



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización de la virulencia de
Leishmania mexicana transfectada con la
proteína fluorescente sfGFP o mKate**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA :

MARIANA DIUPOTEX MURILLO



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. INGBORG DOROTHEA BECKER FAUSER**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Diupotex
Murillo
Mariana
56 34 08 64
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310030782

2. Datos del tutor

Dra.
Ingeborg Dorothea
Becker
Fauser

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Ana
Flisser
Steinbruch

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Rosario
Mata
López

5. Datos del sinodal 3

Dr.
José Sotero
Delgado
Domínguez

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Armando
Pérez
Torres

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización de la virulencia de *Leishmania mexicana* transfectada con la proteína fluorescente sfGFP o mKate
60 p.
2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y particularmente a la Facultad de Ciencias por el imprescindible conocimiento que me brindo a lo largo de mi desarrollo personal y profesional.

Al PAPIIT por su apoyo en la financiación del proyecto IN211418.

A mi tutora, la Dra. Ingeborg Becker Fauser por la asesoría y dirección del presente proyecto.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal, por el sentido y la estructura que le apporto a la presente investigación, así como su apoyo técnico en las inmunofluorescencias, en la diferenciación de macrófagos murinos, la tinción intra y extracelular de parásitos y en la citometría de flujo.

A las Dras. María Berenice Martínez Salazar y Alma Reyna Escalona Montaña, por el desarrollo de los parásitos fluorescentes utilizados a lo largo de los diferentes ensayos.

A la Dra. Norma Lilia Salaiza Suazo, por su ayuda en la realización de las inmunohistoquímicas y el cálculo de la carga parasitaria en tejido.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio, por su apoyo en la realización de la técnica ELISA.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia, por su ayuda y supervisión en los ensayos de dilución limitante, fagocitosis y sobrevivencia intracelular.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, por el soporte técnico brindado en el manejo de animales de laboratorio y en el ensayo de estallido oxidativo.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal, a la M. en C. Laura Enedina Soto Serna, a la M. en C. Raquel Torres Vélez, la Biól. Lucía Villalba Andrade y a Tonantzin Real Rojas, por su apoyo durante el desarrollo de la técnica de dilución limitante.

Al técnico Marco Elías Gudiño Zayas, por su auxilio en la captura y edición de imágenes de epifluorescencia y de campo claro.

A la C. D. María José Gómora Herrera, por su apoyo técnico en la microscopía confocal.

Al Biól. Guillermo Alberto Ramos, por su apoyo en el cuidado y la facilitación de los animales de laboratorio usados en el presente estudio.

Finalmente, me gustaría agradecer a los miembros del jurado: la Dra. Ana Flisser Steinbruch, la Dra. Rosario Mata López, la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, el Dr. José Sotero Delgado Domínguez y el Dr. Armando Pérez Torres, por sus comentarios y observaciones proporcionados para el enriquecimiento del presente trabajo escrito.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

De manera personal me gustaría agradecer a mi familia por el apoyo y el cariño que incondicionalmente me han brindado durante toda mi vida. Perdón por todos los acontecimientos importantes que me perdí durante estos años y gracias por todas las sonrisas que me han regalado.

A mi mamá Elia María, por todas las veces que me escuchaste y aconsejaste durante mis constantes delirios. Gracias por estar presente en todas y cada una de las veces en las que necesitaba ser escuchada.

A mi papá Mario Alberto, por todos los años que te has levantado de madrugada para llevarme a la escuela. Gracias por estar siempre pendiente de mí a pesar de lo cansado que estabas.

A mi hermano Sebastian, por todo el tiempo que has estado a mi lado. Gracias por seguirme la corriente durante mis momentos de locura y por toda la diversión que hemos pasado.

A mis amigos, por todas las risas y aventuras que han compartido conmigo durante tanto tiempo.

Así mismo, deseo expresar mi reconocimiento a todos los profesores que han influido en mi formación como persona y como profesional. Gracias por su dedicación y por todas las valiosas lecciones impartidas.

Particularmente, me gustaría agradecer a la Dra. Becker por la motivación y la oportunidad que me brindó para desenvolverme como investigadora y científica. Gracias por apoyar no solo a mi proyecto de tesis, sino también a los diferentes trabajos que tenemos en marcha.

De manera especial, me gustaría agradecerle a Jaime por todo el tiempo que compartimos durante nuestras largas jornadas en el laboratorio. Gracias por tus consejos y enseñanzas, y sobre todo por la amistad que me brindaste.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	V
RESUMEN	VII
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 LEISHMANIASIS	1
1.2 CUADROS CLÍNICOS	
1.2.1 Leishmaniasis cutánea	3
1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea	4
1.2.3 Leishmaniasis visceral	5
1.3 CICLO DE VIDA	6
1.4 TAXONOMÍA	7
1.5 FACTORES DE VIRULENCIA.....	9
1.5.1 LPG.....	9
1.6 MECANISMOS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE	10
1.6.1 Complemento	10
1.6.2 Fagocitosis	10
1.6.3 Funciones efectoras de los macrófagos.....	11
1.6.4 Secreción de citocinas	11
1.6.5 Anticuerpos específicos contra el parásito	12
1.6.6 Presentación antigénica	12

1.7 PARÁSITOS FLUORESCENTES	13
1.7.1 Transfección constitutiva	13
1.7.2 Proteínas reporteras	14
1.7.3 Inmunogenicidad y toxicidad de las proteínas reporteras	15
1.7.4 Alteración de la virulencia por la expresión de proteínas reporteras	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	
4.1.OBJETIVO GENERAL	17
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Ratones	18
5.2 Parásitos y cultivo	18
5.3 Visualización de la fluorescencia expresada por los parásitos	19
5.4 Infección de ratones BALB/c	19
5.5 Cuantificación de la carga parasitaria	19
5.6 Cuantificación de títulos de anticuerpo anti- <i>Leishmania</i>	20
5.7 Obtención de células de médula ósea de ratón.....	21
5.8 Cultivo de macrófagos derivados a partir de precursores de médula ósea	21
5.9 Ensayo de fagocitosis	22
5.10 Ensayo de sobrevivencia intracelular	22
5.11 Tinción de parásitos con anti-LPG.....	23
5.12 Análisis estadístico.....	23

6	RESULTADOS	
6.1	Expresión de las proteínas sfGFP y mKate en promastigotes y amastigotes	24
6.2	Evolución de la lesión de los ratones infectados con las cepas fluorescentes	25
6.3	Cuantificación de la carga parasitaria en los ratones infectados	26
6.4	Cuantificación de títulos de anticuerpo anti- <i>Leishmania</i>	27
6.5	Análisis de la infección <i>in vitro</i> en macrófagos murinos	28
6.6	Análisis de la sobrevivencia intracelular del parásito	30
6.7	Análisis de la expresión de LPG en promastigotes.....	31
7	DISCUSIÓN	32
8	CONCLUSIONES	36
9	REFERENCIAS	37
10	APÉNDICES	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Endemismos reportados para la leishmaniasis cutánea y/o visceral en el año 2015	2
Figura 2. Casos de leishmaniasis en la República Mexicana durante el periodo 2005 - 2015.....	2
Figura 3. Pacientes con cuadro clínico cutáneo	3
Figura 4. Pacientes con cuadro clínico mucocutáneo	4
Figura 5. Pacientes con cuadro clínico visceral	5
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	7
Figura 7. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	8
Figura 8. Estructura representativa de LPG de <i>Leishmania</i>	9
Figura 9. Sistema de expresión pLEXSY	13
Figura 10. Micrografías de fluorescencia de <i>L. mexicana</i> transfectada con las proteínas sfGFP (Lmex ^{sfGFP}) y mKate (Lmex ^{mKate})	24
Figura 11. Evolución de la lesión en las orejas de los ratones BALB/c infectados con las cepas fluorescentes	25
Figura 12. Carga parasitaria de los ratones infectados.....	26
Figura 13. Cuantificación de los títulos de anticuerpo anti- <i>Leishmania</i> en los sueros de ratones infectados.....	27
Figura 14. Micrografías representativas de macrófagos murinos infectados a las 48 h.....	28
Figura 15. Infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos.....	29
Figura 16. Sobrevida intracelular de los parásitos transfectados a las 48 h.....	30
Figura 17. Expresión de LPG en promastigotes de las cepas fluorescentes.....	31

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

LC	leishmaniasis cutánea
LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LCD	leishmaniasis cutánea diseminada
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LV	leishmaniasis visceral
LDPK	leishmaniasis dérmica postkala-azar
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud
GAL	galactosa
MAN	manosa
GN	glucosamina
GLC	glucosa
GP63	glicoproteína de 63 kDa
LPG	lipofosfoglicano
MAC	complejo de ataque a membrana
C5 y C9	componente 5 y 9 del complemento
C3a y C5a	anafilatoxina C3 y C5
CR1 y CR3	receptor de complemento 1 y 3
CRP	proteína C reactiva
MCP-1	proteína quimioattractante de monocitos 1
PV	vacuola parasitófora
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ATPasa	adenosintrifosfatasa
PKC	proteína quinasa C
PTP	tirosina fosfatasa
MAPK	proteína cinasa activada por mitógeno
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
NO	óxido nítrico
ROI	intermediarios reactivos de oxígeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
IL-1 β	interleucina 1 beta
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
IL-12	interleucina 12
IFN- γ	interferón gamma
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
IL-10	interleucina 10
AP-1	proteína activadora 1
NF- $\kappa\beta$	factor de transcripción nuclear kappa beta
JAK	janus cinasa

STAT	transductor de señales y activador de la transcripción
Th1 y Th2	células T colaboradoras tipo 1 y 2
BMLK's	leucocitos de médula ósea
IgG	inmunoglobulina G
FcγR	receptor Fc gamma
DC	célula dendrítica
APC	célula presentadora de antígeno
CTL	linfocito T citotóxico
MHCI y MHCII	complejo principal de histocompatibilidad clase I y II
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1
CPP32	caspasa 3 de 32 kDa
DsRed	proteína rojo fluorescente de <i>Dicosoma</i>
eqFP578	proteína roja de <i>Entacmaea quadricolor</i>
mKate	proteína monomérica Kate
GFP	proteína verde fluorescente
sfGFP	super folder GFP
RNA	ácido ribonucleico
tRNA	RNA de transferencia
TLR	receptores tipo toll
PS	fosfatidilserina
Lmex ^{WT}	<i>L. mexicana</i> silvestre
Lmex ^{sfGFP}	<i>L. mexicana</i> transfectada con la proteína sfGFP
Lmex ^{mKate}	<i>L. mexicana</i> transfectada con la proteína mKate
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
M199	medio celular 199
RPMI	medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
SFB	suero fetal bovino
PBS	amortiguador salino de fosfatos
HRP	peroxidasa de rábano picante
TMB	tetrametilbencidina
rpm	revoluciones por minuto
kDa	kilodalton
M	molar
pH	potencial de hidrógeno
°C	grados Celsius
nm	nanómetros
mm	milímetros
μg	microgramo
mL	mililitro
μL	microlitro
h	horas

RESUMEN

Los parásitos fluorescentes han demostrado ser una herramienta útil en el estudio de la progresión de la infección tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* debido a la facilidad con la que se puede observar y cuantificar la fluorescencia expresada por el parásito. Previamente, se ha reportado que la expresión constitutiva de algunas proteínas fluorescentes modifica diversos aspectos de los organismos. En el presente estudio se analizó si la virulencia de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ se modifica respecto a la cepa silvestre $Lmex^{WT}$. Para evaluar este fenómeno, se caracterizó la virulencia de las distintas cepas en modelos de infección *in vivo* e *in vitro*. De manera general, los resultados de las infecciones *in vivo* mostraron que el tamaño de las lesiones, la carga parasitaria y los títulos de anticuerpo anti-*Leishmania* incrementan en los ratones infectados con ambas cepas fluorescentes. Particularmente, se observó que la cepa $Lmex^{mKate}$ indujo un mayor incremento en los distintos aspectos evaluados en comparación con la cepa $Lmex^{sfGFP}$. En cuanto a las infecciones *in vitro*, se observó que los macrófagos infectados con la cepa $Lmex^{sfGFP}$ presentan un mayor porcentaje de infección y una mayor carga parasitaria a las 48 h de infección. Asimismo, se observó que esta cepa induce vacuolas parasitóforas de mayor tamaño. Además de analizar la infección *in vivo* e *in vitro*, se evaluó si la transfección de las proteínas fluorescentes modifica la expresión de LPG. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó un incremento en la expresión de este factor de virulencia en los promastigotes de la cepa $Lmex^{mKate}$. Los datos reportados en este trabajo demuestran que la virulencia de las cepas fluorescentes $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ incrementa respecto a la cepa no transfectada. Estos resultados revelan la importancia de evaluar si la transfección de genes reporteros que codifican para la expresión constitutiva de proteínas fluorescentes modifica la virulencia de los parásitos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por diferentes especies de protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos al hospedero mamífero por medio de la picadura de un flebótomo hembra infectado [1]. Esta parasitosis presenta un rango amplio de manifestaciones clínicas que dependen de la especie y del sistema inmune de la persona infectada. El cuadro clínico más común es la leishmaniasis cutánea caracterizada por la presencia de úlceras en la piel, y el menos común es la leishmaniasis mucocutánea que genera lesiones deformantes en las membranas mucosas de la nariz. El único cuadro clínico que puede llegar a ser mortal sin un tratamiento oportuno es la leishmaniasis visceral que afecta a nivel sistémico al comprometer órganos internos [2, 3].

La leishmaniasis se considera como uno de los principales padecimientos desatendidos a nivel global que aqueja principalmente a sectores marginales de la población. Se estima una prevalencia anual de 12-14 millones de personas infectadas alrededor del mundo y se calcula que cada año se presentan 2 millones de casos nuevos, de los cuales se estiman que de 0.7 a 1.2 millones son casos de leishmaniasis cutánea y aproximadamente 300,000 casos pertenecen a la leishmaniasis visceral. Esta parasitosis presenta una amplia distribución geográfica que abarca regiones tropicales, subtropicales y templadas de al menos 90 países considerados como endémicos (Fig. 1) [4]. En el hemisferio oriental se han reportado casos en partes de Asia, en el Oriente Medio, al sur de Europa, al norte de África y en la región subsahariana. Mientras que en el hemisferio occidental la leishmaniasis se reporta en México, América Central y Sudamérica, con algunos casos aislados en Texas y Oklahoma [1, 2]. En México, la especie *Leishmania mexicana* es la causante de la leishmaniasis cutánea en sus dos formas clínicas: localizada y diseminada. En los últimos 10 años se ha reportado al menos un caso de leishmaniasis en la mayoría de los estados de la República Mexicana con excepción de Chihuahua, Tamaulipas, Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Colima, Tlaxcala y Cuernavaca. El mayor número de personas infectadas se concentra al sureste del país en Tabasco, Quintana Roo, Campeche, Chiapas y Veracruz (Fig. 2). Además, en la zona del Pacífico el estado de Nayarit reporta un número de casos elevado [5].

Esta enfermedad representa un problema potencialmente importante debido al aumento en el número de casos ocasionado por los movimientos de migración e inmigración, los cambios medioambientales, la urbanización, la pobreza y la malnutrición [1].

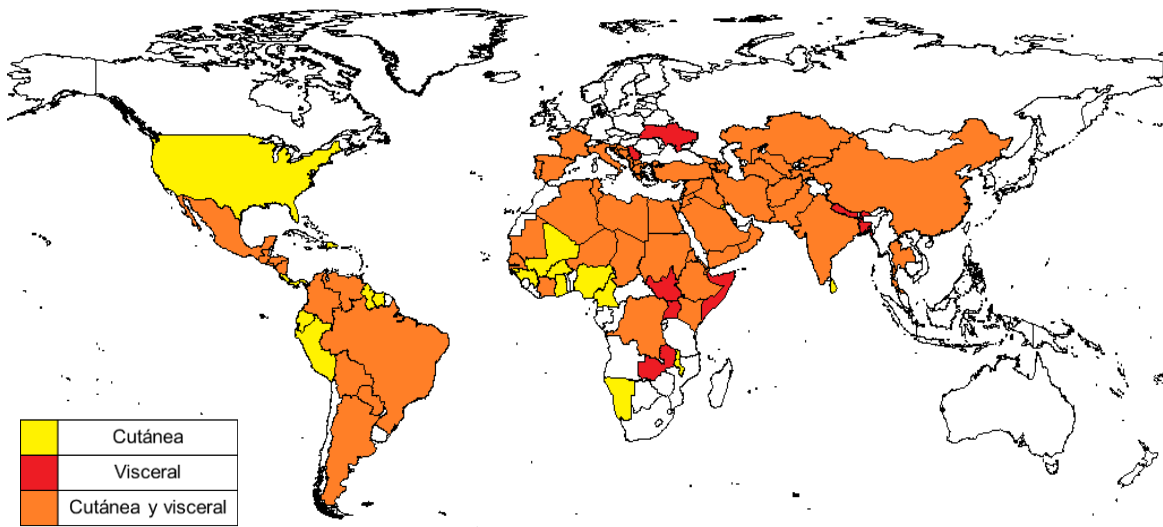


Figura 1. Endemismos reportados para la leishmaniasis cutánea y/o visceral para el año 2015 a nivel mundial. Elaboración propia. Datos obtenidos del repositorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2015) [4].

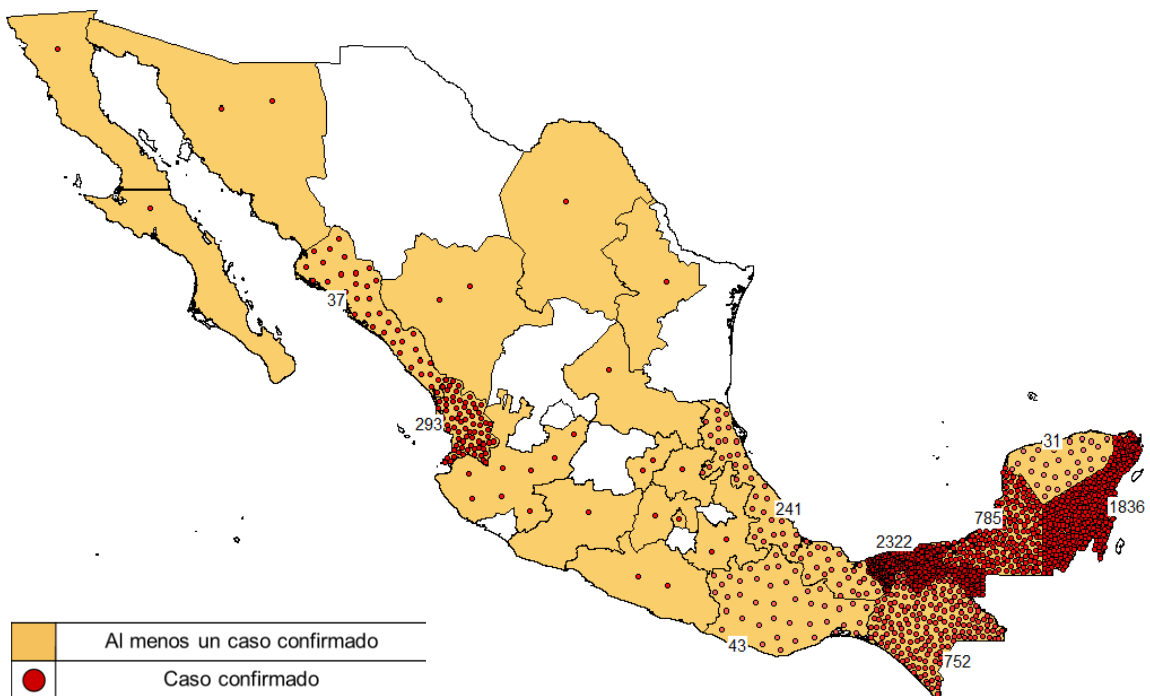


Figura 2. Casos de leishmaniasis reportados en la República Mexicana durante el periodo 2005 - 2015. Los números representan los casos confirmados por estado de las regiones más afectadas. Elaboración propia. Datos obtenidos del Anuario de Morbilidad (2016) [5].

1.2 CUADROS CLÍNICOS

1.2.1 Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma clínica más prevalente alrededor del mundo, el 90% de los casos se presentan en Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Iraq, Perú, Arabia Saudita y Siria. Este cuadro clínico es causado por algunas especies del Viejo Mundo como *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, y por especies del Nuevo Mundo como *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* [6, 7]. Las especies del Viejo Mundo por lo general causan un cuadro clínico benigno y auto-limitante, mientras que las especies localizadas en el continente americano desarrollan otras manifestaciones clínicas más severas como la leishmaniasis cutánea diseminada o la leishmaniasis mucocutánea [8].

La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) es la forma clínica más benigna. Las lesiones cutáneas típicas de este cuadro clínico se originan semanas o meses después en los sitios en donde estrictamente el vector inocula a los parásitos, ubicadas comúnmente en partes expuestas del cuerpo como cara, brazos y piernas [8]. Las lesiones inician como máculas que evolucionan rápidamente en pápulas y posteriormente pueden ulcerarse o formar lesiones crateriformes (Fig. 3A). Estas lesiones suelen curar por si solas en los siguientes meses, dejando como evidencia cicatrices atróficas [1, 6].

La leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) es de curso crónico y se desarrolla cuando los parásitos localizados en las lesiones primarias diseminan y generan nuevas lesiones en prácticamente cualquier parte del cuerpo y nunca o rara vez diseminan en el cuero cabelludo, la región inguinal, axilar, genitales externos, las palmas de las manos y las plantas de los pies. Las lesiones generalmente no ulceran (Fig. 3B) [1, 8].

A



B



Figura 3. Pacientes con cuadro clínico cutáneo. A) Lesión cutánea localizada. Fotografía de C. Black. (Afganistán). OMS [9]. B) Diseminación de las lesiones primarias. Fotografía recuperada de Rincón et al. (2009) [10].

1.2.2 Leishmaniasis mucocutánea

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es causada por especies localizadas en el Nuevo Mundo, tales como *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis*. Este cuadro clínico se presenta comúnmente en pacientes que presentaron en algún momento lesiones cutáneas localizadas. Entre el 1 y el 10% de los individuos infectados progresan de un cuadro cutáneo a uno mucocutáneo por metástasis de las lesiones primarias, lo cual está determinado tanto por el sistema inmune de la persona como por la virulencia del parásito [1, 8]. La característica destacada de la LMC es la evidente presencia de eritemas y úlceras alrededor de la nariz y los labios (Fig. 4A), que progresivamente llevan a la perforación y colapso del septo resultando en la desfiguración facial (Fig. 4B). Más tarde, la progresión de la infección promueve la destrucción de la mucosa oro-nasofaríngea, lo cual lleva a la obstrucción de las vías respiratorias [11]. La causa de muerte más frecuente dentro de este cuadro clínico se asocia principalmente a infecciones bacterianas secundarias [1].

A



B



Figura 4. Pacientes con cuadro clínico mucocutáneo. A) Eritemas al inicio de la infección. Fotografía recuperada de David et al. (2009) [8]. B) Desfiguración causada por la destrucción del septo. Fotografía recuperada de la OMS [9].

1.2.3 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como *kala-azar*, es causada por las especies del complejo *L. donovani* (*L. donovani* y *L. infantum*), capaces de migrar a través del sistema fagocítico mononuclear [6]. Esta enfermedad crónica afecta principalmente a niños, y puede llegar a ser mortal en el 90% de los casos en países en vías de desarrollo. Los síntomas que se presentan típicamente son malestar general, escalofríos, pérdida de peso, anorexia y molestias en la región abdominal lateral izquierda. Los signos asociados más comunes son fiebres irregulares, hepatoesplenomegalia y pancitopenia (Fig. 5A). En países endémicos de LV, como India o Sudán, se ha descrito una presentación clínica alterna conocida como leishmaniasis dérmica postkala-azar (LPDK). Esta se caracteriza por la presencia de exantemas pápulo-eritematosos, máculas hipopigmentadas y lesiones nodulares que aparecen en cualquier parte del cuerpo en pacientes aparentemente curados de la leishmaniasis visceral (Fig. 5B). La LPDK se cura espontáneamente en casos endémicos en África, pero raramente, o nunca, en la India [1, 7].

A



B



Figura 5. Pacientes con cuadro clínico visceral. A) Leishmaniasis visceral típica. B) Leishmaniasis dérmica postkala-azar. Fotografías recuperadas de la OMS [9].

1.3 CICLO DE VIDA

Los parásitos del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida heterogéneo debido a que son capaces de colonizar el tracto digestivo de los vectores y el sistema fagocítico mononuclear de su hospedero mamífero. En los vectores, *Lutzomyia* para el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* para el Viejo Mundo, se desarrollan los promastigotes de forma elongada y flagelada que miden de 10 a 20 μm , mientras que dentro de las células hospederas los promastigotes se diferencian en amastigotes inmóviles y de morfología redondeada con un tamaño de 3 a 7 μm [12].

De manera general, el ciclo de vida del parásito inicia cuando el díptero hematófago inocula a los promastigotes metacíclicos (estadio infeccioso) en la dermis de la piel al momento de alimentarse de la sangre del hospedero. Una vez en el sitio de la lesión, los promastigotes resistentes que escapan a la lisis mediada por el complemento son fagocitados por parte de algunas de las células fagocíticas mononucleares, incluidos los macrófagos [12]. En el interior de estas células, los promastigotes pierden el flagelo y se diferencian en amastigotes, los cuales comienzan a dividirse activamente por fisión binaria hasta inducir la lisis celular de los macrófagos. Los amastigotes liberados al medio extracelular son capaces de infectar nuevas células para continuar replicándose. El ciclo de vida se completa cuando el vector se lleva consigo directamente los amastigotes liberados o los macrófagos infectados al momento de alimentarse. Dentro del tracto digestivo del vector, las células se lisan y los amastigotes liberados se transforman en promastigotes procíclicos (estadio no infeccioso). Estos promastigotes, conforme avanzan a través del intestino del díptero, comienzan a replicarse y diferenciarse en diversos estadios morfológicos y bioquímicamente distinguibles hasta madurar en promastigotes metacíclicos ubicados detrás de la válvula estomodeal, a la altura de la probóscide. Una vez alcanzado el estadio infeccioso, los promastigotes pueden ser transmitidos nuevamente a otro individuo sano ante una nueva ingesta de sangre por parte del vector infectado, iniciándose nuevamente el ciclo de vida del parásito (Fig. 6) [13].

1.4 TAXONOMÍA

La clasificación taxonómica del género *Leishmania* se ha construido con base en criterios extrínsecos e intrínsecos del parásito, dentro de los cuales se incluye la distribución geográfica, el desarrollo del parásito dentro del intestino del vector y factores bioquímicos y moleculares [14, 15].

El género *Leishmania* se divide en dos linajes mayores, referidos como la sección Euleishmania y Paraleishmania. La primera sección incluye a los subgéneros *L. (Saoroleishmania)* que corresponde a especies descritas únicamente en lagartijas, *L. (Leishmania)* que incluye a complejos de especies con un desarrollo en la región anterior al píloro dentro del tubo digestivo del vector, y por último se encuentra el subgénero *L. (Viannia)* el cual es exclusivo para complejos de especies del Nuevo Mundo cuyo desarrollo se lleva a cabo en el píloro y en la región posterior del tubo digestivo. Las especies que no clasifican dentro de estos subgéneros se incluyen en la sección Paraleishmania, sin embargo, la historia evolutiva de este linaje es desconocido (Fig. 7) [15 - 17].

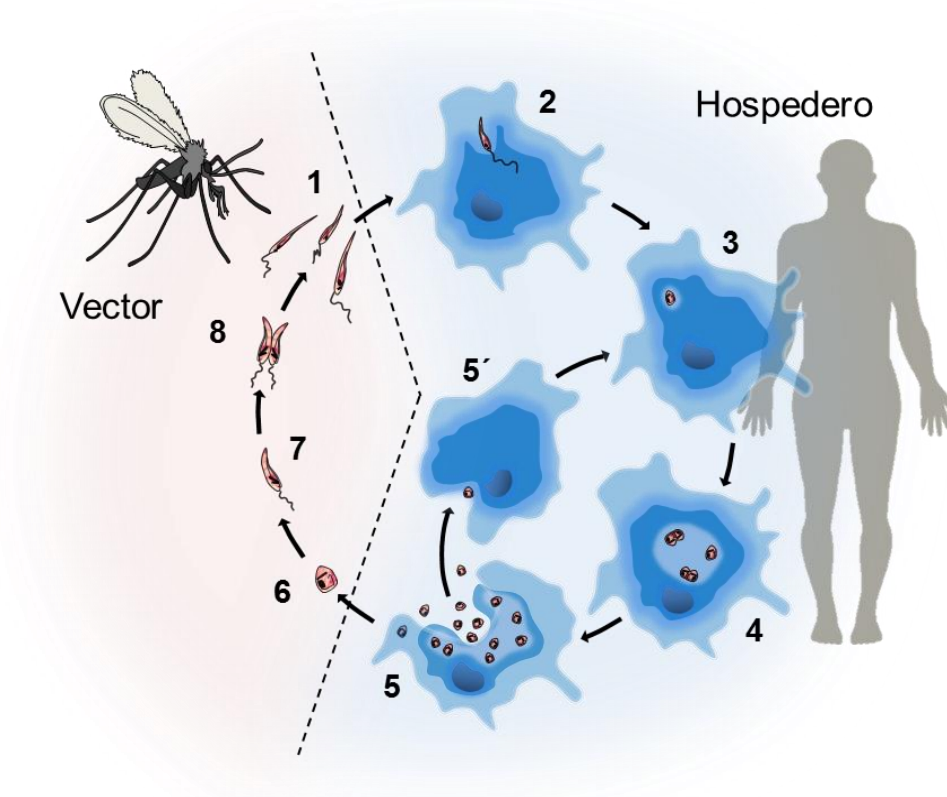


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania*. 1) Inoculación de promastigotes metacíclicos. 2) Fagocitosis. 3) Diferenciación a amastigotes. 4) Replicación intracelular. 5) Lisis celular. 5') Reinfección de macrófagos. 6) Infección del vector con amastigotes. 7) Transformación a promastigotes procíclicos. 8) Replicación y diferenciación de promastigotes metacíclicos. Elaboración propia.

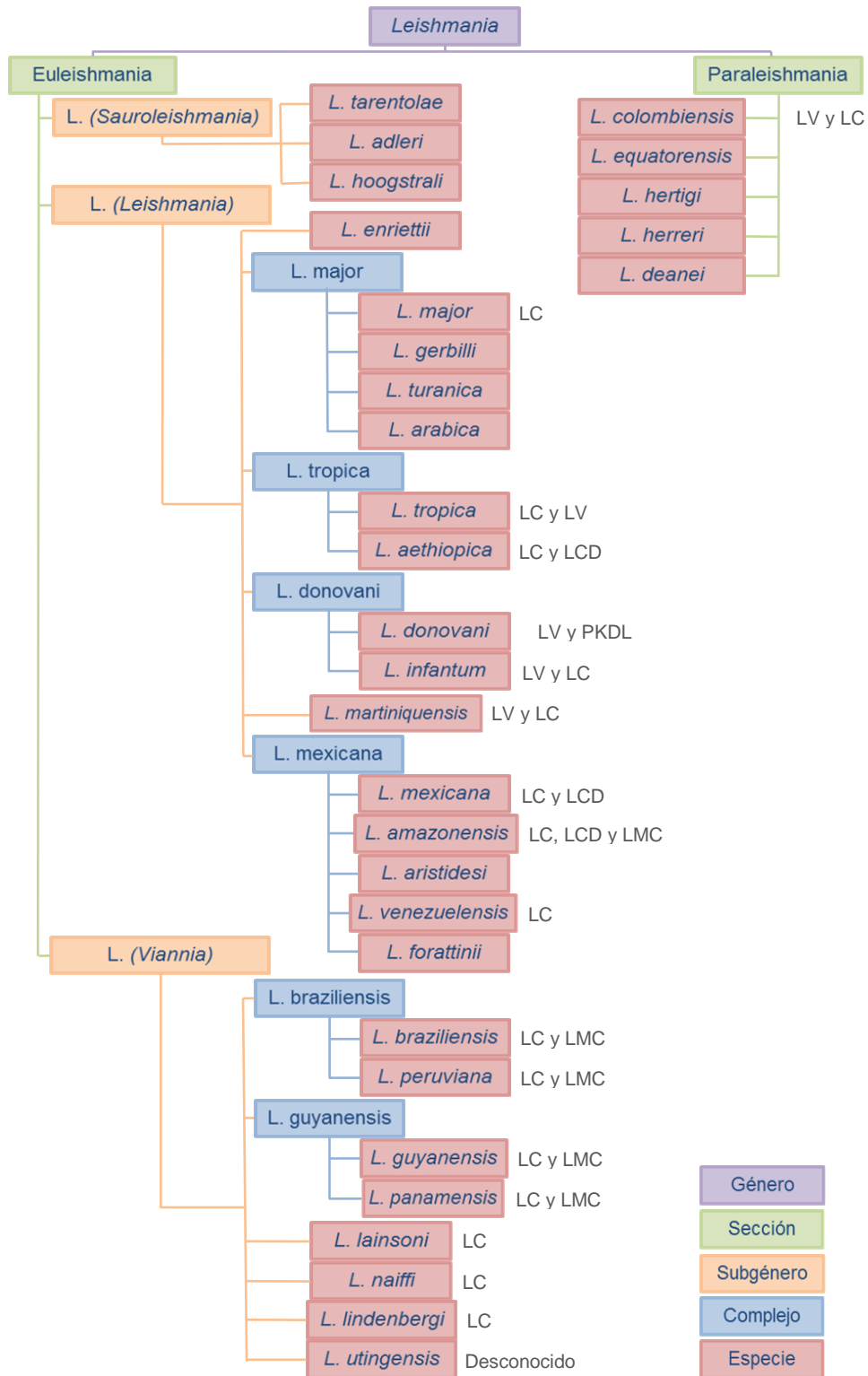


Figura 7. Taxonomía del género *Leishmania*. A la derecha de algunas especies se muestra el cuadro clínico más comúnmente asociados. Modificado de Van der Auwera et al. (2015) [17].

1.5 FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia son moléculas localizadas en la superficie del parásito considerados como determinantes evasivos/invasivos que participan en el establecimiento y la sobrevivencia del parásito en el interior de su célula hospedera. Estos factores de virulencia incluyen a glicoconjugados tales como la glicoproteína de 63 kDa (GP63) y el lipofosfoglicano (LPG) [18].

1.5.1 Lipofosfoglicano

El LPG es uno de los componentes más abundantes del glicocálix de los promastigotes que recubre la superficie celular del parásito. Esta molécula está compuesta por una cadena de unidades repetitivas de fosfoglicano ($\text{Gal}\beta 1,4 \text{Man-PO}_4$) unida a un centro de glicano insertado en la membrana a través de un ancla de 1-O-alkyl-2-lisofosfatidilinositol. En el extremo de la molécula se localiza un dominio terminal formado por oligosacáridos que varían dependiendo de la especie de *Leishmania* [19, 20]. Durante el ciclo de vida del parásito se llevan a cabo diversas modificaciones en la estructura de LPG importantes en la sobrevivencia y diferenciación del parásito. Por ejemplo, se ha visto que las unidades repetitivas de fosfoglicano aumentan al doble en los promastigotes metacíclicos, además, se han identificado cambios en la composición del dominio terminal durante la metaciclogénesis de algunas especies [21].

Este glicoconjugado participa en el establecimiento de la infección en la célula hospedera, ya que contribuye con la evasión de los factores líticos del complemento, con la infección de los macrófagos junto con la inhibición de su actividad microbicida y con la sobrevivencia y diferenciación del parásito [18].

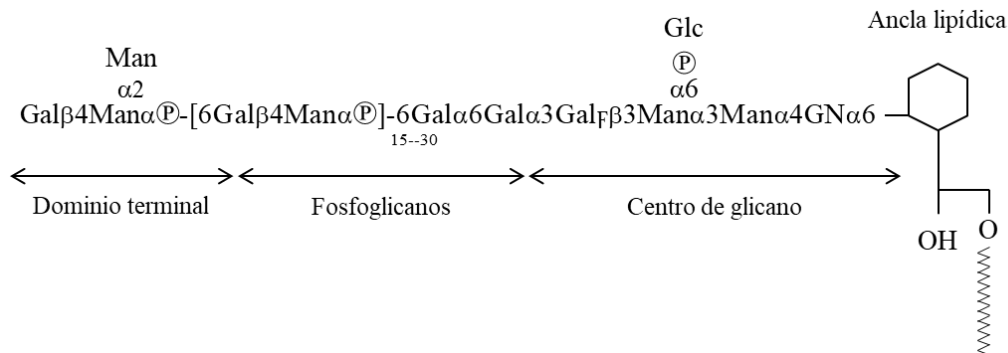


Figura 8. Estructura representativa de LPG de *Leishmania*. El esquema representa los 4 dominios estructurales de la molécula: dominio terminal, cadena de unidades repetitivas de fosfoglicano, centro de glicano y ancla lipídica. Recuperado de Franco et al. (2012) [22].

1.6 MECANISMOS DE EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE

El establecimiento y la progresión de la infección involucran una serie de estrategias utilizadas por el parásito para evadir diversos mecanismos propios del hospedero que participan en la resolución de la enfermedad [23].

1.6.1 Complemento

El primer mecanismo del sistema inmune innato que debe evadir el parásito es el sistema del complemento, el cual lisa aproximadamente al 90% de los promastigotes mediante el complejo de ataque a membrana (MAC) [24]. Los promastigotes resistentes que logran sobrevivir a este mecanismo mediante su inactivación o evasión, poseen un grueso glicocálix compuesto por diversos factores de virulencia [25]. GP63 inhibe la lisis mediada por el complemento al incrementar la conversión de C3b en su forma inactiva C3bi y al reducir la fijación de las fracciones terminales C5-C9 a la superficie del parásito. En cuanto a LPG, se sabe que inhibe la formación de C5 convertasa y de igual forma bloquea la unión de las subunidades terminales del MAC [24, 26]. La inactivación de este mecanismo de defensa innato no solo contribuye a la supervivencia extracelular de *Leishmania*, sino que también participa en la fagocitosis del parásito al inducir la liberación de C3a y C5a que atraen respectivamente a neutrófilos y monocitos al sitio de infección [27].

1.6.2 Fagocitosis

Los promastigotes resistentes que sobreviven a la lisis mediada por el complemento son fagocitados por los macrófagos mediante la participación de diversos receptores que inhiben algunos de los mecanismos microbicidas de las células. Por ejemplo, los receptores de complemento 1 (CR1) y 3 (CR3) que reconocen a las opsoninas C3b y C3bi, inhiben la inflamación y el estallido oxidativo de los macrófagos [26, 28]. Por otro lado, se ha visto que los promastigotes también pueden ser internalizados mediante la interacción de LPG con la proteína C reactiva (CRP) o mediante el receptor de manosa-fucosa [28, 30].

Los neutrófilos atraídos al sitio de infección mediante la quimiocina MCP-1 secretada por macrófagos infectados, también son capaces de fagocitar a los parásitos de manera transitoria [31]. Al entrar en apoptosis, los neutrófilos infectados son fagocitados por los macrófagos dentro de los cuales los parásitos son liberados. De este modo, *Leishmania* utiliza a estas células como “caballos de Troya” no solo para evadir la lisis por el complemento sino también para entrar a su célula hospedera de manera silenciosa [32].

1.6.3 Funciones efectoras de los macrófagos

Una de las estrategias utilizadas por los parásitos para promover su sobrevivencia intracelular y posterior diferenciación, es la formación de vacuolas parasitóforas (PVs) mediante la modificación del compartimento endosomal formado tras su internalización [33]. Algunas de estas modificaciones incluyen el retraso de la maduración del fagosoma a través de LPG, el cual induce la acumulación de F-actina en la periferia de la vesícula para formar una barrera física que impide el tráfico vesicular y el ensamblaje de la NADPH oxidasa necesaria para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación del estallido oxidativo [30]. Además, los parásitos son capaces de bloquear el reclutamiento de la ATPasa o de neutralizar las enzimas hidrolíticas para impedir la acidificación del fagolisosoma y permitir la diferenciación de los promastigotes a amastigotes, los cuales son resistentes al ambiente hidrolítico de la célula hospedera [28].

Otra estrategia utilizada por el parásito para evadir la acción microbicida del macrófago es la inhibición de diferentes vías de señalización. Se ha demostrado que LPG inhibe la activación de la proteína quinasa C (PKC) debido a que impide la unión del calcio y del diacilglicerol a esta proteína. Además, este glicolípido induce el reclutamiento de PTPs que inactivan a la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) [28, 34]. La inactivación de dichas vías afecta la producción de moléculas efectoras contra el parásito como el óxido nítrico (NO) o intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y modifica el perfil de citocinas secretado por las células infectadas [26].

1.6.4 Secreción de citocinas

Leishmania inhibe la producción de citocinas inflamatorias con el fin de prevenir una respuesta inmune protectora. Por ejemplo, el parásito inactiva diferentes factores de transcripción como AP-1, NF- κ B y STAT-1 α que inducen la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-12 [26, 28 & 34]. Estas citocinas son esenciales en la resolución de la enfermedad debido a que se asocian a una respuesta celular tipo Th1 que promueve la producción de IFN- γ , el cual activa la síntesis de la iNOS en los macrófagos infectados para la producción de NO [28]. Por otro lado, el parásito induce la secreción de citocinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10, las cuales bloquean la activación del macrófago al inhibir la producción de citocinas inflamatorias y disminuyen la presentación antigénica [28, 29].

1.6.5 Anticuerpos específicos contra *Leishmania*

La respuesta de anticuerpos específicos contra el parásito se ha asociado con la progresión de la infección tanto en el modelo de susceptibilidad como en el de resistencia a la leishmaniasis debido a que se inhibe la respuesta celular tipo Th1 [35]. Particularmente, se ha demostrado que la inmunoglobulina G (IgG), además de acelerar el proceso de fagocitosis mediante la opsonización de los amastigotes, actúa como un factor de virulencia para el parásito debido a que induce la producción de IL-10 e inhibe la secreción de IL-12 al interactuar con el receptor Fc γ (Fc γ R) de los macrófagos [36]. En la infección con *L. mexicana* se ha observado que la subclase IgG1 induce la producción de esta citocina a través de Fc γ RIII [37].

1.6.6 Presentación antigénica

Además de evadir la respuesta innata del hospedero, *Leishmania* modula negativamente la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos T al intervenir en la presentación antigénica. Por ejemplo, el parásito interfiere en el acoplamiento de los antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII) y secuestra o degrada a las moléculas MHCII localizadas dentro del fagolisosoma. Asimismo, se ha visto que la infección disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD40 e ICAM-1. Esta disminución no solo conduce a una activación subóptima de los linfocitos T, sino que también induce la producción de citocinas tipo Th2 que en última instancia lleva a la inhibición de la actividad microbicida de los macrófagos dada por la inhibición de la iNOS [26, 28 & 34]. Adicionalmente, la activación de los linfocitos T CD4 es atenuada por GP63, ya que degrada al co-receptor CD4 localizado en la superficie celular [30].

1.7 PARÁSITOS FLUORESCENTES

El desarrollo de parásitos transgénicos que expresan constitutivamente diferentes proteínas fluorescentes ha permitido caracterizar la infección causada por *Leishmania* en modelos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, mediante el monitoreo no invasivo de la fluorescencia en tiempo real se ha cuantificado la carga parasitaria en el sitio de inoculación de los parásitos y en los órganos internos en los cuales visceralizan algunas especies [38, 39]. Asimismo, mediante inmunofluorescencias de tejidos infectados con parásitos fluorescentes se ha determinado que el mayor número de células infectadas durante las primeras 18 h de infección son los neutrófilos, sin embargo, este número decrece paulatinamente y comienza a aumentar el número de macrófagos infectados a las 24 h, así como las células de Langerhans a los seis días post-infección [40]. Por otro lado, se han utilizado parásitos fluorescentes para evaluar la eficacia de diferentes compuestos leishmanicidas en cultivos axénicos o en infecciones *in vitro* de distintas líneas celulares [41].

1.7.1 Transfección constitutiva

Numerosos autores han reportado la integración de proteínas fluorescentes mediante la transfección de vectores al genoma del parásito [42 - 50]. Uno de los plásmidos más comúnmente utilizados para la integración de genes en *Leishmania* es el sistema pLEXSY, mediante el cual por recombinación homóloga se integra un casete de expresión en el locus 18S rRNA (ssu) transcrito por la RNA polimerasa I en ambas formas del parásito (Fig. 8) [51].

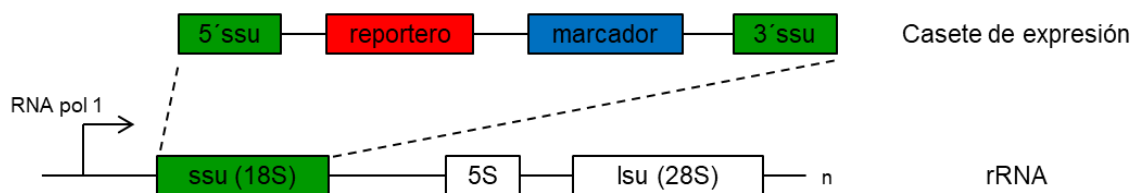


Figura 9. Sistema de expresión pLEXSY. El casete de expresión de copia única se integra al locus cromosomal 18S rRNA (ssu) mediante recombinación homóloga por medio de la linealización de los fragmentos de la subunidad pequeña del rRNA (5' ssu - 3' ssu). El cluster, compuesto por la secuencia del gen reportero y de resistencia a antibiótico, es transcrito por la RNA polimerasa I endógena. Recuperado de Misslitz et al. (2009) [51].

1.7.2 Proteínas reporteras

Las proteínas reporteras son moléculas capaces de emitir luminiscencia de forma intrínseca una vez que son excitadas a determinadas longitudes de onda [52]. Estas proteínas no requieren de cofactores ni componentes enzimáticos para su expresión debido a que el cromóforo, responsable de la absorción y emisión de la luz, se encuentra codificado en la secuencia de aminoácidos del gen reportero [53]. Actualmente se encuentran disponibles numerosas proteínas en una amplia gama de colores y características bioquímicas distintivas que pueden ser monitoreadas mediante microscopia de epifluorescencia y citometría de flujo [39, 54].

La proteína fluorescente más utilizada como molécula reportera es la proteína verde fluorescente (GFP), descubierta en 1962 como un bioproducto de la extracción de la aquorina de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* [55]. Esta proteína de 238 residuos de aminoácidos adopta una estructura característica en forma de lata denominada β -barril. Al centro de dicho cilindro se localiza horizontalmente el cromóforo formado por los aminoácidos Serina-65, Tirosina-66 y Glicina-67, el cual absorbe y emite luz fluorescente a 475 y 508 nm respectivamente [56, 57]. Además de la GFP, se han identificado y clonado otras proteínas fluorescentes en distintas especies de cnidarios [43]. Por ejemplo, la proteína rojo fluorescente brillante (eqFP578) de 231 residuos de aminoácidos deriva de la anemona marina *Entacmaea quadricolor*. Esta proteína, con un espectro de absorción y emisión de 552 y 578 nm respectivamente, presenta una estructura terciaria similar a la GFP, sin embargo, su fluoróforo está formado por Metionina-63, Tirosina-64 y Glicina-65 [58].

A partir del descubrimiento de las primeras proteínas fluorescentes, en los últimos años se han modificado las secuencias de residuos de aminoácidos de estas proteínas con el fin de obtener variantes de mayor utilidad como moléculas reporteras. Por ejemplo, se han introducido mutaciones específicas para aumentar la velocidad de maduración y la intensidad de la fluorescencia o para mejorar el plegamiento a 37°C y aumentar la resistencia a la desnaturalización [59]. Particularmente, la proteína GFP se modificó para producir la variante sfGFP (λ_{ex} 488 nm y λ_{em} 510 nm). Esta proteína modificada, al presentar una mayor tolerancia a la reorganización en la secuencia de aminoácidos y una mejor cinética de plegamiento, es más estable y expresa niveles mayores de fluorescencia [60]. De igual modo, a partir de la proteína dimérica eqFP578 se obtuvo la proteína TagFP635 (mKate) (λ_{ex} 588 nm y λ_{em} 635 nm), la cual es significativamente más brillante, estable y presenta una maduración más rápida debido a su estructura monomérica. Además, el espectro de emisión de luz difiere al de su proteína progenitora, por lo cual se agrupa dentro de las proteínas de rojo lejano [58, 61].

1.7.3 Inmunogenicidad y toxicidad de las proteínas reporteras

Las proteínas fluorescentes han sido ampliamente utilizadas como sistemas reporteros en gran variedad de modelos biológicos, sin embargo, existe evidencia circunstancial que sugiere su inmunogenicidad y citotoxicidad [62]. Estudios previos han demostrado el desarrollo de una respuesta inmune específica hacia los antígenos de las proteínas fluorescentes procesados por las células presentadoras de antígeno (APCs). Particularmente, se ha visto que la proteína GFP y sus variantes modificadas inducen la activación y diferenciación de los linfocitos T citotóxicos (CTL) a través de la presentación por MHC clase I en el modelo experimental de sarcoma CMS4 de ratones BALB/c [63]. La activación de los linfocitos CD8⁺ se ha relacionado con la toxicidad de estas proteínas debido a que induce la liberación de moléculas citotóxicas como la granzima B que facilita la liberación de ROS mitocondrial y la subsecuente muerte celular [64]. También se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por la expresión de algunas proteínas reporteras promueve la liberación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y superóxido (O₂⁻) asociadas con la apoptosis de las células [65]. Otro mecanismo relacionado con la citotoxicidad de las proteínas fluorescentes es la sobreexpresión de la proteína apoptótica CPP32, la cual se ha visto que induce apoptosis en diversas líneas celulares transfectadas con GFP [66].

1.7.4 Alteración de la virulencia por la expresión de proteínas reporteras

La mayoría de los estudios han reportado que la expresión de las proteínas fluorescentes conlleva un costo en la adecuación de los patógenos debido a que impactan negativamente en la capacidad infectiva y replicativa de los organismos. Por ejemplo, Knodler et al. (2005) demostró que el porcentaje de infección de macrófagos murinos y células epiteliales disminuye significativamente en las cepas de *Salmonella enterica* que expresan las proteínas fluorescentes DsRed y GFP [67]. Asimismo, la expresión constitutiva de la proteína GFP disminuye la tasa de crecimiento de tres diferentes serotipos de *Salmonella* [68]. Además, Rang et al. observó que el tiempo de generación de diferentes enterobacterias verdes fluorescentes aumenta conforme incrementa la expresión de GFP [69]. Por último, Mutoji et al. observó que la sobreexpresión de la proteína GFP reduce significativamente la virulencia de *Mycobacterium marinum* [70]. En *Leishmania* se ha visto que la transfección constitutiva de algunas proteínas reporteras modifica el comportamiento de los parásitos al aumentar su replicación e infectividad tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* [48, 50]. Sin embargo, esta observación no es constante entre las diferentes especies de *Leishmania*, ya que se ha visto que algunas cepas fluorescentes no difieren en comparación a los parásitos no modificados [45, 47].

2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de parásitos fluorescentes representa un método valioso para el estudio de la infección causada por los parásitos del género *Leishmania*. Por ejemplo, mediante la detección no invasiva de la fluorescencia se ha identificado y cuantificado la presencia de parásitos en los diferentes tejidos de los animales infectados. Esta estrategia ha permitido reducir el número de animales utilizados en los diferentes trabajos de investigación debido a que se puede utilizar el mismo animal para seguir el curso de la infección en tiempo real. Asimismo, los parásitos fluorescentes han permitido evaluar más rápidamente la actividad leishmanicida de múltiples fármacos en la forma clínica relevante de la enfermedad, de manera que se han identificado un mayor número de compuestos contra el parásito que pueden ser probados en los pacientes diagnosticados con leishmaniasis.

Los parásitos modificados para la expresión de proteínas fluorescentes deben ser capaces de reproducir la infección natural causada por las cepas silvestres en los diferentes modelos experimentales con el fin de obtener resultados confiables. Por consiguiente, es fundamental validar el uso de estas cepas antes de llevar a cabo los ensayos antes mencionados. Muy pocos trabajos han evaluado si la virulencia de los patógenos genéticamente modificados se altera respecto a las cepas parentales. En algunos casos se ha reportado que la expresión constitutiva de diversas proteínas fluorescentes modifica la capacidad replicativa, infectiva y competitiva de los patógenos. Particularmente, en algunas especies de *Leishmania* se ha visto que la virulencia de los parásitos incrementa en las cepas transfectadas para la expresión de proteínas fluorescentes. Por lo tanto, la importancia de este trabajo de investigación consiste no solo en validar el uso de parásitos genéticamente modificados, sino también determinar si la expresión constitutiva de diversas proteínas exógenas modifica la virulencia de los parásitos.

3. HIPÓTESIS

La virulencia de *L. mexicana* transfectada con los genes de las proteínas fluorescentes sfGFP o mKate aumenta respecto a la cepa no transfectada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la virulencia de las cepas fluorescentes $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ se modifica respecto a la cepa $Lmex^{WT}$.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Corroborar la expresión de las proteínas fluorescentes en las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$.
2. Evaluar la evolución de la enfermedad en los ratones infectados con las cepas transfectadas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$.
3. Analizar la carga parasitaria en las orejas y ganglios cervicales de los ratones infectados.
4. Cuantificar los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros de ratones infectados.
5. Analizar la infección *in vitro* en macrófagos murinos infectados con las cepas fluorescentes $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$.
6. Analizar la sobrevivida intracelular de los parásitos fluorescentes en macrófagos murinos.
7. Analizar la expresión de LPG en promastigotes fluorescentes.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Ratones

Se usaron ratones singénicos de 12-14 semanas de edad de la cepa BALB/c. La reproducción, alimentación y condiciones de luz-obscuridad de los animales estuvo a cargo del bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental (UIME) de la Facultad de Medicina, UNAM. El manejo, cuidado y el método de eutanasia se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5.2 Parásitos y cultivo

La cepa silvestre (Lmex^{WT}) (MNYZ/BZ/62/M379) y las transfectadas con las proteínas sfGFP (Lmex^{sfGFP}) y mKate (Lmex^{mKate}) mediante el sistema de expresión pLEXY fueron proporcionadas por el laboratorio de inmunoparasitología de la UIME. La virulencia de cada una de las cepas se mantuvo inoculando constantemente 10×10^6 de promastigotes en fase estacionaria en el cojinete plantar de ratones susceptibles BALB/c.

El cultivo de promastigotes se inició a partir de los amastigotes aislados mediante el aspirado de las lesiones de los ratones previamente infectados. Los amastigotes se aislaron utilizando jeringas de insulina con un calibre de 25 G con la finalidad de lisar por acción mecánica las células infectadas y de esta forma liberar a los amastigotes intracelulares. El medio de cultivo para promastigotes en el que se crecieron las diferentes cepas consistió de medio M199 (Sigma, USA) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB, GIBCO - Life Technologies, Grand Island, NY, USA) descomplementado por calor a 56° C durante 30 minutos. Los cultivos se iniciaron con 1×10^6 de promastigotes / mL en botellas de 25 cm² en un volumen final de 10 mL de medio y se incubaron a temperatura ambiente. Para mantener el cultivo de promastigotes, se transfirió el mismo número de parásitos a botellas con medio de cultivo fresco cada 3-4 días durante la fase logarítmica del parásito, con un máximo de cinco pases por aislado.

5.3 Visualización de la fluorescencia expresada por los parásitos

Los promastigotes de cada una de las cepas mantenidas en cultivos axénicos fueron cosechados mediante centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. Los botones obtenidos se lavaron 2 veces con buffer de fosfatos 0.1 M con pH de 7.4 (PBS) y se resuspendieron en 100 μ L de PBS. Para la visualización de la fluorescencia expresada por las cepas *Lmex*^{sfGFP} y *Lmex*^{mKate} se tomó una muestra de 10 μ L y se extendió sobre un portaobjetos limpio. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Microphot - FXA equipado con filtro verde (XF22) y rojo (XF40), y una cámara Nikon DXM1200F. Además, la fluorescencia de los promastigotes de la cepa silvestre y transfectadas se corroboró mediante el análisis por citometría de flujo (Apéndice A) utilizando el citómetro BD FACSCanto™ II y el programa Flowjo v. 10. La fluorescencia de los amastigotes dentro del macrófago se observó mediante microscopia confocal (Leica TCS SP5).

5.4 Infección de ratones BALB/c

A partir de los cultivos axénicos se cosecharon promastigotes en fase estacionaria por centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos. Para eliminar el medio de cultivo, los parásitos se lavaron dos veces con PBS y se ajustaron a 1×10^6 de promastigotes por cada 5 μ L de PBS mediante el conteo en cámara de Neubauer. Los ratones se infectaron en la dermis de la oreja con jeringas de insulina cargadas con 1×10^6 de promastigotes resuspendidos en 5 μ L de PBS. Previamente estos ratones fueron anestesiados por la inhalación de Isoflurano (Sofloran®) y se desinfectó la zona de inoculación con etanol al 70 %. El incremento en el tamaño de la lesión fue monitoreado durante 6 semanas mediante la medición del incremento de la dermis utilizando un vernier digital. Para el desarrollo de los ensayos posteriores todos los ratones fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical.

5.5 Cuantificación de la carga parasitaria

La carga parasitaria se cuantificó mediante la técnica de dilución limitante descrita inicialmente por Titus et al. (1985) [71]. Brevemente, la oreja y el nódulo linfático derecho de cada uno de los ratones infectados fueron extraídos en condiciones de esterilidad. Los ganglios extraídos fueron colocados en PBS frío, mientras que las orejas infectadas fueron afeitadas con crema depilatoria corporal, desinfectadas con etanol al 70 % y colocadas en PBS frío. Posteriormente, las

orejas se incubaron con 0.9 % (v/v) de colagenasa durante 2 horas a 37°C - 5 % CO₂ y se separaron las láminas dérmicas. Los ganglios y las láminas dérmicas fueron homogenizadas por separado en PBS utilizando émbolos metálicos estériles. El homogeneizado obtenido se colectó y centrifugó a 70 x g durante un minuto para eliminar los restos de tejido. A continuación, los parásitos se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en RPMI - 1640 (Gibco, USA) suplementado con 10 % de SFB. A partir de este stock de parásitos se llevaron a cabo 12 diluciones seriadas 1:10 en placas de 96 pozos de fondo plano (Corning, Life Sciences, NY, USA) previamente preparadas con agar - sangre de conejo al 10 % (v/v) para ayudar al crecimiento de los parásitos. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 26° C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se examinó el crecimiento de los parásitos en cada uno de los pozos utilizando un microscopio óptico invertido con una magnificación de 40 x. La última dilución en la cual se observó al menos un parásito viable fue el título final seleccionado para el reporte de la carga parasitaria, expresada como - log₁₀.

5.6 Cuantificación de títulos de anticuerpo anti-*Leishmania*

La sangre de los ratones previamente infectados fue extraída mediante punción cardiaca para la cuantificación de títulos anti-*Leishmania*. Para la separación del suero, la sangre total se dejó coagular durante 15 minutos a 37° C y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. El suero recuperado fue almacenado a - 20° C para el posterior análisis de anticuerpos. Los títulos anti-*Leishmania* fueron cuantificados mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima tipo sándwich (ELISA). Brevemente, el antígeno total de promastigotes de *L. mexicana* se fijó en placas de 96 pozos EIA/RIA (Corning, Life Sciences, NY, USA) en una concentración de 0.6 µg/mL durante 1 hora en cámara húmeda. Posteriormente, se bloquearon todos los sitios de unión a la placa con caseína al 5 % disuelta en NaOH 0.1 N durante 1 hora. Al término de esta incubación, se agregaron los sueros de los ratones infectados en dilución 1:100 y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) en dilución 1:4,000 y se incubó durante 30 minutos. Las muestras fueron reveladas con una solución compuesta en volúmenes iguales de sustrato de peroxidasa (Tetrametilbencidina - TMB) y solución de peroxidasa B durante 30 minutos en oscuridad, la reacción se paró con ácido fosfórico 1 M. Las muestras se leyeron a 405 nm utilizando un lector de ELISA para microplacas (BioTek Instruments Inc.).

5.7 Obtención de células de médula ósea de ratón

Los macrófagos utilizados para los posteriores ensayos se diferenciaron a partir de células precursoras presentes en la medula ósea de los huesos largos de ratones BALB/c. Brevemente, se extrajo la tibia y el fémur de cada uno de los ratones teniendo el cuidado de no fisurar ninguno de los huesos. Posteriormente, se removió el músculo de cada pieza ósea y utilizando gasas estériles se retiró el resto de tejido adherido. Los huesos limpios e intactos se colocaron en etanol al 70 % durante 3 minutos para eliminar posibles agentes patógenos y se mantuvieron en PBS con 2 % de penicilina/estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Para la expulsión de la médula ósea, se cortaron las epífisis de cada hueso y se inyectó PBS que fue recolectado en tubos cónicos de 50 mL utilizando una jeringa de 10 mL acoplada a una aguja de 25 G. La suspensión celular se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar los restos óseos por sedimentación. Posteriormente, las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos a 20° C y se resuspendieron en RPMI - 1640. Los leucocitos presentes en la médula ósea (BMLK's) se contaron en cámara de Neubauer, excluyendo los eritrocitos por forma y tamaño y a las células muertas utilizando azul de tripán (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA).

5.8 Cultivo de macrófagos derivados a partir de precursores de médula ósea

Para la diferenciación de macrófagos murinos a partir de las células precursoras de médula ósea, se sembraron 2×10^6 de BMLK's en cajas de Petri bacteriológicas de 100 mm (BD Falcon, Bedford, MA, USA) resuspendidas en 10 mL de RPMI - 20% SFB suplementado con el 20 % del sobrenadante de la línea celular L929, productora de M-CSF para la diferenciación de colonias de macrófagos [72]. Las cajas de Petri se mantuvieron en incubación durante 7 días a 37°C con una atmósfera del 5 % de CO₂. Transcurrido este tiempo, se decantó el medio de cultivo y se desprendieron los macrófagos mediante el pipeteo de PBS frío sobre cama de hielo. Las células colectadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 15 minutos a 4° C y se resuspendieron en RPMI - 10% SFB para su uso en los subsiguientes ensayos.

5.9 Ensayo de fagocitosis

En placas para cultivo celular de 24 pozos (Corning, Life Sciences, NY, USA) se colocaron cubreobjetos redondos previamente desengrasados y esterilizados. En cada uno de los pozos se colocaron 5×10^5 macrófagos resuspendidos en medio de cultivo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 minutos. Las células se dejaron adherir a los cubreobjetos redondos durante 24 horas a $37^\circ\text{C} - 5\%\text{CO}_2$. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se hicieron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente para retirar las células no adheridas. Los macrófagos se infectaron con promastigotes en fase estacionaria en una relación 1:10 durante 2 horas a temperatura ambiente. Adicionalmente, para sincronizar la infección y poner en contacto células y parásitos la placa se centrifugo a 1200 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, los pozos se lavaron con PBS y las células se fijaron con etanol al 96% durante 3 minutos. Por último, los macrófagos se tiñeron con Giemsa (Sigma, USA) diluido 1:20 durante 15 minutos en agitación constante. Transcurrido el tiempo de tinción, las preparaciones se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de colorante y se dejaron secar con el ambiente. Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos limpios utilizando resina sintética. Las preparaciones se observaron y fotografiaron a una magnificación de 60x con un microscopio Nikon Microphot - FXA equipado con una cámara Nikon DXM1200F. El porcentaje de infección se calculó mediante el conteo de las células infectadas en un total de 100 células distribuidas a lo largo de 5 fotografías tomadas. Además, se cuantificó el número de parásitos fagocitados por los macrófagos infectados, y el número y área de las vacuolas parasitóforas utilizando el Software ImageJ V1.50i.

5.10 Ensayo de sobrevida intracelular

En placas de cultivo celular de 96 pozos se colocaron 2×10^5 macrófagos resuspendidos en RPMI - 10%SFB y se dejaron incubar a $37^\circ\text{C} - 5\%\text{CO}_2$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los macrófagos se infectaron y lavaron como se describió anteriormente y la placa se incubó durante 2 horas a $37^\circ\text{C} - 5\%\text{CO}_2$. Posteriormente, se decantó el sobrenadante y se lavaron los pozos con PBS para eliminar el exceso de los parásitos no fagocitados. A continuación, las placas se incubaron a $37^\circ\text{C} - 5\%\text{CO}_2$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionó M199 - 10%SFB y la placa se incubó una última vez durante 48 horas a 26°C para suscitar la muerte de las células y permitir la salida de los parásitos. La sobrevida intracelular de cada una de las cepas se evaluó a las 48 horas mediante el conteo de promastigotes liberados al medio de cultivo.

5.11 Tinción de parásitos con anti-LPG

Para la tinción de LPG los promastigotes de recién aislado se cosecharon en el quinto día de crecimiento, se lavaron con PBS y se colocaron 1.5×10^6 de parásitos para cada una de las condiciones en tubos eppendorf de 1.5 mL. Los promastigotes se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 15 minutos a 4°C y se permeabilizaron con Perm/Wash 1X (BD Biosciences). Posteriormente, los parásitos se resuspendieron con el anticuerpo primario anti-LPG (generado en nuestro laboratorio contra LPG de *L. mexicana*) en dilución 1:25 en Perm/Wash y se incubaron durante 20 minutos en frío. Transcurrido el tiempo de incubación, las células volvieron a lavarse con Perm/Wash y se tiñeron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado en Cy5 (Zymed®) en dilución 1:200 durante 20 minutos en oscuridad para evitar la excitación del fluorocromo. Finalmente, los parásitos se lavaron una última vez con Perm/Wash y posteriormente se resuspendieron en PBS para ser analizados en el citómetro de flujo. Los parásitos del control negativo se marcaron únicamente con el anticuerpo primario (s/teñir), y los del control de isotipo solamente se tiñeron con el anticuerpo secundario. La expresión de LPG se determinó mediante citometría de flujo usando el programa BD FACSDiVa 6.0.

5.12 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa GraphPad Prism versión 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Se utilizaron las pruebas U Mann Whitney y Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn's para la comparación entre grupos. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

6. RESULTADOS

6.1 Expresión de las proteínas sfGFP y mKate en promastigotes y amastigotes

La fluorescencia de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ se verificó mediante microscopía confocal y de epifluorescencia en ambas formas del parásito. La fluorescencia expresada por ambas proteínas reporteras se observó en los promastigotes de cultivo axénico y en los amastigotes localizados al interior de los macrófagos (Fig. 10). A partir de estas micrografías se confirmó la fluorescencia de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ utilizadas a lo largo de los diferentes ensayos.

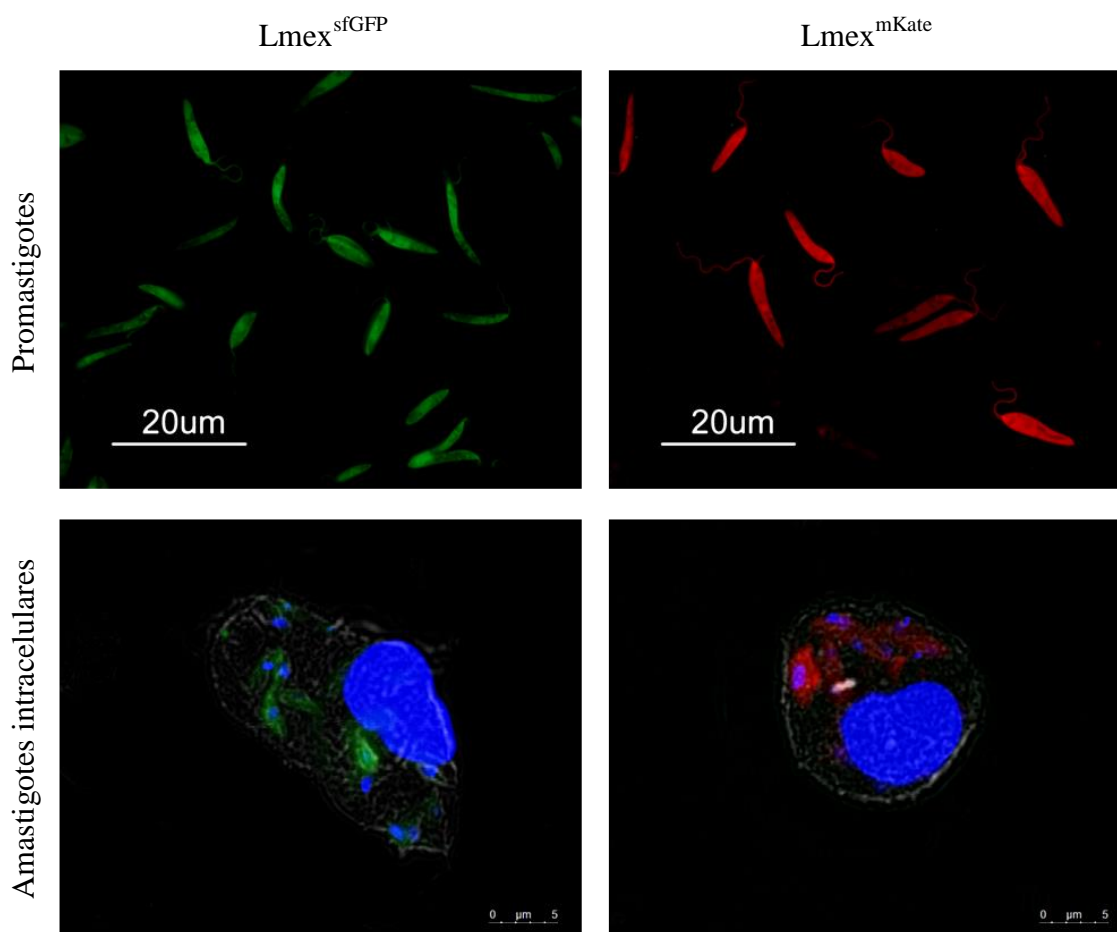


Figura 10. Micrografías de fluorescencia de *L. mexicana* transfectada con las proteínas sfGFP ($Lmex^{sfGFP}$) y mKate ($Lmex^{mKate}$). En el panel superior se observan los promastigotes de ambas cepas fluorescentes mantenidos en cultivo axénico. En el panel inferior se muestran los amastigotes localizados al interior de los macrófagos murinos previamente diferenciados. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul).

6.2 Evolución de la lesión de los ratones infectados con las cepas fluorescentes

Para determinar si la expresión de las proteínas fluorescentes sfGFP o mKate modificó la virulencia de los parásitos, se infectaron ratones BALB/c en la dermis de la oreja con 1×10^6 de promastigotes de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ en fase estacionaria y se monitorearon las lesiones durante seis semanas.

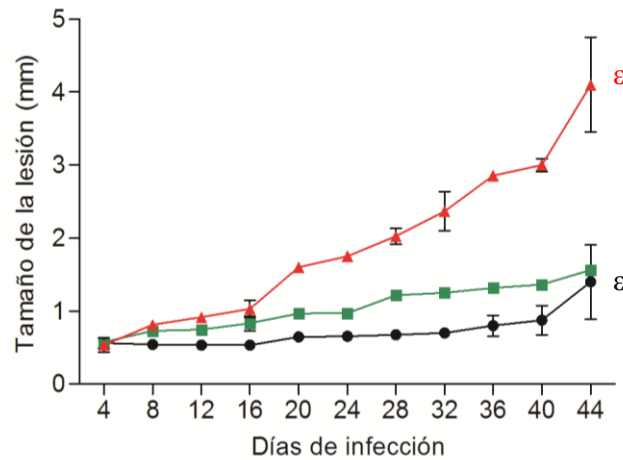


Figura 11. Evolución de la lesión en las orejas de los ratones BALB/c infectados con las cepas fluorescentes. Los ratones se infectaron en la dermis de la oreja con 1×10^6 de promastigotes en fase estacionaria y las lesiones se monitorearon durante 6 semanas de infección. La cepa $Lmex^{WT}$ se representa como ●, la cepa $Lmex^{sfGFP}$ como ■ y la $Lmex^{mKate}$ como ▲. Los puntos representan el promedio \pm la desviación estándar de la medición de 4 ratones infectados.

En relación a las cepas transfectadas, se observó que ambas cepas fluorescentes generan lesiones más grandes respecto a la cepa silvestre. Particularmente, la cepa $Lmex^{mKate}$ generó lesiones del más del doble del tamaño en comparación a las lesiones observadas en los ratones infectados con la cepa $Lmex^{WT}$ (Fig. 11). Además, se observó un crecimiento exponencial de las lesiones generadas por los parásitos de la cepa $Lmex^{mKate}$, mientras que las lesiones causadas por las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{WT}$ crecieron de manera lineal. Los resultados anteriormente expuestos muestran que la transfección de las proteínas reporteras sfGFP y mKate induce lesiones de mayor tamaño respecto a los parásitos no transfectados.

6.3 Cuantificación de la carga parasitaria en los ratones infectados

El siguiente objetivo fue determinar si el aumento en el tamaño de las lesiones se relacionaba directamente con la presencia de un mayor número de parásitos. Para dicho propósito, se calculó la carga parasitaria en la oreja infectada mediante la técnica de dilución limitante a las seis semanas de infección. Además, partiendo de reportes previos donde se ha demostrado que *L. mexicana* visceraliza en el modelo BALB/c [73], se cuantificó el número de parásitos en los nódulos cervicales debido a que representan la estructura más próxima al sitio de inoculación de los parásitos. De manera general, se encontró que la carga parasitaria de los ratones infectados con las cepas fluorescentes no varía estadísticamente respecto a los ratones infectados con los parásitos silvestres en ninguna de las dos estructuras analizadas (Fig. 12). Sin embargo, el número de parásitos en el sitio de inoculación de los parásitos tiende a aumentar en los ratones infectados con la cepa $Lmex^{mKate}$ (Fig. 12A). Asimismo, los parásitos de esta cepa tienden a diseminarse mayormente al nódulo linfático más cercano al sitio de infección (Fig. 12B). Las evidencias anteriores sugieren que la virulencia de las cepas fluorescentes es mayor debido a que la carga parasitaria de las lesiones generadas por los parásitos $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ aumentó respectivamente 1.1 y 1.35 veces en relación a la carga parasitaria cuantificada en los ratones infectados con la cepa $Lmex^{WT}$.

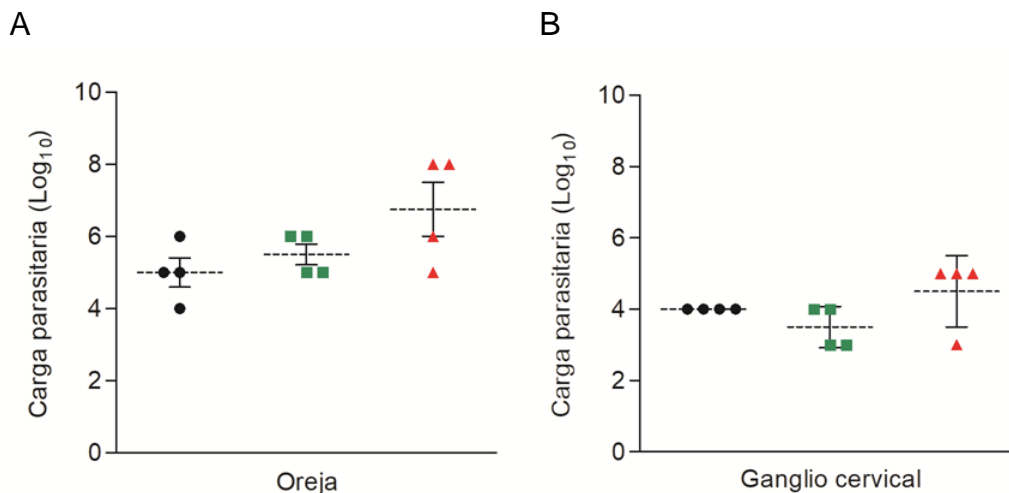


Figura 12. Carga parasitaria de los ratones infectados con las distintas cepas a las 6 semanas de infección. Los parásitos de los ratones infectados fueron aislados de las orejas (A) o del ganglio cervical más cercano al sitio de lesión (B). La carga parasitaria se reportó respecto a la última dilución en la cual se observó el último parásito. Las cepas se representan con los siguientes símbolos: ● para $Lmex^{WT}$, ■ para $Lmex^{sfGFP}$ y ▲ en el caso de $Lmex^{mKate}$. La línea horizontal punteada representa la media \pm la desviación estándar de 4 ratones infectados.

6.4 Cuantificación de títulos de anticuerpo anti-*Leishmania*

A continuación, se determinó si existía una relación entre la concentración de anticuerpos específicos contra el parásito, la carga parasitaria y la severidad del cuadro clínico observado en el ratón. Para dicho objetivo, se cuantificaron los títulos de anticuerpo anti-*Leishmania* en los sueros de ratones sanos e infectados mediante la técnica de ELISA. En cuanto a los ratones sanos, no se detectaron anticuerpos específicos contra el parásito. En cambio, los títulos cuantificados en los sueros de los ratones infectados con ambas cepas fluorescentes aumentaron respecto a la cepa $Lmex^{WT}$. Los títulos anti-*Leishmania* de los ratones infectados con la cepa $Lmex^{sfGFP}$ aumentaron 1.34 veces, mientras que el aumento significativo con la cepa $Lmex^{mKate}$ fue de 1.7 veces (Fig. 13). En relación a estos resultados, se encontró que la concentración de anticuerpos específicos anti-*Leishmania* se correlaciona positivamente con la parasitemia y el tamaño de lesión observado en los ratones infectados con las distintas cepas.

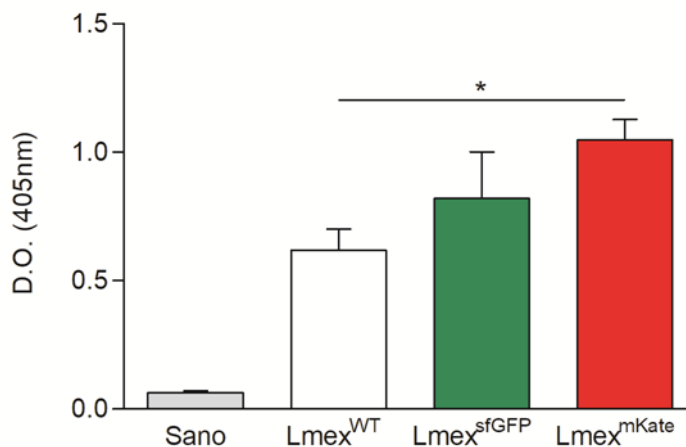


Figura 13. Cuantificación de los títulos de anticuerpo anti-*Leishmania* en los sueros de ratones infectados. El suero de los ratones se separó de la sangre extraída y se cuantificaron los títulos anti-*Leishmania* mediante ELISA. Cada conjunto de datos representa la media \pm el error estándar de 5 ratones infectados con 3 réplicas cada uno.

6.5 Análisis de la infección *in vitro* en macrófagos murinos

Una vez que se observó que las cepas fluorescentes inducen lesiones de mayor tamaño y tienden a aumentar la carga parasitaria a las 6 semanas de infección, se analizó si la expresión de las proteínas reporteras sfGFP o mKate modifica la capacidad *in vitro* del parásito para infectar a su célula hospedera. Para dicho objetivo, se infectaron macrófagos murinos con los promastigotes de las distintas cepas durante 48 horas y se montaron preparaciones fijas teñidas con Giemsa en las cuales se evaluó el porcentaje de infección, el número de parásitos fagocitados y el número y área de las vacuolas parasitóforas (Fig. 14). Analizando los diferentes parámetros de infección, se encontró que la cepa fluorescente $Lmex^{sfGFP}$ infecta 3.2 veces más macrófagos respecto a la cepa $Lmex^{WT}$ (Fig. 15A). Además, se observó que los macrófagos infectados con esta cepa presentan 1.36 veces más parásitos y generan vacuolas parasitóforas 1.49 veces más grandes que la cepa silvestre (Fig. B y C). El número de vacuolas formadas al interior de los macrófagos no fue significativo con ninguna de las cepas fluorescentes utilizadas en la infección (Fig. 15D). Contrario a los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*, se observó que la cepa $Lmex^{sfGFP}$ presenta una mayor capacidad infectiva respecto a la cepa $Lmex^{mKate}$. La infectividad de la cepa transfectada con la proteína mKate tiende a aumentar en comparación con la cepa WT.

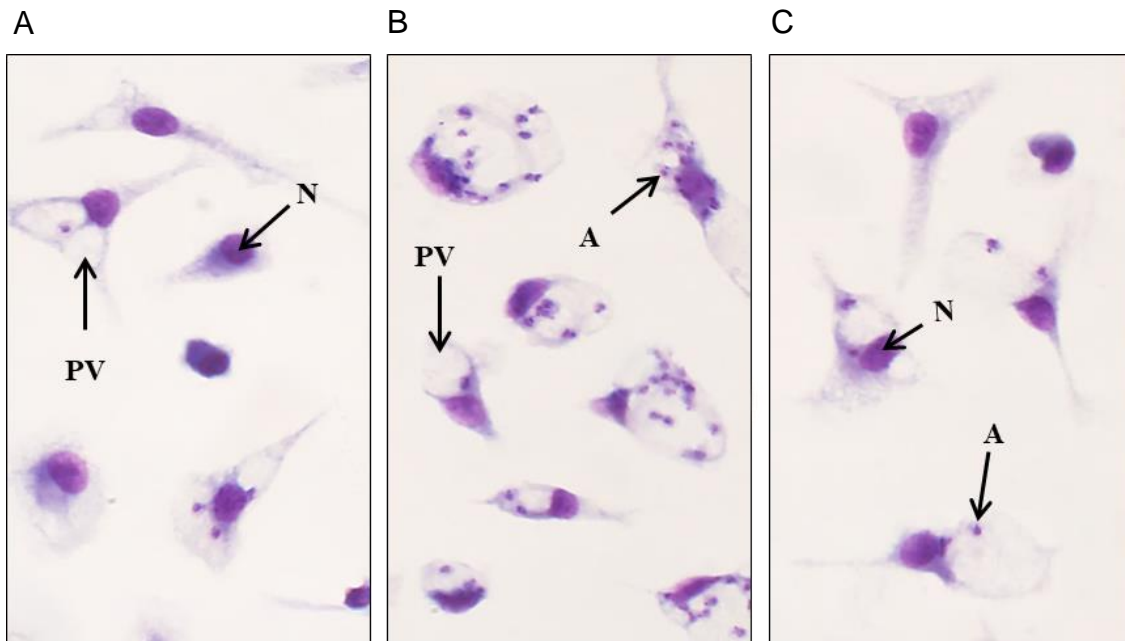


Figura 14. Micrografías representativas de macrófagos murinos infectados a las 48 h. Las preparaciones fueron fijadas y teñidas para ser observadas por microscopio de luz. Las cepas utilizadas para infectar fueron: $Lmex^{WT}$ (A), $Lmex^{sfGFP}$ (B) y $Lmex^{mKate}$ (C). (N) núcleo de macrófagos, (A) amastigotes y (PV) vacuola parasitófora.

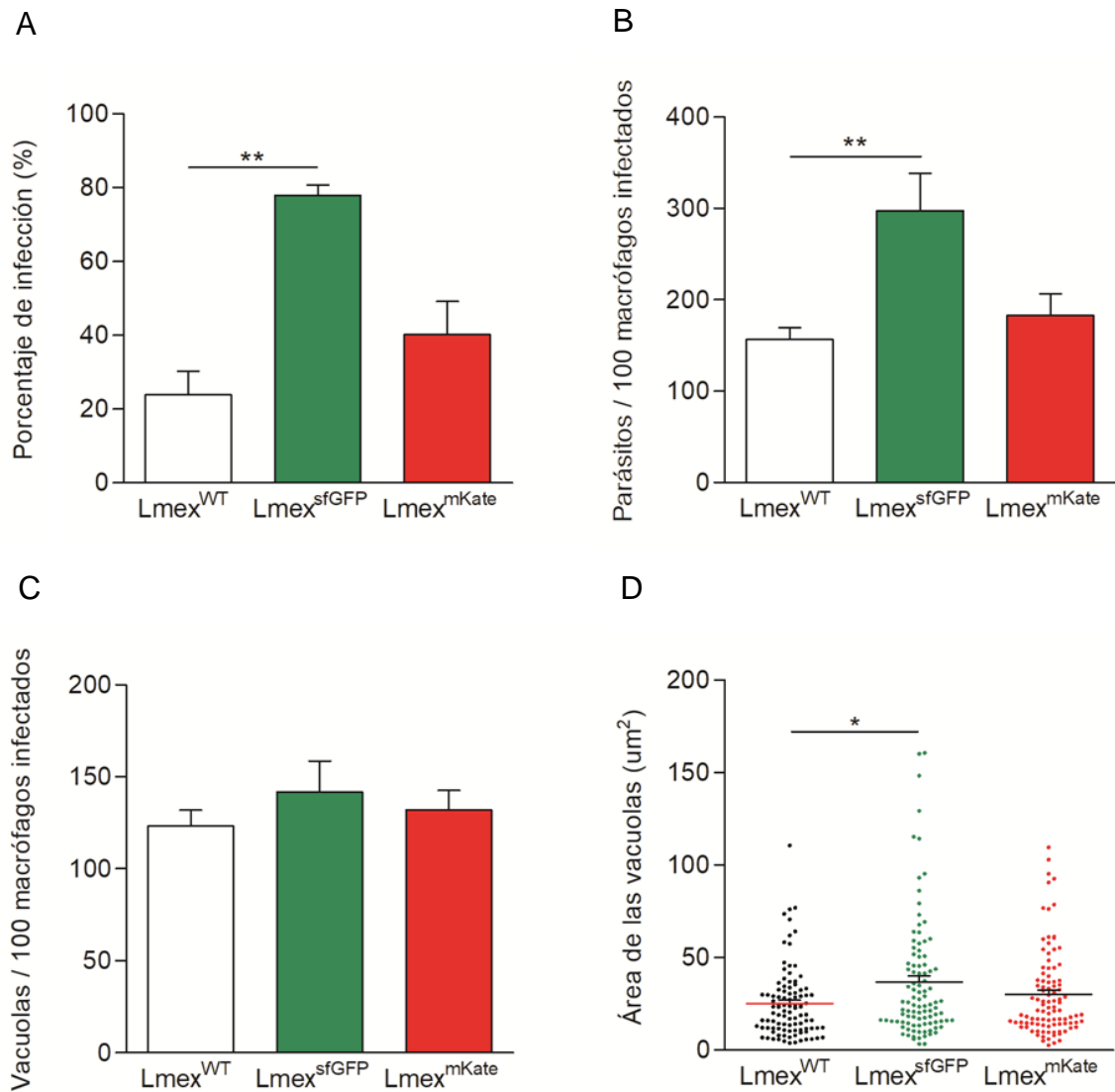


Figura 15. Infección *in vitro* de macrófagos murinos. Los macrófagos se infectaron con promastigotes en fase estacionaria en relación 1:10 durante 2 h. Posteriormente, las células se fijaron y tiñeron a las 48 h post-infección para evaluar los distintos aspectos de la infección. El porcentaje de infección (A) representa el número de macrófagos infectados en un total de 100 células analizadas. La carga parasitaria (B) y el número de vacuolas (C) se evaluaron en 100 macrófagos infectados, mientras que el área de las vacuolas (D) se calculó en un total de 100 fagosomas observados. Las barras representan la media \pm el error estándar de 6 ratones divididos en dos experimentos independientes.

6.6 Análisis de la sobrevivencia intracelular del parásito

El siguiente objetivo fue determinar si la sobrevivencia intracelular de los parásitos transfectados con las proteínas reporteras se modificó respecto a los parásitos silvestres. Para dicho objetivo, se infectaron macrófagos murinos con los promastigotes de las distintas cepas y se contó el número de parásitos liberados a las 48 horas. En ambas cepas fluorescentes, $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$, se observó un aumento en la sobrevivencia intracelular del parásito de 1.63 y 2.5 veces respectivamente en relación con la cepa $Lmex^{WT}$ (Fig. 16). Este aumento fue únicamente significativo en los parásitos que expresan la proteína mKate. En relación con los ensayos *in vivo*, estos resultados sugieren que los parásitos de la cepa $Lmex^{mKate}$ generan lesiones significativamente más grandes debido a que los parásitos sobreviven más al interior de su célula hospedera.

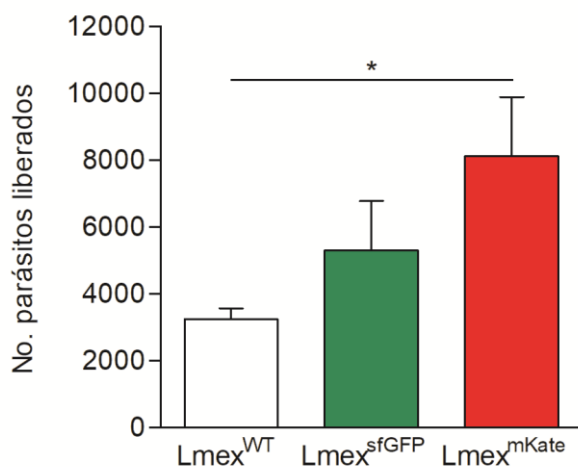


Figura 16. Sobrevivencia intracelular de los parásitos transfectados a las 48 h. Los macrófagos se infectaron con promastigotes en fase estacionaria en relación 1:10 durante 2 h. Posteriormente, las células se cambiaron a M199 y se incubaron a temperatura ambiente para inducir la liberación de los parásitos al medio de cultivo, los cuales se contabilizaron a las 48 h. Las barras representan la media del número de parásitos liberados \pm el error estándar de 5 experimentos independientes con 2 réplicas cada uno.

6.7 Análisis de la expresión de LPG en promastigotes fluorescentes

Finalmente, se evaluó si el incremento de la virulencia y la infectividad *in vitro* de los parásitos transfectados con las distintas construcciones se debía al aumento de la expresión de LPG. Para este fin, se cuantificó la expresión de esta molécula en promastigotes de recién aislado del quinto día de crecimiento mediante citometría de flujo. Se observó que la expresión de LPG únicamente incrementa 1.4 veces más en los promastigotes de la cepa $Lmex^{mKate}$ respecto a los parásitos de la cepa silvestre (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína $mKate$ podría modificar la expresión de los factores de virulencia del parásito, incluyendo LPG.

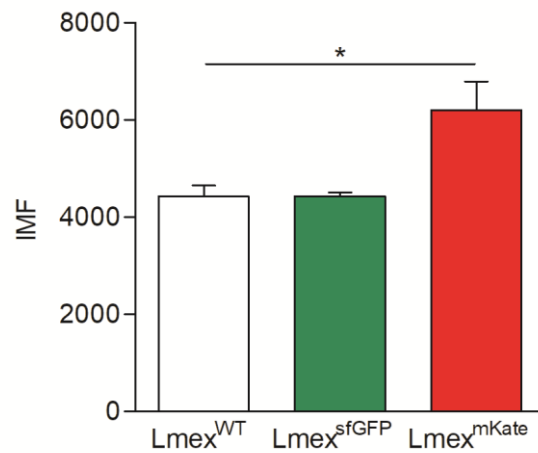


Figura 17. Expresión de LPG en promastigotes de las cepas fluorescentes. Los promastigotes de recién aislado se cosecharon en el día 5 de cultivo y se marcaron con el anticuerpo anti-LPG. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Cada columna representa la intensidad media de fluorescencia \pm la desviación estándar de 5 cultivos axénicos de parásitos.

7. DISCUSIÓN

El avance y perfeccionamiento de las diferentes técnicas de manipulación del genoma de *Leishmania* ha contribuido al estudio de diversos aspectos biológicos del parásito y de su interacción con el hospedero [38]. Particularmente, el desarrollo de parásitos transgénicos que expresan constitutivamente diferentes proteínas fluorescentes ha permitido evaluar de manera más sencilla el curso de la infección mediante el monitoreo de la fluorescencia [39]. Sin embargo, la mayoría de los estudios en los cuales se han utilizado estos parásitos fluorescentes no evalúan si la virulencia del parásito se modifica respecto a las cepas parentales. En algunos casos, se ha reportado que la patogenicidad, así como la capacidad infectiva y replicativa aumenta en diversas especies de *Leishmania* transfectadas con el gen que codifica para la proteína eGFP [48, 50]. Por el contrario, otros autores han demostrado que la transfección de las proteínas GFP y RFP no modifica el crecimiento, la infectividad y la morfología de *L. amazonensis* [45]. Estos trabajos sugieren que la expresión de algunas proteínas fluorescentes puede modificar la virulencia de los parásitos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si la virulencia de las cepas fluorescentes $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ se modifica respecto a la cepa silvestre.

Los parásitos modificados para la expresión de las proteínas sfGFP y mKate utilizados en el presente estudio fueron generados en el laboratorio de Inmunoparasitología de la UIME. Previo al desarrollo de los diferentes ensayos, la fluorescencia expresada por las proteínas reporteras se verificó mediante microscopía y citometría de flujo en cada una de las cepas transfectadas. A partir de las micrografías obtenidas se observó la expresión de ambas proteínas fluorescentes en los promastigotes y amastigotes de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$. Asimismo, mediante el análisis por citometría de flujo se observó una separación cuantitativa entre los parásitos transfectados y silvestres (Apéndice A). Estos resultados demuestran que los genes reporteros de ambas proteínas fluorescentes integrados previamente mediante el sistema de expresión pLEXY en el locus 18S del rRNA se siguen transcribiendo en ambas formas del ciclo de vida del parásito [51], lo cual indica que la expresión de la fluorescencia se ha mantenido constante sin selección desde la modificación genética del parásito.

Una vez que se verificó la fluorescencia de cada una de las cepas, se evaluó si la virulencia de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ se modifica respecto a la $Lmex^{WT}$. Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas fluorescentes inducen un aumento en el tamaño de las lesiones de las orejas infectadas, el cual fue mayor en los ratones infectados con la cepa $Lmex^{mKate}$. Estos resultados demuestran que la infección con ambas cepas modificadas para la expresión de las

proteínas sfGFP y mKate puede aumentar la inflamación en el sitio de infección. Seif y colaboradores, obtuvieron resultados similares en los cuales demostraron que la infección de ratones BALB/c con la cepa fluorescente *L.major*^{EGFP} genera lesiones significativamente más grandes [48]. Es importante destacar que la proteína sfGFP utilizada en este estudio y la EGFP reportada con anterioridad, fueron diseñadas a partir de la proteína parental GFP. Esta observación sugiere que las variantes verdes fluorescentes podrían modificar el curso de la infección ocasionada por *Leishmania*. Adicionalmente, estos resultados reportan por primera vez que una proteína rojo fluorescente altera el desarrollo de las lesiones generadas por *L. mexicana*.

Para evaluar si el aumento en la inflamación de las orejas infectadas se debía a un incremento del número de parásitos en las lesiones, se cuantificó la carga parasitaria en el sitio de inoculación de los parásitos y en el ganglio linfático más cercano al sitio de infección. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó un ligero incremento en la carga de los ratones infectados con ambas cepas fluorescentes, el cual fue mayor en la cepa *Lmex*^{mKate}. Estos resultados podrían indicar un aumento en la capacidad infectiva de las cepas fluorescentes o cambios en la respuesta inmune contra el parásito. Algunos estudios han reportado una respuesta inmune específica hacia las proteínas fluorescentes en diversos modelos experimentales [63, 74 & 75]. En particular, se ha descrito que se producen anticuerpos de tipo IgG 1 contra la proteína sfGFP, lo cual podría estar promoviendo la fagocitosis y la sobrevida intracelular del parásito debido al incremento en la opsonización de los amastigotes [76]. En cuanto a la proteína mKate se desconoce si induce una respuesta específica en el modelo de susceptibilidad a la leishmaniasis por lo que sería importante evaluar dicho fenómeno.

Con la finalidad de evaluar si el aumento en la carga parasitaria se relacionaba con la producción de anticuerpos específicos contra el parásito, se cuantificaron los títulos anti-*Leishmania* en los sueros de los ratones infectados con las cepas transfectadas. Los resultados mostraron que el incremento de los títulos de anticuerpo fue proporcional al número de parásitos cuantificados en las lesiones, de manera que los títulos anti-*Leishmania* más altos se cuantificaron en los ratones infectados con la cepa *Lmex*^{mKate}. Estudios previos han demostrado que la respuesta humoral contra el parásito se asocia con la progresión de la enfermedad debido a que induce una respuesta celular tipo Th2 [35]. Además, se ha visto que los complejos inmunes (antígeno-anticuerpo) aumentan proporcionalmente con la carga parasitaria, lo cual favorece la sobrevida y replicación del parásito al interior de la célula hospedera [77]. Particularmente, se ha visto que altas concentraciones de anticuerpos inducen un perfil de citocinas anti-inflamatorias, mientras que concentraciones moderadas generan un ligero efecto en la producción de IL-10 [78].

Con el objetivo de definir si el incremento de la virulencia se relacionaba directamente con la capacidad infectiva del parásito, se analizó la infección *in vitro* de macrófagos murinos a las 48 post-infección. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que el porcentaje de macrófagos infectados y la carga parasitaria *in vitro* aumentó significativamente en la infección con la cepa Lmex^{sfGFP}. Estos datos sugieren que la expresión de la proteína sfGFP incrementa la capacidad infectiva de *L. mexicana*. Previamente se han reportado resultados similares en los cuales se ha visto que la infectividad y la replicación de *L. mexicana* incrementan con la transfección de la proteína eGFP [50]. En este estudio se propone que el aumento de la infectividad de la cepa Lmex^{sfGFP} se debe a que la expresión de la proteína reportera induce la externalización de la fosfatidilserina (PS) debido al estrés oxidativo que genera en las células (Apéndice B) [79, 80]. Este fosfolípido, al actuar como una señal fagocítica, podría estar incrementando la internalización de los parásitos al ser reconocido directamente por diversos receptores presentes en el macrófago [81]. Estudios previos han demostrado que algunas especies de *Leishmania* son capaces de mimetizar la expresión extracelular de la PS sin inducir la muerte celular subsecuente [82, 83]. Esta estrategia facilita el establecimiento y la replicación del parásito al interior de la célula hospedera debido a que el reconocimiento directo de la PS inhibe las funciones microbicidas del macrófago mediante la producción de citocinas anti-inflamatorias [84, 85].

En relación con las vacuolas parasitóforas, se observó un incremento del tamaño de los fagosomas generados por los macrófagos infectados con la cepa Lmex^{sfGFP}. Esta observación puede relacionarse con la carga parasitaria cuantificada en las células infectadas con dicha cepa debido a que se ha propuesto que el tamaño de las vacuolas parasitóforas influye en el crecimiento y la sobrevivencia intracelular del parásito [86, 87]. Por ejemplo, Wilson y colaboradores demostraron que la reducción del tamaño de los fagosomas generados por fibroblastos infectados con *L. amazonensis*, se relaciona directamente con la disminución en el número de parásitos intracelulares. Además, observaron que la carga parasitaria de los fibroblastos que inducen vacuolas de mayor tamaño es mayor en comparación con los fibroblastos de vacuolas pequeñas, la cual no se modifica cuando las células son tratadas con inhibidores de iNOS [88]. Estos resultados sugieren que la replicación de los parásitos es más eficiente en vacuolas de mayor tamaño y no se relaciona con la disminución en la producción de NO. Actualmente, se desconoce el mecanismo mediante el cual algunas especies de *Leishmania* inducen fagosomas de mayor tamaño. En la infección de macrófagos con *L. mexicana*, se ha visto que la secreción intracelular del proteofosfoglicano (PPG) y la cisteína peptidasa B (CPB) a través de la regulación de GP63, contribuyen con la expansión de la vacuola parasitófora [89, 90]. Los parásitos de la cepa Lmex^{sfGFP} podrían estar regulando alguna de estas vías, sin embargo, se requieren de más estudios para comprobarlo.

Una vez que se determinó la capacidad infectiva de cada una de las cepas, se analizó la sobrevivencia intracelular de los parásitos internalizados por los macrófagos a las 48 horas de infección. Los resultados obtenidos mostraron que los parásitos de las cepas $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ sobreviven más a la actividad microbicida del macrófago, siendo mayor en la cepa $Lmex^{mKate}$. Esta observación puede relacionarse con la externalización de la fosfatidilserina discutida anteriormente, ya que se sabe que el reconocimiento de este fosfolípido por parte del macrófago inhibe la síntesis de NO mediante la secreción de IL-10 y TGF- β [82]. En cuanto a la sobrevivencia entre los parásitos de ambas cepas fluorescentes, no se observó una concordancia entre la carga parasitaria *in vitro* y el número de parásitos liberados. Los macrófagos infectados con la cepa $Lmex^{mKate}$ liberaron un mayor número de parásitos a pesar de que el porcentaje de infección y la carga parasitaria fue menor en comparación a la cepa $Lmex^{sfGFP}$. Estos resultados demuestran que el incremento en el número de células infectadas y parásitos internalizados no se correlaciona con la sobrevivencia intracelular. Además, el incremento en la capacidad infectiva no determina el grado de patogenicidad del parásito puesto que la cepa que presentó la mayor sobrevivencia intracelular ($Lmex^{mKate}$) fue la que generó las lesiones más grandes en los ratones infectados. Lo anterior sugiere que la exteriorización de la PS no es el único mecanismo por el cual se están inhibiendo las funciones efectoras de los macrófagos debido a que la cepa que expresa mayores niveles de PS no es la que más sobrevive al interior de los macrófagos.

Por último, con la finalidad de comprender la infectividad de las cepas fluorescentes en relación con los factores de virulencia del parásito, se evaluó la expresión de LPG en promastigotes de fase estacionaria. De acuerdo con los resultados obtenidos se observó un incremento en la expresión de LPG en la cepa $Lmex^{mKate}$. Estos resultados indican que la transfección del gen de la proteína mKate aumenta la expresión de LPG, lo cual podría relacionarse con el incremento en la sobrevivencia intracelular y con el tamaño de las lesiones observadas en las infecciones *in vivo*. De esta forma, se sabe que LPG contribuye a la sobrevivencia del parásito debido a que interfiere con la respuesta pro-inflamatoria y con la actividad microbicida de la célula a través de su interacción con TLR-2 [91, 92]. Estudios previos han reportado que cepas consideradas como altamente virulentas de *L. major* expresan mayores niveles de LPG e inducen una menor producción de NO en comparación a las cepas poco virulentas [93]. Además, se ha visto que este factor de virulencia contribuye a la resistencia del parásito a diversos compuestos oxidantes [94].

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados observados se puede concluir que la virulencia de las cepas fluorescentes $Lmex^{sfGFP}$ y $Lmex^{mKate}$ incrementa respecto a la cepa silvestre. En los ensayos de las infecciones *in vivo* se observó que ambas cepas transfectadas generan lesiones más grandes, en las cuales a su vez se cuantificó un mayor número de parásitos. Además, se observó un aumento en los títulos de anticuerpo anti-*Leishmania* en relación al incremento de la carga parasitaria. Debido a que no se observó un aumento proporcional entre el tamaño de las lesiones y el número de parásitos, sería interesante evaluar las propiedades inmunogénicas de ambas proteínas reporteras en el modelo murino de susceptibilidad debido a que podrían estar alterando la respuesta inmune.

En cuanto a las infecciones *in vitro*, se observó una mayor capacidad infectiva en la cepa $Lmex^{sfGFP}$, lo cual se relacionó con el incremento en la externalización de la fosfatidilserina en los promastigotes con los cuales se infectaron los macrófagos. Aunque la infectividad de la cepa $Lmex^{sfGFP}$ fue mayor en comparación con la cepa $Lmex^{mKate}$, la sobrevivencia intracelular del parásito fue mayor en la cepa que expresa la proteína rojo fluorescente. Este último resultado a su vez se correlaciona con el incremento en la expresión de LPG en los promastigotes de fase estacionaria. Estos resultados demuestran la importancia de analizar si la manipulación genética del parásito modifica la virulencia de *L. mexicana*, lo cual podría influir en los resultados de los experimentos en los que se utilicen parásitos fluorescentes.

9. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud (2012). Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del comité de expertos de la OMS sobre el control de las Leishmaniasis, Ginebra: 22 a 26 de marzo de 2010, OMS, Serie de informes técnicos, no. 949, pp. 200. Prensa OMS, Ginebra, Suiza.
2. Centers for Disease Controls and Prevention. Parasites - Leishmaniasis (10 de Enero de 2013). Recuperado el 22 de Marzo del 2017, de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html> .
3. Pan American Health Organization. Neglected Infectious Diseases List. Visceral Leishmaniasis (31 de Marzo del 2014). Recuperado el 2 de Abril del 2017, de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420%3A2012-leishmaniasis-visceral&catid=3940%3Ageneral&Itemid=39347&lang=en.
4. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO). Data repository: Neglected tropical diseases, Leishmaniasis. 2016. Recuperado el 7 de Abril del 2015, de <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en>.
5. Secretaria de Salud. Dirección General Adjunta de Epidemiología. Anuario de Morbilidad 1984 - 2015 (30 de Abril de 2014). Recuperado el 23 de Marzo del 2016, de: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/anuarios-de-morbilidad-1984-2016>.
6. Hepburn, N. C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1(4), 563-570.
7. Berman, J. D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, 24(4), 684-703.
8. David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*, 22(6), 491-502.
9. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis (27 de Junio del 2014). Recuperado el 30 de Abril del 2017, de <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

10. Rincón, M., Silva, S., Dueñas, R. & López-Jaramillo, P. (2009). Leishmaniasis Cutánea Diseminada: Reporte de Dos Casos en Santander, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(1): 145-150.
11. Moraes, B. T., Filho Fde, S., Neto, J. C., Neto, P. S. & Melo, J. E. Junior. (2012). Laryngeal leishmaniasis. *Int Arch Otorhinolaryngol*, 16(4), 523-526.
12. Muskus, C. E. & Marin Villa, M. (2002). [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. *Biomedica*, 22(2), 167-177.
13. Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 22(9), 439-445.
14. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votypka, J., Marty, P., Delaunay, P. & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(3), e0004349.
15. Schonian, G., Mauricio, I. & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*, 26(10), 466-469.
16. García-Almagro, D. (2005). Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 96(1): 1-24.
17. Van der Auwera, G. & Dujardin, J. C. (2015). Species typing in dermal leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 28(2), 265-294.
18. Chang, K. P. & McGwire, B. S. (2002). Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis*, 1(1), 1.
19. Lodge, R. & Descoteaux, A. (2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol*, 114(3), 256-265.

20. Kavooosi, G., Ardestani, S. K., Kariminia, A. & Tavakoli, Z. (2006). Production of nitric oxide by murine macrophages induced by lipophosphoglycan of *Leishmania major*. *Korean J Parasitol*, 44(1), 35-41.
21. Moody, S. F. (1993). Molecular variation in *Leishmania*. *Acta Trop*, 53(3-4), 185-204.
22. Franco, L. H., Beverley, S. M. & Zamboni, D. S. (2012). Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Parasitol Res*, 2012, 165126.
23. Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*, 10(1), 111-129.
24. Gurung, P. & Kanneganti, T. D. (2015). Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cell Microbiol*, 17(9), 1286-1294.
25. Lodge, R. & Descoteaux, A. (2005). Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol*, 114(3), 256-265.
26. Seguin, O. & Descoteaux, A. (2016). *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol*, 309, 1-6.
27. Mosser, D. M. & Brittingham, A. (1997). *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9-23.
28. Gupta, G., Oghumu, S. & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*, 82, 155-184.
29. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., et al. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*, 146(10), 3444-3451.
30. Podinovskaia, M. & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*, 10(1), 111-129.

31. Oghumu, S., Lezama-Davila, C. M., Isaac-Marquez, A. P. & Satoskar, A. R. (2010). Role of chemokines in regulation of immunity against leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 126(3), 389-396.
32. van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., et al. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*, 173(11), 6521-6525.
33. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr Opin Microbiol*, 26, 32-40.
34. Olivier, M., Gregory, D. J. & Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*, 18(2), 293-305.
35. Sacks, D. L., Scott, P. A., Asofsky, R. & Sher, F. A. (1984). Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol*, 132(4), 2072-2077.
36. Kane, M. M. & Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol*, 166(2), 1141-1147.
37. Chu, N., Thomas, B. N., Patel, S. R. & Buxbaum, L. U. (2010). IgG1 is pathogenic in *Leishmania mexicana* infection. *J Immunol*, 185(11), 6939-6946.
38. Beattie, L., Evans, K. J., Kaye, P. M. & Smith, D. F. (2008). Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunol*, 30(4), 255-266.
39. Lang T., Lecoer H. & Prina E. (2009). Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends in Parasitology*, 25(10): 464-473.
40. Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S. et al. (2008). *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science*, 321(5891), 970-974.

41. Millington, O. R., Myburgh, E., Mottram, J. C. & Alexander, J. (2010). Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 126(3), 310-317.
42. Bolhassani, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Zamanilui, S., Zahedifard, F., Seyed, N., et al. (2011). Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. *Exp Parasitol*, 127(3), 637-645.
43. Calvo-Alvarez, E., Guerrero, N. A., Alvarez-Velilla, R., Prada, C. F., Requena, J. M., Punzon, C., et al. (2012). Appraisal of a *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(11), e1927.
44. Pulido, S. A., Munoz, D. L., Restrepo, A. M., Mesa, C. V., Alzate, J. F., Velez, I. D., et al. (2012). Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop*, 122(1), 36-45.
45. Rocha, M. N., Correa, C. M., Melo, M. N., Beverley, S. M., Martins-Filho, O. A., Madureira, A. P., et al. (2013). An alternative *in vitro* drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 75(3), 282-291.
46. Patel, A. P., Deacon, A. & Getti, G. (2014). Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. *Parasitology*, 141(4), 501-510.
47. Vacchina, P. & Morales, M. A. (2014). *In vitro* screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(3), 1825-1828.
48. Seif, S., Kazemi, F., Gholami, E., Seyed, N., Taslimi, Y., Habibzadeh, S., et al. (2016). EGFP reporter protein: its immunogenicity in *Leishmania*-infected BALB/c mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(9), 3923-3934.
49. Bastos, M. S., Souza, L. A., Onofre, T. S., Silva, A. Junior, Almeida, M. R., Bressan, G. C., et al. (2017). Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and

- its application as an alternative method for drug screening *in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(2), 155-159.
50. Palacios, G., Parodi, A., Upegui, Y. A., Montoya, A., Pulido, S., Velez, I. D., et al. (2017). Studies *in vitro* on infectivity and sensitivity to antileishmanial drugs in New World *Leishmania* species transfected with the green fluorescent protein [pIR3(-)-eGFP]. *Parasitology*, 1-8.
51. Misslitz, A., Mottram, J. C., Overath, P. & Aebischer, T. (2000). Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*, 107(2), 251-261.
52. Sample, V., Newman, R. H. & Zhang, J. (2009). The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev*, 38(10), 2852-2864.
53. Stepanenko, O. V., Stepanenko, O. V., Shcherbakova, D. M., Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K. & Verkhusha, V. V. (2011). Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *Biotechniques*, 51(5), 313-314, 316, 318 passim.
54. Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. (2005). Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging. *Trends Biotechnol*, 23(12), 605-613.
55. Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-239.
56. Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273(5280), 1392-1395.
57. Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-544.
58. Shcherbo, D., Merzlyak, E. M., Chepurnykh, T. V., Fradkov, A. F., Ermakova, G. V., Solovieva, E. A., et al. (2007). Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods*, 4(9), 741-746.

59. Chapman, S., Oparka, K. J. & Roberts, A. G. (2005). New tools for *in vivo* fluorescence tagging. *Curr Opin Plant Biol*, 8(6), 565-573.
60. Pedelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 24(1), 79-88.
61. Pletneva, N. V., Pletnev, V. Z., Shemiakina, II, Chudakov, D. M., Artemyev, I., Wlodawer, A., et al. (2011). Crystallographic study of red fluorescent protein eqFP578 and its far-red variant Katushka reveals opposite pH-induced isomerization of chromophore. *Protein Sci*, 20(7), 1265-1274.
62. Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., et al. (2016). Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in *in vivo* Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev*, 12(5), 553-559.
63. Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tuting, T., et al. (2000). Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther*, 7(23), 2036-2040.
64. Choy, J. C. (2010). Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ*, 17(4), 567-576.
65. Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762.
66. Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H. & Ke, N. J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun*, 260(3), 712-717.
67. Knodler, L. A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B. A. & Steele-Mortimer, O. (2005). Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit *Salmonella enterica* virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. *Infect Immun*, 73(10), 7027-7031.

68. Oscar, T. P. (2003). Comparison of predictive models for growth of parent and green fluorescent protein-producing strains of *Salmonella*. *J Food Prot*, 66(2), 200-207.
69. Rang, C., Galen, J. E., Kaper, J. B. & Chao, L. (2003). Fitness cost of the green fluorescent protein in gastrointestinal bacteria. *Can J Microbiol*, 49(9), 531-537.
70. Mutoji, K. N. & Ennis, D. G. (2012). Expression of common fluorescent reporters may modulate virulence for *Mycobacterium marinum*: dramatic attenuation results from Gfp over-expression. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 155(1), 39-48.
71. Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T. & Louis, J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol*, 7(5), 545-555.
72. Englen, M. D., Valdez, Y. E., Lehnert, N. M. & Lehnert, B. E. (1995). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is expressed and secreted in cultures of murine L929 cells. *J Immunol Methods*, 184(2), 281-283.
73. Aguilar Torrentera, F., Lambot, M. A., Laman, J. D., Van Meurs, M., Kiss, R., Noel, J. C., et al. (2002). Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg*, 66(3), 273-279.
74. Rosenzweig, M., Connole, M., Glickman, R., Yue, S. P., Noren, B., DeMaria, et al. (2001). Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood*, 97(7), 1951-1959.
75. Yuzhakova, D. V., Shirmanova, M. V., Serebrovskaya, E. O., Lukyanov, K. A., Druzhkova, I. N., Shakhov, B. E., et al. (2015). CT26 murine colon carcinoma expressing the red fluorescent protein KillerRed as a highly immunogenic tumor model. *J Biomed Opt*, 20(8), 88002.
76. Del Tordello, E., Danilchanka, O., McCluskey, A. J. & Mekalanos, J. J. (2016). Type VI secretion system sheaths as nanoparticles for antigen display. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(11), 3042-3047.

77. Ueno, N. & Wilson, M. E. (2012). Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol*, 28(8), 335-344.
78. Gallo, P., Goncalves, R. & Mosser, D. M. (2010). The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett*, 133(2), 70-77.
79. Kalyanaraman, B. & Zielonka, J. (2017). Green fluorescent proteins induce oxidative stress in cells: A worrisome new wrinkle in the application of the GFP reporter system to biological systems? *Redox Biol*, 12, 755-757.
80. Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E. J., Malone, C. C., et al. (2017). Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells. *Redox Biol*, 12, 462-468.
81. Lauber, K., Blumenthal, S. G., Waibel, M. & Wesselborg, S. (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Molecular cell*, 14:277-287
82. de Freitas Balanco, J. M., Moreira, M. E., Bonomo, A., Bozza, P. T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., et al. (2001). Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol*, 11(23), 1870-1873.
83. Wanderley, J. L., Moreira, M. E., Benjamin, A., Bonomo, A. C. & Barcinski, M. A. (2006). Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol*, 176(3), 1834-1839.
84. Fadok, V. A., de Cathelineau, A., Daleke, D. L., Henson, P. M. & Bratton, D. L. (2001). Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem*, 276(2), 1071-1077.

85. Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. A. (2001). The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(8), 627-633.
86. Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., et al. (2000). Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci*, 113 Pt 19, 3531-3541.
87. Niño, A. & Camacho, M. (2004). Impacto del volumen del fagosoma en la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos murinos activados. *Acta Biológica Colombiana*, 9(2), 94-95.
88. Wilson, J., Huynh, C., Kennedy, K. A., Ward, D. M., Kaplan, J., Aderem, A. & Andrews, N. W. (2008). Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. *PLoS Pathog*, 4(10), e1000179.
89. Peters, C., Stierhof, Y. D. & Ilg, T. (1997). Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immun*, 65(2), 783-786.
90. Casgrain, P. A., Martel, C., McMaster, W. R., Mottram, J. C., Olivier, M., & Descoteaux, A. (2016). Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. *PLoS Pathog*, 12(5), e1005658.
91. de Veer, M. J., Curtis, J. M., Baldwin, T. M., DiDonato, J. A., Sexton, A., McConville, M. J., et al. (2003). MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol*, 33(10), 2822-2831.
92. Kavooosi, G., Ardestani, S. K. & Kariminia, A. (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, 136(10), 1193-1199.
93. Srivastava, S., Pandey, S. P., Jha, M. K., Chandel, H. S. & Saha, B. (2013). *Leishmania* expressed lipophosphoglycan interacts with Toll-like receptor (TLR)-2 to decrease TLR-9 expression and reduce anti-leishmanial responses. *Clin Exp Immunol*, 172(3), 403-409.

94. Spath, G. F., Garraway, L. A., Turco, S. J. & Beverley, S. M. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(16), 9536-9541.

10. APÉNDICES

Apéndice A

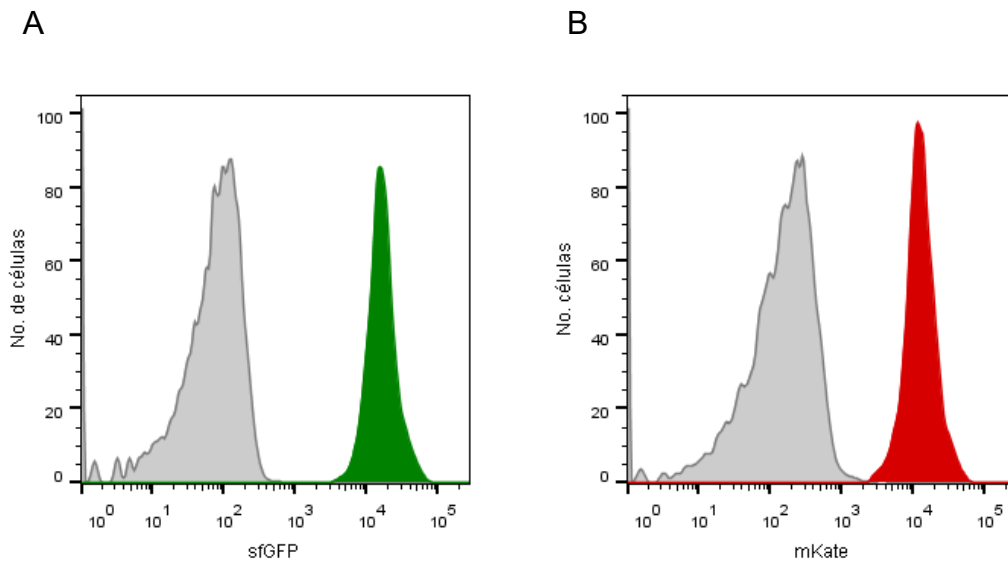
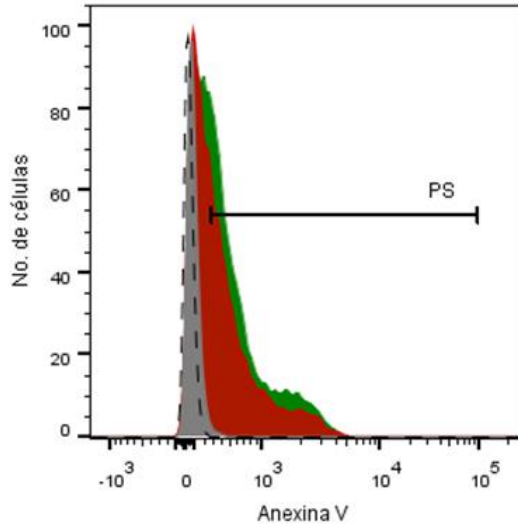


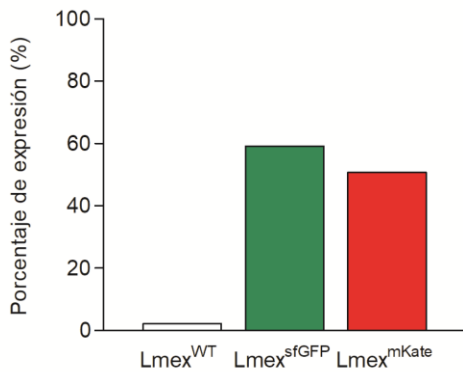
Figura 1. Histogramas representativos de la fluorescencia expresada por las cepas transfectadas. Los parásitos de la cepa $Lmex^{sfGFP}$ se obtuvieron en el canal FL1-H (A) y los de la cepa $Lmex^{mKate}$ se adquirieron en el canal FL2-H (B). Los histogramas de color gris corresponden a la cepa $Lmex^{WT}$.

Apéndice B

A



B1



B2

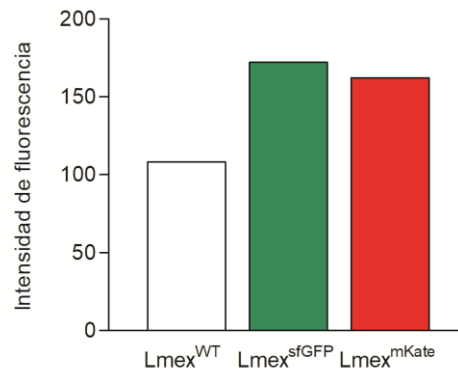


Figura 2. Externalización de PS en los promastigotes de las cepas fluorescentes. Los parásitos fueron cosechados en el quinto día de crecimiento y lavados 2 veces con PBS para eliminar los restos del cultivo celular. Los promastigotes se tiñeron con Anexina V (BD-Pharmigen) conjugado con APC en dilución 1:20 y se incubaron durante 20 minutos en oscuridad. Por último, las células se resuspendieron en PBS y se analizó la expresión de PS por citometría de flujo. A) Histograma representativo de la expresión de PS en las cepas *Lmex^{WT}* (gris), *Lmex^{sfGFP}* (verde) y *Lmex^{mKate}* (rojo). En líneas punteadas se observa el control de promastigotes sin teñir. El porcentaje de expresión (B1) y la intensidad de fluorescencia (B2) de las distintas cepas se representan en gráficas de barras.