silvestres tuvieron mayor número de parásitos y niveles altos de IL-4, IL-13, IgG1 e IgE. Por lo tanto en el caso de esta infección la señalización a través de STAT-6 favorece una respuesta tipo Th2 permisible para el desarrollo de la cisticercosis [44].

En la infección causada por *T. cruzi* se requiere para su control de múltiples mecanismos, incluyendo la activación de macrófagos, una alta producción de anticuerpos y la estimulación de células T CD8 $^{+}$. Se ha visto que los ratones resistentes a *T. cruzi* exhiben

un patrón mixto Th1/Th2 en el compartimiento linfóide y en los órganos que son blancos en esta infección parasitaria. Esto se probó con ratones deficientes de STAT-4 (STAT-4^{-/-}) y STAT-6 (STAT-6^{-/-}), ya que STAT-4 se activa en respuesta de la IL-12 y provee las señales necesarias para dar una respuesta tipo Th1, mientras que STAT-6 es activada por IL-4 e IL-13 provee una señal alternativa para dar una respuesta tipo Th2. Los ratones STAT-6^{-/-} lograron sobrevivir la fase aguda de la infección y tuvieron menor cantidad de parásitos en corazón a los 25 días post-infección en contraste con los ratones STAT-4^{-/-}. Por lo tanto una respuesta dada por células T tipo 1 son necesarias para el desarrollo de una respuesta inmune para el control de *T. cruzi*, pero las células T tipo 2 contribuye a la persistencia del parásito e incrementa la severidad en la enfermedad [59].

El papel de la IL-4 en la exacerbación de la leishmaniosis cutánea ha sido atribuida por la habilidad que tiene de inhibir la actividad leishmanicida en macrófagos y disminuir el desarrollo de la respuesta tipo Th1. En ratones STAT-6^{-/-} utilizados con el fin de determinar el papel que tiene STAT-6 mediado por la señalización de IL-4 en la formación de lesión y la respuesta inmune seguida de la infección de *Leishmania mexicana*, se observó que estos tuvieron una producción mayor de citocinas pro-inflamatorias, un menor tamaño de lesión y menor parasitemia [58].

STAT6 se ha visto relacionada con los progenitores mieloides en la médula ósea, por lo tanto se ha visto el papel que tiene en la anemia por malarica causada por *P. chabaudi* utilizando ratones STAT-6^{-/-}. Los ratones deficientes en STAT-6 infectados con *P. chabaudi* tuvieron una temprana y alta reticulocitosis (aceleración en la eritropoyesis) a pesar de tener una mayor parasitemia, cuando se compararon con los ratones silvestres, estos presentaron menores niveles de IFN- γ que está involucrado en la supresión eritropoyética, por lo tanto se dedujo que debe de existir alguna relación entre IFN- γ e IL-4 dependiente de la señalización STAT-6 en la anemia por malaria [61].

1.5 *Leishmania* y leishmaniosis

Las infecciones causadas por protozoos son el mayor problema de salud pública, afectando más de medio billón de personas alrededor del mundo. Muchas de las enfermedades que estas inducen (como son la malaria, tripanosomiosis, leishmaniosis) representan la mayor causa de mortalidad y morbilidad en países tropicales, causando también un gran impedimento en el desarrollo económico [38]. La leishmaniosis es el resultado de la infección por alguna de las 21 especies de *Leishmania* patógenas para el humano por ejemplo: *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* y *L. chagasi* [1]. El género *Leishmania* se encuentra dentro de la familia Trypanosomatidae y se caracterizan por

poseer un cinetoplasto, una forma única de ADN mitocondrial [56]. Dependiendo de la especie infectiva de *Leishmania* y los factores del hospedero, la enfermedad puede manifestarse de diferentes formas clínicas como: leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis visceral. Leishmaniosis cutánea (LC), manifestándose como úlceras en la piel, usualmente en áreas expuestas del cuerpo, como la cara, los brazos y las piernas. Estas úlceras a menudo se resuelven por sí mismas en los casos del viejo mundo; sin embargo, las infecciones en el nuevo mundo con frecuencia causan lesiones crónicas que no se resuelven por sí mismo. En los individuos con una alteración en la respuesta inmune mediada por células, una forma más severa de LC puede ocurrir llamada LC difusa.

La LC difusa se caracteriza por lesiones diseminadas que se asemejan a la lepra. Leishmaniosis mucocutánea (LM) provoca la destrucción del tejido de la vía oral, nasal y la mucosa faríngea, lo que resulta una desfiguración extrema en los individuos infectados. Leishmaniosis visceral (LV) es la forma más severa de la enfermedad y suele ser mortal si no se trata. La LV causa profundas hepatomegalias, debido a la diseminación de parásitos en todo el sistema reticuloendotelial (Fig. 2)[16] .

La infección causada por *Leishmania* es transmitida al mamífero hospedero por medio de la picadura de la mosca de la arena del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, en el viejo mundo (África, Asia y Europa) y en el nuevo mundo (América), respectivamente [21]. Se estima que más de 12 millones de personas actualmente padecen de leishmaniosis, 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla y hay 70 000 muertes por año [22], haciendo de ésta la enfermedad parasitaria más importante del mundo después de la malaria [47]. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), reporta 1.500.000 casos de leishmaniosis cutánea alrededor del mundo [2]. Esta enfermedad tiene gran relevancia ya que actualmente no hay vacunas ni tratamientos totalmente eficientes para combatirla [22].



Figura 2. Manifestaciones clínicas causadas por Leishmaniosis. De izquierda a derecha: Leishmaniosis visceral, Leishmaniosis mucocutánea, Leishmaniosis cutánea.

1.5.1 Distribución de la leishmaniosis

La leishmaniosis es una de las más diversas y complejas de todas las enfermedades transmitidas por vectores, ya que encierra varias especies de *Leishmania*, diferentes especies de moscas de la arena que actúan como vectores, diversos reservorios y diversas manifestaciones clínicas, por lo tanto esta enfermedad tiene una compleja ecología y epidemiología (Tabla I). La leishmaniosis es endémica en 88 países, 22 se encuentran en el nuevo mundo y 66 en el viejo mundo. Más del 90% de los casos de leishmaniosis cutánea ocurre en Irán, Afganistán, Siria, Arabia Saudita, Brasil y Perú (Fig. 3) y más del 90% de los casos de leishmaniosis visceral ocurre en India, Nepal, Bangladesh, Sureste de Sudán y Noreste de Brasil [56].

En México la leishmaniosis ha sido reportada en 19 estados de la república, en donde las especies más frecuentes son *L. chagasi*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*, que son transmitidas por *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia olmeca* [56].

La leishmaniosis cutánea o “ulcera del chiclero” causada por la especie *L. mexicana* es endémica de nuestro país y fue descrita por primera vez en 1912 en el Estado de Yucatán. Actualmente se presenta principalmente en el sureste de nuestro país en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y, especialmente en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche. Aunque también se ha reportado casos en Nayarit, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Michoacán [3] (Fig.4).

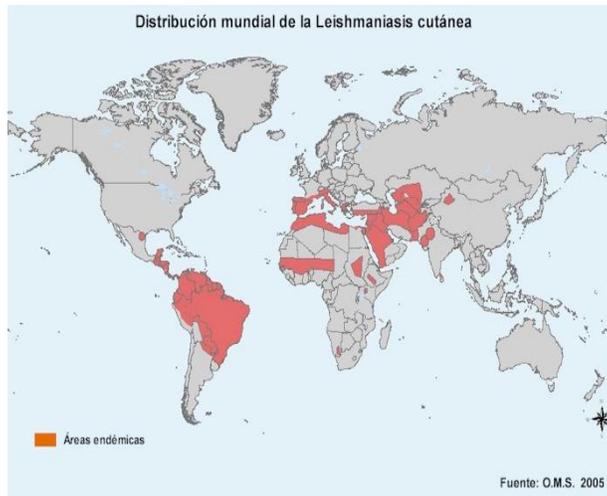


Figura 3. Distribución Mundial de la Leishmaniosis cutánea (OMS, 2005)



Figura 4. Distribución de *Leishmania mexicana* en México. Modificado del mapa presentado en <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/epi-y-control.pdf>

Tabla I. Especies de *Leishmania* del Viejo Mundo y del Nuevo mundo y su distribución geográfica [Awasthi et al . 2004]

Especies	Distribución geográfica	Reservorio	Manifestación clínica
<i>L. chagasi</i> (Nuevo Mundo)	México, Brasil, Argentina, Bolivia, Venezuela	Caninos	LV, LC
<i>L. amazonensis</i> (Nuevo Mundo)	Brasil, Costa Rica, Texas, Guyana Perú, Bolivia,	Roedores	LC, LV, LMC, LCD
<i>L. mexicana</i> (Nuevo Mundo)	México, Guatemala, Texas Costa Rica , Panama	Roedores	LC, LCD
<i>L. major</i> (Viejo Mundo)	Medio este, India, Noreste de China África	Humanos, roedores, conejos	LC
<i>L. tropica</i>	Medio este, India, Litoral mediterraneo Oeste de las áreas Asiáticas	Roedores	LC
<i>L. donovani</i>	África, India, Este de Asia	primate, roedores	LV

LV, Leishmaniosis visceral; LC, Leishmaniosis cutánea; LMC, Leishmaniosis mucocutánea; LCD, Leishmaniosis cutánea difusa

Tabla I. Especies de *Leishmania* del viejo mundo y del nuevo mundo y su distribución geográfica

1.5.2 Ciclo de vida de *Leishmania mexicana*

El ciclo de vida de *Leishmania* es simple y envuelve dos estadios. En el insecto vector, el parásito toma el estadio promastigote donde tiene un ciclo sexual que es consistente con un proceso de meiosis [5], el cual se caracteriza por ser alargado, móvil y extracelular, llegando a medir entre 10 y 20 μm ; mientras que en vertebrados el parásito se encuentra en el estadio amastigote, caracterizándose por ser ovoide, no móvil e intracelular, midiendo de 3 a 7 μm [56,7] (Fig. 5). El parásito es transmitido por un insecto vector, la hembra de las moscas de la arena de la familia Psychodidae, del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo y del género *Phlebotomus* en el viejo mundo. Sin embargo, sólo el 10% de 600 especies conocidas son vectores y sólo 30 de éstas son de gran importancia [56].

Las hembras de las moscas de la arena necesitan de la sangre para obtener proteína necesaria para el desarrollo de sus huevos. La búsqueda por sangre puede cubrir de unos pocos a cientos de metros alrededor de su hábitat. Estas moscas pican especialmente de noche y en el crepúsculo obteniendo sangre de diferentes animales incluyendo al hombre [56]. El ciclo comienza cuando los amastigotes provenientes de macrófagos infectados son liberados dentro del intestino de la mosca de la arena (después de alimentarse de la sangre) [6]. La transformación de amastigotes a promastigotes procíclicos no infectivos a hospederos vertebrados inicia horas después de la ingestión y finaliza alrededor de 24-48 horas, los cuales se dividen rápidamente mediante división binaria [56]. Los promastigotes procíclicos a diferencia de los amastigotes, expresan en su superficie abundantes cantidades de lipofosfoglicanos (LPG) y metaloproteasas gp63. Ambos glicoconjugados

sirven para la protección de los amastigotes contra las enzimas hidrolíticas del intestino de la mosca de la arena, además que LPG favorece la unión al epitelio intestinal del insecto. La transformación de la forma no infectiva divisora procíclica a la forma infectiva no divisora metacíclica puede envolver cambios en la estructura de LPG, una sobrerregulación de la expresión de gp63 y cambios en el contenido enzimático, que van a permitir a los promastigotes metacíclicos aguantar la activación del complemento e infectar los macrófagos exitosamente [6].

El ciclo termina cuando los promastigotes metacíclicos maduros son acumulados en la parte media del intestino y son regurgitados e inoculados en la piel, los cuales invaden y son fagocitados por células locales como macrófagos, células de Langerhans y células reclutadas inmediatamente por el hospedero incluyendo neutrófilos [38]. Estos promastigotes se transforman a amastigotes después de 12-24 horas pos-infección. Después de la transformación, los amastigotes se multiplican dentro de los macrófagos provocando su ruptura y así liberándolos para infectar otros macrófagos. Los macrófagos infectados pueden localizarse en la piel como es el caso de leishmaniosis cutánea formando una úlcera [56] (Fig. 6).

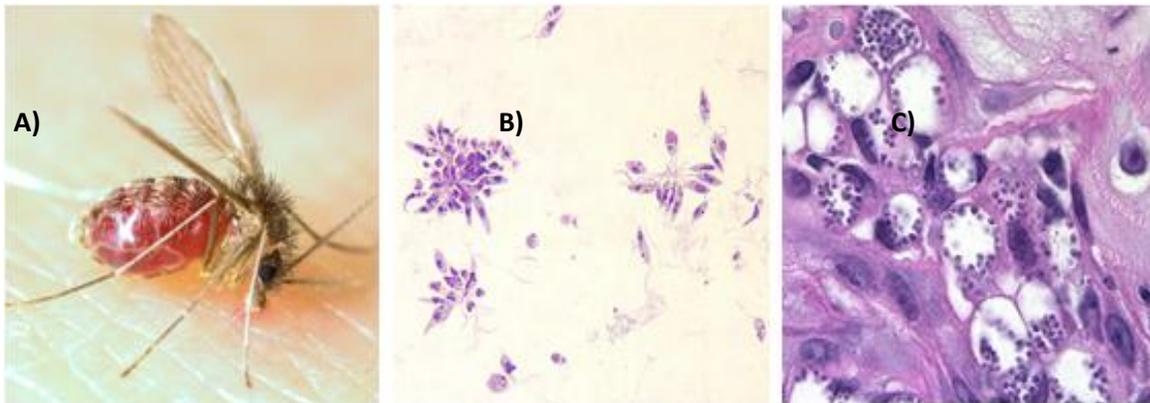


Figura 5. Vector de la leishmaniosis y estadios de la *Leishmania sp.* A) Insecto vector del género *Lutzomyia sp.*, B) la forma infectiva (promastigotes metacíclicos, C) forma no infectiva (amastigotes).
Fuente: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/gl/leishmaniasis/body_Leishmaniasis_il3.htm

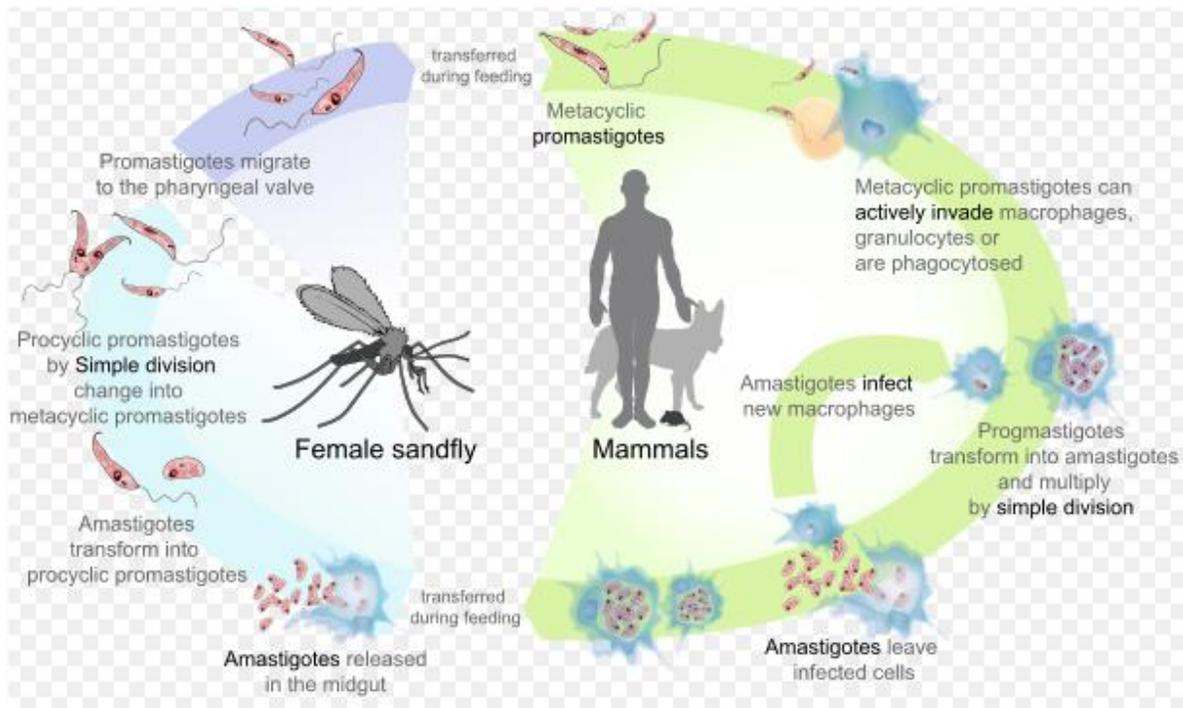


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania sp.*

Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniosis.htm>

1.5.3 Respuesta Inmune frente a *L. mexicana*

Los promastigotes meta-cíclicos liberados tras la picadura del insecto vector infectado están cubiertos con una densa glicocalix en la superficie compuesta por gran parte de moléculas que conceden anclaje llamadas GPI (glicosilfosfatidilinositol). Estas moléculas de anclaje incluyen proteínas como la proteasa de superficie del parásito llamada gp63. El mayor constituyente es el GPI fosfoglicano llamado LPG (lipofosfoglicano). Tanto el LPG como el gp63 son los factores de virulencia de la *Leishmania* [7]. La activación del complemento por LPG es por la vía clásica del complemento aún en ausencia de anticuerpo: La LPG se une por la lectina de unión a la manosa (MBL), lo que provoca una activación del complemento por el dominio C1q, que tiene como resultado la activación del complejo de ataque de membrana C5-C9 sin embargo, gp63 puede inhibir la lisis mediada por el complemento y promover la opsonización del parásito cortando C3b en iC3b [50]. La internalización del parásito por iC3b es mediante los receptores del macrófago CR1 y CR3. Hay otras maneras en que el parásito puede entrar a las células hospederas, mediante

el receptor de fucosa-manosa, receptor de fibronectina, el receptor Fc y el receptor de la proteína C-reactiva y se cree que por TLR 2 [6].

Se ha visto que los parásitos de *L. mexicana* residen dentro de los macrófagos en enormes vacuolas parasitoporas que pueden hospedar a varios amastigotes, por lo que se ha sugerido que una vacuola de tamaño grande puede diluir las concentraciones de hidrolasas a un nivel poco efectivo. Por otra parte se ha visto que Rab5 (guanosina trifosfatasa) restringe la fusión del fagosoma con el endosoma; sin embargo, una sobreexpresión de Rab5 incrementa el tamaño del fagosoma y reduce la actividad leishmanicida, lo que sugiere que esta estrategia es usada por *L. mexicana* [42]. Los macrófagos poseen mecanismos de defensa, incluyendo la activación del metabolito oxidativo del macrófago. La mayor fuente de intermediarios reactivos al oxígeno en los macrófagos es el NADPH (Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato oxidasa), el cual interviene transfiriendo un electrón al oxígeno molecular produciendo O_2^- el cual se puede dismutar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, los parásitos rápidamente se transforman a amastigotes intracelulares, donde el LPG de los parásitos migra a la membrana del fagosoma del macrófago infectado inhibiendo la bomba respiratoria, la actividad hidrolítica y las enzimas lisosomales a través de la quelación de calcio y la inhibición de la proteína cinasa C, que interviene en la fosforilación de p47phox que es una proteína citosólica del NADPH [42].

Las especies de *Leishmania* también pueden parasitar células del linaje fagocítico mononuclear, como los neutrófilos [7]. Los neutrófilos son rápidamente reclutados de la vía sanguínea al sitio de infección vía transmigración a través del endotelio vascular bajo el seguimiento de C-C quimiocinas como: IL-8, la cual es producida principalmente por células epiteliales, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. Los neutrófilos son los primeros en llegar al sitio de infección y se ha visto que los promastigotes de *L. major* pueden aumentar su migración gracias a la liberación del (Factor quimiotáctico de *Leishmania*) LCF, que tiene una potente actividad quimiotáctica en los neutrófilos pero no en otros leucocitos como los monocitos o células NK, la vía de entrada de los parásitos a los neutrófilos es posiblemente vía TLR 2, TLR 5. Los neutrófilos tienen una vida corta con un promedio de vida de 6-10 horas en la circulación, después de esto mueren debido a la apoptosis espontánea. Sin embargo, *L. major* es capaz de extender la vida de estas células mediante un mecanismo que envuelve la inhibición de la activación- caspasa3, siendo la caspasa involucrada con esta apoptosis. De este modo al inhibir la apoptosis los neutrófilos pueden vivir de 2-3 días [30]. Aunque en los neutrófilos pueden sobrevivir *Leishmania*, no tiene la capacidad de multiplicarse en estas células, es por eso que tienen un importante

papel en el reclutamiento de sus células hospederas finales monocitos/macrófagos. A los 2 y 3 días post-infección gracias a la expresión y secreción de la quimiocina: MIP-1 β (proteína inflamatoria del macrófago), los macrófagos llegan a la zona de infección en gran cantidad y toman a los neutrófilos infectados sin embargo, ya que el levantamiento de células apoptóticas es una función fisiológica en los tejidos, estos no representan un peligro, por lo tanto no se activa las funciones antimicrobiales de los macrófagos [30].

En las células dendríticas se ha visto que la fagocitosis solo se da en la forma amastigote, pero no en la forma infectiva promastigote. Se ha observado que la vía de internalización del parásito a las células dendríticas es mediante Fc γ R I (receptor Fc γ). Las células dendríticas infectadas con amastigotes de *Leishmania* resulta en la activación de células asociadas a la regulación positiva de la expresión de MHC tipo I y II, así como de moléculas co-estimuladoras. Las células dendríticas promueven protección contra *L. major* gracias a la rápida activación del factor de transcripción NF- κ B y la sobre-regulación y translocación al núcleo del IRF-1 (factor regulatorio Interferon) y IRF-8, resultando la transcripción de IL-12 que puede actuar en el sistema inmune innato mediante la inducción de las células NK para secretar IFN- γ durante la infección temprana. Aunque las células NK sirven como fuentes de IFN- γ y pueden estar relacionadas con el desarrollo inicial de la respuesta tipo Th1, no son necesarias para controlar finalmente la infección [64].

La inmunidad contra la *Leishmania* es principalmente mediada por células T, y varias investigaciones con *L. major* apoya al paradigma en el cual una respuesta con células tipo Th1 está asociada con una inmunidad protectora y una resolución en la enfermedad, mientras una respuesta tipo Th2 está asociada con la susceptibilidad y una exacerbación de la enfermedad. Sin embargo, en *L. mexicana* no está bien establecida la respuesta inmune protectora.

Las CPA funcionan como puentes entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Tanto los macrófagos infectados como las células dendríticas pueden presentar el antígeno de *Leishmania* a las células T. La presentación del antígeno mediante CPA vía MHC II y la estimulación con IL-12 a células tipo T, causa la expansión de células protectoras tipo Th1 CD4+ productoras de IFN- γ que son esenciales para el control de *L. major* [63]. El IFN- γ es crítico en la respuesta protectora contra leishmaniosis porque estimula la activación de los macrófagos y la producción de ON vía la expresión de iNOs (ON sintasa), que permite a los macrófagos matar a los parásitos internalizados. La actividad leishmanicida de IFN- γ puede ser aumentada por TNF- α [57].

En contraste con animales que montan una respuesta tipo Th2 con expresión de citocinas como IL-10, IL-4 predomina una enfermedad severa. La IL-4 relacionada con este tipo de respuesta es capaz de bajar la producción de IFN- γ y la activación de de macrófagos. También es capaz de inhibir la IL-12 e inhabilitar que se monte una respuesta tipo Th1, provocando una alta susceptibilidad en la enfermedad. Otro factor que lleva la exacerbación de la enfermedad es la producción de anticuerpos tipo IgE (Fig.7) [56].

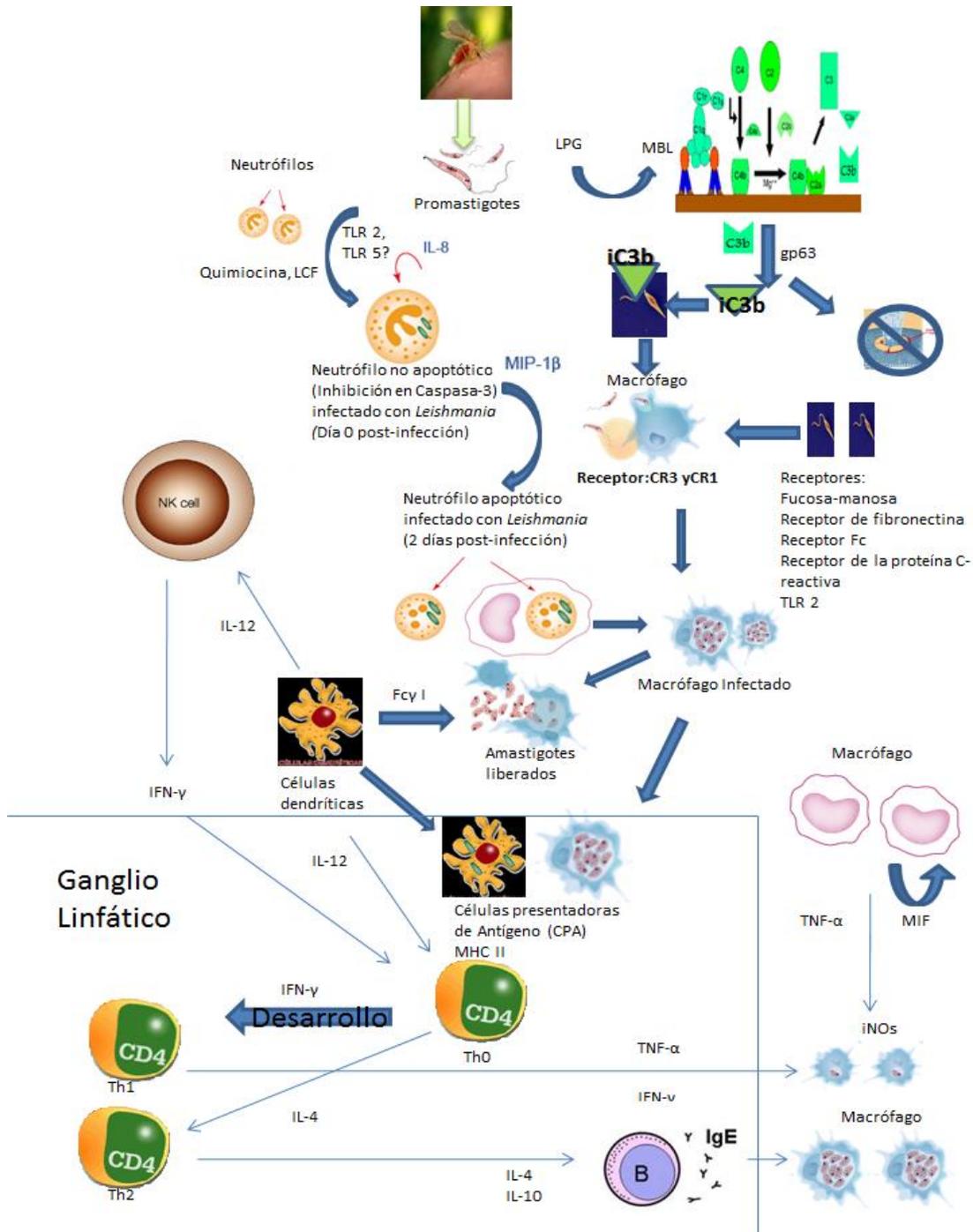


Figura 7. Respuesta Inmune en *Leishmania* La inoculación del parásito a través del vector activa al complemento y células fagocíticas. Tanto los macrófagos como las células dendríticas sirven de células presentadoras de antígeno. Una vez presentado el antígeno por medio del Complejo de Histocompatibilidad tipo II a células TCD4+ se genera respuestas que pueden ser tipo Th1 o Tipo Th2, llevando consigo el control de la leishmaniosis o una exacerbación de la enfermedad respectivamente.

2. Justificación

La inmunología en la infección por *L. major* apoya el paradigma en el cual una respuesta inmune mediada por células tipo Th1 está asociada con citocinas pro-inflamatorias que conllevan a una inmunidad protectora, mientras una respuesta tipo Th2 se ha asociado con citocinas anti-inflamatorias que favorecen la susceptibilidad y una exacerbación de la enfermedad. Si bien la inmunidad contra la leishmaniosis cutánea por *L. mexicana* es mediada principalmente por células T, no está claramente establecida la participación de la respuesta inflamatoria en la respuesta inmune protectora, por lo tanto en el presente trabajo examinamos la participación de la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria a través de ratones deficientes para MIF, ratones deficientes para STAT-6 y ratones con una deficiencia doble MIF/STAT6, en un modelo murino de infección por *L. mexicana* con el propósito de contribuir al establecimiento de la participación la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria en el control de este parásito.

3. Objetivo general:

Determinar la participación de MIF, STAT-6 en ratones MIF/STAT-6 +/+, MIF -/-, STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- en la infección por *L. mexicana*.

3.1. Objetivos particulares:

1. Evaluar el curso de la infección por *L. mexicana* mediante el monitoreo del tamaño de inflamación en ratones de fondo genético BALB/c deficientes para MIF, STAT-6, MIF/STAT-6 y en ratones silvestres como controles.
2. Analizar la carga parasitaria de *L. mexicana* por medio de la técnica de PCR y dilución limitante en los cuatro grupos experimentales.
3. Analizar histologías de la lesión de los cuatro grupos experimentales para observar el daño tisular, la presencia de amastigotes e infiltrado celular
4. Evaluar las citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL4 en suero de los grupos experimentales.

4. Hipótesis

La respuesta celular Th1, exacerbada por la ausencia STAT-6, más que la carencia de citocinas pro-inflamatorias dependientes de MIF en la respuesta inmune innata, es factor determinante en la resistencia a la infección por *L. mexicana*.

5. Material y Métodos

5.1 Animales. Se utilizaron ratones ♂ con fondo genético BALB/c deficientes en los genes STAT6 (STAT6^{-/-}), MIF (MIF^{-/-}) y MIF/STAT6 [MIF/STAT6^(-/-)] y como controles se utilizaron ratones “silvestres” del mismo fondo genético.

5.2 Confirmación del genotipo por PCR. Todos los animales fueron genotipados para determinar la ausencia de MIF, STAT6 y MIF/STAT6 respectivamente por PCR puntual siguiendo el protocolo descrito por Lair, P.W. [29]. Utilizando siempre guantes, material nuevo estéril y libre de DNAsas- RNAsas se obtuvo aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de los ratones experimentales, se llevó a cabo la digestión en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) previamente identificados en donde se colocó el tejido con 500µl de buffer Pk lisis (Apéndice 1) y 20µl de Proteinasa K (In vitrogen 100µg/ml) durante toda la noche en una incubadora a 55°C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se homogenizó invirtiéndose de manera suave hasta que la precipitación del DNA fue evidente. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos para concentrarlo y se decantó la fase líquida, posteriormente se lavó el botón de DNA con etanol frío al 75% en el mismo tubo, centrifugándolo a 14,000 rpm por 5 minutos, se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos a 1 hora. El botón de DNA, se secó y se resuspendió en el tubo con 200 µl de agua grado biología molecular, para ser nuevamente incubado toda la noche a 55° C en el termoblock para disolver el DNA.

5.3 Amplificación del gen (PCR). Para el reconocimiento del gen MIF y STAT6 se utilizaron oligonucleótidos específicos (Apéndice 2). En este proceso se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad de 0.2 ml, los cuales tuvieron un volumen final de reacción de 25 µl al colocarles los siguientes reactivos:

Reactivo	Para MIF	Para NEO
Buffer 10x	2.5µl	2.5µl
DNTP's mix	0.5µl	0.5µl
Primer F (15pM)	5.6µl	3.8µl

Primer R (15pM)	4.1µl	3µl
DNA Taq polimerasa	1.2µl	1µl
Agua (sigma)	9.1µl	12.2µl
Muestra de DNA	2µl	2µl
Reactivo	Para STAT-6	Para NEOSTAT-6
Buffer 10x	2.5µl	2.5µl
DNTP's mix	0.5µl	0.5µl
Primer F (15pM)	2.3µl	3.2µl
Primer R (15pM)	2.4µl	2.9µl
DNA Taq polimerasa	1.2µl	1.2µl
Agua (sigma)	14.1µl	12.7µl
Muestra de DNA	2µl	2µl

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos, se colocaron en el termociclador (Corbett Research) con una temperatura de alineación de 56°C para MIF y 54°C para STAT.

5.4 Electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% en buffer TBE 1X (Apéndice 1). Una vez hecho el gel se colocó sobre un molde y un peine, de 20 pozos que se mantuvo a 4°C por 30 minutos para que el gel se solidificara.

El gel se colocó en la cámara de electroforesis con buffer de TBE 1X y se agregaron por pozo 8 µl de muestras previamente diluidos en 6 µl de buffer de carga blue juice (In vitrogen) a partir del segundo pozo, ya que en el primero se colocó 2 µl del marcador de peso molecular 100pb (in vitrogen). Se colocó las muestras en la cámara de electroforesis hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, 150 mA durante 50 minutos. Finalmente se observó en un trasluminador con la luz UV (ultravioleta) y la imagen se capturó utilizando el programa Alphaimagen.

5.5 Parásitos. Los parásitos de *L. mexicana* se obtuvieron a partir de un ratón previamente infectado con la cepa (MNYC/BZ/M379) donado por el Dr. A. Satoskar (Universidad de OHIO, U.S.A.). Se aislaron los promastigotes de la lesión de ratones infectados en 5 ml de medio de cultivo Schneider suplementado con 10 % de SFB inactivado y antibiótico al 1%

(penicilina y Glutamina, Gibco) para obtener la fase estacionaria de promastigote y se cultivaron en botellas de cultivo con medio Schneider a 28°C y posteriormente fueron cuantificados en la cámara de Neubauer (Hirschmann Techcolor) tomando 2 µl de muestra y 2 µl de formaldehído en cinco cuadros en la cámara de eritrocitos y se cuantificó el número total con la fórmula. # Parásitos/ml = [#parásitos / cuadrantes][dilución 10⁴]. Los parásitos fueron ajustados a 2x10⁶.

5.6 Infección. Se Infectaron de manera subcutánea los ratones MIF (-/-), STAT6 (-/-), MIF/STAT6 (-/-) y MIF/STAT6 (+/+) en la parte posterior cerca de la base de la cola. Los ratones fueron rasurados para hacer más fácil la infección y el monitoreo del tamaño de la lesión. Se procedió a infectar a los ratones con un inóculo de 50 µl de solución salina que contenía 2X10⁶ promastigotes de *L. mexicana* con jeringas de insulina. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio durante las semanas pos infección.

5.7 Monitoreo del tamaño de la lesión. Se monitoreó el tamaño de la lesión de los ratones experimentales con un vernier analítico (Mituyo), tomando el promedio del largo y ancho de la inflamación del sitio de infección.

5.8 Determinación de parásitos por PCR por punto final. Se procedió a determinar la concentración de parásitos de ambos grupos utilizando la técnica de PCR en tiempo puntual. Se extrajo el DNA total de las heridas dorsales a 5 semanas post-infección, para amplificar una secuencia específica de *Leishmania sp.* realizando diluciones consecutivas de 200, 100 ng/ con los primers específicos (apéndice 2), los cuales amplifican una región conservada del minicírculo de DNA del cinetoplasto de todas las especies de *Leishmania* y como control se utilizó los primers específicos para la molécula GAPDH que es una molécula que tiene como función el reconocimiento de moléculas de carbohidratos en macrófagos (apéndice 2) y se realizaron los geles de agarosa (como se describió anteriormente). En este proceso se utilizaron tubos nuevos libres de DNAasas-RNAasas con capacidad de 0.2 ml, en los cuales con un volumen final de reacción de:

Reactivo	Para <i>Leishmania sp.</i>
Buffer 10x	2.5µl
DNTP's mix (2mM) (in vitrogen)	0.5µl
Primer F (15pM)	1µl
Primer R (15pM)	1µl
DNA Taq polimerasa (Platinum, in vitrogen) (5U/µl)	0.25µl
Agua (sigma)	Se ajustó
Muestra de DNA	(200 y 100 ng)

Reactivos	Para GAPDH
Buffer 10x	2.5µl
DNTP's mix (2mM, in vitrogen)	0.5µl
Primer F (15pM)	1µl
Primer R (15pM)	1µl
DNA Taq polimerasa (Platinum, in vitrogen) (5U/µl)	0.25µl
Agua (sigma)	Se ajustó
Muestra de DNA	(200 y 100 ng)

Una vez que rotulados los tubos y con los respectivos reactivos se sometió al siguiente programa con 35 repeticiones en el termociclador con una temperatura de alineación de 56 °C para *Leishmania sp.* y 54° para GAPDH.

5.9 Carga parasitaria por dilución limitante. Se determinó la carga parasitaria de las heridas de los ratones experimentales por dilución limitante en la 5 y 9 semanas posteriores a la infección. Brevemente se maceraron las heridas de cada ratón en cajas petri (6x) (Nunclun Surfase) con medio Schneider suplementado con 10% de SFB complementado y 1 % de antibiótico (Penicilina Glutamina) (in vitrogen). Se centrifugó a 2700 rpm por 10 minutos. El botón celular se resuspendió con 500 µl de medio Schneider y se sembró en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) (dilución 1:10) y se siguió la dilución hasta el pozo 12 (diluciones dobles), se mantuvo a 28 °C durante 24h para su visualización a microscopio óptico invertido (Motic AE31) considerando el último punto de titulación un pozo antes cuando desaparecen los parásitos.

5.10 Obtención de suero. Los ratones fueron sangrados a 2, 4, 6, 8, semanas post-infección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Philips) para inducir la dilatación de la vena caudal y de esta manera facilitar el sangrado. Con un bisturí se hizo un corte en la vena más notoria y se obtuvo aproximadamente de 500 a 700 μ l de sangre en tubos Eppendorf. Los tubos fueron mantenidos a baja temperatura hasta su centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm. Se obtuvo el suero en tubos nuevos y debidamente etiquetados. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso para la determinación de citocinas y anticuerpos específicos.

5.11 Detección de citocinas en sueros por la técnica de ELISA. Las citocinas fueron evaluadas en suero de los ratones a 2, 4,6 y 8 semanas post- infección por medio de la técnica de ELISA- Sandwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Peprotech México). Las placas de 96 pozos (high binding, Costar) fueron sensibilizadas con 100 μ l por pozo del anticuerpo de captura (purified antimouse IL-4, IL-12, IFN- γ y TFN- α) diluido en PBS a una concentración de 1 μ g/ml. Se cubrió la placa y se dejó incubar toda la noche a 4°C . Pasada la incubación fue lavada 3 veces usando buffer de lavado PBS-Tween 0.05% (PBS-T) (Apéndice 1). Posteriormente la placa fue secada y bloqueada con 100 μ l de buffer de bloqueo (Apéndice 1) PBS-BSA 1% (100 μ l por pozo) y se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente. Después se lavó la placa 4 veces con PBS-T, y se procedió a hacer la curva de citocina recombinante murina por duplicado en los primeros pozos de la placa. La curva se realizó a una concentración de 2000 pg/ml y se realizaron diluciones a la mitad, hasta el pozo 11 y en el último pozo solo se agregó PBS-BSA 1%. A los pozos restantes se agregó 25 μ l de las muestras de los sueros y se incubó toda la noche a 4°C . Posteriormente se lavó la placa 4 veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo biotinilado diluido en PBS-BSA a una concentración de 0.5 μ g/ ml, y se agregó 100 μ l de streptavidin peroxidasa diluida 1:2000 en PBS-BSA 1% y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de la incubación la placa se lavó 6 veces con PBS-T y se añadió a cada placa 10 ml de ABTS (Apéndice 1) y 100 μ l de H_2O_2 al 3%, se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Thermo LabSystems) a 405nm.

Los datos arrojados por el lector de ELISA fueron procesados por el Software Multiskan Ascent y evaluados en el software de GraphPad Prism 4.0.

5.12 Cuantificación de antígeno total de *L. mexicana*. Para determinar la cantidad de proteína total del Ag obtenido, se utilizó el método de cuantificación de proteínas por Lowry [31]. Se hizo una curva Estándar con albúmina bovina sérica (ICN, Biomedicals, Inc.) desde 0 µg hasta 100 µg, se mezclaron los 3 reactivos: solución A, solución B (Apéndice 1) a diferentes concentraciones de albúmina y se agregó a cada tubo 3ml, se agitaron y dejaron reposar por 10 minutos en la oscuridad. Por último se le adicionó a cada tubo 0.4 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (J.T. Baker) diluido 1:2 en agua destilada, se agitó y dejó reposar 30 min. A las muestras obtenidas de la lisis de parásitos se les realizaron 3 diferentes diluciones 1:50, 1:100, 1:200. Una vez realizadas estas diluciones se leyó en un espectrofotómetro a 580 -60 nm. Para la curva se utilizó la D. O. de la lectura, la intersección y la pendiente obtenidos del programa Excel (Microsoft) y se aplicó la fórmula $Y = mx + b$ (Fig. 9).

En donde $Y = D.O.$, $m =$ pendiente, $x =$ concentración y $b =$ intersección a la cual se le aplicó el despeje $x = (y/b)/m$ para obtener la concentración de las diluciones realizadas. De las concentraciones obtenidas de las 3 diluciones se tomó el promedio como la cantidad de Ag total obtenido.

$$Y = mx + b$$

$$\text{Coeficiente correlación} = 0.9901$$

$$\text{Intersección} = 0.0293$$

$$\text{Pendiente} = 0.0013$$

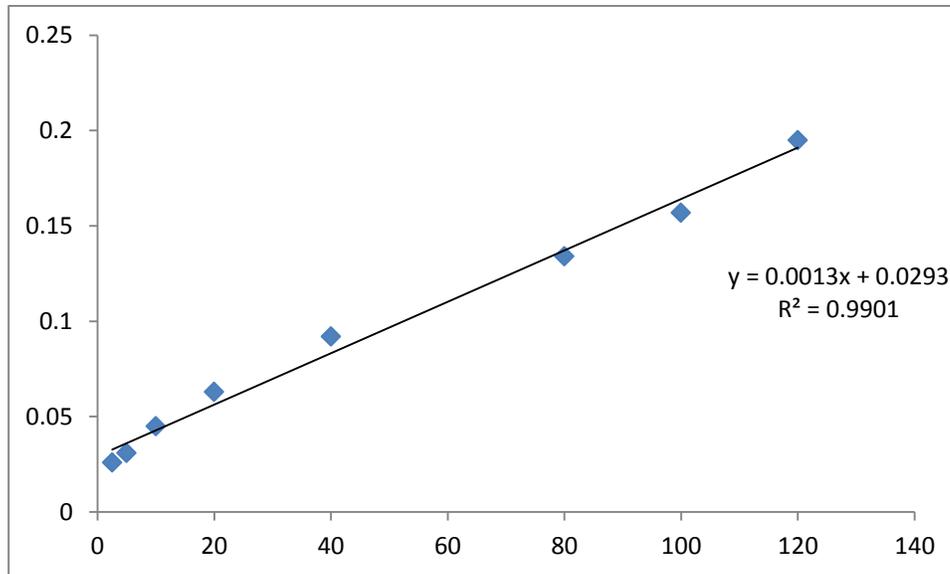


Figura 9. Curva estándar de albúmina, se presentan graficadas las dos densidades ópticas obtenidas, el promedio de estas contra la concentración de albúmina.

5. 13 Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal: Se sacrificaron ratones después de 5 y 9 semanas post-infección con *L. mexicana*, se usaron ratones no infectados como controles. Se inyectaron 5 ml de solución salina fría estéril en la cavidad peritoneal de los ratones y se procedió a darles un ligero masaje con la finalidad de obtener mayor número de macrófagos (MØ). Al finalizar este procedimiento se les realizó una pequeña incisión con el fin de retirar la piel y de esta manera la cavidad peritoneal quedara expuesta para poder extraer las células del exudado peritoneal (PECs) contenidas en la solución salina. La recuperación de la solución salina con las PECs se colocó en tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, una vez centrifugadas se resuspendió el botón con 1 ml de medio DMEM/High glucose, suplementado al 5% con suero fetal bovino y 100 unidades de penicilina/streptomina. Las células fueron contadas en la cámara de Neubauer por la exclusión de azul trypano (tomando 10 µl de muestra más 10µl de Azul trypano), una vez contadas las células se ajustaron a 1×10^6 MØ/ml y se cultivaron en placas de 24 pozos. Una vez colocadas las células en la placa se utilizaron 20 µg/ml de Ag *L. mexicana* para una re-estimulación, usando como control macrófagos estimulados con 5 µg/ml de LPS y macrófagos basales sin ningún tratamiento, se dejaron incubar a 37° C y 5%

de CO₂ durante 24 horas, pasando este lapso de tiempo se recuperó el sobrenadante y se congeló a -70 hasta su uso para determinar el NO.

5.14 Determinación de óxido nítrico (NO) en sobrenadantes de cultivo de MØ. LA determinación de NO se realizó en los sobrenadantes de los MØ cultivados *in vitro* de los ratones experimentales.

El ensayo consiste en preparar dos soluciones por separado

Solución A, 0.1% de dihidrocloruro de naftilenodiamina en agua destilada.

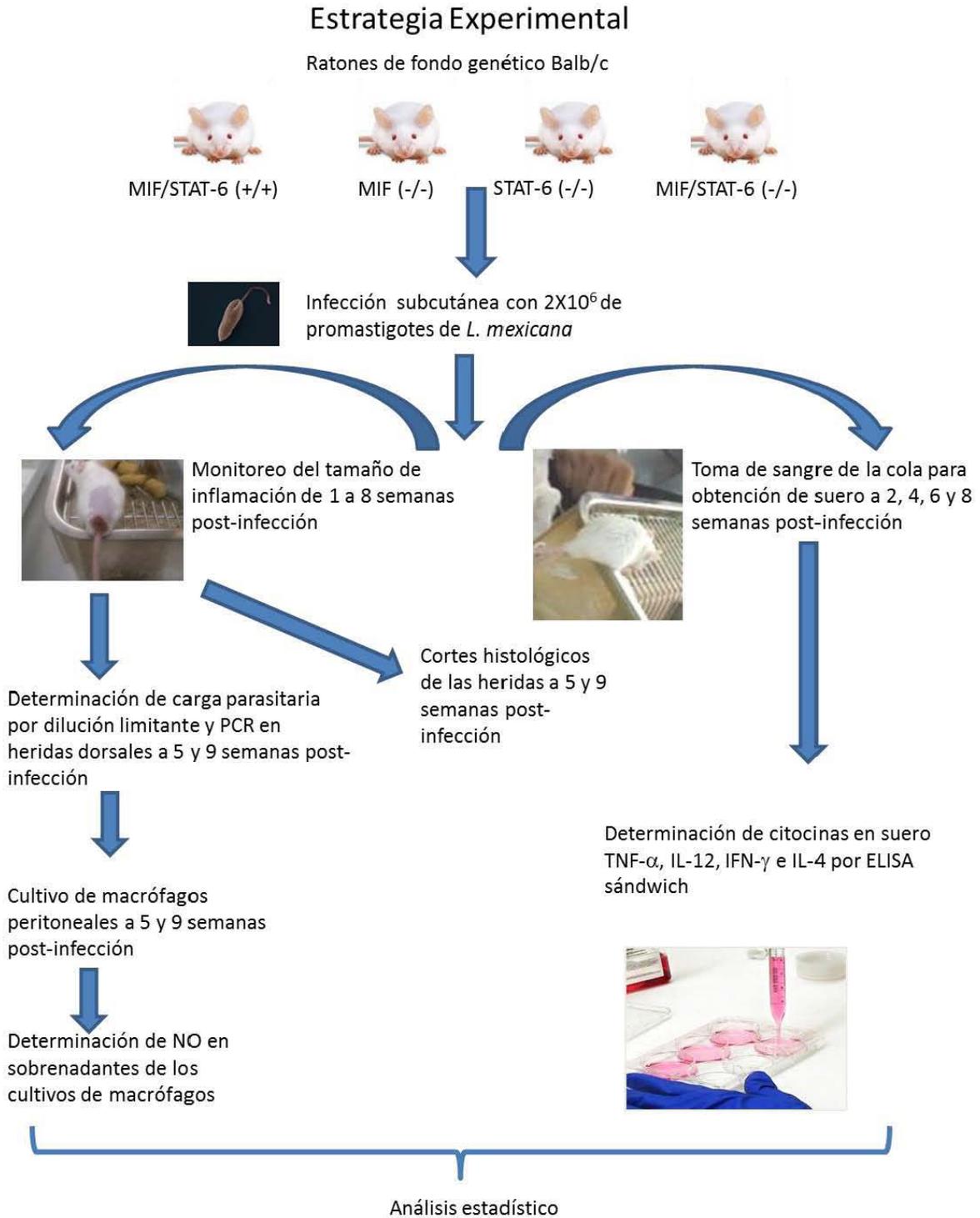
Solución B, Sulfanilamida 5% en H₃PO₄ al 5%.

Momentos antes de realizar el ensayo se mezclaron las soluciones igual volumen para obtener el reactivo de Griess. En una placa para ELISA de fondo plano de 96 pozos se colocó una curva (Empezando en 100 mM diluciones dobles) de nitrito de sodio (NaNO₂) como control y referencia para intrapolar las concentraciones de las muestras. Tanto la curva como las muestras se colocaron en volúmenes de 100 µl y 100 µl de reactivo de Griess. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se leyeron a 550-560 nm en un lector de ELISA (Metertech S960).

5. 15 Histología. Se realizaron cortes histológicos de las heridas dorsales a 5 y 9 semanas post-infección. Se fijaron en paraformaldehído al 4% y se realizaron cortes de 5 micras en el microtomo y se tiñeron los cortes con hematoxilina-eosina, para identificar daño tisular, así como infiltrado celular.

5.16 Análisis estadístico. Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante U de Mann-Whitney y t de Students, según fuera el caso. Se consideraron significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$.

6. Estrategia experimental



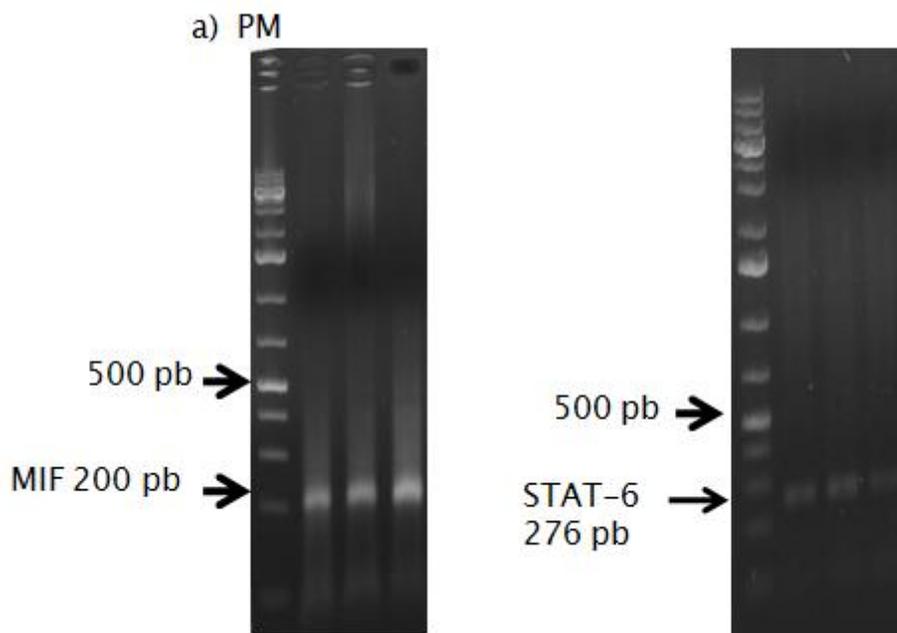
7. Resultados

Determinación del genotipo de los ratones del grupo control y los grupos experimentales.

Se realizó para asegurarnos que los ratones utilizados como controles cumplían con las condiciones necesarias de silvestres (MIF/STAT-6(+/+)) y los ratones de los grupos experimentales fueran deficientes para el gen que codifica MIF (MIF^{-/-}), para STAT-6 (STAT-6^{-/-}) y para ambos genes (MIF/STAT-6^{-/-}) respectivamente.

Lo anterior se llevó a cabo por medio de PCR punto final, la amplificación de los genes funcionales para MIF y STAT-6 del grupo utilizado como control y para NEO, el gen de inserción para los grupos experimentales se puede observar en la figura 8.

El producto de amplificación para MIF tiene un tamaño de 200 pb, el de STAT-6 de 276 pb y en el caso de NEO de 500 pb y 172 pb correspondientemente.



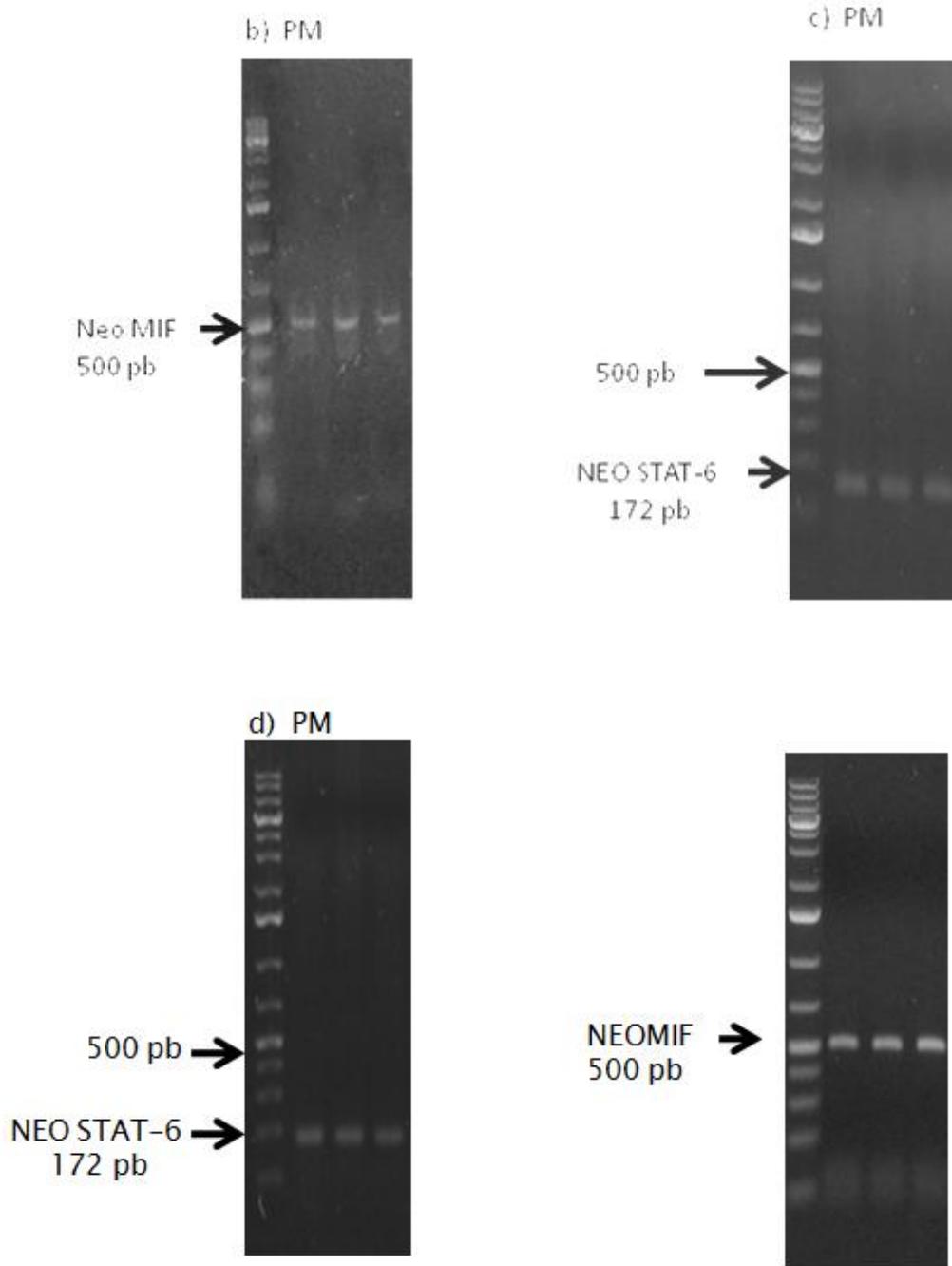


Figura 8. Determinación del genotipo de los ratones experimentales por PCR. Amplificación de los genes funcionales MIF y STAT-6 en ratones silvestres(a), Determinación del gen de inserción NEO para ratones MIF $-/-$ (b), del gen NEO para ratones STAT-6 $-/-$ (c) e inserciones de ambos genes para ratones MIF/STAT6 $-/-$ (d).Peso molecular (PM).

Tamaño de la lesión

Seguido de la inoculación de 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* se monitoreo semanalmente el tamaño de la lesión en los ratones experimentales hasta la semana 8 post- infección. La medición tuvo como propósito determinar si la deficiencia de MIF y STAT-6 intervenía en el desarrollo de la inflamación causada por *L. mexicana*. Tanto los ratones silvestres y MIF^{-/-} desarrollaron una lesión progresiva llegando casi a 1 cm de diámetro. En contraste con los ratones STAT-6^{-/-} y MIF/STAT-6^{-/-} que tuvieron una lesión más pequeña (menos de 0.5 cm) durante el periodo de estudio (Fig. 10). Por lo tanto, al estar ausentes los genes MIF y STAT-6 los ratones desarrollan menor tamaño de lesión, lo que nos indica que responden de una manera más eficiente, controlando la infección causada por *L. mexicana* observándose directamente en el tamaño de la lesión (Fig. 11)

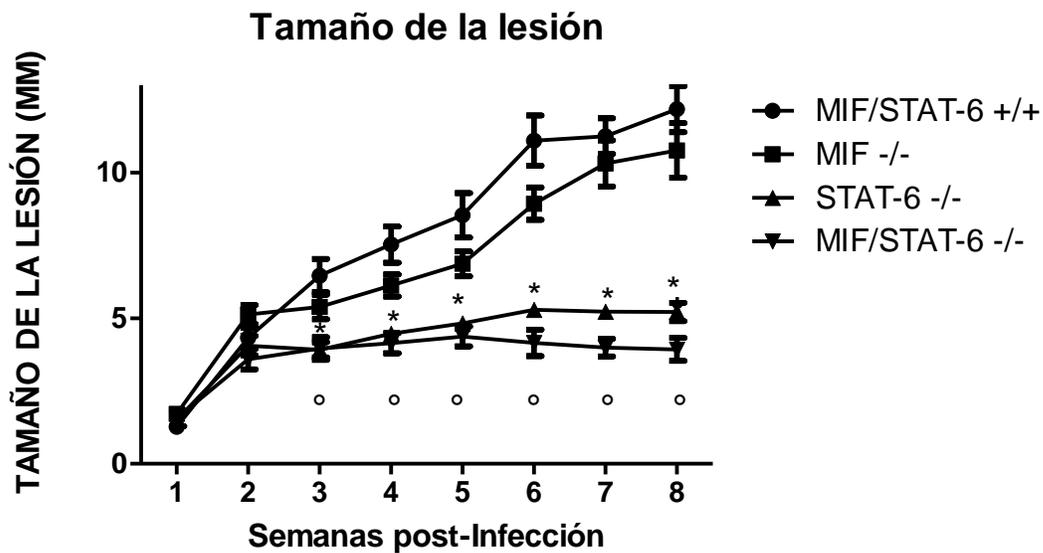


Figura 10. Monitoreo de la lesión hasta la semana 8 post-infección de los grupos experimentales, se puede observar que hay una diferencia estadísticamente significativa en los ratones MIF/STAT-6^{-/-} (°) y los ratones STAT-6^{-/-} (*), comparados con los ratones silvestres y MIF^{-/-}. Los datos están expresados como la media (milímetros) \pm ES. *, ° $p < 0.05$ T students ; Graphpad Prism. *, ° = valor significativo. (n=8).

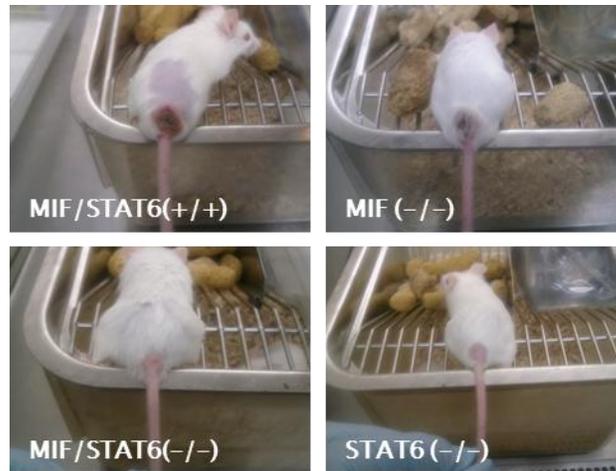


Figura 11. Tamaño de la lesión a la semana 9 post-infección. Se puede observar las diferencias entre los grupos experimentales. En los ratones MIF/STAT-6 +/+ la lesión es de gran tamaño (más de 1 cm), al igual que los ratones MIF -/- que presentan una lesión similar. Por otra parte, los ratones STAT-6 -/- y los ratones MIF/STAT-6 -/- exhiben una lesión tamaño menor a 0.5 cm.

Carga parasitaria

La carga parasitaria se determinó con el fin de comparar la cantidad de parásitos en la lesión dorsal (sitio de infección) y relacionarlo con el tamaño de la misma. Al contrastar la cantidad de parásitos obtenidos por medio de la dilución limitante. Se encontró una cantidad significativamente menor en la carga parasitaria en los ratones MIF/STAT-6 -/- y en los ratones STAT-6 -/-, tanto en la semana 5 (Fig. 12 A) como en la semana 9 post-infección (Fig. 12 B). En ambas semanas los ratones STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- presentaron menor cantidad de carga parasitaria, tal y como se esperaba. Esto se puede explicar por la disminución de la citocina anti-inflamatoria IL-4 (Fig. 19 b y c) que promueve una exacerbación en la leishmaniosis cutánea.

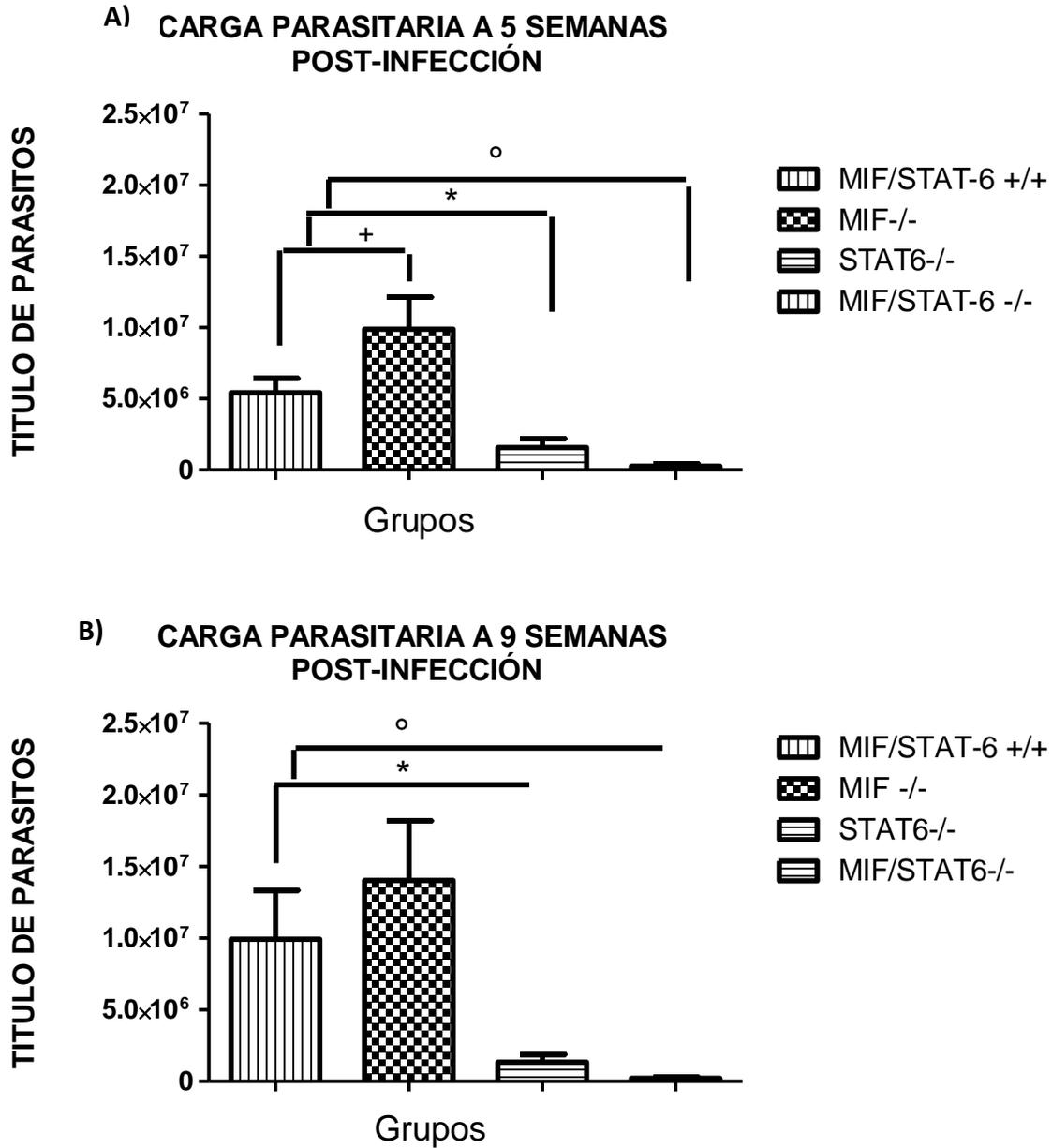
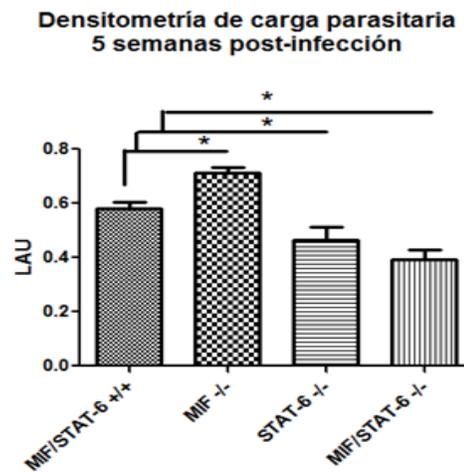
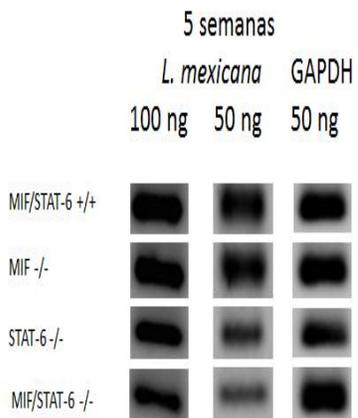


Figura 12. Carga parasitaria por dilución limitante de la herida. Gráficas de la carga parasitaria de la semana 5 y 9 post-infección, donde se muestran las diferencias entre los diferentes grupos experimentales. A) La cantidad de parásitos de *L. mexicana* en los ratones MIF/STAT-6 -/- y STAT-6 -/- en la semana 5 post-infección es estadísticamente menor que los ratones MIF/STAT-6 +/+ y los ratones MIF -/- (n=10). B) La carga parasitaria a las 9 semanas post-infección en los ratones MIF/STAT-6 -/- y STAT-6 -/- es significativamente menor que en los otros dos grupos experimentales (n=13). Los datos están expresados como la media \pm ES. *, °, + p < 0.05 T students; Graphpad Prism. *, °, + = valor significativo.

Determinación de la concentración de parásitos por PCR.

Para confirmar los resultados de la carga parasitaria obtenidos por dilución limitante, se procedió a determinar la concentración de parásitos de las lesiones dorsales de todos los grupos experimentales en la semana 5 y 9 post-infección. Se empleó la técnica de PCR, utilizando una secuencia que amplifica una región conservada del minicírculo de DNA del cinetoplasto de todas las especies de *Leishmania* con un peso molecular de 120 pb. Se observó una expresión del gen del parásito similar en los ratones MIF/STAT-6 $-/-$ y STAT-6 $-/-$ sin embargo, su carga parasitaria fue estadísticamente menor que los otros dos grupos experimentales a las 5 semanas post-infección (Fig. 13A). Mientras que a las 9 semanas post-infección, los ratones MIF/STAT-6 $-/-$ presentaron menor carga parasitaria en comparación con los otros grupos experimentales (Fig. 13B).

A)



B)

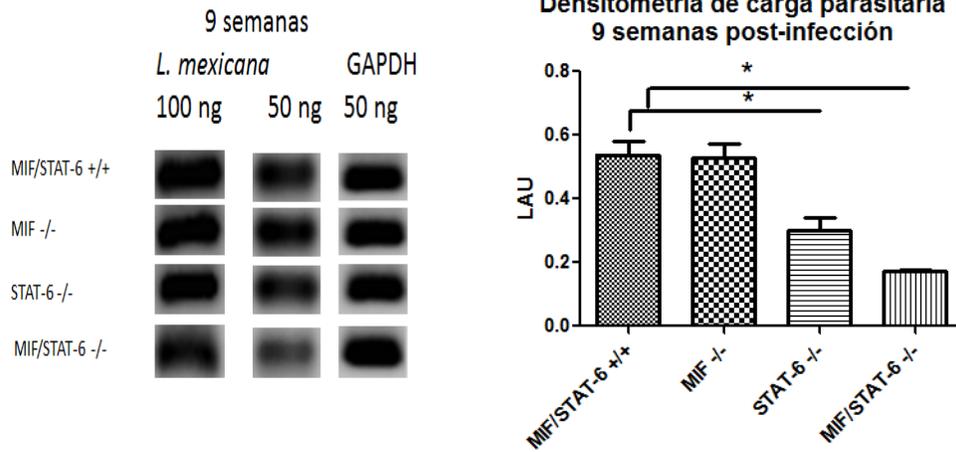


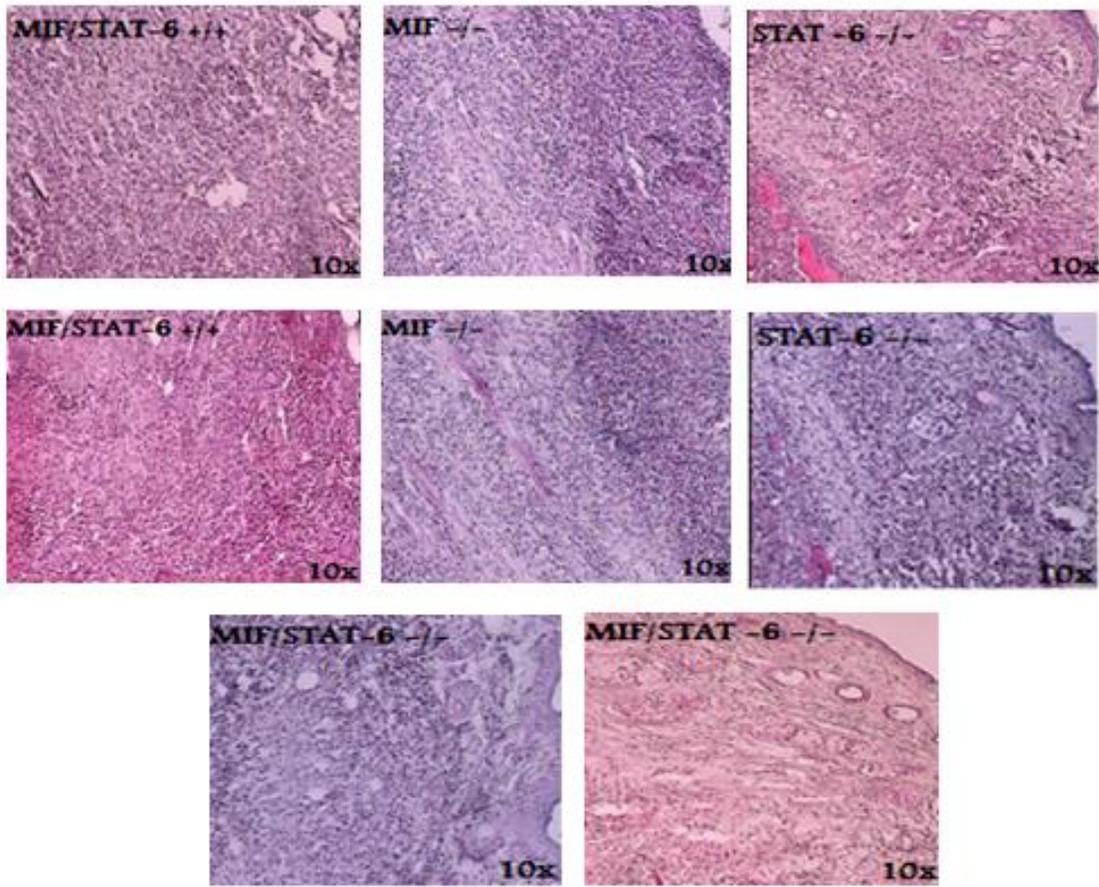
Figura 13. Electroforesis representativas de las cargas parasitarias cuantificadas con la técnica de PCR a las 5 y 9 semanas post-infección. Diluciones consecutivas de 100 y 50 ng/ μ l. Cuantificación por densitometría de la carga parasitaria, de la amplificación del gen a la concentración de 50 ng/ μ l de DNA. A) Se observa una expresión similar de DNA de *L. mexicana* en los ratones MIF/STAT-6 -/- y STAT-6 -/-, ambos teniendo una expresión menor de DNA que los otros dos grupos experimentales a las 5 semanas post-infección. B) Los ratones MIF/STAT-6 -/- presentaron menor expresión de DNA parasitario lo que se traduce como una menor carga parasitaria en comparación con los otros grupos experimentales a la semana 9 post-infección. * $p < 0.05$ Mann-Whitney; LAU= Unidades Arbitrarias Lineales. (n=4).

Histología

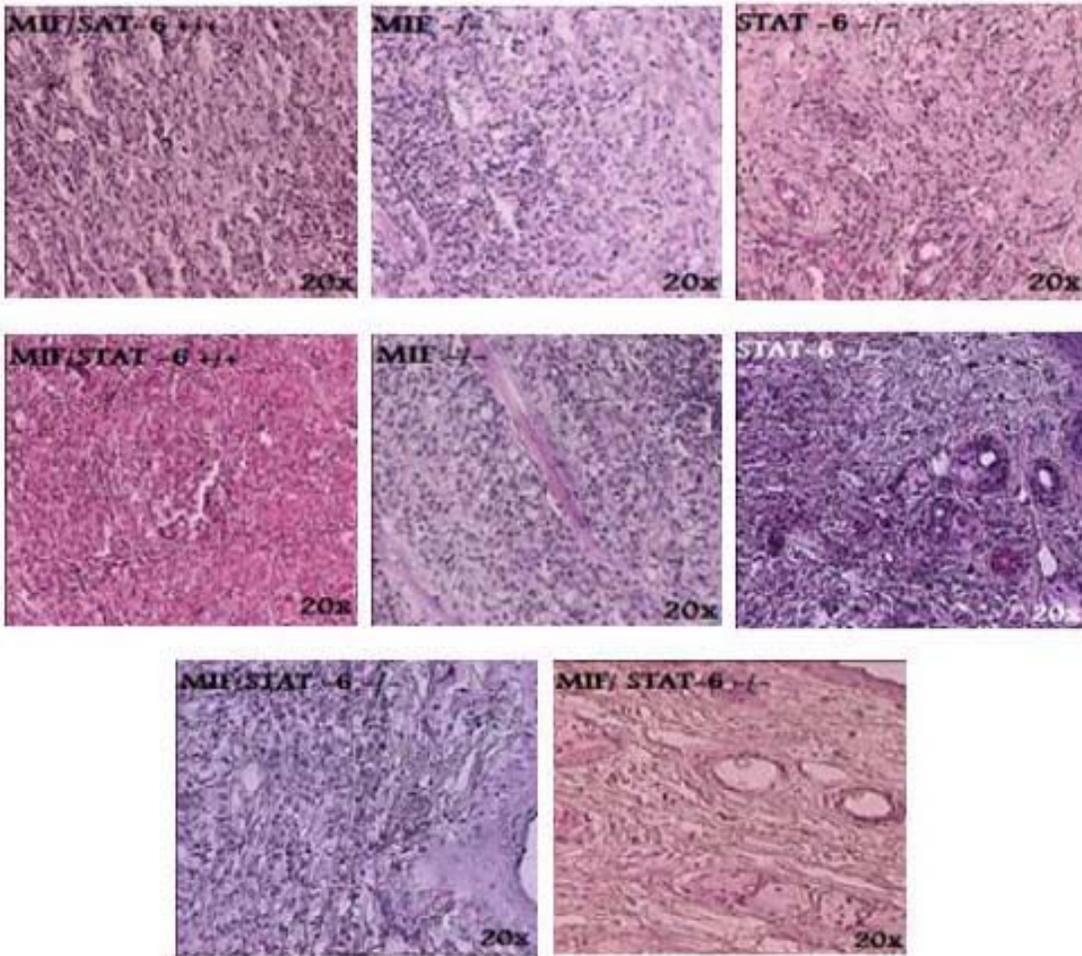
Se realizó a las semanas 5 y 9 post-infección, con la intención de observar el daño causado por *L. mexicana*. Los cortes histológicos fueron realizados de la parte posterior de los ratones cerca de la base de la cola, en donde anteriormente fueron inoculados con el parásito.

A la semana 5 post-infección, los ratones MIF/STAT-6 -/- y STAT-6 -/- tuvieron menor cantidad de infiltrado celular y una mejor preservación en la estructura de la piel. Mientras que los ratones silvestres y MIF -/- tuvieron mayor cantidad de infiltrado celular (Fig. 14).

A)



B)



c)

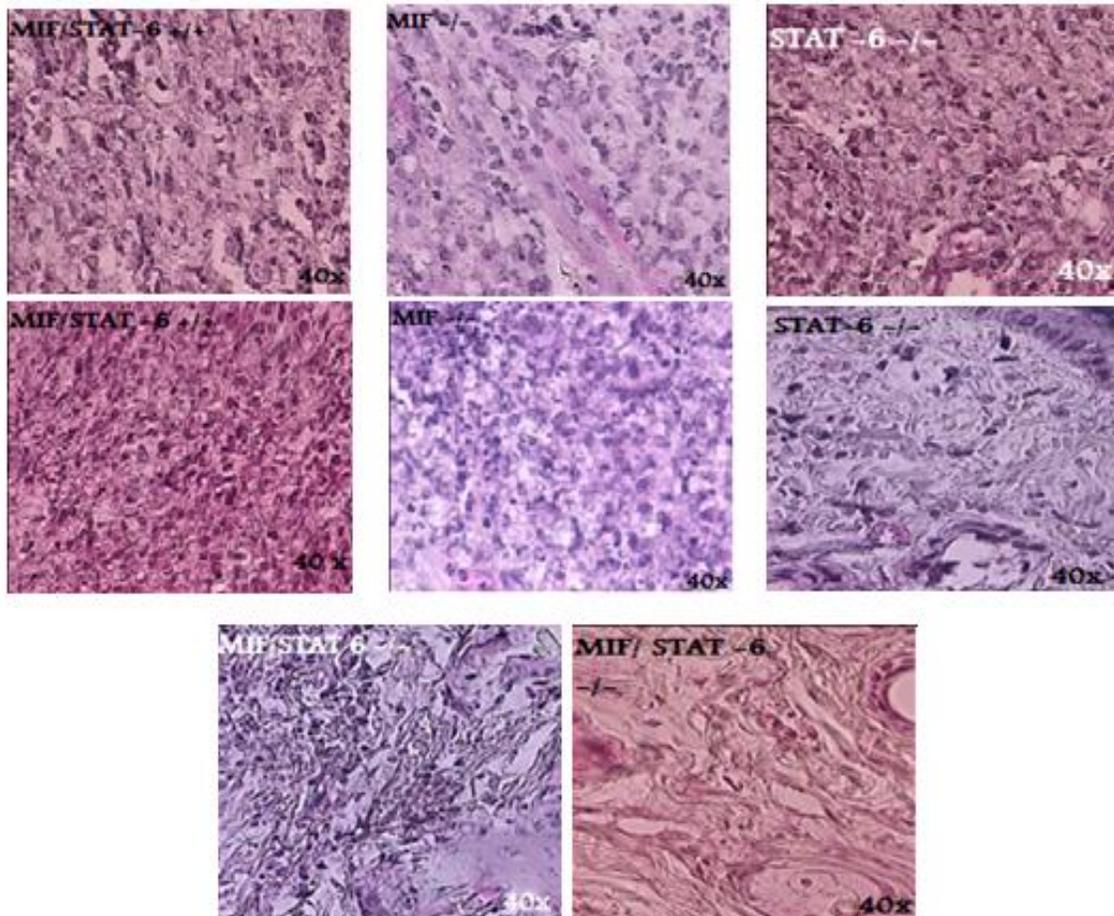
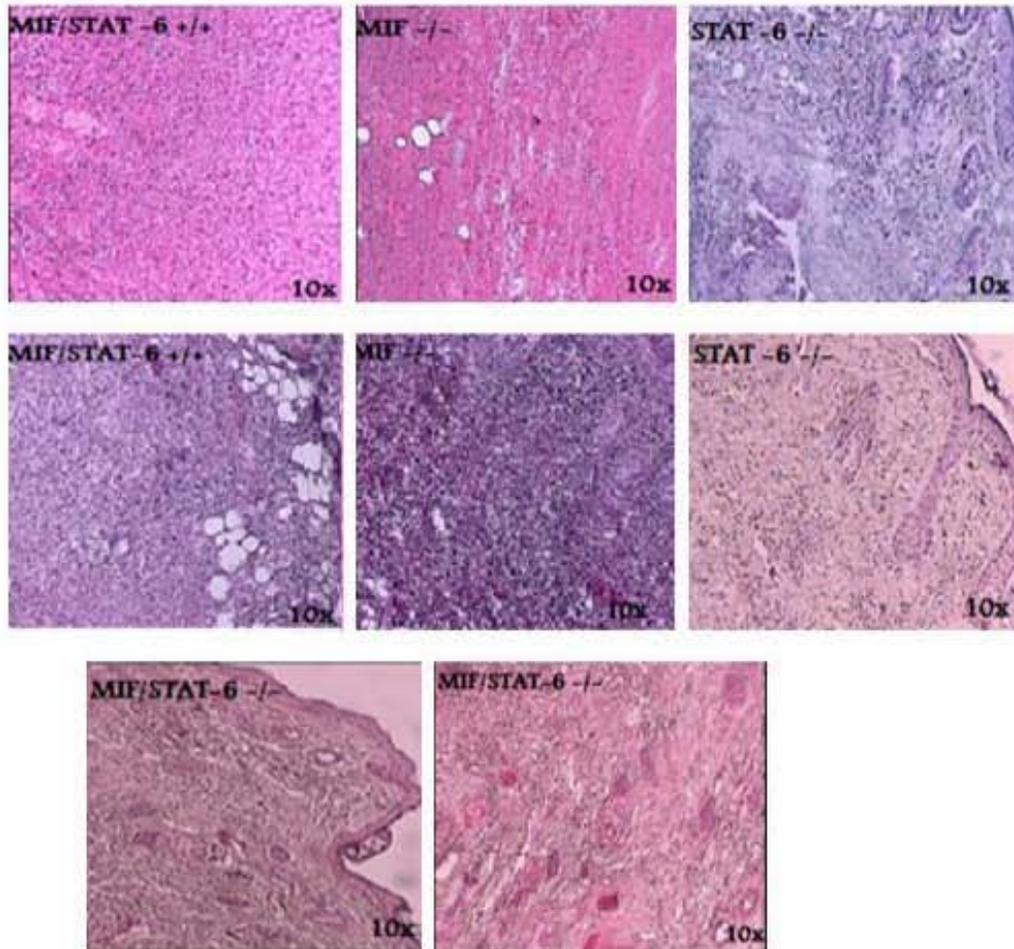


Figura 14. Cortes histológicos a de heridas dorsales de ratones MIF/STAT-6 +/+, MIF -/-, STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 +/- a 5 semanas post-infección con *L. mexicana*. Se puede observar que los ratones MIF/STAT-6 y los STAT-6 presentaron menor infiltrado celular y que la estructura de la piel se encontró en mejores condiciones comparada con los otros dos grupos experimentales. En el caso de los ratones MIF/STAT-6 +/+ y MIF presentaron una mayor cantidad de infiltración celular y una moderada destrucción del tejido. Las imágenes se muestran a diferentes magnificaciones a 10 x (A), 20x (B) y a 40 x (C). Los cortes histológicos se realizaron a los ratones que presentaban mayor tamaño de lesión y menor tamaño de lesión por grupo experimental.

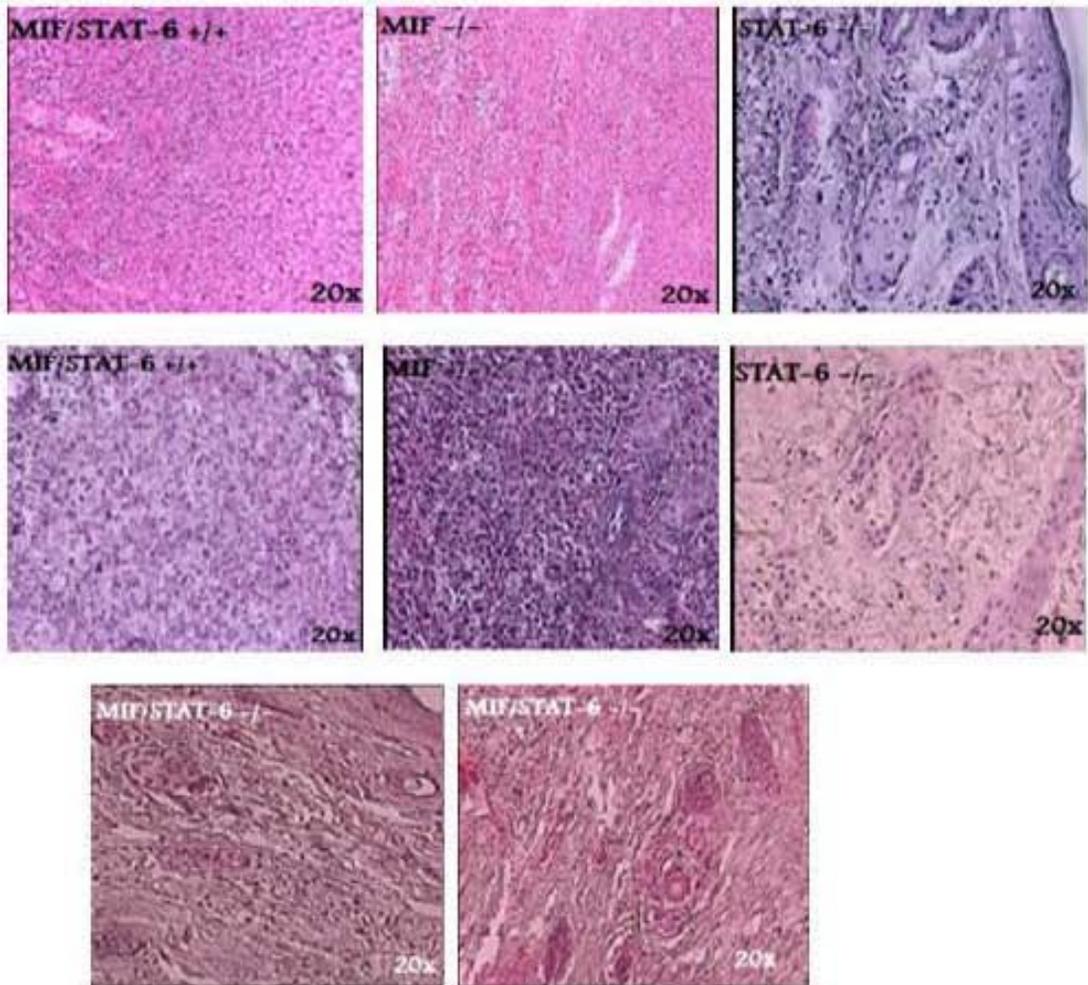
En los cortes histológicos realizados a la semana 9 post-infección, los ratones MIF/STAT-6 -/- presentaron menor cantidad de infiltrado celular y el tejido se encontró más organizado, siendo similares los ratones STAT-6 -/-. Mientras que los ratones silvestres y MIF -/- a esta semana post-infección presentan una alta destrucción del tejido, es por

esto que la coloración de tejido es de un color claro, ya que no hay células que teñir debido a que son zonas necrosadas (Fig. 15).

A)



B)



c)

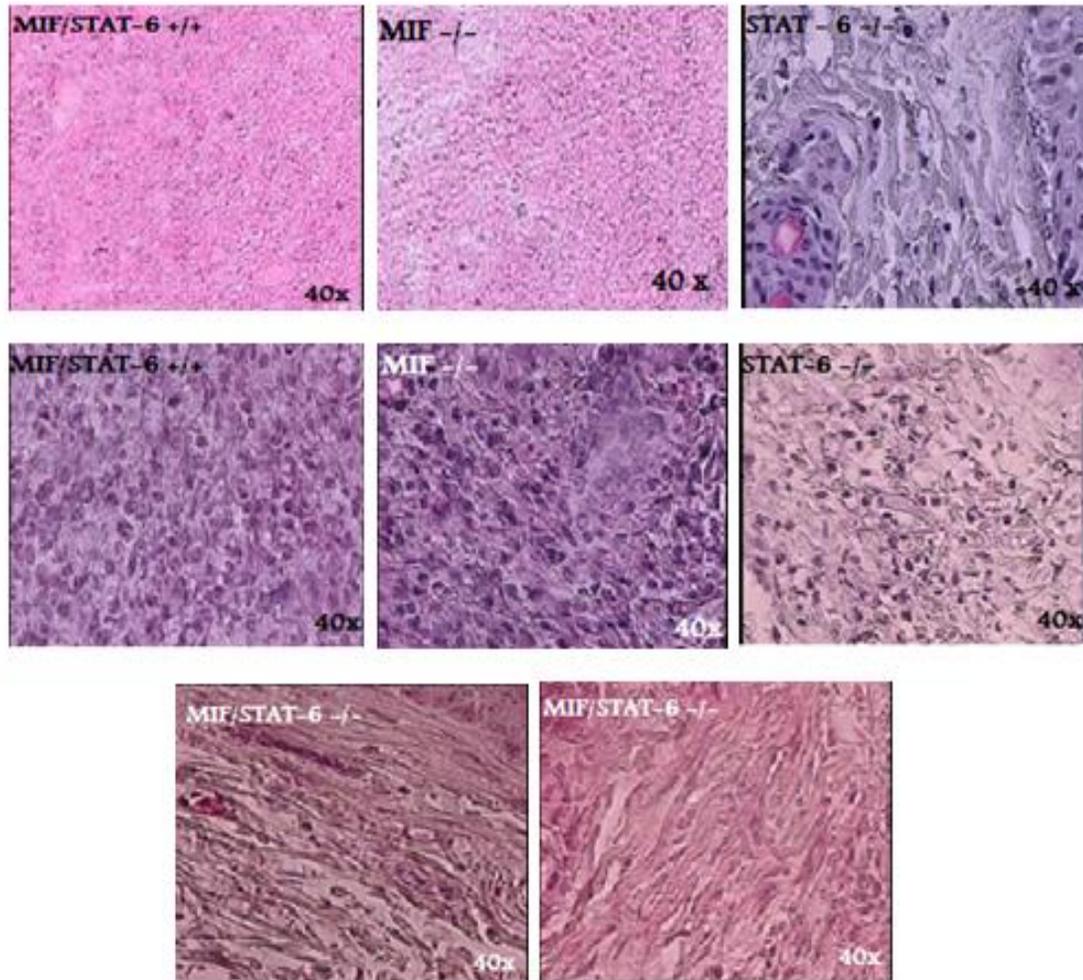


Figura 15. Cortes histológicos de heridas dorsales de los ratones MIF/STAT-6 +/+, MIF -/-, STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- a 9 semanas post-infección con *L. mexicana*. Se puede observar que los ratones STAT-6 tuvieron el tejido mejor conservado y con menor cantidad de infiltración celular seguido de los ratones MIF/STAT-6 -/-. Sin embargo, xlos ratones MIF/STAT-6 +/+ y MIF presentaron una mayor cantidad de infiltración celular y una alta destrucción de tejidos, llegando a presentar zonas con necrosis. Las imágenes se muestran a diferentes magnificaciones a 10 x (A), 20x (B) y 40 x (C).

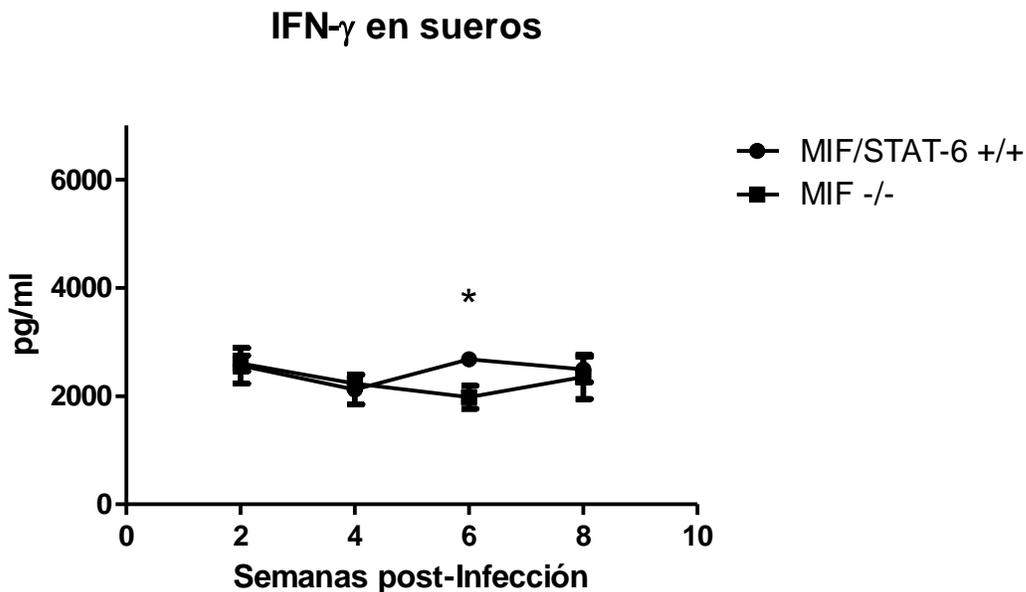
Citocinas pro-inflamatorias

Su medición se realizó con el propósito de esclarecer la importancia de los genes MIF y STAT-6 en una infección causada por *L. mexicana* en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-12.

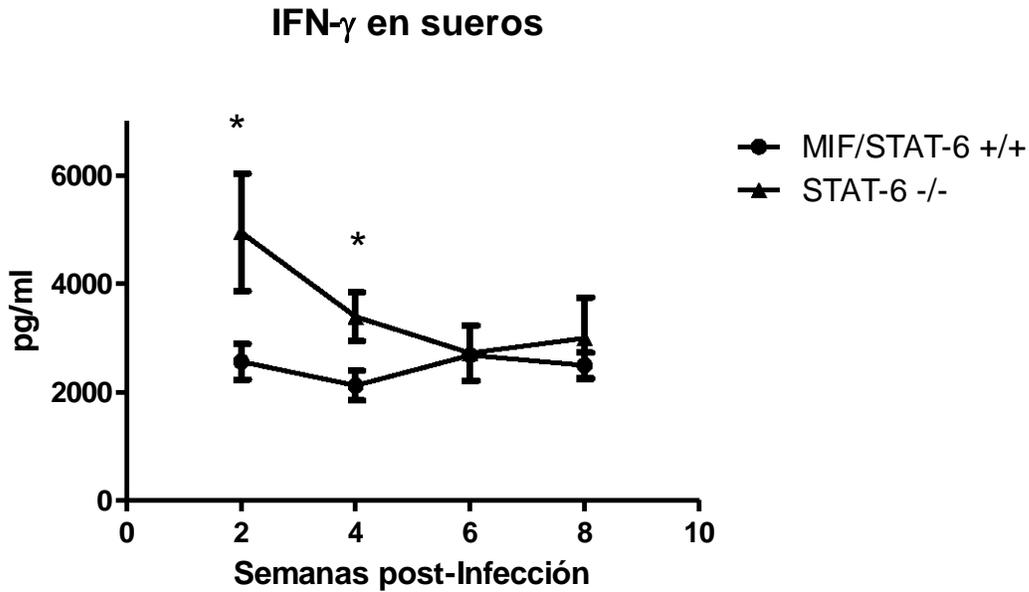
Se analizaron estas citocinas en el suero de los ratones por medio de ELISA sándwich a las semanas 2, 4, 6 y 8 post-infección.

IFN- γ es una citocina pro-inflamatoria que se está involucrada en el control de *L. major* y sus funciones más importantes son la activación del macrófago y la capacidad de aumentar su actividad microbicida para matar parásitos intracelulares. En la figura 16A, se muestra que hay una producción mayor de IFN- γ en los ratones MIF/STAT-6 +/+ comparados con los MIF -/- a las 6 semanas post-infección en los ratones MIF -/- con respecto a los silvestres. En la figura 16B, los ratones STAT-6 -/- presentaron mayor cantidad de IFN- γ que fue estadísticamente significativa en las semanas 2 y 4 post-infección comparados con los ratones MIF/STAT-6+/+. Sin embargo, los ratones MIF/STAT-6-/- presentaron altos niveles de esta citocina pro-inflamatoria en todas las semanas post-infección teniendo su pico más alto en la semana 6 post-infección. (Fig. 16C).

A)



B)



C)

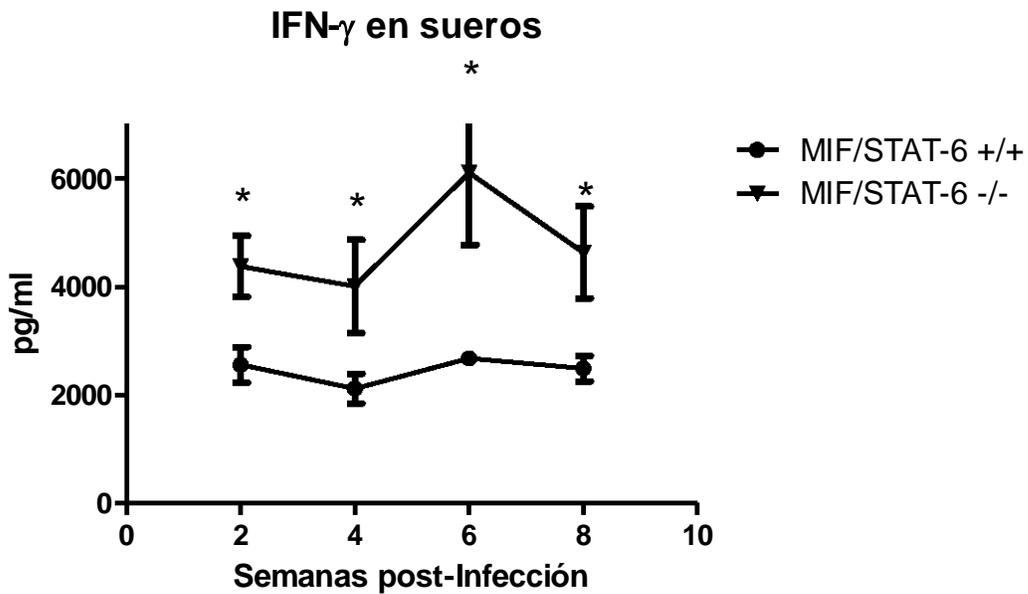
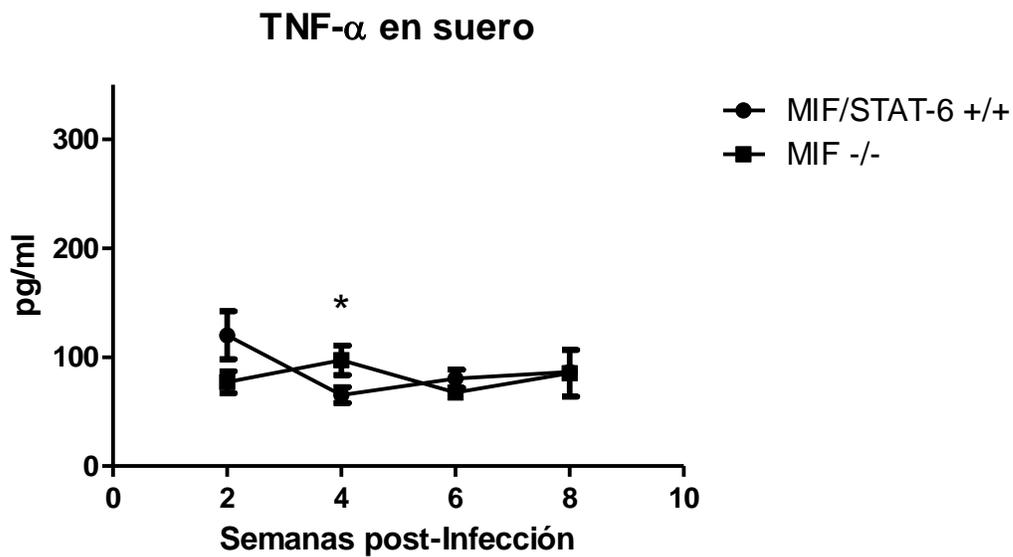


Figura 16. Niveles de IFN- γ en suero durante la infección causada por *L. mexicana* a diferentes semanas post-infección. Esta infección produjo una elevación en el nivel de IFN- γ en la semana 6 post-infección en los ratones MIF/STAT-6 +/+ (A). Por otra parte, los ratones STAT-6 -/- presentaron un alto nivel en la semana 2 post infección y fue disminuyendo conforme la infección continuó (B). Sin embargo, los ratones MIF/STAT-6 -/- en todas las semanas tuvieron niveles más altos de esta citocina, teniendo su pico en la semana 6 post-

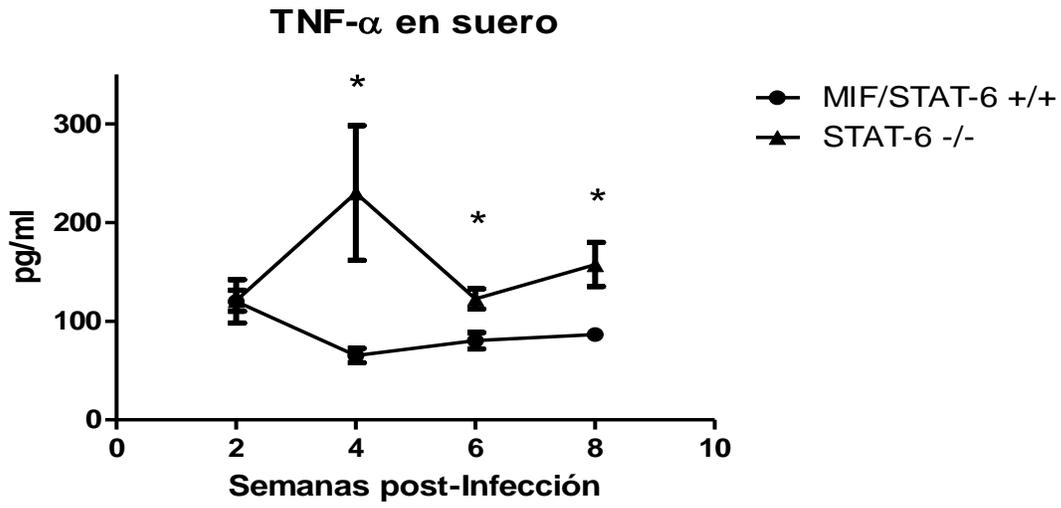
infección. Los datos están expresados como la media \pm ES. *, ° $p < 0.05$ Mann-Whitney; Graphpad Prism. * = valor significativo. (n=5).

Otra citocina pro-inflamatoria que está involucrada en una respuesta inmune protectora contra *L. major* es TNF- α , esta citocina tiene la capacidad de aumentar la actividad leishmanicida del macrófago. En la figura 17 se observa las diferencias que hubo entre los diferentes grupos experimentales. Los ratones MIF/STAT-6 -/- expresaron una cantidad constante de TNF- α en suero en todas las semanas (Fig. 17). La estabilidad en la producción de esta citocina evitó una exacerbación en la respuesta contra la infección y gracias a esto la destrucción del tejido afectado por el parásito no fue tan severa como en los otros grupos experimentales.

A)



B)



C)

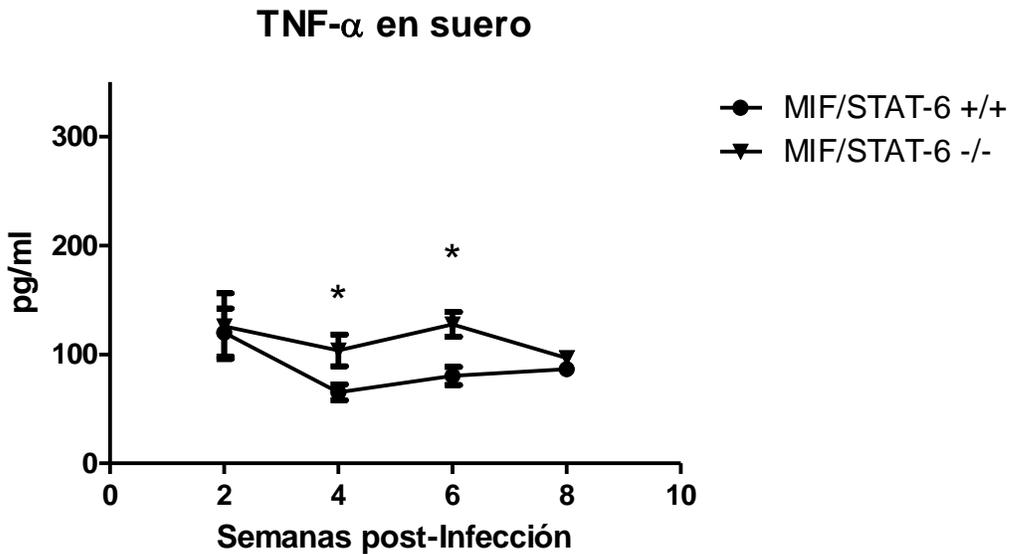
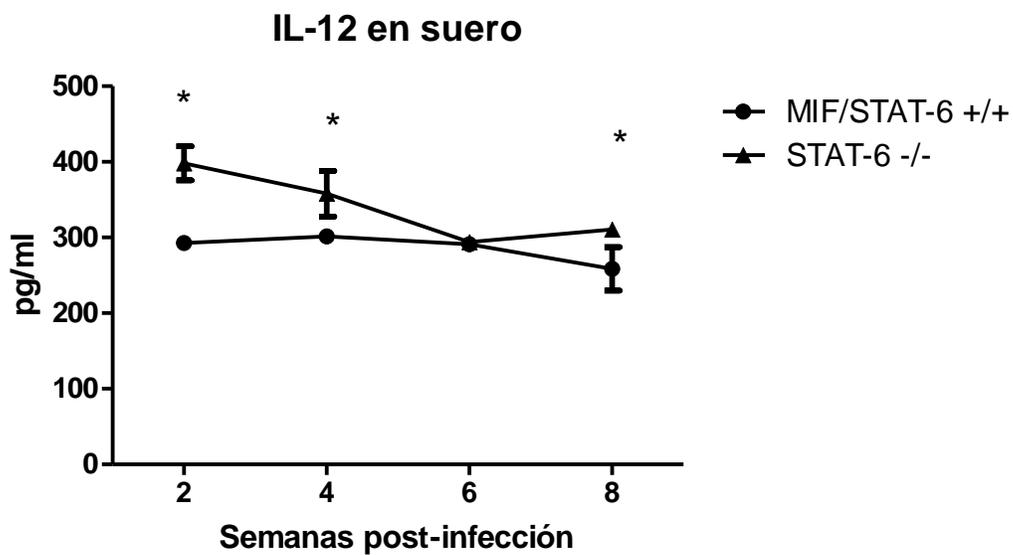
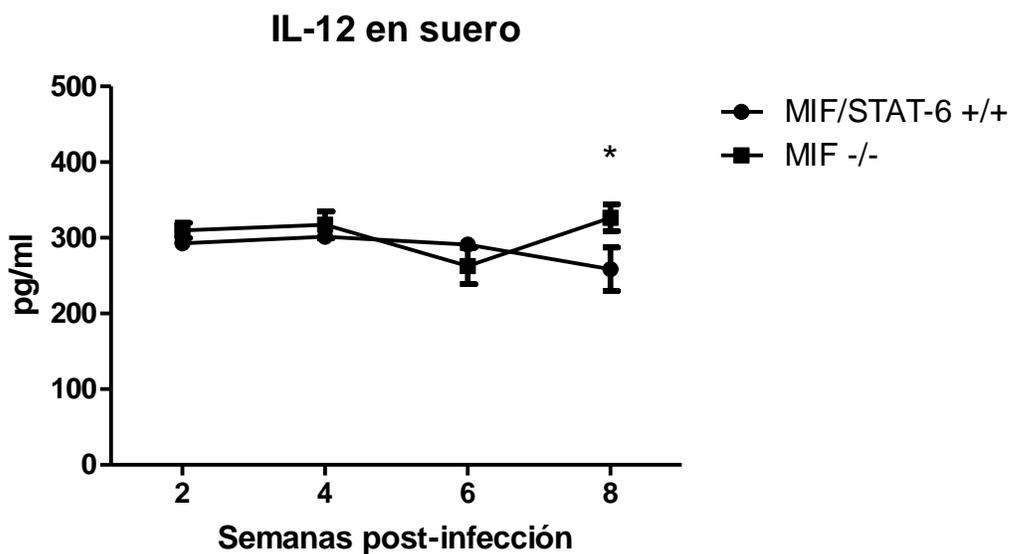


Figura 17. Niveles de TNF- α en suero durante la infección con *L. mexicana* a diferentes semanas post-infección. La infección causada por *L. mexicana* produjo una diferencia en el nivel de TNF- α en la semana 4 post-infección en los ratones MIF -/- comparados con los ratones MIF/STAT-6 +/+ (A). Por otra parte, los ratones STAT-6 -/- presentaron los niveles más altos de TNF- α , comparados con los otros grupos experimentales. Presentando su pico en la semana 4 post-infección (B). Los ratones MIF/STAT-6 -/- presentaron diferencias estadísticamente significativas en las semanas 4 y 6 post-infección comparados con los ratones silvestres. Los datos están expresados como la media \pm ES. *, ° $p < 0.05$ Mann-Whitney; Graphpad Prism. * = valor significativo. (n=5).

La IL-12 es una citocina que puede ser liberada por las CPA y provee las señales necesarias para dar una respuesta tipo Th1. En la siguiente figura se observan las diferencias en la producción de IL-12 entre los diferentes grupos experimentales comparados con los ratones silvestres. Los ratones MIF/STAT-6 $-/-$ tuvieron una producción casi estable, por arriba de los ratones silvestres y los ratones MIF $-/-$ (Fig. 18).

A)



B)

c)

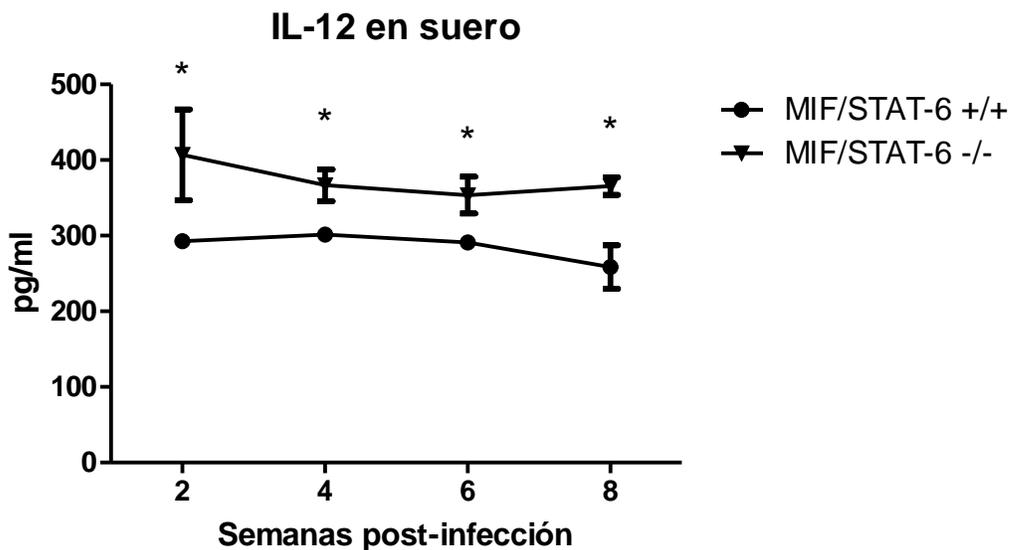


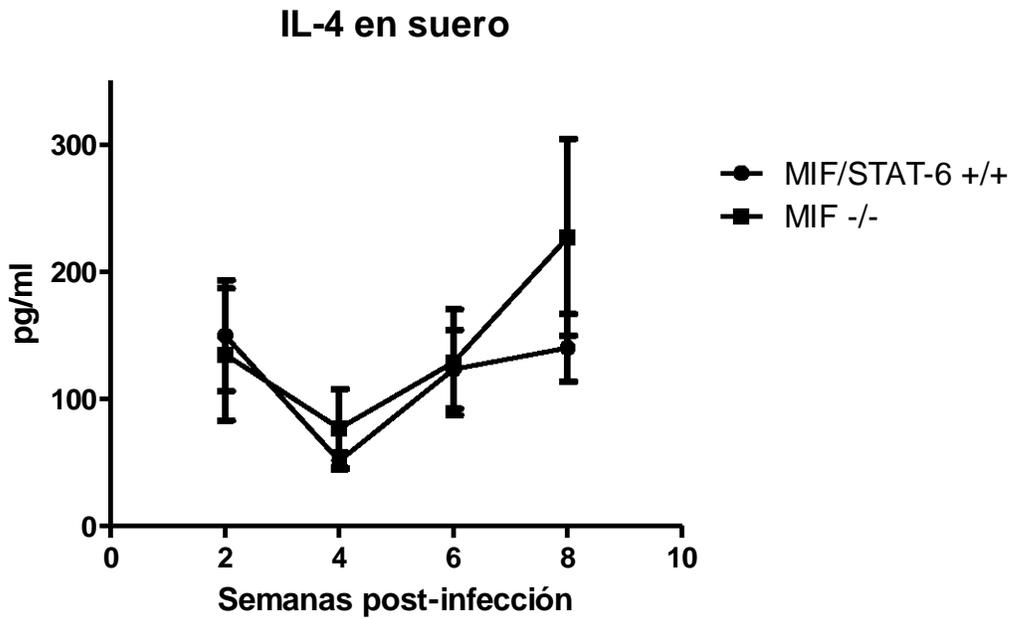
Figura 18. Niveles de IL-12 en suero durante la infección con *L. mexicana* a diferentes semanas post-infección. La infección causada por *L. mexicana* produjo una disminución en el nivel de IL-12 en la semana 8 post-infección en los ratones MIF -/- comparados con los ratones MIF/STAT-6 -/- (A). Los ratones STAT-6 -/- presentaron niveles estadísticamente más altos de IL-12 en la semana 2, 4 y 8 post-infección comparado con los ratones silvestres (B). Presentando casi una estabilidad en la producción de IL-12, los ratones MIF/STAT-6 -/- presentaron niveles superiores a los ratones MIF/STAT-6 +/+ en todas las semanas post-infección medidas (C). Los datos están expresados como la media \pm ES. *, ° $p < 0.05$ Mann-Whitney; graphpad prism. * = valor significativo. (n=5).

Citocina Anti-inflamatoria

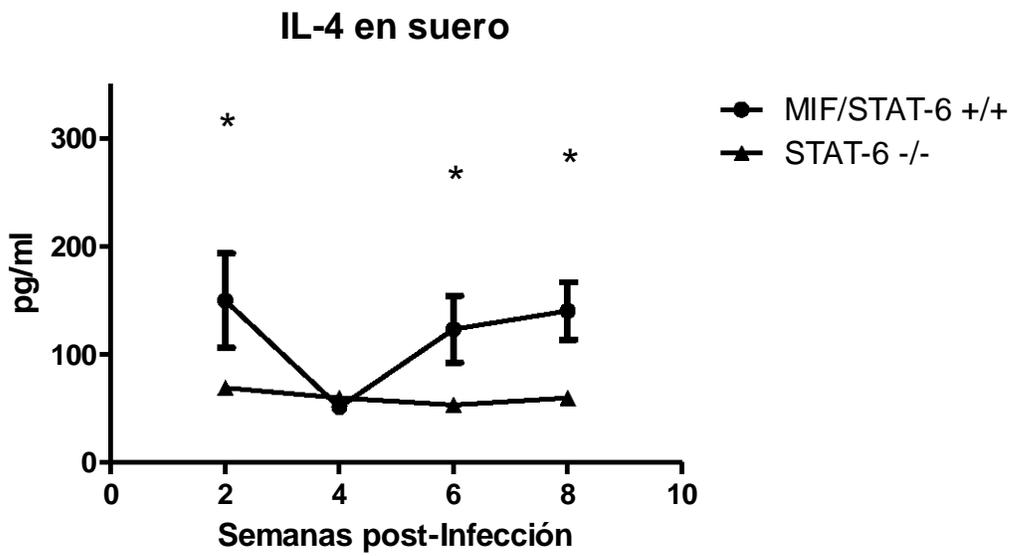
La citocina anti-inflamatoria IL-4 ha sido descrita como pieza fundamental en la diferenciación de la respuesta tipo Th2, asociada a una exacerbación en la enfermedad de leishmaniosis cutánea causada por *L. major*. Esta citocina se determinó en los sueros de los ratones infectados con *L. mexicana* en las semanas 2, 4, 6, y 8 post-infección. En las siguientes figuras se observa el comportamiento en la producción de IL-4 en los diferentes grupos experimentales comparados con los ratones silvestres (Fig. 19). En los ratones MIF/STAT-6 +/+ y MIF -/- no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, ambos grupos experimentales presentaron niveles altos en esta citocina antiinflamatoria que se encuentra relacionada con la deficiencia en el control de la leishmaniosis cutánea. Por otra parte, los ratones STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- presentaron niveles bajos de esta citocina

induciendo una predominancia a una respuesta tipo Th1, la cual está involucrada a la resolución de la enfermedad causada por *L. mexicana*.

A)



B)



c)

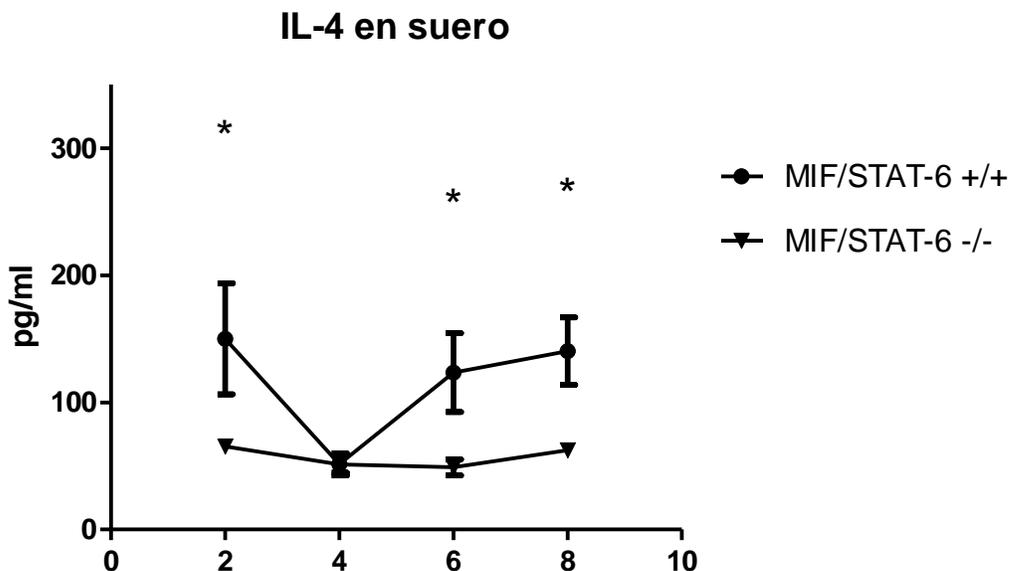


Figura 19. Niveles de IL-4 en suero durante la infección con *L. mexicana* a diferentes semanas post-infección. Se observa que los niveles de IL-4 en suero de los ratones MIF -/- y MIF/STAT-6 +/+ son similares (A) y ambos presentan una alta cantidad de esta citocina comparados con los otros dos grupos experimentales. Los ratones STAT-6 -/- presentaron niveles bajos de IL-4 y con excepción de la semana 4 post-infección todos los niveles fueron estadísticamente menores que los ratones MIF/STAT +/+ (B). En el caso de los ratones con deficiencia en ambos genes, la situación en la producción de IL-4 fue similar a los ratones STAT-6 -/-, teniendo valores por debajo de los ratones silvestres a excepción de la 4ª semana post-infección. (C). Los datos están expresados como la media \pm ES. *, ° p < 0.05 Mann-Whitney; Graphpad Prism. * = valor significativo. (n=5).

Óxido Nítrico

La molécula de óxido nítrico está involucrada en el control de la leishmaniosis debido a su actividad microbicida ya que puede atravesar la pared celular y aniquilar los parásitos que se encuentren en los fagolisosomas de las células infectadas. Esta molécula es generada a consecuencia de la activación del macrófago por algunas citocinas como IFN- γ y TNF- α . Por otra parte, se ha analizado macrófagos infectados incubados con LPG de la superficie de *Leishmania* *in vitro* y estos llegan a perder la habilidad enzimática del iNOS. Dado lo anterior se realizaron las mediciones de esta molécula en los sobrenadantes del cultivo de macrófagos del peritoneo a las 5 y 9 semanas post-infección. En la semana 5 post-infección se encuentran diferencias en la producción de ON en los ratones MIF -/- y MIF/STAT-6 -/-, los cuales fueron estimulados con LPS.

En el caso de los macrófagos retados con el Ag de *L.mexicana* a la semana 5 post-infección solo se observó la diferencia de producción de ON en los ratones que no habían tenido anteriormente una infección por *L. mexicana* (Fig. 20) .

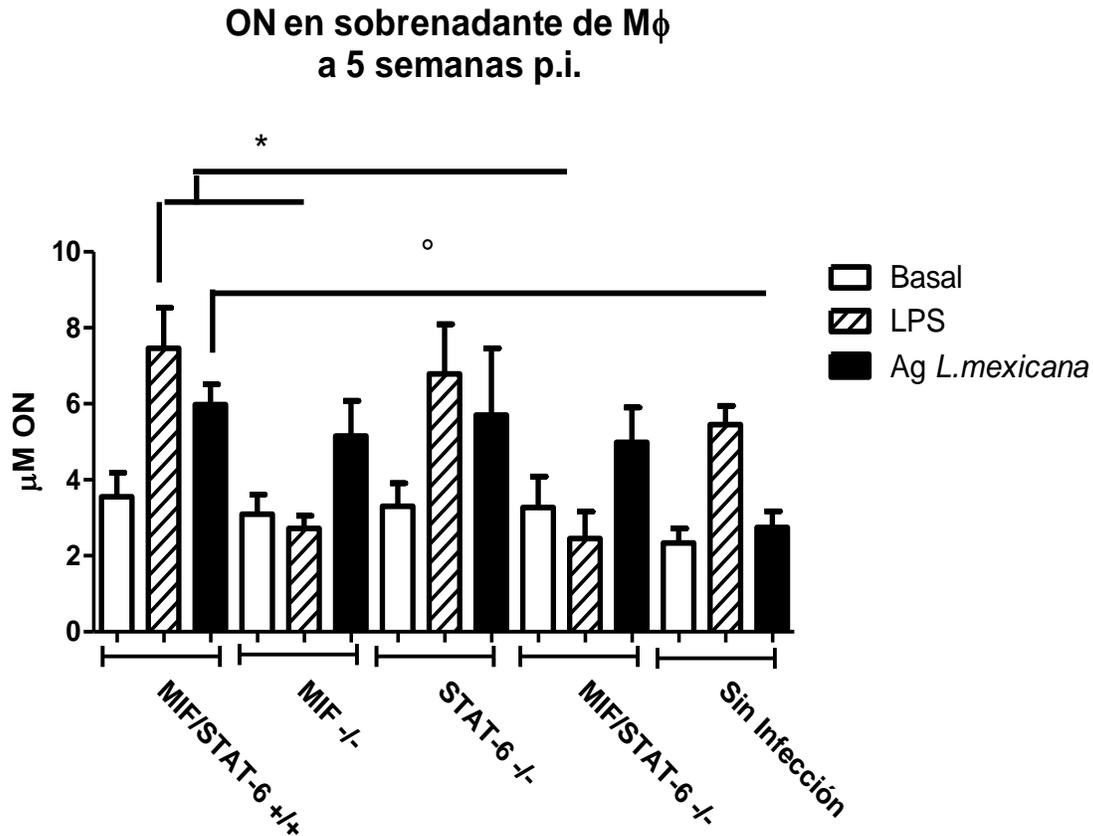


Figura 20. Producción de óxido nítrico en sobrenadantes del cultivo de macrófagos del peritoneo a las 5 semanas post-infección. Se observan diferencias significativas en los ratones MIF -/-, MIF/STAT-6 en la producción de ON cuando fueron retados con LPS. Se encontró una producción menor de ON en los ratones silvestres sin infección cuando fueron retados con Antígeno de *L. mexicana*. Los datos están expresados como la media \pm ES. +, °, $p < 0.05$ Mann-Whitney; Graphpad Prism. +, °, ~ = valor significativo. (N=7)

En los macrófagos estimulados con LPS se encontró una diferencia significativa en la producción de ON en los ratones MIF -/- como se puede observar en la siguiente gráfica. En el caso de los macrófagos retados con el Ag de *L.mexicana* a la semana 9 post-infección se encontró mayor cantidad de ON en los ratones STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- en comparación con los ratones MIF -/- y MIF/SAT-6 -/- (Fig. 21).

ON en sobrenadante de M ϕ
a 9 semanas p.i.

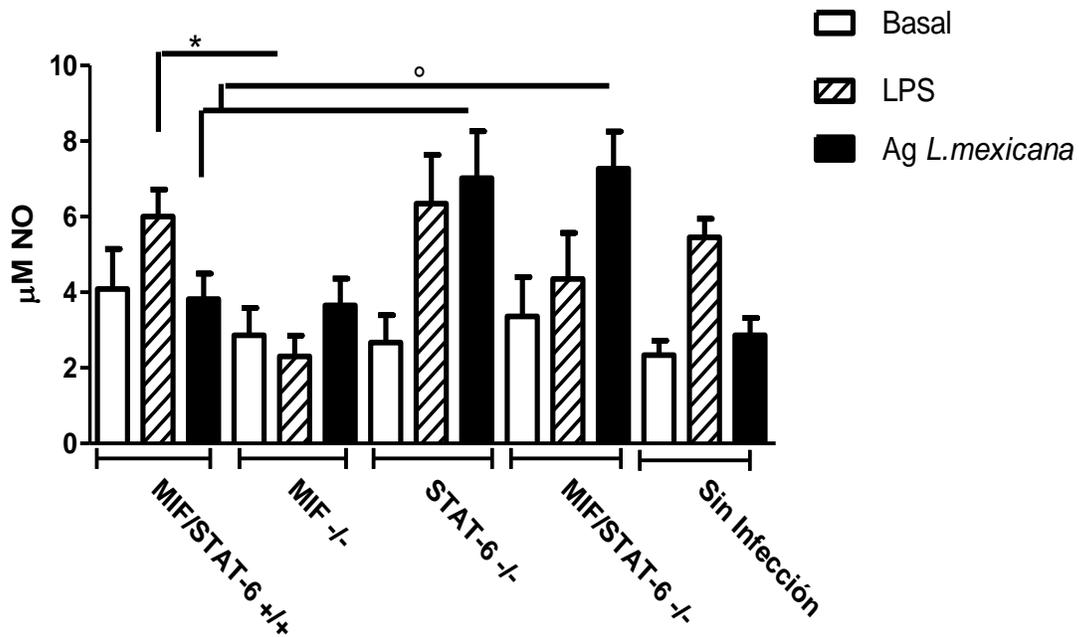


Figura 21. Producción de óxido nítrico en sobrenadantes del cultivo de macrófagos del peritoneo a las 9 semanas post-infección. Se observa una diferencia significativa en los ratones MIF -/- en la producción de ON cuando fueron retados con LPS. También se encontró diferencias significativas en la producción de ON en los ratones STAT-6 -/- y MIF/STAT-6 -/- cuando fueron estimulados con Ag de *L. mexicana*. Los datos están expresados como la media \pm ES. +, °, ~ $p < 0.05$ Mann-Whitney; Graphpad Prism. +, ° = valor significativo. (N=5)

8. Discusión

El balance de citocinas Th1 y Th2 producidas en respuesta a la infección por *Leishmania* ha proporcionado el marco conceptual para entender las formas de curación, con las de no curación de la enfermedad clínica causada por el parásito. Este marco ha sido evaluado en diferentes investigaciones usando principalmente a *L. major*. Este modelo apoya al paradigma en el cual una respuesta con células tipo Th1 está asociada con una inmunidad protectora y una resolución en la enfermedad, mientras una respuesta tipo Th2 está asociada con la susceptibilidad y una exacerbación de la enfermedad. Sin embargo, en *Leishmania mexicana* no está bien establecida la respuesta inmune protectora, quedando incierto el tipo de respuesta protectora requerida para controlarla.

Se ha visto que una vez liberado MIF es capaz de modular la expresión de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos, y es un componente importante en la activación de células T [36] y en colaboración con otras citocinas como IFN- γ , MIF promueve la liberación de óxido nítrico en macrófagos y su función fagocítica [25,37]. Además se ha visto que la habilidad de los ratones infectados con *L. major* en ratones BALB/c está relacionada con la expresión de la molécula de MIF y a una respuesta fuerte del tipo Th1 [49]. Por otra parte la señalización de IL-4 mediante STAT-6 es crítica para la supresión de la respuesta Th1 que es necesaria para el control de las lesiones causadas por *L. mexicana* en ratones BALB/c [56].

Dado lo anterior se planteó el objetivo de estudiar la participación de MIF y STAT-6 en la infección por *L. mexicana* en ratones BALB/c. De manera interesante los ratones MIF/STAT-6^{-/-} y los ratones STAT-6^{-/-} desarrollaron lesiones de menor tamaño, teniendo estos ratones la habilidad de controlar el crecimiento del parásito. Esto indicaría que STAT-6 juega un papel relevante en esta infección. Esta disminución en el tamaño de la lesión podría estar asociada con el incremento de la respuesta tipo Th1. El monitoreo de la lesión se correlacionó con la carga parasitaria medida por dilución limitante y por PCR, donde los ratones con mayor carga parasitaria fueron los ratones MIF /STAT-6^{+/+} y MIF^{-/-} desde la semana 5 hasta la semana 9 post-infección, por lo tanto entre mayor tamaño de lesión mayor carga parasitaria.

Si bien la mayoría de los ratones (C57BL/6, C3H, CBA) a excepción de los que tienen fondo genético BALB/c generan lesiones que se curan solas cuando se les infecta subcutáneamente con *L. major*; cuando se les infecta subcutáneamente con *L. mexicana* todos generan rápidamente lesiones grandes que no se resuelven por si solas [47]. Sin embargo, los ratones BALB/c deficientes para los genes MIF y STAT-6 presentaron mayor capacidad para controlar el parásito, por lo tanto la estructura del tejido epitelial donde fueron inoculados con *L. mexicana* se encontró más conservada, similar a los ratones STAT-

6 -/-. La importancia de la señalización vía STAT-6 en la leishmaniosis cutánea se ha demostrado en diferentes ratones susceptibles deficientes en los genes IL-4, IL-13, y STAT-6, donde estos ratones montan una respuesta Th1 y desarrollan un control efectivo en el crecimiento y replicación del parásito, indicando que STAT-6 juega un papel importante en la susceptibilidad debido a que previene el desarrollo de una respuesta Th1 [21].

La susceptibilidad a la leishmaniosis cutánea en ratones está asociada a la expansión de células tipo Th2, que se caracterizan por la temprana producción de IL-4, provocando una progresiva infección [41]. Se ha estudiado el papel de IL-4, siendo esta citocina crucial para inhibir la generación de una respuesta tipo Th1, demostrando que la activación temprana de IL-4 impide a las células dendríticas a producir IL-12 y promover así una respuesta inmune protectora [10]. Lo que demuestra que IL-4 instruye la susceptibilidad de los ratones BALB/c a *L. major*. Además, los ratones deficientes a la citocina IL-4-/- logran montar una buena respuesta protectora tipo Th1 [40]. Lo que concuerda con los resultados obtenidos, ya que los ratones STAT-6-/- y los ratones MIF/STAT-6-/- al haber tenido menor cantidad de esta citocina, fueron los que menor tamaño de lesión presentaron.

Por otra parte tanto los ratones STAT-6 -/- como los ratones MIF/STAT-6-/- presentaron niveles mayores de TNF- α en suero en al menos dos semanas post-infección en comparación con los otros dos grupos experimentales que presentaron niveles más bajos de esta citocina. Esta citocina es crítica para la resolución de la enfermedad causada por *L. major*, ya que se ha demostrado que los ratones TNF- α -/- no son capaces de controlar la enfermedad e inclusive llega a ser fatal [66]. Además, la manera en la que TNF- α interviene de manera importante es mediante su capacidad para mejorar la activación de los macrófagos, aumentando la producción de ON y por lo tanto la eliminación del parásito [62]. Si bien, se ha sugerido que MIF es un mediador inflamatorio inicial capaz de estimular la expresión de TNF- α [36], en la infección causada por *L. mexicana* parece no jugar un papel importante en la protección contra este parásito, al contrario de STAT-6 que es fundamental en la susceptibilidad.

IL-12 es una citocina que es producida en la mayoría por CPA, se ha observado que en macrófagos infectados con *Leishmania* presentan una disfunción en su habilidad de producir esta citocina, que es un factor inductor en la producción de IFN- γ y es una de las citocinas esenciales para la diferenciación de las células Th1, por lo que es importante para desarrollar resistencia a organismos intracelulares [41]. La importancia de IL-12 en la inmunidad contra leishmaniosis cutánea ha sido demostrada en modelos experimentales con *L. major* demostrando su papel fundamental en la resolución de la infección [21,45]. Por otra parte, en la infección con *L. mexicana* la importancia de STAT-4 dependiente de la señalización por IL-12 es crucial para el desarrollo de una protección inmune contra esta

infección [44]. En los resultados obtenidos, los ratones MIF/STAT-6^{-/-} presentaron niveles de IL-12 por encima de los ratones silvestres, aunque no hubo un pico resaltante, los niveles de esta citocina se mantuvieron elevados durante la infección.

En la determinación de IFN- γ en suero, los ratones MIF/STAT-6^{-/-} tuvieron en todas las semanas post-infección mayor cantidad de esta citocina. IFN- γ producida por células NK puede optimizar la producción de IL-12 de las células dendríticas y la expresión de del receptor de IL-12 de las células T activadas [60, 48]. Esta citocina juega un papel importante en la leishmaniosis cutánea, ya que puede inducir la expresión de iNOS (inducible óxido nítrico sintasa) y la producción de ON en células fagocíticas que albergan a *L. major* (principalmente macrófagos), provocando la destrucción del parásito.

Una molécula que es crítica para la eliminación de este parásito es el óxido nítrico. Esta es inducida por algunas citocinas pro-inflamatorias o por componentes microbiales como es el LPS. El ON es derivado a partir del amino L-arginina por la actividad enzimática del iNOS, y ha demostrado tener funciones antimicrobiales *in vivo* e *in vitro* [11]. Se ha observado que macrófagos infectados incubados y estimulados *in vitro* con LPG de la superficie de *Leishmania* pierden la habilidad de inducir iNOS o producir ON en respuesta al IFN- γ y al LPS [20]. También citocinas relacionadas con una respuesta tipo Th2 como IL-4, IL-10, promueven el crecimiento de los parásitos intracelulares por la inducción de arginasa, la cual cataliza la hidrólisis de L-arginina en urea y L-ornithina. Estos son utilizados por la *Leishmania* para generar poliaminas, que son utilizadas para su proliferación [42]. Por lo anterior, entre mayor cantidad de ON se produzca equivaldría a menor cantidad de parásitos, lo que tendría una correlación con nuestros resultados ya que tanto los macrófagos de los ratones STAT-6^{-/-} como los MIF/STAT-6^{-/-} a las 9 semanas post-infección respondieron mejor al antígeno de *L. mexicana* produciendo mayor cantidad de óxido nítrico. Lo que surge que la vía de señalización STAT-6 está fuertemente relacionada con la susceptibilidad contra *L. mexicana*, mientras que MIF interviene en la replicación del parásito en tiempos tempranos en la infección.

9. Conclusiones

- 1.** La ausencia de los genes MIF y STAT-6 simultáneamente favorece el pronóstico para combatir la infección por *L. mexicana*, produciendo una alta expresión de citocinas relacionadas a una respuesta tipo Th1
- 2.** La señalización vía STAT-6 juega un papel importante en la susceptibilidad contra la infección causada por *L. mexicana*.
- 3.** MIF está relacionada con el control de la replicación del parásito de *L. mexicana*

10. Apéndice 1

Soluciones:

Buffer Pk lisis

200 mM NaCl (J.T. Baker)

5mM de ácido etilenediaminatetraacético (J.T. Baker)

0.2 % dodecil sulfato de sodio (SDS) (J.T. Baker)

1000 mM Tris HCl, Ph 8.5 (J.T. Baker)

Se afora con H₂O destilada hasta 1 litro

Buffer TBE 10X

Tris base (890mM) (ICN Biomedicals Inc.)

Ácido bórico (890mM) (J.T. Baker)

40 ml de EDTA disódico (0.5M) (J.T. Baker)

Se ajusta a pH 8.0 y se afora con H₂O destilada hasta 500 ml.

PBS-T: Solución de lavado (ELISA)

1000 ml de PBS más 0.5% de Tween 20

PBS-BSA Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de albumina sérica bovina (ICN Biomedicals Inc.)

Sustrato ABTS para revelado de ELISA

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals Inc.) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en H₂O destilada y con NaOH llevar a pH 4.53, y hacer alícuotas de 11 ml en tubos y congelar a -70°C hasta su uso.

Soluciones para Lowry

Solución A

Sulfato de cobre CuSO₄ al 1%

Tartrato de Sodio y Potasio 2%

Solución B

Carbonato de Sodio Na₂CO₃ al 2% + NaOH 0.1N

11. Apéndice 2

Condiciones de PCR's

Gen	Secuencias	Producto	T. alineación	Ciclos
MIF	(F) AgACCACgtgCTTAGCTgAg (R) gCATCgCTACCggTggATAA	200 pb	56° C	35
NEO MIF	(F) ATTgAACAAgATggATTgCAC (R) CgTCCAgATCATCCTgATC	500 pb	56°C	35
STAT-6	(F) CTgAATgAACTgCAggACgA	275 pb	54°C	35
NEO STAT-6	(F) CTgAATgAACTgCAggACgA (R) ATACTTTCTCggCAggAgCA	172 pb	54°C	35
<i>Leishmania sp.</i>	(F) gTgggggAggggCgTTCT-3' (R) ATTTTCCACCAACCCCAgTT	120 pb	56°C	35
GAPDH	(F) CTCATgACCACAgTCCATgC (R) CACATTgggggTAggACCAC	201pb	54° C	35

12. Referencias

1. The Center for Disease Control, "Parasites and health: leishmaniasis," 2008, <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leshmaniasis.htm>
2. Boletín Epidemiológico de la Organización Panamericana de la Salud. *Leishmania* Cutánea.2002.23(3)
<http://www.paho.org/spanish/sha/bsindexs.htm>
3. ARIAS J., BELTRAN F., Desjeux P., Walton B. 1996. Epidemiología y control de la Leishmaniasis en las Américas, por país o Territorio .Organización Panamericana de la Salud.
<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/epi-y-control.pdf>
4. ABBAS, A.K.2003.Cellular and molecular immunology.Saunders:562
5. AKOPYANTS, N. S., KIMBLIN, N., SECUNDINO, N., PATRICK, R., PETERS, N., LAWYER, P., DOBSON, D. E., BEVERLEY, S. M. & SACKS, D. L. 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 324, 265-8.
6. ALEXANDER, J., A.R. SATOSKAR, and D.G. RUSSELL, *Leishmania species: models of intracellular parasitism*. J Cell Sci, 1999. 112 Pt 18: p. 2993-3002.
7. AWASTHI, A., MATHUR, R. K. & SAHA, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119, 238-58.
8. AFZALI, B., LOMBARDI, G., LECHLER, R. I. & LORD, G. M. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol*, 148, 32-46.
9. BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J. L., ZERNECKE, A., KOENEN, R. R., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S. R., BUCALA, R., HICKEY, M. J. & WEBER, C. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*, 13, 587-96.
10. BIEDERMANN, T., ZIMMERMANN, S., HIMMELRICH, H., GUMY, A., EGETER, O., SAKRAUSKI, A. K., SEEGMULLER, I., VOIGT, H., LAUNOIS, P., LEVINE, A. D., WAGNER, H., HEEG, K., LOUIS, J. A. & ROCKEN, M. 2001. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol*, 2, 1054-60.
11. BOGDAN, C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2, 907-16.
12. CALANDRA, T. & ROGER, T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 791-800.

13. CALANDRA, T., SPIEGEL, L. A., METZ, C. N. & BUCALA, R. 1998. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11383-8.
14. DAVID, J.R. 1966. Delayed hypersensitivity *in vitro*: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56: 72-77.
15. DELVES, P. J. & ROITT, I. M. 2000. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, 343, 108-17.
16. DESJEUX, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-18.
17. DONNELLY, S. C., HASLETT, C., REID, P. T., GRANT, I. S., WALLACE, W. A., METZ, C. N., BRUCE, L. J. & BUCALA, R. 1997. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, 3, 320-3.
18. FLORES, M., SAAVEDRA, R., BAUTISTA, R., VIEDMA, R., TENORIO, E. P., LENG, L., SANCHEZ, Y., JUAREZ, I., SATOSKAR, A. A., SHENOY, A. S., TERRAZAS, L. I., BUCALA, R., BARBI, J., SATOSKAR, A. R. & RODRIGUEZ-SOSA, M. 2008. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J*, 22, 3661-71.
19. FRANK, D. A. 2009. STAT6 in PMBL: pathogenic or passenger? *Blood*, 114, 1133-4.
20. GREGORY, D. J. & OLIVIER, M. 2005. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology*, 130 Suppl, S27-35.
21. HANNA, E., TULADHAR, R., SATOSKAR, A. R. 2009. Cytokines and their STATs in Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol*, 2010, 294389.
22. IVENS, A. C., PEACOCK, C. S., WORTHEY, E. A., MURPHY, L., AGGARWAL, G., BERRIMAN, M., SISK, E., RAJANDREAM, M. A., ADLEM, E., AERT, R., ANUPAMA, A., APOSTOLOU, Z., ATTIPOE, P., BASON, N., BAUSER, C., BECK, A., BEVERLEY, S. M., BIANCHETTIN, G., BORZYM, K., BOTHE, G., BRUSCHI, C. V., COLLINS, M., CADAG, E., CIARLONI, L., CLAYTON, C., COULSON, R. M., CRONIN, A., CRUZ, A. K., DAVIES, R. M., DE GAUDENZI, J., DOBSON, D. E., DUESTERHOEFT, A., FAZELINA, G., FOSKER, N., FRASCH, A. C., FRASER, A., FUCHS, M., GABEL, C., GOBLE, A., GOFFEAU, A., HARRIS, D., HERTZ-FOWLER, C., HILBERT, H., HORN, D., HUANG, Y., KLAGES, S., KNIGHTS, A., KUBE, M., LARKE, N., LITVIN, L., LORD, A., LOUIE, T., MARRA, M., MASUY, D., MATTHEWS, K., MICHAELI, S., MOTTRAM, J. C., MULLER-AUER, S., MUNDEN, H., NELSON, S., NORBERTCZAK, H., OLIVER, K., O'NEIL, S., PENTONY, M., POHL, T. M., PRICE, C., PURNELLE, B., QUAIL, M. A., RABBINOWITSCH, E., REINHARDT, R., RIEGER, M., RINTA, J., ROBBEN, J., ROBERTSON, L., RUIZ, J. C., RUTTER, S., SAUNDERS, D., SCHAFFER, M., SCHEIN, J., SCHWARTZ, D. C., SEEGER, K., SEYLER, A., SHARP, S., SHIN, H., SIVAM, D., SQUARES, R., SQUARES, S., TOSATO, V., VOGT, C., VOLCKAERT, G., WAMBUTT, R., WARREN, T., WEDLER, H., WOODWARD, J., ZHOU, S., ZIMMERMANN, W., SMITH, D.

- F., BLACKWELL, J. M., STUART, K. D., BARRELL, B. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*, 309, 436-42.
23. JANEWAY, C.A. 2000. Immunobiology. MASSON:664
 24. JANEWAY, C.A., Medzhitov R. 2002. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science*. 226:298-300
 25. JUTTNER, S., BERNHAGEN, J., METZ, C. N., ROLLINGHOFF, M., BUCALA, R. & GESSNER, A. 1998. Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol*, 161, 2383-90.
 26. KIMURA, A. & KISHIMOTO, T. 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*, 40, 1830-5.
 27. KUDRIN, A., SCOTT, M., MARTIN, S., CHUNG, C. W., DONN, R., MCMASTER, A., ELLISON, S., RAY, D., RAY, K. & BINKS, M. 2006. Human macrophage migration inhibitory factor: a proven immunomodulatory cytokine? *J Biol Chem*, 281, 29641-51.
 28. KUPERMAN, D., SCHOFIELD, B., WILLS-KARP, M. & GRUSBY, M. J. 1998. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med*, 187, 939-48.
 29. LAIRD, P. W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RUDNICKI, M. A., JAENISCH, R. & BERNIS, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res*, 19, 4293.
 30. LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G. & SOLBACH, W. 2003. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11, 210-4.
 31. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
 32. LUE, H., KLEEMANN, R., CALANDRA, T., ROGER, T. & BERNHAGEN, J. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*, 4, 449-60.
 33. MARTINEY, J. A., SHERRY, B., METZ, C. N., ESPINOZA, M., FERRER, A. S., CALANDRA, T., BROXMEYER, H. E. & BUCALA, R. 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect Immun*, 68, 2259-67
 34. MCKEE, A. S. & PEARCE, E. J. 2004. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol*, 173, 1224-31.

35. MEDZHITOV, R. & JANEWAY, C. A., JR. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*, 9, 4-9.
36. MITCHELL, R. A., LIAO, H., CHESNEY, J., FINGERLE-ROWSON, G., BAUGH, J., DAVID, J. & BUCALA, R. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 345-50.
37. MORAND, E. F., LEECH, M., WEEDON, H., METZ, C., BUCALA, R. & SMITH, M. D. 2002. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology (Oxford)*, 41, 558-62.
38. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R. & Saravia, N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 336: 1561-1577
39. NISHIHARA, J., ISHIBASHI, T., FUKUSHIMA, T., SUN, B., SATO, Y. & TODO, S. 2003. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 995, 171-82.
40. NOBEN-TRAUTH, N., KROPF, P. & MULLER, I. 1996. Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science*, 271, 987-90.
41. PELLEGRINI, S. & DUSANTER-FOURT, I. 1997. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem*, 248, 615-33.
42. PETERS, N. & SACKS, D. 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev*, 213, 159-79.
43. REYES, J. L., TERRAZAS, L. I., ESPINOZA, B., CRUZ-ROBLES, D., SOTO, V., RIVERA-MONTOYA, I., GOMEZ-GARCIA, L., SNIDER, H., SATOSKAR, A. R. & RODRIGUEZ-SOSA, M. 2006. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, 74, 3170-9.
44. RODRIGUEZ-SOSA, M., DAVID, J. R., BOJALIL, R., SATOSKAR, A. R. & TERRAZAS, L. I. 2002. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol*, 168, 3135-9.
45. RODRIGUEZ-SOSA, M., MONTEFORTE, G. M. & SATOSKAR, A. R. 2001. Susceptibility to *Leishmania mexicana* infection is due to the inability to produce IL-12 rather than lack of IL-12 responsiveness. *Immunol Cell Biol*, 79, 320-2.
46. RODRIGUEZ-SOSA, M., ROSAS, L. E., DAVID, J. R., BOJALIL, R., SATOSKAR, A. R. & TERRAZAS, L. I. 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun*, 71, 1247-54.

47. ROGERS, K. A., DEKREY, G. K., MBOW, M. L., GILLESPIE, R. D., BRODSKYN, C. I. & TITUS, R. G. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett*, 209, 1-7.
48. ROSAS, L. E., KEISER, T., BARBI, J., SATOSKAR, A. A., SEPTER, A., KACZMAREK, J., LEZAMA-DAVILA, C. M. & SATOSKAR, A. R. 2005. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. *Int Immunol*, 17, 1347-57.
49. SACKS, D. & NOBEN-TRAUTH, N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*, 2, 845-58.
50. SACKS, D. & SHER, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol*, 3, 1041-7.
51. SATOSKAR, A. R., BOZZA, M., RODRIGUEZ SOSA, M., LIN, G. & DAVID, J. R. 2001. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun*, 69, 906-11.
52. SCHWARTZ, V., LUE, H., KRAEMER, S., KORBIEL, J., KROHN, R., OHL, K., BUCALA, R., WEBER, C. & BERNHAGEN, J. 2009. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett*, 583, 2749-57.
53. SCHEDEL, M., FREI, R., BIELI, C., CAMERON, L., ADAMSKI, J., LAUENER, R. & KABESCH, M. 2009. An IgE-associated polymorphism in STAT6 alters NF-kappaB binding, STAT6 promoter activity, and mRNA expression. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 583-9, 589 e1-6
54. SCHINDLER, C. W. 2002. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest*, 109, 1133-7.
55. SCHINDLER, U., WU, P., ROTHE, M., BRASSEUR, M. & MCKNIGHT, S. L. 1995. Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity. *Immunity*, 2, 689-97.
56. SHARMA, U. & SINGH, S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45, 255-72.
57. SNIDER, H., LEZAMA-DAVILA, C., ALEXANDER, J. & SATOSKAR, A. R. 2009. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. *Neuroimmunomodulation*, 16, 106-13.
58. STAMM, L. M., RAISANEN-SOKOLOWSKI, A., OKANO, M., RUSSELL, M. E., DAVID, J. R. & SATOSKAR, A. R. 1998. Mice with STAT6-targeted gene disruption develop a Th1 response and control cutaneous leishmaniasis. *J Immunol*, 161, 6180-8.
59. TARLETON, R. L., GRUSBY, M. J. & ZHANG, L. 2000. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 165, 1520-5.

60. TERRAZAS, C. A., JUAREZ, I., TERRAZAS, L. I., SAAVEDRA, R., CALLEJA, E. A. & RODRIGUEZ- SOSA, M. 2010. Toxoplasma gondii: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. *Exp Parasitol*, 126, 348-58.
61. THAWANI, N., TAM, M. & STEVENSON, M. M. 2009. STAT6-mediated suppression of erythropoiesis in an experimental model of malarial anemia. *Haematologica*, 94, 195-204.
62. TRIPATHI, P., SINGH, V. & NAIK, S. 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51, 229-42.
63. WURSTER, A. L., TANAKA, T. & GRUSBY, M. J. 2000. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene*, 19, 2577-84.
64. VON STEBUT, E. 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*, 17, 115-22.
65. WEAVER, C. T., HARRINGTON, L. E., MANGAN, P. R., GAVRIELI, M. & MURPHY, K. M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24, 677-88.
66. WILHELM, P., RITTER, U., LABBOW, S., DONHAUSER, N., ROLLINGHOFF, M., BOGDAN, C. & KORNER, H. 2001. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *J Immunol*, 166, 4012-9.