



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**Análisis de la activación y maduración de las células
dendríticas ante la coincubación con *Leishmania
mexicana* o con LPG: Estudio comparativo entre la
cepa BALB/c y C57BL/6**

Que presenta:

Mirza Luna Reza Méndez

Que para obtener el título de:

Bióloga

Directora de Tesis

Ingeborg Becker Fauser



2022

Ciudad Universitaria, CD.MX.



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:

Mirza Luna

Reza

Méndez

5544903469

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

314187338

2. Datos del Asesor

Doctor

Jaime

Zamora

Chimal

3. Datos del Presidente

Doctora

Ana María

Fernández

Presas

4. Datos del Vocal

Doctora

Bertha

Josefina

Espinoza

Gutiérrez

5. Datos del Secretario

Doctora

Ingeborg

Becker

Fauser

6. Datos del Sinodal 1

Doctora

Claudia

Patricia

Pedraza

Zamora

7. Datos del Sinodal 2

Doctor

Jaime

Zamora

Chimal

DEDICATORIA

- Este trabajo está dedicado a mis padres que siempre se interesaron en mi carrera, me apoyaron, me animaron y, sobre todo, confiaron en mí. Por todo el esfuerzo dedicado para que yo pudiera crecer personal y académicamente, logrando mis objetivos. Los quiero mucho.
- A mi hermano que siempre ha creído en mí y en que puedo lograr todo lo que me proponga. Por todos los días que estuviste a mi lado.
- A mis abuelitos por enseñarme y cuidarme a lo largo de mi vida, permitiéndome aprender algo nuevo todos los días.
- A mi novio Emiliano, por ayudarme a ser mejor estudiante y mejor persona, por tu tiempo al escucharme practicar todos mis proyectos, por tu paciencia y por tu amor.

Agradecimientos académicos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, y en especial a los profesores de Facultad de Ciencias, que tuvieron interés en mí, creyendo en todos mis proyectos, siendo parte de mi desarrollo académico.

Al proyecto CONACyT: Ciencias de frontera 6682 y al Programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, DGAPA-UNAM (PAPIIT IG201221) por el financiamiento de este proyecto.

A mi tutora, la Dra. Ingeborg Becker Fauser por estar al pendiente continuamente de mi aprendizaje, así como su interés y apoyo durante todos mis requisitos académicos, por ser parte del sínodo y enriquecer el trabajo. Asimismo, le agradezco por siempre animarme en mis decisiones.

A mi asesor, el Dr. Jaime Zamora Chimal, por su dedicación, confianza, paciencia y apoyo durante la mitad de mi carrera, por el tiempo que invirtió en mi aprendizaje, sobre todo durante la realización de este proyecto. Gracias por su fe y paciencia hacia mí. Por ayudarme a que mi voz sea escuchada.

A la Dra. Mariana Diupotex Murillo que siempre me enseñó más allá de lo que le pedí, por su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Inmunoparasitología, así como su sabiduría, la cual compartió ayudándome a mejorar siempre.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, por su apoyo, su confianza y sabiduría brindada durante mi desarrollo en el laboratorio.

A la M. en C., Adriana Ruiz Remigio que realizó las ELISAs para el análisis de la producción de citocinas.

A la M. en C., Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia que mantuvo el cultivo de parásitos promastigotes metacíclicos para la infección celular.

A todos los doctores, doctoras y académicos del Laboratorio de Inmunoparasitología porque cada uno me enseñó diferentes áreas en la ciencia, así como me ayudaron en mi crecimiento académico, por su cariño y paciencia.

A las y los integrantes del jurado, por su disposición y apoyo incondicional durante este proceso.

A mis compañer@s y amig@s del laboratorio de Inmunoparasitología, que con su inteligencia y consejos me enseñaron en todos mis proyectos, por su paciencia y compañía durante este proceso.

A todos los animales de experimentación utilizados en este proyecto.

Agradecimientos personales

A mis padres, Guadalupe y Antonio, que siempre han buscado lo mejor para sus hijos, por su dedicación e interés hacia mí y mis objetivos. Gracias por siempre apoyarme en mis momentos difíciles enseñándome que todo esfuerzo vale la pena. Gracias por darme la confianza de seguir a mi corazón y a mi mente.

A mi hermano Ali al que admiro, por tu inteligencia, paciencia, cariño y apoyo incondicional, porque sin tu fe en mí, no estaría aquí. Agradezco el tenerte en mi vida.

A mis abuelos paternos Juanita (†) y Pedro (†) que, a través de su familia, me dejaron sabias enseñanzas permitiéndome ser más fuerte.

A mis abuelos maternos Guadalupe y Abel (†) porque fueron parte esencial en la decisión de estudiar esta carrera, por su apoyo durante mi trayectoria escolar desde preescolar hasta el nivel universitario.

A mis amigos, Yunhuen, Noemi, Jerónimo y César, porque sin ellos la carrera no hubiera sido la misma, gracias por estar en mis peores y mis mejores momentos, siempre estarán en mi corazón.

Índice General

Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
1.1 Ciclo de Vida.....	10
1.2 Lipofosfoglicano de <i>Leishmania</i>	13
1.3 Sistema de Complemento.....	17
1.4 Maduración y activación de células dendríticas.....	18
1.5 Moléculas coestimuladoras CD40 y CD86 y la expresión de IL-10 e IL-12.....	20
1.6 Las cepas C57BL/6 y BALB/c como modelo de leishmaniasis.....	22
2. Justificación.....	25
3. Hipótesis.....	25
4. Objetivo.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. Materiales y Métodos.....	26
6. Resultados.....	32
7. Discusión.....	42
8. Conclusión.....	48
9. Perspectivas.....	49
10. Referencias.....	50
11. Pies de Figura.....	67

Resumen

En *Leishmania*, el lipofosfoglicano (LPG) es el glicolípido más abundante en la superficie del estadio de promastigote. Cuando LPG entra en contacto con las células dendríticas (DC) es capaz de inducir su maduración y activación, aumentando la expresión de moléculas presentadoras de antígeno como MHC-II y de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86. Cuando las DC son activadas producen citocinas como IL-12 e IL-10 que inducen la diferenciación de los linfocitos T ayudadores a un fenotipo inflamatorio o regulatorio, promoviendo la curación o susceptibilidad, respectivamente. La cepa de ratones C57BL/6 se caracteriza por establecer una respuesta inflamatoria en la infección por *Leishmania* que ayuda al control de la enfermedad, mientras que la cepa BALB/c presenta una respuesta antiinflamatoria que promueve la susceptibilidad. El grado de maduración y activación es importante para determinar el tipo de activación de la respuesta inmune celular. En este trabajo se analizó la activación y maduración de las DC provenientes de las cepas BALB/c y C57BL/6 incubadas con LPG soluble o *L. mexicana*, se cuantificó la expresión de CD40, CD86 y MHC-II, y la producción de IL-10 e IL-12 por citometría de flujo y ELISA, respectivamente. Se demostró que las moléculas de maduración y las citocinas aumentaron de forma diferencial ante el estímulo con LPG soluble, siendo mayor en ratones C57BL/6 con respecto a los BALB/c. La infección por el parásito no indujo maduración ni producción de IL-12 en las DC, solamente una producción moderada de IL-10. Se concluyó que el LPG en forma soluble tiene mayor capacidad de activar y madurar a las DC, mientras que la infección por el parásito no induce su maduración, solo su activación mediante la

producción de IL-10, posiblemente, induciendo un microambiente de tolerancia contra el parásito.

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad causada por la infección generada por parásitos del género *Leishmania*, los cuales son inoculados a través de la picadura de moscas de la arena del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo o del género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Van Zandbergen et al., 2006). Se sabe que más de 20 especies de *Leishmania* causan diversas formas de leishmaniasis, incluidas las formas cutánea, mucocutánea y visceral. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leishmaniasis es una de las siete enfermedades tropicales más importantes, y representa un grave problema de salud mundial con un amplio espectro de manifestaciones clínicas. La leishmaniasis cutánea (CL) es la forma más común de la enfermedad en todo el mundo (Torres-Guerrero et al., 2017; WHO., 2020).

La LC es causada por varias especies de *Leishmania* como *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. amazonensis* (WHO., 2021). La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como kala-azar, es causada por *L. donovani* y *L. infantum* (Thakur, 2018; Ready, 2014;). La leishmaniasis mucocutánea (LMC) es causada por *L. panamensis*, *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, y se asocia con un daño parcial o completo de la mucosa oral, nasal y traqueal con formación de úlceras que provocan lesiones en la piel, generando una discapacidad

grave y la formación de cicatrices de por vida (WHO., 2021; Bahrami, Harandi & Rafati, 2018).

1.1 Ciclo de vida

Leishmania es un eucariote con cuyo ciclo de vida se diferencia en dos etapas, que se manifiestan en un hospedero mamífero y un insecto vector. Estos protozoos tienen un ciclo de vida dimórfico, experimentando cambios morfológicos, permitiéndole asegurar la adaptación y supervivencia en cualquiera de los hospederos (Dostálová & Volf, 2012).

Dentro del intestino de los flebótomos, *Leishmania* se encuentra en su estadio de promastigote extracelular, flagelado y móvil. El desarrollo en el vector se inicia cuando una mosca de la arena hembra ingiere sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes. El cambio en las condiciones fisicoquímicas en el interior del intestino del flebótomo como la disminución de la temperatura y el aumento del pH, desencadena la diferenciación morfológica y el desarrollo de los promastigotes (Rogers, Chance & Bates, 2002). Las principales formas de promastigotes dentro del intestino de los flebótomos son procíclicos, nectomonas, leptomonas y metacíclicos, los cuales tienen diferente composición de carbohidratos en el glicocálix del parásito, que les confiere diferente grado de virulencia, y hace infectivos a los promastigotes metacíclicos (Gossage, Rogers & Bates, 2003; Bates, 2018).

El parásito se adhiere firmemente a las microvellosidades del epitelio intestinal de la mosca, lo que le permite adherirse al intestino del vector permitiendo que el

parásito no sea expulsado cuando la mosca defeca (Dostálová & Volf, 2012). Cuando un flebótomo infectado ingiere una segunda comida de sangre, los promastigotes en su forma de leptomonas se diferencian rápidamente en promastigotes metacíclicos, este proceso se llama metacicloogénesis, y se define como la transformación de promastigotes poco infecciosos a altamente infecciosos, facilitando la transmisión de estos a un huésped mamífero (Serafim et al., 2018; da Silva & Sacks, 1987). Para continuar con el ciclo de la infección, la mosca de la arena se alimenta de sangre de un nuevo hospedero creando un pequeño charco de sangre en donde regurgita a los parásitos promastigotes, inoculándolos en el hospedero mamífero (Wilson et al., 1987; Sacks & Kamhawi, 2001).

Posterior a la inoculación en el hospedero mamífero, el sistema de complemento actúa como parte de las primeras barreras ante la infección, encargándose de eliminar de 80-90% de los parásitos induciendo su lisis (Laurenti et al., 2004). El sistema de complemento actúa generando poros en la membrana del parásito para poder degradarlo, sin embargo, se ha observado que algunos parásitos tanto amastigotes como promastigotes metacíclicos son capaces de inactivar a C3b convirtiéndola en su forma inactiva iC3b, una opsonina que facilita la internalización del parásito a los fagocitos (Jacobs et al., 2005). Este mecanismo de inactivación se atribuye a la acción de la proteasa GP63, una de las principales proteínas que se encuentran en la membrana plasmática de *Leishmania*, reduciendo la activación del estallido respiratorio (Brittingham y Mosser, 1996).

Los parásitos que no fueron degradados por el sistema de complemento son internalizados por fagocitos como las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos,

y degradados en el fagolisosoma (McConville et al., 2007; Inaba & Inaba, 2005). Sin embargo, los parásitos que sobreviven se diferencian y replican dentro vacuolas parasitóforas como amastigotes que son: no móviles, redondos y obligados a habitar intracelularmente. Finalmente, el exceso de parásitos en el interior de la célula lisa mecánicamente a la célula infectada conduciendo la muerte celular, y liberando amastigotes para infectar a células cercanas (Mosser & Brittingham, 1997). La ingestión de cuerpos apoptóticos que contienen parásitos viables por fagocitos vecinos permite una propagación silenciosa de la infección (Gluezn et al., 2015). Finalmente, cuando una nueva mosca de la arena se alimenta de sangre de un huésped infectado adquiere amastigotes que posteriormente se transforman en promastigotes y se replicarán dentro del flebótomo completando así el ciclo de vida (Sacks & Kamhawi, 2001; Mosser & Brittingham, 1997).

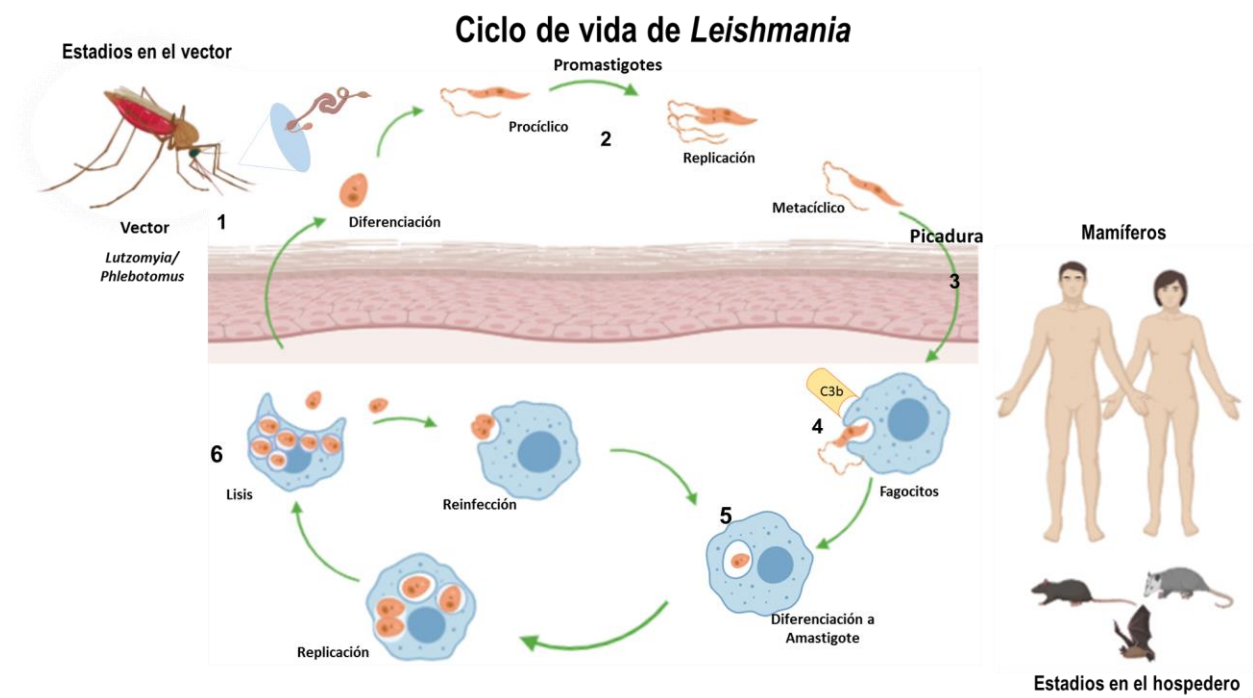


Fig 1. Ciclo de vida de *Leishmania spp.* El parásito tiene un ciclo de vida dimórfico en donde presenta diversos estadios. 1. El ciclo de vida comienza cuando el vector se alimenta de sangre infectada con amastigotes. 2. En el interior del intestino de la mosca, los amastigotes se diferencian a promastigotes procíclicos, nectomonas, leptomonas y metacíclicos siendo la fase metacíclica la más infectiva y altamente transmisible. 3. El vector inocular los parásitos en la dermis del mamífero hospedero liberando a los promastigotes. 4. Los parásitos son degradados por el sistema de complemento, eliminando hasta un 90%, mientras que los que no fueron degradados son ingeridos por fagocitos. 5. Dentro de los fagocitos los promastigotes se diferenciarán a amastigotes. 6. Posteriormente, se replican dentro de las células hasta lograr un estrés mecánico lo cual deriva en la lisis de la célula hospedera y reinfección de nuevos fagocitos. El ciclo de vida continúa cuando la mosca de la arena se alimenta de la sangre de un hospedero infectado y posteriormente infecta a un hospedero sano. Creado en BioRender y modificado de De Pablos, Ferreira & Walrad, 2016.

1.2 Lipofosfoglicano de *Leishmania*

Para que *Leishmania* se propague, debe evitar su degradación dentro del intestino del flebótomo, evitando que las enzimas digestivas de la mosca de la arena lo degraden, así como el sistema de complemento presente en el suero del hospedero mamífero, o bien en el fagolisosoma de las células fagocíticas (Turco & Descoteaux, 1992). Se sabe que los glicoconjugados de la membrana del parásito denominados colectivamente glicocálix, desempeñan diferentes funciones en la supervivencia,

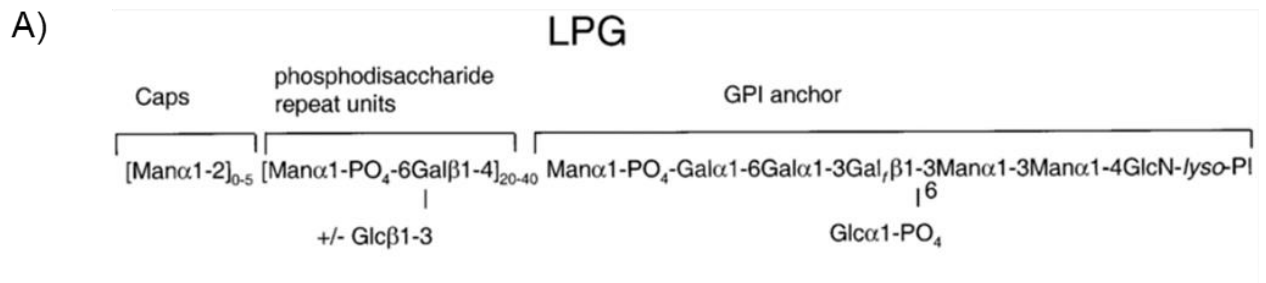
infectividad, virulencia y establecimiento de la enfermedad de *Leishmania spp.* (Mule et al., 2020).

La membrana externa de *Leishmania spp.*, está cubierta por una densa capa de glicoconjugados. Uno de los principales y más abundante es el lipofosfoglicano (LPG), una macromolécula altamente compleja compuesta por cuatro dominios distintos: un motivo de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), un núcleo de glucano, una cadena de fosfoglicano lineal (PG) y una tapa de oligosacárido de terminación (Turco & Descoteaux, 1992). La expresión de LPG sufre cambios en su composición de carbohidratos que son específicos de la etapa de maduración del parásito cuando pasa de procíclico a su estadio infeccioso metacíclico (Sacks et al., 2000). El LPG juega un papel importante en la interacción huésped-parásito como factor de virulencia, el cual es dependiente de la especie de *Leishmania*. Se ha observado que el LPG puede participar en la resistencia al complemento, la adhesión y captación de macrófagos, y en general a su supervivencia, demostrándose que ante una deficiencia de LPG, se disminuye la virulencia del parásito (Späth et al., 2000).

El glicocáliz de los promastigotes contiene gran cantidad de LPG, constituye una de las principales interacciones huésped-parásito que tienen lugar en la dermis del hospedero mamífero inmediatamente después de la inoculación por el vector. En consecuencia, el LPG es el primer objetivo para la detección inmunológica y al mismo tiempo una barrera que protege al parásito del ataque del sistema inmunológico del huésped (Forestier, Gao & Boons, 2015). El LPG favorece la supervivencia del parásito intracelular al interferir con las respuestas

proinflamatorias de las células hospederas mediante la unión del receptor tipo Toll 2 (TLR-2) (Becker et al., 2003; Kavvoosi, Ardestani & Kariminia, 2009).

Los receptores tipo Toll (TLR) proporcionan un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa. Las interacciones LPG-TLR modulan la producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico e inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias (Chandra & Naik, 2008). Por lo que se ha demostrado que la integridad del ancla lipídica, así como la longitud del dominio PG del LPG, están implicadas en la magnitud de la activación de la célula hospedera mediada por LPG a través de TLR2 (Forestier, Gao & Boons, 2015). El reconocimiento temprano de patógenos por células capaces de sintetizar IL-12 y TNF- α es crucial para el control adecuado de patógenos intracelulares, debido a que IL-12 induce la diferenciación de los linfocitos tipo Th1 productores de IFN- γ que activan la iNOS en los macrófagos infectados produciendo óxido nítrico para su eliminación (Beverley & Zamboni., 2012).



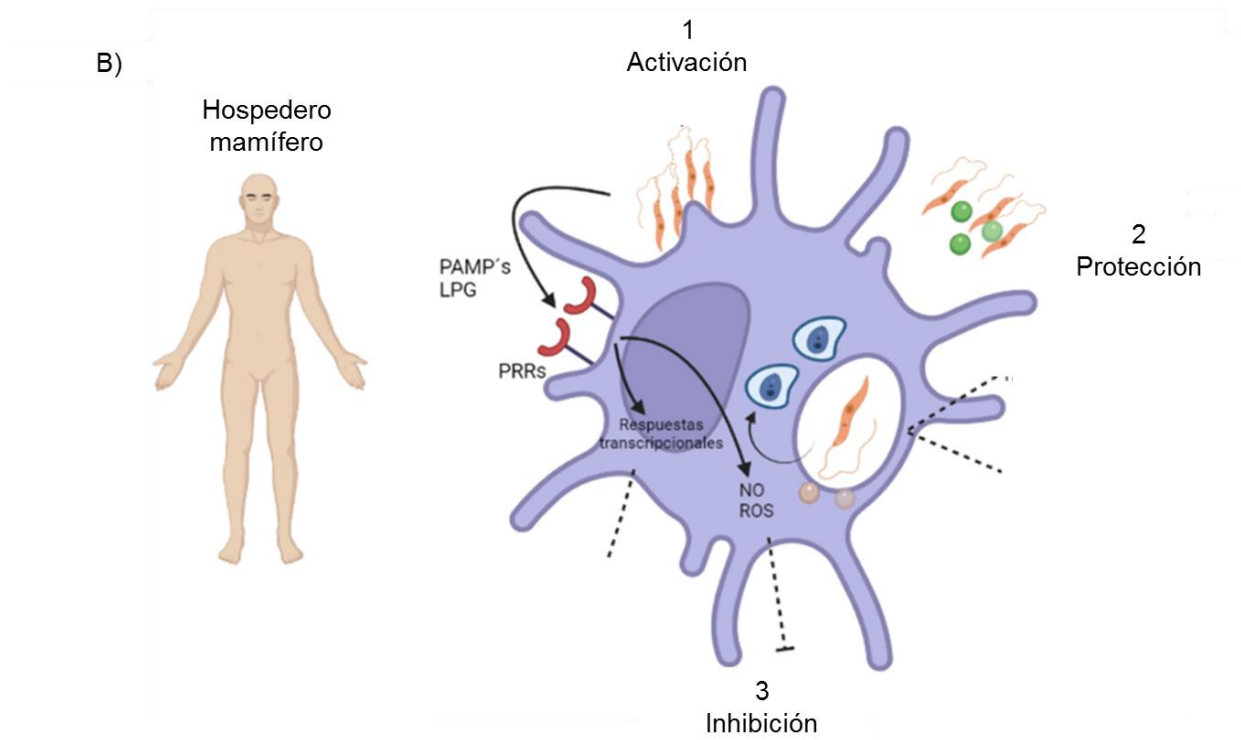


Fig 2. Funciones efectoras del LPG en DC. A) LPG se conforma por una macromolécula compuesta por cuatro dominios distintos: un motivo de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), un núcleo de glucano, una cadena de fosfoglicano lineal (PG) y una tapa de oligosacárido de terminación. B) El LPG puede actuar en la activación eficaz de las funciones de los fagocitos del hospedero, entre las cuales destacan: (1) La activación celular mediante el reconocimiento de PAMPs; (2) Protección de promastigotes ante la lisis celular (3) Inhibición de vías de señalización, así como la alteración de la síntesis de especies de nitrógeno y citocinas relacionadas con el control de la infección y la protección de ROS. Figuras tomadas de (Moss et al., 1999; Franco, Beverley & Zamboni., 2012) y modificadas en BioRender.

1.3 Sistema de complemento

El sistema del complemento tiene un papel importante en la reacción inflamatoria, la lisis y la fagocitosis de *Leishmania* (Elmahallawy, Alkhaldi & Saleh, 2021). Los promastigotes de *L. donovani* son capaces de activar la vía clásica del complemento, mientras que los amastigotes son capaces de activar la vía alternativa (Gabriel et al., 2019), a pesar de que la lisis por medio del complemento difiere en cada especie de *Leishmania* (Franke et al., 1985). Se ha observado que los parásitos de las cepas cutáneas son más susceptibles a la lisis del complemento que las cepas viscerales, lo que sugiere un papel importante de los factores del complemento en la limitación de la infección en la piel (Gabriel et al., 2019). *Leishmania* puede activar las vías del complemento clásico y alternativo simultáneamente, estas vías al ser activadas pueden llegar a degradar al 90% de los parásitos, siendo un mecanismo protector desde los primeros minutos de infección (Laurenti et al., 2004).

Se ha descrito que la resistencia parcial al complemento de *Leishmania* se asocia a la presencia de LPG y GP63, dos componentes abundantes en la membrana del parásito. Por un lado, LPG inhibe la unión de C5b-C9 a la superficie del parásito, mientras que GP63 inactiva C3b generando la opsonina C3bi además inhibe el estallido respiratorio (Puentes et al., 1990, Naderer, Vince & McConville, 2004).

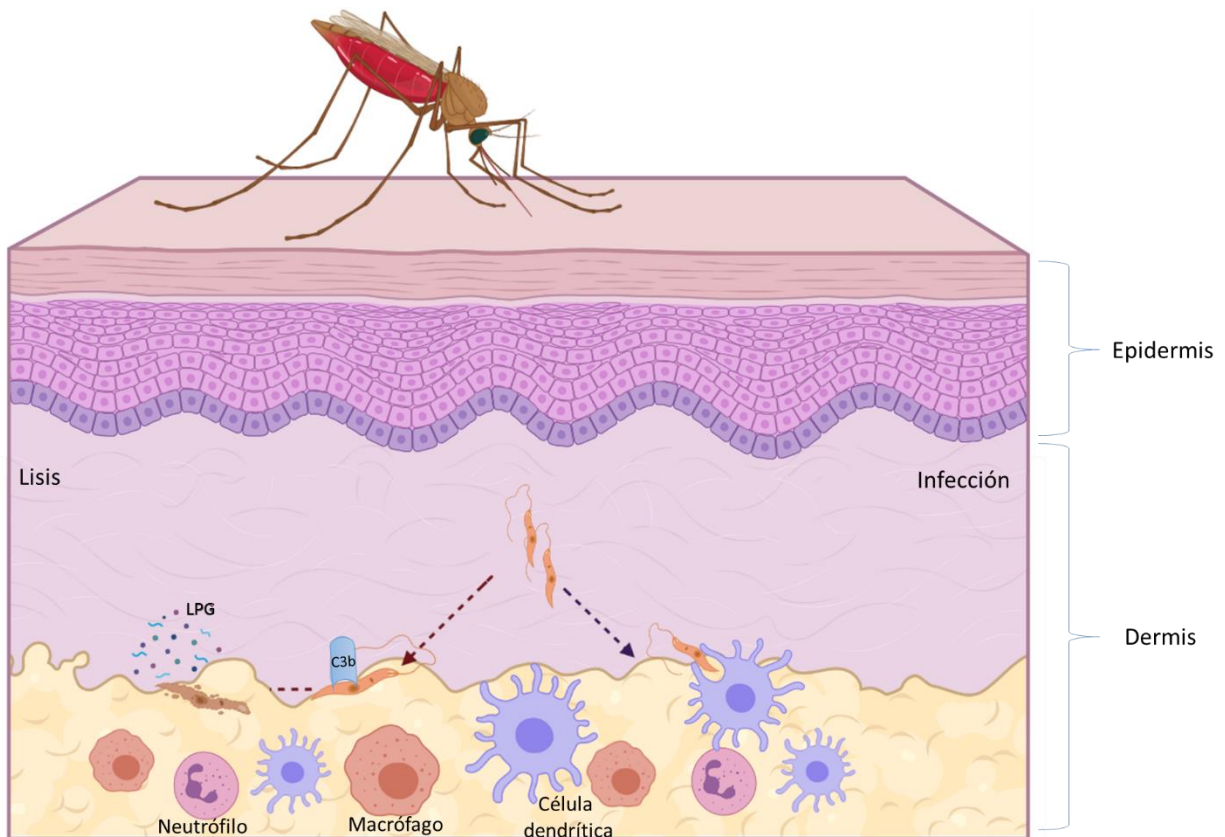


Fig 3. Lisis del parásito por el sistema de complemento

Una vez que los parásitos entran en la dermis del hospedero y activan el sistema de complemento, C3b se adhiere a su membrana y genera poros para poder degradarlo. A este proceso se le conoce como lisis por complemento. Los parásitos que sobreviven a la degradación por complemento son ingeridos por fagocitos, los cuales internan al parásito en fagolisosomas iniciando su degradación, esta fagocitosis también se conoce como infección celular. Figura creada en Biorender, basada en la información tomada de (Navin, Krug & Pearson, 1989)

1.4 Maduración y activación de células dendríticas

Las DC son derivadas de los monocitos que se encuentran en la sangre. Se encuentran en los tejidos y los órganos linfoides y son capaces de iniciar respuestas inmunitarias adaptativas, ya que presentan antígenos a los linfocitos T, aunque también participan en el mantenimiento de la tolerancia hacia los autoantígenos (Qian & Cao, 2018). Son reconocidos como actores clave de la respuesta inmune a la infección causada por patógenos virales, bacterianos y eucariotas (Kapsenberg, 2003). Una de sus principales funciones es procesar proteínas extracelulares e intracelulares y presentar antígenos a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para cebar células T vírgenes (Collin & Bigley, 2018).

Maduración

En un estado inmaduro, las DC se localizan en tejidos periféricos y expresan niveles bajos del MHC-II, así como de moléculas coestimuladoras (Hammer & Ma, 2013). Tras el reconocimiento temprano de PAMPS o DAMPs o la exposición a citocinas inflamatorias, las DC producen mediadores quimiotácticos que reclutan células linfoides innatas como las células NK (Durai & Murphy, 2016). Las DC también captan antígenos y migran a los ganglios linfáticos drenantes, donde promueven las respuestas de células T y células B (Itano, & Jenkins, 2003). La interacción de las DC con PAMPS y DAMPs puede inducir su maduración o su activación.

Durante la maduración, las DC pierden estructuras adhesivas, reorganizan el citoesqueleto y aumentan su motilidad (Mbongue et al., 2017). La maduración de las DC también conduce a una disminución de su actividad endocítica y capacidad fagocítica, aunque incrementa su expresión de MHC-II y de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86 y CD54, junto con una mayor producción

de citocinas y quimiocinas, que permiten la migración de DC a los órganos linfoides y el reclutamiento de otros tipos de células (Moll, 2003; Brandonisio, Spinelli & Pepe 2004). En los órganos linfoides, las DC maduras presentan antígenos a las células T vírgenes y modulan sus respuestas (Reis e Sousa, 2004; Belkaid et al., 2002).

En respuesta a las señales asociadas con la infección y la inflamación, las DC experimentan procesos moleculares que culminan en la adquisición de un estado funcional maduro, cuya característica principal es la capacidad de inducir la activación y proliferación de células T CD4⁺ a través de la presentación de antígenos (Haniffa & Collin, 2015). Después de la interacción con las DC portadoras de antígenos, las células T CD4⁺ vírgenes son capaces de diferenciarse en dos fenotipos funcionales principales: los perfiles T helper 1 (Th1) y T helper 2 (Th2), los cuales a su vez producen IL-12, IFN- γ e IL-4, IL-10, respectivamente (Pennock et al., 2013). Se ha observado que DC murinas infectadas con *Leishmania* en las cepas C57BL/6 como BALB/c alteran la producción de IL-12 e IL-10, que está directamente relacionado con la activación de células T (Bennett et al., 2001; Xin, Li, & Soong, 2008).

1.5 Moléculas coestimuladoras CD40, CD86 y la expresión de IL-10 e IL-12

Una vez que las DC presentan los péptidos de los antígenos a través del MHC-II, y sobreexpresan moléculas coestimuladoras como CD40 y CD86, las moléculas coestimuladoras interactúan con CD40L y CD28 en las células T, logrando su activación (Jia et al., 2012). Se sabe que la estimulación de CD40-CD40L en las DC induce un aumento de MHC-II, CD80 y CD86, lo que mejora la función de

presentación de antígenos de las DC (Thaiss et al., 2011). Además, se ha demostrado que la señalización de CD40 desempeña un papel fundamental en la inducción de Th1 y Th2 (Ara, Ahmed & Xiang, 2018). Por lo tanto, en la respuesta de los linfocitos T es muy importante que CD40 y CD86 se expresen eficazmente. Las células T CD4⁺ son capaces de diferenciarse en dos fenotipos funcionales principales, Th1 y Th2, los cuales a su vez inducen la expresión de IL-12, IFN- γ e IL-4, IL-10 respectivamente (Pennock et al., 2013).

La IL-12 transduce señales para producir y activar células Th1, conduce a la producción de IFN- γ , la proliferación y activación de las células asesinas naturales (NK) productoras de IFN- γ , e inhibe la apoptosis de células T (Banerjee et al., 2016). La respuesta del huésped a la infección está regulada por la producción controlada de citocinas. En ratones y humanos, la resistencia a la leishmaniasis se asocia con la respuesta de citocinas inflamatorias de linfocitos tipo Th1, por lo cual la producción de IL-12 es importante para la resolución de la infección por este parásito (Kalavi et al., 2021). Se ha observado que las especies de *Leishmania* inhiben la producción de IL-12 en las células del huésped infectadas, en beneficio del patógeno (Santos et al., 2021). La respuesta Th2 promueve la supervivencia del parásito ya que hay un aumento en la producción de IL-12 derivando en una susceptibilidad contra el parásito (Maspi, Abdoli & Ghaffarifar, 2016).

Los ratones BALB/c son susceptibles a la infección por *Leishmania*, y esta susceptibilidad está relacionada con disminución en la producción de IL-12, e incremento en la producción de IL-10 e IL-4, dirigiendo la respuesta inmune celular hacia un fenotipo Th2 y regulatorio, modulado por células T reguladoras productoras

de citocinas como IL-10 y TGF- β (Ronet et al., 2010). Las citocinas IL-10 y TGF- β son antiinflamatorias e inmunosupresoras que inhiben la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, células NK, así como eosinófilos y neutrófilos (Gabryšová et al., 2014, Saraiva, Vieira & O'Garra, 2020). Como resultado de la alta expresión de IL-10R, los monocitos y macrófagos son las principales células inhibidas por IL-10 (Moore et al., 2001). En estas células, IL-10 inhibe la transcripción de citocinas y quimiocinas, así como la presentación de antígenos y la maduración de estas células al disminuir la expresión de MHCII, moléculas coestimuladoras (CD86) y de adhesión (CD54) (Creery et al., 1996).

1.6 Las cepas C57BL/6 y BALB/c como modelos de leishmaniasis

Se ha descrito que el resultado de la infección originada por *Leishmania* depende de factores como la genética del hospedero, la especie de parásito infectante, la respuesta inmune del hospedero y las estrategias de evasión ejercidas por el parásito (Cecílio et al., 2014). En el modelo murino, las cepas BALB/c y C57BL/6 son las más utilizadas para caracterizar la susceptibilidad y la resistencia ante la infección por *Leishmania* (Fig. 4), respectivamente (Stamper et al., 2019).

Se ha descrito que en la infección con *L. major*, las cepas C57BL/6 y BALB/c caracterizan la dicotomía de la respuesta inmune Th1 y Th2 ante la infección por el parásito, respectivamente. Los ratones C57BL/6 genéticamente resistentes desarrollan una respuesta inmune celular Th1, caracterizada por la producción de IL-12 por células presentadoras de antígenos, y con alta producción de IFN- γ por parte de las células T CD4, lo cual conlleva a la activación de macrófagos para la eliminación de parásitos intracelulares mediante la producción de óxido nítrico (NO),

debido a la inducción de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) dentro del fagolisosomas (Sacks & Noben-Trauth, 2002). La resistencia también se debe a polimorfismos en genes relacionados con la respuesta inflamatoria como el gen *Ifngr* (receptor de interferón gamma), *nos2* (Óxido nítrico sintetasa) e *il12b* (IL-12), entre otros (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Esto demuestra que la inducción de una respuesta inflamatoria contra el parásito es crucial para la resistencia.

Por el contrario, la susceptibilidad de los ratones BALB/c se asocia con la producción temprana de citocinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10 en el sitio de inoculación y ganglios linfáticos, disminuyendo la expresión de IL-12. Estas citocinas favorecen la generación de macrófagos con un fenotipo alternativo, con la expresión de la enzima arginasa que produce poliaminas a partir de la L-arginina. Las poliaminas favorecen el crecimiento del parásito (Hurdoyal & Brombacher, 2017).

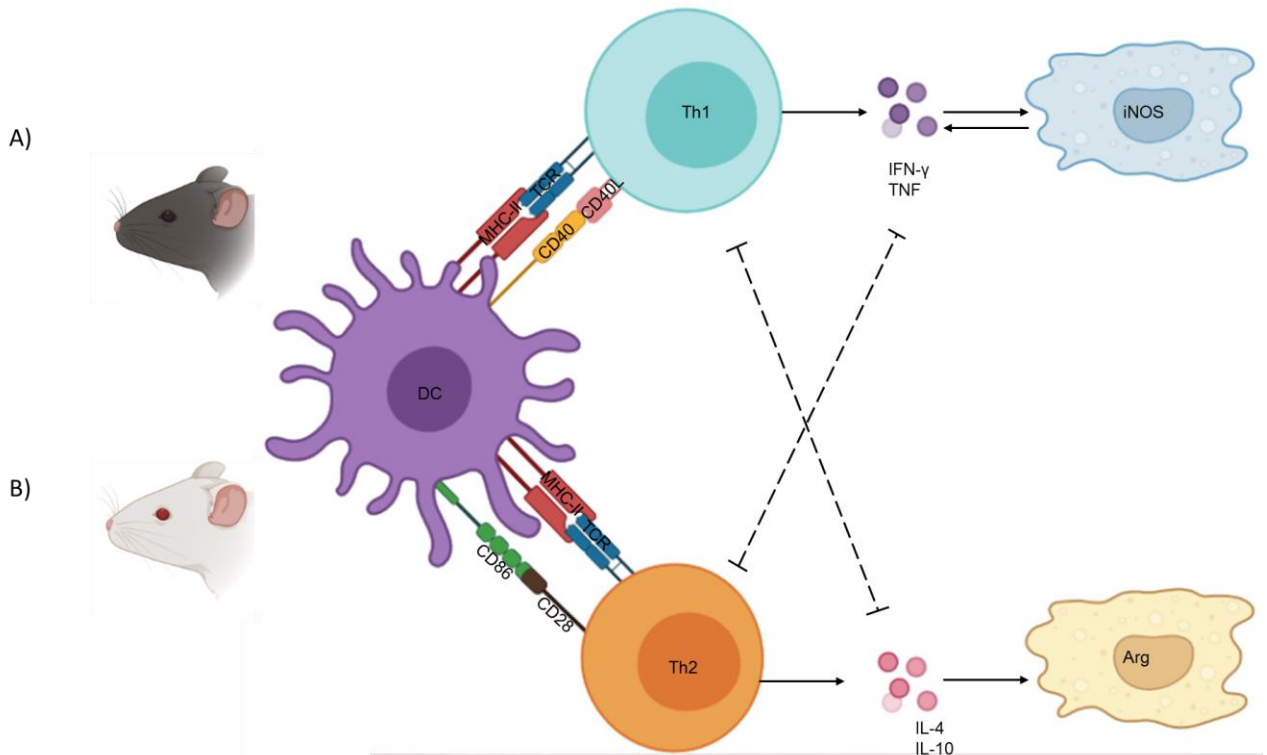


Fig 4. Respuesta inmune en ratones resistentes y susceptibles. (A) Después de la interacción con *Leishmania*, las DC activadas procesan y presentan el antígeno del parásito y producen IL-12, induciendo la diferenciación de linfocitos Th1, mediando la producción de IFN- γ y TNF- α , desencadenando la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). **(B)** Por el contrario, en ratones BALB/c hay una disminución en la producción de IL-12 y una expresión continua de IL-4 e IL-10, las cuales suprimen la respuesta Th1, e inducen arginasa que produce poliaminas, favoreciendo el crecimiento del parásito.

En el caso de la infección con *L. mexicana*, los ratones BALB/c producen niveles más altos de citocinas asociadas a Th2 y muestran una mayor susceptibilidad contra el parásito, mientras que en el caso de la cepa C57BL/6, la infección produce niveles más bajos de citocinas Th2. Sin embargo, la producción de IFN- γ en estos ratones

es baja, siendo aproximadamente 3 veces menor que la observada en infecciones por *L. major*. Esto se asocia a una resistencia parcial a la infección por *L. mexicana* en ratones de la cepa C57BL/6. En resumen, la infección por *L. mexicana* genera lesiones progresivas que no cicatrizan en ambas cepas de ratones, sin embargo, la severidad de las lesiones es distinta, dependiendo de la cepa de ratón (Hsu & Scott, 2007; Pedraza et al 2017).

2. Justificación

En el modelo murino se ha observado que la leishmaniasis cutánea es más severa en la cepa BALB/c que en la cepa C57BL/6, dicha susceptibilidad depende del tipo de respuesta inmune celular que se origina en cada cepa. La cepa BALB/c origina una respuesta tipo Th2 que ayuda a la progresión de la enfermedad, mientras que la cepa C57BL/6 origina una respuesta tipo Th1 que ayuda al control de la infección. Se ha descrito que el desarrollo de esta respuesta celular depende del grado de maduración alcanzado por las células dendríticas en la interacción con el parásito y sus antígenos. En este trabajo se analizó la maduración alcanzada por las células dendríticas por la infección con el parásito o la estimulación con LPG para determinar si existe relación con la resistencia o susceptibilidad.

3. Hipótesis

La interacción de las células dendríticas con *Leishmania mexicana* en su estadio de promastigote o su LPG reduce su activación y maduración, siendo mayor la reducción en células dendríticas de la cepa BALB/c en comparación con la C57BL/6.

4. Objetivo General

Analizar la activación y maduración de las células dendríticas ante la infección por *L. mexicana* o la estimulación con LPG en las cepas BALB/c y C57BL/6.

4.1 Objetivos específicos

1. ~~Analizar~~ Evaluar la progresión de la infección en los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.
2. Analizar la maduración de DC provenientes de ratones BALB/c y C57BL/6 incubadas con LPG o promastigotes mediante la cuantificación de la expresión de MHCII, CD40 y CD86.
3. Estudiar la activación de DC provenientes de ratones BALB/c y C57BL/6 incubadas con LPG o promastigotes mediante la cuantificación de la producción de IL-12 e IL-10.

5. Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones macho BALB/c y C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad que fueron producidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental, UNAM. El manejo, cuidado y método de eutanasia fue llevado siguiendo los lineamientos establecidos para los animales de laboratorio de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 y bajo la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la UNAM, con número de registro 063-2020/022-CIC-2020. Los ratones se encontraban libres de patógenos

y con agua y comida *ad libitum*. Durante el estudio los ratones se distribuyeron en cajas con micro-aisladores y fueron mantenidos en el bioterio.

Infección con *L. mexicana*

Para la infección en el lóbulo de la oreja, los ratones fueron anestesiados utilizando un anestésico inhalado isofluorano. Ambas cepas de ratones se inocularon de forma subcutánea en el lóbulo derecho de la oreja con 1×10^5 promastigotes en 5 μ L de solución salina, utilizando jeringas de insulina con aguja calibre 31 G.

Cultivo de Parásitos

Se utilizaron parásitos de la cepa Lacandona con número de registro MHOM/MX2011 perteneciente a la especie *L. mexicana* (Escalona-Montaño et al., 2016). Estos *parásitos* fueron proporcionados por el laboratorio de inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental. La virulencia de *L. mexicana* se mantuvo mediante pases en ratones BALB/c que fueron inoculados en el cojinete plantar con 10×10^6 de promastigotes crecidos en fase estacionaria.

Para el cultivo de promastigotes se aislaron los amastigotes aspirados de las lesiones de los ratones previamente infectados. El aislamiento de amastigotes se llevó a cabo utilizando jeringas de insulina con agujas calibre 25 G con las cuales se aspiraron las células infectadas. Los parásitos fueron cultivados en medio 199 (Invitrogen Cat. 12350039) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal bovino (SFB, GIBCO-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) descomplementado por calor a 56° C durante 30 minutos. Los cultivos se iniciaron con 1×10^6 de promastigotes/mL

en botellas de 25 cm² en un volumen final de 10 mL de medio e incubados a temperatura ambiente. Los promastigotes fueron utilizados en la fase estacionaria de crecimiento, en el día 5 de cultivo.

Análisis del desarrollo de la infección

El desarrollo de la infección fue monitoreado una vez a la semana durante ocho semanas mediante la medición del grosor de lesión usando un calibrador métrico. En la semana ocho post-infección se realizó la eutanasia de los ratones, posteriormente la lesión fue aislada para determinar la carga parasitaria.

Cuantificación de la carga parasitaria

Para cuantificar la carga parasitaria se realizó un ensayo de dilución limitante, siguiendo el protocolo de Titus con algunas modificaciones (Titus et al., 1985). Los ratones fueron eutanasiados y las lesiones fueron aisladas y pesadas en una balanza analítica. Para la obtención de los parásitos, los tejidos fueron homogenizados por maceración con PBS durante varios minutos. Posteriormente, la suspensión celular fue diluida en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado por calor (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. El ensayo se realizó en placas de cultivo de 96 pozos en medio bifásico agar sangre de conejo. El agar sangre consistía en una base de agar nutritivo al 3% (Difco, Detroit, MI) y NaCl al 0,6% en agua bidestilada, esterilizada por calor. Las diluciones seriadas de la solución del

homogenizado del tejido se realizaron 1:10 en medio RPMI con 10% de SFB. Todas las placas se cultivaron a 26° C durante 10 días.

Purificación del lipofosfoglicano (LPG)

El LPG fue purificado de los promastigotes de *L. mexicana* cultivados en medio RPMI-1640 suplementado con NaHCO₃ a 2 mM y 10 % de SFB inactivado, a 26°C. Los parásitos fueron cosechados y lavados en el 5to día, durante su fase estacionaria. El LPG fue purificado de 10x10¹⁰ promastigotes como describió McConville realizando variaciones en el método (McConville et al., 1987). Los parásitos fueron centrifugados a 3200 rpm, el sobrenadante fue decantado y al botón se le colocó cloroformo/metanol/agua (1:2:0.5 v/v) por 2 h a temperatura ambiente. El material insoluble fue usado para la extracción de LPG con 9% de 1-butanol en agua (2x50 mL) y los sobrenadantes fueron secados al vacío. El LPG fue purificado de esta fase estacionaria por cromatografía de octil-sefarosa en HPLC usando un gradiente de 1 propanol (5-60%) en 0.1 M de acetato de amonio. La preparación fue negativa para la presencia de endotoxina usando la prueba de *Limulus* sp. (Amebococyte assay, E-Toxate Kit; Sigma). Se utilizó polimixina B (5 g/mL) para confirmar la ausencia de contaminantes de LPS. Una alícuota fue analizada por electroforesis (SDS-PAGE) para comprobar si existían contaminantes proteicos empleando tinción de plata, con resultado negativo.

Obtención de células dendríticas

Las DC se diferenciaron de la médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6. Posterior a la eutanasia se retiró la médula ósea de los huesos largos de los ratones (fémur y la tibia) a través de lavados con PBS. Las células aisladas fueron colocadas en placas bacteriológicas (Falcon) de 100 mm a una concentración de 2×10^6 células de la médula por 10 mL de medio RPMI-1640 con 10% de SFB inactivado por calor (probado para endotoxina), 2 mM 1-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 50 µg de 2-mercaptoetanol (Gibco Invitrogen Corporation, Calsbad CA, USA), 25 mM de amortiguador HEPES y 24 mM de NaHCO₃ (Sigma). El medio completo fue suplementado con 10% de GM-CSF contenido en el sobrenadante de la línea células X-63 transfectada con el gen murino GM-CSF, que es equivalente a 200 U/mL de GM-CSF (Zal et al., 1994). La línea X-63 fue donada por la Dra. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, MillHill, London, UK). En el 3er día de cultivo, se añadieron 10 mL de medio de cultivo fresco conteniendo GM-CSF. En el día 6 se retiraron 10 mL de medio cuidando no retirar células y se añadieron 10 mL de medio fresco. En el 8vo día, las células no adherentes fueron lavadas, centrifugadas y suspendidas en medio RPMI con 10% de SFB. Para cuantificar la pureza en cada lote de la línea celular X-63 se realizó una citometría de flujo, observándose que las células fueron 85% CD11c⁺ y 90% MHC-II⁺.

Condiciones experimentales

Las células se dividieron en cuatro grupos para analizar la expresión de moléculas coestimuladoras así como la producción de citocinas ante diferentes estímulos durante 24 horas. El grupo uno se manejó como grupo control, el cual no fue estimulado; el segundo grupo se pulsó con 10 µg/mL de LPG, el tercer grupo se

estimuló con parásitos promastigotes en fase estacionaria de *L.mexicana* en una relación 1:10, finalmente el último grupo se tomó como control positivo y fue estimulado con 10 µg/mL de peptidoglicano.

Cuantificación de citocinas

Se coincubaron 1.5×10^5 células dendríticas en placas de 96 pozos con 10 µg/mL de LPG o 10 µg/mL de peptidoglicano o 1.5×10^6 promastigotes, por 24 horas. Se recuperaron los sobrenadantes del cultivo y se cuantificaron mediante ELISA las citocinas IL-12p70 e IL-10.

Citometría de flujo

Las células dendríticas fueron bloqueadas con el anticuerpo anti-CD16/32 (eBioscience # Cat. 14-0161-85) en dilución 1:50 por 10 minutos a 4°C para evitar pegado inespecífico. Posteriormente, la suspensión celular fue centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y la suspensión celular fue teñida con anticuerpos anti-CD11c en PE, anti-CD1d en FITC, anti-CD86 en PE-Cy7, anti-CD40 en APC (BD # Cat. 557401, BioLegend # Cat. 123508, BioLegend # Cat. 121810 # Cat., BioLegend # Cat.105013 y BioLegend # Cat.124611) todos en dilución 1:100 por 20 minutos a 4°C. Después, la suspensión celular fue centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm a 4°C, el botón fue resuspendido en 500 µL PBS para lavar el posible anticuerpo restante. Posteriormente, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 2% por 15 minutos a 4°C. El exceso de fijador fue lavado como se describió anteriormente. Por último, la suspensión celular fue

recuperada en tubos de poliestireno de 5mL para su lectura en el citómetro de flujo FACS CANTO II BD y analizados con el software DIVA.

Análisis Estadístico

Todos los datos fueron analizados utilizando la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. Para determinar si los valores eran significativos se utilizó una $p \leq 0.05$, para esto se utilizó el programa Prism GraphPad v8.

Resultados

Tamaño de lesión y carga parasitaria en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*

Se midieron las lesiones del lóbulo de la oreja de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados por *L. mexicana*. Se observó que a partir de la tercera semana de infección las lesiones empezaron a aumentar de tamaño (Figura 5A), observándose una marcada diferencia a partir de la sexta semana, donde los ratones BALB/c presentaban un mayor tamaño de lesión, llegando a medir en promedio un grosor de casi 2 mm, mientras que las lesiones de la cepa C57BL/6 presentaban un grosor de casi 1.5 mm de grosor ($p \leq 0.05$). Esta tendencia se mantuvo hasta la octava semana, donde la cepa BALB/c presentaba un grosor de lesión de ≈ 4 mm, mientras que C57BL/6 ≈ 2 mm.

Para cuantificar la progresión de la infección en ambas cepas de ratones, se realizó una cuantificación de la carga parasitaria por el método de dilución limitante (Figura 5B). Se observó que la cepa BALB/c presentaba 1.41×10^6 parásitos/mg de tejido,

mientras que la cepa C57BL/6 presentó una carga parasitaria de 224×10^3 parásitos/mg de tejido por lo que la cepa BALB/c presentó 6.2 veces más carga parasitaria que la cepa C57BL/6 ($p \leq 0.05$).

Estos datos demostraron que la cepa C57BL/6 tiene un mejor control del desarrollo de las lesiones y de la replicación del parásito en comparación a la cepa BALB/c.

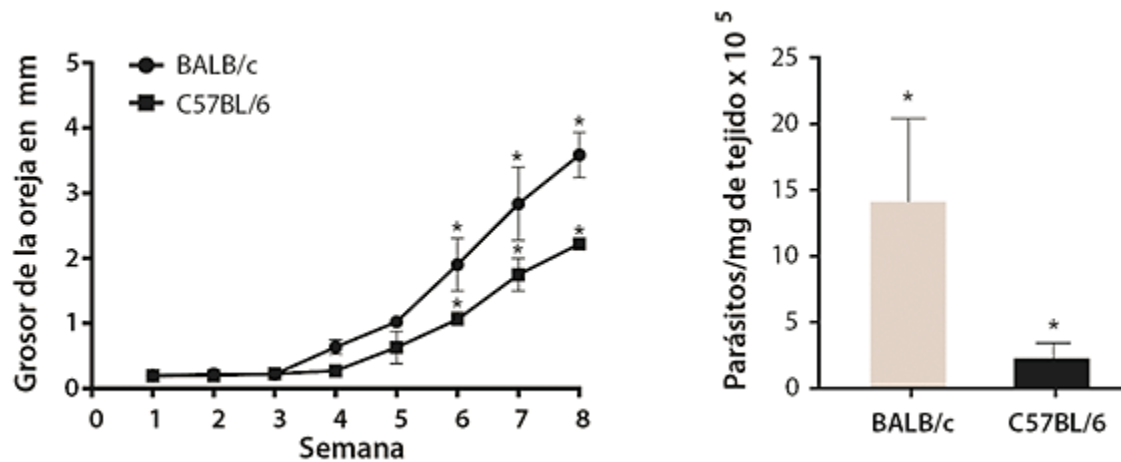


Figura 5. Progresión de las lesiones de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L.mexicana*. A, Crecimiento de las lesiones en el lóbulo de la oreja de ratones infectados con 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. B, Cuantificación de la carga parasitaria. Los datos representan la media y la desviación estándar de 4 experimento independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y se representó con *.

Expresión de MHC-II en DC de BALB/c y C57BL/6 estimuladas con LPG o infectadas *L.mexicana*

Se observó que en estado basal la cepa BALB/c tiene una mayor expresión de MHC-II en comparación a la cepa C57BL/6 (Fig. 6). Ante el estímulo con LPG la expresión de MHC-II aumentó en DC de ambas cepas, en comparación al grupo control. Para C57BL/6, la expresión aumentó el doble, llegando a ser de 3800 IMF (intensidad media de fluorescencia), mientras que para BALB/c la expresión de MHC-II aumentó 1.3 veces, teniendo una expresión de 2500 IMF ($p \leq 0.05$). El control positivo estimulado con peptidoglicano tuvo una expresión significativa de MHC-II en DC de la cepa C57BL/6, lo cual no se observó en los DC de la cepa BALB/c. Esto sugiere que la cepa C57BL/6 responde más fuertemente a los estímulos innatos dados por estos PAMPs, LPG y Peptidoglicano.

La infección con promastigotes aumentó la expresión de MHC-II significativamente en DC de ambas cepas ($p \leq 0.05$). En BALB/c la expresión de MHC-II aumentó 1.2 veces más en comparación al grupo control, llegando a ser de 3500 IMF, mientras que la expresión de MHC-II en C57BL/6 fue de 2300 IMF, siendo casi el doble de su expresión en comparación al grupo control ($p \leq 0.05$).

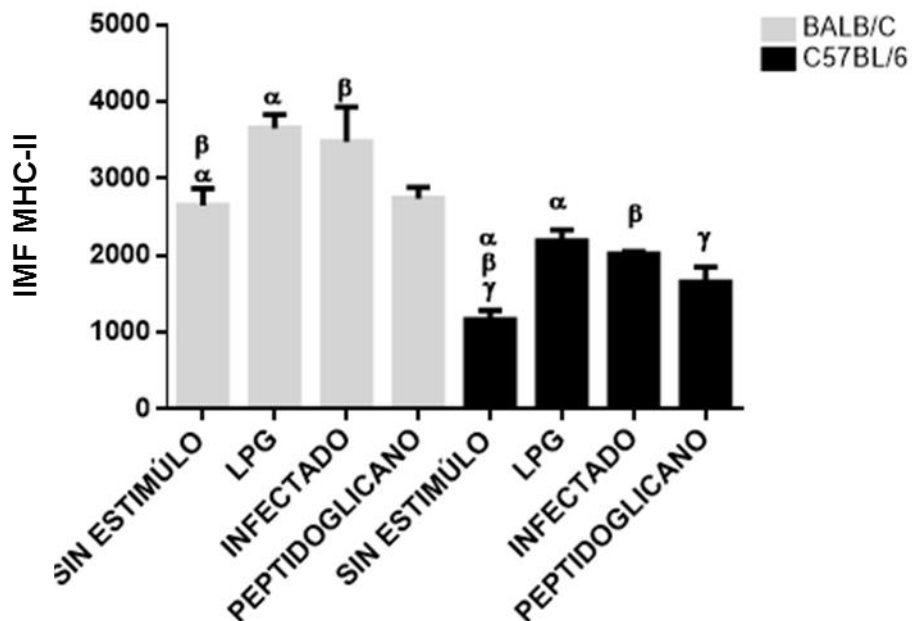


Figura 6. Expresión de la molécula MHC-II en células dendríticas ante la infección con *L. mexicana* o la estimulación con LPG purificado. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con $10 \mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o $10 \mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α , β , γ .

Expresión de CD40 en DC de BALB/c y C57BL/6 estimuladas con LPG o infectadas *L.mexicana*

Se analizó la expresión de CD40 y CD86 presentes en las células dendríticas coincubadas con promastigotes de *L. mexicana* o LPG. Se observó que de forma

basal las DC de ambas cepas de ratones tienen una baja expresión de CD40, esta expresión se ve aumentada por el agonista de TLR2, peptidoglicano ($p \leq 0.05$).

Ante el estímulo con LPG, las DC de la cepa BALB/c incrementaron significativamente la expresión de CD40, llegando a una expresión de 15×10^3 de IMF, siendo quince veces mayor en comparación al grupo control. De igual forma, LPG aumentó la expresión de CD40 en DC de ratones C57BL/6, llegando a una expresión de 10×10^3 de IMF, 10 veces mayor en comparación al grupo control ($p \leq 0.05$). Por otro lado, ante la incubación con *L. mexicana* ambas cepas muestran un aumento mínimo en la expresión de CD40 ($p \leq 0.05$) (Figura 7).

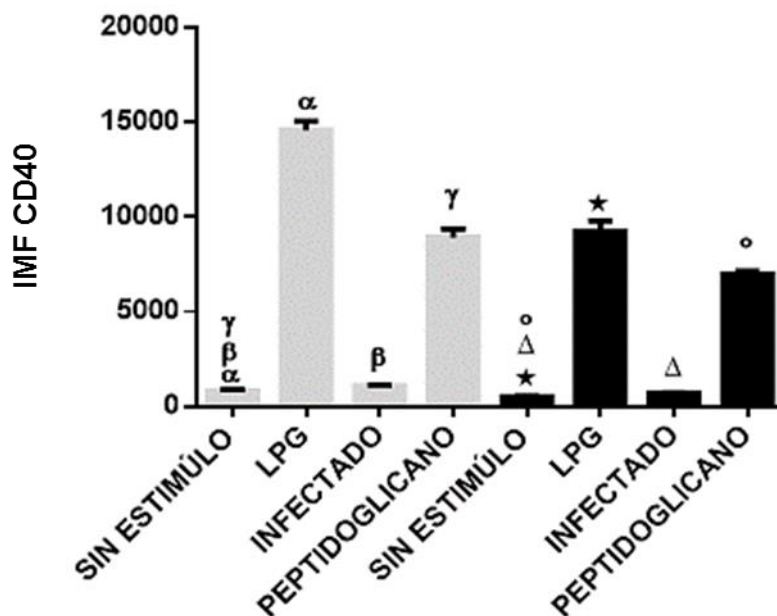


Fig. 7 Expresión de la molécula CD40 en células dendríticas estimuladas con LPG o *L.mexicana*. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG,

promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α y β para la cepa BALB/c y $^{\circ}$, $*$, Δ , para la cepa C57BL/6.

Expresión de CD86 en DC de BALB/c y C57BL/6 estimuladas con LPG o infectadas *L.mexicana*.

Se observó que las DC de BALB/c y C57BL/6 aumentan la expresión de CD86 por el estímulo de LPG ($p \leq 0.05$). En DC de ratones BALB/c, la expresión de moléculas CD86 aumentaron casi al doble del grupo control, llegando su expresión a 220 IMF. En el caso de DC de ratones C57BL/6, la expresión fue tres veces mayor en comparación al grupo control, llegando a ser de 350 IMF. La incubación con *L. mexicana* en DC de BALB/c indujo un aumento de 1.5 veces la expresión de CD86 en comparación al grupo control, llegando a una expresión de 150 IMF ($p \leq 0.05$). Mientras que las DC de C57BL/6 no mostraron cambio en la expresión (Figura 8).

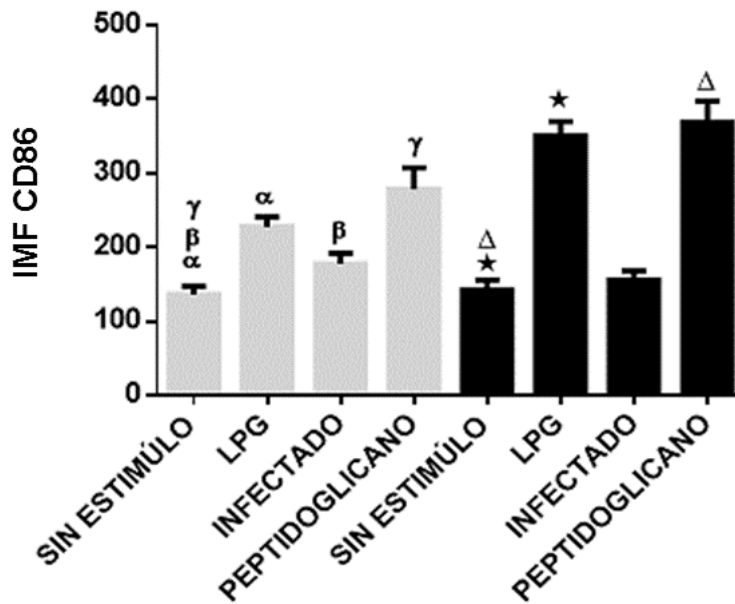


Fig. 8 Expresión de la molécula CD86 en DC estimuladas con LPG estimuladas con LPG o *L. mexicana*. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α , β , y γ para la cepa BALB/c y, *, Δ para la cepa C57BL/6.

Producción de IL-12 en DC de BALB/c y C57BL/6 estimuladas con LPG o infectadas *L. mexicana*.

Se cuantificó la producción de IL-12 en sobrenadantes de DC incubadas con LPG, *L. mexicana* o peptidoglicano. El control sin estímulo mostró nula producción de IL-

12, mientras que el estímulo con peptidoglicano indujo su producción hasta ≈ 6000 y 8000 pg/mL en las cepas BALB/c y C57BL/6, respectivamente ($p \leq 0.05$).

En la coincubación con LPG también se observó que tanto las DC de ratones BALB/c como los de la cepa C57BL/6 mostraron elevada producción de IL-12 ($p \leq 0.05$), llegando hasta los 5.5×10^3 pg/mL en la cepa BALB/c y hasta los 5×10^3 pg/mL en la cepa C57BL/6. La infección con *L. mexicana* no indujo la producción de la citocina en DC de ninguna de las dos cepas, mostrando que la inducción de la producción de IL-12 se lleva a cabo únicamente con LPG soluble en las DC (Figura 9).

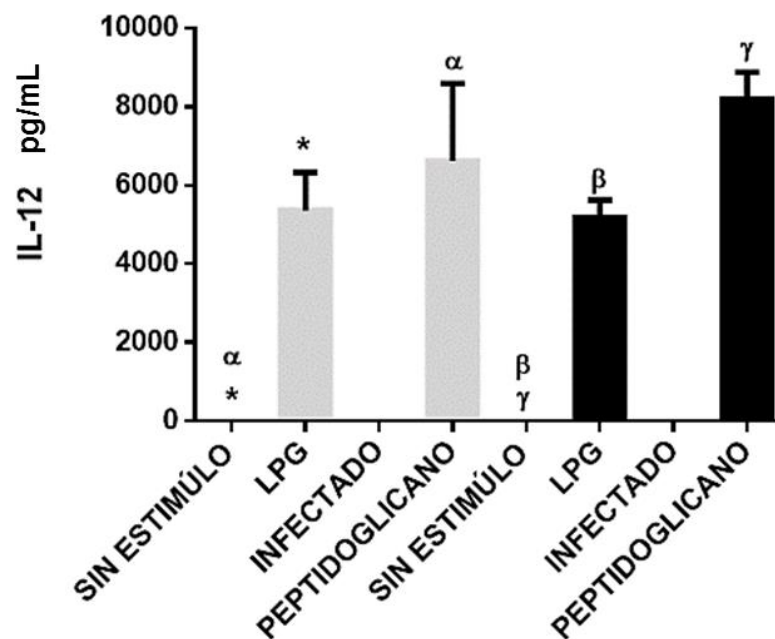


Fig. 9 Producción de IL-12 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la estimulación con LPG purificado y la infección con *L. mexicana*. Se

pulsaron 1.5×10^5 células dendríticas con $10 \mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o $10 \mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Se cuantificó IL-12 mediante ELISA en los sobrenadantes. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α , *, para la cepa BALB/c y β , γ para la cepa C57BL/6.

Producción de IL-10 en DC de BALB/c y C57BL/6 estimuladas con LPG o infectadas *L. mexicana*.

Se cuantificó la producción de IL-10 en sobrenadantes de DC incubadas con LPG, *L. mexicana* o peptidoglicano. El control sin estímulo mostró nula producción de IL-10, mientras que peptidoglicano indujo un aumento en la producción de IL-10 en DC de ambas cepas de ratones, en comparación al grupo control. Sin embargo, para ninguna cepa fue significativo. En DC de la cepa BALB/c, las coincubaciones con LPG o el parásito indujeron la producción de IL-10 hasta 150 y 180 pg/mL , respectivamente ($p \leq 0.05$).

Por otro lado, en DC de la cepa C57BL/6, el estímulo con LPG no indujo la producción de IL-10, únicamente la coincubación con *L. mexicana* indujo la expresión de IL-10, llegando hasta los 80 pg , sin embargo, este aumento no fue significativo (Figura 10,).

Estos resultados muestran que la cepa BALB/c producen más eficientemente la IL-10, un mediador antiinflamatorio que la cepa C57BL/6.

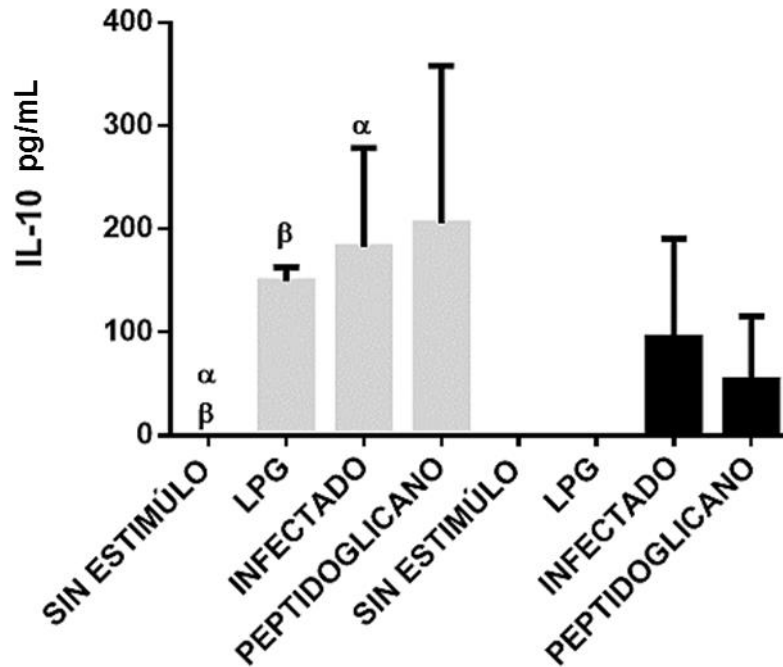


Fig. 10 Producción de interleucina 10 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L. mexicana* y la estimulación con LPG purificado. Se pulsaron 1.5×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas, posteriormente se cuantificó IL-10 mediante ELISA en los sobrenadantes. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α y β .

Discusión

En este trabajo se comparó la activación y maduración de DC de las cepas BALB/c y C57BL/6 ante la incubación con *L. mexicana* o LPG. La maduración y activación de las células presentadoras de antígenos se relacionan con el control de la enfermedad, ya que entre mayor grado de maduración y activación con producción de citocinas proinflamatorias tengan las células, hay una mayor diferenciación de linfocitos Th1 (Terhune & Czerniecki, 2013), que ayudan a controlar la enfermedad. Por lo cual, en este trabajo se analizó el desarrollo de la enfermedad en la cepa BALB/c y C57BL/6 y se comparó el grado de maduración de las DC y su posible relación con la resistencia o susceptibilidad desarrollada en estos modelos.

En cuanto al progreso de la infección, se mostró mayor susceptibilidad de la cepa BALB/c en comparación con la cepa C57BL/6, observándose lesiones con mayor tamaño y mayor carga parasitaria. Estos resultados están relacionados con la genética de la cepa BALB/c, la cual desarrolla una respuesta tipo Th2 con producción de IL-4 que favorece el desarrollo de la enfermedad (Pennock et al., 2013). De hecho, se ha descrito que la cepa BALB/c deficiente de IL-4 es parcialmente resistente a la infección por *L. major*, mientras que la misma cepa deficiente en el receptor para IL-4, IL-4r, controla la infección por el parásito, lo cual indica que IL-4 está implicada en la susceptibilidad de los ratones BALB/c contra la infección por *Leishmania* (Sacks & Noben-Trauth, 2002). Adicionalmente, en cepas

resistentes como la C57BL/6 se han descrito diversos loci involucrados en la resistencia a la enfermedad, reportándose que los loci *Lmr2* y *D6Mit122* controlan el tamaño de la lesión (Lipoldová & Demant, 2006), mientras en BALB/c regulan la producción de IL-10 en suero (Kobets et al., 2019). De igual forma los loci como *D10Mit46*, *D11Mit62* y *D6Mit10* asociados a la resistencia, regulan el tamaño de las lesiones y la producción de IFN- γ e IL-12 en cepas resistentes como C57BL/6 (Lipoldová et al., 2000).

Otros autores también han demostrado que el nivel de transcritos en macrófagos infectados por *L. amazonensis* es diferente en cada cepa de ratón. La cepa BALB/c expresa mayor cantidad de transcritos para ERK1/2, el cual participa en la inhibición de NF- κ B, mientras C57BL/6 expresa mayor cantidad de transcritos para P38 MAPK, la cual participa en la expresión de NF- κ B, afectando la supervivencia del parásito (Aoki et al., 2019) debido a la inhibición de mecanismos inflamatorios que activan el estallo respiratorio y la producción de citocinas inflamatorias que podrían desencadenar la respuesta celular Th1 (Dayakar et al., 2019).

En esta tesis también se analizó la activación y la maduración de las DC, las cuales son inducidas por el reconocimiento de antígenos a través de PRR's presentes en la membrana celular, como TLR2 que reconoce al LPG de los promastigotes (Becker et al., 2003). Por lo cual, se evaluó la activación y maduración, inducida por LPG o promastigotes en DC células. La maduración se analizó mediante la cuantificación de la expresión de moléculas de superficie implicadas en la presentación antigénica y la coestimulación como MHC-II, CD40, CD86, debido a

que las células dendríticas maduras eficientemente activan a los linfocitos T, lo cual se asocia a una alta presentación antigénica y coestimulación (Tai et al., 2018).

Se observó que, de manera basal, BALB/c presenta una mayor expresión de MHC-II en comparación a la cepa C57BL/6. Otros autores han reportado resultados similares, indicando que el gen *H2-Oa* que codifica MHC-II se expresa mayormente en la cepa BALB/c, en comparación con C57BL/6 (Restrepo et al., 2021). Sin embargo, tanto la infección como el LPG soluble indujeron mayor expresión de MHC-II de forma proporcional en la cepa C57BL/6, con respecto a BALB/c. Esto pudo deberse a que la activación por TLR2 es más sostenida en la cepa C57BL/6, posiblemente debido a que la fosforilación de I κ B α por LPG en células dendríticas dura más tiempo en las DC de la cepa C57BL/6 que en BALB/c (Zamora et al., 2017). Otros autores también han demostrado que la activación de DC por LPG es un fuerte inductor de la expresión de MHC-II, así como de CD86 y además promueve

la producción de IL-12, NO y TNF- α de las células, participando así en la inmunidad protectora ante la infección (Favila et al., 2015; Campos et al., 2001).

La mayor expresión de MHC-II también está relacionada con mayor activación de la respuesta celular Th1. Nagy et al., reportaron que un incremento en la expresión de MHC-II induce con mayor eficiencia la activación eficiente de células TCD4⁺ Th1 (Nagy et al., 2021). Por tanto, el mayor incremento proporcional de MHC-II inducida por el parásito o LPG en DC de C57BL/6 podría contribuir a la capacidad parcialmente protectora observada en la cepa contra el parásito. Roy et al., también sugieren que el aumento de MHC-II está relacionado con la resistencia a la

leishmaniasis causada por *L. donovani*, ya que al presentarse MHC-II^{-/-} los ratones se vuelven más susceptibles (Roy et al., 2014; Locksley et al., 1993).

Una vez comenzada la maduración de las DC, aumenta la expresión de CD40 y CD80, la cual es esencial en la activación de linfocitos T. La señalización de CD40-CD40L es fundamental en la inmunidad frente a *Leishmania*. Su sobreexpresión aumenta los niveles de activación de Th1 e induce la activación de macrófagos para eliminar a los parásitos (Chandel et al., 2014). Los resultados del presente estudio demostraron que las DC de forma basal tienen una baja expresión de CD40, la cual aumenta con el estímulo de LPG. En contraste, el promastigote no indujo mayor expresión de CD40 en DC de ambas cepas de ratones. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Aoki y colaboradores, los cuales demostraron que ante la incubación con *L. amazonensis*, la expresión de CD40 se ve disminuida tanto en C57BL/6 como en BALB/c, lo que demuestra que el parásito no es capaz de inducir la expresión de CD40 e incluso podría disminuir dicha expresión en el tiempo (Aoki et al., 2019).

El papel de CD40 en la infección es relevante, ya que ratones que carecen de CD40 son susceptibles a la infección por *L. major*, lo cual se asocia con una deficiente activación de los linfocitos T, generando una baja producción de IFN- γ (Field et al., 2007). La incapacidad del parásito de inducir CD40 sugiere que las DC infectadas con *Leishmania* no activan a los linfocitos T, solamente lo realizan las DC que son maduras y activadas por LPG soluble, posiblemente liberado por la lisis del parásito inducida por el complemento, lo cual sugeriría que son los antígenos de los

parásitos muertos o lisados los que podrían iniciar la activación de la respuesta inmune adaptativa.

CD86 presentó baja expresión en DC en estado basal de ambas cepas de ratones. La expresión aumentó significativamente ante un estímulo con LPG en DC de ambas cepas. En contraste, el aumento de CD86 en DC incubadas con el parásito fue bajo, y solo fue significativo en ratones BALB/c. Se ha descrito que CD86 es una molécula importante para la producción de IFN- γ , IL-5 e IL-12, las cuales son relevantes para generar una respuesta inmunitaria contra *Leishmania* (Falcão et al., 2016). Nuestros resultados demostraron que LPG soluble es capaz de inducir la expresión de CD86 en DC. Este aumento posiblemente está relacionado con la activación de TLR2 inducida por LPG, ya que esto induce la translocación de NF- κ B y este factor de transcripción se encuentra involucrado en la transcripción de CD86 (Zamora-Chimal et al., 2017, Zou & Hu., 2005). Adicionalmente, nuevamente se reafirma que solo el LPG soluble logra la maduración de las DC, mientras que la infección no lo hace, sugiriendo nuevamente que los parásitos lisados, posiblemente por completo, son los que podrían inducir la maduración de las DC.

En cuanto a la activación de las DC, los resultados demostraron que DC de la cepa de BALB/c son capaces de producir IL-10 ante un estímulo directo con LPG así como con la incubación con el parásito. En contraste, DC de C57BL/6 estimuladas con LPG no producen IL-10, aunque la infección por *L. mexicana* sí induce su producción. Esta observación es comparable con los resultados obtenidos por Restrepo et al. los cuales demostraron que ante una infección de macrófagos con *L. panamensis*, BALB/C tuvo una mayor expresión del gen *IL10*, el cual induce la

producción de IL-10, mientras que en la cepa C57BL/6 el gen disminuyó su expresión (Restrepo et al., 2021). De igual forma, Aoki y colaboradores demostraron que la infección con *L. amazonensis* disminuía la producción de IL-10 de macrófagos en la cepa C57BL/6, en comparación a la cepa BALB/c (Aoki et al., 2019). Estas observaciones sugieren que la susceptibilidad y la resistencia están ligadas a la producción de IL-10.

La mayor producción de IL-10 observada en BALB/c podría contribuir a la diferenciación de la respuesta celular a Th2, ya que puede inducir su diferenciación (Schwarz et al., 2013). De igual forma podría inducir Células Treg, mediada por la activación de FOXP3⁺, la cual participa en la supervivencia del parásito (Bhattacharya et al., 2016). La producción mantenida de IL-10 es capaz de inhibir la activación de linfocitos T, debido a que reduce la maduración de las DC, apaga los mecanismos efectores del linfocito T (Dayakar et al., 2019) y reduce la producción de IL-12 y de IFN- γ (Rahim et al., 2005), participando en la susceptibilidad de la cepa y contribuyendo a generar una respuesta Th2.

Para analizar la respuesta proinflamatoria observamos la producción de IL-12. La citocina IL-12 impulsa la diferenciación de los linfocitos Th1, además induce la producción de IFN- γ en las células NK, como en las células T, mediando la expresión de NOS2 y la producción de NO en los macrófagos, participando en la eliminación del parásito (Dayakar et al., 2019). Los resultados del presente estudio mostraron que DC tanto de BALB/c como de C57BL/6 producen IL-12, aunque únicamente con cuando son estimulados con LPG. Se ha descrito que IL-12 es inducida por la activación de TLR2 en DC mediante el estímulo con LPG (Aebischer

et al., 2005; Becker et al., 2003) que conduce a la activación de NF- κ B, participando en la diferenciación a linajes Th1 (Reinhard et al., 2012)

Observamos que el LPG soluble tiene una mayor capacidad de inducir IL-12 en DC, sugiriendo nuevamente que la degradación del promastigote por el sistema de complemento permite que se libere el LPG, el cual podrá ser reconocido por el TLR2 de las DC, llevando a la activación de NF- κ B para generar linfocitos Th1, las cuales participarán en la producción de IFN- γ . Esta citocina activa a los macrófagos, induciendo su expresión de iNOS y la producción de NO, lo cual participan en la eliminación del parásito (Argueta-Donohué et al., 2008). Sin embargo, los parásitos no lisados por el complemento son capaces de inhibir la producción de IL-12 mediante la inducción de MAPk, que activan la vía de Erk $\frac{1}{2}$, induciendo la producción de IL-10 (Kima, 2007). De igual forma, se ha descrito que la internalización del parásito en macrófagos da como resultado inhibición de INF- γ , limitando la producción de NO como de IL-12 (Blanchette et al., 2003). De esta forma, los resultados obtenidos fueron comparables con estudios anteriormente descritos, sugiriendo que el parásito es capaz de inhibir la maduración y la producción de mediadores proinflamatorios de las DC, permitiendo la replicación del parásito y participando en la susceptibilidad.

Conclusión

La activación y maduración de las DC juega un papel importante en la inmunidad ante la infección por *Leishmania*. La cepa de ratones C57BL/6 desarrolla un fenotipo maduro con producción de mediadores inflamatorios, mayor que el de la cepa BALB/c, lo cual podría explicar su resistencia parcial a la infección. El LPG soluble

cumple su función como PAMP, induciendo activación de las DC y su maduración. Sin embargo, el parásito no induce ni maduración ni activación de mediadores inflamatorios como IL-12, únicamente induce IL-10 con lo cual contribuye al desarrollo de un ambiente tolerogénico contra *L. mexicana*.

Perspectivas

Los resultados mostraron que el LPG soluble induce de forma eficaz la activación y maduración de DC por lo que sería importante observar si el parásito lisado, al liberar LPG de su membrana, también tiene la capacidad de madurar a las DC. Igualmente es importante analizar si la activación y maduración eficaz de las DC también es dependiente de la especie de parásito del que se obtiene el LPG soluble. También sería importante analizar la activación de los linfocitos T mediante la maduración de las DC por el estímulo con el LPG soluble, el parásito lisado o la coincubación con parásitos vivos, analizando si los linfocitos T son capaces de inducir la producción de citocinas proinflamatorias para el control de la enfermedad en ratones BALB/c y C57BL/6.

Referencias

1. Reinhard, K., Huber, M., Lohoff, M., & Visekruna, A. (2012). The role of NF- κ B activation during protection against Leishmania infection. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 302(4-5), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.006>

2. Dayakar, A., Chandrasekaran, S., Kuchipudi, S. V., & Kalangi, S. K. (2019). Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 10, 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00670>
3. Bhattacharya, P., Ghosh, S., Ejazi, S. A., Rahaman, M., Pandey, K., Ravi Das, V. N., Das, P., Goswami, R. P., Saha, B., & Ali, N. (2016). Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004422. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004422>
4. Aebischer, T., Bennett, C. L., Pelizzola, M., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Urbano, M., Capozzoli, M., Luchini, A., Ilg, T., Granucci, F., Blackburn, C. C., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2005). A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *European journal of immunology*, 35(2), 476–486. <https://doi.org/10.1002/eji.200425674>
5. Argueta-Donohué, J., Carrillo, N., Valdés-Reyes, L., Zentella, A., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2008). *Leishmania mexicana*: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). *Experimental parasitology*, 120(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.04.002>
6. Kima P. E. (2007). The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International*

journal for parasitology, 37(10), 1087–1096.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007>

7. Zou, G. M., & Hu, W. Y. (2005). LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *Journal of cellular physiology*, 205(3), 437–443.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20420>
8. Terhune, J., Berk, E., & Czerniecki, B. J. (2013). Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines*, 1(4), 527–549.
<https://doi.org/10.3390/vaccines1040527>
9. Kobets, T., Čepičková, M., Volkova, V., Sohrabi, Y., Havelková, H., Svobodová, M., Demant, P., & Lipoldová, M. (2019). Novel Loci Controlling Parasite Load in Organs of Mice Infected With *Leishmania major*, Their Interactions and Sex Influence. *Frontiers in immunology*, 10, 1083.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01083>
10. Lipoldová, M., & Demant, P. (2006). Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature reviews. Genetics*, 7(4), 294–305. <https://doi.org/10.1038/nrg1832>
11. Lipoldová, M., Svobodová, M., Krulová, M., Havelková, H., Badalová, J., Nohýnková, E., Holán, V., Hart, A. A., Volf, P., & Demant, P. (2000). Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. *Genes and immunity*, 1(3), 200–206. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363660>
12. Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., & Wei, W. (2018). Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune

Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 642.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00642>

13. Chandel, H. S., Pandey, S. P., Shukla, D., Lalsare, K., Selvaraj, S. K., Jha, M. K., & Saha, B. (2014). Toll-like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting *Leishmania major* infection. *Clinical and experimental immunology*, 176(2), 283–290. <https://doi.org/10.1111/cei.12264>
14. Falcão, S., Jaramillo, T. M., Ferreira, L. G., Bernardes, D. M., Santana, J. M., & Favali, C. B. (2016). *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. *Frontiers in immunology*, 7, 287. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00287>
15. 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>
16. WHO. Leishmaniasis. Recuperado el 5 de Febrero 2020 de: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
17. WHO Leishmaniasis (Recuperado el 02 de noviembre 2021 de: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>
18. Ready P. D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical epidemiology*, 6, 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
19. Thakur, L., Singh, K. K., Shanker, V., Negi, A., Jain, A., Matlashewski, G., & Jain, M. (2018). Atypical leishmaniasis: A global perspective with emphasis on the Indian subcontinent. *PLoS neglected tropical diseases*, 12(9), e0006659. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006659>

20. Bahrami, F., Harandi, A. M., & Rafati, S. (2018). Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 222. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>
21. Dostálová, A., & Volf, P. (2012). Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & vectors*, 5, 276. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>
22. Sacks, D., & Kamhawi, S. (2001). Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annual review of microbiology*, 55, 453–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.453>
23. Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, 124(Pt 5), 495–507. <https://doi.org/10.1017/s0031182002001439>
24. Bates P. A. (2018). Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature microbiology*, 3(5), 529–530. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
25. Gluenz, E., Wheeler, R. J., Hughes, L., & Vaughan, S. (2015). Scanning and three-dimensional electron microscopy methods for the study of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* flagella. *Methods in cell biology*, 127, 509–542. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.12.011>
26. Laurenti, M. D., Orn, A., Sinhorini, I. L., & Corbett, C. E. (2004). The role of complement in the early phase of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 37(3), 427–434. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300021>

27. Mosser, D. M., & Brittingham, A. (1997). Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9–S23. <https://doi.org/10.1017/s0031182097001789>
28. Wilson, M. E., Innes, D. J., Sousa, A. D., & Pearson, R. D. (1987). Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. *The Journal of parasitology*, 73(1), 55–63.
29. Collin, M., & Bigley, V. (2018). Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154(1), 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>
30. Qian, C., & Cao, X. (2018). Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Seminars in immunology*, 35, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.002>
31. Kapsenberg M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature reviews. Immunology*, 3(12), 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
32. Reis e Sousa C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current opinion in immunology*, 16(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>
33. Moll H. (2003). Dendritic cells and host resistance to infection. *Cellular microbiology*, 5(8), 493–500. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00291.x>
34. Brandonisio, O., Spinelli, R., & Pepe, M. (2004). Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and infection*, 6(15), 1402–1409. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.10.004>

- 35.** Xin, L., Li, K., & Soong, L. (2008). Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Molecular immunology*, 45(12), 3371–3382. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.04.018>
- 36.** Soong L. (2008). Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(7), 4355–4360. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4355>
- 37.** Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C., & Sacks, D. (2002). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(8), 3992–4000. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.8.3992>
- 38.** Bennett, C. L., Misslitz, A., Colledge, L., Aebischer, T., & Blackburn, C. C. (2001). Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European journal of immunology*, 31(3), 876–883. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200103\)31:3<876::aid-immu876>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200103)31:3<876::aid-immu876>3.0.co;2-i)
- 39.** Elmahallawy, E. K., Alkhaldi, A., & Saleh, A. A. (2021). Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 139, 111671.
- 40.** Gabriel, Á., Valério-Bolas, A., Palma-Marques, J., Mourata-Gonçalves, P., Ruas, P., Dias-Guerreiro, T., & Santos-Gomes, G. (2019). Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response

against a Polymorphic Parasitic Disease. *Journal of immunology research*, 2019, 2603730. <https://doi.org/10.1155/2019/2603730>

41. Mbongue, J. C., Nieves, H. A., Torrez, T. W., & Langridge, W. H. (2017). The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Frontiers in immunology*, 8, 327. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00327>
42. Franke, E. D., McGreevy, P. B., Katz, S. P., & Sacks, D. L. (1985). Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 134(4), 2713–2718.
43. Turco, S. J., & Descoteaux, A. (1992). The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual review of microbiology*, 46, 65–94. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.000433>
44. Mule, S. N., Saad, J. S., Fernandes, L. R., Stolf, B. S., Cortez, M., & Palmisano, G. (2020). Protein glycosylation in *Leishmania* spp. *Molecular omics*, 16(5), 407–424. <https://doi.org/10.1039/d0mo00043d>
45. Späth, G. F., Epstein, L., Leader, B., Singer, S. M., Avila, H. A., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000). Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9258–9263. <https://doi.org/10.1073/pnas.160257897>
46. Forestier, C. L., Gao, Q., & Boons, G. J. (2015). *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this

- highly complex and multifunctional glycoconjugate?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 193. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00193>
- 47.** Sacks, D. L., Modi, G., Rowton, E., Späth, G., Epstein, L., Turco, S. J., & Beverley, S. M. (2000). The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1), 406–411. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.406>
- 48.** Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Delgado, J., Carrillo-Carrasco, N., Kobeh, L. G., Ruiz, A., Cervantes, R., Torres, A. P., Cabrera, N., González, A., Maldonado, C., & Isibasi, A. (2003). Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and biochemical parasitology*, 130(2), 65–74. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(03\)00160-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(03)00160-9)
- 49.** Kavooosi, G., Ardestani, S. K., & Kariminia, A. (2009). The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to Leishmania major phosphoglycans (PGs). *Parasitology*, 136(10), 1193–1199. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990473>
- 50.** Chandra, D., & Naik, S. (2008). Leishmania donovani infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clinical and experimental immunology*, 154(2), 224–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03741.x>
- 51.** Cecílio, P., Pérez-Cabezas, B., Santarém, N., Maciel, J., Rodrigues, V., & Cordeiro da Silva, A. (2014). Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Frontiers in immunology*, 5, 480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00480>

52. Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature reviews. Immunology*, 2(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>
53. Ara, A., Ahmed, K. A., & Xiang, J. (2018). Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. *ImmunoTargets and therapy*, 7, 55–61. <https://doi.org/10.2147/ITT.S163614>
54. Jia, J., Wang, Z., Li, X., Wang, Z., & Wang, X. (2012). Morphological characteristics and co-stimulatory molecule (CD80, CD86, CD40) expression in tumor infiltrating dendritic cells in human endometrioid adenocarcinoma. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 160(2), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.11.020>
55. Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H., & Kurts, C. (2011). Chemokines: a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in immunology*, 2, 31. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00031>
56. Kalavi, K., Jorjani, O., Faghihi, M. A., & Mowla, S. J. (2021). Cytokine Gene Expression Alterations in Human Macrophages Infected by *Leishmania major*. *Cell journal*, 22(4), 476–481. <https://doi.org/10.22074/cellj.2021.6524>
57. Santos, C. O., Costa, S. F., Souza, F. S., Mendes, J., de Pinheiro, C., Moreira, D., Silva, L. K., de Lima, V., & de Sá Oliveira, G. G. (2021). Blocking IL-10 signaling with soluble IL-10 receptor restores in vitro specific lymphoproliferative response in dogs with leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PloS one*, 16(1), e0239171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239171>

- 58.** Banerjee, S., Bose, D., Chatterjee, N., Das, S., Chakraborty, S., Das, T., & Saha, K. D. (2016). Attenuated Leishmania induce pro-inflammatory mediators and influence leishmanicidal activity by p38 MAPK dependent phagosome maturation in Leishmania donovani co-infected macrophages. *Scientific reports*, *6*, 22335. <https://doi.org/10.1038/srep22335>
- 59.** 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>
- 60.** Gabryšová, L., Howes, A., Saraiva, M., & O'Garra, A. (2014). The regulation of IL-10 expression. *Current topics in microbiology and immunology*, *380*, 157–190. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43492-5_8
- 61.** Saraiva, M., Vieira, P., & O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of experimental medicine*, *217*(1), e20190418. <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>
- 62.** Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, *19*, 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- 63.** Creery, W. D., Diaz-Mitoma, F., Fillion, L., & Kumar, A. (1996). Differential modulation of B7-1 and B7-2 isoform expression on human monocytes by cytokines which influence the development of T helper cell phenotype. *European journal of immunology*, *26*(6), 1273–1277. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260614>
- 64.** Navin, T. R., Krug, E. C., & Pearson, R. D. (1989). Effect of immunoglobulin M from normal human serum on Leishmania donovani promastigote

- agglutination, complement-mediated killing, and phagocytosis by human monocytes. *Infection and immunity*, 57(4), 1343–1346.
<https://doi.org/10.1128/iai.57.4.1343-1346.1989>
- 65.** Franco, L. H., Beverley, S. M., & Zamboni, D. S. (2012). Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan. *Journal of parasitology research*, 2012, 165126.
<https://doi.org/10.1155/2012/165126>
- 66.** Moss, J. M., Reid, G. E., Mullin, K. A., Zawadzki, J. L., Simpson, R. J., & McConville, M. J. (1999). Characterization of a novel GDP-mannose:Serine-protein mannose-1-phosphotransferase from *Leishmania mexicana*. *The Journal of biological chemistry*, 274(10), 6678–6688.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6678>
- 67.** Titus, R. G., Marchand, M., Boon, T., & Louis, J. A. (1985). A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite immunology*, 7(5), 545–555. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1985.tb00098.x>
- 68.** Inaba, K., & Inaba, M. (2005). Antigen recognition and presentation by dendritic cells. *International journal of hematology*, 81(3), 181–187.
<https://doi.org/10.1532/IJH97.04200>
- 69.** McConville, M. J., de Souza, D., Saunders, E., Likic, V. A., & Naderer, T. (2007). Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. *Trends in parasitology*, 23(8), 368–375.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.06.009>

- 70.** McConville, MJ, Bacic, A., Mitchell, GF y Handman, E. (1987). El lipofosfoglicano de *Leishmania major* que vacuna contra la leishmaniasis cutánea contiene un ancla lipídica de alquilglicerofosfoinositol. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América* , 84 (24), 8941–8945. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.8941>
- 71.** Campos, MA, Almeida, IC, Takeuchi, O., Akira, S., Valente, EP, Procópio, DO, Travassos, LR, Smith, JA, Golenbock, DT y Gazzinelli, RT (2001). Activación del receptor 2 tipo Toll por anclas de glicosilfosfatidilinositol de un parásito protozoario. *Revista de inmunología (Baltimore, Maryland: 1950)* , 167 (1), 416–423. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>
- 72.** Roy, K., Naskar, K., Ghosh, M., & Roy, S. (2014). Class II MHC/peptide interaction in *Leishmania donovani* infection: implications in vaccine design. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(12), 5873–5880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302970>
- 73.** Locksley, R. M., Reiner, S. L., Hatam, F., Littman, D. R., & Killeen, N. (1993). Helper T cells without CD4: control of leishmaniasis in CD4-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5127), 1448–1451. <https://doi.org/10.1126/science.8367726>
- 74.** Gossage, S. M., Rogers, M. E., & Bates, P. A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, 33(10), 1027–1034. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00142-5)
- 75.** da Silva, R., & Sacks, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and*

immunity, 55(11), 2802–2806. <https://doi.org/10.1128/iai.55.11.2802-2806.1987>

- 76.** Serafim, T. D., Coutinho-Abreu, I. V., Oliveira, F., Meneses, C., Kamhawi, S., & Valenzuela, J. G. (2018). Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nature microbiology*, 3(5), 548–555. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7>
- 77.** Brittingham, A., & Mosser, D. M. (1996). Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology today (Personal ed.)*, 12(11), 444–447. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)10067-3](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)10067-3)
- 78.** Jacobs, T., Andrä, J., Gaworski, I., Graefe, S., Mellenthin, K., Krömer, M., Halter, R., Borlak, J., & Clos, J. (2005). Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania* major infection. *Medical microbiology and immunology*, 194(3), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s00430-004-0229-y>
- 79.** Naderer, T., Vince, J. E., & McConville, M. J. (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current molecular medicine*, 4(6), 649–665. <https://doi.org/10.2174/1566524043360069>
- 80.** Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H., & Joiner, K. A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania* major promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(12), 4311–4316.

- 81.** Haniffa, M., Bigley, V., & Collin, M. (2015). Human mononuclear phagocyte system reunited. *Seminars in cell & developmental biology*, *41*, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.05.004>
- 82.** Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in physiology education*, *37*(4), 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
- 83.** Rodríguez-Serrato, M. A., Salinas-Carmona, M. C., & Limón-Flores, A. Y. (2020). Immune response to *Leishmania mexicana*: the host-parasite relationship. *Pathogens and disease*, *78*(8), ftaa060. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa060>
- 84.** Hurdayal, R., & Brombacher, F. (2017). Interleukin-4 Receptor Alpha: From Innate to Adaptive Immunity in Murine Models of Cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, *8*, 1354. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01354>
- 85.** Pedraza-Zamora, C. P., Delgado-Domínguez, J., Zamora-Chimal, J., & Becker, I. (2017). Th17 cells and neutrophils: Close collaborators in chronic *Leishmania mexicana* infections leading to disease severity. *Parasite immunology*, *39*(4), 10.1111/pim.12420. <https://doi.org/10.1111/pim.12420>
- 86.** Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Müller, K. E., Nerland, A. H., & Floeter-Winter, L. M. (2019). Differential immune response modulation in early *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c and C57BL/6

macrophages based on transcriptome profiles. *Scientific reports*, 9(1), 19841.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-56305-1>

- 87.** Restrepo, C. M., Llanes, A., Herrera, L., Ellis, E., Leonart, R., & Fernández, P. L. (2021). Gene expression patterns associated with *Leishmania panamensis* infection in macrophages from BALB/c and C57BL/6 mice. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(2), e0009225.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009225>
- 88.** Favila, M. A., Geraci, N. S., Jayakumar, A., Hickerson, S., Mostrom, J., Turco, S. J., Beverley, S. M., & McDowell, M. A. (2015). Differential Impact of LPG- and PG-Deficient *Leishmania major* Mutants on the Immune Response of Human Dendritic Cells. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(12), e0004238.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004238>
- 89.** Nagy, N. A., de Haas, A. M., Geijtenbeek, T., van Ree, R., Tas, S. W., van Kooyk, Y., & de Jong, E. C. (2021). Therapeutic Liposomal Vaccines for Dendritic Cell Activation or Tolerance. *Frontiers in immunology*, 12, 674048.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674048>
- 90.** Field, A. E., Wagage, S., Conrad, S. M., & Mosser, D. M. (2007). Reduced pathology following infection with transgenic *Leishmania major* expressing murine CD40 ligand. *Infection and immunity*, 75(6), 3140–3149.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00160-07>
- 91.** Zamora-Chimal, J., Fernández-Figueroa, E. A., Ruiz-Remigio, A., Wilkins-Rodríguez, A. A., Delgado-Domínguez, J., Salaiza-Suazo, N., Gutiérrez-Kobeh, L., & Becker, I. (2017). NKT cell activation by *Leishmania mexicana*

LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology*, 222(2), 454–462.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.003>

- 92.** Hsu, A. C., & Scott, P. (2007). Leishmania mexicana infection induces impaired lymph node expansion and Th1 cell differentiation despite normal T cell proliferation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(12), 8200–8207. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8200>

Pies de figura

Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

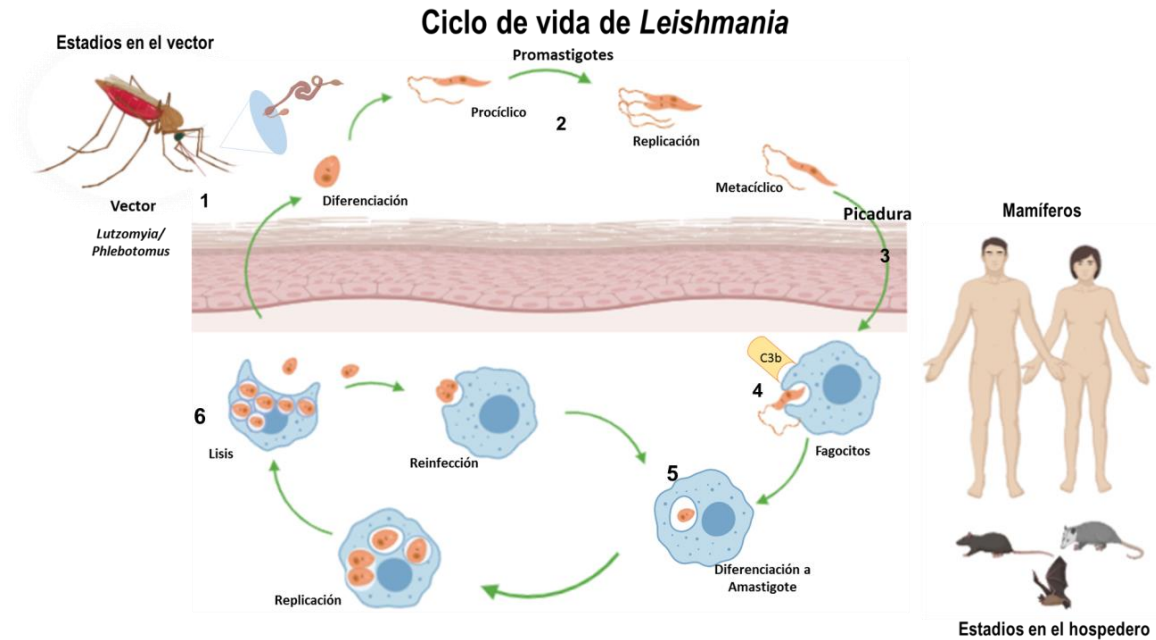


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. El parásito tiene un ciclo de vida dimórfico en donde presenta diversos estadios. 1. El ciclo de vida comienza cuando el vector se alimenta de sangre infectada con amastigotes. 2. En el interior del intestino de la mosca, los promastigotes se diferencian en procíclicos, nectomonas, leptomonas y metacíclicos siendo la fase metacíclica la más infectiva y altamente transmisible. 3. El vector inocula los parásitos en la dermis del mamífero hospedero liberando a los promastigotes. 4. Los parásitos son degradados por el sistema de complemento, eliminando hasta un 90%, mientras que los que no fueron degradados, son ingeridos por fagocitos. 5. Dentro de los fagocitos los promastigotes se diferenciarán a amastigotes. 6. Posteriormente, se replican dentro de las células hasta lograr un estrés mecánico lo cual deriva en la lisis de la célula

hospedera y reinfección de nuevos fagocitos. El ciclo de vida continua cuando la mosca de la arena se alimenta de la sangre de un hospedero infectado y posteriormente infecta a un hospedero sano. Creado en BioRender y modificado de De Pablos, Ferreira & Walrad, 2016.

Funciones efectoras del LPG en DC.

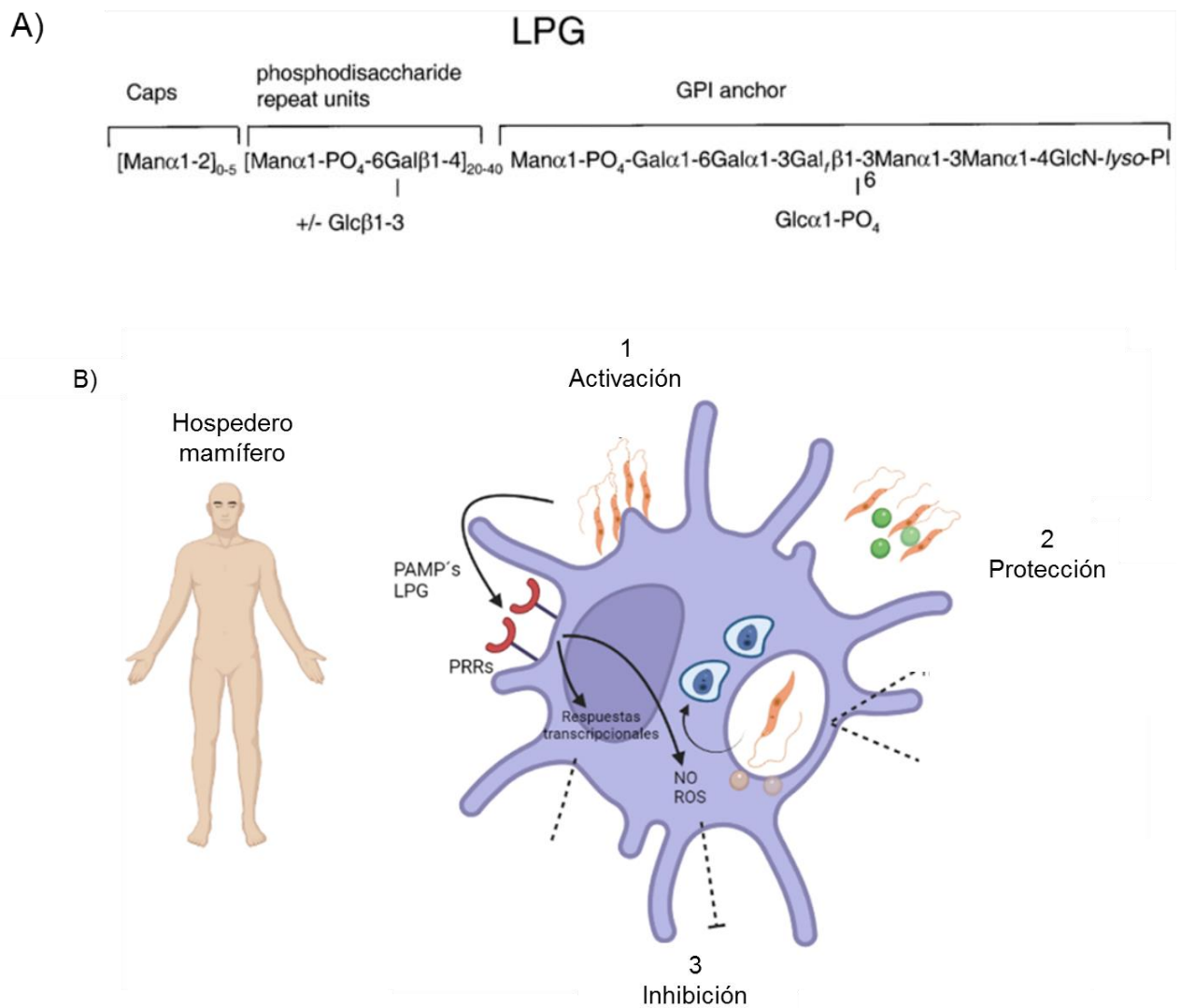


Fig. 2 Funciones efectoras del LPG en DC. A) LPG se conforma por una macromolécula compuesta por cuatro dominios distintos: un motivo de anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI), un núcleo de glucano, una cadena de fosfoglicano lineal (PG) y una tapa de oligosacárido de terminación. B) El LPG puede actuar en la activación eficaz de las funciones de los fagocitos del hospedero, entre las cuales destacan: (1) La activación celular mediante el reconocimiento de PAMPs; (2) Protección de promastigotes ante la lisis celular (3) Inhibición de vías de señalización, así como la alteración de la síntesis de especies de nitrógeno y citocinas relacionadas con el control de la infección y la protección de ROS. Figuras tomadas de (Moss et al., 1999; Franco, Beverley & Zamboni., 2012) y modificadas en BioRender.

Lisis del parásito por el sistema de complemento

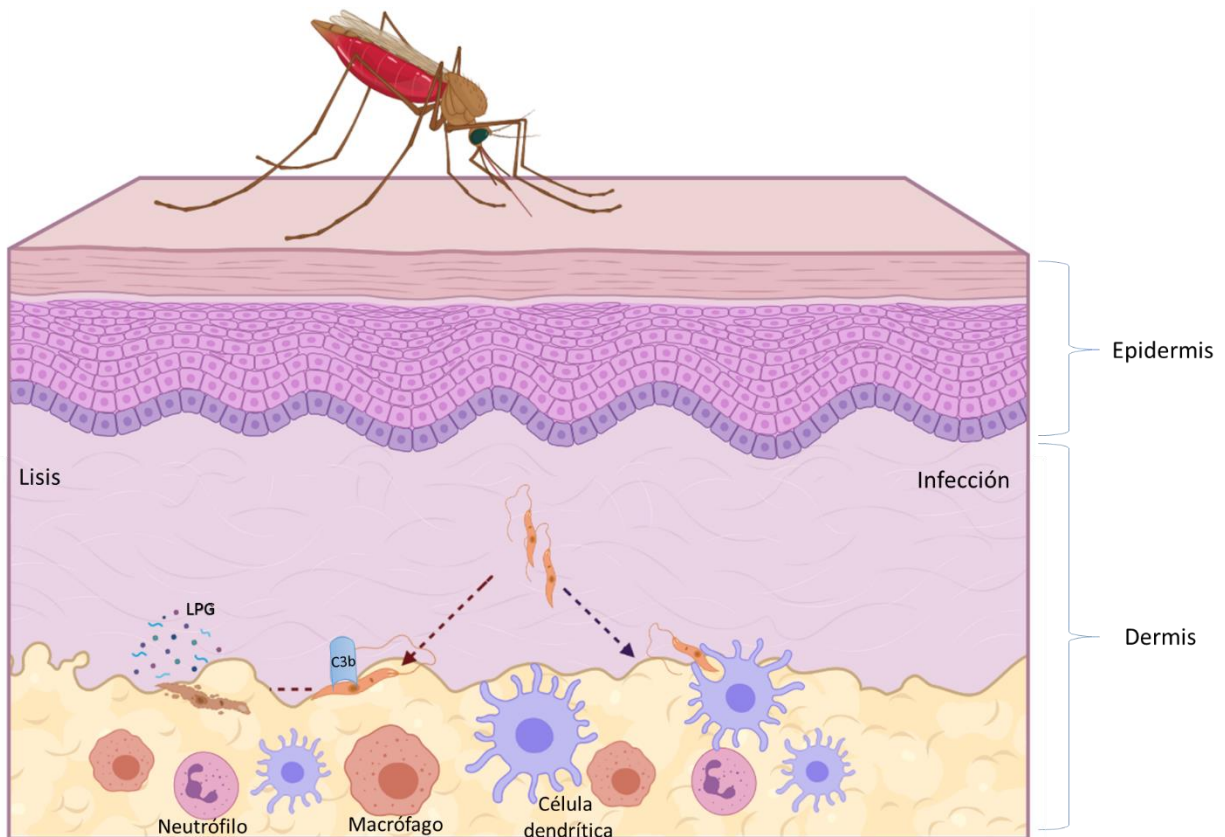


Fig. 3 Lisis del parásito por el sistema de complemento Una vez que los parásitos entran en la dermis del hospedero y activan el sistema de complemento C3b se adhiere a su membrana y genera poros para poder degradarlo, este proceso se le conoce como lisis por complemento. Los parásitos que sobreviven a la degradación por complemento son ingeridos por fagocitos, los cuales internan al parásito en fagolisosomas para participar en su degradación, esta fagocitosis también se conoce como infección celular. Figura creada en Biorender, basada en la información tomada de (Navin, Krug & Pearson, 1989)

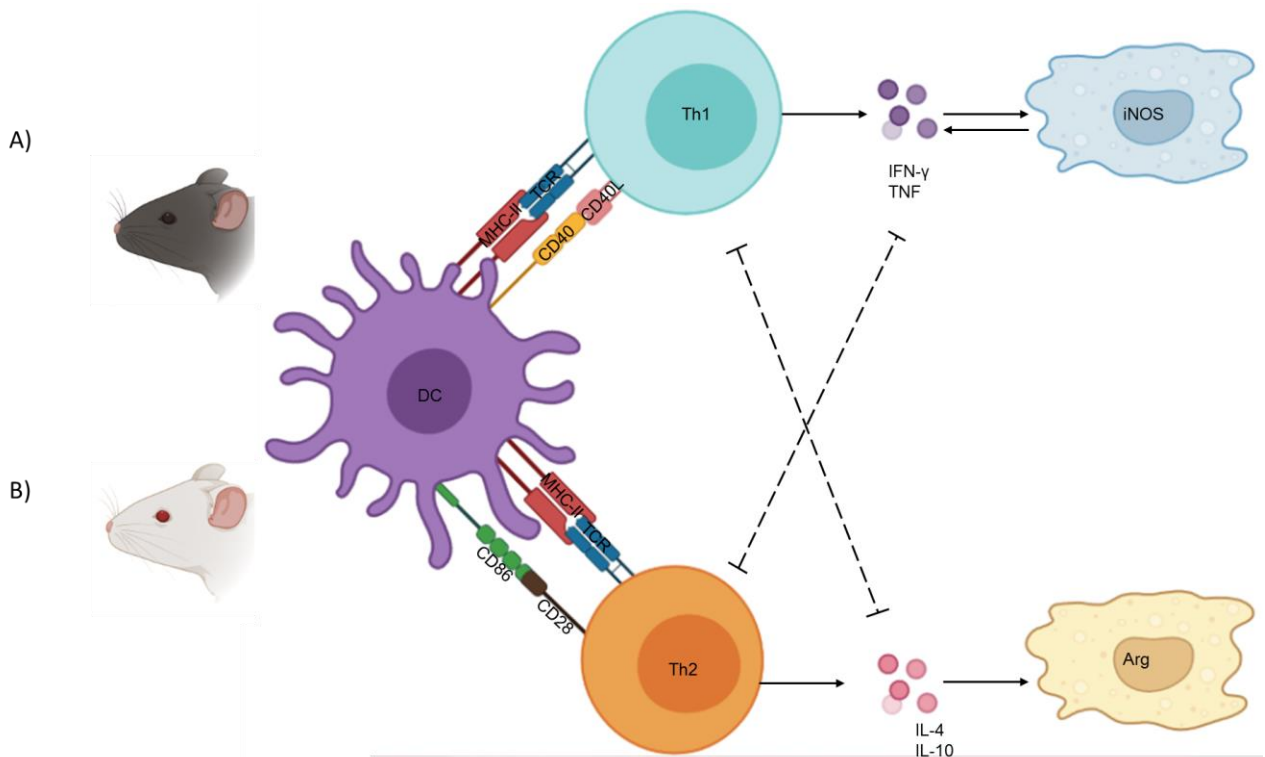


Figura 4. Respuesta inmune en ratones resistentes y susceptibles. (A) Después de la interacción con *Leishmania*, las DC activadas procesan y presentan el antígeno del parásito y producen IL-12, induciendo la diferenciación de linfocitos Th1. Estos son productores de IFN- γ y TNF- α que desencadena la expresión del óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). **(B)** Por el contrario, en ratones BALB/c hay una disminución en la producción de IL-12 y una expresión continua de IL-4 e IL-10, los cuales suprimen la respuesta Th1, e inducen arginasa que produce poliaminas que ayudan al crecimiento del parásito.

Progresión de las lesiones de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L. mexicana*

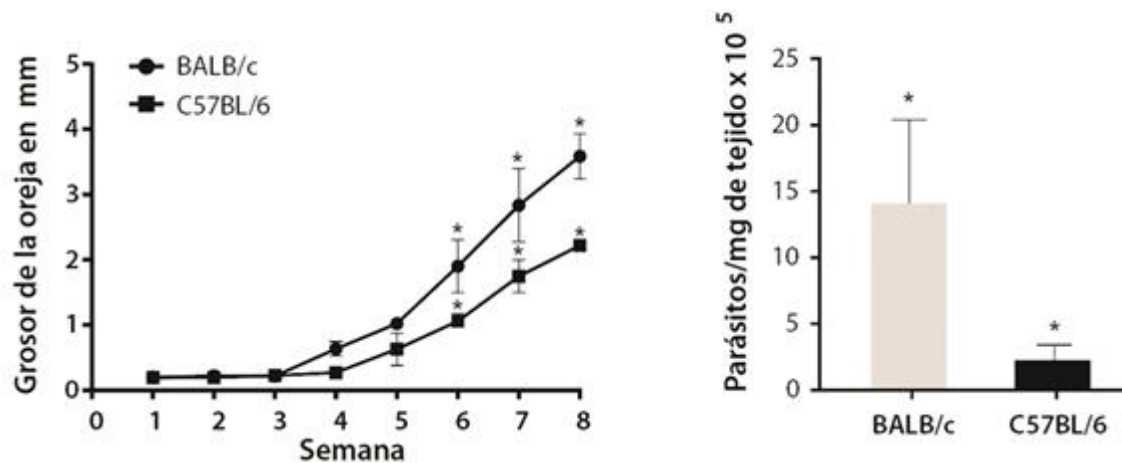


Figura 5. Progresión de las lesiones de ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L. mexicana*. A, Crecimiento de las lesiones en el lóbulo de la oreja de ratones infectados con 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*. B, Cuantificación de la carga parasitaria. Los datos representan la media y la desviación estándar de 4 experimento independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y se representó con *.

Expresión de la molécula MHC-II en células dendríticas ante la infección con *L. mexicana* o la estimulación con LPG purificado

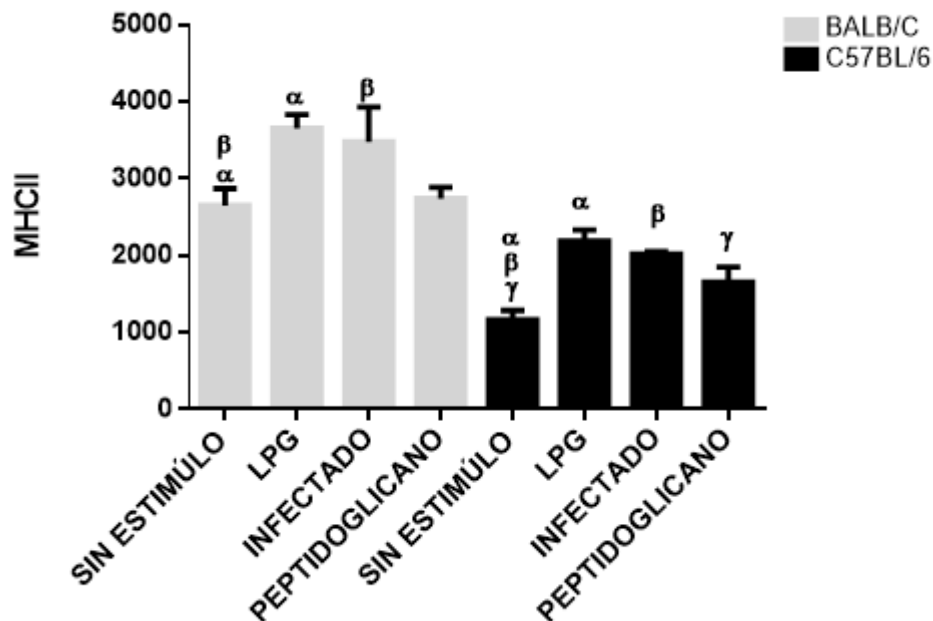


Figura 6. Expresión de la molécula MHC-II en células dendríticas infectadas con *L. mexicana* o estimuladas con LPG purificado. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α , β , γ .

Expresión de la molécula CD40 en células dendríticas estimuladas con LPG o *L. mexicana*

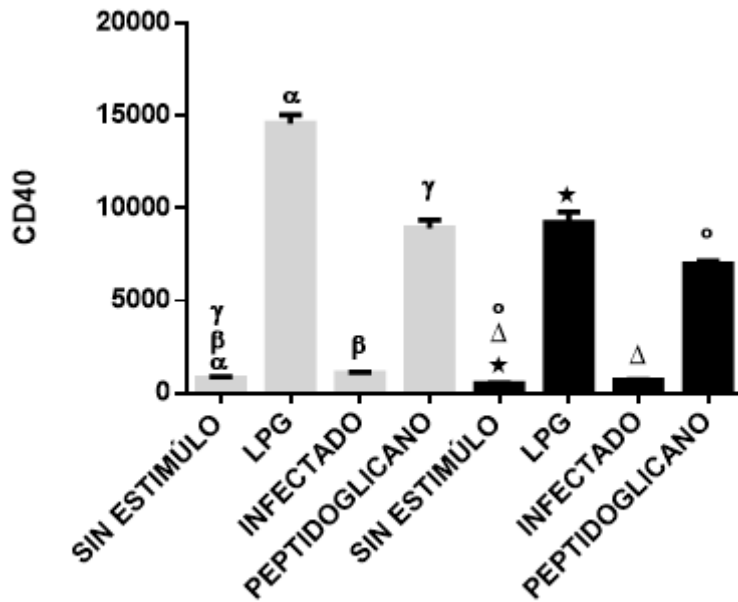


Fig. 7 Expresión de la molécula CD40 en células dendríticas estimuladas con LPG o *L. mexicana*. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α y β para la cepa BALB/c y $^{\circ}$, * , Δ , para la cepa C57BL/6.

Expresión de la molécula CD86 en DC estimuladas con LPG estimuladas con LPG o *L. mexicana*

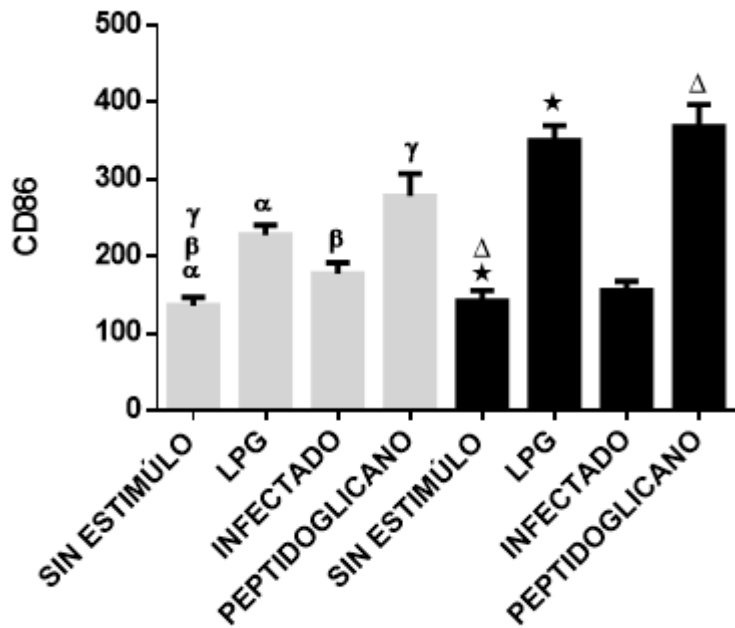


Fig. 8 Expresión de la molécula CD86 en DC estimuladas con LPG estimuladas o *L. mexicana*. Se pulsaron 1×10^5 células dendríticas con $10 \mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o $10 \mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α , β , γ para la cepa BALB/c y *, Δ para la cepa C57BL/6.

Producción de IL-12 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la estimulación con LPG purificado y la infección con *L. mexicana*

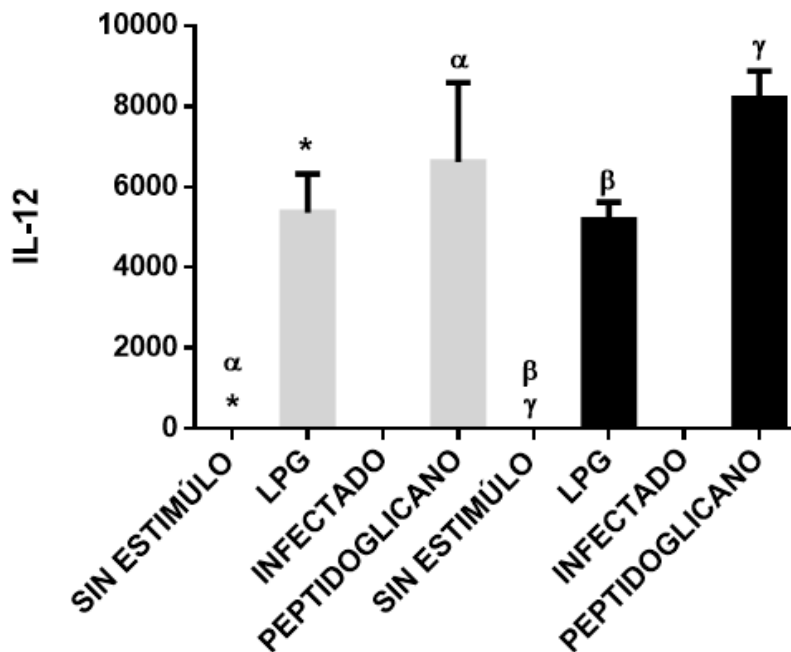


Fig. 9 Producción de IL-12 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la estimulación con LPG purificado y la infección con *L. mexicana*. Se pulsaron 1.5×10^5 células dendríticas con $10 \mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o $10 \mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas, posteriormente se cuantificó IL-12 mediante ELISA en los sobrenadantes. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos $\alpha, *$, para la cepa BALB/c y β, γ para la cepa C57BL/6.

Producción de interleucina 10 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L. mexicana* y la estimulación con LPG purificado

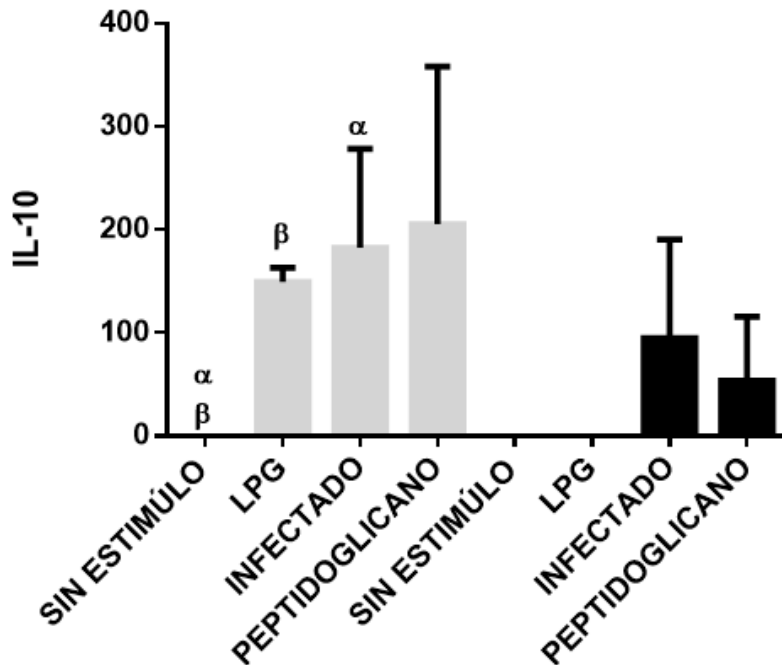


Fig. 10 Producción de interleucina 10 en células dendríticas de ratones BALB/c y C57BL/6 ante la infección con promastigotes de *L. mexicana* y la estimulación con LPG purificado. Se pulsaron 1.5×10^5 células dendríticas con 10 $\mu\text{g/mL}$ de LPG, promastigotes en relación 1:10 o 10 $\mu\text{g/mL}$ de peptidoglicano por 24 horas, posteriormente se cuantificó IL-10 mediante ELISA en los sobrenadantes. Las barras representan la media con la desviación estándar de 4 experimentos independientes. Una $p \leq 0.05$ fue considerada significativa y representada con los símbolos α y β .