



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS CARGADAS CON EL
PÉPTIDO GK1 Y UN LISADO DE
PROMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*
EN LA INFECCIÓN DE RATONES BALB/c
POR ESTE PARÁSITO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FABIÁN EDUARDO GRAJALES
MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno:

Grajales
Martínez
Fabián Eduardo
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
4100333360

2. Datos del tutor:

Dra.
Laila
Gutiérrez
Kobeh

3. Datos del sinodal 1:

Biól.
Arturo Alfredo
Wilkins
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2:

Dra.
Gabriela
Piñón
Zárate

5. Datos del sinodal 3:

M. en C.
Alma Reyna
Escalona
Montaño

6. Datos del sinodal 4:

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

7. Datos del trabajo escrito:

Análisis del efecto de células dendríticas cargadas con el péptido GK1 y un lisado de promastigotes de *Leishmania mexicana* en la infección de ratones BALB/c por este parásito.
72 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh por su valiosa asesoría, apoyo, consejos, lecciones sobre inmunología y experimentación científica, así como por las correcciones a esta tesis. Especialmente le agradezco por guiar pacientemente mi curiosidad científica y por su amable disposición a apoyar mis propuestas e ideas para el proyecto.

Al Biól. Arturo Alfredo Wilkins Rodríguez por enseñarme las técnicas de cultivo, manejo de animales, inmunohistoquímica y diseño experimental, por proporcionarme el material que requerí para la realización de este proyecto, por su amistad y todas sus enseñanzas en el ámbito académico y personal.

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por haberme permitido realizar este proyecto de tesis en las instalaciones a su cargo (Laboratorio de Inmunoparasitología, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, UNAM).

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de tesis (proyecto no. 217913).

A los miembros del jurado de examen profesional: Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, Biól. Arturo Alfredo Wilkins Rodríguez, Dra. Gabriela Piñón Zárate, M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña y Dr. Luis Felipe Jiménez García por la amable disposición a formar parte del jurado y por las correcciones a esta tesis.

A la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde y al Dr. René Segura Velázquez del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), así como a la Dra. Gabriela Piñón Zárate del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Fac. de Medicina (UNAM) por su amable disposición a proporcionarme el péptido GK1 empleado para este proyecto.

A la M. C. Adriana Ruiz Remigio por enseñarme la técnica de Elisa y proporcionarme los reactivos requeridos.

Al M. V. Z. Daniel Andrés Sánchez Almaraz y al Biól. Guillermo Alberto Ramos Blancas del Bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental por las facilidades otorgadas para la disposición y cuidado de los animales de laboratorio empleados para este proyecto.

A la Dra. Edith Fernández Figueroa por ayudarme a tomar las microfotografías de las preparaciones histológicas observadas al microscopio, así como por su amistad y apoyo siempre que lo necesité.

Al Dr. Julio Morán Andrade por las facilidades otorgadas para la realización de los cortes histológicos empleados para este proyecto.

Al M. en C. Augusto José González Canto del Laboratorio de Patología, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM por su amable disposición a permitirnos el uso del citómetro para la caracterización de las células.

Al Biól. Jorge Rodríguez González por su ayuda en el uso del citómetro, así como por su amistad y apoyo cuando lo necesité.

A la M. en C. Alma Reyna Escalona Montaña y a la Dra. Ma. Berenice Martínez Salazar por su valiosa amistad, consejos y ayuda cada vez que la necesité.

A mi amada familia por su cariño y apoyo, especialmente a mi tíos: Candelaria Mtz., Alberto Mtz. e Isabel Lara, así como a mis primos Alberto E. y Ma. del Carmen Mtz. por el apoyo que me brindaron durante la carrera.

A mi gran amigo Daniel García Villalobos por su amistad, apoyo y enseñanzas, así como a todos los valiosos amigos que hice en el lab. durante la realización de este proyecto y en la facultad durante la carrera, que son tantos que no alcanzaría a nombrarlos a todos.

DEDICATORIA

A mi mamá Juanita

Por su gran amor

Por confiar y creer en mí

Por su valioso apoyo siempre

MUCHÍSIMAS GRACIAS, este logro también es tuyo

A mi papá Joel

Por darme la vida y

Por su valiosa ayuda

G R A C I A S

A Daniel

Por su cariño

Por su compañía

Por su apoyo incondicional

G R A C I A S

ÍNDICE

Página

Índice de figuras y tablas	7
Abreviaturas	9
1. Introducción	12
1.1 <i>Leishmania</i>	12
1.1.1 Taxonomía	12
1.1.2 Morfología	13
1.1.2.1 El promastigote	13
1.1.2.2 El amastigote	13
1.1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	15
1.2 Leishmaniasis	17
1.2.1 Cuadros clínicos de la leishmaniasis	17
1.2.1.1 Leishmaniasis cutánea (LC)	17
1.2.1.1.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	18
1.2.1.1.2 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)	18
1.2.1.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	18
1.2.1.3 Leishmaniasis visceral (LV)	19
1.2.2 Epidemiología de la leishmaniasis en el mundo	20
1.2.3 Epidemiología de la leishmaniasis en México	21
1.3 Células dendríticas (DCs)	22
1.3.1 Origen de las células dendríticas murinas	22
1.3.2 Maduración de las células dendríticas	23
1.3.3 Presentación antigénica de las células dendríticas a los linfocitos T	24
1.3.4 Clasificación de las células dendríticas murinas	25
1.3.4.1 Células dendríticas convencionales o clásicas (cDCs) y células dendríticas migratorias (mDCs)	26
1.3.4.1.1 Células dendríticas CD8 α ⁺ y células dendríticas CD103 ⁺ (DCs CD8 α ⁺ y DCs CD103 ⁺)	26
1.3.4.1.2 Células dendríticas CD11b ⁺ (DCs CD11b ⁺)	27
1.3.4.2 Células dendríticas plasmacitoides (pDCs)	28
1.3.4.3 Células de Langerhans (LCs)	28
1.3.4.4 Células dendríticas inflamatorias (iDCs)	28
1.3.5 Empleo de las células dendríticas en la inmunoterapia contra algunas	29

5.15 Cuantificación de la carga parasitaria en las lesiones de los ratones infectados mediante el conteo de amastigotes en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina	43
5.16 Determinación de IL-12 en cortes histológicos de ganglios poplíteos de los ratones infectados mediante inmunohistoquímica	44
5.17 Análisis estadístico de los resultados	45
6. Resultados	45
6.1 Caracterización de las BMDCs mediante citometría de flujo	45
6.2 Cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de las BMDCs estimuladas	47
6.3 Seguimiento del tamaño de las lesiones de los ratones tratados con las BMDCs estimuladas e infectados con <i>L. mexicana</i>	51
6.4 Cuantificación de la carga parasitaria en las lesiones de los ratones infectados mediante el conteo de amastigotes en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina	56
6.5 Producción de IL-12 en los ganglios poplíteos de los ratones infectados	58
7. Discusión	60
8. Conclusiones	66
9. Referencias bibliográficas	66
10. Referencias de las imágenes	72

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica del parásito <i>Leishmania</i>	14
Figura 1. Morfología del promastigote de <i>Leishmania</i> (a) Microfotografía electrónica de barrido. (b) Esquema del promastigote	15
Figura 2. Morfología del amastigote de <i>Leishmania</i> (a) Microfotografía electrónica de barrido (b) Esquema del amastigote	15
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	17

Figura 4. Cuadros clínicos de la leishmaniasis (a) Leishmaniasis cutánea localizada (b) Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada (c) Leishmaniasis mucocutánea (d) Leishmaniasis visceral	20
Figura 5. Distribución geográfica de la leishmaniasis en el mundo	21
Figura 6. Inmunoterapia ex vivo con células dendríticas exógenas estimuladas in vitro	31
Figura 7. Caracterización de las BMDCs mediante citometría de flujo	46
Figura 8. Producción de TNF- α por las BMDCs estimuladas con GK1 y lisado de promastigotes	47
Figura 9. Producción de IFN- γ por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y lisado de promastigotes	48
Figura 10. Producción de IL-12p40 por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y lisado de promastigotes	49
Figura 11. Producción de IL-12p70 por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y lisado de promastigotes	50
Figura 12. Desarrollo de la infección por <i>L. mexicana</i> en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar	52
Figura 13. Desarrollo de la infección por <i>L. mexicana</i> en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar	53
Figura 14. Desarrollo de la infección por <i>L. mexicana</i> en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar	54
Figura 15. Tamaño final de las lesiones de los ratones a las 10 semanas posteriores a la infección con los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	55
Figura 16. Fotomicrografía de los cortes histológicos de las lesiones teñidos con HE (400X)	56
Figura 17. Número total de amastigotes presentes en un área de 1 mm ² de tejido de las lesiones de los ratones	58
Figura 18. Inmunohistoquímica anti IL-12 en ganglios poplíteos de los ratones infectados	59

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ad	Adyuvante
Ag	Antígeno
B220	Isoforma de 200 kDa del antígeno común leucocitario CD45
BAFT3	Factor de transcripción activador 3
BMDCs	Células dendríticas derivadas a partir de precursores presentes en la médula ósea de ratón
BSA	Albúmina de suero bovino
BST2 (CD317)	Antígeno 2 de las células del estroma de la médula ósea
BTLA (CD272)	Proteína atenuadora de linfocitos B y T
C-kit (CD117)	Receptor del ligando C-kit
CCL19 (MIP-3β)	Quimiocina 19 (Proteína proinflamatoria de macrófagos 3 beta)
CCL21 (SLC)	Quimiocina 21 (Quimiocina de tejido linfoide secundario)
CD1 (ITGAE)	Molécula no clásica para la presentación de antígenos lipídicos
CD103	Integrina $\alpha\text{E}\beta\text{7}$
CD115 (CSF-1R)	Receptor del factor estimulador de colonias
CD11b (ITGAM)	Cadena alfa del receptor para complemento tipo 3
CD11c (ITGAX)	Cadena alfa del receptor para complemento tipo 4
CD135 (FLT3)	Receptor para el ligando FLT3L
CD14	Receptor para el complejo de lipopolisacárido y proteína de unión al lipopolisacárido
CD154 (CD40L)	Ligando del receptor CD40
CD16 (FcyR IIIb)	Receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas G
CD209 (DC-SIGN)	Molécula de adhesión intercelular de tipo no integrina específica de células dendríticas
CD28	Receptor de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86
CD32 (FcyR II)	Receptor de baja afinidad para el fragmento Fc del complejo inmune de las inmunoglobulinas G
CD4	Correceptor para moléculas de tipo MHC-II
CD40 (TNFRSF5)	Receptor de la molécula coestimuladora CD154
CD43 (SPN)	Eucosialina o sialoforina (proteína transmembranal)
CD45RA	Isoforma A del antígeno común leucocitario
CD64 (FcyR1)	Receptor de alta afinidad para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas G
CD69 (AIM)	Antígeno de activación temprana de linfocitos T
CD8	Correceptor de moléculas tipo MHC-I
CD80 (B7-1)	Molécula coestimuladora, ligando de CD28 y CTLA-4
CD86 (B7-2)	Molécula coestimuladora, ligando de CD28 y CTLA-4
cDCs	Células dendríticas convencionales o clásicas
CDP	Precursor común de células dendríticas
CLRs	Receptores de lectina tipo C
cMoP	Precursor común de monocitos
CRs	Receptores de complemento
CTLA-4 (CD152)	Receptor de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (regulador negativo de la activación de los linfocitos T)
CX3CR1	Receptor para la quimiocina CX3CL1 o fractalquina
DC-ASPGR (CD301, CLEC10A)	Receptor de lectina tipo C (Miembro A de la familia 10)

DCIR (CLEC4A)	Receptor de lectina tipo C (Miembro A de la familia 4)
DCs	Células dendríticas
Dectin-1 (CLEC7A)	Receptor de lectina tipo C (Miembro A de la familia 7)
DNGR-1 (CD370, CLEC9A)	Receptor de lectina tipo C para necrosis celular (Miembro A de la familia 9)
DPBS	Buffer Dulbecco salino de fosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Epcam	Molécula de adhesión de células epiteliales
F4/80	Receptor 1 de la hormona tipo mucina con módulo de tipo factor de crecimiento epidérmico
FcRs	Receptores para los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas
FcεR1	Receptor de alta afinidad para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas E
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT3L	Ligando del receptor CD135 (FLT3)
GM-CSF	Factor estimulador para la formación de colonias de granulocitos y macrófagos
HE	Hematoxilina-eosina (tinción)
ID2	Factor 2 inhibidor de transcripción o unión al DNA
iDCs	Células dendríticas inflamatorias
IFN-γ	Interferón gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-12p40	Interleucina 12, subunidad p40
IL-12p70	Interleucina 12, subunidad p70
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-22	Interleucina 22
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7Rα	Cadena alfa del receptor para interleucina 7
INDRE	Instituto nacional de diagnóstico y referencia epidemiológicos
iNOS	Sintasa inducible de óxido nítrico
IRF4	Factor 4 regulador del interferón
IRF8	Factor 8 regulador del interferón
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LCP	Precursor común linfoide
LCs	Células de Langerhans
Lin	Marcador de linaje
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LtβR	Receptor para linfotoxina β
LV	Leishmaniasis visceral
Ly6C	Complejo 6 del antígeno de linfocitos
MCP-1 (CCL2)	Proteína quimiotáctica de monocitos
mDCs	Células dendríticas migratorias
MDP	Precursor de macrófagos y células dendríticas
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I

MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
ml	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
NLRs	Receptores tipo Nod
NLs	Nódulos linfáticos
nm	Nanómetro (s)
Notch2	Factor de transcripción 2 homólogo al locus neurogénico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pDCs	Células dendríticas plasmacitoides
PE	Ficoeritrina
pre-DC	Precursor de células dendríticas convencionales y migratorias
pre-pDCs	Precursor de células dendríticas plasmacitoides
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
R-10	Medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina, L-glutamina y 2-mercaptoetanol.
RelB (I-Rel)	Factor de transcripción homólogo B del oncogén viral de la reticuloendoteliosis aviar
RPMI	Medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute"
RUNX3	Factor 3 de transcripción tipo runt
SCA-1 (Ly6-A/E)	Antígeno 1 de células troncales
SFB	Suero fetal bovino
Siglec-H (CD169)	Lectina H de tipo inmunoglobulina para unión del ácido siálico
SIRP-α (CD172a)	Proteína de señal reguladora alfa
syn	Sinónimo
TBS	Tris buffer salino
TBST	Tris buffer salino con tween 20
TCR	Receptor del linfocito T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TipDCs	Células dendríticas productoras de TNF- α e iNOs
TLR7	Receptor tipo Toll 7
TLR9 (CD289)	Receptor tipo Toll 9
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
WHO	Organización mundial de la salud (World Health Organization)
XCR1	Receptor de linfotactina 1 (XCL1) y 2 (XCL2)
Zbtb46 (BTBD4)	Factor 46 de transcripción con dedo de Zinc y dominio BT
μg	Microgramo (s)
μl	Microlitro (s)
μm	Micrómetro (s)
μM	Micromolar
Alt	Nivel alto de expresión del marcador en la célula
Int	Nivel intermedio de expresión del marcador en la célula
Baj	Nivel bajo de expresión del marcador en la célula
\times g	Veces la fuerza de la gravedad

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Leishmania*

Leishmania es el género de un grupo de diferentes especies de protozoarios parásitos dimórficos, perteneciente a la clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae, causante de la leishmaniasis. Se han descrito 35 especies de *Leishmania*, de las cuales aproximadamente 20 son responsables de la leishmaniasis en humanos (Fraga et al., 2013). Este parásito es transmitido por la picadura de las “moscas de la arena” o flebótomos, dípteros hematófagos pertenecientes a los géneros *Lutzomyia* (en América) y *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África), de los cuales aproximadamente 50 de las 1000 especies que existen son vectores de la leishmaniasis (Mansueto et al., 2014). *Leishmania* presenta un ciclo de vida digenético, alternando entre una fase móvil y extracelular denominada promastigote que se desarrolla en el mosquito vector y una fase inmóvil e intracelular denominada amastigote que se desarrolla en hospederos mamíferos, incluido el hombre.

1.1.1 Taxonomía

Una de las características taxonómicas más importantes que presenta *Leishmania* es el cinetoplasto, estructura mitocondrial especializada que contiene ADN no nuclear, el cual agrupa al género *Leishmania* en la familia Trypanosomatidae. Otra característica de *Leishmania* es la presencia de un solo flagelo en posición anterior durante su estadio extracelular, el cual se reabsorbe reduciéndose a un axonema intracitoplásmico cuando el parásito se encuentra en la forma intracelular.

En la actualidad el género *Leishmania* se divide en 3 subgéneros de acuerdo a la posición en el intestino del vector: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Schönian et al., 2010). El subgénero *Leishmania* posee un desarrollo de tipo suprapilórico, en el que la multiplicación del parásito se da en la porción media del intestino del vector, seguida por una migración a la probóscide para la transmisión al hospedero mamífero. El desarrollo del subgénero *Viannia* es de tipo peripilórico, con una multiplicación en la porción posterior del intestino y una migración posterior hacia a la parte anterior y a la probóscide. Ambos subgéneros agrupan a las especies de importancia médica que parasitan al humano y a otros mamíferos. En cambio, el subgénero *Sauroleishmania* incluye sólo a las especies que parasitan a reptiles. El desarrollo de este subgénero es de tipo hipopilórico, en el cual la multiplicación del parásito se da en la porción posterior del intestino, siendo el parásito transmitido por la deposición de heces

fecales infestadas (Wilkins, 2010; Schönian G et al., 2010).

Debido a que resulta difícil distinguir morfológicamente las diferentes especies de *Leishmania*, se han empleado, entre otros, los siguientes criterios para su clasificación taxonómica:

- a) biológicos: morfología y cultivo del parásito, tipo de desarrollo del parásito en el flebótomo vector, procedencia y manifestaciones clínicas de los sujetos infectados.
- b) bioquímicos: electroforesis de isoenzimas.
- c) moleculares: análisis del ADN del núcleo y del cinetoplasto.
- d) inmunológicos: reactividad del parásito con anticuerpos monoclonales (Sánchez et al., 2004).

1. 1. 2 Morfología

El parásito *Leishmania* posee dos fases en el ciclo de vida: promastigote y amastigote, las cuales se desarrollan en organismos diferentes.

1. 1. 2. 1 El promastigote

El promastigote (fig. 1) es la fase alargada y extracelular del parásito que se desarrolla dentro del tracto digestivo del mosquito vector. Mide de 10-14 por 1.5-3.5 μm y posee un núcleo localizado en posición central, además de un cinetoplasto cercano a la parte anterior del mismo. Posee un flagelo en posición anterior que le confiere movilidad, el cual emerge de una bolsa flagelar situada delante del cinetoplasto (Besteiro et al., 2007).

1. 1. 2. 2 El amastigote

El amastigote (fig. 2) es la fase intracelular del parásito que se desarrolla dentro de las células fagocíticas del hospedero, tales como células dendríticas y macrófagos, en las que se encuentran en vesículas. El amastigote mide de 2.5-5.0 μm por 1.5-2.0 μm dependiendo de la especie y posee un núcleo excéntrico, además de un cinetoplasto en posición tangencial al núcleo. A diferencia del promastigote, el amastigote carece de movilidad, ya que el flagelo es muy corto y se encuentra contenido en la bolsa flagelar, por lo cual no es apreciable al microscopio óptico (Besteiro et al., 2007).

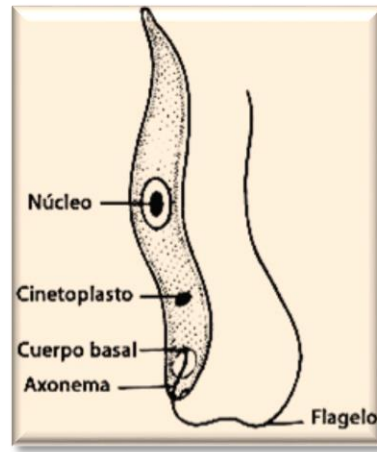
Tabla 1. Clasificación taxonómica del parásito *Leishmania*, basada en características bioquímicas, moleculares y biológicas, incluyendo la forma clínica causada en el humano (Wilkins, 2010; OMS, 2012).

Reino	Protista (Haeckel, 1866)							
Subreino	Protozoa (Goldfuss, 1817)							
Phylum	Sarcomastigophora (Honigberg-Balamuth, 1963)							
Subphylum	Mastigophora (Deising, 1866)							
Clase	Zoomastigophorea (Calkins, 1909)							
Orden	Kinetoplastida (Honigberg, 1963)							
Suborden	Trypanosomatina (Kent, 1880)							
Familia	Trypanosomatidae (Doflein, 1901)							
Género	<i>Leishmania</i> (Ross, 1903)							
Subgénero (Desarrollo en el vector)	<i>Leishmania</i> (Peripilórico)				<i>Viannia</i> (Suprapilórico)		<i>Sauroleishmania</i> (Hipopilórico)	
Complejo	<i>L.(L.) donovani</i>	<i>L.(L.) tropica</i>	<i>L.(L.) major</i>	<i>L.(L.) aethiopica</i>	<i>L.(L.) mexicana</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>	<i>L.(S.) tarentolae</i>
Especies	<i>L.(L.) donovani</i>	<i>L.(L.) tropica</i>	<i>L.(L.) major</i>	<i>L.(L.) aethiopica</i>	<i>L.(L.) mexicana</i> (syn <i>L. pifanoi</i>)	<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>L.(V.) guyanensis</i>	<i>L.(S.) tarentolae</i>
	<i>L.(L.) chagasi</i> (syn <i>L. infantum</i>)	<i>L.(L.) killicki</i>			<i>L.(L.) amazonensis</i> (syn <i>L. garnhami</i>)	<i>L.(V.) peruviana</i>	<i>L.(V.) panamensis</i>	<i>L.(S.) gymnodactyli</i>
					<i>L.(L.) venezuelensis</i>			
Hospedero	Mamíferos, incluido el humano							Reptiles
Forma clínica	LV, LCL	LCL, LCD	LCL	LCL, LMC, LCD	LCL, LCD	LCL, LMC		No patogénica para el humano

LCL, leishmaniasis cutánea localizada; LMC, leishmaniasis mucocutánea; LCD, leishmaniasis cutánea difusa o diseminada; LV, leishmaniasis visceral.

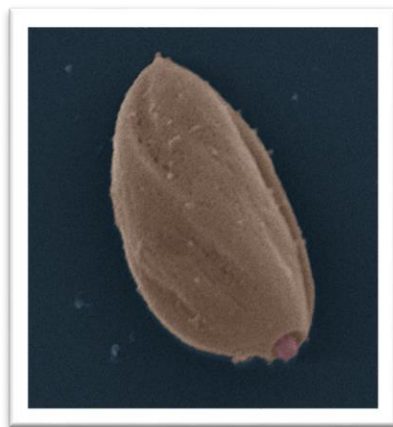


a)

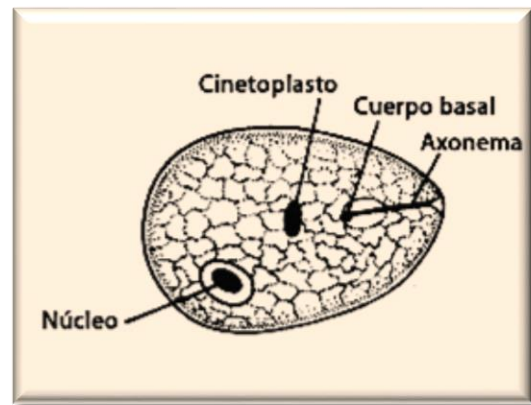


b)

Figura 1. Morfología del promastigote de *Leishmania*. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido. (b) Esquema del promastigote (Wikipedia, 2010; Yourarticlelibrary, s.f.).



a)



b)

Figura 2. Morfología del amastigote de *Leishmania*. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido. (b) Esquema del amastigote (Wikipedia, 2010; Yourarticlelibrary, s.f.).

1. 1. 3 Ciclo de vida de *Leishmania*

La mosca transmisora de *Leishmania* es hematófaga debido a que requiere sangre para el desarrollo de los huevos. El ciclo inicia cuando la mosca adquiere al parásito en la forma de amastigote al alimentarse de un mamífero infectado. Al alimentarse, la mosca inserta en la piel las partes bucales en forma de sierra, la corta y forma una pequeña herida de la cual succiona la sangre que brota de los capilares dañados y que se encuentra combinada con células infectadas o con amastigotes libres. En las siguientes 24 a 48 horas, los amastigotes se transforman a

promastigotes procíclicos (forma flagelada con una alta tasa de multiplicación) dentro del tracto digestivo de la mosca. Después se duplican activamente por fisión binaria longitudinal y se adhieren al intestino de la mosca mediante un glicolípido denominado lipofosfoglicano (LPG). Esta molécula se encuentra en la superficie del parásito e interactúa con una galectina que reviste el epitelio del tracto digestivo del vector (Kamhawi, 2006). A continuación, los promastigotes procíclicos se transforman en promastigotes metacíclicos (forma flagelada carente de división celular), en los que el LPG sufre modificaciones en el número de moléculas y composición, lo que permite que el parásito se desprenda del epitelio intestinal y migre hacia el esófago, faringe y probóscide de la mosca. Cuando la mosca pica nuevamente para alimentarse, ésta regurgita al parásito y transmite de 10 a 100 promastigotes metacíclicos al hospedero mamífero (Hall, 1995; Oliveira et al, 2013).

Dentro del hospedero vertebrado, los promastigotes metacíclicos permanecen brevemente en el espacio intercelular y activan al complemento por la vía clásica y alternativa, lo que aunado al daño de la picadura de la mosca, provoca el reclutamiento de los leucocitos al sitio de infección. De esta forma, los promastigotes se opsonizan y son capturados por los neutrófilos, en los cuales el parásito reside transitoriamente y posteriormente es fagocitado por las células hospederas principales de *Leishmania*: los macrófagos y las células dendríticas (Moradin y Descoteaux, 2012). Mientras el 90% de los promastigotes logran ser destruidos por el sistema del complemento, los parásitos que sobreviven inician su transformación a amastigotes dentro del ambiente ácido del fagolisosoma de la célula hospedera. Posteriormente, los amastigotes se dividen activamente por fisión binaria y aumentan en números de hasta 200 amastigotes, ocasionando la lisis de la célula. Los amastigotes liberados por la lisis infectan a las células vecinas y el ciclo se cierra cuando una nueva mosca pica al hospedero vertebrado infectado (Liu y Uzonna, 2012).

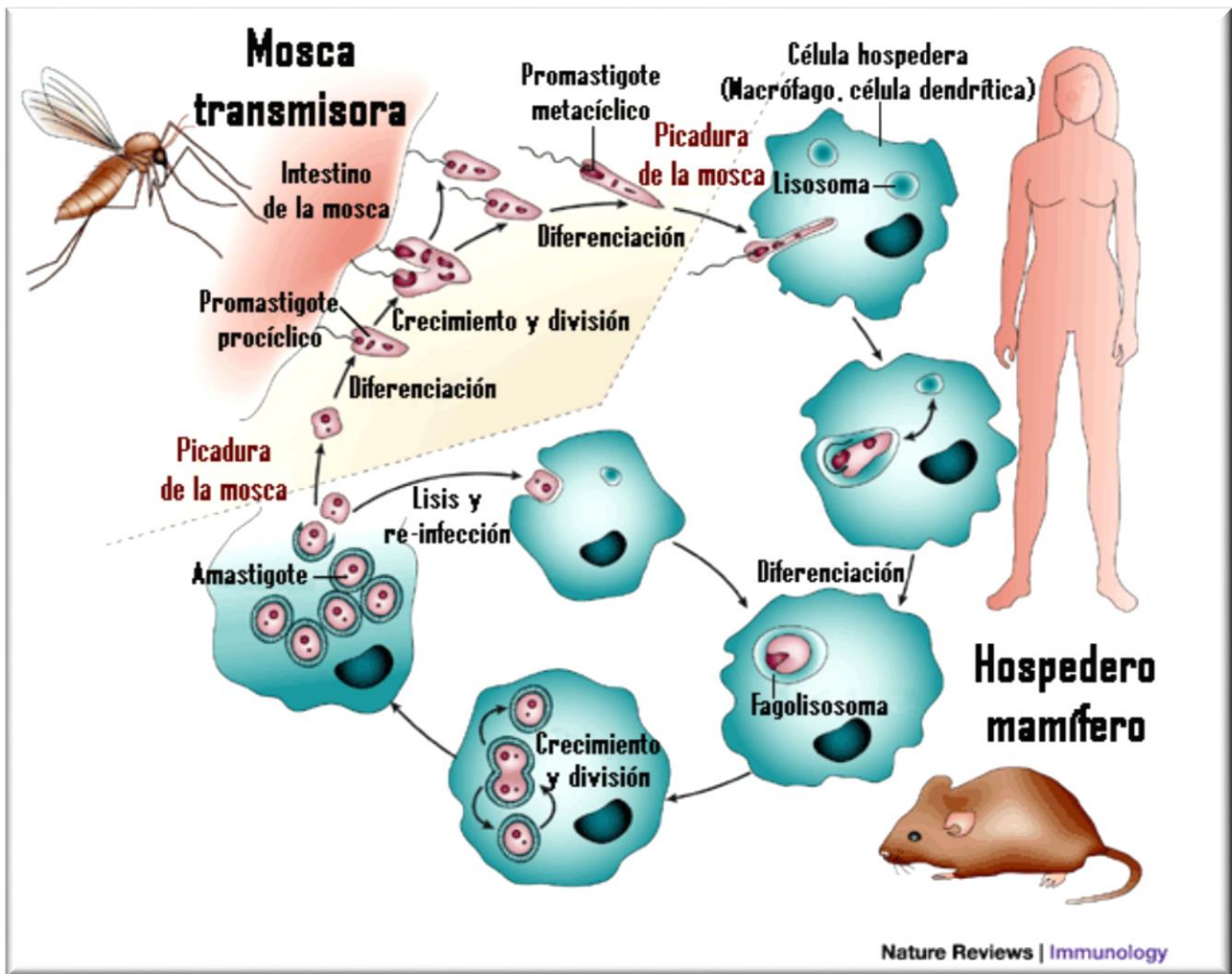


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* (modificado de Sacks y Noben-Trauth, 2002).

1.2 Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por *Leishmania*.

1.2.1 Cuadros clínicos de la leishmaniasis

La leishmaniasis presenta un rango de diferentes manifestaciones clínicas (fig. 4) dependiendo de la especie del parásito infectante y de la respuesta inmune del hospedero, pudiendo presentarse tres posibles cuadros clínicos: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV).

1.2.1.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

La LC es la manifestación más común de la enfermedad y puede presentarse en dos variantes principales: leishmaniasis cutánea localizada (LCV) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

1. 2. 1. 1. 1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

La LCL consiste en una úlcera que se forma en el lugar de la picadura de la mosca, siendo generalmente un área expuesta tal como la cara, los brazos o las piernas. Posteriormente a la picadura, se forma una pápula eritematosa frecuentemente prurítica y de crecimiento gradual, la cual progresa a un nódulo y posteriormente a una úlcera en un periodo de 1 a 3 meses. Se pueden presentar una o varias úlceras, dependiendo del número de veces que el individuo fue picado, las cuales son indoloras a menos que haya una fuerte infección bacteriana. Las lesiones en los individuos con LCL generalmente se curan espontáneamente en pocos meses o en un año, quedando con cicatrices permanentes. Sin embargo, cuando la lesión es en la oreja, las úlceras se vuelven crónicas y mutilantes.

La LCL es causada en América por las especies del complejo de *L. (L.) mexicana* y *L. (V.) braziliensis* y en Asia y África por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* y *L. (L.) aethiopica*. En México, la especie causante de la LCL es *L. (L.) mexicana* y en el 40 % de los casos la lesión se desarrolla en la oreja, condición denominada úlcera del chiclero (Mansueto et al., 2014).

1. 2. 1. 1. 2 Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD)

La LCD es la forma menos frecuente de la LC y en ésta el parásito se disemina a través del líquido tisular, la linfa o raramente por vía sanguínea, extendiéndose por casi todo el tegumento del paciente. Como consecuencia, surge un infiltrado difuso del tejido subcutáneo, en el cual se forma un gran número de nódulos, pápulas y placas de infiltración, los cuales raramente llegan a ulcerarse. En los casos más avanzados de la enfermedad, las lesiones se diseminan rápidamente cubriendo gran parte del cuerpo, especialmente las extremidades. Las lesiones de la piel llegan a persistir por meses o incluso años.

Esta forma clínica es ocasionada en África por *L. (L.) aethiopica* y en América por *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis*. En México la LCD es causada, al igual que la LCL, por *L. (L.) mexicana* y la virulencia de esta especie parece ser mayor que la de otras especies causantes de este cuadro clínico (Mansueto et al., 2014).

1. 2. 1. 2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La LMC también es conocida como espundia y generalmente ocurre como una diseminación del parásito hacia la nariz o boca, incluyendo la lengua. Las lesiones de la LMC pueden aparecer de forma simultánea a un episodio de LC o incluso años después de que el paciente se ha curado

de ésta. Los signos iniciales de la LMC son estornudos frecuentes, eritema y ulceraciones en las narinas, las cuales no sanan espontáneamente. Posteriormente, las ulceraciones invaden la nariz, la boca, la faringe y la laringe, provocando destrucción del tabique nasal y desfiguramiento, el cual a su vez provoca estigma social. Sin tratamiento, pueden comprometerse las vías aéreas, dificultando la respiración por la nariz, sufriendo sangrados ocasionales, así como ronquera y disfonía, que son manifestaciones de daño en la laringe y en las cuerdas vocales. La LMC es recurrente incluso después de que el paciente ha sido curado de un primer cuadro clínico del padecimiento. Los pacientes con LMC pueden morir por causa de infecciones secundarias y malnutrición (McGwire y Satoskar, 2014).

La LMC es endémica de América del Sur y Central, siendo el agente causal las distintas especies del subgénero *Viannia*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana*. En cuanto a la presencia de la LMC en México, en los casos reportados se ha aislado e identificado a *L. (V.) braziliensis* como el agente causal (Mansueto et al., 2014; INDRE, 2014).

1. 2. 1. 3 Leishmaniasis visceral (LV)

La LV también es conocida como kala-azar. En esta forma clínica los amastigotes se multiplican en las células del sistema fagocítico mononuclear de los órganos internos del hospedero, tales como el hígado, el bazo, el intestino y la médula ósea, debido a una diseminación de los parásitos desde el sitio inicial de la infección cutánea.

Se ha observado que la infección por las especies viscerotrópicas de *Leishmania* usualmente es asintomática o no grave, seguida de una resolución espontánea. Sólo uno de 30 a 100 casos de pacientes infectados desarrolla LV en un periodo de 2 a 8 meses a partir de la infección. Los factores que predisponen el desarrollo de LV incluyen la malnutrición, pobreza, inmunodeficiencia y una alta carga parasitaria de *L. (L.) donovani* (en Asia y África) o *L. (L.) infantum* (syn. *L. (L.) chagasi*) (en el Mediterráneo y en América) (Argaw et al., 2013). Los primeros síntomas que experimentan los pacientes con LV son fiebre, debilidad, anorexia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y deterioración progresiva del estado psicofísico. Posteriormente se experimenta epistaxis, hemorragia gingival, distensión abdominal, ascitis y edema periférico. La LV posee una mortalidad del 75 al 95% en pacientes con un diagnóstico tardío, particularmente en pacientes inmunosuprimidos. Generalmente el deceso es causado por anemia severa, una infección secundaria o hemorragia (Mansueto et al., 2014).



Figura 4. Cuadros clínicos de la leishmaniasis. (a) Leishmaniasis cutánea localizada. (b) Leishmaniasis cutánea difusa. (c) Leishmaniasis mucocutánea. (d) Leishmaniasis visceral.

1. 2. 2 Epidemiología de la leishmaniasis en el mundo

La leishmaniasis tiene una alta prevalencia en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, tales como América Central, Sudamérica, el sur de Europa, el norte y este de África, el este y sureste de Asia y el Medio Oriente. La distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector, siendo endémica en 98 países, 72 de los cuales están en vías de desarrollo (fig. 5). Existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección por *Leishmania*. Se estima que la leishmaniasis afecta a 12 millones de personas en el mundo con 1.3 millones de nuevos casos y entre 20,000 a 30,000 defunciones anuales (WHO, 2015).

La LC presenta 0.7 a 1.2 millones de casos nuevos anuales en el mundo, de los cuales el 95 % se dan en América, la cuenca del Mediterráneo, Asia Central y el Medio Oriente. Más de dos tercios de los casos totales ocurren en diez países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Etiopía, Irán, Perú, Sudán y Siria (WHO, 2015). La LMC se presenta principalmente en Bolivia, Brasil y Perú, los cuales suman el 90% de los casos en el mundo. La LV se presenta en la India y el Este de África, donde el 90% de los casos se ubican en seis países: Bangladesh, Brasil,

1.3 Células dendríticas (DCs)

Como se mencionó anteriormente, las DCs y los macrófagos son las principales células hospederas del parásito *Leishmania*. Las DCs son un grupo heterogéneo de células especializadas en la captura, transporte, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes. Las DCs poseen una morfología estrellada debido a prolongaciones del citoplasma, similares a las dendritas de las neuronas y debido a esto reciben este nombre. Las DCs son capaces de reconocer patógenos, células muertas y antígenos propios, y además dirigen el tipo, magnitud y especificidad de la respuesta inmune, determinando si ésta lleva a una respuesta mediada por los linfocitos T CD4⁺ efectoros (tipo T_{H1} o T_{H2}), linfocitos T CD8⁺ citotóxicos o a la tolerancia inmunológica. La primera población de DCs descrita fueron las células de Langerhans (LCs), descubiertas en 1868 por Paul Langerhans. Sin embargo, el papel de las DCs como células presentadoras de antígeno fue apreciado hasta 1973, después de que Steinman y Cohn identificaran por primera vez a las DCs en el bazo de ratones y las describieran como células con un alto potencial para iniciar y modular la respuesta inmune (Steinman y Cohn, 1973; Banchereau y Steinman, 1998).

1.3.1 Origen de las células dendríticas murinas

La mayoría de las DCs se originan a partir de precursores presentes en la médula ósea (Geissmann et al., 2010), con excepción de las LCs que se originan a partir de precursores embrionarios (Hoeffel et al., 2012). En la médula ósea, el precursor de macrófagos y DCs (MDP) con fenotipo Lin⁻Sca1⁻IL-7R α ⁻C-kit⁺CX3CR1⁺CD115⁺ da origen al precursor común de células dendríticas (CDP) y al precursor común de monocitos (cMoP). El CDP posee un fenotipo Lin⁻Sca1⁻IL7R α ⁻CD16/32^{Baj}C-kit^{Int}CD115⁺CD135⁺ y da origen al precursor de DCs residentes y migratorias (pre-DC), cuyo fenotipo es Lin⁻C-kit⁺CD16/32⁻CX3CR1⁺CD135⁺CD11c⁺MHC-II^{Baj}CD43^{Int}SIRP- α ^{Int}CD4⁻CD8⁻ y al precursor de DCs plasmacitoides (pre-pDCs) con fenotipo CD115⁻DNGR-1⁻CD135⁻ (Liu et al., 2009; Schraml y Reis e Sousa, 2015).

Los pre-pDCs se diferencian a DCs plasmacitoides (pDCs) en la médula ósea y posteriormente migran por vía sanguínea a los órganos periféricos, sin embargo, las pDCs también pueden originarse a partir de precursores comunes linfoides (LCPs), aunque en menor proporción. Los pre-DCs abandonan la médula ósea a través de la circulación sanguínea y migran hacia órganos linfoides y no linfoides, donde se diferencian en CD8⁺ y CD4⁺CD11b⁺ (DCs residentes de tejido linfoide) y en CD103⁺ y CD11b⁺ (DCs migratorias), respectivamente (Haniffa et al., 2013; Schlitzer y Ginhoux, 2014; Schraml y Reis e Sousa, 2015).

Otra población de DCs denominadas inflamatorias o iDCs se deriva a partir de los monocitos, los cuales también se originan en la médula ósea a partir del cMoP con fenotipo DNGR-1-CD135-Ly6C⁺. Los monocitos se encuentran en la circulación sanguínea y son reclutados a los órganos periféricos, donde cambian su fenotipo y función a iDCs durante el proceso inflamatorio (Schraml y Reis e Sousa, 2015).

1. 3. 2 Maduración de las células dendríticas

Las DCs reconocen al antígeno y lo internalizan mediante endocitosis o fagocitosis. El reconocimiento del antígeno es llevado a cabo mediante diferentes familias de receptores tales como:

1. Receptores Fc (FcRs) que reconocen complejos inmunes antígeno-anticuerpo.
2. Receptores de complemento (CRs) que reconocen antígenos opsonizados por moléculas solubles del complemento.
3. Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los receptores tipo Nod (NLRs) o los receptores tipo Toll (TLRs). Los PRRs reconocen una gran variedad de patrones moleculares asociados a organismos patogénicos (PAMPs) tales como bacterias, virus y parásitos, entre otros. Receptores de lectina tipo C (CLRs) que reconocen a los carbohidratos de moléculas presentes en la superficie de los organismos patogénicos (Kaisho et al., 2012; Dudek et al., 2013).

Una vez que las DCs han reconocido a un antígeno, atraviesan por una serie de cambios en la expresión génica mediante un proceso denominado maduración, descrito por primera vez en 1985 por Schuler y Steinman. Este proceso ocurre in situ en los NLs para las DCs residentes de tejido linfoide, en cambio para las DCs migratorias ocurre durante la migración desde los tejidos periféricos hacia los NLs, mientras la cual llevan a cabo el procesamiento del antígeno.

La maduración prepara a las DCs para llevar a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T a través de diferentes eventos en la célula:

- 1) aumento en la expresión de las moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras o de adhesión, tales como CD40, CD80 y CD86.
- 2) disminución en la capacidad para capturar y fagocitar o endocitar antígenos.
- 3) aumento en la secreción de citocinas.
- 4) cambios en la producción de quimiocinas y expresión de los receptores de las mismas, que permiten la migración de las DCs.

A diferencia de las DCs maduras, las DCs inmaduras (con una expresión baja de moléculas coestimuladoras y poca producción de citocinas proinflamatorias) portan antígenos de células (por ejemplo, de células apoptóticas fagocitadas) cuya función es promover tolerancia inmunológica en los linfocitos T periféricos in vivo. Diferentes estudios han demostrado que las DCs inmaduras pueden inhibir la función antígeno-específica de linfocitos T efectores existentes, ya que son capaces de activar a linfocitos T antígeno-específicos con un fenotipo altamente productor de IL-10, carentes de producción de IFN- γ y sin actividad citotóxica (Dhodapkar et al., 2001). Estas observaciones se confirmaron in vivo con un experimento en el que se demostró que la inyección de LPS por sí sólo demostró desencadenar una respuesta inmune similar a la obtenida con la inoculación de DCs estimuladas con LPS previamente in vitro. De ahí se determinó que la maduración de las DCs es regulada por señales exógenas (Dhodapkar et al., 2001).

La maduración de las DCs puede inducirse in vitro mediante diversos estímulos tales como microorganismos (virus, bacterias y parásitos) o sus productos (tal como el LPS), citocinas proinflamatorias (por ejemplo: IL-1 β , IL-6, TNF- α), moléculas de superficie de los linfocitos T (por ejemplo: CD154 o ligando de CD40), entre otros (Dalod et al., 2014).

1. 3. 3 Presentación antigénica de las células dendríticas a los linfocitos T

Las DCs no sólo son eficientes en el procesamiento y la presentación de todo tipo de antígenos a los linfocitos T, sino que también poseen la capacidad de presentar antígenos lipídicos tales como glicolípidos, fosfolípidos, lipopéptidos, entre otros, a células NK y células NKT a través de las moléculas no clásicas de presentación CD1. Además, las DCs poseen un mecanismo para presentar a los antígenos exógenos (que son endocitados y presentados a través de moléculas del MHC-II) a los linfocitos T CD8⁺ a través de moléculas del MHC-I, en un proceso denominado presentación cruzada. La presentación cruzada es especialmente eficiente en las subpoblaciones de DCs murinas CD8⁺ y CD103⁺, así como en las iDCs (Dresch et al., 2012).

Como ya se mencionó, las DCs actúan como centinelas que capturan antígenos en los tejidos periféricos y los transportan a los órganos linfoides secundarios para presentarlos a los linfocitos T vírgenes y así iniciar una respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T. Este evento se lleva a cabo durante un proceso complejo conocido como sinapsis inmunológica, el cual consiste en una organización molecular especializada que ocurre en la región de

contacto entre las DCs y los linfocitos T. La formación de la sinapsis inmunológica requiere al receptor del linfocito T (TCR) y a la molécula del MHC a la cual se encuentra acoplado el antígeno peptídico, además de las moléculas coestimuladoras (principalmente CD40-CD40L y CD28-CD80/86), así como de la producción de varias citocinas tales como IL-1, IL-2, IFN- γ e IL-12. De esta forma, los linfocitos T reciben tres señales, una a través del TCR, otra a través del receptor CD28 para moléculas coestimuladoras y otra a través del receptor de citocinas. Durante esta interacción, las DCs tienen un papel importante en determinar la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a los linfocitos T efectores, en el caso de los linfocitos T CD4⁺ en células T cooperadoras de tipo 1 o 2 (T_H1 o T_H2) y en el caso de los linfocitos T CD8⁺ en células T CD8⁺ citotóxicas (Dalod et al., 2014), dependiendo de la naturaleza de la señal de activación, la subpoblación y grado de maduración de las DCs, así como del microambiente de citocinas. Por ejemplo, las citocinas IL-12, IL-18 e IFN- γ producidas por las DCs promueven la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia una respuesta proinflamatoria de tipo T_H1, mientras que citocinas como la IL-10 y TGF- β producidas por las DCs promueven una respuesta antiinflamatoria de tipo T_H2 (Reis e Sousa, 2006).

1. 3. 4 Clasificación de las células dendríticas murinas

Las DCs comprenden varias subpoblaciones con diferentes funciones, las cuales se dividen tradicionalmente en dos grupos con base en la ubicación anatómica, el fenotipo y la función de cada población. Esta clasificación separa a las DCs en: DCs residentes de tejidos linfoides también denominadas convencionales o clásicas (cDCs) y DCs migratorias (mDCs) o residentes de tejidos periféricos no linfoides. Ambas poblaciones se encuentran en los tejidos linfoides con irrigación linfática aferente tales como los nódulos linfáticos (NLs) y se caracterizan por la expresión de los marcadores CD11c^{Alt}MHC-II^{Baj} en las cDCs y CD11c^{Baj}MHC-II^{Alt} en las mDCs (Dakic et al., 2004; Haniffa et al., 2012). Anteriormente se usaba el término DCs “mieloides” para diferenciar a las “mDCs y cDCs” (mieloides) de las “pDCs” (linfoides). El término “linfoide” surgió debido a la morfología secretora de las pDCs que asemeja a las células plasmáticas. Sin embargo, el término “linfoide” es confuso y ya no se usa en la nomenclatura de las DCs (Haniffa et al., 2013). A su vez, las cDCs y las mDCs se subdividen de acuerdo a la expresión de los siguientes marcadores en cDCs CD8 α ⁺ y CD4⁺CD11b⁺ y en mDCs CD103⁺ y CD11b⁺. Además de las cDCs y las mDCs, existen tres poblaciones más de DCs denominadas DCs plasmacitoides (pDCs), DCs inflamatorias (iDCs) y DCs epiteliales o células de Langerhans (LCs) (Schlitzer y Ginhoux, 2014).

1. 3. 4. 1 Células dendríticas convencionales o clásicas (cDCs) y células dendríticas migratorias (mDCs)

En el ratón, las DCs residentes en el tejido linfóide se denominan “clásicas” o “convencionales” (cDCs) para distinguirlas de las DCs migratorias o residentes en los tejidos periféricos no linfoides (mDCs) y de las DCs plasmacitoides (pDCs), entre otras. Las cDCs se localizan en los tejidos linfoides ejerciendo la función de capturar y presentar antígenos en los órganos linfáticos, es decir, in situ, por lo que no requieren migrar para llevar a cabo la presentación antigénica. Las cDCs se encuentran en los conductos y en el seno subcapsular de los NLs, así como en el timo y en el bazo. Las cDCs se clasifican en DCs CD8 α ⁺ y DCs CD4⁺CD11b⁺ (Edelson et al., 2010).

Las mDCs se caracterizan por cursar el ciclo de vida clásico de las DCs, funcionando como centinelas en los tejidos periféricos no linfoides, listas para detectar y capturar antígenos para posteriormente transportarlos a los NLs para presentarlos a los linfocitos T vírgenes. Durante la inflamación, las mDCs migran a los NLs con el subsecuente incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras. Este incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras corresponde a las DCs con un fenotipo maduro. Sin embargo, las mDCs también son capaces de migrar a los NLs con un fenotipo inmaduro y en ausencia de inflamación, promoviendo de esta forma la tolerancia inmunológica. Las mDCs se dividen a su vez en DCs CD103⁺ y DCs CD11b⁺ (Edelson et al., 2010).

1. 3. 4. 1. 1 Células dendríticas CD8 α ⁺ y células dendríticas CD103⁺ (DCs CD8 α ⁺ y DCs CD103⁺)

Las DCs CD8 α ⁺ se localizan en los tejidos linfoides tales como los NLs y el bazo, mientras que las DCs CD103⁺ se encuentran en los tejidos periféricos o no linfoides. Ambas subpoblaciones son las principales en llevar a cabo la presentación cruzada de antígenos y producir cantidades elevadas de IL-12 (Schlitzer y Ginhoux, 2014). Las DCs CD8 α ⁺ y DCs CD103⁺ se desarrollan de forma semejante al ser similarmente dependientes de CD135, del factor inhibidor de transcripción o unión al DNA 2 (ID2), del factor de transcripción activador 3 (BAFT3) y del factor regulador del interferón 8 (IRF8), y asimismo expresan de forma similar los receptores de quimiocinas XCR1, de necrosis celular DNGR-1 (CLEC-9A) y receptores tipo Toll 3, 4, 11 y 13 (Edelson et al., 2010, Laffont et al., 2010).

Estas subpoblaciones presentan algunas diferencias, por ejemplo las DCs CD8 α ⁺ son mejores

productoras de IFN- γ que las DCs CD103⁺. En cambio, las DCs CD103⁺ son las principales mediadores de tolerancia en las mucosas al capturar y presentar antígenos apoptóticos a los linfocitos T. Existe una subpoblación de DCs CD103⁺ que también es CD11b⁺ (DCs CD103⁺CD11b⁺) y se encuentra en la lamina propia del intestino. Las DCs CD103⁺CD11b⁺ interactúan con las células caliciformes, adquieren antígenos del lumen y producen grandes cantidades de TGF- β y retinaldehído deshidrogenasa, reclutando linfocitos T al intestino y promoviendo inmunotolerancia. Durante el proceso inflamatorio, las DCs CD103⁺CD11b⁺ promueven respuesta inmunes mediante la producción de IL-6 e IL-12 (Laffont et al., 2010, (Schlitzer y Ginhoux, 2014).

1. 3. 4. 1. 2 Células dendríticas CD11b⁺ (DCs CD11b⁺)

Las DCs CD11b⁺ son inductoras de las respuestas inmunes de tipo Th2 y Th17 y se encuentran en tejidos no linfoides y linfoides tales como en el bazo, en el cual también expresan CD4 y se denominan DCs CD11b⁺CD4⁺ o esplénicas. Las DCs CD11b⁺ poseen un fenotipo CX3CR1⁺SIRP- α ⁺BTLA⁺F4/80⁺CD14⁻CD64⁻ y son dependientes de los factores de transcripción Notch2 (proteína 2 homóloga al locus neurogénico), RelB (homólogo B del oncogén viral de la reticuloendoteliosis aviar) e IRF4 (factor regulador del interferón 4). Sin embargo, los requerimientos de estos factores varían de acuerdo a la ubicación de las DCs en los tejidos. Por ejemplo, las DCs CD11b⁺CD4⁺ del bazo son dependientes de Notch2 y Relb, así como del receptor para linfoxina β (Lt β R), pero no de IRF4, mientras que las DCs CD11b⁺ del pulmón son independientes de Notch2 y RelB, pero no de IRF4. En cambio, las DCs CD11b⁺CD103⁺ de la lámina propia del tracto digestivo son dependientes de todos los factores de transcripción anteriormente mencionados (Schlitzer y Ginhoux, 2014). Esta dependencia de los factores de transcripción requeridos por las DCs CD11b⁺ en los diferentes tejidos sugiere que éstas pueden ser poblaciones independientes que se originan a partir de progenitores diferentes o que sus diferencias se deben a las condiciones impuestas por el microambiente local. Actualmente, aún queda por determinar si las DCs CD11b⁺ constituyen un linaje homogéneo o ramas divergentes del mismo árbol ontogénico.

A su vez, las DCs CD11b⁺ intestinales pueden dividirse en dos grupos de acuerdo a la expresión o ausencia de CD103. Las DCs CD11b⁺CD103⁺ se localizan exclusivamente en el intestino y producen IL-23 e IL-6 de manera constitutiva, además de contribuir a la homeostasis intestinal mediante la producción de la proteína de unión a IL-22 (Martin et al., 2013). Las DCs CD11b⁺CD103⁻ son una población pequeña y productora de IFN- γ , lo que promueve una respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4⁺ (Cerovic et al., 2013).

1. 3. 4. 2 Células dendríticas plasmacitoides (pDCs)

Las pDCs expresan CD11c, BST2, Siglec-H y B220 y dependen del factor de transcripción E2-2 para su desarrollo. En condiciones normales, las pDCs presentan un fenotipo inmaduro y se encuentran circulando en la sangre, en el bazo y en los NLs. En condiciones de inflamación son reclutadas al sitio de infección, en donde adquieren un fenotipo maduro y secretan una gran cantidad de IFN- α , IFN- β , IL-12 e IL-6. Al madurar, las pDCs expresan MHC-II, TLR7, TLR9 y moléculas coestimuladoras tales como CD40, CD69, CD80 y CD86, con lo cual son capaces de llevar a cabo la presentación cruzada de antígenos, induciendo con esto tanto respuestas tipo T_H1 como T_H2 (Schlitzer y Ginhoux, 2014).

1. 3. 4. 3 Células de Langerhans (LCs)

Las LCs presentan un origen diferente a las demás DCs, ya que provienen de precursores hematopoyéticos embrionarios, principalmente de monocitos hepáticos fetales (Hoeffel et al., 2012) y durante el desarrollo son totalmente dependientes de ID2 y del factor de transcripción tipo runt 3 (RUNX3). Una característica particular de las LCs es la expresión de moléculas de adhesión epitelial (Epcam) y langerina, un receptor de lectina tipo C localizado en organelos especializados denominados gránulos de Birbeck. Estas células migran constantemente a los NLs de la piel, donde presentan antígenos dérmicos y epidérmicos a los linfocitos T CD4⁺, induciendo tolerancia periférica. Se ha demostrado también que en infecciones cutáneas con *Candida albicans* o *Staphylococcus aureus*, las LCs inducen una respuesta tipo T_H17 a través de la secreción de IL-23, IL-6 e IL-1 β (Schlitzer y Ginhoux, 2014).

1. 3. 4. 4 Células dendríticas inflamatorias (iDCs)

Las iDCs son un grupo de DCs que se presentan durante la inflamación, ya sea causada por la invasión de un patógeno o por enfermedades autoinmunes. Se originan a partir de monocitos y expresan CD11b, CD11c, MHC-II, CD64, Fc ϵ R1 y diferentes niveles de Ly6C (Plantinga et al., 2013). Las iDCs capturan antígenos en los tejidos en los que fueron reclutadas durante el proceso inflamatorio y posteriormente migran a los NLs, en los que inducen predominantemente una respuesta de tipo T_H1 a través de la producción de grandes cantidades de IL-12, aunque también son capaces de inducir respuestas de tipo T_H17 y producir IL-23.

Se ha descrito que en ratones existen dos grandes grupos de iDCs: las iDCs CD209⁺Zbtb46⁺ dependientes de Flt3L y las iDCs CD209⁻Zbtb46⁻ dependientes de CSF-1R. Las iDCs CD209⁺Zbtb46⁺ son mejores en la presentación cruzada de antígenos y se ha observado que

durante la infección por *Listeria monocytogenes* producen TNF- α e iNOs en el bazo, por lo que se les ha denominado TipDCs (DCs productoras de TNF- α e iNOs) (Haniffa et al., 2013).

1. 3. 5 Empleo de las células dendríticas en la inmunoterapia de algunas enfermedades

Como ya se explicó anteriormente, las DCs poseen un papel fundamental en el inicio, modulación y polarización de la respuesta inmune adaptativa. Debido a tales características son de gran interés en el desarrollo de vacunas o inmunoterapias para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, especialmente para las cuales aún no existe una vacuna eficaz tales como el SIDA, el cáncer, la malaria, la hepatitis C, la tuberculosis, las alergias, las enfermedades autoinmunes e incluso la leishmaniasis, por mencionar algunas (Palucka y Banchereau, 2013).

1. 3. 5. 1 Tipos de inmunoterapias con células dendríticas

Mientras las vacunas profilácticas tradicionales promueven la generación de anticuerpos y linfocitos B de memoria específicos que previenen el establecimiento de una infección a través de la respuesta inmune humoral tipo T_H2, la inmunoterapia con DCs es empleada cuando ya se ha establecido una infección con el fin de inducir principalmente una respuesta inmune celular tipo T_H1 contra células tumorales o infectadas. La inmunoterapia con DCs también se denomina como terapia de vacunación celular o vacunación con DCs y se clasifica de acuerdo con la metodología empleada en el diseño y aplicación en dos grupos: inmunoterapia *ex vivo* e inmunoterapia *in vivo*. La inmunoterapia *ex vivo* emplea DCs cultivadas a partir de progenitores celulares sanguíneos del paciente que posteriormente son estimuladas *in vitro*, en cambio la inmunoterapia *in vivo* no requiere del cultivo de las DCs puesto que aprovecha las DCs del paciente, a las cuales se les dirige in situ los antígenos acoplados a un anticuerpo específico para una población determinada de DCs (Cohn y Delamarre, 2014; Wimmers et al., 2014).

1. 3. 5. 1. 1 Inmunoterapia *ex vivo* con células dendríticas exógenas pulsadas *in vitro*

La inmunoterapia *ex vivo* emplea DCs exógenas (fig. 5), las cuales requieren cultivarse *in vitro*. Para esto, las DCs se diferencian a partir de células progenitoras multipotenciales de médula ósea o monocitos sanguíneos que se extraen del paciente y que son cultivadas en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Mientras

el cultivo de las DCs murinas sólo requiere como factor de diferenciación al GM-CSF, las DCs humanas requieren además la presencia de IL-4 o IL-13 (Alters et al., 1999).

Una vez cultivadas, las DCs deben estimularse con los antígenos contra los cuales se desea dirigir la respuesta inmune o inducir protección. Los antígenos empleados para la estimulación de las DCs se pueden obtener a partir de tumores u organismos patogénicos, entre otras fuentes. Las DCs reconocen y fagocitan/endocitan dichos antígenos con los que son estimuladas, posteriormente los procesan y acoplan a moléculas clásicas del MHC (clase I y II) o no clásicas (familia CD1), con lo que las DCs están listas para presentar los antígenos a los linfocitos T e iniciar una respuesta inmune específica en contra de los antígenos presentados por las DCs (De Freitas e Silva et al., 2014). Los antígenos empleados para estimular las DCs pueden tener diferentes grados de inmunogenicidad y ser reconocidos por diferentes tipos de receptores. Mientras algunos de los antígenos son reconocidos por receptores que poseen motivos de activación (ITAM) los cuales desencadenan vías de señalización que promueven la activación y maduración de las DCs, otros por el contrario son reconocidos por receptores que poseen dominios de inhibición (ITIM) los cuales inhiben la activación y maduración de las DCs. Como se mencionó anteriormente, las DCs se encuentran en un estadio inmaduro a menos que una señal externa promueva su maduración, con lo que aumenta su expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas.

Por este motivo, en la inmunoterapia con DCs se emplean adyuvantes para promover la maduración de las DCs estimuladas. La lista de adyuvantes es grande, se han empleado desde citocinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-12 hasta compuestos microbianos conservados (PAMPs) tales como el LPS, péptidos inmunogénicos, dinucleótidos CpG, entre otros. La maduración de las DCs es necesaria para que se monte una respuesta inmune protectora, ya que a diferencia de las DCs maduras, las DCs inmaduras provocan la generación de tolerancia a través de la producción de linfocitos T reguladores, anergia y/o delección de linfocitos T. Por este motivo, las inmunoterapias con DCs también se han empleado en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Dalod et al., 2014).



Figura 6. Inmunoterapia ex vivo con células dendríticas exógenas estimuladas in vitro (Summott et al., 2011).

Las DCs estimuladas con los antígenos son inoculadas al paciente y posteriormente migran hacia los ganglios linfáticos, en los cuales llevan a cabo la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores y de memoria, iniciando una respuesta inmune protectora o tolerogénica, dependiendo de las necesidades de la inmunoterapia. Se pueden emplear DCs maduras para inducir una respuesta inmunoprotectora ante cáncer y enfermedades infecciosas o DCs inmaduras para inducir una respuesta tolerogénica ante enfermedades autoinmunes.

1. 3. 6. 1. 2 Inmunoterapia *in vivo* con células dendríticas endógenas pulsadas *in situ*

A diferencia de la inmunoterapia a base de DCs exógenas que requiere el cultivo *in vitro* de DCs diferenciadas a partir de células precursoras del paciente, la inmunoterapia in vivo emplea las propias DCs del paciente (DCs endógenas), a las cuales se les dirigen *in situ* los antígenos y adyuvantes de interés. Para esto, los antígenos se acoplan a un anticuerpo específico, el cual se selecciona con base en la ubicación y población de DCs a la que se requiere dirigir los antígenos. Mientras los antígenos dan especificidad a la inmunoterapia contra la enfermedad que se requiere tratar, el anticuerpo permite que sólo una población específica de DCs que posee afinidad por dicho anticuerpo sea la que reconozca al complejo antígeno-anticuerpo. De esta

forma, al ser reconocido el antígeno por una población determinada de DCs, el antígeno acoplado es internalizado junto con el anticuerpo por las DCs. Generalmente al complejo antígeno-anticuerpo también se le añade un adyuvante, que al igual que en la inmunoterapia *ex vivo*, promueve que las DCs maduren y no se produzca tolerancia (De Freitas e Silva et al., 2014). Las DCs internalizan y procesan al complejo antígeno-anticuerpo-adyuvante (Ag-Ad-Ac) y posteriormente acoplan los antígenos por la vía clásica (MHC-I y -II) o no clásica (familia CD1) a las moléculas de presentación antigénica, mientras que el adyuvante promueve la maduración de las DCs, preparándolas para la presentación de los antígenos a los linfocitos T. El reconocimiento e internalización de los complejos Ag-Ad-Ac por las DCs puede llevarse a cabo mediante la selección específica de diversos marcadores de superficie, tales como las lectinas DCIR, DC-SIGN, Dectin, Clec-9A, Langerina, DEC205, DC-ASGPR y Dectin-1, entre otros, produciéndose una respuesta inmune humoral y/o celular mediada por los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ (Cohn L, Delamarre L. 2014).

1. 3. 6. 2 Eficacia de la inmunoterapia con células dendríticas

Diversos estudios han demostrado que la inmunoterapia con DCs es eficaz en conferir inmunidad a través de la expansión de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos, tanto efectores como de memoria. Incluso, las DCs son capaces también de promover la producción de anticuerpos a través de la presentación de antígenos a los linfocitos B y la polarización de la respuesta inmune a una de tipo T_H2. Aunque la inmunoterapia con DCs es un campo relativamente reciente, se han obtenido algunos resultados exitosos, especialmente en el campo de la oncología. Por ejemplo, actualmente existe una inmunoterapia con DCs empleada para mejorar la calidad y duración de vida de pacientes masculinos con cáncer de próstata. Dicho tratamiento fue aprobado por la FDA en el año 2010 bajo el nombre comercial Provenge® (Sipuleucel-T) (Gardner et al., 2012). Este logro y otros estudios apoyan el empleo de la inmunoterapia con DCs en el desarrollo de inmunoterapias profilácticas y terapéuticas. En la actualidad se están realizando alrededor de 191 pruebas clínicas que emplean a la inmunoterapia con DCs en el tratamiento de diversas enfermedades tales como diferentes tipos de cáncer (en próstata, ovario, mama, piel, pulmón, cerebro, páncreas, entre otros), artritis reumatoide, asma, diabetes y en la infección por el VIH (Clinical Trials, 2015).

Con el fin de aumentar la eficacia de las inmunoterapias que emplean DCs se emplean adyuvantes, entre los cuales se encuentran los péptidos inmunogénicos tal como el péptido GK1, el cual se describe a continuación.

1. 3. 5. 3 Empleo del péptido GK1 en la inmunoterapia con células dendríticas

El péptido GK1 es una molécula pequeña formada por 18 residuos de aminoácidos (GYYYPSDPNTFYAPPYSA) y es uno de los componentes de la vacuna S3PVac contra la cisticercosis porcina (Díaz et al., 2003). La secuencia de GK1 fue obtenida a partir del antígeno recombinante KETc7 de *Taenia crassiceps*. El antígeno recombinante KETc7 es una secuencia de 100 residuos de aminoácidos, rica en prolina, la cual demostró ser efectiva como vacuna en contra de la cisticercosis experimental en ratones (Segura et al., 2006; Segura et al., 2009). A partir de KETc7, se encontraron y mandaron a sintetizar tres secuencias lineales con alto potencial de ser epítopes antigénicos: GK1, GK2 y GK3, de los cuales sólo GK1 demostró ser eficaz en inducir protección contra los cisticercos de *T. crassiceps*. Posteriormente se demostró que GK1 posee propiedades inmunoestimuladoras, ya que promueve la proliferación de linfocitos T CD4⁺ in vitro e in vivo a través del incremento en la expresión de moléculas del MHC-II, moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, y en la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IFN- γ y MCP-1 (Segura et al., 2009). Posteriormente, GK1 se empleó como adyuvante en la optimización de la vacuna Fluzone contra la influenza (Segura et al., 2006), así como en el tratamiento del melanoma en ratones mediante la vacunación peritumoral con GK1 (Pérez et al., 2013) y en la inmunoterapia de ratones con melanoma empleando DCs cargadas con el antígeno tumoral MAGE-AX con GK1 y TNF- α (Piñón et al., 2014). En el estudio de la vacuna Fluzone contra la influenza, se observó que la administración subcutánea de GK1 con la vacuna incrementó los niveles de anticuerpos contra el virus de la influenza en los ratones antes y después de la infección, reduciendo los niveles locales de inflamación que acompañaban a la propia vacunación y favoreciendo la eliminación del virus. Además, debido a que GK1 es una molécula pequeña y es rápidamente eliminado del cuerpo, éste mejoró el desempeño de la vacuna Fluzone sin ocasionar efectos adversos (Segura et al., 2006). En otro estudio, se observó que la administración peritumoral de GK1 en ratones con melanoma redujo el tamaño de los tumores y aumentó la sobrevivencia de los animales (Pérez et al., 2013). En un estudio para el tratamiento del melanoma en ratones se probó una inmunoterapia con BMDCs cargadas con un antígeno tumoral específico (MAGE-AX) en combinación con el péptido GK1 y TNF- α , logrando aumentar la sobrevivencia y reducción del tamaño del tumor (Piñón et al., 2014).

2. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis afecta a 12 millones de personas en el mundo con 1.3 millones de casos nuevos y entre 20,000 a 30,000 defunciones anuales. Existen 98 países con aproximadamente 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección (WHO, 2015). Esta enfermedad no sólo puede llegar a ser mortal en grupos vulnerables, sino que también suele ser recurrente en pacientes que han sufrido un primer episodio de LMC o LV. Los desfiguramientos faciales, cicatrices y estigma social siguen afectando la calidad de vida de los pacientes, incluso después de haberse curado de leishmaniasis. Existen algunos fármacos que son eficaces en combatir y resolver la leishmaniasis, sin embargo aún no existe una vacuna que sea capaz de prevenir el desarrollo de la enfermedad. Además, el empleo de los medicamentos actuales para controlar la leishmaniasis resulta tóxico, caro o duradero para el paciente. Por otro lado, cada vez se reportan más cepas de *Leishmania* resistentes a dichos medicamentos, por lo que en la actualidad se requieren terapias alternativas para prevenir y resolver la leishmaniasis. Existen diferentes candidatos de vacunas e inmunoterapias con diferentes niveles de eficacia en la prevención y control de esta enfermedad (Kumar y Engwerda, 2014), de las cuales una estrategia novedosa que se ha empleado en el modelo murino es la inmunoterapia con DCs (Wimmers et al., 2014). La inmunoterapia con DCs ha demostrado ser eficiente en estudios realizados tanto en enfermedades infecciosas como no infecciosas, incluyendo la leishmaniasis. Algunas estrategias han optado por terapias combinadas entre fármacos e inmunoterapias con DCs (Joshi et al., 2013) logrando la eliminación del parásito. La especificidad de la inmunoterapia con DCs depende de los antígenos con los cuales las DCs son estimuladas o cargadas, ya que estos antígenos son los que presentarán a los linfocitos T. La fuente de los antígenos empleados para la estimulación de las DCs puede ser diversa, variando desde un lisado tumoral o de un organismo patogénico hasta vectores virales o péptidos sintéticos, entre otros. Diferentes estudios han demostrado que las DCs cargadas con lisados y antígenos de *Leishmania* transferidas a ratones confieren protección inmunológica contra la infección (Von Stebut et al., 2000; Berberich et al, 2003; Ramírez et al, 2004; Remer K. et al, 2007; Agallou et al., 2011; Masic et al., 2012; Agallou et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Majumder et al., 2014). Estos estudios han empleado BMDCs, LCs y pDCs cargadas con parásitos lisados o con antígenos específicos de especies tales como *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani*, así como diferentes adyuvantes tales como dinucleótidos CpG, TNF- α , entre otros. Sin embargo, ningún estudio había evaluado el efecto de la inmunoterapia con BMDCs en la infección en ratones por *L. mexicana*.

Las DCs requieren además, de un fenotipo maduro para que se lleve a cabo una óptima presentación antigénica y activación de los linfocitos T antígeno-específicos efectores y de memoria, lo cual se logra con moléculas activadoras o adyuvantes que inducen la maduración de las DCs. Una molécula que ha sido empleada como adyuvante es el péptido GK1, el cual es uno de los componentes de la vacuna S3PVac contra la cisticercosis porcina (Díaz et al., 2003). GK1 ha sido empleado como adyuvante en la optimización de la vacuna Fluzone contra la influenza (Segura et al., 2006), así como en el tratamiento del melanoma en ratones mediante la vacunación peritumoral de GK1 (Pérez et al., 2013) y en la inmunoterapia de ratones con melanoma empleando DCs cargadas con el antígeno tumoral MAGE-AX con GK1 y TNF- α (Piñón et al., 2014).

Dado los antecedentes mencionados, este proyecto de tesis consideró de interés evaluar el efecto de la inmunoterapia con DCs estimuladas con el péptido GK1 y un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la infección de ratones por este parásito. El análisis del efecto de esta inmunoterapia es de importancia, ya que podría sentar las bases de un tratamiento potencial que prevenga o resuelva la leishmaniasis. Asimismo, las técnicas empleados en este proyecto podrían aplicarse para el posible tratamiento de otras enfermedades. Por otro lado, evaluar el efecto de GK1 como adyuvante en la inmunoterapia con DCs en la leishmaniasis es de interés, ya que este péptido podría emplearse posteriormente como adyuvante en el diseño de otras inmunoterapias o vacunas.

3. HIPÓTESIS

La administración de células dendríticas cargadas con el péptido GK1 y un lisado de promastigotes de *Leishmania mexicana* disminuye la infección por este parásito en ratones BALB/c.

4. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de BMDCs estimuladas con GK1 y un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la infección de ratones BALB/c por este parásito.

3.2 Objetivos Específicos

- Diferenciar DCs a partir de precursores presentes en la médula ósea de ratón.
- Caracterizar las BMDCs por citometría de flujo.
- Analizar el efecto del péptido GK1 y el lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la producción de citocinas por las BMDCs.
- Analizar el efecto de la transferencia adoptiva de BMDCs estimuladas con GK1 y un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la infección de ratones BALB/c con *L. mexicana* y evaluar el desarrollo de la infección a través del registro del incremento en el grosor del cojinete plantar infectado.
- Cuantificar la carga parasitaria presente en las lesiones de los ratones infectados mediante el conteo de los amastigotes en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica la producción de IL-12 en los ganglios poplíteos de los ratones infectados.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Para todos los experimentos se emplearon ratones singénicos de la cepa BALB/c hembra de 7 a 10 semanas de edad, los cuales fueron criados y mantenidos bajo condiciones libres de organismos patogénicos específicos en las instalaciones y a cargo del personal del Bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

5.2 Parásitos

Se emplearon promastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC (MHOM/MX/2011/LAC) en fase estacionaria de cultivo, con lo que se obtiene el mayor número de promastigotes metacíclicos equivalentes a la infección natural. Los parásitos fueron cultivados y proporcionados amablemente por el Biól. Arturo Wilkins Rodríguez (Lab. de Inmunoparasitología, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM).

5. 3 Péptido GK1

El péptido GK1 fue proporcionado amablemente por la Dra. Edda Lydia Sciutto Conde y el Dr. René Segura Velázquez del Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, así como por la Dra. Gabriela Piñón Zárate del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

5. 4 Sobrenadante enriquecido con GM-CSF murino producido por la línea celular X-63

El sobrenadante utilizado en los cultivos de las BMDCs fue proporcionado amablemente por el Biol. Arturo A. Wilkins Rodríguez (Lab. de Inmunoparasitología, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM). Este sobrenadante fue producido por la línea celular X-63, la cual consiste en el mieloma Ag8653 transfectado con cDNA del gen que codifica para el GM-CSF murino (Zal et al. 1994), donada por la Dra. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, Mill Hill, London, UK). El sobrenadante empleado al 10% en el medio de cultivo para la diferenciación de las BMDCs es equivalente a utilizar 200 U/ml de GM-CSF murino recombinante de acuerdo al protocolo descrito Lutz et al. (1999).

5. 5 Cultivo de células dendríticas derivadas de precursores presentes en la médula ósea de ratón (BMDCs)

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se cortaron las extremidades posteriores, de las cuales se retiró la piel y el músculo con ayuda de pinzas, tijeras y gasas, dejando al descubierto el fémur y la tibia. Estos huesos se colocaron en una caja de Petri de 60 mm con una solución desinfectante compuesta por buffer salino de fosfatos Dulbecco o DPBS 1X (fórmula de la solución concentrada a 10X: 2 g/L de cloruro de potasio, 2 g/L de fosfato de potasio monobásico anhidro, 80 g/L de cloruro de sodio, 11.5 g/ml de fosfato de potasio dibásico anhidro. Caisson Laboratories Inc, North Logan, UT, USA) suplementado con 200 U/ml de Penicilina G y 200 µg de Estreptomina (Sigma Aldrich, San Louis, MO, USA) durante 10 minutos y posteriormente se transfirieron a otra caja de Petri con solución desinfectante fresca, la cual se llevó a una campana de flujo laminar. Dentro de la campana de flujo laminar, se cortaron las epífisis de cada fémur y tibia y se expulsó la médula ósea en un tubo cónico de 50 ml mediante inyecciones sucesivas con DPBS. El tubo con la médula ósea se centrifugó a 300 × g

durante 10 minutos y se lavó con DPBS. El botón celular obtenido finalmente se resuspendió en 5 ml de medio RPMI (Gibco Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) y se determinó la cantidad de leucocitos con una cámara de Neubauer. Las células precursoras obtenidas de la médula fueron cultivados en cajas de 100 mm no tratadas para cultivo en suspensión de acuerdo al protocolo descrito por Lutz et al. (1999), en una concentración de 2×10^6 células/caja (5×10^5 células/ml) en 10 ml de medio RPMI suplementado (R-10) con 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado por calor (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 2mM de L-glutamina, 50 μ M de 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich) y 10% de GM-CSF producido por la línea celular X-63. Las cajas de cultivo fueron mantenidas en incubación a 37 °C y 5% de CO₂. Las BMDCs fueron alimentadas con medio R-10 fresco y 10% de GM-CSF en los días 3 y 6 de cultivo.

Las BMDCs se cosecharon en el día 7 y para los experimentos in vitro se sembraron en placas de 24 pozos a una concentración de 1×10^6 células/pozo en 1 ml de medio R-10 para su posterior estimulación. En cambio, para el experimento in vivo, las BMDCs se sembraron en placas de 6 pozos de baja adherencia a una concentración de 5×10^6 células/pozo en 5 ml de medio R-10 para su estimulación posterior.

5. 6 Caracterización de las BMDCs mediante citometría de flujo

Las BMDCs se cosecharon, se lavaron con DPBS y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células en 500 μ l de un buffer de tinción compuesto por DPBS, 2% de suero de caballo y 5 mM de EDTA. Las células se incubaron durante 15 minutos a 4 °C para bloquear los receptores Fc y evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos. Después de un lavado con la misma solución, las células se marcaron durante 30 minutos a 4 °C con el anticuerpo de interés a una dilución 1:200 en buffer de tinción. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD11c de ratón conjugado con PE hecho en hámster, anti-CD11b de ratón conjugado con FITC, anti-I-A/I-E de ratón conjugado con FITC y anti-CD86 de ratón conjugado con FITC, hechos en rata (BioLegend, San Diego, CA, USA). Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo, las células se lavaron 3 veces con DPBS y se resuspendieron en 500 μ l de buffer para ser analizadas inmediatamente en el citómetro. Las muestras se analizaron en un citómetro FACSCAN (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) utilizando el programa CellQuest y los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.9 (Copyright© Joseph Trotter, 1993-2000).

5. 7 Preparación del lisado de promastigotes de *Leishmania mexicana*

El lisado de los promastigotes de *L. mexicana* que se empleó para la estimulación de las BMDCs se preparó mediante ciclos rápidos de congelación-descongelación y sonicación. Para esto, los promastigotes en cultivo axénico se cosecharon en el día 7, cuando alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente, se centrifugaron y lavaron con DPBS, después se contaron y resuspendieron en tubos de criopreservación con DPBS a una concentración de 2×10^6 promastigotes/ml. La suspensión de parásitos se sometió a 6 ciclos de congelación y descongelación, sumergiendo los tubos en N₂ líquido durante un minuto y luego en baño María a 37 °C durante 5 min por cada ciclo. Posteriormente, la suspensión se sometió a 5 ciclos de sonicación en agua, cada uno con una duración de 3 minutos. A continuación, el lisado de los parásitos se observó al microscopio para comprobar que no quedaran parásitos sin lisar y finalmente se almacenó a -70 °C para su uso posterior. En todos los experimentos el lisado se empleó en una proporción de 10 promastigotes de *L. mexicana* por cada BMDC.

5. 8 Estimulación de las BMDCs

5. 8. 1 Experimentos in vitro

Las BMDCs se cosecharon al séptimo día de cultivo y sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 1×10^6 BMDCs/ml de medio R-10. Las BMDCs se trataron por duplicado con los estímulos siguientes: (1) Basal, sin ningún estímulo; (2) GK1, 10 µg/ml de GK1; (3) TNF-α, 500 U/ml de TNF-α; (4) lisado, 50 µl/ml de lisado; (5) GK1+TNF-α, 10 µg/ml del péptido GK1 y 500 U/ml de TNF-α; (6) GK1+lisado, 10 µg/ml del péptido GK1 y 50 µl/ml de lisado, (7) TNF-α+lisado, 500 U/ml de TNF-α y 50 µl/ml de lisado; (8) GK1+TNF-α+lisado, 10 µg/ml de GK1, 500 U/ml de TNF-α y 50 µl/ml de lisado.

Las BMDCs se incubaron con los estímulos durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, el sobrenadante de cultivo de cada pozo se colectó y se centrifugó a 300 × g durante 10 min para eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes de los diferentes tubos se transfirieron a tubos nuevos, etiquetados y almacenados a -70°C para la posterior determinación de la concentración de citocinas producidas por las DCs, mediante ELISA.

5. 8. 2 Experimento in vivo

Las BMDCs se cosecharon al séptimo día de cultivo y sembraron en placas de 6 pozos de baja adherencia a una densidad de 5×10^6 BMDCs en 5 ml de medio R-10. Las BMDCs se trataron por duplicado con los estímulos siguientes: (1) Basal, sin ningún estímulo; (2) GK1, 10 $\mu\text{g/ml}$ de GK1; (3) TNF- α , 500 U/ml de TNF- α ; (4) lisado, 50 $\mu\text{l/ml}$ de lisado; (5) GK1+TNF- α , 10 $\mu\text{g/ml}$ del péptido GK1 y 500 U/ml de TNF- α ; (6) GK1+lisado, 10 $\mu\text{g/ml}$ del péptido GK1 y 50 $\mu\text{l/ml}$ de lisado, (7) TNF- α +lisado, 500 U/ml de TNF- α y 50 $\mu\text{l/ml}$ de lisado; (8) GK1+TNF- α +lisado, 10 $\mu\text{g/ml}$ de GK1, 500 U/ml de TNF- α y 50 $\mu\text{l/ml}$ de lisado.

Las BMDCs se incubaron con los estímulos durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Posteriormente, las BMDCs se colectaron en tubos cónicos de 15 ml para su uso posterior en la transferencia adoptiva a los ratones. Los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación se transfirieron a tubos nuevos, se etiquetaron y se almacenaron a -70 °C para la posterior determinación de la concentración de citocinas producidas por las DCs, mediante ELISA.

5. 9 Transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas a los ratones BALB/c

Después de que las BMDCs estimuladas se colectaron en los tubos cónicos de 15 ml, se procedió a lavarlas 3 veces para eliminar los restos de medio de cultivo y estímulos con los que fueron tratadas. Para esto, se resuspendieron en DPBS y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 10 min, repitiendo este proceso para cada lavado. Posteriormente, las BMDCs se resuspendieron en DPBS y se contaron en una cámara de Neubauer. A continuación, el volumen de los tubos se ajustó para tener una densidad celular de 2.5×10^3 BMDCs/ μl de PBS. Posteriormente se realizó la transferencia adoptiva de las BMDCs. Para esto, se formaron los siguientes 9 grupos de ratones cada uno con 3 individuos y cuya denominación corresponde al tratamiento que recibieron las BMDCs transferidas: (1) Control, no recibió la transferencia de las BMDCs. Los grupos 2 al 9 sí recibieron la transferencia de las BMDCs tratadas de la manera siguiente: (2) BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +lisado. Para llevar a cabo la transferencia adoptiva de las BMDCs a los ratones, éstos se inyectaron en la vena caudal derecha con la cantidad de 5×10^5 BMDCs en 200 μl de DPBS. Finalmente, los ratones fueron etiquetados de acuerdo al número de condición mediante rayas en la cola con marcador indeleble para su identificación.

5. 10 Infección de los ratones tratados con las BMDCs estimuladas con promastigotes de *Leishmania mexicana*

Una semana después de haber efectuado la transferencia adoptiva de las BMDCs tratadas, los 9 grupos de ratones fueron inoculados vía intradérmica/subcutánea en el cojinete plantar derecho con 2×10^5 promastigotes de *L. mexicana* cepa LAC en un volumen de 30 μ l de DPBS.

5. 11 Seguimiento del tamaño de las lesiones de los ratones tratados con las BMDCs estimuladas e infectados con *Leishmania mexicana*

Una semana después de haber infectado los ratones con los parásitos, se tomaron las medidas de la pata derecha (infectada) y la izquierda (sana) de los ratones de cada condición. Para efectuar dichas mediciones se empleó un medidor digital de grosor o caliper (iGaging®, modelo DTG-001, San Clemente, CA, USA) con el cual se tomó la medida desde la parte plantar hasta la parte dorsal de la pata. Las mediciones se efectuaron durante 10 semanas y la determinación del grosor de los cojinetes plantares corresponde a las diferencias entre la pata sana y la infectada de cada ratón.

5. 12 Cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de las BMDCs estimuladas

Los sobrenadantes obtenidos de la estimulación de las BMDCs se utilizaron para la cuantificación de las citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 producidas por las DCs. Para esto, se emplearon placas de 96 pozos de alta adherencia a las que se les añadió un anticuerpo de captura específico para cada citocina en las diluciones correspondientes (1 μ g/ml TNF- α , 2 μ g/ml IFN- γ , 1 μ g/ml IL12p40, 4 μ g/ml IL12p70; BD PharMingen Biosciences, San Jose, CA, USA), el cual fue incubado durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente, la placa se lavó para eliminar el anticuerpo no unido y se bloqueó con una solución de DPBS con BSA al 1% durante 30 min. Finalizado el tiempo de incubación, la placa se lavó y se añadieron las muestras problema y las curvas patrón para cada citocina (citocinas recombinantes de BD PharMingen Biosciences) y se incubaron durante 2 horas. A continuación se lavó la placa y se añadieron los anticuerpos de detección específicos para cada citocina acoplados a biotina en las diluciones

correspondientes (1 µg/ml TNF-α, 0.5 µg/ml IFN-γ, 0.25 µg/ml IL12p40, 1 µg/ml IL12p70 y µg/ml IL10; BD PharMingen Biosciences) y se incubó durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la placa y se añadió a cada pozo una solución de estreptavidina acoplada a fosfatasa alcalina a una dilución 1:2000 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y la placa se incubó durante 30 min. Posteriormente, a cada pozo de la placa se añadió una solución de p-nitrofenil fosfato (Sigma Aldrich) a una concentración de 0.005 mg/ml. Finalmente, la presencia de las citocinas se reveló en un lector de ELISA para microplacas (312e Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) a una longitud de onda de 405 nm con ayuda del programa KC4 que determinó las concentraciones de las citocinas de las muestras en pg/ml con base en los valores de absorbancia obtenidos de la curva patrón realizada con las citocinas recombinantes.

5. 13 Procesamiento histológico de los cojinetes plantares y ganglios poplíteos de los ratones infectados

Después de dar seguimiento al tamaño de las lesiones de los 9 grupos de ratones infectados durante 10 semanas, éstos se sacrificaron y se extirparon las extremidades inferiores, de las cuales se extrajeron los ganglios poplíteos. Tanto las extremidades inferiores como los ganglios obtenidos se fijaron en formol al 10%. Posteriormente, el hueso se separó del cojinete plantar y se desechó, mientras que los cojinetes plantares se colocaron en casetes de inclusión debidamente etiquetados. De forma similar, los ganglios poplíteos fijados se cortaron transversamente y se colocaron en casetes de inclusión. Los ganglios poplíteos y cojinetes plantares segmentados se lavaron 3 veces con agua corriente durante 10 min para eliminar el formol y posteriormente se deshidrataron mediante inmersiones seriadas en diferentes concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 95%, 95%, 100%, 100%) y finalmente se clarificaron con dos inmersiones de xilol para finalmente ser incluidos en parafina de grado histológico.

5. 14 Tinción con hematoxilina-eosina de los cortes histológicos de los cojinetes plantares de los ratones infectados

Se hicieron cortes histológicos de 2 μm de grosor de los cojinetes plantares infectados de los 9 grupos de ratones. Los cortes se desparafinaron mediante la inmersión en xilol absoluto, a continuación se rehidrataron sumergiéndolos en diferentes concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 95%, 70%, 50%) y finalmente se colocaron en vasos Koplín con agua destilada. Posteriormente, los tejidos se tiñeron con hematoxilina de Gill durante 5 min y se lavó el exceso de colorante. El primer lavado se hizo con agua destilada, después con alcohol ácido (metanol al 98% y ácido clorhídrico al 2%) y finalmente con agua destilada. A continuación, se añadieron unas gotas de solución amortiguada de Scott (sulfato de magnesio al 2 % y bicarbonato de sodio al 0.2 %) a las laminillas para virar el color de la hematoxilina y de inmediato se lavaron con agua destilada. Posteriormente, los tejidos se tiñeron con una solución acuosa de eosina durante 5 min y se deshidrataron mediante la inmersión en diferentes concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%, 100%) y después se aclararon sumergiéndolas en xilol. Finalmente, se hizo el montaje de las preparaciones, para lo cual se añadió resina sintética a las laminillas y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron secar toda la noche para su análisis posterior.

5. 15 Cuantificación de la carga parasitaria en las lesiones de los ratones mediante el conteo de amastigotes en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina

Los cortes histológicos de los cojinetes plantares murinos teñidos con hematoxilina-eosina se observaron en un microscopio de luz Imager M.1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) y se tomaron aleatoriamente 7 fotografías a un aumento de 400X por cada laminilla, correspondiendo a un área final de 1 mm^2 del tejido, para lo cual se empleó una cámara a color AxioCamMRC5 (Carl Zeiss). Posteriormente, se procedió a contar el número total de amastigotes de *L. mexicana* presentes en las fotografías de cada corte con el programa ImageJ 1.48v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

5. 16 Determinación de IL-12 en cortes histológicos de ganglios poplíteos de los ratones infectados mediante inmunohistoquímica

Los cortes de los ganglios poplíteos se colocaron en portaobjetos cargados positivamente (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA), se desparafinaron sumergiéndolos en xilol y después se rehidrataron sumergiéndolos en diferentes concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 95%, 70%, 50%). A continuación, los tejidos se sometieron a un proceso de reactivación antigénica, para lo cual se calentaron en el horno de microondas por debajo del punto de ebullición durante 15 minutos en un buffer de citratos (10 mM de citrato de sodio, 0.05% Tween 20, pH 6). Las laminillas se lavaron con agua corriente y a continuación con el buffer de lavado Tris buffer salino con Tween 20 (TBST), compuesto de 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y Tween 20 al 1 %. Posteriormente, se añadió a las laminillas una solución de peróxido de hidrógeno al 3%, la cual se dejó actuar durante 10 min, para bloquear los sitios catalíticos de la peroxidasa endógena de los tejidos. Los cortes se lavaron con TBST y se añadió un buffer de bloqueo compuesto por 1% de BSA y 5% de suero de caballo, durante 30 minutos en una cámara húmeda para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario al tejido. Pasado el tiempo de bloqueo, se decantó el buffer de bloqueo de las laminillas y se añadió el anticuerpo primario anti-IL12p40/p70 de ratón hecho en rata (PharMingen Biosciences) en una dilución 1:100 en tris buffer salino (TBS) (50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl) y BSA al 1%. A las laminillas que se emplearon como control del anticuerpo secundario no se les añadió el anticuerpo primario sino únicamente TBS y BSA al 1%. Las laminillas se incubaron durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las laminillas se lavaron con TBST para eliminar el anticuerpo primario no unido y se añadió el anticuerpo secundario anti-rata hecho en cabra y acoplado a peroxidasa (PharMingen Biosciences), en una dilución 1:100 en TBS y BSA al 1%, el cual se dejó actuar en los tejidos durante una hora a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación, se añadió el sustrato 3,3'-Diaminobencidina (Sigma Aldrich) a las laminillas, las cuales se revisaron constantemente al microscopio óptico para detectar la presencia de IL12p40/p70. Después, la reacción se detuvo lavando las laminillas con agua destilada. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Gills durante 2 minutos, a continuación se viró el color de la hematoxilina añadiendo unas gotas de solución amortiguada de Scott (2% sulfato de magnesio y 0.2% bicarbonato de sodio) y de inmediato se lavaron con TBST. A continuación los tejidos se deshidrataron, para lo cual las laminillas se sumergieron en diferentes concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 95%, 100%, 100%) y después se aclararon con xilol. Finalmente, se hizo el montaje de las

preparaciones, para lo cual se añadió resina sintética a las laminillas y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron secar toda la noche y se guardaron para su análisis posterior.

5. 17 Análisis estadístico de los resultados

Los datos se expresaron como la media de los valores obtenidos \pm la desviación estándar (SD). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba t de Student con el programa JMP 8.0.2 (Copyright © 2009, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las BMDCs mediante citometría de flujo

Las BMDCs se cosecharon en el día 7 de cultivo y se tiñeron con anti-CD11c conjugado con PE, anti-CD11b conjugado con FITC, anti-I-A/I-E conjugado con FITC y anti-CD86 conjugado con FITC. Posteriormente, las BMDCs teñidas con los marcadores fueron leídas en un citómetro FACSCAN y los datos se analizaron con el programa WinMDI 2.9.

El 68.6% de las células fueron positivas para el marcador CD11c (cadena alfa del receptor para complemento tipo 4 o CR4) (fig. 7A), una molécula altamente expresada en las DCs de origen mieloide, por lo que se emplea como un marcador importante para identificarlas. El 78.9% de las células expresaron CD11b (cadena alfa del receptor para complemento tipo 3, CR3 o MAC-1) (fig. 7B), el cual se expresa preferencialmente en las células del linaje mieloide.

Para analizar el grado de madurez de las BMDCs se evaluó la expresión del MHC-II (fig. 7C), el cual se expresa en niveles bajos en la superficie de las BMDCs inmaduras y aumenta en el estadio maduro. Se observa que las BMDCs presentaron niveles bajos a intermedios de MHC-II, que corresponden principalmente a BMDCs inmaduras y en menor proporción a BMDCs maduras. Además, se midió la expresión de CD86, una molécula coestimuladora cuya expresión aumenta conforme las BMDCs maduran. Las células presentaron niveles bajos de CD86 (fig. 7D), lo que corresponde principalmente a una población de BMDCs inmaduras. Estos resultados en conjunto permitieron identificar a las células cultivadas, como BMDCs de origen mieloide $CD11c^+CD11b^+$ y con un fenotipo inmaduro $MHC-II^{Int}CD86^{Baj}$.

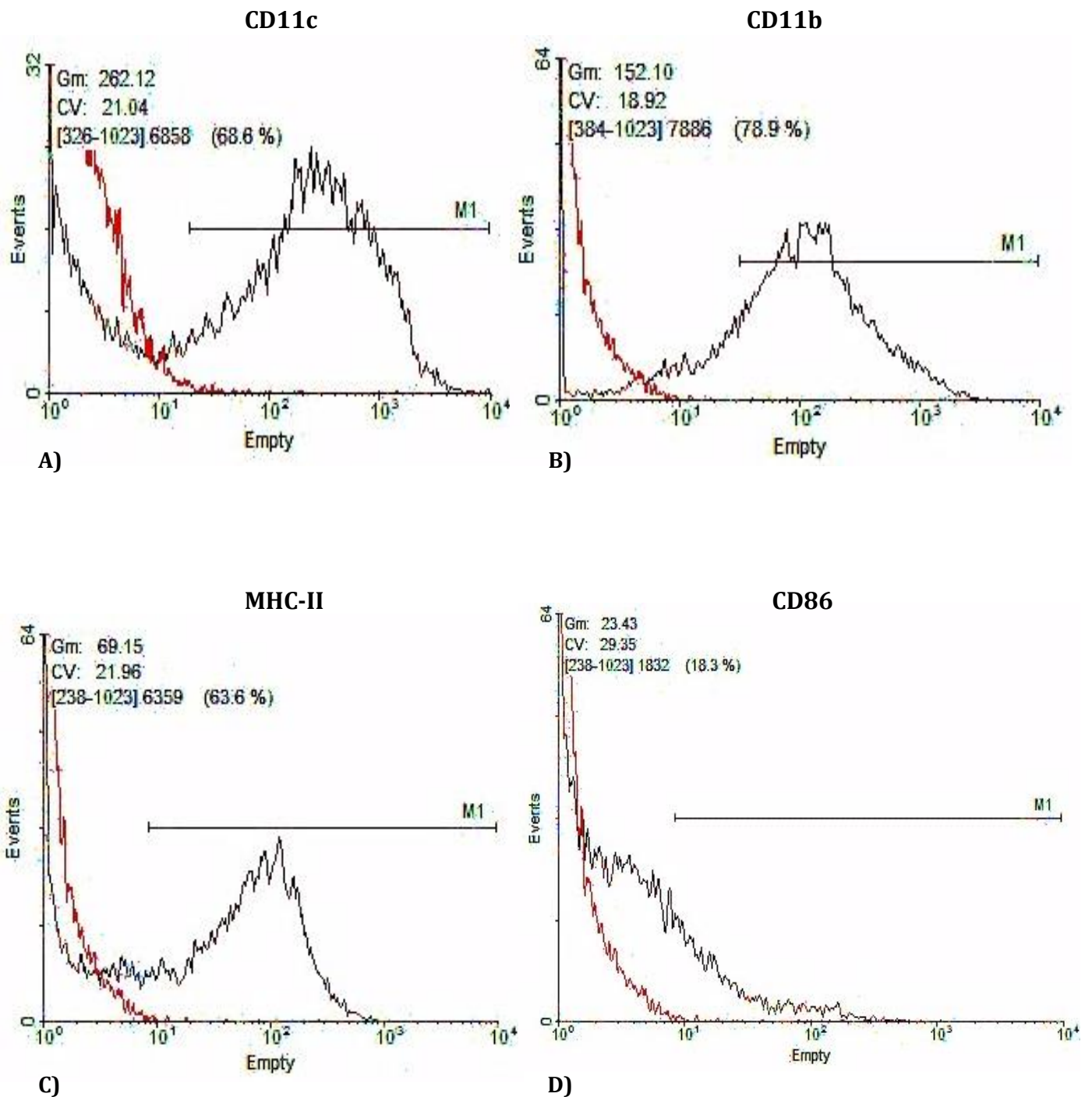


Figura 7. Caracterización de las BMDCs mediante citometría de flujo. Las BMDCs se cosecharon en el día 7 de cultivo y se analizó por citometría de flujo la expresión de los siguientes marcadores de superficie: (A) CD11c, (B) CD11b, (C) MHC-II y (D) CD86. Los histogramas de color rojo representan al control de las células sin teñir, los histogramas de color negro representan a las células teñidas y las líneas horizontales indican el porcentaje de células positivas para cada uno de los marcadores.

6.2 Cuantificación de citocinas en los sobrenadantes de las BMDCs estimuladas

Las BMDCs se cosecharon en el día 7 de cultivo y se estimularon con GK1, TNF- α y un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en forma individual y combinada. El TNF- α se empleó como un estímulo para inducir la maduración de las BMDCs (Lutz et al., 2009). Con el fin de analizar el efecto de los estímulos anteriormente mencionados en la producción de citocinas por las BMDCs, se detectó y cuantificó mediante ELISA la presencia de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL12 en los sobrenadantes de las BMDCs estimuladas. En cuanto a la detección de IL-12, se cuantificaron las subunidades de IL-12p40 que producen las BMDCs en altas cantidades y de IL-12p70, la cual se produce en menor cantidad y posee la función biológica de la citocina.

Las BMDCs produjeron la mayor cantidad de TNF- α después de haber sido estimuladas con el péptido GK1 en combinación con el lisado de promastigotes. El estímulo individual con GK1 indujo un incremento ligero en la producción de TNF- α con respecto al basal, mientras que el estímulo individual con el lisado no tuvo ningún efecto en la producción de TNF- α (fig. 8).

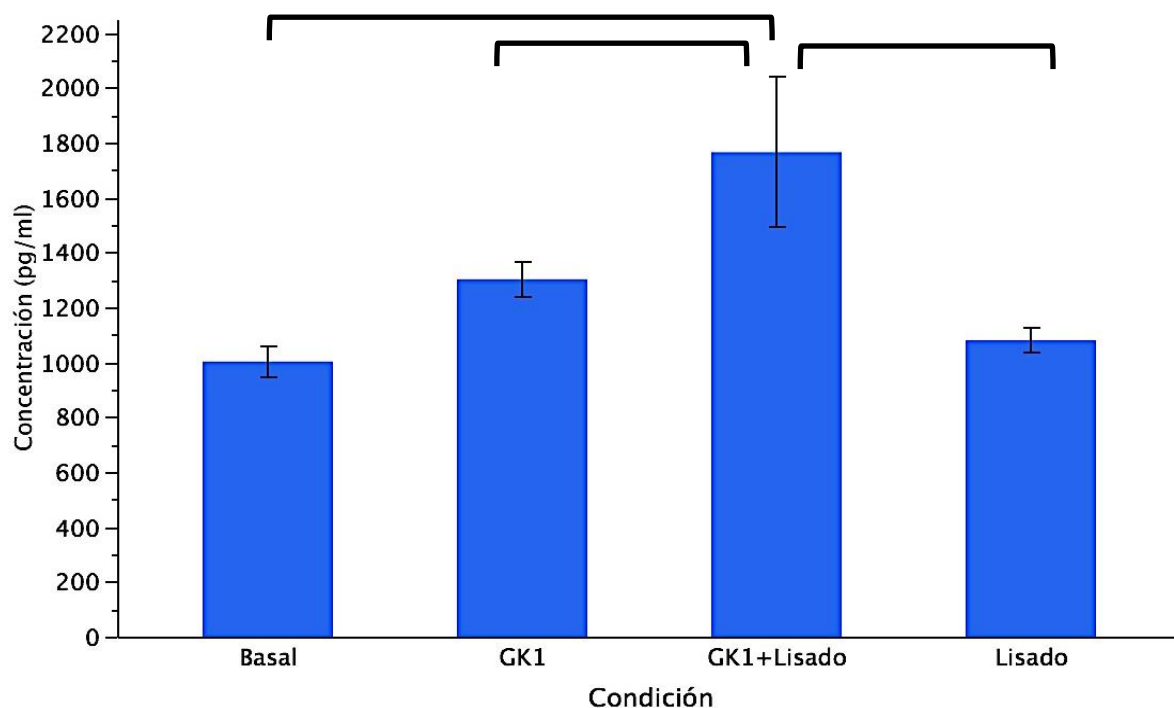


Figura 8. Producción de TNF- α por las BMDCs estimuladas con GK1 y un lisado de promastigotes. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar ($p < 0.05$). Las líneas horizontales en la parte superior de la figura indican las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones.

En cuanto a la producción de IFN- γ , las BMDCs secretaron esta citocina después de haber sido estimuladas con TNF- α y GK1 solos, así como en combinación con el lisado. El TNF- α se empleó como estímulo para inducir la maduración de las BMDCs. La mayor producción de IFN- γ se indujo con TNF- α y GK1 combinados. El lisado por sí solo no indujo una producción significativa de IFN- γ por las BMDCs (fig. 9).

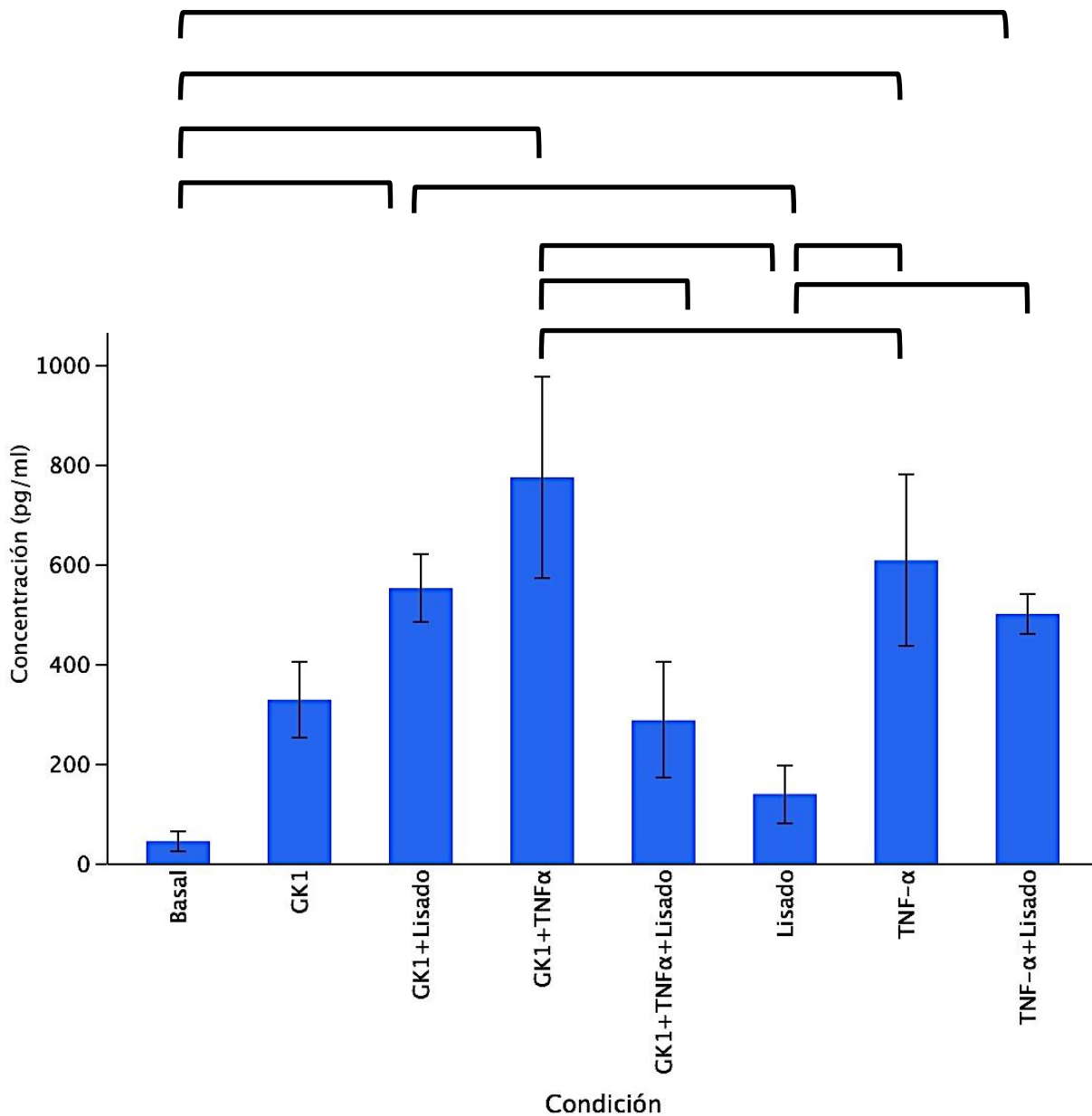


Figura 9. Producción de IFN- γ por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y un lisado de promastigotes. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar ($p < 0.05$). Las líneas horizontales en la parte superior de la figura indican las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones.

Con respecto a la producción de IL-12p40 por las BMDCs, se observa que los estímulos de TNF- α , GK1 y el lisado, tanto de manera individual como en combinación, indujeron altos niveles de IL-12p40 (fig. 10). La máxima cantidad de IL-12p40 se produjo en respuesta a los estímulos con GK1+TNF- α así como con GK1+lisado. El lisado por sí solo no indujo una producción significativa de IL-12p40 por las BMDCs.

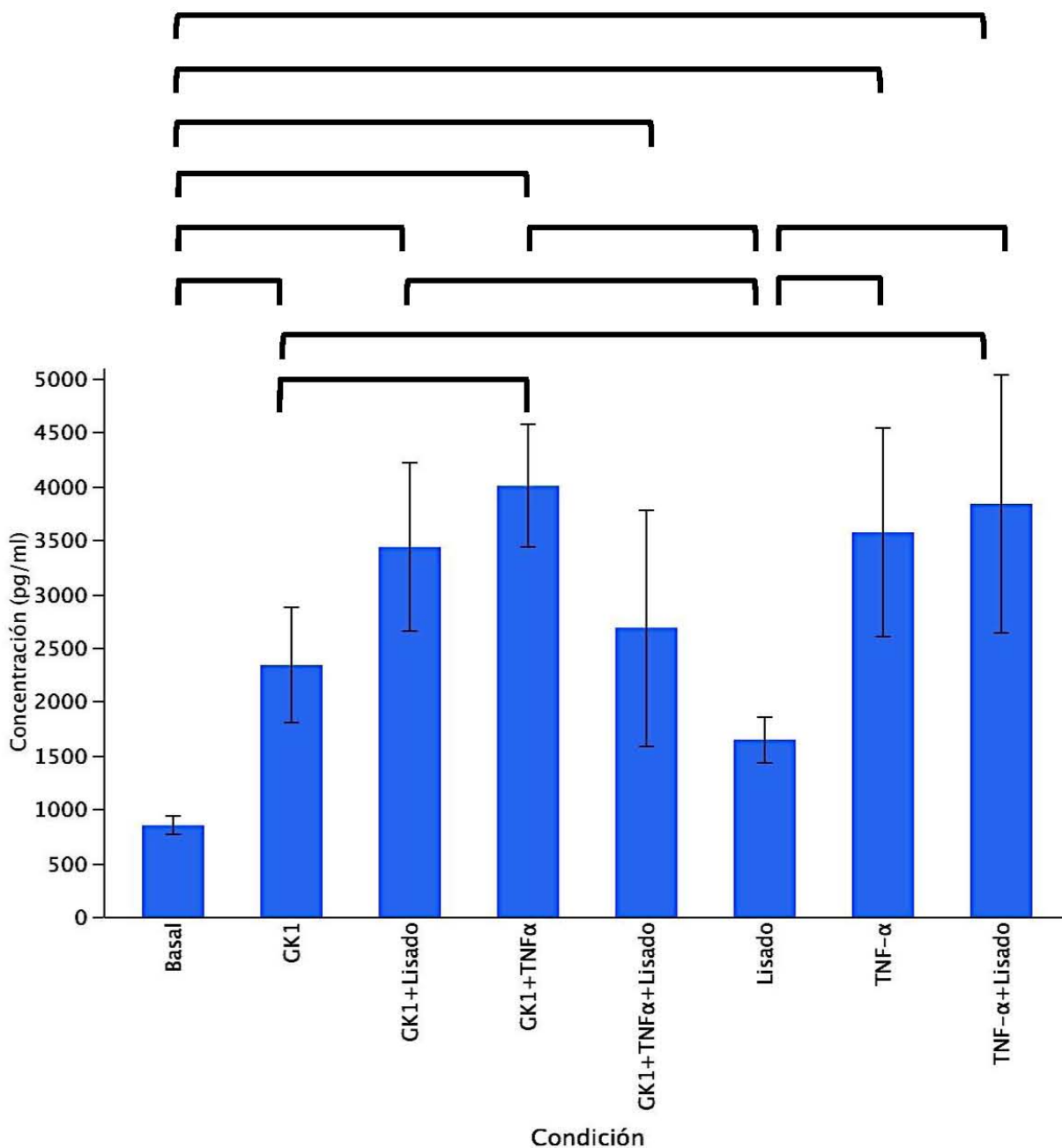


Figura 10. Producción de IL-12p40 por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y un lisado de promastigotes. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar ($P < 0.05$). Las líneas horizontales en la parte superior de la figura indican las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones.

La producción de IL-12p70 (fig. 11) se indujo con los estímulos de TNF- α y GK1 solos, así como en combinación con el lisado. La máxima cantidad de IL-12p70 se produjo en respuesta al estímulo con GK1+TNF- α . El lisado por sí solo no indujo una producción significativa de IL-12p70 por las BMDCs.

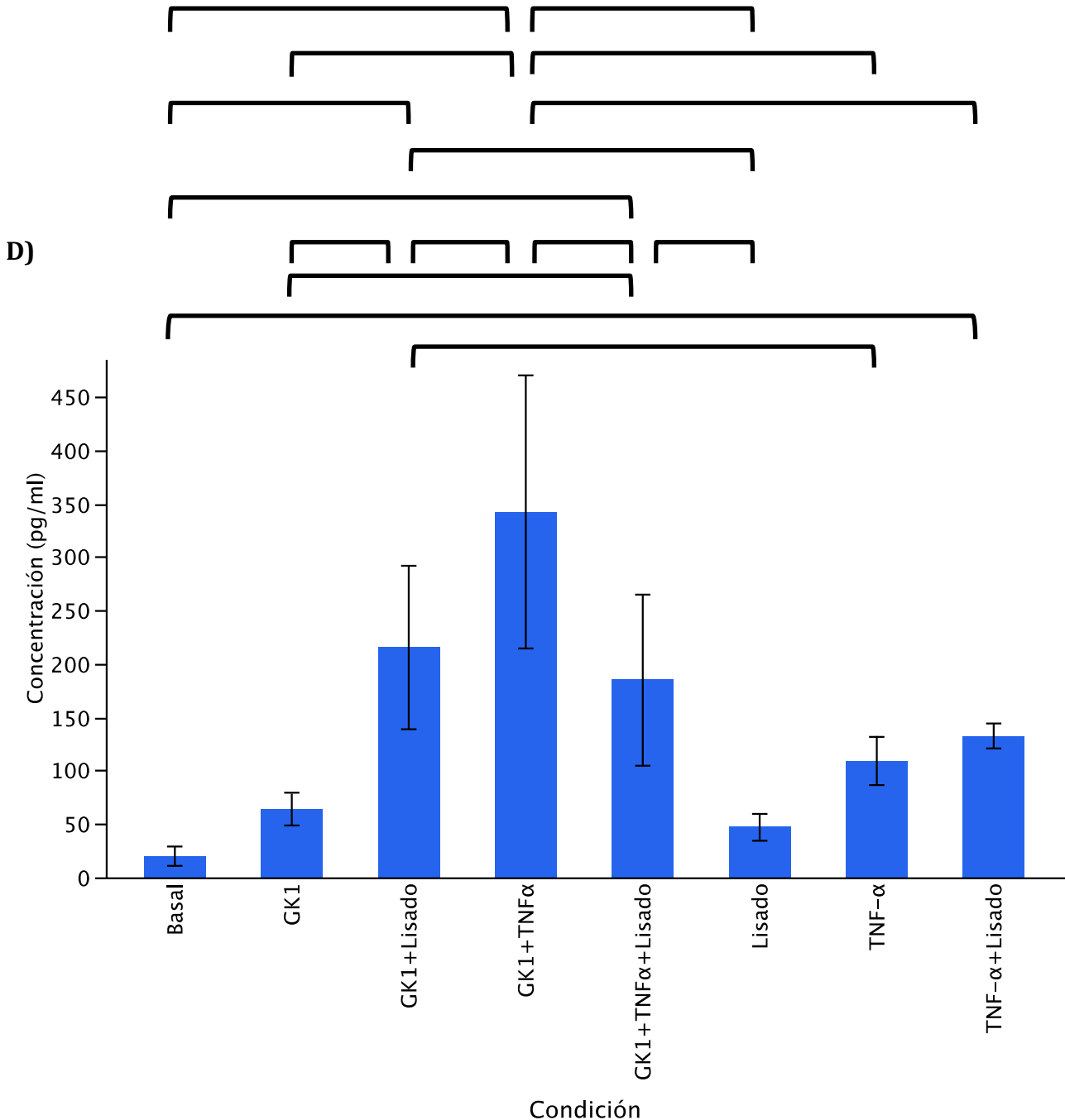


Figura 11. Producción de IL-12p70 por las BMDCs estimuladas con GK1, TNF- α y un lisado de promastigotes. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar ($P < 0.05$). Las líneas horizontales en la parte superior de la figura indican las diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones.

6.3 Seguimiento del tamaño de las lesiones de los ratones tratados con las BMDCs estimuladas e infectados con *L. mexicana*

Después de haber demostrado el efecto de GK1, TNF- α y un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la producción de citocinas proinflamatorias por las BMDCs in vitro, se procedió a analizar el efecto de dichas BMDCs estimuladas en la infección de ratones con promastigotes de *L. mexicana* con el objetivo de determinar si las BMDCs lograrían controlar la infección. Para esto se formaron 9 grupos de ratones que corresponden a los diferentes estímulos que recibieron las BMDCs. El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, mientras que los grupos 2 al 9 sí recibieron la transferencia de las BMDCs estimuladas como se indica a continuación: (2) Basal o BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +Lisado. Una semana después de que se realizó la transferencia de las BMDCs estimuladas a los ratones, éstos se infectaron con promastigotes de *L. mexicana* en el cojinete plantar derecho. Posteriormente, se midió semanalmente la diferencia entre el grosor del cojinete plantar infectado y el sano durante 10 semanas (figuras 12-14). Al finalizar la medición del desarrollo de las lesiones en el tiempo de infección establecido, las extremidades infectadas de los ratones se midieron, cortaron y fotografiaron (fig. 15).

En las 3 figuras siguientes se muestra la diferencia promedio en el tamaño de las lesiones de los diferentes tratamientos aplicados a los ratones a lo largo de las 10 semanas que duró el experimento. La fig. 12 muestra todos los tratamientos y con el fin de facilitar su lectura dichos resultados se separaron en dos figuras: la fig. 13 muestra los 2 grupos cuyo tratamiento impidió el desarrollo de lesiones de gran tamaño, mientras que la fig. 14 muestra el resto de grupos en los que el tratamiento no impidió el desarrollo de lesiones grandes.

En la fig. 12 se observa que a partir de la semana 2 las lesiones mostraron un tamaño diferente entre los diferentes tratamientos. El grupo (1) control que no recibió la transferencia de las BMDCs estimuladas desarrolló las lesiones de mayor tamaño a partir de la semana 3. De forma similar, el grupo (2) basal que recibió las BMDCs no estimuladas desarrolló lesiones de gran tamaño a partir de la semana 2. Por el contrario, los grupos (7) GK1+lisado y (8) TNF- α +lisado desarrollaron las lesiones de menor tamaño de todos los tratamientos a partir de la semana 5 y hasta finalizar el experimento, cuyas diferencias en el tamaño de las lesiones con respecto al grupo (1) control son estadísticamente significativas a partir de la semana 3 (fig. 13). Inclusive, se puede observar que con estos tratamientos el tamaño de las lesiones disminuye en la semana 3 (ver \uparrow en fig. 13).

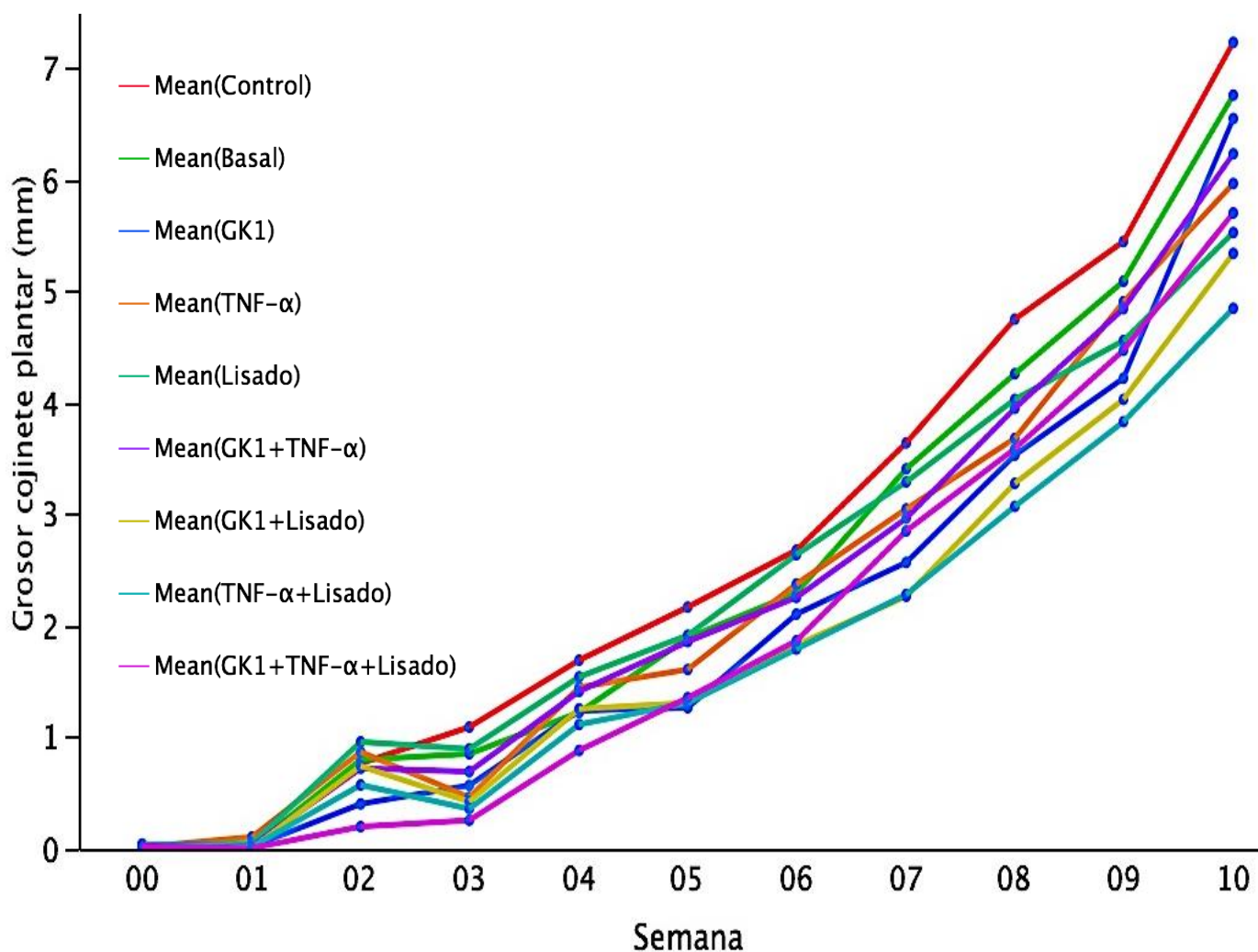


Figura 12. Desarrollo de la infección por *L. mexicana* en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar. Se muestra el promedio de las diferencias entre el tamaño del cojinete plantar infectado y el sano de tres ratones por tratamiento. Esta figura muestra todos los tratamientos y con el fin de facilitar su lectura se presentan los tratamientos en forma separada en las dos figuras siguientes (figs. 13 y 14). Se han omitido las barras de desviación estándar, las cuales se muestran posteriormente en las figuras 13 y 14. El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, los grupos 2 al 9 sí recibieron la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas: (2) basal, BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +lisado.

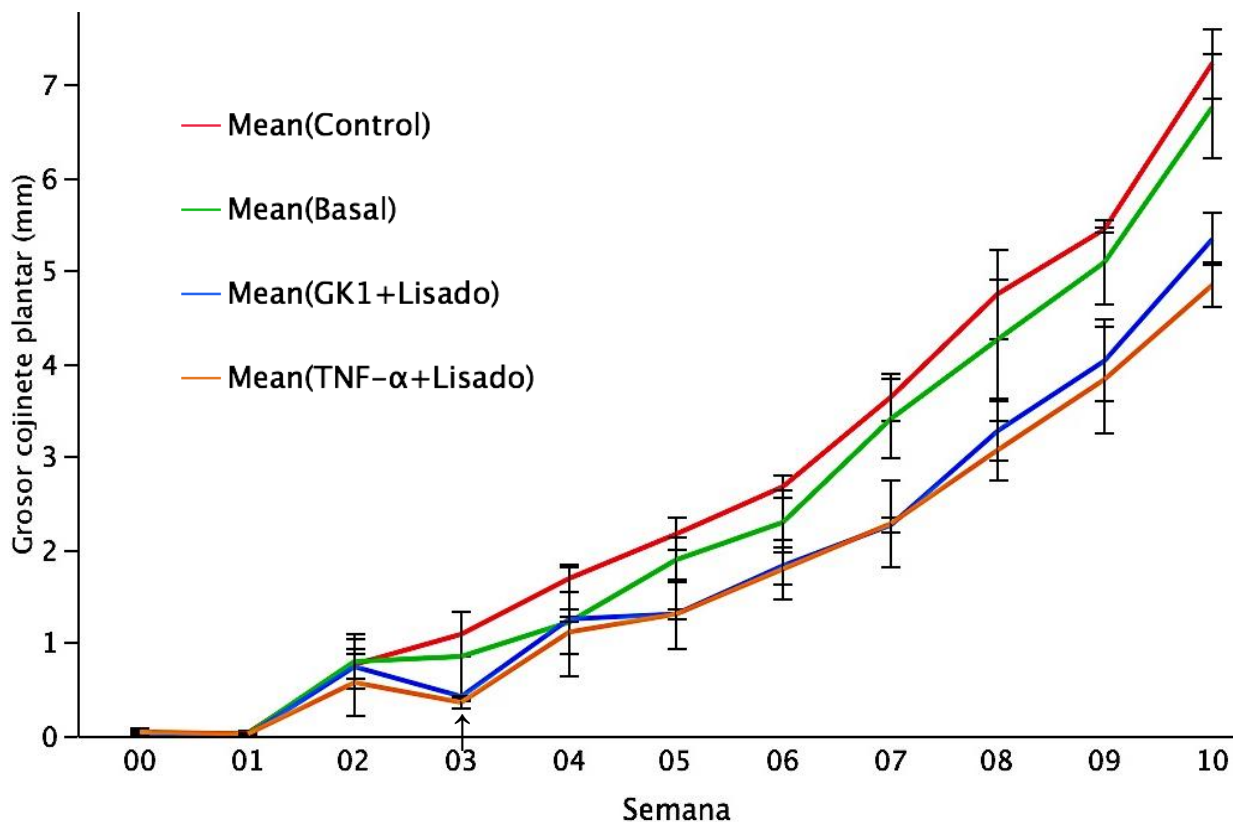


Figura 13. Desarrollo de la infección por *L. mexicana* en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar. Los valores son el promedio de las diferencias del cojinete plantar infectado contra el sano de tres ratones por cada tratamiento \pm la desviación estándar ($P < 0.05$). Se muestran los grupos 7) GK1+lisado y (8) TNF- α +lisado que desarrollaron las lesiones de menor tamaño en comparación con los grupos (1) control y (2) basal.

El grupo (9) GK1+TNF- α +lisado desarrolló lesiones de tamaño pequeño entre las semanas 2 y 5, a partir de la cual las lesiones continuaron creciendo (fig. 14). Sin embargo, al final del experimento, las lesiones de este grupo mostraron un tamaño menor que las de los grupos (1) control y (2) basal, cuyas diferencias resultaron estadísticamente significativas hasta el final de la infección. En cambio, los grupos (3) GK1, (4) TNF- α , (5) lisado y (6) GK1+TNF- α desarrollaron lesiones de un tamaño intermedio (fig. 14 y 15), cuya diferencia al final del experimento con respecto a los grupos (1) control y (2) basal no resultó estadísticamente significativa. Interesantemente, sólo el grupo (3) GK1 logró reducir el tamaño de las lesiones únicamente en la semana 5, a partir de la cual continuaron creciendo.

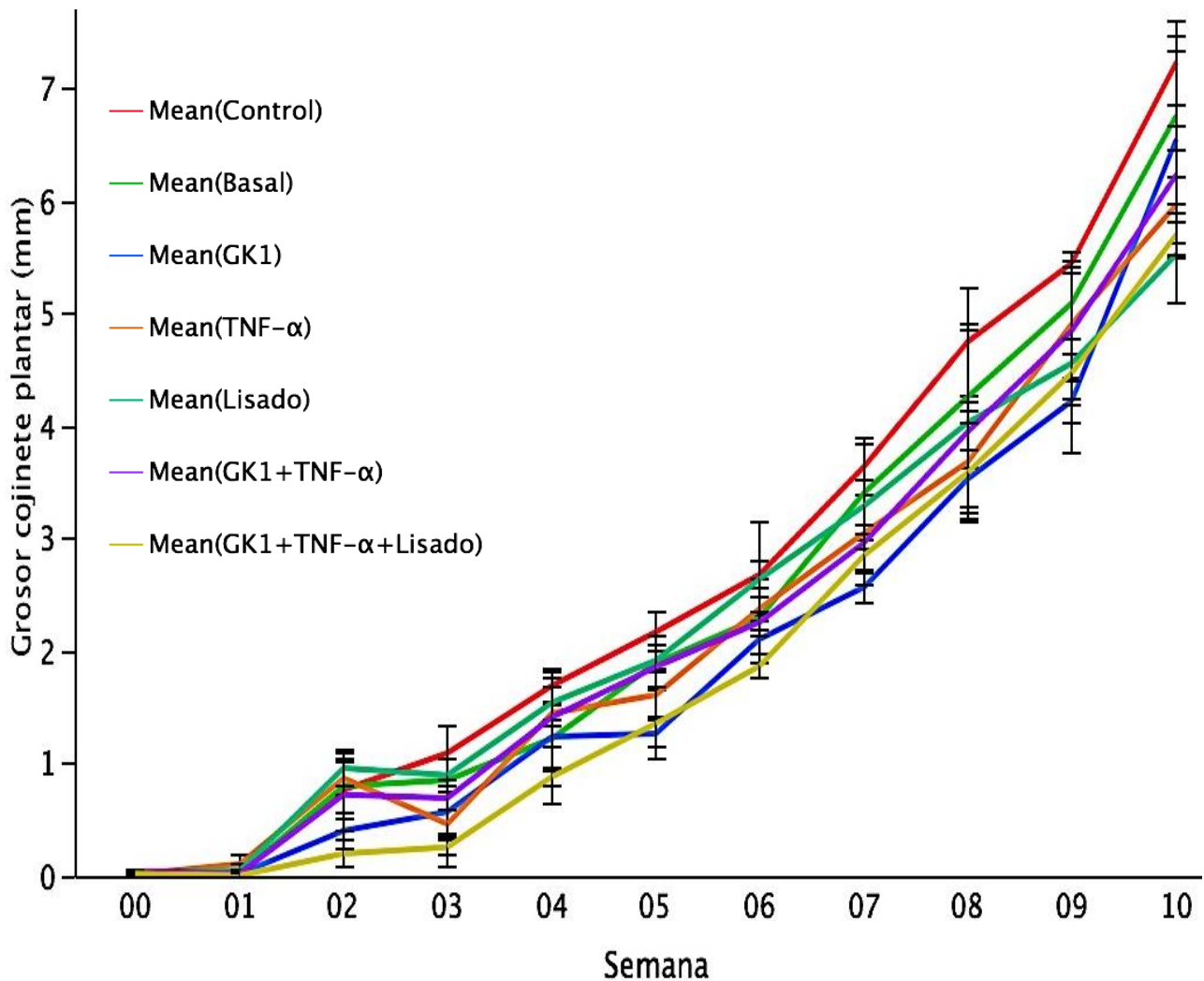


Figura 14. Desarrollo de la infección por *L. mexicana* en los ratones determinado mediante el cambio en el tamaño de la lesión en el cojinete plantar. Los valores son el promedio de las diferencias del cojinete plantar infectado contra el sano de tres ratones por cada tratamiento \pm la desviación estándar ($P < 0.05$). Se muestran los 7 grupos de ratones que desarrollaron las lesiones de mayor tamaño: El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, los grupos 2 al 9 sí recibieron la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas: (2) basal, BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (9) GK1+TNF- α +lisado.

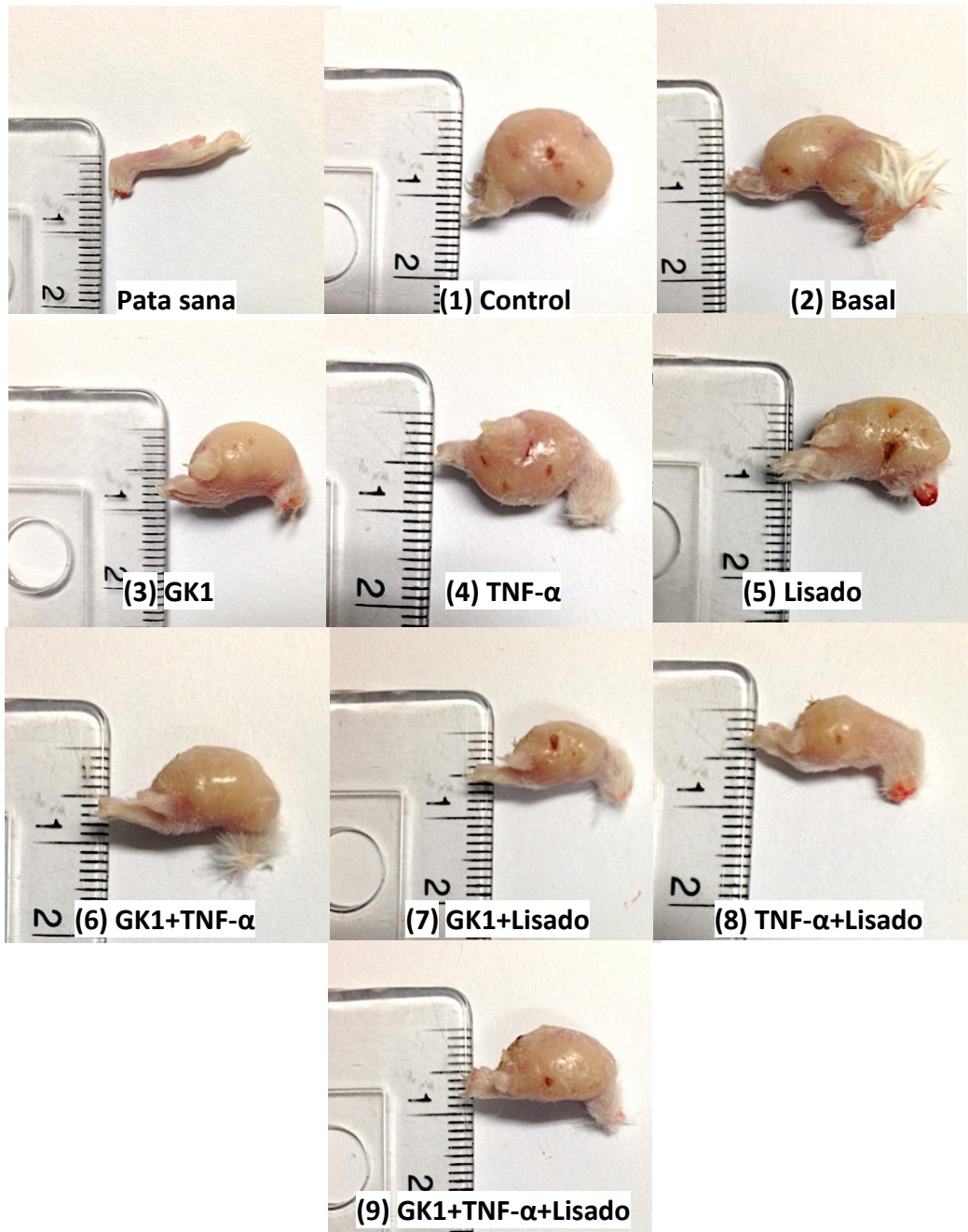
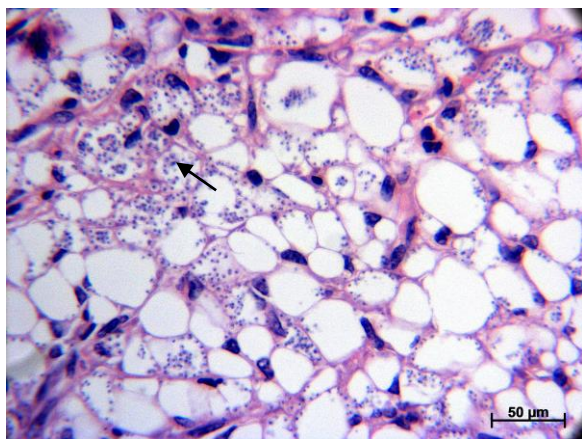


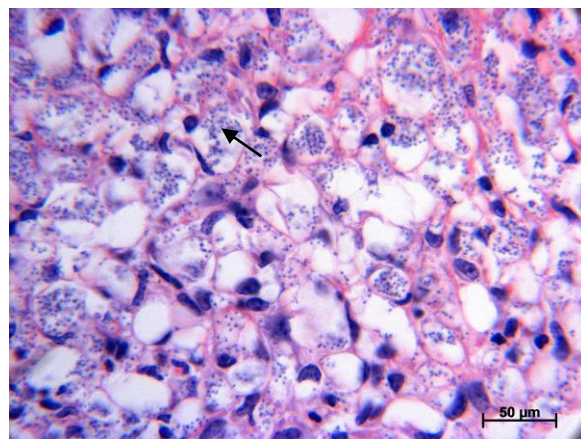
Figura 15. Tamaño final de las lesiones de los ratones a las 10 semanas posteriores a la infección con los promastigotes de *L. mexicana*. El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, los grupos 2 al 9 sí recibieron la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas: (2) basal, BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +lisado. Las imágenes son representativas del tamaño de la lesión de un ratón por cada tratamiento.

6.4 Cuantificación de la carga parasitaria en las lesiones de los ratones mediante el conteo de amastigotes en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina

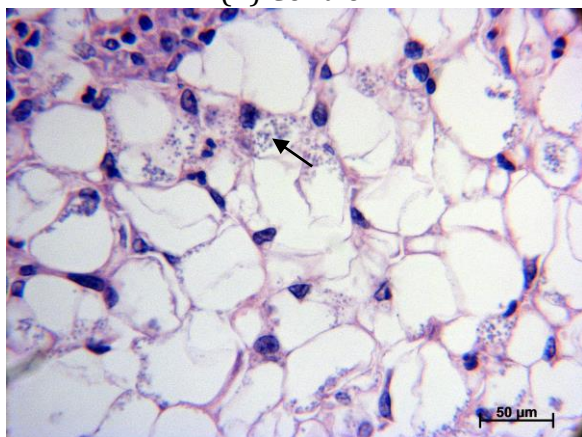
Al finalizar el seguimiento de la infección en los ratones, se procedió a determinar la carga parasitaria mediante el conteo de los amastigotes presentes en las lesiones con el fin de determinar si la diferencia en el tamaño de la lesión entre los tratamientos está relacionada con la cantidad de parásitos presentes en los tejidos. Para esto, se realizaron cortes histológicos de los cojinetes plantares incluidos en parafina, los cuales se tiñeron con HE y se observaron al microscopio. Se tomaron 7 fotografías a 400X de las laminillas de los diferentes tratamientos, que corresponden a un área final de 1 mm² de tejido. En la fig. 16 se muestra un campo representativo fotografiado por cada condición, el cual se empleó para la cuantificación de los parásitos. En la fig. 17 se muestra el número total de amastigotes presentes por mm² de tejido. En ambas figuras (figs. 16 y 17) se observa que la mayor cantidad de parásitos se encontró en los grupos (1) control, (2) basal y (5) lisado. Por el contrario, la menor cantidad de parásitos se encontró en los grupos (7) GK1+lisado y (8) TNF- α +lisado, mientras que el resto de los grupos mostraron un número de parásitos intermedio.



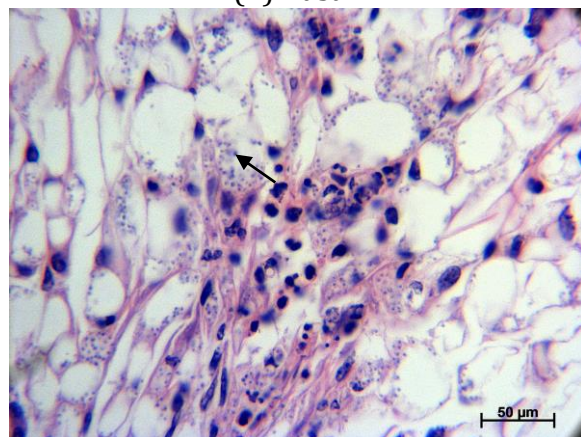
(1) Control



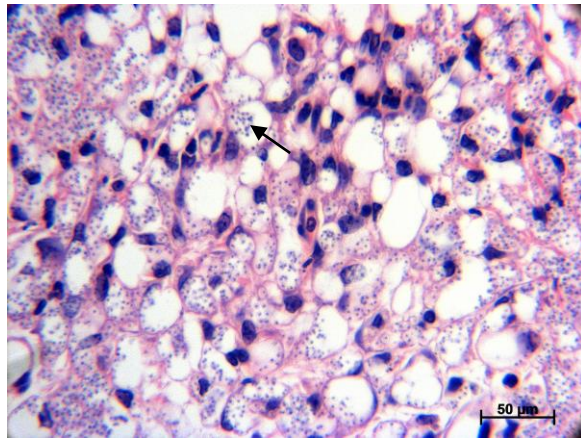
(2) Basal



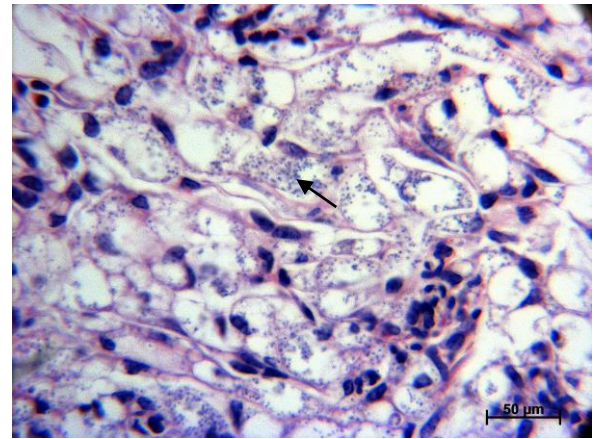
(3) GK1



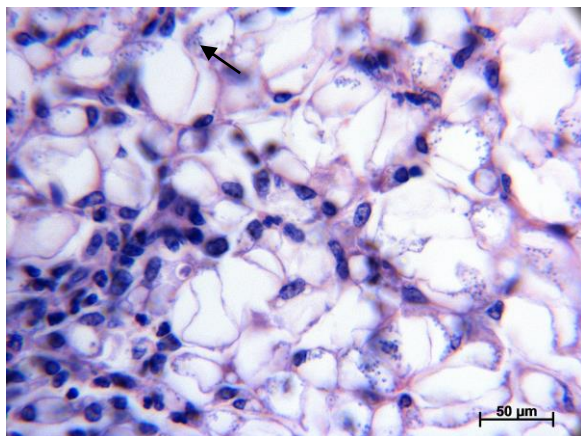
(4) TNF- α



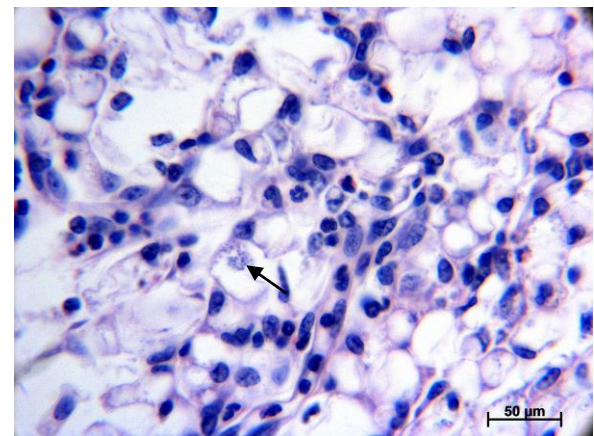
(5) Lisado



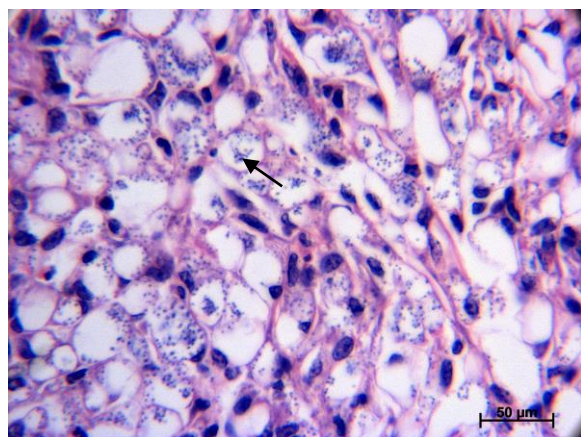
(6) GK1+TNF- α



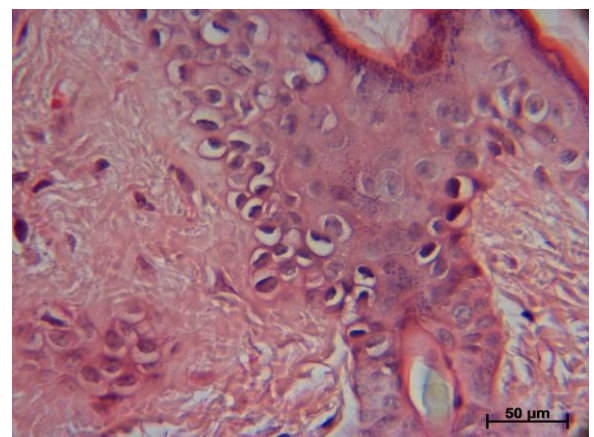
(7) GK1+Lisado



(8) TNF- α +Lisado



(9) GK1+TNF- α +Lisado



Ratón sano

Figura 16. Fotomicrografía de los cortes histológicos de las lesiones teñidos con HE (400X). El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, los grupos 2 al 8 sí recibieron la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas: (2) Basal, BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +lisado. Se muestra un campo representativo por cada condición. La barra en la parte inferior derecha equivale a 50 μ m. La flecha señala los amastigotes.

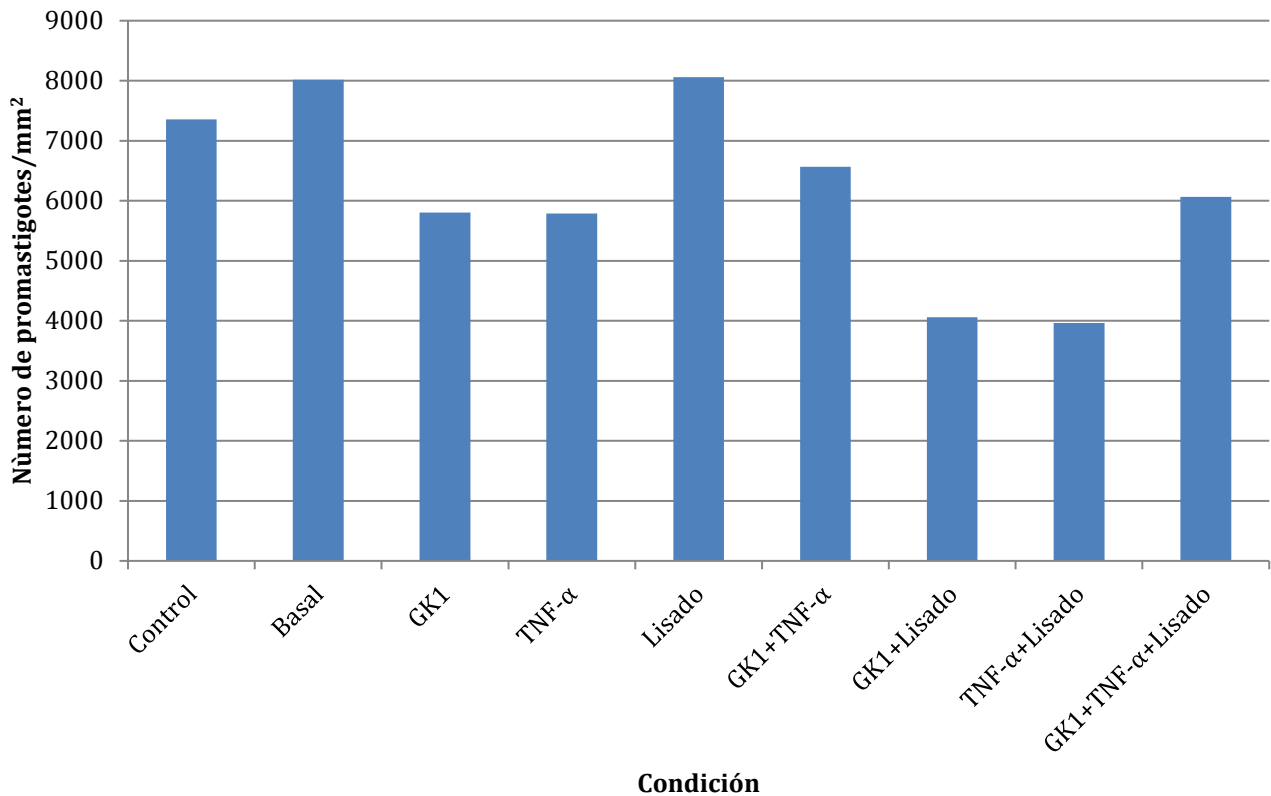
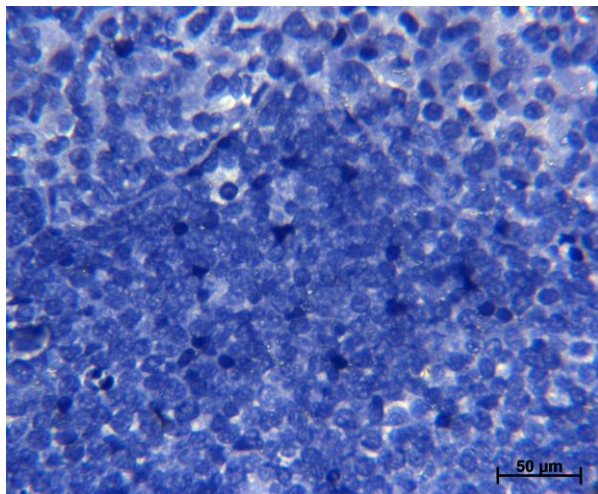


Figura 17. Número total de amastigotes presentes en un área de 1 mm² de tejido de las lesiones de los ratones. El grupo (1) control no recibió la transferencia de las BMDCs, los grupos 2 al 8 sí recibieron la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas: (2) Basal, BMDCs sin ningún estímulo; (3) GK1; (4) TNF- α ; (5) lisado; (6) GK1+TNF- α ; (7) GK1+lisado; (8) TNF- α +lisado; (9) GK1+TNF- α +lisado. La carga parasitaria es representativa de un ratón por tratamiento.

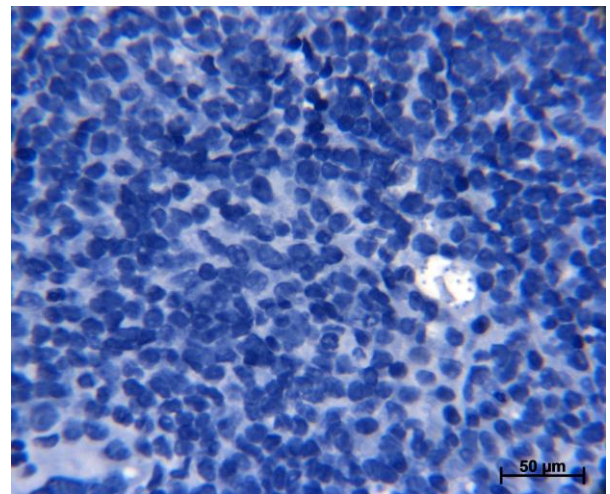
6.5 Producción de IL-12 en los ganglios poplíteos de los ratones infectados

Las laminillas de los cortes histológicos de los ganglios poplíteos empleados en la inmunohistoquímica anti IL-12 descrita en la metodología, se analizaron en un microscopio de luz Imager M.1 (Zeiss, Germany) y fotografiaron con una cámara a color AxioCamMRc5 (Zeiss, Germany) en busca de alguna reacción colorimétrica positiva, cuya coloración café revelara la presencia de IL-12 en el tejido, con el objetivo de determinar si la producción de esta citocina pudiese estar promoviendo la diferenciación de los linfocitos hacia una respuesta T_H1. En la figura 18 se muestra un campo representativo de la inmunohistoquímica anti IL-12 en los cortes histológicos de los ganglios poplíteos de 3 grupos seleccionados de los ratones infectados: el grupo control que no recibió la transferencia de las BMDCs estimuladas y los grupos que recibieron las BMDCs tratadas con GK1+lisado y TNF- α +lisado. Los ganglios

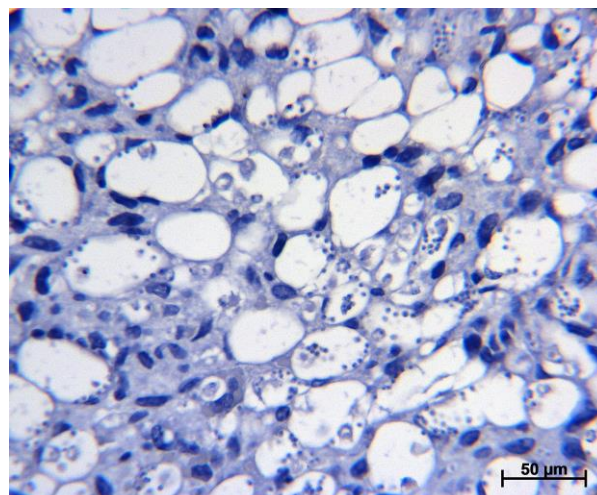
poplíteos se encuentran en cercanía al sitio de la lesión en la que el parásito fue inoculado. Por lo tanto, el ganglio poplíteo un tejido en el que se esperaría una importante presentación antigénica por las DCs dérmicas que hayan capturado al parásito en el sitio cercano a la lesión. Al observar los resultados de la inmunohistoquímica no se encontró la presencia de IL-12 que se estuviese siendo secretada por las poblaciones celulares del ganglio. Sin embargo, sí logró observar una diferencia importante entre los ganglios de los diferentes tratamientos, ya que en la mayor parte de la zona subcapsular del ganglio poplíteo del grupo control se encontró una gran cantidad de células infectadas con amastigotes de *L. mexicana*. Es muy probable que las células infectadas se traten de DCs dérmicas infectadas que migraron desde el sitio cercano de la lesión hasta el ganglio más cercano (el poplíteo), en donde a su vez pueden infectar a más DCs y macrófagos que residen en el mismo ganglio. Por el contrario, en los ganglios poplíteos de los grupos GK1+lisado y TNF- α +lisado hubo muy pocos parásitos y en cambio, se observó una alta densidad de poblaciones de células (fig. 18).



GK1+lisado



TNF- α +lisado



Control

Figura 18. Inmunohistoquímica anti IL-12 en ganglios poplíteos de los ratones infectados. El grupo control no recibió la transferencia de BMDCs, a diferencia de los grupos GK1+lisado y

TNF- α lisado. Se muestra un campo representativo por tratamiento. La barra en la parte inferior derecha equivale a 50 μ m.

7. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es un problema de salud que afecta a 12 millones de personas en el mundo con 1.3 millones de casos nuevos y entre 20,000 a 30,000 defunciones anuales. Es una enfermedad que se presenta en 98 países y se calcula que existen 350 millones de personas expuestas al riesgo de infección por su agente causal, el parásito *Leishmania* (WHO, 2015). Existen algunos fármacos que son eficaces en combatir y resolver la leishmaniasis tales como los Antimoniales Pentavalentes, Anfotericina B, Paromomicina, Pentamidina, Miltefosina, entre otros. Sin embargo, el empleo de la quimioterapia para controlar la leishmaniasis resulta tóxico, caro o de larga duración para el paciente (McGwire y Satoskar, 2014). Por otro lado, cada vez se reportan más cepas de *Leishmania* resistentes a los fármacos, por lo que en la actualidad se requieren tratamientos alternativos para prevenir y resolver la leishmaniasis. Existen diferentes candidatos de vacunas (por ejemplo, la administración de antígenos anti-*Leishmania* con dinucleótidos CpG) e inmunoterapias con diferentes niveles de eficacia en la prevención y control de esta enfermedad (Kumar y Engwerda, 2014), de las cuales una estrategia novedosa que se ha empleado es la inmunoterapia con células dendríticas en el modelo murino, denominada también terapia de vacunación celular o vacunación con células dendríticas (Wimmers et al., 2014).

Las DCs juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune contra *Leishmania*, promoviendo la diferenciación de los linfocitos T vírgenes a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores y de memoria específicos contra el parásito (Kumar y Engwerda, 2014). Diferentes estudios han demostrado que la transferencia en ratones de DCs cargadas con lisados y antígenos de *Leishmania* confieren protección inmunológica contra la infección (Von Stebut et al., 2000; Berberich et al., 2003; Ramírez et al., 2004; Remer K. et al., 2007; Agallou et al., 2011; Masic et al., 2012; Agallou et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Majumder et al., 2014). Estos estudios han empleado BMDCs, LCs y pDCs cargadas con parásitos lisados o con antígenos específicos de las especies *L. major*, *L. infantum* y *L. donovani* y adyuvantes tales como dinucleótidos CpG, TNF- α , entre otros. Sin embargo, ningún estudio ha evaluado el efecto de la inmunoterapia con BMDCs en la infección de ratones por *L. mexicana*.

El empleo de adyuvantes en la inmunoterapia con DCs es de suma importancia para asegurar que las DCs expresen un fenotipo maduro y de esta forma puedan inducir inmunidad, a diferencia de las DCs inmaduras que inducen tolerancia inmunológica. Uno de los adyuvantes que se ha empleado en la inmunoterapia con DCs es el péptido GK1, el cual es uno de los componentes de la vacuna S3PVac contra la cisticercosis porcina (Díaz et al., 2003). La primera vez que se empleó a GK1 como adyuvante fue en un estudio que buscaba optimizar el efector protector de la vacuna Fluzone contra el virus de la influenza (Segura et al., 2006). Posteriormente, Segura y colaboradores demostraron en 2009 que el péptido GK1 posee fuertes propiedades inmunoestimuladoras, ya que promueve la proliferación de linfocitos T CD4⁺ in vitro e in vivo a través del incremento en la expresión de moléculas del MHC-II, moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y en la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ y MCP-1 (CCL2). Además, debido a que GK1 es un péptido de 18 aminoácidos de longitud es rápidamente eliminado del cuerpo, por lo que ofrece los beneficios de un adyuvante sin causar efectos adversos (Segura et al., 2009). Posteriormente, se observó que la administración peritumoral de GK1 en ratones con melanoma redujo el tamaño de los tumores y aumentó la sobrevivencia de los animales (Pérez et al., 2013). Otro estudio probó una inmunoterapia en el tratamiento del melanoma en ratones, para esto empleó BMDCs cargadas con un antígeno tumoral específico (MAGE-AX) en combinación con el péptido GK1 y TNF- α , el cual aumentó la sobrevivencia y redujo el tamaño del tumor (Piñón et al., 2014).

Con base en los resultados anteriores, resultó de interés para este proyecto de tesis evaluar el efecto de las BMDCs estimuladas con GK1 y el lisado de promastigotes de *L. mexicana* en la infección posterior de ratones por este parásito. Para esto, el lisado de promastigotes de *L. mexicana* se empleó como fuente de antígenos del parásito con el objetivo de dar especificidad a la inmunoterapia. Dado que las BMDCs requieren de un fenotipo maduro para que se lleve a cabo una óptima presentación antigénica y activación de los linfocitos T efectores y de memoria antígeno-específicos, se empleó GK1 y TNF- α como adyuvantes.

Primeramente se analizó el efecto de GK1, TNF- α y el lisado de promastigotes en la producción de las citocinas proinflamatorias o de tipo Th₁ TNF- α , IFN- γ , IL-12p40 e IL-12p70 por las BMDCs, debido a que éstas son esenciales en el control y eliminación del parásito (Moll y Berberich, 2001), a diferencia de las citocinas de tipo Th₂ tal como IL-10, IL-4 y TGF- β que favorecen la multiplicación del parásito (Masic et al., 2012). Los resultados de la cuantificación de las citocinas determinados mediante ELISA revelaron que GK1 y TNF- α inducen un aumento en la producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12p40/p70 por las BMDCs, siendo este efecto mayor

para TNF- α que para GK1 (fig. 8). En cambio, el lisado de los promastigotes no tuvo ningún efecto en la producción de las citocinas por las BMDCs al ser empleado de manera individual. Sin embargo, en combinación con GK1 o TNF- α se obtuvo la máxima producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12p40/p70. Por lo tanto, el débil efecto que el lisado mostró en inducir la producción de las citocinas fue potenciado con el empleo de GK1 y TNF- α , confirmándose así la capacidad adyuvante de estas moléculas. Similarmente, Segura et al. (2009) demostraron que el aumento en la producción de las citocinas al emplear el péptido GK1 en combinación con LPS induce una producción mayor de citocinas que al emplear GK1 o LPS por separado.

Posteriormente al análisis del efecto de los estímulos anteriormente mencionados en la producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12p40/p70 por las BMDCs, se determinó el efecto de las BMDCs estimuladas con TNF- α , GK1 y el lisado de promastigotes en el control de la infección de los ratones con promastigotes de *L. mexicana* a la semana posterior de la transferencia de las BMDCs estimuladas. El desarrollo de la infección en los ratones se siguió semanalmente mediante la medición del tamaño de la lesión durante 10 semanas. Finalizado este tiempo, se determinó la carga parasitaria de las lesiones mediante el conteo de los amastigotes presentes en un área de 1 mm² de tejido. Las diferencias en el tamaño de las lesiones de los ratones se observaron a partir de la semana 2 entre los diferentes tratamientos. El grupo control que no recibió la transferencia adoptiva de las BMDCs estimuladas desarrolló las lesiones de mayor tamaño a lo largo de todo el experimento, llegando incluso a presentar pequeñas ulceraciones (figs. 12 y 15). Del mismo modo, el grupo basal que recibió las BMDCs no estimuladas desarrolló lesiones de un tamaño similar a las del grupo control. Estos grupos (control y basal) son los que mostraron también la mayor carga parasitaria al final de la infección, de forma similar al grupo que recibió las BMDCs tratadas sólo con el lisado (fig. 17) que se discute en el párrafo siguiente.

Los ratones inoculados con las BMDCs estimuladas únicamente con el lisado de los promastigotes desarrollaron al final de la infección lesiones de un tamaño ligeramente menor que los grupos control y basal, pero con una carga parasitaria muy alta, como se mencionó anteriormente. Este efecto se debió probablemente a que al carecer del estímulo que el adyuvante proporciona a las BMDCs para inducir su maduración e inmunogenicidad, es probable que varias de las BMDCs expresaran un fenotipo inmaduro, promoviendo tolerancia inmunológica a los antígenos del parásito, lo cual se reflejó en un tamaño de lesión reducido (figs. 12, 14 y 15) pero con una alta carga parasitaria (fig. 17). La incapacidad de este tratamiento para limitar la multiplicación del parásito se correlaciona con el efecto nulo que el

lisado tuvo en la producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12p40/p70 por las BMDCs (figs. 8-11), que como se había mencionado, son importantes en el control y en la eliminación de *Leishmania* (Moll y Berberich, 2001; Masic et al., 2012).

El grupo de ratones que recibió las BMDCs estimuladas con GK1+TNF- α +lisado desarrolló temporalmente lesiones de tamaño pequeño entre las semanas 2 y 4, a partir de la cual las lesiones continuaron creciendo hasta al alcanzar un tamaño intermedio al final de la infección (fig. 12). Con este tratamiento se obtuvo una carga parasitaria final en la lesión de un nivel intermedio pero menor a la de los grupos control y basal, lo que sugiere que las BMDCs estimuladas con GK1+TNF- α +lisado lograron limitar el desarrollo de las lesiones infectadas por los promastigotes de *Leishmania* durante las primeras 4 semanas, a partir de la cual las lesiones continuaron creciendo y dentro de ellas el parásito continuó multiplicándose.

Por otro lado, los ratones que recibieron las BMDCs estimuladas con GK1+lisado o TNF- α +lisado desarrollaron las lesiones de menor tamaño de todos los tratamientos durante el transcurso del experimento, mostrando una reducción a la mitad en la carga parasitaria final de las lesiones (fig. 17). Inclusive, se puede observar que con estos tratamientos el tamaño de las lesiones disminuye en la semana 3 (fig. 13). Los resultados obtenidos con ambos tratamientos se correlacionan con los de la cuantificación de citocinas, en las que se observó que los estímulos con GK1+lisado o TNF- α +lisado indujeron la máxima producción de TNF- α , IFN- γ e IL-12p40/p70 por las BMDCs (figs. 8-11). De esta forma tanto GK1 como TNF- α mostraron una capacidad similar para inducir la producción de citocinas proinflamatorias por las BMDCs, así como de potenciar in vivo el efecto inmunoprotector de la inmunoterapia.

El efecto de la inmunoterapia conseguido en los ratones tratados con las BMDCs estimuladas con GK1+lisado o TNF- α +lisado e infectados con promastigotes de *L. mexicana* es similar a lo que han observado otros estudios, en los que se han empleado BMDCs, LCs, iDCs y pDCs. Estos estudios han obtenido diferentes niveles de eficacia de protección inmunológica contra el parásito *Leishmania*, la cual depende de varios parámetros definidos en el diseño de la inmunoterapia, tales como la calidad, cantidad y origen de antígenos empleados en el cargado de las BMDCs, la población de DCs empleada, la vía de inoculación, entre otros. Sin embargo, en todos se observó que la inmunoterapia con DCs en la leishmaniasis promueve la reducción del tamaño de las lesiones, aumenta la producción de anticuerpos contra *Leishmania* e induce la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectores y de memoria específicos contra el parásito (Von Stebut et al., 2000; Berberich et al., 2003; Ramírez et al., 2004; Remer K. et al., 2007;

Agallou et al., 2011; Masic et al., 2012; Agallou et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Majumder et al., 2014).

Las BMDCs que fueron estimuladas con GK1 y TNF- α por separado o en combinación no tuvieron un efecto significativo en limitar el crecimiento de las lesiones o la carga parasitaria en los ratones. Esto se debe probablemente a que las células, al no haber sido estimuladas con el lisado de promastigotes, no contaban con los antígenos de *Leishmania* necesarios para dar especificidad a la inmunoterapia en contra del parásito. Sorpresivamente el grupo de ratones que recibió las BMDCs estimuladas sólo con GK1 limitó el crecimiento de las lesiones únicamente en la semana 5 (fig. 12). Esto se explica a que, como se mencionó anteriormente, GK1 por sí sólo induce un aumento en la secreción de TNF- α , IFN- γ , MIP-1 (CCL2), en la expresión de CD86 y MHC-II, así como en la activación de linfocitos T antígeno-específicos por las BMDCs (Segura et al., 2009). De manera que el efecto observado en la semana 5 con este tratamiento, se debe en parte a las citocinas secretadas por las BMDCs en inducción por GK1, así como de otros mecanismos de la respuesta inmune que no se evaluaron en este proyecto. De forma similar, Pérez et al. (2013) demostraron que la administración peritumoral de GK1 en ratones con melanoma redujo el tamaño de los tumores y aumentó la sobrevivencia de los animales, aún cuando no se emplearon antígenos del tumor para dar especificidad al tratamiento.

Una vez finalizado el experimento de los ratones tratados con las BMDCs estimuladas y posteriormente infectados con los promastigotes de *L mexicana*, se decidió evaluar y comparar la presencia de IL-12 en los ganglios poplíteos del grupo control que mostró la mayor carga parasitaria y tamaño de lesión, contra los grupos GK1+lisado y TNF- α +lisado que mostraron la menor carga parasitaria y tamaño de lesión. Se eligieron los ganglios poplíteos para evaluar la presencia de IL-12 debido a que en éstos es donde se da la presentación antigénica y polarización hacia una respuesta de tipo T_{H1} por las DCs, además de encontrarse en cercanía al sitio de la lesión. El objetivo de evaluar la presencia de IL-12 fue el de determinar si aún se estaría produciendo la citocina en los ganglios, que a su vez podría seguir promoviendo una repuesta inmunoprotectora de tipo T_{H1} contra *Leishmania*. Para esto, los ganglios poplíteos se extirparon de los ratones y se hicieron cortes histológicos que se emplearon para analizar la presencia de IL-12 en los ganglios mediante inmunohistoquímica. La producción de IL-12 por las DCs es importante en la polarización de la respuesta a una de tipo T_{H1} protectora mediada por linfocitos T CD4⁺ productores de IFN- γ , el cual a su vez activa a los macrófagos para eliminar al parásito, sin embargo, el parásito inhibe la producción de IL-12 por las DCs y en

cambio promueve la producción de citocinas de tipo T_H2 tales como IL-10, IL-4 y TGF- β que favorecen su sobrevivencia y multiplicación (Soong L, 2008; Contreras et al., 2014). Sin embargo, la inmunohistoquímica anti IL-12 reveló que no hubo presencia de la citocina en los ganglios, lo cual se puede deber a que los amastigotes de *L. mexicana* inhiben la producción de IL-12 por las DCs incluso si éstas son estimuladas con LPS o IFN- γ (Soong L, 2008). Sin embargo, un resultado interesante que se observó al analizar las laminillas de la inmunohistoquímica anti IL-12 de los ganglios poplíteos del grupo control fue la gran cantidad de células infectadas con amastigotes de *Leishmania* en la zona subcapsular del ganglio. En cambio, en los ganglios poplíteos de los grupos que recibieron el tratamiento con las BMDCs estimuladas con GK1+lisado y TNF+lisado se observaron muy pocas células infectadas y asimismo se observó una alta densidad de poblaciones de células (fig. 18).

A pesar de que las BMDCs estimuladas con el lisado y GK1 o TNF- α lograron disminuir el tamaño de las lesiones y la carga parasitaria en los ratones infectados por *Leishmania*, los distintos tratamientos de las BMDCs empleados en este proyecto que mostraron limitar el crecimiento de las lesiones únicamente hasta la semana 5, aunque las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los grupos control y basal se mantuvieron hasta el final de la infección. Existen varias causas por las que incluso los tratamientos con las BMDCs estimuladas con GK1+lisado o TNF- α +lisado no hayan logrado conferir protección inmunológica contra la infección por *Leishmania*. Primeramente, el lisado es una mezcla de antígenos de diferente naturaleza y niveles de inmunogenicidad que en conjunto no brindan los niveles de protección inmunológica que al emplear antígenos definidos molecularmente (Berberich, 2003). Por otro lado, se tiene que considerar que sólo se realizó una inmunización a los ratones antes de la infección, mientras otros protocolos emplean varias inmunoterapias para reforzar y mantener la protección inmunológica. Otro aspecto a considerar es que la inmunoterapia en este proyecto se efectuó con antígenos del parásito en la fase de promastigote, por lo que la protección inmunológica puede estar limitada al reconocimiento y eliminación de este estadio del parásito. En cambio, dentro de la célula hospedera el parásito adquiere la forma de amastigote, con lo que cambia la expresión de las moléculas de superficie y con esto modifica los antígenos que permiten su reconocimiento. Por lo tanto, en el diseño de futuras inmunoterapias con DCs en la leishmaniasis será necesario emplear además antígenos que se expresen altamente en la fase de amastigote del parásito, que finalmente es el estadio que ocasiona en el hospedero las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.

Finalmente, la obtención de respuestas inmunes duraderas y lo suficientemente robustas ha sido uno de los mayores retos en el campo de la inmunoterapia con DCs, por lo que actualmente se busca optimizar diferentes parámetros en el diseño de las inmunoterapias con DCs con el fin de mejorar su eficacia, tales como la calidad, cantidad y origen de antígenos empleados en el cargado de las BMDCs, la población de DCs empleada, la vía de inoculación, entre otros

8. CONCLUSIONES

En este proyecto se demostró que la administración de BMDCs estimuladas con un lisado de promastigotes de *L. mexicana* en combinación con GK1 o TNF- α disminuye la infección por este parásito en ratones, reduciendo la carga parasitaria y limitando el crecimiento de las lesiones.

El péptido GK1 y el TNF- α mostraron propiedades adyuvantes con una eficacia similar al ser empleados en combinación con el lisado de promastigotes en la estimulación de las BMDCs, induciendo la producción de altos niveles de TNF- α , IFN- γ e IL-12 por las BMDCs.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agallou M, Margaroni M, Karagouni E. 2011. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. *Vaccine* 29: 5053–5064.
2. Agallou M, Smirlisb D, Soteriadoub KP, Karagouni E. 2012. Vaccination with *Leishmania* histone H1-pulsed dendritic cells confers protection in murine visceral leishmaniasis. *Vaccine* 30: 5086–5093.
3. Alters SE, Gadea JR, Holm B, Lebkowski J, Philip R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother* 22(3):229–236.
4. Argaw D, Mulugeta A, Herrero M, Nombela N, Teklu T, Tefera T, et al. 2013. Risk factors for visceral leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2543.
5. Banchereau J, Steinman R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(19): 245-252.

6. Bates P. 2007 Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 37: 1097–1106
7. Berberich C, Ramírez JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YAW, Moll H. 2003. Dendritic Cell (DC)-Based Protection Against an Intracellular Pathogen Is Dependent Upon DC-Derived IL-12 and Can Be Induced by Molecularly Defined Antigens. *J Immunol* 170: 3171-3179.
8. Berberich C, Ramírez JR, Hambrecht C, Alber G, Skeiky YAW, Moll H. 2003. Dendritic Cell (DC)-Based Protection Against an Intracellular Pathogen Is Dependent Upon DC-Derived IL-12 and Can Be Induced by Molecularly Defined Antigens. *J Immunol* 2003; 170:3171-3179; doi: 10.4049/jimmunol.170.6.3171
9. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37: 1063-75.
10. Cerovic V, Houston SA, Scott CL, Aumeunier A, Yrlid U, Mowat AM, Milling SW. 2013. Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol* 6: 104-113.
11. Cohn L, Delamarre L. 2014. Dendritic cell-targeted vaccines. *Frontiers in Immunology* 5(255): 1-11.
12. Contreras I, Estrada JA, Guak H, Martel C, Borjian A, Ralph B, Shio MT, Fournier S, Krawczyk CM, Olivier M. 2014. Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions. *PLoS Negl Trop Dis* 8(9): e302. doi:10.1371/journal.pntd.0003202
13. Cravens P, Lipsky PE. 2002. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunology and Cell Biology* 80: 497–505.
14. Dakic A, Shao QX, D'Amico A, O'Keeffe M, Chen WF, Shortman K et al. 2004. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *Journal of Immunology* 172(2): 1018–1027.
15. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. 2014. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *The EMBO Journal* 33(10): 1104-1116.
16. De Freitas e Silva R, Brelaz MCA, Alves VR. 2014. Dendritic cell-based approaches in the fight against diseases. *Frontiers in Immunology* 5(78): 1-4.
17. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. 2001. Antigen- specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193(2): 1-12.
18. Díaz MA, Villalobos N, De Alujab A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralded C, Sciuttod E, Fragoso G. 2003. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93: 81–90.
19. Dresch C, Leverrier Y, Jacqueline Marvel J, Shortman K. 2012. Development of antigen cross-

presentation capacity in dendritic cells. *Trends in Immunology* 33(8): 381-388.

20. Dudek AM, Martin S, Garg AD, Agostinis P. 2013. Immature, semi-mature, and fully mature dendritic cells: toward a DC-cancer cells interface that augments anticancer immunity. *Frontiers in Immunology (Tumor Immunity)* 4(438): 1-14.
21. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG et al. 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207: 823-836.
22. Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena J. 2013. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infection, Genetics and Evolution* 18: 229-237.
23. Gardner T et al. 2012. Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics* 8(4): 534-539
24. Haniffa M, Collin M, Ginhoux F. 2013. Ontogeny and Functional Specialization of Dendritic Cells in Human and Mouse. *Advances in Immunology* 120: 1-35.
25. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P et al. 2012. Human tissues contain CD141(hi) cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103(b) nonlymphoid dendritic Cells. *Immunity* 37(1): 60-73.
26. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B et al. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* 209(6): 1167-1181.
27. http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis_en_mexico.html
28. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=dendritic+cells&recr=Open>
29. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=dendritic+cells&recr=Open>
30. Joshi J, Malla N, Kaur S. 2013. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. *Parasitology International* 63: 612-620.
31. Kaisho T. 2012. Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine* 30: 7652-7657
32. Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol* 22(9): 339-445.
33. Kling JC, Darby J, Körner H. 2014. CCR7 facilitates the pro-inflammatory function of dendritic cells in experimental leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 36(4): 177-85. doi: 10.1111/pim.12097.
34. Kumar R, Engwerda C. 2014. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clinical & Translational*

35. Laffont S, Siddiqui KR, Powrie F. 2010. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103⁺ dendritic cells. *Eur J Immunol* 40: 1877-1883.
36. Lauterbach H, Bathke B, Gilles S, Traidl-Hoffmann C, Lubber CA, Fejer G, Freudenberg MA, Davey GM, Vremec D, Kallies A et al. 2010. Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3⁺ DCs are major producers of IFN- λ in response to poly IC. *J Exp Med* 207: 2703-2717.
37. Liu D, Uzonna JE. 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2(83): 1-8.
38. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K et al. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324(5925): 392-397.
39. Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92.
40. Majumder S, Bhattacharjee A, Chowdhury BP, Majumdar SB, Subrata Majumdar S. 2014. Antigen-pulsed CpG-ODN-activated dendritic cells induce host-protective immune response by regulating the T regulatory cell functioning in *Leishmania donovani*-infected mice: critical role of CXCL10. *Frontiers in Immunology, Immunotherapies and Vaccines* 5(261): 1-9.
41. Mansueto P, Seidita A, Vitale G, Cascio A. 2014. Leishmaniasis in travelers: A literature review. *Travel Medicine and Infectious Disease* 12: 563-581.
42. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Chauvin C, Utriainen L, Aumeunier A, Scott CL, Mowat A, Cerovic V, Houston SA et al. 2013. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal Immunol* 7(1): 101-113.
43. Masic A, Hurdal R, Nieuwenhuizen NE, Brombacher F, Moll H. 2012. Dendritic Cell-Mediated Vaccination Relies on Interleukin-4 Receptor Signaling to Avoid Tissue Damage after *Leishmania major* Infection of BALB/c Mice. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): 1-9.
44. McGwire B, Satoskar A. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* 107: 7-14.
45. McGwire B. S., Satoskar A. R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Q J Med* 107: 7-14.
46. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31: 563-604.
47. Mildner A, Jung S. 2014. Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity* 40: 642-656.

48. Moradin N, Descoteaux A. 2012. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2(121): 1-7.
49. Oliveira F, De Carvalho AM, De Oliveira CI. 2013. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: the trigger trio. *Frontiers in Immunology* 4(375): 1-8.
50. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaiike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K et al. 2013. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38(5): 943-957.
51. Organización Mundial de la Salud. 2012. Control de la leishmaniasis. Serie de informes técnicos 949: 6.
52. Palucka K, Banchereau J. 2013. *Current Opinion in Immunology* 25: 396-402.
53. Pérez A, Vera J, Hernaiz JC, Moreno E, Monteverde D, Vera C, Estrada D. 2013. The Synthetic Parasite-Derived Peptide GK1 Increases Survival in a Preclinical Mouse Melanoma Model. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 28(9): 682-690.
54. Peters C et al. 1995. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J. Cell Sci.* 108: 3715-3724.
55. Piñón G, Herrera MA, Hernández B, Jarquín K, Castell AE. GK-1 Improves the Immune Response Induced by Bone Marrow Dendritic Cells Loaded with MAGE-AX in Mice with Melanoma. *Journal of Immunology Research*: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/158980>
56. Plantinga M, Guilliams M, Vanheerswynghels M, Deswarte K, Branco-Madeira F, Toussaint W, Vanhoutte L, Neyt K, Killeen N, Malissen B et al. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell- mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38: 322-335.
57. Ramírez JR, Fröhlich A, Berberich C, Moll H. 2004. Dendritic Cells (DC) Activated by CpG DNA ex vivo are potent inducers of host resistance to an intracellular pathogen that is independent of IL-12 derived from the immunizing DC. *J Immunol* 172: 6281-6289.
58. Remer KA, Apetrei C, Schwarz T, Linden C, Moll H. 2007. Vaccination with plasmacytoid dendritic cells induces protection against infection with *Leishmania major* in mice. *Eur. J. Immunol.* 37: 2463-2473.
59. Sacks D, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology* 2: 845-858
60. Sánchez L, Sáenz E, Pancorbo J, Zegarra R, Garcés N, Regis A. 2004. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana* 14(2): 82-98.
61. Schlitzer A, Ginhoux F. 2014. Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology* 26: 90-99.
62. Schönian G., Mauricio I., Cupolillo E. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol* 26: 466-469.

63. Schraml B, Reis e Sousa C. 2015. Defining dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 32: 13–20.
64. Schwarz T, Remer KA, Nahrendorf W, Masic A, Siewe L, Müller W, Roers A, Moll H. 2013. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. *PLoS Pathog* 9(6): 1-11.
65. Segura R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. 2009. Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009, 16(9): 1338-1343.
66. Segura R, Pérez A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, Corral R, Rosetti F, Fragoso G, Grinstein S, Sciutto E. 2006. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 24: 1073–1080.
67. Soon L. 2008. Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania mexicana*. *The Journal of Immunology* 180: 4355-4360.
68. Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-62.
69. Surmont V, van Thiel E, Vermaelen K, van Meerbeeck J. Investigational approaches for mesothelioma. 2011. *Front Oncol* (1)22: 1-15.
70. Ueno N, Wilson ME. 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology* 28(8): 335-344.
71. Von Stebut E, Belkaid Y, Nguyen BV, Cushing M, Sacks DL, Udey MC. 2000. *Leishmania* major-infected murine Langerhans cell-like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous Leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 30: 3498–3506.
72. Wilkins A. 2010. Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* en la regulación de la óxido nítrico sintasa en células dendríticas de ratón (tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF.
73. Wimmers F, Schreibelt G, Sköld AE, Figdor CG, De Vries IJM. 2014. Paradigm shift in dendritic cell-based immunotherapy: from in vitro generated monocyte-derived DCs to naturally circulating DC subsets. *Frontiers in immunology* 5(165): 1-12.
74. Zal T, Volkman A, Stockinger B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T Cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 180: 2089-99.

10. REFERENCIAS DE LAS IMÁGENES

Fig. 1a)

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5f/LeishmaniaMexicana_Amastigote_SEM.jpg

Fig. 2a)

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8b/LeishmaniaMexicana_Promastigote_SEM.jpg

Fig. 1b y 2b)

http://www.yourarticlelibrary.com/wp-content/uploads/2014/01/clip_image002175.jpg

Fig. 3) http://www.nature.com/nri/journal/v2/n11/fig_tab/nri933_F1.html

Fig. 4a)

<http://www.primehealthchannel.com/wp-content/uploads/2011/03/Cutaneous-Leishmaniasis.jpg>

Fig. 4b) Lab. de inmunoparasitología. Depto. de Med. Exp., Facultad de Medicina, UNAM.

Fig. 4c)

<https://web.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Leishmaniasis/images/boyMC.jpg>

Fig. 4d)

<http://www.who.int/entity/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis3.jpg%253Fua%253D1&imgrefurl=http://www.who.int/campaigns/worldhealthday/2014/photos/leishmaniasis/en/&h=891&w=1101&tbnid=KgcaGMwt5xcaJM:&zoom=1&docid=kp6pIEdCPuzgM&ei=6vvHVPCbGY2yoQT9IDwCQ&tbnid=isch&client=safari&ved=0CBoQMygAMA>

Figura 5) http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html

Figura 6)

http://www.frontiersin.org/files/Articles/12154/fonc-01-00022-r2/image_m/fonc-01-00022-g002.jpg