



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis del efecto de la monodieta de garbanzo en  
la infección por *Leishmania mexicana* de ratones  
BALB/c**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A :**

**ADRIANA OSORIO HERNÁNDEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno

Osorio  
Hernández  
Adriana  
55 74 06 80 81  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
311292468

### 2. Datos del tutor

Dra.  
Ingeborg Dorothea  
Becker  
Fauser

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Jaime  
Zamora  
Chimal

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.  
José Sotero  
Delgado  
Domínguez

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.  
Armando  
Pérez  
Torres

### 6. Datos del sinodal 4

M. en C.  
Isabel Cristina  
Cañeda  
Guzmán

### 7. Datos del trabajo escrito

Análisis del efecto de la monodieta de garbanzo en la infección por *Leishmania mexicana* de ratones BALB/c  
51 p.  
2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de desarrollarme tanto académicamente como profesionalmente.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por permitirme desarrollar este trabajo en el laboratorio así como por sus asesorías y portación en este trabajo, así como a mi desarrollo académico.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal por su aporte y apoyo en esta investigación y sus consejos.

A la Dra. Norma Salaiza Sauzo por su ayuda en esta investigación y en la realización de las técnicas de histología y tinción de hematoxilín-eosina.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia por su ayuda en mi formación académica y apoyo en la técnicas de cultivo de parásitos, infección y manejo de animales.

A la M. en C. Adrian Ruiz Remigio, por su apoyo en la realización de las diferentes técnicas de ELISA.

A mis sinodales la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, al Dr. Jaime Zamora Chimal, al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, al Dr. Armando Pérez Torres y a la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán, por sus comentarios y aportaciones a mi trabajo.

Al Dr. Filiberto Malagón Gutiérrez por su valioso apoyo en el diseño experimental.

El proyecto fue apoyado por los donativos: PAPIIT IN211418 y CONACyT 221405.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis madres Norma por ser mi inspiración día con día, la fuerza para levantarme y continuar con este sueño, y Natividad a la cual le debo todo lo que soy, por estar para mí a cada momento de mi vida y enseñarme infinitas cosas y por ser la persona que es.

A mi padre Juan por su apoyo, su presencia en los momentos más importantes de mi vida y por las lecciones que me enseña.

A mis tíos Leticia, Agustín, Luis, César y a mi abuelo Agustín por apoyarme, enseñarme, cuidarme y estar para mí a lo largo de mi vida.

A mi novio Ulises por impulsarme e inspirarme a ser mejor cada día, a no rendirme, por estar para mí siempre, escucharme y por apoyarme en mis proyectos.

A mi hermano Juan el cual quiero demasiado y por su franqueza.

A Jaime Zamora por su motivación, consejos, apoyo a lo largo de este proyecto, eres una inspiración para mí, y por esas pláticas tan interesantes en el laboratorio.

A mis amigas Fernanda y Liliana por apoyarme, por los consejos, por estar para mí siempre que las necesité y por su amistad.

A mis amigos Astrid que me escucha, me aconseja, a Yaylyn por tantas risas, a Lucero por ser como una hermana para mí, a Jonathan, Bryan, Tania, Andrés, Erika por todos los momentos que estuvieron para mí, y por ser parte importante de mi vida.

A mis profesores que estuvieron a lo largo de mi vida académica y a sus enseñanzas.

Y a todos los amigos que han dejado una enseñanza a lo largo de mi vida.

# ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Leishmaniasis.....	2
1.2 Cuadros clínicos.....	3
1.2.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL).....	3
1.2.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).....	4
1.2.3 Leishmaniasis visceral (LCV).....	5
1.3 Medicamentos usados en leishmaniasis.....	6
1.4 Ciclo de vida.....	6
1.5.1 Respuesta inmune innata.....	9
1.5.1.1 Complemento.....	9
1.5.1.2 Neutrófilos.....	10
1.5.1.3 Macrófagos.....	11
1.5.1.4 Células Natural Killer (NK).....	12
1.5.1.5 Células dendríticas.....	13
1.5.2 Respuesta inmune adaptativa.....	13
1.5.2.1 Linfocitos T.....	13
1.5.2.2 Linfocitos T CD8.....	14
1.5.2.3 Linfocitos T CD4.....	14
1.5.2.4 Linfocitos B.....	15
1.6 Modulación de la respuesta inmune por dietas en leishmaniasis.....	17
1.7 Garbanzo.....	18
1.8 Compuestos bioactivos.....	18
1.9 Modulación de la respuesta inmune por garbanzo.....	20
II. JUSTIFICACIÓN.....	20
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos.....	21
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Animales.....	21
5.2 Infección con <i>L. mexicana</i> en ratones BALB/c.....	22

5.3 Cuantificación de la carga parasitaria de las lesiones.....	22
5.4 Obtención de esplenocitos de bazo.....	23
5.5 Inducción de la producción de citocinas por esplenocitos de bazo.....	23
5.6 Cuantificación de citocinas.....	23
5.7 Cuantificación de los títulos de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> .....	24
5.8 Análisis estadístico.....	25
VI. RESULTADOS.....	25
6.1 Tamaño de lesiones y análisis de la carga parasitaria de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> tratados con monodieta de garbanzo.....	25
6.2 Producción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias por esplenocitos de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> tratados con monodieta de garbanzo.....	27
6.3 Cuantificar los títulos de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> en los sueros de los ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> tratados con monodieta de garbanzo.....	29
VII. DISCUSIÓN.....	30
VIII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	33
IX. REFERENCIAS.....	33

## ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Leishmaniasis cutánea localizada, con una única úlcera.....	3
Figura 2. Leishmaniasis cutánea difusa, con múltiples nódulos en brazos.....	4
Figura 3. Leishmaniasis visceral, niño con hepatoesplenomegalia y desnutrición.....	5
Cuadro1. Medicamento utilizados en leishmaniasis y sus efectos secundarios.....	6
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	8
Figura 5. Respuesta inmune en la infección por <i>Leishmania</i> .....	16
Cuadro 2. Compuestos bioactivos del garbanzo con efecto leishmanicida.....	19
Figura 6. Evolución de la lesión de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> alimentados con la monodieta de garbanzo.....	26
Figura 7. Foto comparativa de una lesión en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> alimentados con las diferentes dieta.....	26
Figura 8. Producción de citocinas proinflamatorias producidas por esplenocitos estimulados con Ag. de <i>L. mexicana</i> de los diferentes grupos de ratones.....	27
Figura 9. Producción de citocinas antiinflamatorias producidas por esplenocitos estimulados con Ag. completo de <i>L. mexicana</i> de los diferentes grupos de ratones.....	28
Figura 10. Cuantificación de los títulos de anticuerpos <i>anti-Leishmania</i> .....	29

## I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es clasificada como una de las enfermedades tropicales desatendidas según la OMS. Presenta tres cuadros clínicos que son leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y leishmaniasis visceral (LV), en México el principal cuadro clínico es LCL (Torres *et al.*, 2017).

La resistencia a leishmania se ha asociado a una respuesta Th1 mientras que la susceptibilidad asociada a una respuesta Th2. La respuesta Th1 hay una producción de citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ , que ayudan activar al macrófagos de forma clásica que expresan la iNOS y producen NO que ayuda a matar a los parásitos, mientras que una respuesta Th2 a través de citocinas como IL-10 e IL-4, los macrófagos de forma alternativa que ayudan al crecimiento de parásitos intracelulares y la progresión de la enfermedad (Awasthi *et al.*, 2004).

Los medicamentos actuales para tratar la enfermedad son de difícil acceso, por ello se están buscando diferentes alternativas con plantas o un cambio en la dieta, para tratar leishmaniasis, así como para evitar los efectos secundarios de los medicamentos.

El garbanzo se ha visto que puede ayudar a mejorar la salud intestinal (Myint *et al.*, 2017) y en enfermedades cardiovasculares, obesidad y cáncer debido a sus compuestos bioactivos (Shinohara *et al.*, 2016; Jayaprakash *et al.*, 2018). Actualmente no existe un estudio de garbanzo en enfermedades parasitarias, aunque experimentos preliminares realizados en el Laboratorio de Malariología por el Dr. Filiberto Malagón habían mostrado que la monodieta con garbanzo favorecía el control de la infección por plasmodium en un modelo murino. Estos antecedentes formaron la base para el análisis del efecto de la monodieta de garbanzo en un modelo murino de leishmaniasis.

## 1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por diferentes especies de parásitos protozoarios intracelulares del género *Leishmania* que se trasmite por la picadura del mosquito *Phlebotomus* en Asia, África y Europa y *Lutzomyia* en América (Ferraz *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2017). Este grupo de enfermedades se encuentra en áreas tropicales y subtropicales que se encuentra en 89 países (Reithinger *et al.*, 2007), siendo endémica en Asia, África, América y la región del mediterráneo. En México el área endémica se localiza al sur de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y parte de Yucatán. En el mundo hay 350 millones de personas que corren el riesgo de contraer la enfermedad, actualmente hay más de 12 millones de personas infectadas, reportándose cada año entre 1.5 y 2 millones de casos nuevos; esta enfermedad es la causa de 70,000 muertes por año (Alvar *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2017; Kedzierski, 2010). En México en 2013 se reportaron 970 casos de leishmaniasis, de los cuales el 98% fueron formas cutáneas (OPS/OMS, 2013).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida (Andrade *et al.*, 2001). Entre los principales factores de riesgo para contraer la enfermedad se encuentran los ambientales como son: el aumento de la temperatura entre 25°-35° C, la deforestación, la fragmentación de los bosques, la urbanización y el cambio climático. Entre los factores del huésped se encuentran: la inmunosupresión por VIH y coinfección con otros patógenos, el desarrollo de resistencia a los medicamentos, el aumento de viajes a regiones endémicas, la mala nutrición y factores socioeconómicos. El cuadro clínico de la enfermedad depende de la especie infectante (Torres *et al.*, 2017; Oryan *et al.*, 2016).

## 1.2 Cuadros clínicos

### 1.2. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Esta forma clínica empieza por un nódulo eritematoso o varios, los cuales oscilan entre 1 y 10 cm de diámetro (figura 1). Después de 1 a 3 meses el nódulo se convierte en una vesícula, luego en una pústula y al romperse, se produce una úlcera redondeada con bordes nodulares o gruesos. Generalmente las úlceras se encuentran en la cara, los antebrazos y las piernas. Estas úlceras pueden llegar a sanar entre 3 a 5 meses dejando una cicatriz a menudo hiperpigmentada (Torres *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2006). Los tratamientos más efectivos que se han utilizado son los antimoniales pentavalentes, la pentamidina y la miltefosina (David *et al.*, 2009).

Las principales especies de *Leishmania* que pueden producir este cuadro clínico son *L. major*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Reithinger *et al.*, 2007; Gurung *et al.*, 2015). Los casos de LCL se encuentran principalmente en Oriente Medio, Afganistán, Pakistán, África y América Latina (Miranda *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Leishmaniasis cutánea localizada, con una única úlcera. Foto tomada de Torres *et al.*, 2017.

### 1.2.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Esta forma se caracteriza por una baja respuesta inmune celular, lo que provoca la diseminación de la enfermedad a través del tejido y la linfa, desarrollando lesiones en la mayor parte de la piel debido a inoculaciones múltiples o una diseminación de los parásitos por una alta carga parasitaria. Se caracteriza por nódulos superficie lisa o rugosa. La cara y las extremidades superiores e inferiores son las zonas más afectadas (figura 2) (David *et al.*, 2009; Akilov *et al.*, 2007). Los principales síntomas son linfadenopatía y fiebre (Torres *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2006).

Las principales especies que pueden producir un cuadro clínico de LCD son *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. aethiopica*. Los casos de LCD se encuentran principalmente en América del Sur, América Central y Etiopía (Goto *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Leishmaniasis cutánea difusa, con múltiples nódulos en brazos. Foto tomada de Sinha *et al.*, 2008.

### 1.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)

Este cuadro clínico también se conoce como la enfermedad de kala-azar (fiebre negra), siendo la principal población en riesgo niños e individuos inmunocomprometidos y con mala nutrición. El cuadro clínico incluye son linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, fiebre, debilidad, anorexia, astenia, pigmentación cutánea, pérdida de peso y en la biometría hemaática hay leucopenia y trombocitopenia (figura 3) (Torres *et al.*, 2017; Awasthi *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2006). Esta enfermedad es causada por especies como *L. donovani* y *L. infantum* (Gurung *et al.*, 2015). Se encuentra principalmente en África del Este y del Norte, India, Pakistán, Bangladesh, Nepal, China, en el sur de Europa y en Latinoamérica (Miranda *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Leishmaniasis visceral, niño con hepatoesplenomegalia y desnutrición. Foto tomada de WHO, 2019.

### 1.3 Medicamentos usados en leishmaniasis

Los medicamentos actuales para tratar leishmaniasis presentan algunos inconvenientes ya que, tienen alta toxicidad, efectos secundarios, poca efectividad y un alto costo (cuadro 1). Entre los principales se encuentran la anfotericina B, los antimoniales pentavalentes, la pentamidina, la paromomicina, la miltefosina y la sitamaquina. Estos medicamentos actúan directamente en la membrana del parásito al formar poros, fragmentando el DNA y disminuyendo su proliferación (Bekhit *et al.*, 2018).

**Cuadro 1.** Medicamentos utilizados en leishmaniasis y sus efectos secundarios (Bekhit *et al.*, 2018; Torres *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2006; Ponte *et al.*, 2017).

<b>Medicamento</b>	<b>Efectos secundarios</b>
Anfotericina B	Nefrotoxicidad, fiebre y escalofríos
Antimoniales pentavalentes (Estibogluconato de sodio (pentosam) y antimoniato de meglumina)	Irritación local, anorexia, náuseas, vómitos, mialgias, artralgias, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, hipertensión, hipoglucemia, alteraciones electrocardiográficas, abscesos glúteos, cefalia, epigastralgia y vértigo.
Pentamidina	Poglicemia, hipotensión y nefrotoxicidad.
Paromomicina	Difusión hepática.
Miltefosina	Teratogenicidad.
Sitamaquina	Vómitos, dispepsia, cianosis y glomerulonefritisnefrítica.

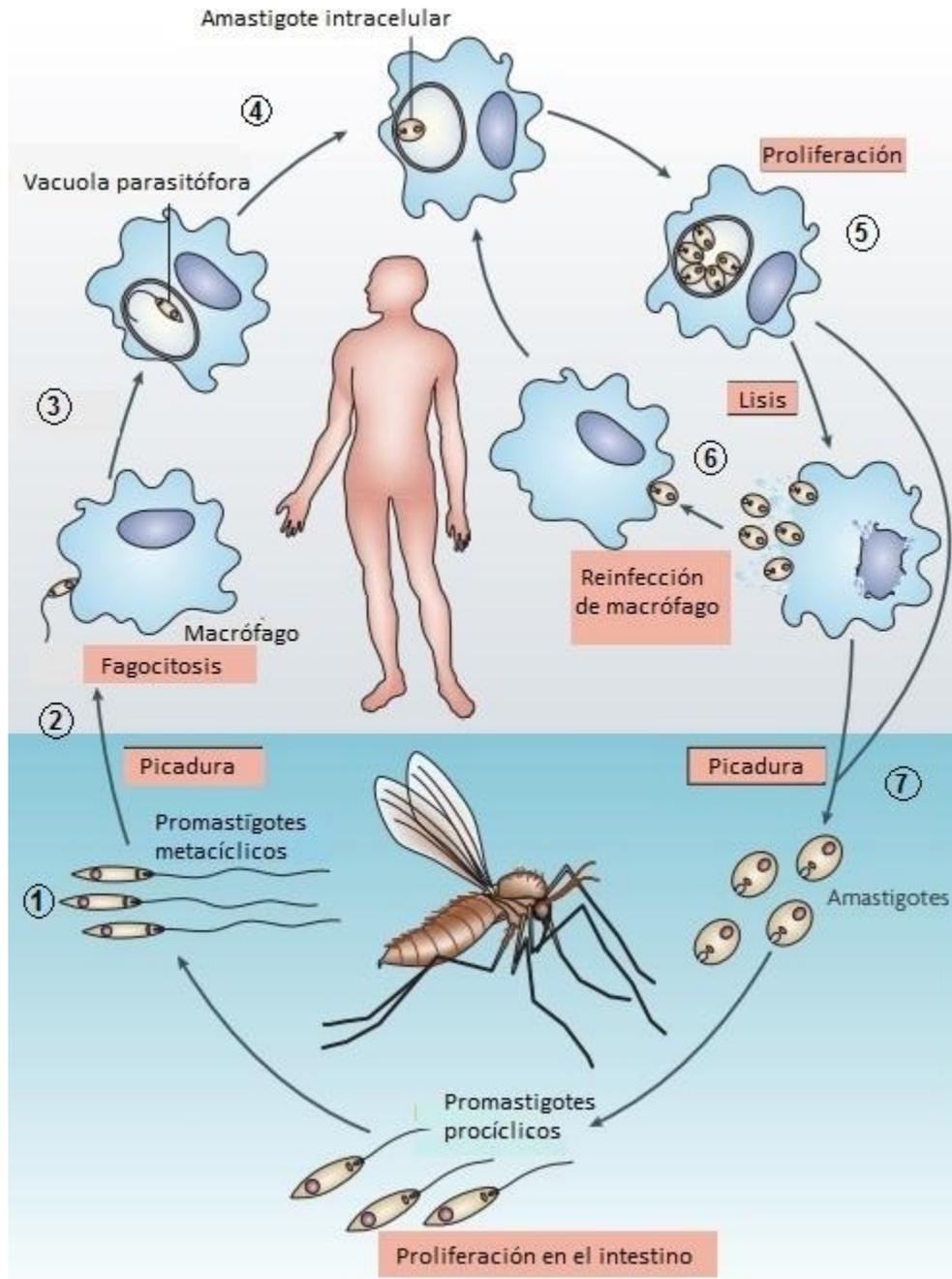
### 1.4 Ciclo de vida

El parásito *Leishmania* se transmite por la picadura de una mosca hembra, del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Awasthi *et al.*, 2004). El ciclo de vida de *Leishmania* se compone de dos etapas: un estadio móvil que es representado por el promastigote flagelado que mide de 10 a 20  $\mu\text{m}$

de largo se encuentra en el intestino medio de la mosca; y el segundo estadio representado por el amastigote (sin flagelo) en donde el parásito es intracelular obligatorio, se localiza en las células fagocíticas del hospedero y mide de 2.5 a 7.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (Torres *et al.*, 2017).

La mosca hembra al alimentarse de un animal infectado ingiere la forma de amastigote y en el intestino de la mosca comienzan un proceso de cambio, pasan a ser promastigotes procíclicos, los cuales presentan capacidad de adherencia en el epitelio del intestino medio de la mosca mediante la molécula lipofosfoglicano (LPG). Posteriormente, estos promastigotes maduran a promastigotes metacíclicos (fase infecciosa), cuyo LPG cambia de composición de carbohidratos promoviendo su desprendimiento del epitelio intestinal, donde la mosca al volver a alimentarse de un hospedero sano inocular a los parásitos (Torres *et al.*, 2017; Vera *et al.*, 2006).

Una vez en la dermis, los promastigotes metacíclicos son internalizados por células fagocíticas, como los macrófagos y neutrófilos. En los macrófagos se forma una vacuola parasitófora, y los promastigotes se diferencian en amastigotes y proliferan por fisión binaria, provocando la lisis de la célula. Los amastigotes son liberados y vuelven a ser fagocitados por otros macrófagos, el ciclo de vida de *Leishmania* se cierra cuando la mosca se alimenta de un huésped infectado (Torres *et al.*, 2017; Reithinger *et al.* 2007; Awasthi *et al.*, 2004).



**Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*.** Los promastigotes metacíclicos, se encuentran en la mosca (1). Los parásitos se transmiten cuando la mosca se alimenta del huésped mamífero (picadura) (2), y estos son fagocitados por células como los macrófagos (3). Dentro de los macrófagos el promastigote se diferencia a su estadio de amastigote en la vacuola parasitófora donde se replican llevando a la lisis de la célula hospedera (4,5), lo que permite la liberación de los amastigotes infectando así otras células (6). El ciclo se cierra cuando una mosca sana se infecta al alimentarse del huésped infectado (7) (Modificado de Chappuis *et al.*, 2007)

## 1.5.1 Respuesta inmune innata

### 1.5.1.1 Complemento

En la respuesta inmune innata una de las primeras barreras de defensa es el sistema del complemento que funciona como una cascada de proteasas, las cuales se activan unas a otras de manera enzimática para activar el complejo de ataque a membrana (MAC) que sirve para la eliminación de patógenos. Además, contribuye a la inflamación local y moldea la respuesta inmune adaptativa (Lubbers *et al.*, 2017). Las 3 vías del complemento son: la vía clásica que inicia cuando se forman complejos inmunes después de la unión de IgG o IgM a patógenos o antígenos extraños; la vía alternativa que se desencadena por hidratos de carbono, lípidos y proteínas que se encuentran en las superficies de los patógenos y la vía de las lectinas que se activa cuando la lectina de unión a manosa (MBL) o la Ficolina se unen a los restos de carbohidratos en las superficies de los patógenos. La vía final común de las tres vías es la convertasa C3 que divide a C3 para generar C3b y éste activa el MAC (fracciones C5b-C9) en la membrana extracelular del parásito y provoca su lisis (Sarma *et al.*, 2011).

Los parásitos pueden activar la vía alternativa o clásica. Los promastigotes de *L. major*, *L. enrietti*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* son capaces de activar el complemento a través de la vía alternativa, mientras que *L. donovani* puede activar la vía clásica y alternativa (Mosser *et al.*, 1986). Los anticuerpos IgM e IgG se unen y aglutinan a los promastigotes, activando la vía clásica del complemento y facilitando la fagocitosis del parásito (Domínguez *et al.*, 1999). La vía alternativa se activa por un proceso independiente de anticuerpos, para esta vía C3b se deposita sobre la superficie del parásito y se tiene que formar un enlace amida o éster entre el tioéster de C3b y un grupo amino o hidroxilo libre en la superficie del parásito (Mosser *et al.*, 1984). También se ha encontrado que la unión de proteínas solubles de fase aguda, como la proteína C reactiva (CRP) y las proteínas de unión a manano (MBP) del hospedero, son capaces de activar el sistema del complemento a través de la vía de lectinas sobre el parásito (Mosser *et al.*, 1997).

El sistema del complemento es un buen mecanismo para limitar la infección por *Leishmania*, ya que es capaz de eliminar al 95% de los parásitos promastigotes, sin embargo, el parásito se encuentra cubierto por el mayor gliconjugado (LPG) y la glicoproteína 63 kDa (gp63) (Awasthi *et al.*, 2004), que están involucradas en la resistencia al complemento. LPG es el principal sitio receptor de C3 en los promastigotes e inhibe la formación del MAC en la superficie de la membrana del parásito, mientras que gp63 degrada C3b a una forma físicamente similar a iC3b (Brittingham *et al.*, 1996), que inhibe completamente la formación del MAC (Gupta *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2015). LPG y gp63 facilitan la opsonización del parásito por C3b y C3bi que promueve la fagocitosis a través del receptor CR1 y el receptor CR3 en neutrófilos y macrófagos. El promastigote metacíclico tiene proteínas quinasas que fosforilan las proteínas del complemento C3, C5 y C9, inhibiendo la formación del MAC en la superficie del parásito, desactivando las vías del complemento clásicas y alternativas (Gurung *et al.*, 2015; Brittingham *et al.*, 1995).

#### 1.5.1.2 Neutrófilos

Los neutrófilos son células polimorfonucleares y son las primeras que migran al sitio de infección, donde pueden matar a los agentes infecciosos al generar un potente estallido oxidativo y liberando mediadores tóxicos en la vacuola parasitófora (De Menezes *et al.*, 2016). Los neutrófilos fagocitan a *Leishmania* y comienzan a secretar quimiocinas como IL-8 (CXCL8) para atraer a más neutrófilos al sitio de la infección (Awasthi *et al.*, 2004). Actúan como “caballos de troya”, al permitir que los parásitos sobrevivan en su interior, ya que el LPG de los promastigotes inhibe la maduración del fagosoma y el estallido oxidativo. Por otro lado, los neutrófilos pueden atrapar y lisar a algunos parásitos a través de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (Martínez *et al.*, 2018; De Menezes *et al.*, 2018; Gupta *et al.*, 2013).

### 1.5.1.3 Macrófagos

Los macrófagos son células mieloides que se encuentran en los tejidos y se encargan de fagocitar y degradar a las células muertas, los desechos celulares, los materiales extraños y participan en los procesos inflamatorios (Varol *et al.*, 2015). Los macrófagos pueden ser activados por citocinas como el IFN- $\gamma$ , el TNF- $\alpha$  y por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's), forman parte de la primera línea de defensa en las infecciones, reconociendo y matando a los patógenos (Arango *et al.*, 2015). Los promastigotes son fagocitados rápidamente por los macrófagos a través del reconocimiento mediado por receptores del complemento (CR3s), receptores de manosa, receptores de fibronectina, receptores Fc $\gamma$ R y receptores tipo Toll (TLR) (Handman *et al.*, 2002). Los TLR reconocen PAMP's, siendo TLR2 el que reconoce al LPG de los promastigotes, induciendo la producción de TNF- $\alpha$  y especies reactivas de oxígeno (ROS) en el macrófago (Gupta *et al.*, 2013).

Los macrófagos pueden eliminar a los parásitos induciendo su estallido oxidativo, o por su producción de óxido nítrico (NO) en el fagolisosoma. El estallido oxidativo provoca la producción de ROS. En leishmaniasis las principales fuentes de ROS son la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Sarwar *et al.*, 2017). La NADPH oxidasa al activarse reacciona con el sustrato NADPH que reduce el oxígeno a superóxido ( $O_2^-$ ). Posteriormente la enzima superóxido dismutasa convierte espontáneamente el superóxido en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radicales hidroxilo (OH), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito (Millar *et al.*, 2002). La xantina oxidasa también se encarga de la síntesis de superóxido y óxido nítrico, cediendo un electrón de xantina al oxígeno y la reducción de nitrito a NO (Sarwar *et al.*, 2017).

Una de las estrategias que utiliza el parásito dentro de los macrófagos para inhibir el estallido oxidativo es cuando impide la fosforilación de las subunidades p67 y p47 de la NADPH oxidasa debido a la señalización de la proteína quinasa C (PKC), ya que LPG obstruye la inserción de la PKC al impedir la unión del  $Ca^{+}$  y el diacilglicerol que bloquea el ensamblaje del complejo NADPH oxidasa evitando la

producción de ROS (Bhattacharyya *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2012; Badirzadeh *et al.*, 2017).

Por otro lado dependiendo del ambiente de citocinas los macrófagos se pueden activar de forma clásica y alternativa. La forma clásica es mediada por citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-1 y TNF- $\alpha$  producidas por células Th1 y NK. El IFN- $\gamma$  estimula a los macrófagos, a través de la vía JAK / STAT a que expresen y tenga actividad la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), que es una enzima que cataliza la producción de NO a partir de L-arginina. NO y las ROS son esenciales para provocar la muerte de los parásitos (Iniesta *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2018). La activación alternativa de los macrófagos antagónica a la activación clásica, está mediada por citocinas Th2 como IL-4 e IL-13. Se caracteriza por inducir la actividad de arginasa, la cual hidroliza L-arginina en L-ornitina y urea; la L-ornitina es un sustrato para la síntesis de prolina, glutamina y poliaminas, moléculas que ayudan a la replicación y supervivencia del parásito (Figura 5) (Gordon, 2003; Reguera *et al.*, 2009).

#### 1.5.1.4 Células Citotóxicas Naturales (NK)

Las células NK tienen una función efectora de producción de citocinas y de actividad citotóxica. Se encuentran en los ganglios linfáticos, en la sangre, en la piel, el intestino, el hígado, los pulmones y el útero, entre otros órganos (Taborda *et al.*, 2014). En leishmaniasis, las células NK son reclutadas al sitio de infección después de la llegada de los neutrófilos y son la fuente principal de la producción temprana de IFN- $\gamma$  que favorece la diferenciación Th1 de las células T CD4<sup>+</sup>. También ayudan a la lisis directa del parásito a través de su actividad citotóxica y contribuyen a la producción de iNOS en macrófagos (Gupta *et al.*, 2013, Martínez *et al.*, 2018).

#### 1.5.1.5 Células dendríticas

Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos y el puente entre la inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Se localizan en la piel y mucosas, así como en el intersticio de los órganos, donde captan antígenos que procesan mientras migran a través de los vasos linfáticos, al mismo tiempo que cambia a células maduras presentadoras de antígenos a los linfocitos T en la paracorteza de los ganglios linfáticos regionales (Feijó *et al.*, 2016). En la leishmaniasis fagocitan y procesan tanto a los parásitos como a los antígenos. Al madurar y presentar estos antígenos a las células T de manera eficiente, producen citocinas como IL-12p70 clave para mantener la respuesta Th1 (Von Stebut *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2018).

#### 1.5.2 Respuesta inmune adaptativa

##### 1.5.2.1 Linfocitos T

La respuesta inmune innata y adaptativa son necesarias para poder controlar la infección por *Leishmania*. Una de las células que forman parte de la respuesta adaptativa son las células T, que se encuentran en los órganos linfoides secundarios y reconocen antígenos procesados y presentados en el contexto de las moléculas de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a través del receptor de células T (TCR). Hay varios subtipos de células T pero las principales son las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> (Overgaard *et al.*, 2015; Novais *et al.*, 2015). Las células T CD8<sup>+</sup> reconocen antígenos unidos a MHC I, contribuyen a la eliminación de patógenos intracelulares debido a su capacidad para matar células infectadas liberando moléculas citotóxicas como las granzimas y las perforinas, producen citocinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , y ayudan a la modulación de la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> (Stäger *et al.*, 2012; Mittrücker *et al.*, 2014; Da Silva *et al.*, 2014). Las células T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos unidos a MHC II, son la principal fuente de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , dirigen respuestas inmunes apropiadas durante la defensa del huésped y la patogénesis de

enfermedades inflamatorias y pueden diferenciarse a células Th1 o Th2 (inflamatorias y antiinflamatorias, respectivamente) mediado por la citocina IL-12 o la citocina IL-4 respectivamente (Hirahara *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2014).

#### 1.5.2.2 Linfocitos T CD8

En leishmaniasis las células T CD8<sup>+</sup> son protectoras cuando producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha/\beta$  (Woodland *et al.*, 2003), pero promueven la infección cuando son citolíticas. Por lo tanto, en la infección primaria, las células T CD8<sup>+</sup> que se encuentran en el ganglio linfático producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  e inducen una respuesta Th1 y son necesarias para modular las respuestas de las células T CD4<sup>+</sup> subpoblación Th1 que inducen la activación del macrófago clásico que logra lisis a los parásitos. En contraste, las células T CD8<sup>+</sup> que migran a las lesiones en una infección primaria producen poco IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , muestran una actividad citolítica que aumenta la muerte celular, lo que lleva a la liberación de moléculas proinflamatorias, incluidas moléculas de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y lo que lleva a una respuesta inflamatoria exagerada que promueve un daño tisular exacerbado (Tripathi *et al.*, 2007; Stäger *et al.*, 2012; Kaech *et al.*, 2002; Novais *et al.*, 2015).

#### 1.5.2.3 Linfocitos T CD4

Las células efectoras T CD4<sup>+</sup> subpoblación Th1 producen de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que activa la producción de la iNOS en macrófagos ayudando a resolver la infección (Tripathi *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2018), además las células T de memoria residentes pueden promover el reclutamiento rápido de células efectoras e inducir inmunidad innata independiente del antígeno, acelerando y amplificando así la resistencia a la infección (Glennie *et al.*, 2015). Por otro lado, las células T CD4<sup>+</sup> subpoblación Th2, producen altos niveles de IL-4 e IL-13 que inducen la actividad de la arginasa (Figura 5), que favorecen la proliferación de los parásitos intracelulares (Novais *et al.*, 2015; Heinzl *et al.*, 1989). Asimismo, IL-4 también

controla el cambio de las inmunoglobulinas en las células B activadas, en humanos cambia la expresión de IgE e IgG4, mientras que en ratones cambia la expresión IgE e IgG1, regula la expresión de IFN- $\gamma$ . Por estos efectos, IL-4 es una citocina que se asocia a la susceptibilidad a la infección por *Leishmania* (Maspi *et al.*, 2016; Hurdayal *et al.*, 2017)

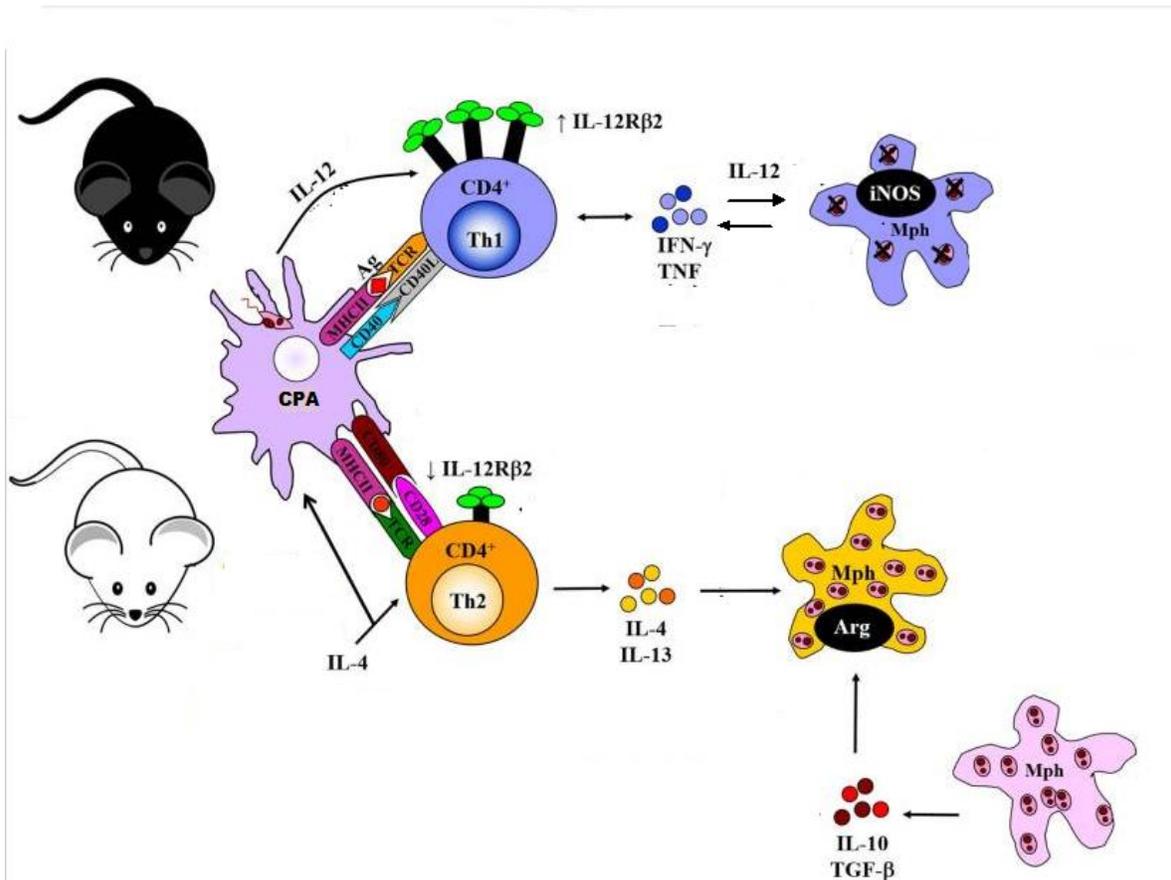
#### 1.5.2.4 Linfocitos B

Cuando son activados por células T linfoides, activadas a su vez por la presentación de un antígeno, los linfocitos B se diferencian a células plasmáticas o plasmocitos productoras de anticuerpos. Los linfocitos B también participan en la presentación antigénica, la secreción de citocinas, y contribuyen al mantenimiento y organización de la estructura del tejido. En leishmaniasis los linfocitos B, pueden tener diferentes respuestas dependiendo de la especie, promoviendo o ayudando a resolver la infección (Silva *et al.*, 2018).

La producción de anticuerpos aumentan la patogénesis en *L. mexicana*, *L. pifanoi* y *L. amazonensis*. En un estudio con ratones knockout limitados de anticuerpos circulantes, y carecen de la cadena  $\gamma$  común de los receptores Fc, presentan lesiones más pequeñas cuando son infectados con las especies anteriores de *Leishmania*. En estos ratones, los parásitos no pueden ser fagocitados a través de los receptores Fc (Fc $\gamma$ R) (Liu *et al.*, 2012; Miles *et al.*, 2005; Soong, 2008 Wanasen *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2007; Kima *et al.*, 2000). Adicionalmente, a través de los receptores Fc $\gamma$ R los anticuerpos pueden activar a las células T CD4<sup>+</sup> productoras de IL-10, las cuales promueve la progresión de la enfermedad (Soong, 2008; Wanasen *et al.*, 2008).

En algunas especies de *Leishmania*, al activarse las células B por medio de TLRs, son generadas de células B inmunosupresoras que inhiben respuestas Th1 e inducen respuestas Th2, con lo cual ayudan a que la infección se establezca y se exacerbe. Así, en leishmaniasis cutánea, las células B contribuyen al establecimiento de la infección y aumentan la susceptibilidad a la enfermedad. Los

ratones con deficiencia de células B que son infectados con *L. amazonensis* muestran una carga parasitaria menor y lesiones más pequeñas (Wanasen *et al.*,2008).



**Figura 5. Respuesta inmune en la infección por *Leishmania*.** Cuando los promastigotes son inoculados, el sistema del complemento se activa lisando a algunos parásitos mientras algunos son fagocitados por células presentadoras de antígenos que producen IL-12 ayudando a diferenciar a las células CD4<sup>+</sup> Th1, las cuales producen IFN- $\gamma$ , y TNF- $\alpha$ . Estas citocinas activan a los macrófagos de forma clásica induciendo la iNOS y la producción de óxido nítrico que llevan a la muerte del parásito. En contraste, la producción de IL-4 por mastocitos, eosinófilos estimula a las células CD4<sup>+</sup> Th2, que producen IL-4 e IL-13, dichas citocinas activan a los macrófagos de forma alternativa, activando a la arginasa que ayuda a la producción de poliaminas que favorecen la proliferación y replicación del parásito. De igual manera los macrófagos infectados de forma alternativa producen algunas citocinas como IL-10 y TGF- $\beta$  que inhiben la activación de los linfocitos T (Foto modificada de Hurdayal *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2013).

## 1.6 Modulación de la respuesta inmune por dietas en leishmaniasis

La desnutrición es un importante problema de salud, principalmente en países en vías de desarrollo donde los niños se ven especialmente afectados. Se estima que 826 millones de personas en el mundo están desnutridas, de las cuales el 95.9% se encuentran en países en vías de desarrollo (Corware *et al.*, 2014).

Una dieta balanceada es esencial para una buena salud, ya que se ha visto que una dieta que incluye vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales, aminoácidos y flavonoides, puede ayudar a la prevención de enfermedades (Jason, 2006). De esta forma, tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa pueden verse afectadas en un hospedero desnutrido, aumentando la susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Corware *et al.*, 2014). En leishmaniasis se ha visto que la dieta puede influir en la respuesta inmune durante la infección.

La falta de proteínas en la dieta puede ayudar a la progresión de la leishmaniasis ayudando a la progresión de la enfermedad, en estudios donde se administró una dieta baja en proteínas a ratones infectados con *leishmania* se observó que la dieta tiene un impacto negativo en el desarrollo del timo, mostrándose una desorganización del tejido linfoide con cambios en la celularidad, cambiando la proporción de células T CD4<sup>+</sup> / TCD8<sup>+</sup> y alterando la migración de las células, de igual manera se encontró una alteración de la fagocitosis por los macrófagos, un aumento de la actividad de la enzima arginasa y una menor concentración de NO, resultando en un aumento de la carga del parásito en el bazo y aumentaron las citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-10 (Corware *et al.*, 2014; Losada *et al.*, 2017). En otro estudio se observó que la administración oral de sulfato de zinc a pacientes con leishmaniasis cutánea cada 15 días por 45 días indujo una tasa de curación de hasta el 96.9% en las lesiones (Sharquie *et al.*, 2001). Estos estudios sugieren la importancia de la dieta en el desarrollo de las enfermedades. Se ha sugerido que la dieta puede modular la respuesta inmune modificando la respuesta contra patógenos (Corware *et al.*, 2014).

## 1.7 Garbanzo

El garbanzo (*Cicer arietinum*), una leguminosa de la familia Fabaceae, subfamilia Faboideae tiene grandes efectos en la salud, considerándose un alimento de gran importancia, ya que tiene gran cantidad de carbohidratos y proteínas, que en conjunto constituyen aproximadamente el 80% de la masa total de las semillas secas. Los lípidos representan el 6.4% del peso total de la semilla seca, de los cuales la mayoría son insaturados, como los ácidos linoleico y el ácido oleico, también tiene tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), esteroides ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol) y tocotrienoles. (Jukanti *et al.*, 2012; Bar-El Dadon *et al.*, 2017; Wood, 2007). De igual manera el garbanzo tiene grandes cantidades de aminoácidos esenciales excepto los que contienen azufre como metionina y cistina. El consumo de 100 gramos de garbanzo cocido puede proporcionar hasta un 44% de la ingesta diaria recomendada de algunos minerales, también podemos encontrar vitaminas solubles en agua como vitaminas B, vitamina C, niacina, ácido pantoténico, piridoxina y ácido fólico, así como vitaminas liposolubles como vitamina A en forma de carotenoides, vitamina E y vitamina K. Adicional a estos nutrientes el garbanzo tiene compuestos bioactivos con efectos leishmanicidas (Bar-El Dadon *et al.*, 2017; Jukanti *et al.*, 2012).

## 1.8 Compuestos bioactivos

El garbanzo es una fuente notable de compuestos bioactivos como alcaloides, taninos, ácido fítico, saponinas y compuestos fenólicos, estos últimos con actividades antioxidantes, apoptóticas y antiproliferativas (Torres *et al.*, 2015).

Los compuestos fenólicos que se encuentran en el garbanzo incluyen isoflavonas como la genisteína, la formononetina y la biocanina A; flavonoides como la quercetina y la mirricetina; ácidos fenólicos que se dividen en derivados del ácido benzoico como el ácido gálico, el ácido vanílico, el ácido sirínico, el ácido protocatéquico y el ácido *p*-hidroxibenzoico; y derivados del ácido cinámico como el ácido cafeico, el ácido clorogénico, el ácido ferúlico, el ácido sinápico y el ácido *p*-cumumérico; y antocianinas como petunidina, delphinidina y malvidin (Sreerama *et*

*al.*, 2010; Aguilera *et al.*, 2011; Jukanti *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2018; Monk *et al.*, 2017).

Dentro del garbanzo destacan los compuestos fenólicos como ácido gálico, ácido cafeico, la quercetina y biocanina A (cuadro 2), pues se han visto que tiene un efecto leishmanicida y modulador de la respuesta inmune induciendo mecanismos microbicidas innatos y la producción de citocinas por algunas células (Belkhefha *et al.*, 2017; Sreerama *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2017).

**Cuadro 2.** Compuestos bioactivos del garbanzo con efecto leishmanicida (Wood *et al.*, 2007; Sreerama *et al.*, 2010)

<b>Compuesto</b>	<b>Unidad</b>	<b>Rango</b>	<b>Actividad</b>
Biocanina A	µg/100 g	838 - 3080	Efecto directo en el parásito
<i>Cotiledones</i>			
Quercetina	µg/g	7.01	Efecto directo en el parásito y su metabolismo.
Ácido gálico	µg/g	8.5	Efecto directo en el parásito y modulación de la respuesta inmune
Ácido cafeico	µg/g	103.3	Efecto directo en el parásito y modulación de la respuesta inmune
<i>Semilla</i>			
Quercetina	µg/g	104.9	Efecto directo en el parásito y su metabolismo.
Ácido gálico	µg/g	4.1	Efecto directo en el parásito y modulación de la respuesta inmune
Ácido cafeico	µg/g	17.7	Efecto directo en el parásito y modulación de la respuesta inmune

## 1.9 Modulación de la respuesta inmune por garbanzo

Se ha demostrado que la dieta de garbanzo puede modular la respuesta inmune, induciendo un aumento en el perfil de citocinas de tipo Th1. Se ha observado que al administrar extractos de proteínas de garbanzo a ratones BALB/c, se indujo un aumento en las citocinas inflamatorias como IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  y disminuyó la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-17 e IL-10 por esplenocitos (Gupta *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2012). En otro estudio en ratones suizos albinos expuestos a estrés crónico, se administró vía oral un extracto alcohólico de *Cicer microphyllum* (especie silvestre de garbanzo) que llevó a un aumento de las poblaciones de células TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> y un aumento de citocinas inflamatorias como IFN- $\gamma$  e IL-2 (Kour *et al.*, 20011). Estos estudios demuestran que el garbanzo puede modificar el perfil de citocinas debido a sus compuestos que principalmente ayudan a la producción de citocinas inflamatorias, las cuales juegan un papel muy importante en la respuesta inmune contra *Leishmania*.

## II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el tratamiento contra la leishmaniasis es de difícil acceso y genera reacciones secundarias, se siguen buscando diferentes tratamientos para tratar la enfermedad. Se ha demostrado que la dieta puede modificar el curso de la infección. Por ejemplo, se ha observado que el incremento de zinc o vitamina A puede ayudar a controlar la infección en pacientes con leishmaniasis debido al efecto leishmanicida y a la modulación de la respuesta inmune que presentan respectivamente dichos compuestos. Por este motivo en este trabajo se propuso aplicar una monodieta de garbanzo como posible tratamiento contra la enfermedad, ya que presenta compuestos bioactivos que son reducen la viabilidad del parásito y que pueden modificar la respuesta inmune.

### **III. HIPÓTESIS**

La monodieta de garbanzo ayuda a controlar la infección por *L. mexicana*.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Analizar el efecto de la monodieta de garbanzo en el desarrollo de la infección por *L. mexicana* de ratones BALB/c.

#### **4.2. Objetivos específicos**

1. Evaluar el tamaño de la lesión de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y alimentados con una monodieta de garbanzo.
2. Analizar la carga parasitaria de las lesiones de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y alimentados con una monodieta de garbanzo.
3. Analizar las citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4) de los esplenocitos de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y alimentados con una monodieta de garbanzo.
4. Cuantificar los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y alimentados con una monodieta de garbanzo.

### **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Animales**

Para todos los experimentos se utilizaron ratones BALB/c hembras de 8 semanas de edad manejados bajo estricto apego a la Norma Oficial Mexicana para el manejo de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-199. Los animales se

encontraban libres de patógenos, y recibieron comida y agua *ad libitum*. Un grupo de ratones fue alimentado con una monodieta de garbanzo variación blanco Sinaloa (Verde Valle®) y un grupo control que fue alimentado con una dieta balanceada de animales de laboratorio (LABDIET®, 5010 Laboratory Autoclavable Rodent Diet) por nueve semanas, tiempo en que concluyó el experimento

## 5.2 Infección con *L. mexicana* en ratones BALB/c

Se infectaron 12 ratones en el cojinete plantar dividiéndose en dos grupos de ratones con  $1 \times 10^6$  de promastigotes en fase estacionaria de crecimiento (día 5 de cultivo) con una jeringa para insulina. El tamaño de la lesión fue monitoreado durante nueve semanas con la ayuda de un vernier digital. Al terminar el experimento, los ratones se anestesiaron y se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los cojinetes plantares, el bazo y el suero de cada grupo de ratones.

## 5.3 Cuantificación de la carga parasitaria de las lesiones

Para determinar la carga parasitaria de las lesiones, los cojinetes plantares previamente obtenidos se fijaron en formol al 10%, posteriormente fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes histológicos seriados los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina, con la cual se pudo observar el núcleo del parásito para su identificación. Para el conteo de los parásitos teñidos se tomaron 8 fotos de las tinciones de cada muestra histológica a un aumento de 400X con una cámara AxionCamMRc5 (Carl Zeiss). Las fotos fueron analizadas con el programa ImageJ V1.50i (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health).

#### 5.4 Obtención de esplenocitos

Una vez sacrificados los ratones se obtuvieron los bazos y se colocaron en buffer de fosfato salino (PBS). Posteriormente fueron macerados en mallas de 180  $\mu\text{m}$  para obtener una suspensión celular (de cada muestra) que fue centrifugada a 800 x g por 10 min a 20° C, el botón con las células fue resuspendido en 7 ml de PBS y se colocó sobre 4 ml de una solución de HISTOPAQUE® en tubos cónicos de 15 ml. Después, se centrifugó a 800 x g por 20 min a 20° C separándose las células por gradiente de densidad, del cual se tomaron las células de la interfase que contenía a los esplenocitos, para quitar los restos de HISTOPAQUE® se realizaron dos lavados a dichas células, cada lavado se realizó centrifugando la muestra a 800 x g por 10 min a 4° C, y resuspendiendo el botón celular con 10 ml de PBS. Para determinar la viabilidad las células fueron contadas en una cámara de Neubauer por el método de exclusión con azul tripan al 0.4% (GIBCO®).

#### 5.5 Inducción de la producción de citocinas en esplenocitos

Se cultivaron los esplenocitos de cada grupo de estudio en placas de 96 pozos a una densidad de millón de esplenocitos por 200  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Para inducir la producción de citocinas se estimularon las células con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  de un lisado total de Ag. de promastigotes *L. mexicana* por 5 días a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al término de la incubación se obtuvieron los sobrenadantes de los esplenocitos de cada grupo experimental, para su posterior cuantificación de citocinas.

#### 5.6 Cuantificación de citocinas

Para la cuantificación de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-4) se utilizó ELISA tipo sándwich siguiendo las especificaciones del fabricante BD-Pharmingen. Brevemente, en una placa de 96 pozos de fondo plano (Corning, Life Sciences, NY, USA) se colocaron 50  $\mu\text{l}$  por pozo del anticuerpo de captura específico para

cada citocina, las cuales anteriormente fueron diluidas en un regulador de fosfato bifásico de sodio anhidro 0.1 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), se tapó la placa y se dejó incubar a 4° C por 12 h. Posteriormente, la placa se lavó con PBS y se colocaron 200 µl por pozo de solución bloqueadora de caseína al 5% disuelta en NaOH 0.1 M por 30 min a temperatura ambiente. Después se lavó la placa y se colocaron 50 µl por pozo de la curva estándar y las muestras de los sobrenadantes de los esplenocitos, se dejaron incubar toda una noche a 4° C. Al siguiente día la placa se lavó y se colocaron 100 µl del anticuerpo de detección y se dejó incubar 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la placa y se colocó una dilución 1:2000 de estreptavidina-fosfatasa alcalina que se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. Por último, se lavó la placa y se colocaron 100 µl por pozo de la solución reveladora de buffer de sustrato y sustrato de fosfatasa durante 1 h. Las muestras se leyeron a 405 nm con un lector de ELISA para microplacas (BioTek Instruments Inc) y para analizar los datos de cada citocina se utilizó el programa KC4 (BioTek Instruments Winooski VT).

### 5.7 Cuantificación de los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania*

Para la cuantificación de los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania*, se obtuvo la sangre de cada grupo experimental por punción cardiaca con ayuda de jeringas para insulina. El suero sanguíneo se obtuvo coagulando la sangre y posteriormente se centrifugó y se cuantificaron los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* por medio de ELISA. En una placa de 96 pozos EIA/RIA (Corning, Life Sciences, NY, USA) se fijaron 0.6 µg/pozo de antígeno total de promastigotes de *L. mexicana* mediante la incubación en cámara húmeda de dicha placa durante una hora a 4° C. Posteriormente se agregaron 200 µl de solución bloqueadora de caseína al 5% disuelta en NaOH 0.1 M durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa con PBS y se colocaron 100 µl de los sueros de los ratones en dilución 1:100, y se dejó incubar por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Después se lavó la placa nuevamente con PBS y se colocaron 100 µl del anticuerpo secundario HRP (peroxidasa de raíz

fuerte) anti-IgG de ratón en dilución 1:4000 y se incubó por 30 min. Por último se colocaron 100 µl de solución reveladora compuesta de un volumen de sustratos de peroxidasa TMB (Tetrametilbencidina) y un volumen igual de solución peroxidasa B, y se incubó por 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Para parar la reacción se utilizaron 100 µl de una solución de 1 M de ácido fosfórico. Las muestras se leyeron a 405 nm con un lector de ELISA para microplacas (BioTeK Instruments Inc).

## 5.8 Análisis estadístico

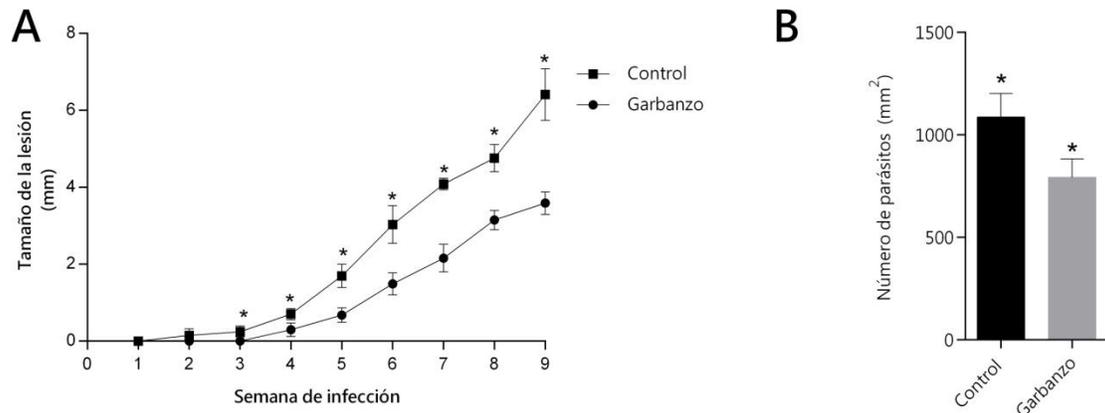
Todos los resultados fueron analizados por una prueba U de Mann-Whitney de dos colas con ayuda del programa GraphPad Prism versión 6 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## VI. RESULTADOS

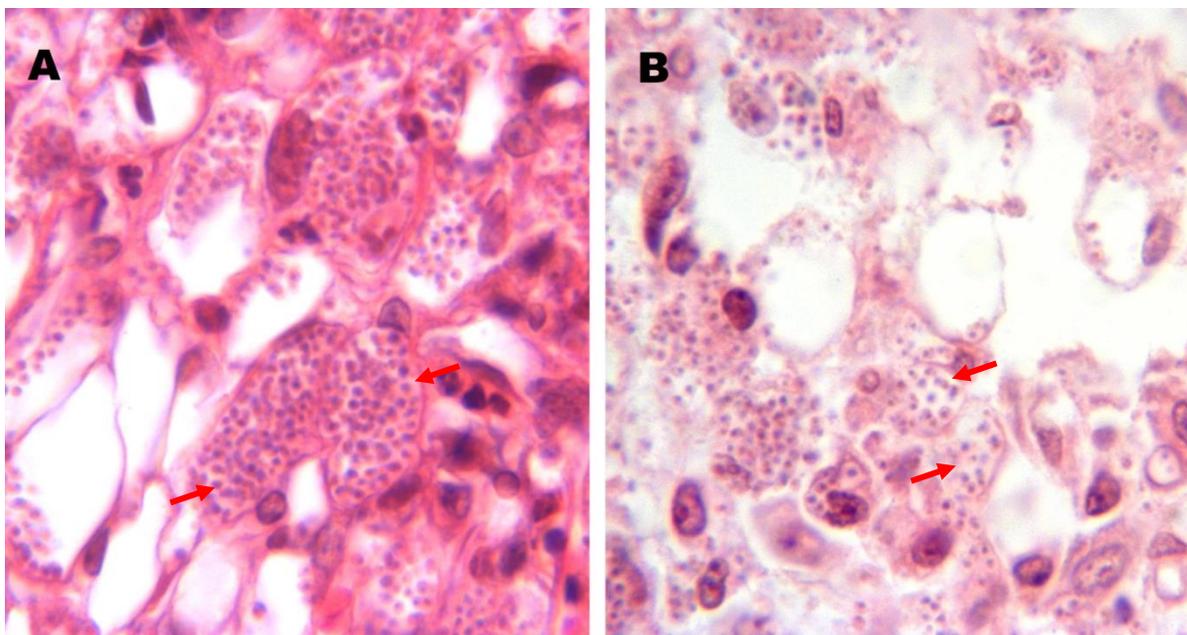
### 6.1 Análisis del tamaño de lesiones y de la carga parasitaria de ratones infectados con *L. mexicana* tratados con monodieta de garbanzo

Para analizar si la monodieta de garbanzo tuvo algún efecto en la infección por *L. mexicana* en ratones BALB/c se midió el tamaño de la lesión que corresponde a la diferencia del cojinete plantar infectado y el sano. Se observó que el tamaño de las lesiones (figura 6A) de los ratones tratados con la monodieta de garbanzo fue menor desde la semana 3 de exposición, comparado con la dieta control ( $p < 0.05$ ). Para determinar si el tamaño de la lesión está relacionado con la carga parasitaria se cuantificaron los parásitos de cortes histológicos de las lesiones (figura 6B), encontrándose que hay una reducción significativa en el número de amastigotes entre los ratones alimentados con monodieta de garbanzo de 1.3 veces y el control ( $p < 0.05$ ). Asimismo, en las fotomicrografías se pudo observar

que los macrófagos infectados contienen menor número de parásitos en el grupo de ratones alimentados con la monodieta de garbanzo (figura 7).



**Figura 6. Evolución de la lesión de ratones infectados con *L. mexicana* alimentados con la monodieta de garbanzo.** En A se observa el tamaño de lesión en el cojinete plantar de ratones infectados con  $1 \times 10^6$  de parásitos tratados con las diferentes dietas durante nueve semanas. En B se muestra el número de parásitos por  $\text{mm}^2$  de tejido de las lesiones en ratones infectados y tratados con las diferentes dietas. Los datos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 6 réplicas. Los \* representan la diferencia significativa.



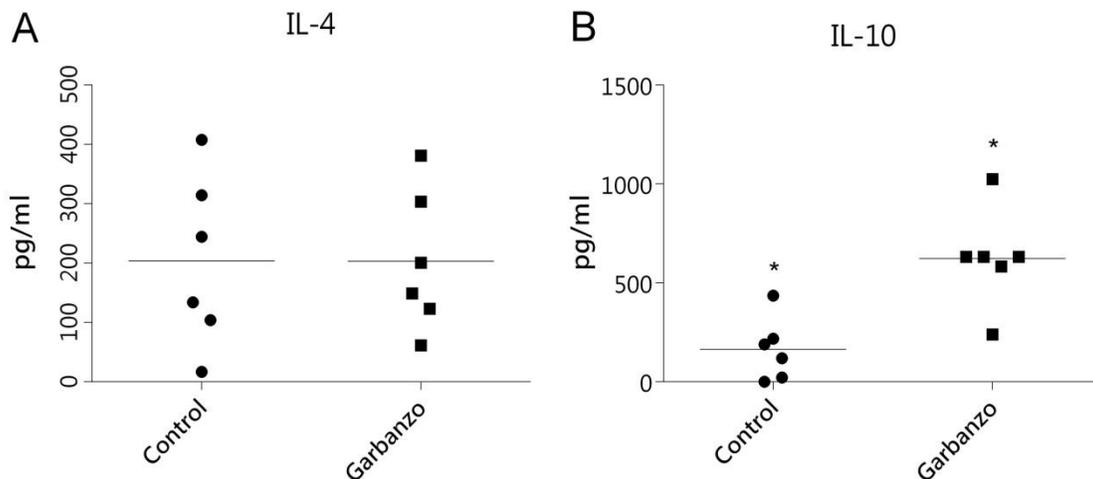
**Figura 7. Fotomicrografías comparativas de cortes histológicos de ratones infectados con *L.***



**Figura 8. Producción de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) producidas por esplenocitos estimulados con Ag. de *L. mexicana* de los diferentes grupos de ratones.** Las citocinas se cuantificaron de sobrenadantes de células incubadas por 5 días con Ag. total de *L. mexicana*. En A y B se muestra la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  respectivamente. Los datos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 6 réplicas. Los \* representan la diferencia significativa.

En cuanto a las citocinas antiinflamatorias se observó que la citocina IL-10 aumentó significativamente 3.8 veces en ratones alimentados con garbanzo (626 pg/ml) con respecto al control (161 pg/ml). Mientras que la producción IL-4 no hubo cambio significativo en los grupos de estudio (figura 9).

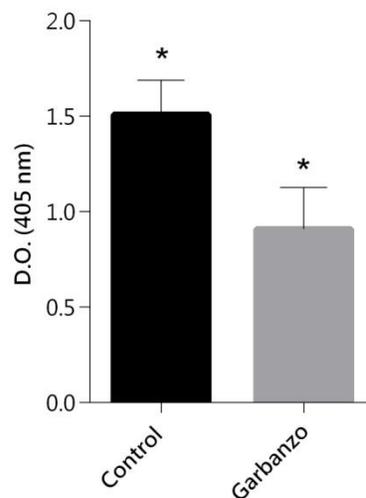
Comparando los datos de las citocinas inflamatorias y antiinflamatorias, se observó que el aumento de las citocinas inflamatorias fue mayor en el grupo experimental alimentado con garbanzo con respecto al grupo control.



**Figura 9. Producción de citocinas antiinflamatorias producidas por esplenocitos estimulados con Ag. completo de *L. mexicana* de los diferentes grupos de ratones.** Las citocinas se cuantificaron de sobrenadantes de células incubadas por 5 días con Ag. de *L. mexicana*. En A y B se muestra la producción de IL-4 y IL-10 respectivamente. Los datos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 6 réplicas. Los \* representan la diferencia significativa.

### 6.3 Análisis de la cuantificación de los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* tratados con monodieta de garbanzo

Para determinar si había una relación entre la cantidad de anticuerpos y la carga parasitaria se cuantificaron los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros de los ratones alimentados con garbanzo y el grupo control. Interesantemente se observó que una diferencia significativa en los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en el grupo alimentado con dieta de garbanzo donde disminuyeron significativamente 1.6 veces con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10. Análisis de la cuantificación de los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania*.** En la gráfica se observan los títulos de anticuerpos de los sueros de ratones infectados con  $1 \times 10^6$  de parásitos, tratados con la dieta de garbanzo y dieta control durante nueve semanas. Los datos representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar de 6 réplicas. Los \* representan la diferencia significativa.

## VII. DISCUSIÓN

La dieta puede influir en el trascurso de diferentes infecciones ya que algunos alimentos pueden tener compuestos que pueden modular la respuesta inmune, o alterando la microbiota (Torres *et al.*, 2017; Ponte *et al.*, 2017). El garbanzo ha adquirido gran importancia debido a que tiene compuestos bioactivos que pueden ser benéficos para la salud humana ya que tienen efectos antioxidantes, apoptóticos y antiproliferativos (Torres *et al.*, 2015; Islamuddin *et al.*, 2015; Ogungbe *et al.*, 2014; De Madeiros *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2015). En el presente estudio se analizó si la monodieta de garbanzo ayuda a controlar la infección por *L. mexicana* de ratones BALB/c, observándose que disminuye la carga parasitaria, reduce el tamaño de la lesión y modula la producción de citocinas inflamatorias y antiinflamatorias.

La reducción en el desarrollo de leishmaniasis que se observó en los ratones alimentados con la monodieta puede deberse al papel directo de los compuestos bioactivos presentes en el garbanzo, como el ácido gálico, el ácido cafeico, la quercetina y la biocantina A, los cuales tienen efecto leishmanicida directo. Hubo una reducción en la carga parasitaria así como en el tamaño de la lesión, y en estudios anteriores se ha mostrado que el ácido gálico inhibe el crecimiento de promastigotes de diferentes especies, la viabilidad de los amastigotes y reduce la tasa de infección de macrófagos (Kheirandish *et al.*, 2016). El ácido cafeico reduce el tamaño de la lesión de ratones infectados con *Leishmania*, disminuye la viabilidad de los promastigotes al causar despolarización mitocondrial y el aumento de ROS (Belkhelfa *et al.*, 2017; Passero *et al.*, 2011; Belkhelfa *et al.*, 2018; Chappuis *et al.*, 2007; Bortoleti *et al.*, 2019). La quercetina inhibe la proliferación de los promastigotes, reduce su infectividad hacia el macrófago, en el amstigote interfiere en su adquisición de hierro en el interior del macrófago, inhibe su enzima ribonucleótido reductasa, involucrada en la síntesis de DNA del parásito provocando la detención del ciclo celular, aumenta su producción de ROS lo que lo lleva a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial e inducción de su muerte por apoptosis o necrosis (Cataneo *et al.*, 2019; Belkhelfa *et al.*, 2017; Da Silva *et al.*, 2012; Fonseca *et al.*, 2011; Sen *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2000). Por

último estudios in vitro donde la biocantina A tiene un efecto leishmanicida en los promastigotes (Sartorelli *et al.*, 2009). Estos antecedentes sugieren que la reducción en la carga parasitaria y la disminución en el tamaño de la lesión se deben a la posible presencia de estos compuestos en el garbanzo utilizado en este trabajo.

Otra manera por la cual el garbanzo podría ayudar a disminuir la carga parasitaria es por la inmunomodulación que ejerce sobre el macrófago, algunos trabajos han demostrado que compuestos del garbanzo como el ácido gálico y el ácido cafeico presentan un efecto inmunomodulador. Por un lado, el ácido gálico aumenta la liberación de nitritos y el calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>] en los macrófagos (Alves *et al.*, 2017), aumenta el RNAm de la iNOS y de citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así como de las citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (Radtke *et al.*, 2004; Radtke *et al.* 2003), mientras que el ácido cafeico aumenta el nivel de NO, aumenta la expresión y actividad de la iNOS, a través de la estimulación por TNF- $\alpha$  (Belkhelfa *et al.*, 2017; Passero *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2008 Belkhelfa *et al.*, 2018; Chappuis *et al.*, 2007; Bortoleti *et al.*, 2019). Adicionalmente, la quercetina puede inhibir la enzima arginasa reduciendo la diferenciación hacia macrófagos alternativos. De esta manera los posibles compuestos bioactivos presentes en la variedad de garbanzo utilizado, podrían estar activando al macrófago, ayudando a eliminar al parásito.

Adicionalmente, el garbanzo puede estar inmunomodulando el perfil de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en la infección como se mostró en los resultados de los ratones alimentados con garbanzo, donde se observó un aumento de éstas citocinas por esplenocitos. En algunos estudios (Gupta *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2012) al administrar extractos proteicos de garbanzo a ratones BALB/c, hubo un aumento en la producción de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ , así como de la citocina antiinflamatoria IL-10 en esplenocitos, por lo que al comparar los resultados de estos estudios con los datos obtenidos es sugerente que la monodieta de garbanzo administrada a los ratones BALB/c infectados con

*L. mexicana* favorece al aumento de la modulación de la respuesta inmune, aumentando el perfil de citocinas principalmente inflamatorias ayudando así a controlar la infección, ya que estas citocinas ayudan a inducir la expresión de la iNOS en macrófagos infectados por *L. mexicana* que juega un papel importante para la muerte del parásito. Nuestros resultados coinciden con los trabajos anteriores al aumentar el perfil de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  así como de la citocina IL-10 que puede estar actuando como una citocina regulatoria para evitar que la infección se exacerbe.

Por último la reducción de la carga parasitaria también estuvo relacionada con una menor producción de anticuerpos, algunos autores han demostrado que la cantidad de anticuerpos es directamente proporcional a la cantidad de parásitos en las lesiones, ya que estos aumentan la patogénesis de la enfermedad debido a que promueven la fagocitosis del parásito (Miles et al., 2005). Nuestros resultados coinciden con estos antecedentes ya que los ratones alimentados con la monodieta de garbanzo tuvieron una menor carga parasitaria así como un menor número de títulos de anticuerpos.

Por los mecanismos descritos anteriormente el garbanzo podría ayudar a controlar la infección por *L. mexicana* al eliminar de manera directa al parásito por su efecto en la viabilidad del parásito, o de manera indirecta al activar al macrófago y al inducir un cambio en el perfil de citocinas en los esplenocitos. Coincidiendo con nuestros resultados al cambiar el perfil de citocinas y reducir la carga parasitaria, de igual manera es el primer estudio en leishmaniasis que se realiza con garbanzo.

## VIII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró que el garbanzo tiene un efecto sobre la infección por *L. mexicana* en ratones BALB/c, reduciendo el tamaño de lesión y la carga parasitaria, lo cual podría deberse al incremento en la producción de citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  que reducen la sobrevivencia del parásito. Por lo que se propone que el garbanzo puede funcionar como una alternativa terapéutica.

Como perspectiva, se podría analizar la concentración del ácido gálico, el ácido cafeico, la quercetina y la biocantina A en la variedad de garbanzo utilizada en esta tesis y probarlos directamente en ratones infectados para demostrar si de igual manera podrían ser utilizados como tratamiento en la infección por *L. mexicana*.

## IX. REFERENCIAS

- Aguilera, Y., Dueñas, M., Estrella, I., Hernández, T., Benitez, V., Esteban, R. M., & Martín-Cabrejas, M. A. (2011). Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Chickpeas (*Cicer arietinum* L.) as Affected by a Dehydration Process. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66(2), 187–195. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0230-8>
- Akilov, O. E., Khachemoune, A., & Hasan, T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, 46(2), 132–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03154.x>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., ... de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

- Alves, M. M. de M., Brito, L. M., Souza, A. C., Queiroz, B. C. S. H., de Carvalho, T. P., Batista, J. F., ... Carvalho, F. A. de A. (2017). Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(9), 893–903. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>
- Andrade-Narváez, F. J., Vargas-González, A., Canto-Lara, S. B., & Damián-Centeno, A. G. (2001). Clinical Picture of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Leishmania) Mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(2), 163–167. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000200005>
- Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2015). *Leishmania* survival in the macrophage: Where the ends justify the means. *Current Opinion in Microbiology*, 26, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>
- Awasthi, A., Mathur, R. K., & Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *The Indian Journal of Medical Research*, 119(6), 238–258. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243162>
- Badirzadeh, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Abdossamadi, Z., Heidari-Kharaji, M., Gholami, E., ... Rafati, S. (2017). Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005774>
- Bar-El Dadon, S., Abbo, S., & Reifen, R. (2017). Leveraging traditional crops for better nutrition and health - The case of chickpea. *Trends in Food Science and Technology*, 64, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.002>
- Bekhit, A. A., El-Agroudy, E., Helmy, A., Ibrahim, T. M., Shavandi, A., & Bekhit, A. E. D. A. (2018). *Leishmania* treatment and prevention: Natural and synthesized drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 160, 229–244. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.10.022>

- Belkhelda-Slimani, R., & Djerdjouri, B. (2018). Caffeic acid combined with autoclaved *Leishmania major* boosted the protection of infected BALB/c mice by enhancing IgG2 production, IFN- $\gamma$ /TGF- $\beta$  and iNO synthase/arginase1 ratios, and the death of infected phagocytes. *Inflammopharmacology*, 26(2), 621–634. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0399-z>
- Belkhelda-Slimani, R., & Djerdjouri, B. (2017). Caffeic acid and quercetin exert caspases-independent apoptotic effects on *Leishmania major* promastigotes, and reactivate the death of infected phagocytes derived from BALB/c mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(4), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.022>
- Bhattacharyya, S., Ghosh, S., Jhonson, P. L., Bhattacharya, S. K., & Majumdar, S. (2001). Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: Defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. *Infection and Immunity*, 69(3), 1499–1507. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1499-1507.2001>
- Bortoleti, B. T. da S., Tomiotto-Pellissier, F., Gonçalves, M. D., Miranda-Sapla, M. M., Assolini, J. P., Carlotto, A. C., ... Pavanelli, W. R. (2019). Caffeic acid has antipromastigote activity by apoptosis-like process; and anti-amastigote by TNF- $\alpha$ /ROS/NO production and decreased of iron availability. *Phytomedicine*, 57(December 2018), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.12.035>
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P., & Mosser, D. M. (1995). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(6), 3102–3111. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673725>
- Brittingham, A., & Mosser, D. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology Today*, 12(11), 444–447. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10067-3](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10067-3)

- Cataneo, A. H. D., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M. M., Assolini, J. P., Panis, C., Kian, D., ... Pavanelli, W. R. (2019). Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 113(February), 108745. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108745>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., ... Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Corware, K., Yardley, V., Mack, C., Schuster, S., Al-Hassi, H., Herath, S., ... Kropf, P. (2014). Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages. *Nutrition and Metabolism*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-51>
- Da Silva Santos, C., & Brodskyn, C. I. (2014). The Role of CD4 and CD8T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Public Health*, 2(September), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00165>
- Da Silva, E. R., Maquiaveli, C. do C., & Magalhães, P. P. (2012). The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Experimental Parasitology*, 130(3), 183–188. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.01.015>
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22(6), 491–502. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>

- De Luca, P. M., & Macedo, A. B. B. (2016). Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. *Frontiers in Immunology*, 7(APR), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00151>
- de Medeiros, M. das G. F., da Silva, A. C., Citó, A. M. das G. L., Borges, A. R., de Lima, S. G., Lopes, J. A. D., & Figueiredo, R. C. B. Q. (2011). In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitology International*, 60(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.03.004>
- De Menezes, J. P., Saraiva, E. M., & Da Rocha-Azevedo, B. (2016). The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>
- Domínguez, M., & Toraño, A. (1999). Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(1), 25–35. <https://doi.org/10.1084/jem.189.1.25>
- Feijó, D., Tibúrcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C., & Tavares, N. (2016). Dendritic Cells and Leishmania Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3967436>
- Ferraz, R., Cunha, C. F., Gomes-Silva, A., Schubach, A. O., Pimentel, M. I. F., Lyra, M. R., ... Bertho, Á. L. (2015). Apoptosis and frequency of total and effector CD8+ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0799-x>
- Fonseca-Silva, F., Inacio, J. D. F., Canto-Cavalheiro, M. M., & Almeida-Amaral, E. E. (2011). Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in Leishmania

amazonensis. *PLoS ONE*, 6(2), e14666.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>

Glennie, N. D., Yeramilli, V. A., Beiting, D. P., Volk, S. W., Weaver, C. T., & Scott, P. (2015). Skin-resident memory CD4+ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(9), 1405–1414. <https://doi.org/10.1084/jem.20142101>

Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. (2012). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 293–307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>

Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. R. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 155–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3>

Gupta, N., Bisen, P. S., & Bhagyawant, S. S. (2018). Chickpea Lectin Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Induces Apoptosis Through Cell Cycle Arrest. *Protein & Peptide Letters*, 25(5), 492–499. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180406142900>

Gupta, R. K., Raghav, A., Sharma, A., Gupta, K., Neelabh, Mandal, P., ... Dwivedi, P. D. (2017). Glycation of clinically relevant chickpea allergen attenuates its allergic immune response in Balb/c mice. *Food Chemistry*, 235, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.056>

Gurung, P., & Kanneganti, T. D. (2015). Innate immunity against *Leishmania* infections. *Cellular Microbiology*, 17(9), 1286–1294. <https://doi.org/10.1111/cmi.12484>

Handman, E., & Bullen, D. V. R. (2002). Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*, 18(8), 332–334. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377273>

- Heinzel, F. P., Sadick, M. D., Holaday, B. J., Coffman, R. L., & Locksley, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of Experimental Medicine*, *169*(1), 59–72. <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.59>
- Hirahara, K., & Nakayama, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm. *International Immunology*, *28*(4), 163–171. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw006>
- Hurdayal, R., & Brombacher, F. (2017). Interleukin-4 receptor alpha: From innate to adaptive immunity in murine models of cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, *8*(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01354>
- Iniesta, V., Gómez-Nieto, L. C., & Corraliza, I. (2001). The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, *193*(6), 777–784. <https://doi.org/10.1084/jem.193.6.777>
- Islamuddin, M., Chouhan, G., Farooque, A., Dwarakanath, B. S., Sahal, D., & Afrin, F. (2015). Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(1), e3321. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003321>
- Janson, M. (2006). Orthomolecular medicine: the therapeutic use of dietary supplements for anti-aging. *Clinical Interventions in Aging*, *1*(3), 261–265. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18046879>
- Jayaprakash, B., & Das, A. (2018). Extraction and Characterization of Chick PEA (*Cicer arietinum*) Extract with Immunostimulant Activity in BALB/C MICE. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *19*(3), 803–810. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.803>

- Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L. L., & Chibbar, R. N. (2012). Nutritional quality and health benefits of chickpea ( *Cicer arietinum* L.): a review . *British Journal of Nutrition*, 108(S1), S11–S26. <https://doi.org/10.1017/s0007114512000797>
- Kaech, S. M., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, 2(4), 251–262. <https://doi.org/10.1038/nri778>
- Kedzierski, L. (2010). Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 177–185. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62881>
- Kheirandish, F., Delfan, B., Mahmoudvand, H., Moradi, N., Ezatpour, B., Ebrahimzadeh, F., & Rashidipour, M. (2016). Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82, 208–215. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.04.040>
- Kima, P. E., Constant, S. L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K. S., Haberman, A. M., ... McMahon-Pratt, D. (2000). Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(6), 1063–1068. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.1063>
- Kour, K., Sangwan, P. L. S., Khan, I., Koul, S., Sharma, S. N., Kitchlu, S., ... Bani, S. (2011). Alcoholic extract of *Cicer microphyllum* augments Th1 immune response in normal and chronically stressed Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(2), 267–277. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2010.01195.x>
- Liu, D., & Uzonna, J. E. (2012). The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune

response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(June), 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00083>

Losada-Barragán, M., Umaña-Pérez, A., Cuervo-Escobar, S., Berbert, L. R., Porrozzi, R., Morgado, F. N., ... Cuervo, P. (2017). Protein malnutrition promotes dysregulation of molecules involved in T cell migration in the thymus of mice infected with *Leishmania infantum*. *Scientific Reports*, 7, 45991.  
<https://doi.org/10.1038/srep45991>

Lubbers, R., van Essen, M. F., van Kooten, C., & Trouw, L. A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology*, 188(2), 183–194. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>

Martínez-López, M., Soto, M., Iborra, S., & Sancho, D. (2018). *Leishmania* Hijacks myeloid cells for immune escape. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00883>

Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*, 110(6), 247–260. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>

Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M. B., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(5), 747–754. <https://doi.org/10.1084/jem.20041470>

Millar, T. M., Kanczler, J. M., Bodamyali, T., Blake, D. R., & Stevens, C. R. (2002). Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Report*, 7(2), 65–70.  
<https://doi.org/10.1179/135100002125000280>

Miranda Gómez, O., & González Barea, I. (2007). Leishmaniasis cutánea. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 36(4), 0–0. Retrieved from

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572007000400011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572007000400011)

Mittra, B., Saha, A., Chowdhury, A. R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., ... Majumder, H. K. (2000). Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(6), 527–541. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972088><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1949962>

Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>

Monk, J. M., Lepp, D., Wu, W., Graf, D., McGillis, L. H., Hussain, A., ... Power, K. A. (2017). Chickpea-supplemented diet alters the gut microbiome and enhances gut barrier integrity in C57Bl/6 male mice. *Journal of Functional Foods*, 38, 663–674. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.002>

Mosser, D. M., & Brittingham, A. (1997). Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571687>

Mosser, D. M., & Edelson, P. J. (1984). Activation of the alternative complement pathway by Leishmania promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 132(3), 1501–1505. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6363545>

Mosser, D. M., Burke, S. K., Coutavas, E. E., Wedgwood, J. F., & Edelson, P. J. (1986). Leishmania species: Mechanisms of complement activation by five

- strains of promastigotes. *Experimental Parasitology*, 62(3), 394–404. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(86\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0014-4894(86)90048-2)
- Myint, H., Kishi, H., Koike, S., & Kobayashi, Y. (2017). Effect of chickpea husk dietary supplementation on blood and cecal parameters in rats. *Animal Science Journal*, 88(2), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.jmgs.2017.02.001>
- Novais, F. O., & Scott, P. (2015). CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Seminars in Immunopathology*, 37(3), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0475-7>
- Ogungbe, I. V., Erwin, W. R., & Setzer, W. N. (2014). Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 48, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.jmgs.2013.12.010>
- OPS/OMS. (2013). *Informe Leishmaniasis N°1; Leishmaniasis - Informe epidemiológico de las Américas*. 1–4.
- Oryan, A., & Akbari, M. (2016). Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(10), 925–932. <https://doi.org/10.1016/J.APJTM.2016.06.021>
- Overgaard, N. H., Jung, J.-W., Steptoe, R. J., & Wells, J. W. (2015). CD4 + /CD8 + double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of Leukocyte Biology*, 97(1), 31–38. <https://doi.org/10.1189/jlb.1RU0814-382>
- Passero, L. F. D., Bonfim-Melo, A., Corbett, C. E. P., Laurenti, M. D., Toyama, M. H., de Toyama, D. O., ... Lago, J. H. G. (2011). Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitology Research*, 108(3), 529–536. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2091-8>

- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., ... Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(12), e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>
- Radtke, O. A., Kiderlen, A. F., Kayser, O., & Kolodziej, H. (2004). Gene Expression Profiles of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cytokines in *Leishmania major* -Infected Macrophage-Like RAW 264.7 Cells Treated with Gallic Acid. *Planta Medica*, *70*(10), 924–928. <https://doi.org/10.1055/s-2004-832618>
- Radtke, O. A., Foo, L. Y., Lu, Y., Kiderlen, A. F., & Kolodziej, H. (n.d.). Evaluation of sage phenolics for their antileishmanial activity and modulatory effects on interleukin-6, interferon and tumour necrosis factor-alpha-release in RAW 264.7 cells. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *58*(5–6), 395–400. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12872935>
- Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., Showalter, M., Hickerson, S., & Beverley, S. M. (2009). *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *165*(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.01.001>
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, *7*(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)
- Ribeiro, T. G., Nascimento, A. M., Henriques, B. O., Chávez-Fumagalli, M. A., Franca, J. R., Duarte, M. C., ... Castilho, R. O. (2015). Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, *165*, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.047>

- Sarma, J. V., & Ward, P. A. (2011). The complement system. *Cell and Tissue Research*, 343(1), 227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>
- Sartorelli, P., Carvalho, C. S., Reimão, J. Q., Ferreira, M. J. P., & Tempone, A. G. (2009). Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). *Parasitology Research*, 104(2), 311–314. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1193-z>
- Sarwar, H. S., Akhtar, S., Sohail, M. F., Naveed, Z., Rafay, M., Nadhman, A., ... Shahnaz, G. (2017). Redox biology of *Leishmania* and macrophage targeted nanoparticles for therapy. *Nanomedicine*, 12(14), 1713–1725. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0049>
- Sen, G., Mukhopadhyay, S., Ray, M., & Biswas, T. (2008). Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1066–1075. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn053>
- Sharquie, K. E., Najim, R. A., Farjou, I. B., & Al-Timimi, D. J. (2001). Oral zinc sulphate in the treatment of acute cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 26(1), 21–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11260171>
- Shinohara, S., Gu, Y., Yang, Y., Furuta, Y., Tanaka, M., Yue, X., ... Kimura, H. (2016). Ethanol extracts of chickpeas alter the total lipid content and expression levels of genes related to fatty acid metabolism in mouse 3T3-L1 adipocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(2), 574–584. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2654>
- Silva-Barrios, S., Charpentier, T., & Stäger, S. (2018). The Deadly Dance of B Cells with Trypanosomatids. *Trends in Parasitology*, 34(2), 155–171. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.001>

- Sinha, S., Fernández, G., Kapila, R., Lambert, W. C., & Schwartz, R. A. (2008). Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *International Journal of Dermatology*, 47(12), 1263–1270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03804.x>
- Soong, L. (2008). Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4355–4360. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354154>
- Sreerama, Y. N., Sashikala, V. B., & Pratapa, V. M. (2010). Variability in the Distribution of Phenolic Compounds in Milled Fractions of Chickpea and Horse Gram: Evaluation of Their Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8322–8330. <https://doi.org/10.1021/jf101335r>
- Stäger, S., & Rafati, S. (2012). CD8(+) T cells in leishmania infections: friends or foes? *Frontiers in Immunology*, 3, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00005>
- Taborda, N. A., Hernández, J. C., Montoya, C. J., & Rugeles, M. T. (2014). Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología*, 33(1), 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2013.11.002>
- Torres-Fuentes, C., Contreras, M. del M., Recio, I., Alaiz, M., & Vioque, J. (2015). Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 180, 194–202. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.046>
- Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Tripathi, P., Singh, V., & Naik, S. (2007). Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51(2), 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x>

- Varol, C., Mildner, A., & Jung, S. (2015). Macrophages: Development and Tissue Specialization. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 643–675. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112220>
- Vera-Izaguirre, D. S., Vega-Memije, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Arenas, R. (2006). Leishmaniasis. Revisión. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 4(4), 252–260.
- Verma, A. K., Kumar, S., Tripathi, A., Chaudhari, B. P., Das, M., & Dwivedi, P. D. (2012). Chickpea (*Cicer arietinum*) proteins induce allergic responses in nasobronchial allergic patients and BALB/c mice. *Toxicology Letters*, 210(1), 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.01.011>
- Von Stebut, E., & Udey, M. C. (2004). Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. *Microbes and Infection*, 6(12), 1102–1109. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.024>
- Wanasen, N., Xin, L., & Soong, L. (2008). Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology*, 38(3–4), 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.08.010>
- WHO | Visceral leishmaniasis. (2016). WHO. Retrieved from [https://www.who.int/leishmaniasis/visceral\\_leishmaniasis/en/](https://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/)
- Wood, J. A. & Grusak, M. A. (2009). Nutritional Value of Chickpea. In F. Kantar, F. Y. Hafeez, B. G. Shivakumar, S. P. Sundaram, N. A. Tejera, A. Aslam, ... P. Raja (Eds.), *Chickpea breeding and management* (pp. 179–192). <https://doi.org/10.1079/9781845932138.008>
- Woodland, D. L., & Dutton, R. W. (2003). Heterogeneity of CD4+ and CD8+ T cells. *Current Opinion in Immunology*, 15(3), 336–342. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00037-2)