



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LPG EN AISLADOS DE
LEISHMANIA OBTENIDOS DE PACIENTES CON DISTINTO CUADRO CLÍNICO Y SU
CORRELACIÓN CON LA VIRULENCIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. VILLALBA ANDRADE LUCIA

**TUTORA PRINCIPAL: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CD. MX. FEBRERO, 2019



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.

OFICIO CPCB/057/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VILLALBA ANDRADE LUCIA** con número de cuenta **306296969**, con la tesis titulada **"ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CINÉTICA DE EXPRESIÓN DE LPG EN AISLADOS DE *Leishmania* OBTENIDOS DE PACIENTES CON DISTINTOS CUADROS CLÍNICOS Y SU CORRELACIÓN CON LA VIRULENCIA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER**:

Presidente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Vocal: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
Secretario: DRA. ANA MARÍA FERNÁNDEZ PRESAS
Suplente: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Suplente: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 15 de enero de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada.

Al apoyo para los proyectos CONACYT 221405, PAPIIT IN217515 y PAPIIT IN211418.

A los miembros de mi Comité Tutorial: Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Ana María Fernández

Presas y Dra. Gladis del Carmen Fragoso González.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por poner a mi disposición todas las herramientas para desarrollarme académicamente.

A la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina por el espacio y la infraestructura para llevar a cabo esta tesis.

A la Dra. Becker con admiración por su apoyo en mi formación académica.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por su invaluable asesoría en el presente proyecto, y su apoyo técnico en las técnicas de marca intracelular de parásitos, infecciones *in vivo* e *in vitro* y en los ensayos de estallido oxidativo y sobrevida.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal, por el aporte en esta investigación, su apoyo técnico en la dilución limitante y en la citometría de flujo.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia, por su ayuda y supervisión en los ensayos de dilución limitante e infección *in vitro*, así como su apoyo con los cultivos de parásitos de *Leishmania* que se usaron en ese trabajo.

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

A la M. en C. Laura Enedina Soto Serna y a la M. en C. Raquel Torres Vélez por su apoyo con la técnica de dilución limitante.

A los animales de laboratorio con los que se realizaron los experimentos para esta tesis.

Dedicatorias

A mis papas, por todos los sacrificios que han hecho para brindarnos a mi hermana y a mi todo lo necesario para desarrollarnos académica y personalmente, por sus desveladas y desmañadas, por estar ahí siempre para nosotras.

A mi hermana, por ser compañera y cómplice de mis locuras y por ser un ejemplo de dedicación y pasión por la vida.

A mis abuelas y abuelos, por ser la raíz de la familia por la que siempre estaré agradecida.

A mi familia de sangre y mi familia elegida por su apoyo y compañía, comparto con ustedes este trabajo que representa el fin de un ciclo y el comienzo de uno nuevo, este logro es nuestro.

Gracias vida por tantas oportunidades.

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Leishmaniasis	4
1.2 Epidemiología	4
1.4 Morfología	5
1.5 Ciclo de vida	6
1.6 El vector	7
1.7 Clasificación de los cuadros clínicos en la leishmaniasis	8
1.7.1 Leishmaniasis visceral o <i>Kala- Azar</i> (LV)	8
1.7.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	10
1.7.3 Leishmaniasis cutánea (LC).....	11
1.7.3.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	12
1.7.3.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	12
1.8 Patogenia de la infección por <i>Leishmania</i>	13
1.9 Factores de virulencia en <i>Leishmania</i>	16
1.9 Lipofosfoglicano (LPG).....	17
2. ANTECEDENTES.....	21
3. HIPÓTESIS.....	23

4. OBJETIVOS	24
Objetivo general:	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1 Cultivo y aislamiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	25
5.2 Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c.....	26
5.3 Tinción de <i>L. mexicana</i> con α -LPG para análisis de citometría de flujo.....	26
5.4 Ensayo de fagocitosis.	27
5.5 Análisis de sobrevivencia de parásitos intracelulares	27
5.6 Ensayo de estallido oxidativo.....	28
5.7 Infección de ratones BALB/c	28
5.8 Análisis de la carga parasitaria por dilución limitante	29
5.9 Análisis estadístico	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1 Análisis de las curvas de crecimiento de tres aislados de <i>L. mexicana</i>	30
6.2 Análisis de la expresión de LPG.....	31
6.3 Análisis de la infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos obtenidos de médula ósea con los tres aislados de <i>L. mexicana</i>	35
6.4 Análisis de la sobrevivencia de tres aislados de <i>L. mexicana</i> en macrófagos murinos de médula ósea....	37
6.5. Análisis del efecto que ejercen los tres aislados de <i>L. mexicana</i> sobre el estallido oxidativo de macrófagos de ratones BALB/c.	38
6.6 Análisis de la progresión de la infección en cojinete plantar en ratones BALB/c con tres aislados de <i>L. mexicana</i>	41

6.7 Análisis de la carga parasitaria en lesiones de cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con tres aislados de <i>L. mexicana</i>	42
7. DISCUSIÓN	44
8. CONCLUSIONES.....	51
9. PERSPECTIVAS.....	52
10. LITERATURA CITADA.....	53

RESUMEN

La molécula de LPG es un complejo fosfolípido presente en la superficie de *Leishmania* que funciona como un factor de virulencia, ya que le confiere a *Leishmania* ventajas adaptativas para poder regular la respuesta inmune del hospedero mamífero. En este trabajo se analizaron tres aislados de *Leishmania mexicana*, dos de ellos obtenidos de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada y uno con leishmaniasis mucocutánea. Se analizó la expresión de LPG, así como los efectos moduladores que ejercen los parásitos sobre macrófagos, tales como su capacidad infectiva, su capacidad de inhibir el estallido oxidativo y su sobrevivencia intracelular. Adicionalmente se analizó la capacidad de los parásitos de infectar a ratones BALB/c.

Se encontró que la expresión de LPG de los parásitos aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada (“Lacandona” y “Galina”) se puede relacionar con el índice de infección y con la inhibición del estallido oxidativo de macrófagos infectados. En el aislado del paciente mucocutáneo “MCQR”, la expresión de LPG se relacionó con el índice de infección y con la carga parasitaria en macrófagos. Sin embargo, estos parásitos ejercieron un efecto activador sobre el estallido oxidativo que no se correlacionó con la expresión de LPG y contrasta con los parásitos “Lacandona” y “Galina” de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada. Queda por explorarse si esta diferencia pudiera estar asociada a diferencias en las moléculas LPG, lo cual sería un hallazgo novedoso ya que a la fecha únicamente se han descrito diferencias entre las moléculas de LPG de diferentes especies de *Leishmania*, pero no entre distintos aislados de una misma especie. También se desconoce si estas diferencias

son la causa del distinto grado de virulencia que ejercieron los parásitos sobre mecanismos efectores de macrófagos.

ABSTRACT

The LPG molecule is a complex phospholipid present on the surface of *Leishmania* that functions as a virulence factor, since it gives *Leishmania* adaptive advantages to regulate the immune response of the mammalian host. In this work three strains of *Leishmania mexicana* were analyzed, two of them obtained from patients with localized cutaneous leishmaniasis and one with mucocutaneous leishmaniasis. The expression of LPG was analyzed, as well as the modulating effects exerted by the parasites on macrophages, such as their infective capacity, their ability to inhibit oxidative burst and their intracellular survival. Additionally, the ability of the parasites to infect BALB/c mice was analyzed. It was found that the expression of LPG of the parasites isolated from patients with localized cutaneous leishmaniasis ("Lacandona" and "Galina") can be related to the infection index and to the inhibition of the oxidative burst of infected macrophages. In the strain of the mucocutaneous patient "MCQR", the expression of LPG was related to the infection index and the parasitic load in macrophages. However, these parasites exerted an activating effect on the oxidative burst that did not correlate with the expression of LPG and contrasted with the parasites "Lacandona" and "Galina" of patients with localized cutaneous leishmaniasis. It remains to be explored if this difference could be associated with differences in the LPG molecules, which would be a novel finding since to date only differences have been described between the LPG molecules of different species of *Leishmania*, but not between different isolates of a same species. It is also unknown if these differences are causing the different degree of virulence exerted by the parasites on macrophage effector mechanisms.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

Los parásitos protozoarios del género *Leishmania* provocan un amplio espectro de cuadros clínicos. Los cuadros clínicos que produce la infección de este parásito incluyen la leishmaniasis cutánea (LC), que puede ser leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis mucocutánea (MC), y la leishmaniasis visceral (LV). Al menos 20 especies de este género pueden infectar al ser humano. Los protozoarios se transmiten por la picadura de flebótomos hembras de los géneros *Lutzomyia*, en el Continente Americano y *Phlebotomus*, en el resto de los continentes.

1.2 Epidemiología

Esta enfermedad parasitaria es endémica en 87 países, de los cuales la mayoría se encuentran en la zona mediterránea de Europa y el Continente Americano [1]. Se ubica en el grupo de enfermedades tropicales desatendidas y se estima que hay 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque hay un importante subregistro. En el año 2015 se reportaron 200 000 nuevos casos de LC y 25 000 de LV. De los casos reportados para la forma cutánea, 150 000 corresponden a la zona del Mediterráneo y 50 000 al Continente Americano, mientras que de los casos de la forma visceral 10 000 corresponden a la región Africana [2]. Se estima que a nivel mundial 310 millones de personas están en riesgo de adquirir esta enfermedad.

1.3 Taxonomía

El parásito *Leishmania* fue descrito en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright en un niño armenio. El género *Leishmania spp.* (Ross, 1903) pertenece al subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Dentro del género *Leishmania* hay dos subgéneros que infectan al humano, *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)* (Lainson and Shaw, 1987) [3].

La clasificación de las especies y subespecies de *Leishmania* se basa en características intrínsecas del parásito, ya sean inmunológicas, bioquímicas o moleculares. La clasificación actual divide al género *Leishmania* en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* [3].

Los diferentes cuadros clínicos que se desarrollan en respuesta a la infección involucran diferentes especies de *Leishmania* y tienen una distribución geográfica característica:

En América, la enfermedad cutánea se atribuye a especies de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*: *L. L. mexicana*, *L. V. braziliensis*, *L.V. panamensis*, *L. V. guyanensis*, y *L. V. peruviana*.

La enfermedad mucocutánea es generada por las especies *L.V. braziliensis* y *L. V. panamensis*, principalmente. *L. chagasi*, causa la forma visceral [4].

1.4 Morfología

Los protozoarios del género *Leishmania* presentan dos formas principalmente: amastigote es la forma intracelular, que se establece en macrófagos y células dendríticas de los

hospederos mamíferos, y promastigotes que se encuentra en el interior del intestino del vector. El amastigote es redondo u ovalado, reside y se multiplica en fagolisosomas de los fagocitos mononucleares, aunque se ha documentado su presencia en otros tipos celulares como neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel [5]. El diámetro de los amastigotes varía dependiendo la especie de *Leishmania* [6], presentan un núcleo grande y un cinetoplasto puntiforme pequeño. El cinetoplasto es una subestructura mitocondrial que contiene DNA único y le da el nombre a este grupo de protozoos del orden Kinetoplastida. El promastigote es elongado, de aproximadamente 10–20 μm , por 2-3 μm (sin contar la longitud del flagelo). Se desarrolla y se multiplica en el intestino del vector [5, 6]. El promastigote presenta un gran núcleo central y el cinetoplasto aparece como una banda granular dentro de la extensión de la mitocondria que se localiza a 1-2 μm del extremo anterior del parásito y es el sitio de donde emerge el flagelo. Es importante señalar que el cinetoplasto contiene su propio genoma, correspondiente al genoma mitocondrial en los mamíferos [7].

1.5 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Leishmania* se desarrolla en dos hospederos y comienza cuando el flebótomo hembra pica a un mamífero infectado para alimentarse e ingiere los amastigotes presentes en células fagocíticas infectadas. Una vez que los parásitos llegan al intestino medio del vector, estos se transforman en la forma de promastigote y comienzan a multiplicarse [8]. En su paso por el tubo digestivo del vector, los promastigotes pasan por diversos cambios morfológicos que culminan con la fase de promastigotes metacíclicos, que

se encuentran en la faringe y la probóscide del insecto [8]. Los parásitos permanecen ahí hasta una nueva picadura donde son inoculados a un nuevo hospedero. Con cada picadura se transmiten aproximadamente entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, de los cuales la mayoría son destruidos por células del sistema inmune del hospedero como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células de Langerhans. Los parásitos que logran sobrevivir a esta primera línea de defensa activan el sistema de complemento y la opsonización les permite adherirse a receptores de superficie del macrófago para ser fagocitados [9]. Una vez dentro del espacio intracelular de células fagocíticas, los parásitos se dividen por fisión binaria y cuando el número de amastigotes es excesiva, rompen la membrana de la célula, liberando los parásitos que a su vez vuelven a ser fagocitados por células vecinas. El ciclo se completa cuando el mosquito se alimenta de un individuo infectado.

1.6 El vector

La leishmaniasis se transmite por la picadura de mosquitos flebótomos hembras infectados de los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Estos insectos adquieren la infección tanto por los humanos, como por reservorios tales como roedores, cánidos y primates infectados de *Leishmania*. Se cree que un 10% de las 800 especies conocidas está involucrado en la transmisión de la leishmaniasis humana [9].

Los mosquitos flebótomos son pequeños, de aproximadamente 3 mm de longitud y de color variable que va desde un tono blanquecino hasta llegar a ser casi completamente negros. Presentan tres pares de patas muy largas y sedas que recubren al cuerpo incluyendo las alas

lanceoladas que se posan en una posición de V. Presentan dos ojos compuestos y la probóscide es de tipo picador-chupador. Sus hábitos alimenticios son principalmente nocturnos, aunque se ha descrito que también pican de día y no tienden a alejarse de su entorno habitual ya que su vuelo es corto [10]. Solo las mosquitas hembras presentan hábitos hematófagos, ya que necesitan un alimento rico en proteínas para poder producir sus huevos [10, 11].

1.7 Clasificación de los cuadros clínicos en la leishmaniasis

La infección por *Leishmania* puede presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas que dependen de las características del parásito (especie, capacidad infectiva, patogenicidad y virulencia), del vector (especie, el número de picaduras y la composición de la saliva) y del hospedero (estado inmunológico y susceptibilidad genética [12]).

Los principales cuadros clínicos que se presentan por infecciones con *Leishmania* son tres:

- a) Leishmaniasis visceral o *Kala azar*, también conocida como fiebre negra.
- b) Leishmaniasis mucocutánea o espundia
- c) Leishmaniasis cutánea: localizada (LCL) o difusa (LCD).

1.7.1 Leishmaniasis visceral o *Kala- Azar* (LV).

Las especies asociadas a este cuadro clínico son principalmente *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. En México se han reportado casos en los estados de Chiapas, Puebla y Guerrero

y el agente etiológico asociado es *L. chagasi* [4]. La infección puede ser asintomática, aguda o crónica y el tiempo de incubación varía entre algunos meses hasta varios años.

Las signos y síntomas generales de este cuadro clínico son: fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. En los niños, los signos y síntomas que se presentan son: fiebre, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis, esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatías, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades. El bazo es grande, firme y puede aparecer con consistencia blanda en casos agudos [12].



Figura1.

Hepatoesplenomegalia.WHO



Figura 2. Síndrome de desgaste.

WHO

1.7.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Este cuadro clínico conocido como espundia en América se presenta después de una enfermedad cutánea, incluso años después y se debe a la metástasis de las lesiones cutáneas. Estas lesiones se inician en las mucosas, principalmente en la nasal, con una inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular. Las complicaciones pueden llegar a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico e involucra varios tejidos como el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe y tráquea. Presenta resistencia a la quimioterapia específica. La mortalidad de este cuadro clínico es muy grande si se llega a presentar en niños [4].



Figura 3. Leishmaniasis mucocutánea. WHO



Figura 4. LMC. Lesión conocida como "nariz de tapir". CDC

1.7.3 Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es la forma de infección con mayor distribución a nivel mundial.

Los principales agentes causales en América son *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*.

Se puede presentar de dos formas, la infección localizada, en la que la infección presenta úlceras en la zona del piquete, y la forma difusa en la que la infección se disemina por la piel

[4].

1.7.3.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

En este cuadro clínico la incubación puede variar entre una a doce semanas. En el lugar de la picadura del mosquito aparece una pápula eritematosa, que generalmente se mantiene asintomática y en algunos casos se presenta una adenopatía regional. Después de 1 a 3 meses se presenta la úlcera con bordes elevados, bien definidos, indurados que paulatinamente adquiere un tono rojizo. Este cuadro clínico puede curar en 3 y 18 meses en más del 90 % de los casos [13].



Figura 5. Leishmaniasis cutánea; lesión conocida como "nariz de tapir". CDC



Figura 6. Leishmaniasis cutánea. CDC

1.7.3.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Este cuadro se produce en el continente americano por el complejo de *L. mexicana* [14]. En este caso la infección se caracteriza por lesiones nodulares diseminadas por toda la piel.

Está reportado que los nódulos de este cuadro clínico presentan un gran número de parásitos y abarcan todo el tegumento a excepción del cuero cabelludo, las regiones inguinal y axilar, genitales, plantas y palmas. En este cuadro clínico se puede presentar resistencia al tratamiento lo que se han asociado a recaídas continuas. La causa de esta sintomatología radica en el tipo de respuesta inmune que desarrolle el paciente en respuesta a la infección por *Leishmania* [4, 15].



Figura 7. Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada. WHO

1.8 Patogenia de la infección por *Leishmania*

En la infección por *Leishmania*, la interacción del parásito con el sistema inmune es muy compleja, y determina la forma clínica de la enfermedad que se desarrollara en respuesta a la infección.

Desde el momento de la picadura por la mosquita infectada inicia una respuesta inmune en el hospedero en respuesta a las piezas bucales del insecto que lacera los vasos sanguíneos e inyecta sustancias vasodilatadoras [16]. El trauma de esta lesión induce en el hospedero

una respuesta inflamatoria que provoca la migración de macrófagos y linfocitos al sitio de la lesión para reorganizar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización [16].

Cerca del 90% de los promastigotes inoculados en el espacio extracelular son eliminados por neutrófilos y eosinófilos sanguíneos que llegan al sitio de la lesión, así como por la activación de la cascada del complemento. Los promastigotes que sobreviven son fagocitados por los macrófagos, donde se transforman en amastigotes e inician su multiplicación [17]. Los promastigotes de *Leishmania* que son opsonizados por el componente C3b del complemento, se unen a los receptores de macrófago CR1 y CR3 que favorecen su fagocitosis y su supervivencia, ya que estos receptores están asociados a una baja actividad inflamatoria en el macrófago [17].

La regulación de la fagocitosis de los promastigotes está dada por receptores de superficie del macrófago. Los ligandos de *Leishmania*, como los glicoconjugados de superficie que incluyen a la GP63 y a los lipofosfolípidos son reconocidos por C3bi, llevando a la opsonización y fagocitosis del parásito [18]. Estas moléculas juegan un papel importante en la supervivencia de las leishmanias dentro de fagolisosomas de células fagocíticas, donde inician su replicación.

Leishmania ha desarrollado mecanismos para sobrevivir dentro del macrófago después de haber sido fagocitada que incluyen la disminución de la producción de óxido nítrico (NO) y la inhibición del estallido oxidativo en el macrófago activado [19]. También se ha descrito la capacidad de los amastigotes de aumentar la producción de IL-10 por los macrófagos. Esto contrarresta el efecto activador de IFN- γ , disminuyendo su producción de IL-12 y TNF- α , lo cual genera un microambiente permisivo para el parásito [20].

Entre los receptores de la respuesta inmune innata que reconocen al parásito están los receptores TLR (Toll-like Receptors) en células dendríticas y macrófagos. Los receptores TLR2 reconocen a LPG y TLR9 es activado por amastigotes intracelulares de *L. donovani* en respuesta al estímulo con IFN- γ [21, 22]. Las células dendríticas fagocitan al parásito principalmente a través de los receptores CD16 y CD64 que favorece la activación de las células dendríticas y aumenta la expresión de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), así como de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas activadas tienen capacidad de procesar y presentar antígenos por ambos complejos, activando así a linfocitos T CD4 y T CD8 [23].

El macrófago es una de las células que desempeña un papel central en la infección por *Leishmania*, al llevar a cabo un triple papel:

- 1) es célula hospedera
- 2) es célula presentadora de antígenos que activa linfocitos T
- 3) es célula efectora, capaz de eliminar al parásito [24].

Sin embargo, *Leishmania* ha desarrollado estrategias de evasión que le permiten ser internalizada por el macrófago por receptores que no activan a la célula y puede sobrevivir dentro del macrófago evadiendo sus mecanismos leishmanicidas. Es capaz de regular la maduración del fagosoma logrando un microambiente más permisivo para su crecimiento en las vesículas, evitando su destrucción. Como resultado de estos mecanismos, las defensas del macrófago tales como el estallido oxidativo y producción de NO disminuyen [25].

En la respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* participan dos subpoblaciones de linfocitos T: los Th1 productores de IFN- γ , IL-2 y TNF- α que incrementan la activación del macrófago y la hipersensibilidad retardada, y la subpoblación de linfocitos Th2 productoras de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 que se relacionan con la inmunidad humoral [26]. De acuerdo con estos perfiles, las cepas de ratones que son capaces de generar una respuesta de tipo Th1 son resistentes a la infección por *Leishmania*, mientras que las que desarrollan una respuesta Th2 son muy susceptibles y cursan con una leishmaniasis progresiva.

Sin embargo, en infecciones humanas no se observa tan claramente el patrón de citocinas Th1/Th2 y más bien presentan perfiles mixtos donde el predominio de Th1 y/o de linfocitos T CD8 se asocian con la resolución de la enfermedad [26, 27]. Los linfocitos T CD8 juegan un papel en la respuesta inmune frente a *Leishmania*, como células citotóxicas y generadoras de IFN- γ , que activan al macrófago induciendo su producción de NO que lleva a la lisis del parásito [28].

Otro grupo celular importante en la infección por *Leishmania* son los linfocitos CD18, cuya deficiencia en el modelo murino provoca la diseminación por alteración de la función del macrófago y una reducción de la respuesta Th1 [29].

1.9 Factores de virulencia en *Leishmania*

En la infección por *Leishmania*, los factores de virulencia se pueden agrupar en diferentes categorías. Estas están basadas en características que le confieren al parásito diferentes aptitudes [30]:

- la capacidad de ingresar al huésped.
- la habilidad para evadir las defensas del sistema inmune.
- la capacidad de proliferar dentro del hospedero.
- la cualidad de contrarrestar la respuesta inmune.

La severidad del cuadro clínico en la leishmaniasis se ha asociado a distintos factores de virulencia del parásito [31]. Los determinantes invasivos/evasivos que *Leishmania* presenta en su superficie y que ayudan al parásito a establecerse, sobrevivir y multiplicarse exitosamente dentro de la célula hospedera como el glicofosfatidilinositol (GPI), glicosilfosfolípidos, lipofosfoglicanos (LPG), fosfoglicanos, proteofosfoglicanos (PPGs), glicoproteína GP63, proteasas de cisteína, histonas, ATPasas y la fosfatidilserina (PS), aunque esta última también se relaciona con una muerte parecida a apoptosis del parásito, por lo que se le considera un mecanismo altruista [32].

1.9 Lipofosfoglicano (LPG)

El parásito *Leishmania* en su forma de promastigote está cubierto por un complejo glicocalyx compuesto de diferentes glicoconjugados anclados a la membrana. De estas moléculas, el LPG o lipofosfoglicano es la más abundante y juega un papel importante en la infectividad y patogénesis del parásito tanto en el vector como en el hospedero mamífero. El LPG de *Leishmania* está constituido por una ancla lipídica que consiste en un 1-Oalquilo-2-*liso*-fosfatidil(*myo*)inositol, con un núcleo de glicano heptasacárido al que se une un polímero PG (fosfoglicano) compuesto por 15-30 unidades repetidas de [6-Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄-] y concluye con un oligosacárido. Las unidades repetidas de

fosfoglicanos varían dependiendo de la especie de *Leishmania* y del estadio de maduración en que se encuentre. Las unidades repetidas de azúcares son cruciales para la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago y el establecimiento de la infección [33, 34].

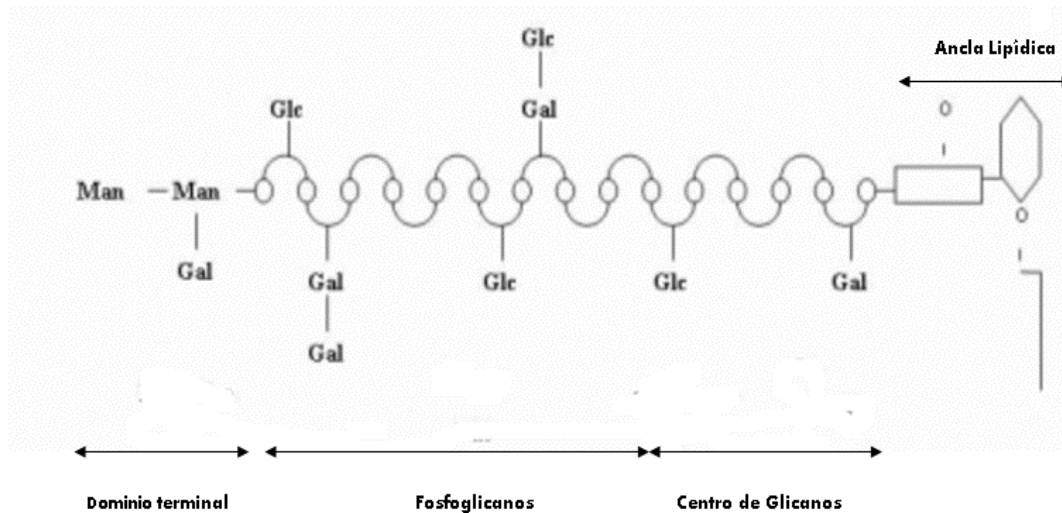


Figura 8. Estructura del LPG de *Leishmania mexicana*.

Todos los dominios del LPG comprendidos por el PG, las cadenas laterales y los oligosacáridos son compartidos con otras moléculas de superficie del parásito [35]. *Leishmania* tiene que sobrevivir a diferentes obstáculos durante la fase del ciclo de vida dentro del tracto digestivo de la mosca. El denso glicocalix que presentan los promastigotes procíclicos al iniciar su diferenciación, formado por LPG y PPG, le brinda protección contra las enzimas hidrolíticas del intestino y evita la liberación de proteasas. También, el LPG brinda la capacidad al parásito de adherirse a las células epiteliales del intestino medio, lo que impide que el parásito sea excretado. Una vez que el parásito madura al estadio

metacíclico, cambia la conformación del LPG, lo que le permite ser liberado de las células epiteliales intestinales [33].

Una vez que el parásito es inoculado en el hospedero mamífero, *Leishmania* debe enfrentar las primeras líneas de defensa de este. Antes de ser internalizado por las células fagocíticas del sistema inmune del hospedero, los promastigotes metacíclicos deben evadir al sistema de complemento. En el promastigote metacíclico, el dominio PG de la molécula de LPG es aproximadamente dos veces más largo que cuando el parásito se encuentra en la fase de promastigote procíclico, lo que evita la unión del complejo de ataque a membrana del complemento y la formación del poro en su superficie. Sin embargo, los pasos iniciales en la cascada de complemento también contribuyen a la entrada de *Leishmania* al macrófago a través de los receptores de complemento. El LPG activa el sistema de complemento permitiendo la generación de las opsoninas C3b y C3bi que se unen a la superficie del promastigote y permiten su fagocitosis por los receptores CR1 y CR3, dos receptores que se asocian con bajo estallido oxidativo y una desregulación en la producción de IL-12 [17].

El LPG también es un factor importante en la internalización del promastigote por el macrófago y le brinda protección contra los mecanismos efectores intracelulares durante las primeras etapas de la infección. Para facilitar la fagocitosis, el LPG se adhiere a los receptores de manosa-fucosa, la proteína de unión a manosa y la proteína C- reactiva.

Una vez dentro del macrófago, los promastigotes se encuentran en la vacuola parasitófora (PV) que tiene que llevar a cabo procesos de fusión antes de convertirse en fagolisosoma con capacidad de destruir al parásito. Las moléculas LPG pueden inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo que inhibe la biogénesis fagosomal. Esto retrasa la

acidificación de la vacuola y la producción de enzimas lisosomales, permitiendo la supervivencia del parásito dentro del macrófago [36].

Inicialmente, se postuló que el retraso en la formación del fagolisosoma brindaba protección al promastigote de la acidez del medio y de las enzimas hidrolíticas dentro del fagolisosoma, sin embargo, ahora se sabe que la molécula de LPG es capaz de interactuar y repeler especies oxidantes de forma directa, por lo que se piensa que la fusión retardada de vacuolas responde más a una evasión del reconocimiento y presentación antigénica del parásito por el sistema inmune [37].

Tanto el estallido oxidativo como la producción de NO son mecanismos efectores del macrófago que son importantes para el control de infecciones por organismos intracelulares como *Leishmania*, y su producción está regulada por la proteína cinasa C (PKC). Sin embargo, el LPG de *Leishmania* inhibe a PKC y su transducción de señales lo que se asocia con un nivel más alto de infección [38]. LPG interactúa con el dominio regulatorio de la PKC que contiene diacilglicerol, calcio y los sitios de unión a fosfolípidos o puede inhibir su activación previniendo que PKC se inserte en la membrana [39]. Otro mecanismo mediante el cual el LPG puede proteger al amastigote dentro del fagolisosoma es la quelación del calcio, que es importante regulador de varias vías de activación celular. Esto se debe a que el calcio se une a las unidades repetidas del LPG sin perturbar la estructura del glicano. La movilización alterada de calcio puede llevar a una traducción de señales deteriorada lo que puede resultar en una deficiente activación de la PKC [36].

2. ANTECEDENTES

En México, la leishmaniasis es prevalente en al menos 22 de las 32 entidades federativas y la mayoría de los casos corresponden a las formas cutáneas de la enfermedad. Las causas de variabilidad en los cuadros clínicos de pacientes infectados por *L. mexicana* incluyen la virulencia de la cepa y el fondo genético del paciente [39]. La molécula de superficie LPG es un importante factor de virulencia del parásito, facilitando la infección y progresión de la enfermedad por su capacidad de modular el sistema inmune.

En el presente trabajo se buscó una posible asociación entre las variaciones en la expresión de LPG de tres diferentes aislados de *L. mexicana* obtenidas de pacientes con cuadros clínicos de leishmaniasis de distinta severidad (dos de LCL y uno de LMC). Los parásitos incluidos en este estudio fueron aislados hace varios años en el laboratorio de Inmunoparasitología de pacientes y mantenidos en cultivos *in vitro* y pases en ratones BALB/c. Los dos aislados de LCL fueron obtenidos de pacientes que se habían infectado en Chiapas pero que mostraron distinto grado de severidad. Así el paciente infectado con el aislado “Lacandona” mostró una evolución rápida que requirió 2 ciclos de tratamiento para su curación. A diferencia de este, el paciente que se había infectado con el aislado “Galina” presentó un cuadro clínico más benigno, de lenta evolución y que curó rápidamente. Por otro lado, el parásito denominado “MCQR” fue aislado en Chetumal de un paciente que presentaba lesiones en mucosa oral. A pesar de que los cuadros clínicos de los pacientes mostraron distinta severidad, los parásitos aislados de ellos fueron tipificados como *L. mexicana* mediante oligonucleótidos específicos desarrollados en el laboratorio [40].

Además de analizar la expresión de la molécula de LPG, se analizaron efectos funcionales de los parásitos sobre macrófagos diferenciados de médula ósea, tales como su capacidad de infectar al macrófago, su capacidad de inhibir el estallido oxidativo, su sobrevivencia intracelular y su capacidad de infectar a ratones BALB/c. Este estudio comparativo busca analizar si parásitos aislados de pacientes con distinta severidad clínica presentan diferencias en la expresión de LPG y en sus mecanismos infectivos que se pudieran correlacionar con la severidad clínica observada en los pacientes.

3. HIPÓTESIS

El nivel de expresión de LPG en los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con cuadros clínicos de distinta severidad se correlaciona directamente con el grado de inhibición del estallido oxidativo, infectividad y sobrevida en el macrófago ejercidos por los parásitos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si los aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con diferentes cuadros clínicos presentan variaciones en el nivel de expresión de LPG y si estas variaciones se correlacionan con la modulación del estallido oxidativo, infectividad y sobrevida del parásito en macrófagos murinos.

Objetivos Particulares:

- Analizar mediante citometría de flujo la expresión del lipofosfoglicano (LPG) en promastigotes de los aislados de *L. mexicana* durante su fase de crecimiento *in vitro*.
- Analizar el índice de infección de macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c tratados con los aislados de *L. mexicana*.
- Analizar si los aislados de *L. mexicana* tienen distinta capacidad de sobrevida en macrófagos de ratones BALB/c
- Analizar si los aislados de *L. mexicana* ejercen distinto efecto sobre el estallido oxidativo en macrófagos de ratones BALB/c.
- Evaluar la progresión de la enfermedad en el cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con los aislados de *L. mexicana*.
- Evaluar la carga parasitaria mediante dilución limitante en el cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con los aislados de *L. mexicana*.

5. METODOLOGÍA

Para la realización de los estudios se utilizaron ratones hembra de 8 semanas de edad de la cepa BALB/c producidos y cuidados en el bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental. El trabajo con ratones se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-199. El sacrificio se realizó por desnucamiento, evitando siempre que no hubiera sufrimiento del animal.

Los aislados de *L. mexicana* utilizados fueron:

Aislado “Lacandona” obtenido de un paciente con LCL en 2014

Aislado “Galina” obtenido de un paciente con LCL aislada en 2011

Aislado “MCQR” obtenido de un paciente con LMC en 2000.

5.1 Cultivo y aislamiento de promastigotes de *L. mexicana*.

Los parásitos utilizados en los experimentos fueron aislados de la lesión del cojinete plantar de ratones BALB/c hembras con 13 semanas de infección, se trabajó solo con el primer pase de cada cultivo. Bajo condiciones de esterilidad, los parásitos fueron aspirados directamente de las lesiones del cojinete plantar utilizando jeringas de insulina. Los parásitos obtenidos se colocaron en medio 199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB).

Para el cultivo de promastigotes, se colocaron 5×10^5 promastigotes por mililitro en una botella de cultivo de 25 c.c. con 10 ml de medio 199 y 10% de SFB a un pH de 7.2. Se incubó a 26°C y se monitoreó el cultivo diariamente.

5.2 Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c

Se diferenciaron macrófagos obtenidos de precursores de médula ósea de ratones BALB/c mediante la siguiente metodología: se obtuvieron los huesos largos (tibia y fíbula) de los ratones, se colocaron en PBS estéril y mediante lavados con PBS se obtuvo la médula ósea. Las células obtenidas se incubaron en placas de 100 x 15 mm en 10 ml de medio RPMI, suplementado con 20% de SFB y 10% de sobrenadante L929 (línea productora de M-CSF). Las células se incubaron durante 7 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. A los 7 días se removió el medio y se desprendieron las células adheridas a la placa mediante lavados con PBS frío. Las células se re-suspendieron en 1 ml de RPMI, suplementado con 10% de SFB.

5.3 Tinción de *L. mexicana* con α -LPG para análisis de citometría de flujo

Se analizó la expresión de LPG mediante citometría de flujo para lo cual se marcaron 1×10^6 promastigotes de cada uno de los aislados de *L. mexicana*. Los parásitos se fijaron durante 15 minutos en frío con paraformaldehído al 2% y se lavaron una vez con PBS. Para permeabilizar la membrana, los parásitos se suspendieron en 50 μ l de regulador Perm/Wash (BD) y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-LPG en una dilución 1:25 durante 30 minutos. Se centrifugaron los parásitos para eliminar el exceso del anticuerpo, y se suspendieron en 50 μ l del anticuerpo secundario en APC (Zymed No. Cat. 81-65-16) diluido 1:200 durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, los parásitos fueron lavados y suspendidos en 200 μ l de PBS para ser leídos en el citómetro de flujo (FACS CANTO II BD)

y analizados con el software FlowJo_V10. Como control de isotipo se utilizó una condición con parásitos marcados solo con el anticuerpo secundario.

5.4 Ensayo de fagocitosis.

Para evaluar el índice de infección de los tres aislados de *L. mexicana* se adhirieron 1×10^6 macrófagos derivados de médula ósea en portaobjetos estériles y libres de grasa a 37°C y CO₂ al 5% durante 24 horas suspendidos en medio RPMI + 10% SFB. Después de un cambio del medio de cultivo se infectaron los macrófagos con cada uno de los tres aislados de *Leishmania* en una relación 1:10 (una célula por diez parásitos) a 26°C por 3 horas. Los parásitos no fagocitados fueron removidos con lavados de PBS a temperatura ambiente. Las células infectadas se suspendieron en 1 ml de medio RPMI +10% SFB y se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 24 horas. Las células infectadas se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente y fijadas con 200 µl de etanol absoluto durante 3 minutos. Para poder visualizar la fagocitosis, las células infectadas y fijadas a los cubreobjetos se tiñeron con 500 µl GIEMSA (SIGMA-Aldrich) (a una dilución 1:20 en agua destilada) durante 15 minutos. Para establecer el índice de infección se contaron 100 células, tomando en cuenta tanto las células no infectadas como las infectadas. Y para evaluar la carga parasitaria en macrófagos se contó el número de parásitos fagocitados por 100 células infectadas.

5.5 Análisis de sobrevivencia de parásitos intracelulares

Se infectaron 1×10^6 macrófagos derivados de médula ósea con cada uno de los aislados de *Leishmania* en una relación 1:10 a 26°C durante 3 horas. Para eliminar los parásitos no

fagocitados se realizaron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente y se agregó 1 ml de medio RPMI + 10% SFB. Se incubaron a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se lavaron los macrófagos con PBS a temperatura ambiente y se suspendieron en 1 ml de medio 199 con 10% de SFB. Las células infectadas se incubaron a 26°C sin CO₂, lo cual lleva a la muerte de los macrófagos y favorece la viabilidad de los parásitos. Se revisaron las placas cada 24 horas con un microscopio invertido hasta ver liberación de parásitos al medio, los parásitos extracelulares se recuperaron y se contaron con una cámara de Neubauer.

5.6 Ensayo de estallido oxidativo

El estallido oxidativo con la producción de intermediarios de oxígeno (ROI) fue analizado mediante quimioluminiscencia en presencia de 60 µl de Luminol (SIGMA) utilizando un luminómetro (Labsystem Finlandia) con temperatura controlada a 25°C. El estallido fue inducido con 50 µM de PMA y fue monitoreado cada 40 segundos durante 30 minutos. Los ensayos se realizaron con 1x10⁶ macrófagos infectados por 5 y 180 minutos con los tres aislados de *L. mexicana* (10x10⁶ promastigotes), utilizándose como control el macrófago sin infectar. Se analizó el valor más alto de luminiscencia registrado por el equipo durante el ensayo.

5.7 Infección de ratones BALB/c

Se infectaron seis ratones en el cojinete plantar con 1x10⁶ promastigotes de *L. mexicana* suspendidos en 10 µl de PBS y se realizaron mediciones semanales de las lesiones en el cojinete plantar con ayuda de un vernier. Este procedimiento se llevó a cabo para cada uno de los aislados de *L. mexicana*.

5.8 Análisis de la carga parasitaria por dilución limitante

La carga parasitaria de las lesiones de ratones infectados con los tres aislados de *Leishmania* se determinó utilizando la técnica de dilución limitante descrita previamente por Titus *et al*, 1985, con algunas modificaciones. En condiciones de esterilidad se cortaron los cojinetes plantares de los ratones infectados. Posteriormente los tejidos se pesaron usando una balanza analítica y se homogenizaron por maceración. Los sobrenadantes del macerado se suspendieron en 2 ml de medio 199 + 10% SFB. De esta suspensión se tomaron 20 μ l y se añadieron a 180 μ l de medio 199 + 10% SFB en la primera fila de una placa de 96 pozos de fondo plano, por duplicado. Se realizaron diluciones seriadas tomando 20 μ l de la suspensión previa más 180 μ l de medio 199 + 10% SFB. Se incubó la placa a 28°C durante 7 días. Se evaluaron las placas para determinar crecimiento de parásitos en las diferentes diluciones. Para determinar el número de parásitos por mg de muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de parásitos/mg tejido} = \frac{\text{Factor de dilución}^{\text{(última dilución en la que se encontraron parásitos-1)}} * \text{dilución inicial}}{\text{Peso (mg)}}$$

5.9 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 Kruskal-Wallis y Anova de dos vías. Los valores de $p < 0.0001$ fueron considerados estadísticamente significativos.

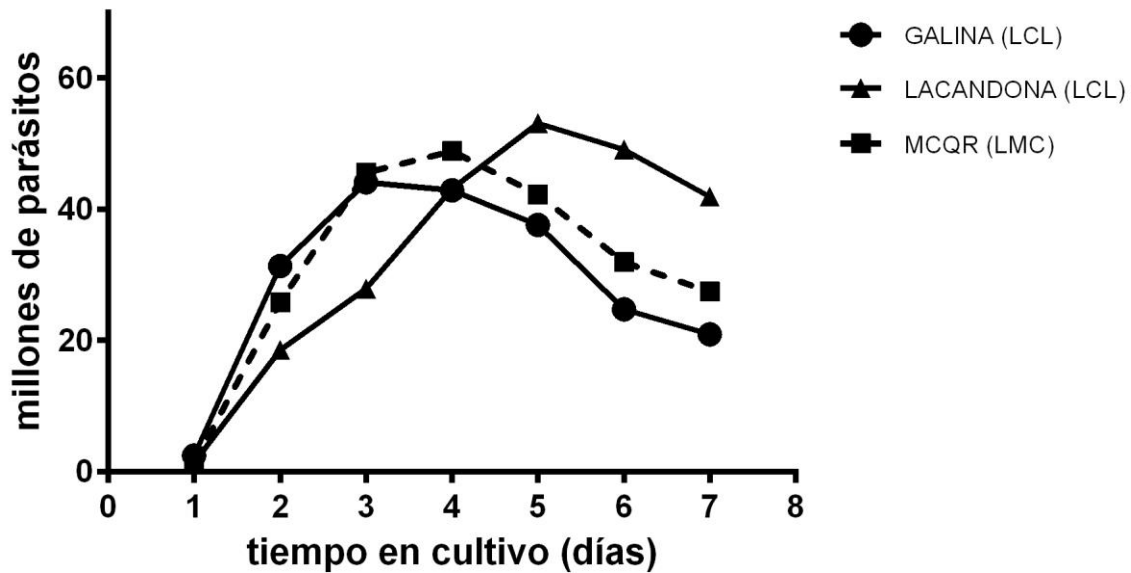
6. RESULTADOS

6.1 Análisis de las curvas de crecimiento de tres aislados de *L. mexicana*

Para evaluar el comportamiento *in vitro* de los tres aislados de *L. mexicana*, se realizaron curvas de crecimiento, lo cual permitió determinar los días de cultivo en los que los promastigotes se encontraban en metacicloogénesis para ser utilizados en los ensayos experimentales.

Se analizó el crecimiento de los tres aislados durante todos los días de crecimiento *in vitro*. En el aislado “Lacandona” (LCL) se observó que la fase logarítmica duró hasta el día 5 del cultivo, después de la cual se inició la fase estacionaria con una duración de 24 horas, obteniéndose 53 millones de parásitos por mililitro. El aislado “Galina” (LCL) mostró una fase logarítmica hasta el día 3 y continuó con la fase estacionaria durante 24 horas hasta el día 4, obteniéndose 44 millones de parásitos por mililitro. El aislado “MCQR” (LMC) mostró un crecimiento logarítmico hasta el día 4 de cultivo, en el cual alcanzó el mayor crecimiento con 48 millones de parásitos por mililitro, también con una fase estacionaria de 24 horas. Pasada la fase estacionaria todos los cultivos tuvieron una disminución considerable en el número de parásitos en cultivo (Gráfica 1).

Curvas de crecimiento



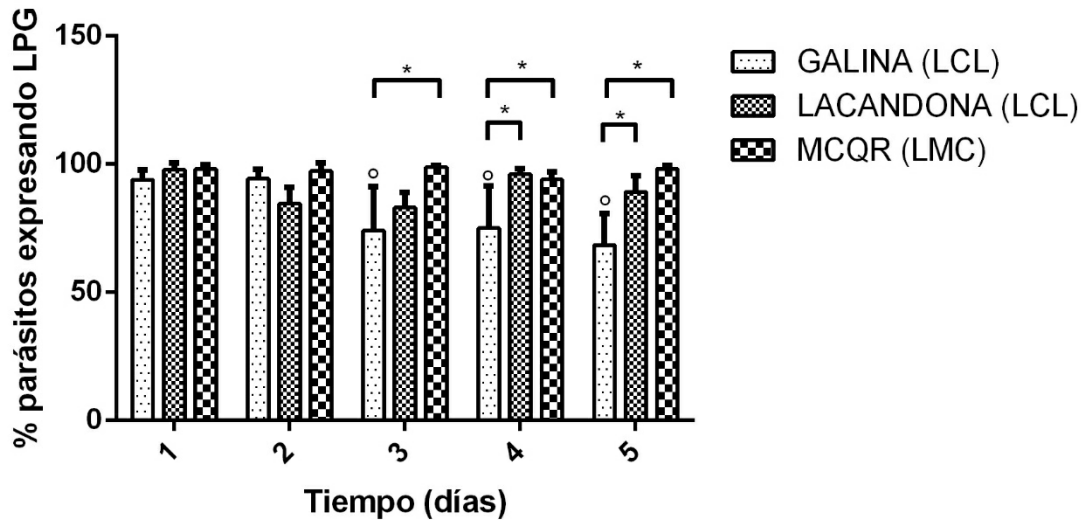
Gráfica 1. Curvas de crecimiento de tres aislados de *L. mexicana* (Lacandona, Galina y MCQR). Se establecieron los días con mayor número de parásitos para cada aislado. El aislado “Lacandona” alcanzó el punto máximo de crecimiento en el día 5, el aislado “Galina” alcanzó el punto máximo de crecimiento en el día 3 y el aislado “MCQR” alcanzó el punto máximo de crecimiento en el día 4. Todos los aislados presentaron una fase estacionaria de 24 horas de duración posterior a la fase logarítmica. No se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de los diferentes cultivos *in vitro*. La grafica muestra el promedio de 6 experimentos independientes.

6.2 Análisis de la expresión de LPG

Se analizó el porcentaje de parásitos expresando LPG en los tres aislados de *L. mexicana* durante 5 días de cultivo *in vitro*. El aislado “Galina” presentó un alto porcentaje de parásitos expresando LPG el día 1 y 2, con 94% de parásitos con marca positiva. Sin embargo, a partir del día 3 y hasta el día 5, el porcentaje de parásitos expresando LPG disminuyó significativamente ($p < 0.0001$), con un promedio de 70% de parásitos positivos

(Gráfica 2). El aislado “Lacandona” presentó un alto porcentaje de parásitos expresando LPG desde el primer día de cultivo y se mantuvo sin diferencias significativas hasta el día 5. Se observó una ligera disminución en los parásitos que expresan LPG en los días 2 y 3, pero el porcentaje volvió a aumentar en los días 4 y 5 (Gráfica 2). En el caso del aislado “MCQR” el porcentaje de parásitos que expresan LPG se mantuvo alto y sin diferencias significativas durante los 5 días del cultivo que se analizaron, con un promedio de 98% de parásitos positivos a la marca de LPG (Gráfica 2).

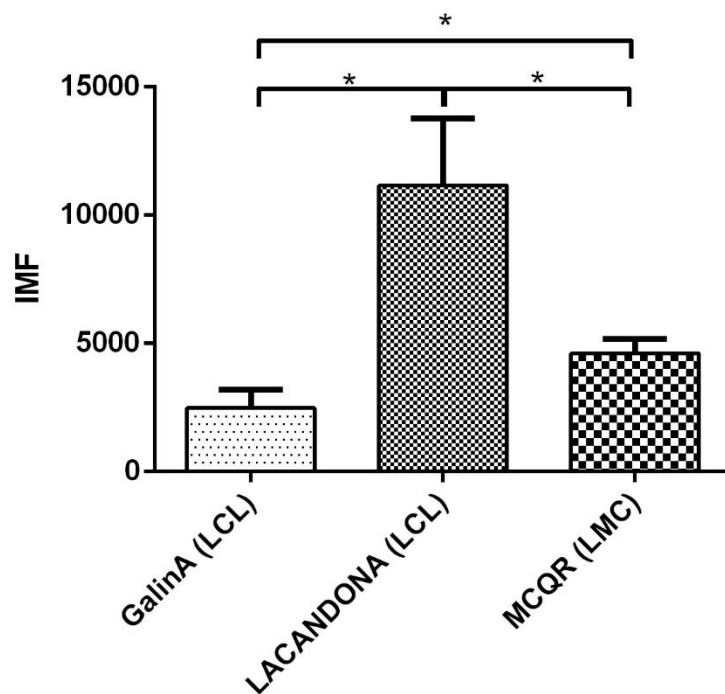
En el análisis comparativo del porcentaje de parásitos que expresan LPG entre los diferentes aislados no se mostraron diferencias significativas entre los aislados “Lacandona” y “MCQR”, sin embargo, al comparar estos dos aislados con el aislado “Galina” se encontraron diferencias significativas a partir del día 3 con el aislado “MCQR” y en los días 4 y 5 con el aislado “Lacandona” ($p < 0.0001$). (Gráfica 2).



Gráfica 2. Análisis del porcentaje de parásitos expresando LPG a lo largo de 5 días de cultivo *in vitro*. El aislado “Galina” (LCL) presentó un alto porcentaje de parásitos expresando LPG los primeros 2 días del cultivo, sin embargo, a partir del día 3 este porcentaje disminuyó significativamente ($p < 0.0001$). Los aislados “Lacandona” (LCL) y “MCQR” (LMC) presentaron un porcentaje de parásitos que expresan LPG arriba del 90% desde el primer día del cultivo y hasta el día 5, sin que se encontraran diferencias significativas entre los diferentes días. Al comparar los diferentes cultivos solo el aislado “Galina” fue significativamente diferente al encontrarse aproximadamente un 20% menos parásitos expresando LPG en su superficie a partir del día 3 con respecto al aislado “MCQR” y en los días 4 y 5 fue significativamente diferente con respecto al aislado “Lacandona” ($p < 0.0001$). Cada barra representa el promedio de cinco experimentos independientes \pm desviación estándar.

Una vez que se identificó el día en el cual se realizaría la infección correspondiente al día de máximo crecimiento de los diferentes cultivos, se analizó la expresión de LPG por IMF en los tres aislados de *L. mexicana*, en el día 3 para el aislado “Galina” (LCL), en el día 4 para el aislado “MCQR” (LMC) y en el día 5 para el aislado “Lacandona” (LCL).

Se encontró que el aislado “Lacandona” fue el que presentó una mayor expresión de LPG en su superficie, comparándolo con los aislados “Galina” y “MCQR”. El aislado “Galina” fue el que expresó menos LPG en su superficie comparándolo con los otros dos aislados de *L. mexicana* que se analizaron ($p < 0.0001$) (Gráfica 3).

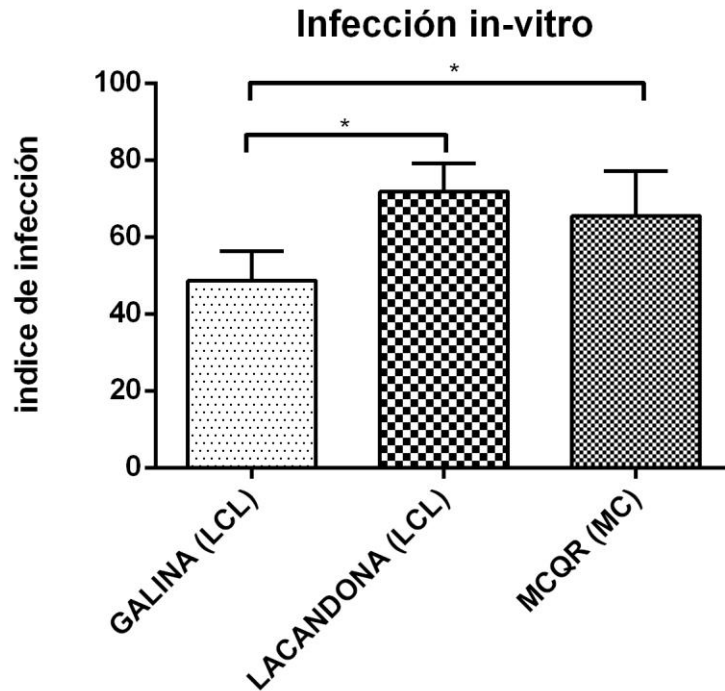


Gráfica 3. Análisis de la expresión de LPG en tres aislados de *L. mexicana* mediante intensidad media de fluorescencia en los días de mayor fase estacionaria del cultivo. El aislado “Lacandona” fue el que expresó una mayor cantidad de moléculas de LPG en su superficie, mientras que el aislado “Galina” fue el que menos LPG expresó. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.3 Análisis de la infección *in vitro* de macrófagos murinos obtenidos de médula ósea con los tres aislados de *L. mexicana*.

Para determinar el índice de infección de cada uno de los aislados de *L. mexicana* utilizados para este estudio, se infectaron macrófagos murinos derivados de médula ósea obtenidos de ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad. El índice de infección se obtuvo contando 100 células tanto infectadas como no infectadas.

Se observó, en el aislado “Lacandona”, un índice de infección del 70%, siendo este, el aislado que presentó la tendencia a tener el mayor índice de infección, aunque no fue significativamente diferente al del aislado “MCQR”, que presentó un índice de infección del 65%. En el aislado “Galina” de cuadro clínico localizado se observó un índice de infección del 48%, que fue diferente significativamente con respecto a los otros dos aislados ($p < 0.0001$) (Gráfica 4).

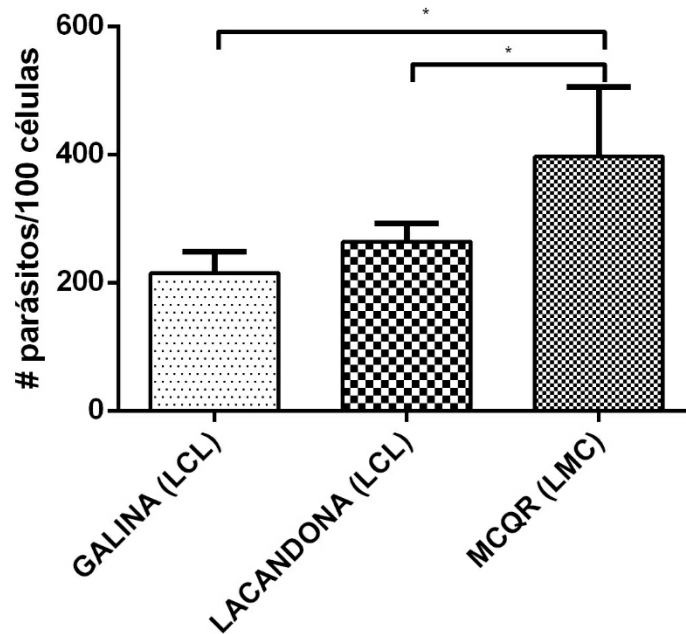


Gráfica 4. Análisis de infección *in vitro* de macrófagos derivados de medula ósea con tres aislados de *L. mexicana*. El aislado “Galina” presentó un índice de infección significativamente menor ($p < 0.0001$) que el de los otros dos aislados con un 48% de macrófagos infectados. Las barras representan el promedio de 6 experimentos independientes \pm desviación estándar.

Después de determinar el aislado que presentó un mayor porcentaje de macrófagos infectados, se analizó la carga parasitaria dentro de los macrófagos infectados con los diferentes aislados de *L. mexicana*. Para esto se contaron los parásitos que se encontraban dentro de 100 macrófagos infectados.

Contrario a lo observado en el índice de infección, ambos aislados de cuadro clínico localizado “Galina” y “Lacandona” presentaron un número similar de parásitos fagocitados, aproximadamente 200 parásitos por cada 100 células, sin diferencias significativas entre ellos. El cuadro clínico mucocutáneo fue el que presentó una mayor carga parasitaria en

macrófagos con 400 parásitos/100 células, siendo esta cantidad significativamente más alta que la observada en los aislados de cuadro clínico localizado ($p < 0.0001$) (Gráfica 5).

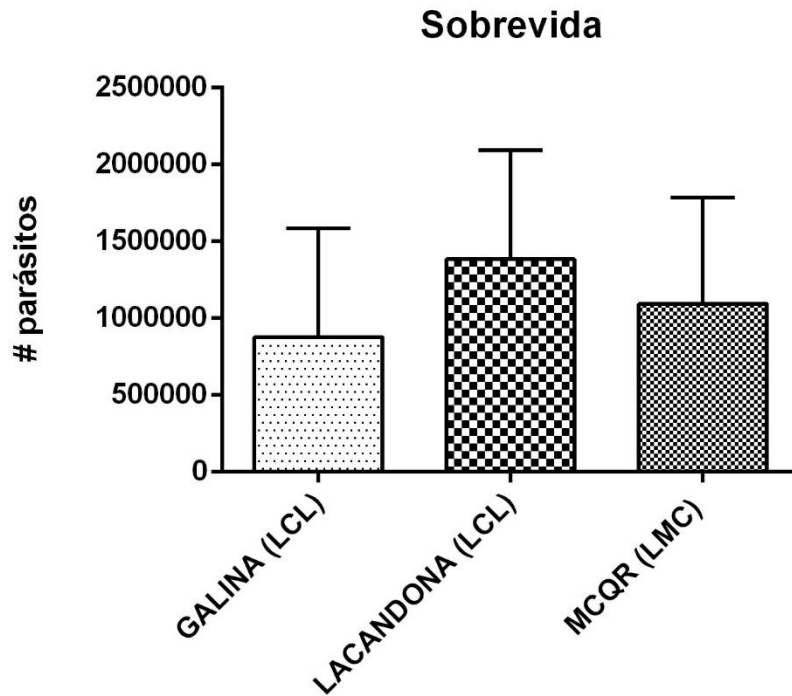


Gráfica 5. Análisis de la carga parasitaria en macrófagos con los tres aislados de *L. mexicana*. El aislado de cuadro clínico mucocutáneo fue el que presentó una mayor carga parasitaria dentro del macrófago infectado. Este resultado fue significativamente diferente con respecto a los dos aislados de cuadro clínico localizado “Galina” y “Lacandona” ($P < 0.0001$). Las barras representan el promedio de 6 experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.4 Análisis de la sobrevivencia de tres aislados de *L. mexicana* en macrófagos murinos de médula ósea.

Para poder determinar la capacidad de sobrevivencia de los parásitos de los distintos aislados se evaluó la liberación de parásitos posterior a la infección de macrófagos murinos de médula ósea. En el caso de los aislados de pacientes con LCL, “Lacandona” presentó una liberación de 1.3×10^6 parásitos/ml, mientras que del aislado “Galina” se liberaron 8.8×10^5 parásitos y el aislado del paciente con LMC, “MCQR”, presentó una liberación de 1.1×10^6

parásitos/mililitro. No se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia de estos tres aislados (Gráfica 6).

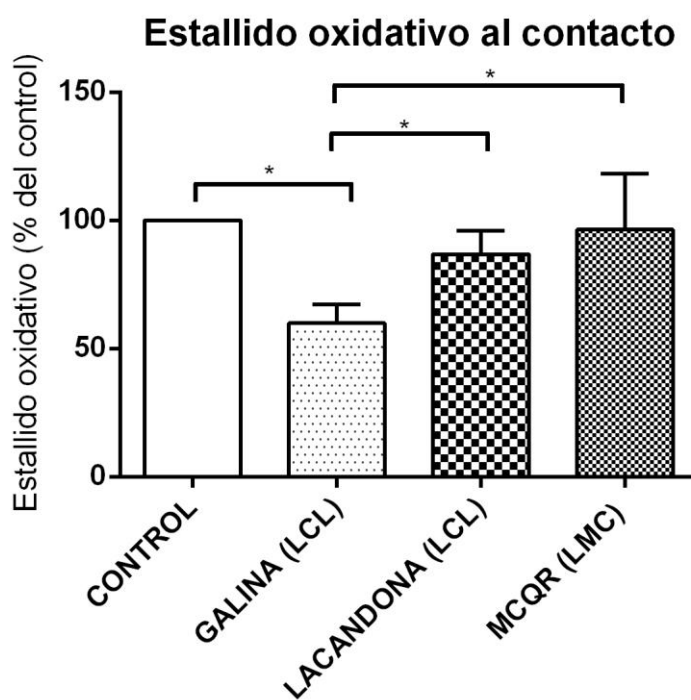


Gráfica 6. Ensayo de sobrevivencia de tres aislados de *Leishmania* en macrófagos murinos de médula ósea. “Lacandona” fue el aislado con la liberación más alta, con 1.3×10^6 parásitos liberados, el aislado “MCQR” tuvo una liberación de 1.1×10^6 parásitos por mililitro, mientras que el aislado “Galina” tuvo la menor cantidad de parásitos liberados por mililitro (8.8×10^5 parásitos). No se encontraron diferencias significativas entre estos tres aislados. Cada barra representa el promedio de 6 mediciones independientes \pm su desviación estándar.

6.5. Análisis del efecto que ejercen los tres aislados de *L. mexicana* sobre el estallido oxidativo de macrófagos de ratones BALB/c.

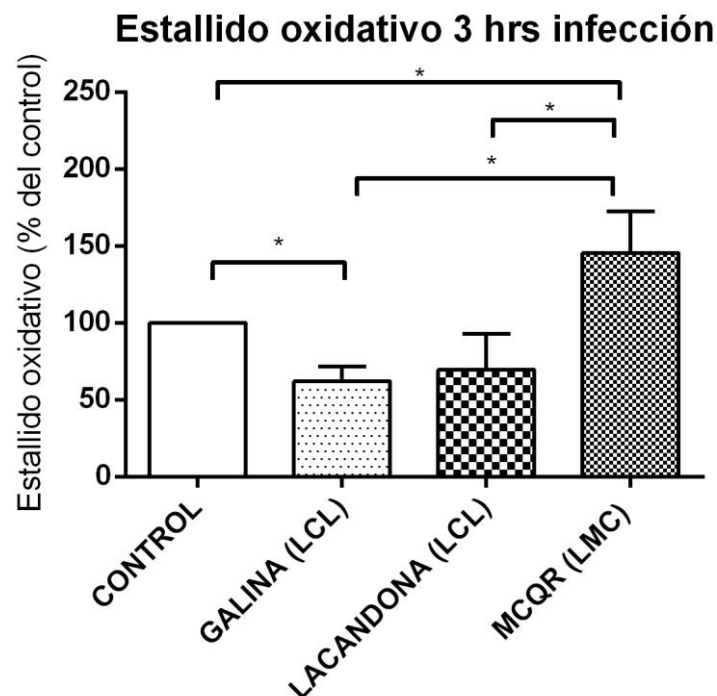
Se analizó si los diferentes aislados de *L. mexicana* tienen distinta capacidad de modular el estallido oxidativo en macrófagos murinos de médula ósea al momento de entrar en

contacto con el parásito y después de 3 horas de infección. Al momento del contacto entre macrófagos y parásitos el aislado “Galina” inhibió el estallido oxidativo del macrófago en un 50% con respecto al control ($p < 0.0001$). Así mismo, el otro aislado de LCL “Lacandona” presentó una tendencia a inhibir levemente el estallido oxidativo en macrófagos murinos. En contraste, el aislado “MCQR” no inhibió el estallido oxidativo. No se encontraron diferencias significativas entre los aislados “Lacandona” y “MCQR”, adicionalmente ninguno de estos fue significativamente distinto al control (Gráfica 7).



Gráfica 7. Análisis del efecto de los diferentes aislados de *Leishmania* sobre el estallido oxidativo en macrófagos murinos de médula ósea al momento del contacto. Los resultados se normalizaron para una mejor evaluación del porcentaje de variación entre las condiciones. No se encontraron diferencias significativas en la modulación del estallido oxidativo con respecto al control en los aislados “Lacandona” y “MCQR”. El aislado “Galina” inhibió en un 50% el estallido oxidativo con respecto al control ($p < 0.0001$). En este último aislado se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los otros aislados analizados ($p < 0.0001$). Cada barra representa el promedio de 5 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

A las 3 horas de infección se encontró que el aislado “Lacandona” inhibió el estallido oxidativo en macrófagos murinos en un 30% ($p < 0.0001$), en el caso del aislado “Galina” también de cuadro clínico localizado se inhibió el estallido oxidativo en un 40% ($p < 0.0001$), mientras que el aislado “MCQR” de cuadro clínico mucocutáneo incrementó el estallido oxidativo casi en un 40% ($p < 0.0001$), con respecto al control de macrófagos no infectados (Gráfica 8).

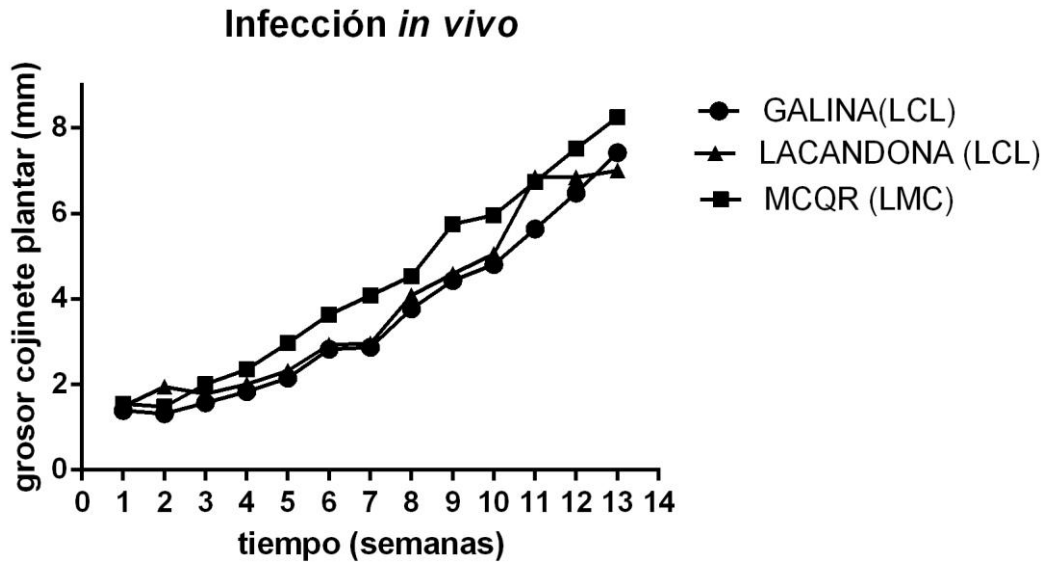


Gráfica 8. Análisis del efecto de los diferentes aislados de *Leishmania* sobre el estallido oxidativo en macrófagos murinos de médula ósea a las 3 horas de infección. Los resultados se normalizaron para una mejor evaluación del porcentaje de variación entre las diferentes condiciones. Se observó que los dos aislados de cuadro clínico localizado inhibieron el estallido oxidativo en un 35% aproximadamente ($p < 0.0001$), mientras que el aislado de cuadro clínico mucocutáneo “MCQR” incrementó en la misma proporción el estallido oxidativo del macrófago infectado ($p < 0.0001$). Al comparar los diferentes aislados entre si se observaron diferencias significativas entre los aislados con diferente cuadro clínico ($p < 0.0001$). Cada barra representa el promedio de 5 experimentos independientes \pm la desviación estándar.

Al comparar los aislados entre si no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos aislados de cuadro clínico localizado “Lacandona” y “Galina”, sin embargo, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) al compararlos con el aislado “MCQR” de cuadro clínico mucocutáneo que activó el estallido oxidativo del macrófago infectado en lugar de inhibirlo (Gráfica 8).

6.6 Análisis de la progresión de la infección en cojinete plantar en ratones BALB/c con tres aislados de *L. mexicana*.

Para poder evaluar la progresión de la enfermedad de los tres aislados de *L. mexicana in vivo* se infectaron ratones BALB/c hembras de 6 semanas en el cojinete plantar y se evaluó la evolución de la infección durante 13 semanas. Se observaron ligeras diferencias en el transcurso de la lesión. Los aislados con cuadro clínico localizado “Lacandona” y “Galina” fueron los que presentaron una tendencia de causar un menor tamaño de lesión, mientras que el aislado con cuadro clínico mucocutáneo “MCQR” causó un mayor tamaño de lesión, aunque las diferencias entre ellos no fueron significativas (Gráfica 9).



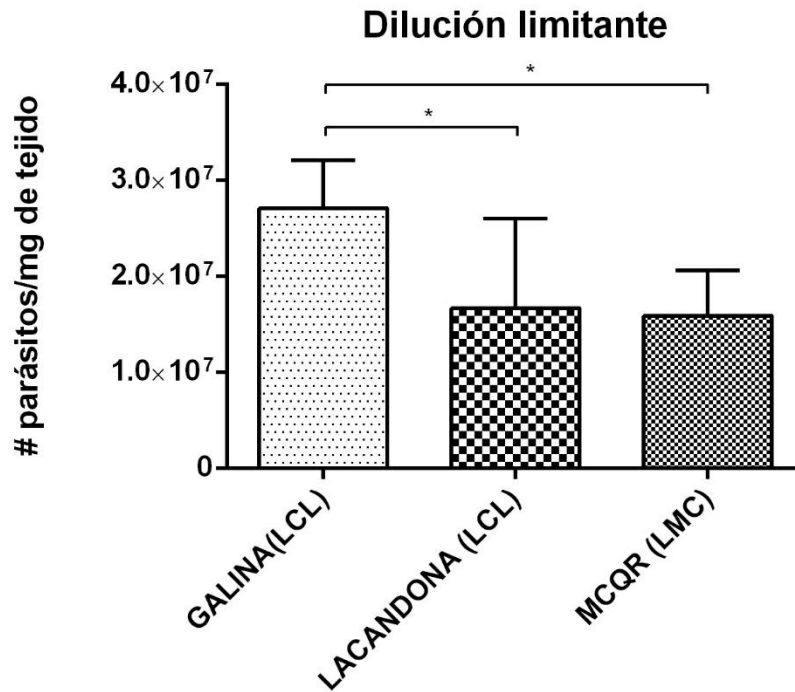
Gráfica 9. Análisis de la progresión de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con tres aislados de *L. mexicana*. Los aislados que presentaron el menor tamaño del cojinete plantar fueron los de cuadro clínico localizado “Lacandona” y “Galina”, el aislado con cuadro clínico mucocutáneo “MCQR” presentó un mayor tamaño, con una tendencia a ser mayor que los aislados localizados. Cada punto representa el promedio de 6 mediciones independientes \pm su desviación estándar.

6.7 Análisis de la carga parasitaria en lesiones de cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con tres aislados de *L. mexicana*.

Para determinar el número de parásitos por mg de tejido en las lesiones del cojinete plantar de los ratones infectados, se realizó la técnica de dilución limitante y se observó que el aislado “Galina” presentó más parásitos en las lesiones, con 2.7×10^7 parásitos/mg de tejido. En el caso de los aislados “Lacandona” y “MCQR”, se contaron 1.6×10^7 y 1.5×10^7 parásitos, respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre los aislados

“Lacandona” y “MCQR” pero si entre estos dos aislados y el aislado “Galina” ($p < 0.0001$)

(Gráfica 10).



Gráfica 10. Carga parasitaria de las lesiones de cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con tres aislados de *L. mexicana*. Se encontró que el aislado “Galina” fue del que se obtuvo el mayor número de parásitos/mg de tejido. La diferencia en el número de parásitos, comparando el aislado “Lacandona” y “MCQR” con el aislado “Galina”, fue significativa ($p < 0.0001$). Cada barra representa el promedio de 6 experimentos independientes \pm su desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

En México, el protozoario intracelular *L. mexicana* es el principal agente causal de la leishmaniasis cutánea, donde las variaciones en la severidad del cuadro clínico se han relacionado tanto con el estado inmune de los pacientes infectados, como con la virulencia de los parásitos [41]. En el presente trabajo se analizaron 3 aislados de *L. mexicana*, dos de ellos aislados de pacientes con LCL, y un aislado de un paciente que presentaba lesiones en mucosa faríngea, características del cuadro clínico mucocutáneo.

La molécula de LPG presente en la superficie de *Leishmania* se ha descrito en la literatura como un importante factor de virulencia que le confiere al parásito la capacidad de infectar y sobrevivir dentro de las células del sistema inmune del hospedero mamífero, particularmente en macrófagos [33]. Esta molécula presenta variaciones en su expresión y estructura entre las diferentes especies de *Leishmania* [34, 35, 42, 43]. Sin embargo, se sabe poco sobre posibles variaciones en la molécula de LPG entre parásitos de la misma especie y si estas diferencias se pueden asociar con la severidad de la infección en el hospedero mamífero.

En este trabajo se analizó si existen diferencias en la expresión de la molécula de LPG entre tres aislados de *L. mexicana* obtenidos de pacientes con cuadros clínicos de distinta severidad. Se evaluó la respuesta de macrófagos diferenciados de precursores de médula ósea de ratones a la infección, por los tres aislados para buscar si la expresión diferencial de LPG se podía asociar a una respuesta diferencial del macrófago y a una mayor severidad en el cuadro clínico.

El cultivo *in vitro* de *Leishmania* presenta dos fases de crecimiento: la fase logarítmica, que se caracteriza por el rápido crecimiento de parásitos en el cultivo axénico, y la fase estacionaria, en la que la tasa de replicación de los parásitos se reduce pero se alcanza la metaciclogénesis, donde los parásitos se transforman a promastigotes metacíclicos altamente infectivos [44]. El presente estudio reveló diferencias en las fases de crecimiento entre los tres aislados, ya que el aislado “Galina” alcanzó su fase estacionaria en el día 3 del cultivo, mientras que para los aislados “MCQR” y “Lacandona” la fase estacionaria se observó en los días 4 y 5, respectivamente. Este resultado concuerda con observaciones reportadas en la literatura sobre variaciones en las fases de crecimiento entre tres diferentes aislados de *L. mexicana* donde fueron atribuidas a cambios de pH en el medio y a metabolitos de desecho producidas por los diferentes aislados [45].

Durante la metaciclogénesis del parásito la expresión de moléculas de virulencia cambia, moléculas como LPG que incrementa su expresión, tamaño y varía su composición química, haciendo al parásito más virulento [44, 46]. En los tres aislados de *L. mexicana* que se analizaron, no se encontró correlación entre el porcentaje de parásitos que expresan LPG y los días de fase estacionaria del cultivo. En el caso del aislado “Galina” el porcentaje de parásitos expresando LPG disminuyó significativamente en el día 3 y en los aislados “Lacandona” y “MCQR” el porcentaje de parásitos que expresaron LPG rebasó el 90% de la población y no sufrió cambios significativos a lo largo de toda la curva de crecimiento. Sin embargo, cabe considerar que el anticuerpo monoclonal utilizado para medir la expresión de LPG mediante citometría de flujo solo detecta el lípido de anclaje de la molécula y no

permite detectar cambios en su tamaño o alguna modificación en los carbohidratos de la cadena de fosfolípidos [46].

La molécula de LPG en la superficie del parásito se ha asociado con distintas estrategias de evasión que afectan a diversos mecanismos efectores del macrófago. LPG promueve la opsonización del parásito por componentes del complemento que permiten su fagocitosis vía receptores del macrófago que no activan una respuesta inflamatoria como son CR1 y CR3, lo que genera un medio más permisivo para la sobrevivencia de *Leishmania* dentro del macrófago [17, 33]. Parásitos con una elevada expresión de LPG presentan un alto índice de infección [33, 39]. Otro mecanismo del macrófago afectado por LPG es el estallido oxidativo, ya que azúcares de las cadenas laterales de LPG captan los radicales hidroxilo y aniones superóxido producidos por el macrófago en respuesta a la infección. Adicionalmente inhibe la actividad de la PKC al interactuar con su región reguladora [36, 47]. También se ha descrito que LPG de *Leishmania* retarda la fusión del fagosoma con el lisosoma para evitar su destrucción dentro de las vacuolas del macrófago [32, 37].

En el presente trabajo se analizó si la expresión de LPG de los aislados de *L. mexicana* se asociaba con la capacidad del parásito de modificar la respuesta del macrófago y/o con su infectividad *in vivo*.

El análisis del aislado "Galina" (LCL) mostró que durante los primeros 3 días del cultivo el 93% de los parásitos expresaron LPG en su superficie, lo cual disminuyó después del tercer día donde únicamente el 75% de los parásitos expresaron LPG hasta el día 5 del cultivo. La intensidad media de fluorescencia de la molécula de LPG durante la fase estacionaria (día

3) en este aislado fue casi cinco veces menor que la registrada para el aislado “Lacandona” (LCL) y dos veces menor que el aislado “MCQR” (MC).

Al evaluar la modificación ejercida sobre el macrófago por el aislado “Galina” se observó que el índice de infección fue del 48%, (el índice de infección más bajo entre los tres aislados) y se obtuvo una carga parasitaria de 200 parásitos/100 células infectadas. La sobrevivencia intracelular de este aislado fue comparativamente menor al de los otros dos aislados. Los resultados de los experimentos *in vitro* relacionados con el bajo índice de infección, baja carga parasitaria y poca sobrevivencia asociados con la baja expresión de LPG son similares a lo reportado en la literatura [33]. Llama la atención que, a pesar de tener la más baja expresión de LPG, este aislado logró inhibir el estallido oxidativo mejor que otros aislados. Esto podría deberse a diferencias en la estructura de LPG. Diferencias en las estructuras de LPG entre las diferentes especies de *Leishmania* y entre diferentes cepas de la misma especie han sido reportadas en la literatura. En 1995, McConville y cols. describieron estructuras diferentes en dos especies de *Leishmania*: *L. tropica* y *L. aethiopica* y entre dos cepas de *L. major*. Estas diferencias consistían básicamente en diferente composición de las cadenas laterales de carbohidratos en la molécula de LPG [48]. Otros estudios asocian las diferencias en la composición química del LPG con diferentes efectos moduladores sobre la respuesta inmune del hospedero [42]. Estos antecedentes sugieren que la capacidad de inmunomodular al macrófago del aislado “Galina” posiblemente difiera de los otros aislados por cambios en la estructura en la molécula de LPG, ya que, a pesar de una baja expresión de LPG, parece ser suficiente para inhibir el estallido oxidativo. Llama la atención que a pesar de esta inhibición no hubo una mayor sobrevivencia del parásito, lo cual

se puede deber a que inicialmente hubo baja infección del macrófago. Sin embargo, en infecciones *in vivo* se encontraron significativamente más parásitos/mg de tejido en las lesiones en comparación con los otros dos aislados. En infecciones *in vivo* hay que tomar en cuenta que los parásitos no solo interactúan con macrófagos, sino que también con otras células del sistema inmune, donde además de LPG, participan otras moléculas de virulencia, como la metaloproteasa GP63 [13, 39, 41].

En el aislado “Lacandona” (LCL), el 97% de parásitos expresaron LPG desde el primer día de cultivo en conjunto con una muy elevada intensidad media de fluorescencia para el día del cultivo en metaciclologénesis. El índice de infección fue elevado con el 72% asociada a una mayor sobrevivida en el macrófago, en comparación con los otros aislados. Esto se asocia con el 30% de inhibición del estallido oxidativo. La comparación de la expresión de LPG con los resultados de los experimentos *in vitro* están de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura [33, 36, 47], siendo que este aislado presentó una mayor expresión de LPG lo cual se asoció con un mayor índice de infección y una mayor tendencia a sobrevivir en el macrófago, lo cual posiblemente se asocia al retraso en la fusión del fagosoma con el lisosoma ejercido por LPG, permitiendo que *Leishmania* tenga una mayor oportunidad de sobrevivir [37]. En resumen, la alta expresión de LPG en el aislado “Lacandona” se puede relacionar con un mayor índice de fagocitosis, una tendencia a inhibir el estallido oxidativo del macrófago y una mayor sobrevivida *in vitro*. En los experimentos *in vivo*, la carga parasitaria del aislado “Lacandona” fue significativamente menor a la encontrada en el otro aislado de cuadro clínico localizado “Galina”. Llama la atención que a pesar de una elevada expresión de LPG, este aislado haya sobrevivido poco en las lesiones. Una posible

explicación de esto pudiera ser la participación de otras células del sistema inmune que participaron en controlar la infección en el modelo animal.

El aislado "MCQR" (MC) también presentó un alto porcentaje (98%) de parásitos expresando LPG durante los 5 días de cultivo y adicionalmente presentó una media de fluorescencia de LPG muy grande que se asocia con una gran carga parasitaria en macrófagos infectados, aunque su sobrevivencia intracelular fue parecida a los otros aislados. La gran expresión de LPG se puede asociar a un gran índice de infección y una gran carga parasitaria en macrófagos, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura [33]. Interesantemente, este fue el único aislado que activó el estallido oxidativo en macrófagos infectados durante 3 horas tres horas de infección. Llama la atención que, a pesar de este incremento, no se haya reducido importantemente el número de parásitos que sobreviven dentro de los macrófagos. Este resultado podría reflejar algún cambio en la estructura de la molécula de LPG de este aislado posiblemente como consecuencia del tiempo y los pases en cultivo que se le han hecho en el laboratorio, ya que es el parásito de mayor tiempo en el laboratorio (2000), mientras que "Galina" y "Lacandona" fueron aisladas en 2011 y 2014, respectivamente [43]. Aunque los experimentos *in vitro* no mostraron una reducción en el número de parásitos, los datos *in vivo* mostraron que este aislado presentó una tendencia a generar lesiones más grandes y con mayor daño al tejido.

En resumen, en los casos de los aislados "Galina" y "Lacandona" de *L. mexicana* que generan cuadros de LCL, la expresión de LPG se puede asociar al grado de infección en macrófagos murinos de medula ósea y a una inhibición del estallido oxidativo. Sin embargo, los

experimentos *in vivo* mostraron resultados opuestos, ya que las cargas parasitarias de las lesiones no correlacionan con la expresión de LPG. En infecciones *in vivo* es difícil identificar el papel de LPG en la fisiopatogenia de la enfermedad, ya que hay que tomar en cuenta la participación de diversos mecanismos inmunes contra *Leishmania* entre los cuales los linfocitos T y su producción de citocinas juegan un papel crucial en definir el curso de la infección [49].

En este trabajo únicamente se analizó el nivel de expresión de la molécula de LPG sin tomar en cuenta su estructura y composición química, que son cruciales para poder esclarecer su papel en la infección por *Leishmania*.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados, los resultados de este trabajo llevan a las siguientes conclusiones:

- 1) Se encontraron diferencias significativas en la expresión de LPG en los tres aislados de *L. mexicana* que se analizaron.
- 2) La expresión de LPG se puede relacionar con el índice de infección de macrófagos derivados de medula ósea para los tres aislados de *L. mexicana* que se analizaron.
- 3) La expresión de LPG se puede relacionar con la inhibición del estallido oxidativo en los dos aislados de Leishmaniasis cutánea localizada.
- 4) La expresión de LPG no se correlaciona con la sobrevivencia intracelular de los tres diferentes aislados de *L. mexicana*.
- 5) No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de la lesión de ratones BALB/c infectados con los tres aislados de *L. mexicana*, por lo que no se puede asociar este fenómeno a las diferencias observadas en la expresión de LPG.
- 6) No se puede correlacionar la expresión de LPG en la superficie de los tres aislados de *L. mexicana* con la carga parasitaria de las lesiones de ratones BALB/c infectados.
- 7) El aislado "MCQR" se caracteriza por su alta carga parasitaria en macrófagos a pesar de un aumento en el estallido oxidativo, que sugiere algún posible cambio en su molécula de LPG.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo se describió que existen diferencias en la expresión de LPG entre diferentes aislados de *L. mexicana* y que estas diferencias se traducen en capacidades biológicas que le permiten al parásito sobrevivir en macrófagos. Falta por analizar posibles diferencias estructurales o bioquímicas del LPG de los diferentes aislados que son responsables de las diferentes capacidades moduladoras de los mecanismos inmunes que definen la progresión de la enfermedad.

10. LITERATURA CITADA

1. Banuls, A.L., M. Hide, and F. Prugnolle, *Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans*. Adv Parasitol, 2007. **64**: p. 1-109.
2. Leishmaniasis; Epidemiological situation, (s.f.), available on: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
3. Fraga, J., et al., *Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene*. Infect Genet Evol, 2010. **10**(2): p. 238-45.
4. G., L., *Diagnostic Medical Parasitology*. 2006, Washington DC.
5. Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach, *Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?* Trends Microbiol, 2003. **11**(5): p. 210-4.
6. Sunter, J., & Gull, K.. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, (2017), **7**(9), 170165.
7. Dedet, J.P., et al., *Cutaneous leishmaniasis. The parasite*. Clin Dermatol, 1999. **17**(3): p. 261-8.
8. S.M. Gossage, M.E. Rogers, P.A. BatesTwo separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle Int. J. Parasitol., **33** (2003), pp. 1027-1034

9. Kamhawi, S., et al., *The vectorial competence of Phlebotomus sergenti is specific for Leishmania tropica and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment*. Parasitology, 2000. **121 (Pt 1)**: p. 25-33.
10. Killick-Kendrick, R., et al., *Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1986. **80(1)**: p. 138-42.
11. Claborn, D.M., *The biology and control of leishmaniasis vectors*. J Glob Infect Dis, 2010. **2(2)**: p. 127-34.
12. SO, R.J., *Inmunología en la infección por Leishmania: Conceptos actuales. Immunology in Leishmania infection: Current concepts*. Revista médico científica, 2010: p. 19-31.
13. Awasthi, A., R.K. Mathur, and B. Saha, *Immune response to Leishmania infection*. Indian J Med Res, 2004. **119(6)**: p. 238-58.
14. Velasco-Castrejón O, Savarino S, WaltonB, Gama-Neva F. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. Am J Trop Med Hrg 1989;41(3):280-288.
15. Convit, J., *Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela*. Clin Dermatol, 1996. **14(5)**: p. 479-87.
16. Kamhawi, S., *The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections*. Microbes Infect, 2000. **2(14)**: p. 1765-73.
17. Da Silva, R.P., et al., *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*. J Immunol, 1989. **143(2)**: p. 617-22.

18. Ueno, N. and M.E. Wilson, *Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival*. Trends Parasitol, 2012. **28**(8): p. 335-44.
19. Carneiro P.P. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148084. Published 2016 Feb 3. doi:10.1371/journal.pone.0148084
20. Kane, M.M. and D.M. Mosser, *The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1141-7.
21. Martinez-Salazar, B., M. Berzunza-Cruz, and I. Becker, [*Leishmania mexicana* DNA activates murine macrophages and increases their TLR9 expression]. Gac Med Mex, 2008. **144**(2): p. 99-104.
22. Vargas-Inchaustegui, D.A., et al., *Distinct roles for MyD88 and Toll-like receptor 2 during Leishmania braziliensis infection in mice*. Infect Immun, 2009. **77**(7): p. 2948-56.
23. von Stebut, E. and S. Tenzer, *Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with Leishmania major*. Int J Med Microbiol, 2017.
24. Ruiz, J.H. and I. Becker, *CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis*. Parasite Immunol, 2007. **29**(12): p. 671-8.
25. Podinovskaia, M. and A. Descoteaux, *Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction*. Future Microbiol, 2015. **10**(1): p. 111-29.

26. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014;66(2):127-32..
27. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993;91(4):1390-5..
28. Stefani, M.M., I. Muller, and J.A. Louis, *Leishmania major*-specific CD8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(3): p. 746-52.
29. Schonlau, F., et al., *In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response*. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(9): p. 2729-40.
30. Pirofski LA, C.A., *Immunomodulators as an antimicrobial tool*. *Current opinion in microbiology* 2006: p. 489-95.
31. N., R., *Factores de virulencia en Leishmania y su relacion con el desarrollo de la leishmaniasis*. *Dermatologia Venezolana*, 2003. **41**.
32. Franca-Costa, J., et al., *Exposure of phosphatidylserine on Leishmania amazonensis isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e36595.
33. Franco, L.H., S.M. Beverley, and D.S. Zamboni, *Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan*. *J Parasitol Res*, 2012. **2012**: p. 165126.

34. McConville, M.J. and J.E. Ralton, *Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of Leishmania parasites*. Behring Inst Mitt, 1997(99): p. 34-43.
35. Turco, S.J. and A. Descoteaux, *The lipophosphoglycan of Leishmania parasites*. Annu Rev Microbiol, 1992. **46**: p. 65-94.
36. J. F. Dermine, *Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis*; Cell Microbiol. 2000 Apr; 2(2): 115–126. 3.
37. Rossi, M., and Fasel, N. (2018). How to master the host immune system? *Leishmania parasites have the solutions!* *Int. Immunol.* 30, 103–111. doi: 10.1093/intimm/dxx075
38. Suvercha Bhardwaj, Neetu Srivastava, Raki Sudan, and Bhaskar Saha, “*Leishmania Interferes with Host Cell Signaling to Devise a Survival Strategy,*” *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 109189, 13 pages, 2010..
39. Descoteaux, A. and S.J. Turco, *Glycoconjugates in Leishmania infectivity*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1455**(2-3): p. 341-52.
40. Berzunza-Cruz, M., et al., *PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis*. Parasitol Res, 2009. **104**(3): p. 691-9.
41. Cunningham, A.C., *Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania*. Exp Mol Pathol, 2002. **72**(2): p. 132-41.
42. Ibraim, I.C., et al., *Two biochemically distinct lipophosphoglycans from Leishmania braziliensis and Leishmania infantum trigger different innate immune responses in murine macrophages*. Parasit Vectors, 2013. **6**: p. 54.

43. Forestier, C.L., Q. Gao, and G.J. Boons, *Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?* Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 193.
44. Muskus, C.E. and M. Marin Villa, *[Metacyclogenesis: a basic process in the biology of Leishmania]*. Biomedica, 2002. **22**(2): p. 167-77.
45. Guillermo Valencia-Pacheco BMV-K, A.G.F.-S., Fernando J. Andrade-Narvaez. , *Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de Leishmania (Leishmania) mexicana a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México.* Rev Biomed, 1998. **9**: p. 206-2013.
46. Moody, S.F., *Molecular variation in Leishmania.* Acta Trop, 1993. **53**(3-4): p. 185-204.
47. Delgado-Dominguez, J., et al., *Leishmania mexicana lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice.* Parasite Immunol, 2010. **32**(6): p. 440-9.
48. McConville, M.J., et al., *Structure of Leishmania lipophosphoglycan: inter- and intra-specific polymorphism in Old World species.* Biochem J, 1995. **310 (Pt 3)**: p. 807-18.
49. Gupta, G., S. Oghumu, and A.R. Satoskar, *Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis.* Adv Appl Microbiol, 2013. **82**: p. 155-84.