

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ANÁLISIS DEL EFECTO MODULADOR QUE EJERCE
Leishmania SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 E IL-12
EN CELULAS DENDRÍTICAS DE RATÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

ADRIANA RUIZ REMIGIO

DIRECTORA DE TESIS: DR. INGEBORG BECKER FAUSER

MEXICO, D. F.



ENERO, 2005

COORDINACIÓN

m. 340696



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Adriana Ruiz Remigio

FECHA: 02-Febrero-2005

FIRMA: Adriana Ruiz Remigio

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Ruiz Remigio Adriana** con número de cuenta **88113726**, y número de expediente **3991168** con la tesis titulada: "**Análisis del efecto modulador que ejerce Leishmania sobre la producción de IL-10 e IL-12 en células dendríticas de ratón**", bajo la dirección del(a) **Dra. Ingeborg Becker Fauser**.

Presidente:	Dr. Raúl Mancilla Jiménez
Vocal:	Dra. Martha Legorreta Herrera
Secretario:	Dra. Ingeborg Becker Fauser
Suplente:	Dra. Gladys Carmen Fragoso González
Suplente:	Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 27 de enero del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo estuvo apoyado por los proyectos 37538-M de CONACYT e IN231602-3 de DGAPA.

El desarrollo de esta Tesis estuvo bajo la dirección de la Dra. Ingeborg Becker Fauser en el laboratorio de Inmunoparasitología, del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM.

A lo largo de este proyecto de Tesis se contó con la colaboración de la Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar y del Dr. Raúl Mancilla Jiménez como miembros del Comité Tutorial.

La revisión del presente trabajo además, estuvo a cargo de la Dra. Martha Legorreta Herrera y de la Dra. Gladys Carmen Fragoso González como miembros del jurado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque día con día me llena de bendiciones.

Especialmente agradezco a mis padres Alicia y Angel y a mi hermano Edgar por el apoyo incondicional que siempre me han brindado pues sin el no lo hubiera logrado. Los quiero mucho.

A mis abuelitos Esperanza y Pedro por todo su apoyo y cariño.

A mis padrinos, tíos y primos por su confianza, cariño y todo lo bello que me han dado a lo largo de mi existencia.

A José de Jesús por el amor y apoyo que me ha brindado y por impulsarme a seguir adelante. Te amo.

A mis amigas Ilyana, Iraís, Rocely y Alma quienes me han motivado en el momento preciso y por ello han sido importantes en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Becker y a todo el gran equipo del laboratorio de Inmunoparasitología, pues de alguna manera todos han contribuido en este trabajo.

A cada uno de los miembros del comité tutorial que con sus valiosos comentarios se enriqueció el contenido de este escrito.

A la Dra. Laila Gutiérrez por enseñarme técnicas muy importantes para la realización de la tesis y por estar dispuesta siempre para resolver mis dudas.

A Ricardo Vargas y todo el personal del bioterio por proporcionarme los ratones usados en esta investigación. A Lucía Álvarez, Marco Gudiño y Ma. Elena Vargas por su ayuda.

A todas las personas que han contribuido para que este trabajo saliera adelante.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser tan importante en mi desarrollo académico.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
ABREVIATURAS	v
I) INTRODUCCIÓN	1
1) <i>Leishmania</i> , UN PROTOZOARIO QUE CAUSA LEISHMANIASIS	1
2) CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO <i>Leishmania</i>	3
3) DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA LEISHMANIASIS	4
4) CICLO DE VIDA DE <i>Leishmania sp.</i>	4
5) CUADROS CLÍNICOS	6
A) Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	6
B) Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	7
C) Leishmaniasis cutánea esporotriciforme (LE)	9
D) Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)	9
E) Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	10
F) Leishmaniasis visceral (LV)	11
6) ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA LEISHMANIASIS	12
7) LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	14
A) DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	14
i) Células dendríticas de origen linfoide	15
ii) Células dendríticas de origen mieloide	16
iii) Células dendríticas derivadas de monocitos	16
B) RECONOCIMIENTO Y CAPTURA DEL ANTÍGENO POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	17
C) MIGRACIÓN Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	19
8) CITOCINAS PRODUCIDAS POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	22
A) CITOCINAS DE LA INMUNIDAD INNATA	22
i) Interleucina-10 (IL-10)	23
ii) Interleucina-12 (IL-12)	23
iii) Factor de Necrosis Tumoral (TNF)	24
B) CITOCINAS DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA	25

9) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
II) HIPÓTESIS	27
III) OBJETIVOS	27
IV) DISEÑO EXPERIMENTAL	28
1) Animales de laboratorio	28
2) Cultivo de parásitos	28
3) Extracción de médula ósea	29
4) Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón	30
5) Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón	31
6) Estimulación de las células	31
7) ELISA tipo sandwich	32
8) Análisis estadístico	35
V) RESULTADOS	36
A) PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c	36
B) PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6	38
C) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6	40
D) PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c	42
E) PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6	42
F) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6	43
G) PRODUCCIÓN DE TNF- α EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c	45
H) PRODUCCIÓN DE TNF- α EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6	45
I) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6	46
VI) DISCUSIÓN	48
VII) CONCLUSIONES	53
VIII) BIBLIOGRAFÍA	54
APÉNDICE 1. LISTA DE EQUIPOS	60
APÉNDICE 2. LISTA DE REACTIVOS	61
APÉNDICE 3. PREPARACIÓN DE REACTIVOS	63

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical de amplia distribución mundial. Esta parasitosis es transmitida durante la picadura de un mosquito del género *Lutzomyia* y es causada por el protozoario *Leishmania*, un parásito intracelular que reside principalmente en fagocitos mononucleares del hospedero mamífero, tales como macrófagos (M ϕ) y células dendríticas (DC).

Se ha estudiado exhaustivamente la respuesta inmune adquirida en la infección por *Leishmania*. En modelos murinos de cepas susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis se encontró que la cura de esta enfermedad está determinada por una respuesta inmune tipo Th1, con la producción de citocinas activadoras del M ϕ tales como IFN- γ y TNF- α . Por otro lado, la progresión del padecimiento se asoció con una respuesta tipo Th2, con producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 que ejercen un efecto inhibitorio sobre mecanismos leishmanicidas del M ϕ .

Aún se sabe poco sobre la participación de la respuesta inmune innata en el desarrollo del padecimiento. Se desconoce la participación de DC y de M ϕ , así como del efecto que ejerce *Leishmania major* sobre la producción de citocinas por estas células. Debido a que ambas células pueden producir tanto IL-12 y TNF- α (inductoras de una respuesta Th1) así como IL-10 (inductora de una respuesta Th2), será interesante analizar el patrón de citocinas secretadas por estas células cuando están en contacto con el parásito.

En este trabajo se aislaron DC y M ϕ derivados de médula ósea de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis para observar si *Leishmania major* era capaz de modular su secreción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α . Para la diferenciación hacia DC se incubaron las células de médula ósea durante 7 días con GM-CSF e IL-4 y para la diferenciación hacia M ϕ se utilizó M-CSF. Para el análisis del efecto que ejerce el parásito sobre ambas células se incubaron 1×10^6 de DC o de M ϕ con *L. major* (1:10) y como controles positivos se incubaron las células con LPS (100 ng/ml), con LPS y *L. major* y con Poly I:C (10 μ g/ml) por un período de 24 hrs. Se cuantificó la producción de citocinas IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de ELISA.

Los resultados de las células de ratones BALB/c estimuladas con *L. major* mostraron que las DC incrementaron su producción de la citocina IL-12 (p40) (3X) significativamente ($P=0.006$), de IL-10 (2.8X) y no secretaron TNF- α . Los M ϕ incrementaron su producción de IL-12 (p40) (2.2X), de TNF- α (2.3 X) y significativamente de la citocina IL-10 (4.3 X) ($P=0.03$).

Las células de ratones C57BL/6 estimuladas con *L. major* mostraron que las DC no secretaron IL-12 (p40), IL-10 ni TNF- α . Los M ϕ no secretaron IL-12 (p40), pero incrementaron su producción de TNF- α (2.4X) y de IL-10 (4.6X) de manera significativa ($P=0.02$).

En resumen, estos datos revelan que el parásito modula de manera diferente la producción de citocinas en DC y en M ϕ y adicionalmente, esta modulación varía entre cepas de ratones con fondo genético susceptible y resistente a la leishmaniasis. *L. major* estimula una mayor producción de IL-10 e IL-12 (p40) por DC de ratones susceptibles BALB/c que por DC de ratones resistentes C57BL/6. Por otro lado, el parásito induce una mayor producción de IL-10 y TNF- α por M ϕ en comparación con DC y este efecto estimulador sobre el M ϕ es igual en ambas cepas de ratón. La susceptibilidad a la leishmaniasis de ratones BALB/c posiblemente se pueda correlacionar con la secreción elevada de IL-10 por sus DC estimuladas con *L. major*, que es más del doble de la IL-10 secretada por DC de ratones resistentes C57BL/6. Esta citocina secretada tempranamente por DC de ratones susceptibles ejerce un efecto inhibitorio sobre el M ϕ infectado, permitiendo la replicación intracelular incontrolada del parásito. Posiblemente, el efecto inhibitorio ejercido por la IL-10 sobre el M ϕ infectado sea más fuerte que el estímulo inducido por la IL-12 (p40) pues ambas son secretadas por las DC de ratones susceptibles. La presencia de IL-12 no parece ser relevante en conferir protección, ya que su ausencia en ratones C57BL/6 no afecta la resistencia de esta cepa de ratón a la leishmaniasis y por otro lado, su presencia en ratones susceptibles BALB/c no garantiza que estos ratones se protejan contra la infección con *L. major*.

Concluimos que la IL-10 producida por DC posiblemente sea el factor determinante para el pronóstico del padecimiento y que el fondo genético del ratón es determinante para establecer si la DC responde a la infección con *L. major* con una elevada producción de la IL-10.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a tropical disease with a worldwide distribution. The disease is transmitted by a sandfly *Lutzomyia* and caused by the protozoan parasite *Leishmania*, an obligate intracellular parasite that infects mononuclear phagocytes, such as macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC), in the mammalian host.

The acquired immune response has been extensively studied in the *Leishmania* infection. Susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mouse models of leishmaniasis have shown that disease cure is mediated by an Th1 immune response, with production of M ϕ activating cytokines such as IFN- γ and TNF- α . On the other hand, disease progression is associated with a Th2 immune response and the production of IL-4, IL-5 and IL-10, which have an inhibitory effect on the leishmanicidal mechanisms of M ϕ .

Little is known regarding the contribution of the innate immune response in the disease outcome. The effect that *Leishmania major* exerts on the cytokine production of DC and M ϕ has not been studied. Due to the fact that both cells produce IL-12 and TNF- α (Th1 inducers) as well as IL-10 (Th2 inducer), it is tempting to analyze the cytokine pattern secreted by these cells when they are exposed to the parasite.

In the present work we isolated DC and M ϕ from bone marrow cultures of *Leishmania* susceptible (BALB/c) and resistant (C57BL/6) mice, in order to analyze whether *L. major* was capable of modulating the secretion of IL-10, IL-12 (p40) and TNF- α by these cells. The differentiation of DC was achieved by culturing bone marrow cells with GM-CSF and IL-4 during 7 days and M ϕ differentiation was achieved using M-CSF. In order to analyze the effect that the parasite exerted on the cells, 1×10^6 DC or M ϕ were incubated with *L. major* (1:10) and for positive controls, the cells were incubated with LPS (100 ng/ml), with LPS and *L. major* or with Poly I:C (10 μ g/ml). Production of cytokines IL-10, IL-12 (p40) and TNF- α was analyzed in culture supernatants using ELISA.

The results of BALB/c mouse cells showed that stimulation of DC with *L. major* significantly increased their production of IL-12 (p40) (3X) ($P=0.006$), of IL-10 (2.8X) whereas no secretion of TNF- α was detected. In M ϕ , the parasite stimulation induced an increase of IL-12 (p40) (2.2X), of TNF- α (2.3X) and additionally a significant increase of IL-10 (4.3X) ($P=0.03$).

The results of C57BL/6 mouse cells showed that DC stimulated with *L. major* did not secrete IL-12 (p40), IL-10 nor TNF- α . In M ϕ , the parasite stimulation did not induce IL-12

(p40) secretion, yet it increased TNF- α (2.4X) and the IL-10 production increased significantly (4.6X) ($P=0.02$).

Taken together, these data show that the parasite modulates the cytokine production of DC and M ϕ differently and additionally, the modulation varies according to the genetic background of *Leishmania* susceptible and resistant mouse strains. *L. major* stimulates a higher production of IL-10 and IL-12 (p40) in DC of susceptible BALB/c mice as compared to DC of resistant C57BL/6 mice. On the other hand, the parasite induces a higher production of IL-10 and TNF- α in M ϕ as compared to DC, and this stimulatory effect is the same in both mouse strains. The susceptibility of BALB/c mice towards leishmaniasis possibly correlates with the higher secretion of IL-10 by its DC, which is double as much as that of DC of resistant C57BL/6 mice. The early secretion of this cytokine by DC in susceptible mice exerts an inhibitory effect on infected M ϕ , permitting the uncontrolled intracellular replication of the parasite. Possibly the inhibitory effect induced by IL-10 on the infected M ϕ is stronger than the stimulatory effect induced by IL-12 (p40), which is also secreted by DC of the susceptible mice. The presence of IL-12 does not seem to be relevant in conferring protection since its absence in C57BL/6 mice does not affect the resistance of these mice towards the *Leishmania* infection and on the other hand, its presence in susceptible BALB/c mice does not guarantee the protection of these mice against the *L. major* infection.

We conclude that the IL-10 produced by DC possibly is the factor that determines the disease outcome and that the genetic background of the mouse is determinant in establishing whether DC respond to the infection of *L. major* increasing their IL-10 production.

ABREVIATURAS

APC	células presentadoras de antígeno
CL	células de Langerhans
DC	células dendríticas
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IDR	intra dermorreacción
IFN	interferón
IL	interleucina
iNOS	cintasa de óxido nítrico inducible
LCD	leishmaniasis cutánea difusa
LCL	leishmaniasis cutánea localizada
LCPD	leishmaniasis cutánea pseudodifusa
LE	leishmaniasis esporotriciforme
LMC	leishmaniasis mucocutánea
LPG	lipofosfoglicano
LPS	lipopolisacárido
LV	leishmaniasis visceral
MCP-1	proteína quimiotáctica del monocito
M-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos
M ϕ	macrófagos
MHC-I	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
NO	óxido nítrico
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	amortiguador salino de fosfatos
SFB	suero fetal bovino
TLR	receptor tipo Toll
TNF	factor de necrosis tumoral

I) INTRODUCCIÓN

1) *Leishmania*, UN PROTOZOARIO QUE CAUSA LEISHMANIASIS

Los protozoarios son organismos cuya característica fundamental es la de estar formados por una sola célula, siendo la mayoría microscópicos con formas sumamente variadas y un tamaño que oscila entre 10 μm y 3 mm de longitud. Los protozoarios han logrado explotar una gran diversidad de ambientes, hay solitarios o coloniales (dentro de las colonias los organismos conservan su individualidad), cosmopolitas en aguas dulces, marinas o terrestres y varios grupos son parásitos de invertebrados y de vertebrados superiores. Actualmente se conocen aproximadamente 65,000 diferentes protozoarios. Al hombre le han causado algunas de las enfermedades más serias y con las más altas mortalidades, aún en la actualidad, como es el caso del paludismo, la disentería amibiana, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Martínez y Gutiérrez, 1985).

La leishmaniasis es una parasitosis que afecta a varias especies de mamíferos incluido de manera importante el hombre. Esta enfermedad es causada por un protozoario intracelular obligado del género *Leishmania* que infecta principalmente células del sistema fagocítico mononuclear. Este protozoario presenta dentro de su ciclo de vida dos estadios que son los de promastigote y amastigote. El promastigote (Figura 1) es la fase móvil y mide de 15 a 20 μm de largo por 1.5 a 4 μm de ancho, su forma es alargada, tiene un núcleo central y un cuerpo basal por delante del cinetoplasto donde nace su flagelo. Esta fase habita en el vector que es la hembra de un mosquito hematófago del género *Phlebotomus*, así conocido en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo conocido como *Lutzomyia* (Figura 2). El amastigote (Figura 3) representa la fase inmóvil, es de forma redondeada u oval con

aproximadamente 2 a 5 μm de diámetro, con un núcleo excéntrico, un cinetoplasto y carente de flagelo. Su citoplasma está cubierto por una doble membrana. Este estadio se desarrolla dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear del mamífero hospedero (Lezama e Isaac, 1995).



Figura 1. Promastigotes de *Leishmania sp.*



Figura 2. *Lutzomyia sp.*, vector transmisor de la leishmaniasis en el Nuevo Mundo.



Figura 3. Amastigotes de *Leishmania sp.* en el interior de un macrófago.

2) CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO *Leishmania*

REINO: Protista

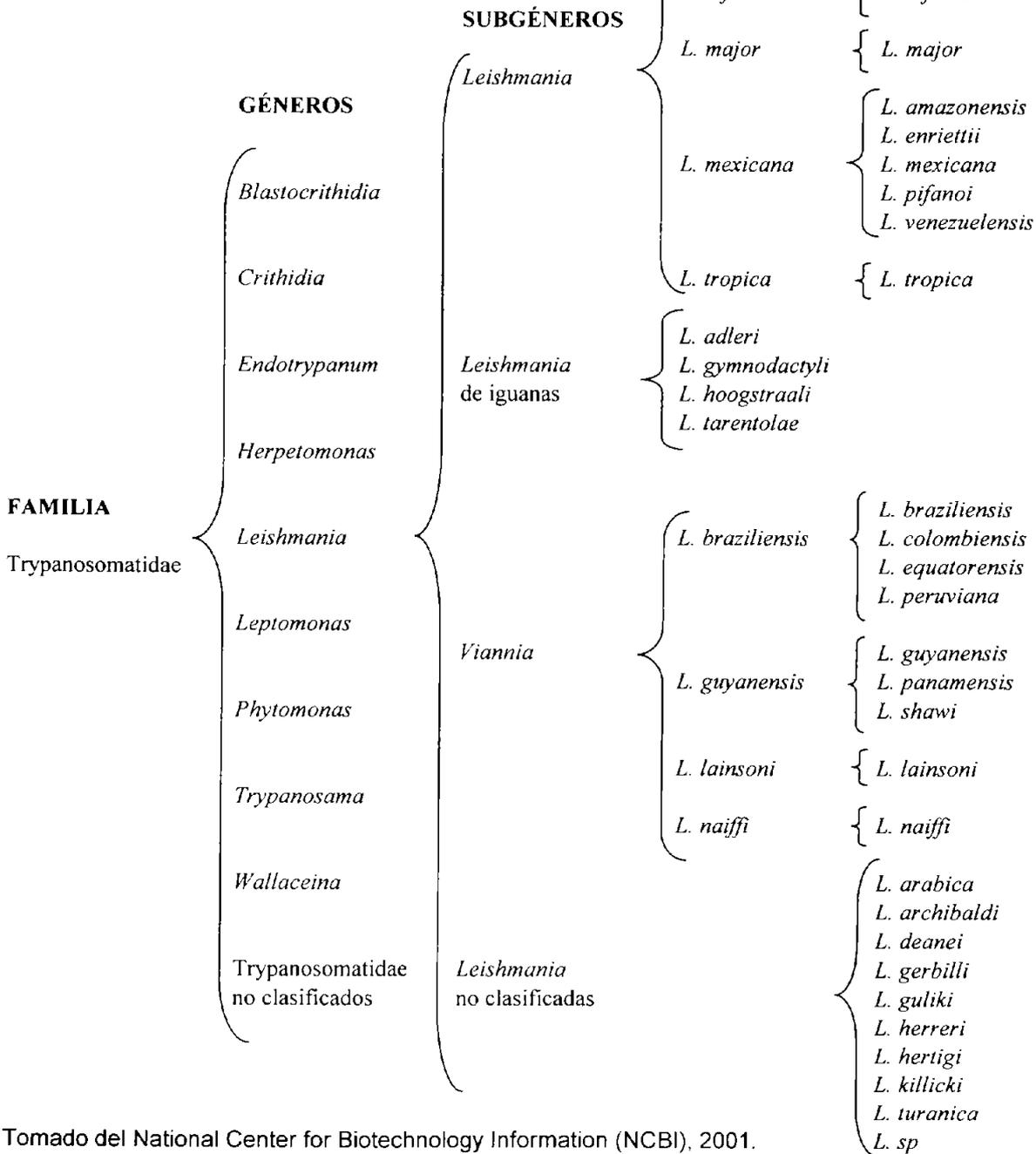
PHYLUM: Sarcomastigophora

SUBPHYLUM: Mastigophora

CLASE: Zoomastigophora

ORDEN: Kinetoplastida

SUBORDEN: Trypanosomatida



Tomado del National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2001.

3) DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA LEISHMANIASIS

La leishmaniasis es una enfermedad de amplia distribución geográfica en el mundo, se presenta de manera preferente en las zonas tropicales y subtropicales en todos los continentes a excepción de Australia y la Antártida (OPS/OMS, 1994).

En México se extiende del lado del Atlántico, desde Coahuila y Tamaulipas hasta la Península de Yucatán y en el Pacífico, desde Nayarit hasta Chiapas (Velasco, 1987). En total se ha identificado en 17 estados: Campeche, Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Velasco *et al.*, 1991b; OPS/OMS, 1994).

4) CICLO DE VIDA DE *Leishmania sp.*

El ciclo de vida de *Leishmania* se divide en dos fases en las que interviene por un lado el vector o transmisor que es el mosquito hematófago y por otro el hospedero mamífero, donde se manifiesta la enfermedad. Además del hombre la leishmaniasis se ha detectado en mamíferos domésticos y silvestres como perros, perezosos, osos hormigueros, martuchas, mapaches, tejones, tepezcuintles, tlacuaches y ratones (Lezama e Isaac, 1995).

En el tracto digestivo del insecto, el parásito se presenta en la forma de promastigote y una vez que el mosquito pica al mamífero para alimentarse de su sangre, inocular a los promastigotes en su fase más infectiva que es la metacíclica. Estos infectan a los macrófagos y a las células dendríticas inmaduras o células de Langerhans principalmente. Una vez dentro de las células, los promastigotes pierden sus flagelos, transformándose así en amastigotes (Lezama e Isaac, 1995).

Los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta que la célula estalla, liberando a los parásitos que infectan nuevas células. Cuando un mosquito pica a un organismo

infectado, adquiere a los amastigotes intracelulares que en su tracto digestivo se diferencian a promastigotes y así puede infectar nuevamente a otro individuo (Figura 4) (Killick-Kendrick *et al.*, 1974).

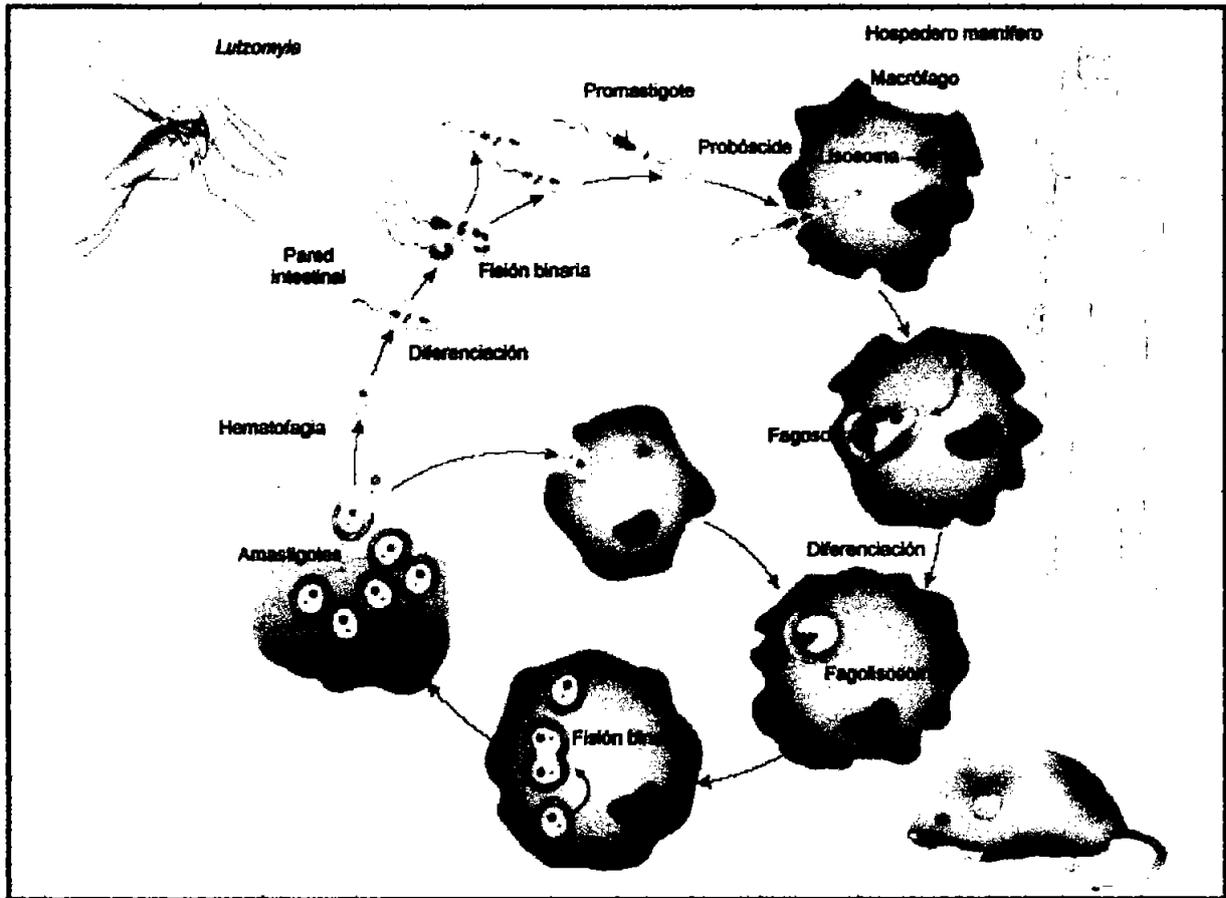


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

5) CUADROS CLÍNICOS

Las características de los cuadros clínicos dependen de varios factores que incluyen la especie de *Leishmania*, la eficiencia en la respuesta inmune del hospedero que está influida por factores genéticos o bien por infecciones agregada por otros organismos patogénicos. Cuando la infección está restringida a la piel, se produce la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y la leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD) (Velasco, 1987). En la leishmaniasis mucocutánea (LMC) las lesiones ocurren en mucosas y en la leishmaniasis visceral (LV) el parásito se encuentra en bazo e hígado (Velasco *et al.*, 1991a).

A) Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Esta forma clínica puede ser causada por *Leishmania major*, en México es causada por *Leishmania mexicana mexicana* y es conocida como “úlceras de los chicleros”, se caracteriza por la presencia de uno o múltiples nódulos, dependiendo del número de veces que el transmisor picó a la persona. La ulceración aparece de 15 a 20 días después de la picadura y es generalmente redondeada de bordes indurados, fondo limpio e indolora (Figura 5) (Velasco, 1991a). Con excepción de las lesiones auriculares que son muy destructivas, la úlcera puede curar espontáneamente en un plazo de 6 meses a 2 años o con quimioterapia con antimoniales (Becker *et al.*, 1999). La hipersensibilidad se desarrolla en forma temprana y los pacientes son positivos a la intra dermorreacción (IDR) con leishmanina (prueba de Montenegro) (Castes *et al.*, 1983). En las lesiones de pacientes con LCL se presenta un infiltrado intenso de células de Langerhans (células dendríticas inmaduras) en la epidermis en un número de 363 ± 72 células y ocasionalmente se encuentran

en granulomas de la dermis papilar, además en los infiltrados de las lesiones se presentan linfocitos T, en mayor número los T CD4⁺ (663±137) que los T CD8⁺ (580±100). Las células NK se presentan en un número de 364±70 y se distribuyen de manera uniforme en las lesiones, por otro lado, la presencia de los macrófagos es escasa (243±72) y muy pocos están parasitados (Salaiza-Suazo *et al.*, 1999).



Figura 5. Lesión característica de una leishmaniasis cutánea localizada (LCL).

B) Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Esta manifestación clínica puede ser causada por *Leishmania aethiopica* o por *Leishmania mexicana amazonensis* y en México por *Leishmania mexicana mexicana*. La LCD se inicia con un nódulo que no se ulcera y se disemina por vía linfática, dando como resultado la formación de múltiples nódulos en todo el tegumento cutáneo (Figura 6) con excepción de cuero cabelludo, palmas de las manos, plantas de los pies, región axilar, inguinal y genital, aunque en México es frecuente encontrarla también en mucosas y genitales. Estos pacientes son negativos a la IDR con leishmanina. A diferencia de la LCL, la LCD es de difícil tratamiento y generalmente causa la muerte del individuo por invasión

del parásito a las mucosas naso y orofaríngeas, causando obstrucción de las vías respiratorias y digestivas. Los macrófagos de los pacientes con LCD generalmente están intensamente parasitados y su respuesta inmune celular se encuentra inhibida mientras que la respuesta humoral está aumentada, aunque sin ser protectora (W.H.O., 1984; Walton y Velasco, 1987; Velasco *et al.*, 1989). En las lesiones de los sujetos con LCD hay una disminución importante en el número de células, las células de Langerhans están en un número de 155 ± 29 compactadas en la epidermis y sus dendritas están muy cortas, los linfocitos T $CD4^+$ se presentan en un número de 266 ± 60 y hay 380 ± 82 de linfocitos T $CD8^+$. En las lesiones no se observan granulomas y las células están distribuidas de manera uniforme en el tejido inflamatorio. El número de las células NK también disminuye y es de 222 ± 56 , sin embargo, el número de los macrófagos está aumentado (577 ± 103) y se encuentran altamente parasitados (hasta 15 parásitos por célula) (Salaiza-Suazo *et al.*, 1999).



Figura 6. Lesiones características de una leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

C) Leishmaniasis cutánea esporotriciforme (LE)

La manifestación de esta forma clínica se caracteriza por la presencia de pequeños nódulos subcutáneos que se diseminan por vía linfática, generando un cuadro clínico similar a las lesiones que ocasiona una micosis causada por *Sporothrix shenckii*, es por ello que se le conoce con este nombre. Es causada por *Leishmania aetiopica*. En este caso la IDR es positiva y la presencia de parásitos en las biopsias es escasa (Gaafar *et al.*, 1994; James *et al.*, 1997).

D) Leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD)

Las lesiones de este cuadro clínico son muy parecidas a las que se presentan en la LE, son lesiones nodulares que siguen la trayectoria de los vasos linfáticos, o bien puede ser un conjunto de lesiones nodulares alrededor de otra lesión nodular algunas veces ya ulcerada (Figura 7). Los pacientes que tienen esta forma clínica son negativos a la IDR con leishmanina. Las lesiones poseen escasos parásitos y al igual que las de la LCD, son refractarias al tratamiento con medicamentos o por termoterapia. Esta forma clínica, hasta ahora, solo ha sido descrita para México en la Chontalpa Tabasqueña (Velasco *et al.*, 1997). Berzunza-Cruz y colaboradores (2000) demostraron diferencias entre los aislados de esta forma clínica y otras cepas de *Leishmania mexicana mexicana* aisladas de pacientes con LCL y LCD, mediante un estudio de RFLP del ADN del cinetoplasto.



Figura 7. Lesiones características de una leishmaniasis cutánea pseudodifusa (LCPD).

E) Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

A esta manifestación se le conoce también como espundia y es causada por *Leishmania braziliensis braziliensis* y probablemente también por *Leishmania braziliensis panamensis* y *Leishmania braziliensis guyanensis*. La leishmaniasis mucocutánea se inicia con una lesión cutánea que posteriormente se disemina originando nuevos sitios de infección que se extienden hacia la cavidad oronasal y faríngea (Figura 8) (Castes *et al.*, 1983). Esta condición no cura espontáneamente, es de difícil tratamiento y resistente a la quimioterapia. El abultamiento de nariz y labios causa la característica nariz de tapir y de manera crónica puede presentarse una mutilación severa con obstrucción en las vías respiratorias y los pacientes presentan inanición debido a la odinofagia, por ello hay desnutrición y se puede originar la muerte. En los casos severos se presenta un incremento de células T en el sitio de la lesión (Walton, 1984). En México ha sido observada en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz (Velasco, 1987).



Figura 8. Lesiones características de una leishmaniasis mucocutánea (LMC).

F) Leishmaniasis visceral (LV)

El cuadro clínico que causa la leishmaniasis visceral también se conoce como kala-azar o enfermedad negra y es causado por *Leishmania donovani*. Se caracteriza por la presencia de fiebre, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, pérdida de peso importante, diarrea e hipergamaglobulinemia, además se presenta oscurecimiento de la piel, aunque esto no se ha observado en pacientes mexicanos (Figura 9). Inmunológicamente se observa pérdida de la respuesta de hipersensibilidad cutánea tardía, así como de la reactividad *in vitro* de los linfocitos T a antígenos de *Leishmania*. Cuando la enfermedad se manifiesta no cura espontáneamente y lleva a la muerte a menos que se trate adecuadamente (Hakdar *et al.*, 1983).



Figura 9. Cuadro clínico de la leishmaniasis visceral (LV).

6) ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA LEISHMANIASIS

Los parásitos del género *Leishmania* en sus diversas especies pueden causar un amplio espectro de la enfermedad desde lesiones cutáneas que pueden curar espontáneamente hasta lesiones viscerales que pueden tener un desenlace fatal (Moll, 1993).

El perfil de la enfermedad ha sido estudiado ampliamente en un sistema experimental murino por lo que el ratón ha llegado a ser un modelo excelente para el estudio de la leishmaniasis, sobre todo para la leishmaniasis cutánea pues la severidad de la enfermedad puede ser medida por el tamaño de la lesión cuando el parásito es inoculado en el cojinete plantar. Otra razón del estudio de la leishmaniasis en el modelo murino es debido a que existen cepas de ratones susceptibles y resistentes a la infección y estas son la cepa BALB/c y la C57BL/6 respectivamente. La infección de ratones con *Leishmania major*, causante de la leishmaniasis cutánea, ha sido uno de los primeros modelos *in vivo* para el estudio de la respuesta inmune y los parámetros que determinan que se presente una respuesta tipo Th1 o bien una respuesta tipo Th2. Los ratones C57BL/6, que presentan una respuesta Th1, se caracterizan principalmente por la producción de IFN- γ , resolver sus lesiones y curar; por otro lado, los ratones BALB/c, que presentan una respuesta tipo Th2, producen principalmente IL-4 y mueren por infecciones que no curan (Mentink y Mosser, 2000).

Una de las células de la inmunidad innata que juega un papel importante en la leishmaniasis es el macrófago (M ϕ), pues es una célula fagocítica y por lo tanto puede ser infectada por *Leishmania*, además es una célula secretora de citocinas tales como TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-15 e IL-18, que pueden activar a otras células del sistema inmune. Por otro lado, es una célula presentadora de antígenos profesional y además es una célula efectora pues presenta mecanismos como la producción de óxido nítrico (NO) y el aumento

de radicales de oxígeno con los que pueden destruir a los parásitos (Murray y Nathan, 1999). En la respuesta tipo Th1, el IFN- γ estimula a los M ϕ infectados con *Leishmania* y se activan sus mecanismos leishmanicidas con los que los parásitos son eliminados. Por otro lado, se ha observado que en sujetos con LCD *Leishmania* usa estrategias de evasión de los procesos microbicidas del M ϕ como son la inhibición de mediadores inflamatorios como el TNF- α y la IL-12, impide el estallido oxidativo, suprime la expresión de iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible) y la producción de NO y además baja la regulación de los genes para MHC-I y MHC-II (Stafford *et al.*, 2002).

Otra de las células importantes en la leishmaniasis es la célula dendrítica (DC) que en estado inmaduro puede tomar antígenos y procesarlos, esto es la señal de maduración y se da entonces la migración hacia nódulos linfáticos y presenta el antígeno a linfocitos T pues es una célula presentadora de antígenos profesional. La DC es una de las primeras células con las que se encuentra el parásito en la piel, esta puede fagocitar leishmanias pero a pesar de no tener mecanismos leishmanicidas como el M ϕ , su papel de centinela dentro del sistema inmune es muy importante, ya que por sus características y funciones que serán descritas posteriormente, es fundamental en el desarrollo de la leishmaniasis (Brandonisio *et al.*, 2004). Una de sus principales características es la producción de IL-12, citocina pro-inflamatoria muy importante en esta parasitosis pues va a estimular a las células NK en su producción de IFN- γ y esta citocina estimulará a los M ϕ para que destruyan a la *Leishmania*. La DC es la principal fuente de IL-12 pues se ha observado que en infecciones con *Leishmania donovani* es la DC y no el M ϕ quien produce IL-12 (Gorak *et al.* 1998).

Por otro lado, la regulación de la IL-12 se lleva a cabo por la IL-10, una citocina anti-inflamatoria que desempeña un papel importante en la leishmaniasis, pues suprime la

síntesis de IFN- γ , reduce la producción de NO, baja la expresión de las moléculas MHC-I y MHC-II así como de la molécula co-estimuladora B7 (Padigel *et al.*, 2003). Se ha demostrado que ratones BALB/c deficientes en la producción de IL-10 pueden controlar la infección con *Leishmania major*, lo que sugiere que la IL-10 juega un papel crítico en mediar la susceptibilidad y patogénesis de la leishmaniasis cutánea (Mentink y Mosser, 2001).

7) LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DC) originalmente fueron identificadas por Steinman y Cohn en 1973. Son células accesorias que desempeñan funciones importantes en la inducción de las respuestas inmunitarias. Estas células se identifican morfológicamente como células con proyecciones membranosas o espinosas (Abbas *et al.*, 1995).

Las DC presentan péptidos y proteínas a linfocitos T por lo que son conocidas como células presentadoras de antígeno (APC) (Sathaporn y Eremin, 2001).

A) DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Un avance importante en el estudio biológico de las DC es poderlas propagar *in vitro* usando factores de crecimiento. Así se ha encontrado que las DC son derivadas de la médula ósea y tienen distintos linajes hematopoyéticos. A la fecha se han descrito DC que se pueden desarrollar de un único progenitor por 3 distintas vías y dependiendo de las citocinas, pueden presentar características funcionales distintas (Sathaporn y Eremin, 2001). Varios estudios sugieren que hay diferentes vías para la formación de las DC maduras. Las vías difieren en el progenitor, en los estados intermediarios, en los requerimientos de citocinas,

en la expresión de marcadores de superficie y en las funciones biológicas de las DC (Satthaporn y Eremin, 2001).

i) Células dendríticas de origen linfoide

Inicialmente descritas en el ratón, el término linfoide se refiere a varias características que sugieren a un precursor común con las células T. Las DC de origen linfoide carecen de características presentes en las de origen mieloides, como son los marcadores de superficie CD11b, CD13 y CD33. En sangre, los precursores linfoides pueden ser CD4⁺ CD11⁺. Existe evidencia de que en humanos existe un linaje linfoide equivalente. Las DC linfoides pueden derivarse de progenitores que pueden madurar en células T y células NK. Tales progenitores se localizan en el timo y en las áreas de células T de tejidos linfoides secundarios por lo que las DC linfoides se localizan en áreas ricas en células T en el bazo y en los nódulos linfáticos (Satthaporn y Eremin, 2001). En el ratón las DC linfoides así como las mieloides expresan altos niveles de CD11c, MHC-II y moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40. Las DC de origen linfoide expresan como homodímero al CD8 α y expresan altos niveles de marcadores como el DEC-205 y el CD1d (Banchereau *et al.*, 2000).

A las DC linfoides se les ha atribuido una serie de funciones como son: promover una selección negativa en el timo y ser co-estimuladoras para células T CD4⁺ y CD8⁺. Las DC linfoides pueden producir altas concentraciones de IL-12 y son menos fagocíticas que las DC de origen mieloides. La IL-12 secretada por DC linfoides y no mieloides induce producción de IFN- γ . El precursor linfoide puede dar origen a células B, células NK, células T y DC (Lotze y Thomson, 1999 y Satthaporn y Eremin, 2001).

ii) Células dendríticas de origen mieloide

Las DC de origen mieloide están en zonas marginales del bazo, pero pueden migrar bajo la influencia de señales proinflamatorias como lipopolisacárido (LPS) o extractos de parásitos. En el ratón, las DC mieloides así como las linfoides expresan altos niveles de CD11c, MHC-II y moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40. Cuando las DC mieloides se enfrentan a LPS o son cultivadas *in vitro*, incrementan marcadores como el DEC-205 o CD1d (Banchereau *et al.*, 2000).

Las células de Langerhans (CL) son ejemplo de DC de origen mieloide, son CD34⁺, tienen altos niveles de HLA-DR y HLA-DQ⁺. El precursor mieloide puede dar origen a granulocitos, monocitos y DC (Lotze y Thomson, 1999 y Satthaporn y Eremin, 2001).

iii) Células dendríticas derivadas de monocitos

Hay evidencias de estudios donde se ve la relación entre las DC y las células del linaje monocito/macrófago. Las células mononucleares de sangre periférica adherentes están enriquecidas de monocitos y estos pueden diferenciarse a CL si se cultivan en presencia de suero fetal de ternera, presentan el marcador CD1a cuando se cultivan con GM-CSF. Las citocinas requeridas para la diferenciación de DC *in vitro* a partir de células mononucleares de sangre periférica adherentes fue documentada por Romani y colaboradores y por otro lado por Sallusto y Lanzavecchia en 1994. Estos autores mencionan que se requiere de GM-CSF e IL-4 para producir células CD1a⁺ CD14⁻ con capacidad de incorporar y procesar antígenos, características típicas de una DC inmadura (Satthaporn y Eremin, 2001).

B) RECONOCIMIENTO Y CAPTURA DEL ANTÍGENO POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DC migran desde la médula ósea hasta tejidos periféricos donde persisten por períodos de tiempo variables hasta el momento que son estimuladas por algún antígeno como la *Leishmania*. Las DC inmaduras o CL se acumulan rápidamente (1 hr aprox.) en los sitios donde se deposita el antígeno. Esta acumulación representa reclutamiento de precursores de DC circulantes, en respuesta a la producción de quimiocinas en el sitio de inflamación donde se puede dar la interacción con las células T además de la interacción que ocurre en los ganglios linfáticos. Una vez que las DC entran en contacto con el antígeno, maduran y migran hacia ganglios linfáticos. Durante el proceso de reconocimiento del antígeno y durante su migración y maduración, las DC presentan cambios en la expresión de receptores (Janeway Jr. *et al.*, 2003; Hertz *et al.*, 2001).

Las DC tienen la capacidad de capturar antígenos mediante varias vías como son: 1) la macropinocitosis mediante la cual forman vesículas pinocíticas; 2) la endocitosis mediada por receptores tipo lectina (Tabla 1) y receptores Fc γ tipo II (CD32) y 3) la fagocitosis de partículas como fragmentos celulares generados durante la necrosis o apoptosis, así como de virus, bacterias y parásitos intracelulares.

Las DC pueden capturar concentraciones picomolares o nanomolares del antígeno mediante la macropinocitosis y la endocitosis, mientras que otras células presentadoras de antígeno solo capturan concentraciones de antígenos mayores a esas.

Adicionalmente, las DC tienen receptores tipo Toll (TLRs), entre los cuales se encuentran TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR9, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) como LPS, lipoproteínas de bacterias, peptidoglicanos y

dinucleótidos CpG. Estos receptores no son fagocíticos y únicamente participan en la activación celular induciendo su secreción de citocinas (Figdor *et al.*, 2002).

LECTINA TIPO-C	TIPO	CÉLULA	LIGANDO	FUNCIÓN
MMR (CD206)	I	DC Y CL	Manosa y fucosa	Captura de antígeno
DEC-205 (CD205)	I	DC Y CL	?	Captura de antígeno
Dectina 1	II	DC Y CL	β -glicanos	Interacción célula T
Dectina 2	II	DC Y CL	?	Captura de antígeno
Langerina (CD207)	II	CL	?	Formación gránulos de Birbeck
DC-SIGN (CD209)	II	DC	HIV-1 (gp120), mananas, ICAM-2, ICAM-3	Interacción célula T, captura de antígeno y migración
BDCA-2	II	DC plasmacit.	?	Captura de antígeno
DCIR (LLIR)	II	DC	?	?
CLEC-1	II	DC	?	?

Tabla 1. Lectinas tipo-C presentes en células dendríticas (DC) y células de Langerhans (CL)

C) MIGRACIÓN Y PRESENTACIÓN DEL ANTÍGENO POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

La migración y maduración de las DC es crítica para iniciar la respuesta inmune celular en contra del antígeno. El antígeno induce la maduración mediante cambios fenotípicos y funcionales de la DC que culminan en la transición de una célula dendrítica inmadura fagocítica a una célula dendrítica madura presentadora de antígenos con capacidad migratoria. Algunas moléculas involucradas en la transición hacia APC son CD40, TNF-R e IL-1R pues mediante la unión a sus ligandos se induce la maduración de las DC que está mediada por varios procesos (Flores-Romo, 2001). La maduración inicia cuando un antígeno como *Leishmania* es introducido en la piel y se genera un proceso inflamatorio con producción de TNF- α e IL-1 y acumulación de más DC en ese sitio. En este momento MIP-3 α que se expresa en epitelios juega un papel importante al ser una quimiocina atrayente de DC inmaduras o de sus precursores hacia los epitelios inflamados. Además hay aumento de MHC-II intracelular en compartimentos llamados MIICs, receptores para quimiocinas como CCR1, CCR5, CCR6 (Tabla 2) y elevación en la expresión de CD68. Por otro lado hay niveles bajos de CCR7, CD54, CD58, CD80, CD86, CD40, CD83 y no hay DC-LAMP (Banchereau *et al.*, 2000; Proudfoot, 2002).

RECEPTOR	LIGANDO
DC inmaduras	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3, MIP-5
CCR2	MCPs
CCR4	TARC, MDC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6 (solo en CL)	MIP-3 α (LARC, Exodus-1)
CXCR1	IL-8
CXCR4	SDF-1
DC maduras	
CCR7	MIP-3 β , 6Ccina (SLC)

Tabla 2. Expresión de receptores para quimiocinas en células dendríticas (DC).

Una vez que las DC capturan el antígeno, los niveles de E-cadherina disminuyen y mediante la elevada expresión celular de elastasas y colagenasas, pueden degradar varios componentes de la matriz extracelular, con lo que se facilita la migración de las DC a través de la piel (Tang *et al.*, 1993).

Cuando empieza la migración de las DC, hay disminución de los procesos de endocitosis y fagocitosis y de la expresión de CCR1, CCR5, CCR6, CD68 y MIP-3 α . Cuando esto ocurre, se incrementa la expresión de CD54, CD58, CD80, CD86, CD40, CD83, DC-LAMP, p55 y CCR7. Las DC maduran durante su migración desde los tejidos inflamados a través de la vía linfática, con la participación de la 6Ccina que se expresa en vasos linfáticos. Las DC maduras entran al área paracortical de los nódulos linfáticos, en

respuesta a la producción de MIP-3 β y/o 6Ccina presente en la zona de células T. Las DC pueden producir MIP-3 β y 6Ccina con lo que se amplifica la señal quimiotáctica. Estas dos quimiocinas también son quimiotácticas para linfocitos T (Figura 10). Se requiere de diversas moléculas de adhesión para que las DC maduras puedan interactuar con los linfocitos T como son: ICAM-1, ICAM-2 y LFA-1, LFA-3 (Banchereau *et al.*, 2000).

Las DC presentan antígenos endógenos mediante MHC-I, mientras que las moléculas clase II se relacionan con la presentación de antígenos exógenos (Acolla *et al.*, 1995; Gielen *et al.*, 1988).

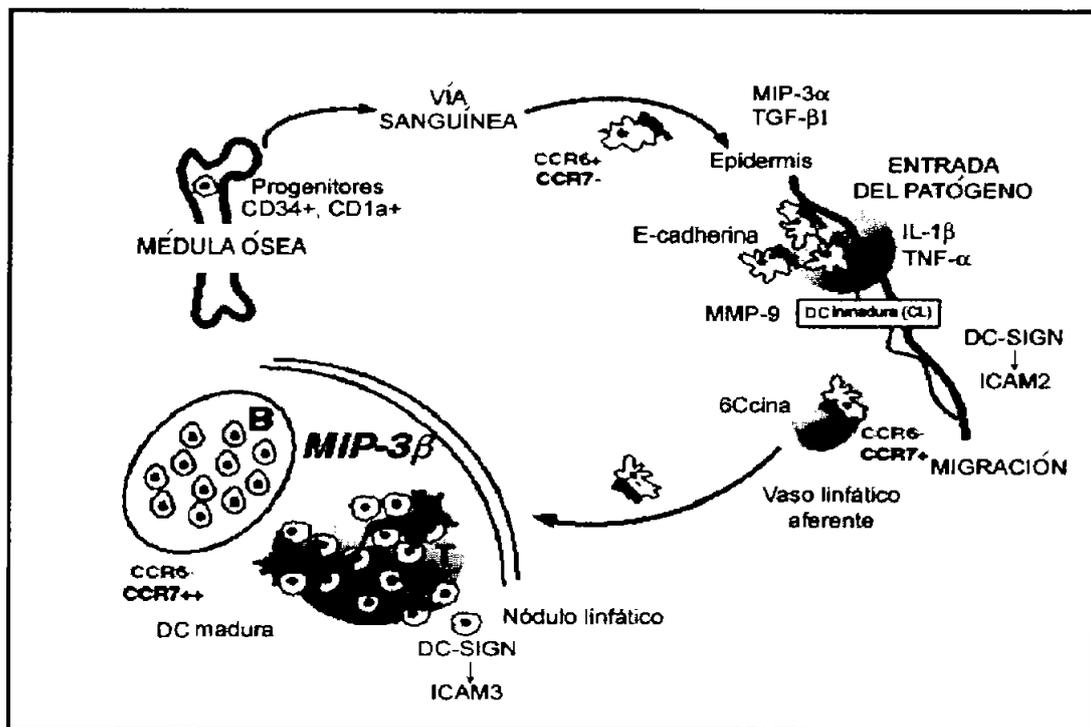


Figura 10. Migración y maduración de las células dendríticas (DC).

8) CITOCINAS PRODUCIDAS POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las citocinas son proteínas solubles secretadas por diversos tipos celulares, entre ellos las DC y se secretan como respuesta a diversos estímulos activadores. Las citocinas median muchas de las funciones efectoras de las células que las producen y son los principales mecanismos mediante los cuales varias poblaciones celulares inmunológicas e inflamatorias se comunican entre sí. Las citocinas se producen durante las fases efectoras de la inmunidad innata y adquirida y sirven para mediar y regular las respuestas inmunológicas e inflamatorias. (Abbas *et al.*, 1995).

Existe una gran diversidad de citocinas que pueden llevar a cabo una o varias de las siguientes funciones biológicas: como mediadores de la inmunidad innata, como reguladores de la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria, como reguladores de la inflamación de origen inmunológico y como estimuladores de la proliferación y diferenciación de los leucocitos inmaduros (Janeway Jr. *et al.*, 2003).

A) CITOCINAS DE LA INMUNIDAD INNATA

En la inmunidad innata, los productos microbicidas como el LPS y el LPG (lipofosfoglicano), estimulan directamente a los fagocitos mononucleares para que secreten sus citocinas. La inmunidad innata puede utilizar una gran variedad de mecanismos efectores para eliminar la infección o de lo contrario contenerla hasta que el patógeno pueda ser reconocido por el sistema inmune adaptativo. Las citocinas liberadas en esta fase protegen contra infecciones virales e inician reacciones inflamatorias que protegen contra las bacterias. Dentro de estas se encuentran los interferones (IFN) tipo I (IFN- α e IFN- β), el factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-10 (IL-10), la interleucina-12 (IL-12) y las quimiocinas como la interleucina-8

(IL-8), RANTES y la proteína quimiotáctica del monocito-1 (MCP-1) (Janeway Jr. *et al.*, 2003).

Dentro de este grupo de citocinas, las que son producidas por las DC son IL-10, IL-12 y TNF- α .

i) Interleucina-10 (IL-10)

La IL-10 es una citocina de 18 kD producida por el subgrupo Th2 de las células cooperadoras CD4⁺. Es un inhibidor potente de las respuestas inflamatorias e inmunes, debido en parte a que inhibe la función de las células presentadoras de antígeno al suprimir la expresión de moléculas clase II del MHC en DC y M ϕ . La IL-10 es un producto de las células T CD8 y Th2 activadas, células B, queratinocitos, monocitos y DC activadas. Originalmente se identificó debido a su capacidad para inhibir la producción de citocinas en células T activadas, actuando muy frecuentemente de forma sinérgica con TGF- β . La IL-10 inhibe la producción de IL-2 e IFN- γ en las células Th1, favoreciendo así las respuestas dependientes de Th2. También inhibe la producción de citocinas en las NK y las especies reactivas de oxígeno, NO y las proteínas de adhesión en los M ϕ . Además de los efectos inhibidores también tiene capacidad estimuladora sobre la producción de anticuerpos de las células B (Parslow *et al.*, 2002; Janeway Jr. *et al.*, 2003).

ii) Interleucina-12 (IL-12)

La IL-12 es un heterodímero de 70 kD que consta de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma covalente, una de 35 kD (p35) y otra de 40 kD (p40). La IL-12 es un regulador esencial de la inmunidad tanto innata como adquirida. A través de su acción

promotora selectiva de la diferenciación de linfocitos Th1, la IL-12 potencia la inmunidad celular, en tanto que suprime las funciones dependientes de Th2 como la producción de IL-4, IL-10 y anticuerpos IgE. La IL-12 induce la proliferación de células T y NK activadas, induce la actividad lítica de NK y células LAK y es el inductor más potente de la producción de IFN- γ en células T y NK activadas. Además la IL-12 induce la producción de GM-CSF, TNF- α , IL-6 y en menor grado de IL-2 con la que actúa de manera sinérgica para promover las respuestas de las células NK. La IL-12 es producida por APC profesionales como son las células B activadas, los M ϕ y las DC. La síntesis de IL-12 se controla en parte a través de un mecanismo de retroalimentación: los productos de las células Th2, IL-4 e IL-10 la suprimen, en tanto que IFN- γ , citocina tipo Th1, es indispensable para su producción sostenida (Parslow *et al.*, 2002; Trinchieri, 2003).

iii) Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

El TNF es una citocina que puede promover el crecimiento y diferenciación de células B, también activa neutrófilos y M ϕ , estimula la hematopoyesis y produce un amplio rango de efectos sobre células no hematopoyéticas. También induce la expresión de otras citocinas y de mediadores que promueven la inflamación por lo que es una citocina pro-inflamatoria. Su importancia principal en la inmunidad se basa en su capacidad para inducir la activación de linfocitos T cooperadores (Th) por medio de APC que pueden producir TNF- α cuando entran en contacto con una célula Th. Posteriormente TNF- α actúa de forma autócrina para inducir o incrementar la expresión de moléculas de adhesión, receptores para IFN- γ y proteínas clase II del MHC localizados en la superficie de las APC y de esta manera incrementar la eficiencia con la que las APC como las DC y los M ϕ pueden unirse y activar

a las células Th. El TNF- α puede actuar también de manera sinérgica con la IL-1 y la IL-6 con la finalidad de producir efectos aumentados. Esta citocina puede ser producida por DC, M ϕ , NK, linfocitos T CD4 y T CD8 (Parslow *et al.*, 2002).

B) CITOCINAS DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA

Las citocinas derivadas de las células T se producen como respuesta al conocimiento específico de antígenos extraños. Durante la respuesta inicial de las células T CD4 *naïve* al antígeno en los tejidos linfoides periféricos, se produce la diferenciación de estas células en dos clases de células efectoras, las Th1 o Th2, ejerciendo un impacto crucial en el resultado de la respuesta inmune adaptativa. Los mecanismos que controlan este paso en la diferenciación de las células CD4 todavía no están definidos por completo, pero pueden estar influenciados por las citocinas presentes durante la fase proliferativa inicial de la activación de las células T. Algunos experimentos han demostrado que las células T CD4 estimuladas inicialmente con IL-12 e IFN- γ tienden a convertirse en células Th1, por el contrario, las células T CD4 activadas en presencia de IL-4 y especialmente IL-6 tienden a diferenciarse en células Th2. Esto se debe a que la IL-4 y la IL-6 promueven la diferenciación de las células Th2, mientras que la IL-4 o la IL-10 en combinación o solas inhiben la generación de células Th1 (Janeway Jr. *et al.*, 2003).

9) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las citocinas IL-10 e IL-12 ejercen efectos antagónicos durante la infección con *Leishmania* que pueden repercutir de manera determinante en la evolución del padecimiento. Por un lado, la IL-12 tiene capacidad de estimular a las células NK para que estas a su vez produzcan IFN- γ y TNF- α , las cuales tienen la capacidad de activar a los mecanismos leishmanicidas del M ϕ , como son la producción de NO y radicales de oxígeno. Adicionalmente, la IL-12 es inductora de una respuesta inmune adquirida tipo Th1 en la que se producen citocinas activadoras del M ϕ . Esta activación es crucial para lograr la muerte del parásito y el control del padecimiento.

Por otro lado, la IL-10 ejerce un efecto inhibitorio sobre el M ϕ infectado con *Leishmania*, provocando una inactivación de sus mecanismos leishmanicidas y permitiendo la replicación intracelular incontrolada del parásito. La presencia de IL-10 favorece una respuesta tipo Th2 provocando la progresión del padecimiento.

Aún se desconoce que células y que mecanismos regulan la producción de IL-12 e IL-10 en la leishmaniasis y siendo la DC una de las células de la respuesta inmune innata que puede producir tanto IL-12 como IL-10, resulta interesante analizar el efecto que ejerce *Leishmania major* sobre su producción de citocinas *in vitro*. Los datos obtenidos de este estudio posiblemente ayuden a aclarar el enigma sobre las causas responsables de la progresión incontrolada del padecimiento en pacientes con LCD. Para este estudio resulta ideal utilizar el modelo murino de leishmaniasis, ya que el ratón susceptible BALB/c es parecido al paciente con LCD, mientras que el ratón resistente C57BL/6 presenta un comportamiento inmune y características de infección que son similares a pacientes con LCL.

II) HIPÓTESIS

Leishmania major induce la secreción de IL-10 por células dendríticas de ratones susceptibles BALB/c y la secreción de IL-12 (p40) y TNF- α en ratones resistentes C57BL/6.

III) OBJETIVOS

1. Obtención de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis, cultivadas en presencia de rGM-CSF e IL-4.
2. Analizar de manera comparativa el efecto que ejerce *Leishmania major* sobre la producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α en células dendríticas obtenidas de ratones BALB/c y C57BL/6.
3. Obtención de macrófagos a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6, cultivados en presencia de M-CSF.
4. Analizar de manera comparativa el efecto que ejerce *Leishmania major* sobre la producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α en macrófagos de médula ósea obtenidos de ratones BALB/c y C57BL/6.

IV) DISEÑO EXPERIMENTAL

1) Animales de laboratorio

Se utilizaron dos cepas de ratón: BALB/c (susceptible a la leishmaniasis) y C57BL/6 (resistente a la leishmaniasis). Cuando los ratones BALB/c son infectados con *Leishmania* en el cojinete plantar se desarrollan lesiones que generan un aumento en el grosor del cojinete, sin embargo, cuando un ratón C57BL/6 es inoculado con el parásito no desarrolla lesión. La edad de los ratones que se utilizaron para la obtención de la médula ósea fue de 8 semanas.

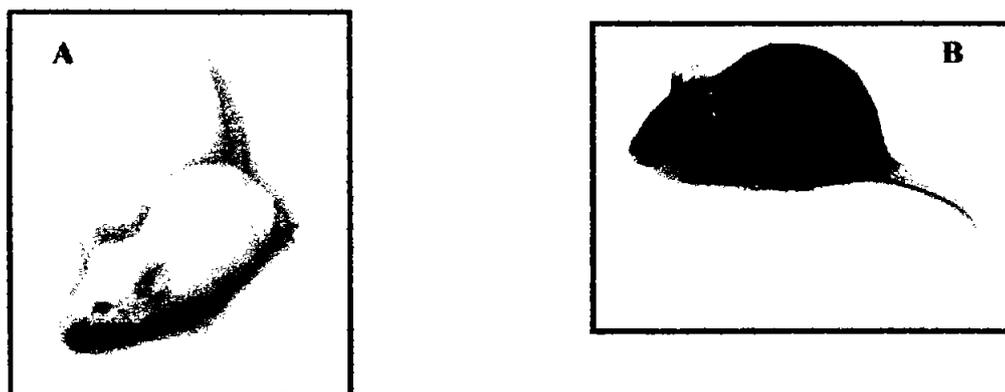


Figura 11. Cepas de ratones genéticamente susceptibles y resistentes a la leishmaniasis.

A) ratón BALB/c y B) ratón C57BL/6.

2) Cultivo de parásitos

Se cultivaron promastigotes de *Leishmania major* a 25°C en RPMI 1640 con 10 % de suero fetal bovino (SFB), descomplementado a 56°C durante 20 minutos. Los promastigotes fueron contados en una cámara de Neubauer y cosechados mediante

centrifugación del medio de cultivo a 4000 rpm durante 10 min a 25°C. El cálculo del número de promastigotes se hizo mediante la siguiente fórmula:

promastigotes/ml = # de promastigotes x 10,000 x factor de dilución.

3) Extracción de médula ósea

Se sacrificaron los ratones de ambas cepas de estudio (BALB/c y C57BL/6) por dislocación cervical y fueron bañados en etanol al 70 %. En una campana de flujo laminar horizontal, se cortó la piel de las extremidades inferiores descubriendo el músculo para después cortarlas y colocarlas en una caja de Petri con PBS y gentamicina al 0.2 %. Con unas tijeras se eliminó la mayor parte del músculo y posteriormente se utilizó una navaja de bisturí para eliminar restos de músculos y tendones y así dejar limpios el fémur y la tibia. Estos se sumergieron en una nueva caja de Petri con PBS y gentamicina al 0.2 %. Posteriormente se trasladaron los huesos a una campana de flujo laminar de bioseguridad para extraer la médula. Se separó el fémur de la tibia con cuidado de que la médula no quedara al descubierto, se tomaron los huesos por el centro con una pinza y con unas tijeras se cortaron los extremos de los huesos (la diáfisis y la epífisis). Usando una jeringa de 10 ml con una aguja de insulina, se inyectaron 10 ml de PBS al interior del hueso para extraer la médula. Las células de la médula se centrifugaron a 1200 rpm, 10 min a 4°C en un tubo de 50 ml. Posteriormente se cultivaron las células en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4 recombinantes de ratón para inducir su diferenciación hacia DC y del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) para inducir su diferenciación hacia Mφ.

4) Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

Se cultivaron las células precursoras CD34⁺ de la médula ósea en presencia de GM-CSF e IL-4 recombinantes de ratón para diferenciarlas a DC. Una vez centrifugadas las células obtenidas de las médulas, se resuspendieron en RPMI 1640 con 10 % de SFB descomplementado y se contaron en una cámara de Neubauer. Se sembraron 1×10^6 células/ml por pozo en cajas de 24 pozos, cultivando entre 250×10^6 a 300×10^6 por experimento. El cultivo de las DC duró 7 días a 37°C con 5 % de CO₂, tomando como primer día el día de la siembra de las células que provienen de la médula. Por cada 1×10^6 células se agregó 1 ml de RPMI 1640 con 10 % de SFB, 1 X de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 16 ng/ml de GM-CSF y 74 ng/ml de IL-4 recombinantes de ratón. El segundo día se retiró cuidadosamente el 50 % del medio de cada pozo y se reemplazó por medio nuevo adicionado con las citocinas recombinantes. Esto se hizo para eliminar los granulocitos no adherentes y dejando únicamente los cúmulos de DC que se encontraban adheridos débilmente a los M ϕ que estaban adheridos al plástico. En el cuarto día también se hizo un cambio del 50 % del medio de cultivo. El sexto día se removió cuidadosamente el contenido de cada uno de los pozos con una pipeta, procurando no desprender las células adheridas en el fondo del pozo. Por otro lado, se prepararon columnas en tubos de 15 ml que contenían 6 ml de RPMI 1640 con 50 % de suero de ternera descomplementado. En cada columna se agregó el contenido de 5 pozos y se dejaron sedimentar por 20 min con la finalidad de que los cúmulos de DC se depositaran en el fondo. Transcurrido ese tiempo se eliminaron 6 ml de cada columna con una pipeta de transferencia, cuidando de tomar la parte superficial donde se encontraban los granulocitos. Se reemplazaron los 6 ml con RPMI 1640 sin suero y se centrifugaron los tubos entre 1400 a 1500 rpm, 10 min a 4°C. Posteriormente

se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y en los botones se encontraban las DC que se resuspendieron en RPMI 1640 y se contaron para su posterior estímulo.

5) Cultivo de macrófagos derivados de médula ósea de ratón

Los M ϕ derivados de médula ósea fueron utilizados como control y para su cultivo se utilizaron cajas de Petri (Falcon 100x15 mm). Por cada caja se cultivó la médula de 1 hueso (fémur o tibia). En cada caja de Petri se agregaron 10 ml de medio DMEM enriquecido con 20 % de SFB, 20 mM de L-glutamina y 30 % del sobrenadante de cultivo de la línea celular L929 que produce M-CSF, factor que diferencia las células de médula hacia M ϕ . Para obtener el M-CSF que produce esta línea celular, se cultivaron las células L929 en medio DMEM con 10 % de SFB y se colectó el sobrenadante una vez que las células formaron una capa confluyente que fue aproximadamente a los 4 días de cultivo. Este fue el sobrenadante que se agregó a las células de médula (Boltz-Nitulescu *et al.*, 1987). El cultivo de los M ϕ derivados de la médula ósea duró entre 7 y 10 días a 37°C con 5 % de CO₂. Posteriormente se eliminó el sobrenadante de las cajas, se agregó EDTA 5 mM y se incubaron durante 5 min a 37°C. Esto permitió el desprendimiento de las células que se transfirieron a tubos con RPMI 1640 sin suero y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min a 4°C. Este lavado se realizó dos veces y se contaron los M ϕ para ser estimulados de manera simultánea con las DC.

6) Estimulación de las células

Las DC y los M ϕ se sometieron a distintos estímulos consistentes en:

1) células sin estímulo (basal),

- 2) células estimuladas con promastigotes de *Leishmania major* (1 célula por 10 parásitos) (experimental),
- 3) células estimuladas con LPS (100 ng/ml) (control positivo),
- 4) células estimuladas con LPS (100 ng/ml) y promastigotes de *Leishmania major* (1:10) (control positivo),
- 5) células estimuladas con Poly I:C (10 µg/ml) (control positivo, pues es un nucleótido que se considera buen estimulador de DC debido a que expresan TLR-9).

Para cada condición se colocaron 1×10^6 células en 1 ml de RPMI 1640 en cajas de 24 pozos y se incubaron por 24 hrs a 37°C con 5 % de CO². Los sobrenadantes de cultivo fueron analizados mediante la técnica de ELISA tipo sandwich para la detección de las citocinas IL-10, IL-12 (p40) y TNF-α.

7) ELISA tipo sandwich

Esta técnica se utilizó para la detección de IL-10, IL-12 (p40) y TNF-α en los sobrenadantes de cultivo. Se utilizaron placas de 96 pozos (Costar) fondo plano tratadas para ELISA. Este método consistió de varios pasos:

1) Colocación del anticuerpo de captura:

el anticuerpo se diluyó en un buffer de unión a pH=9 para el caso de las citocinas IL-10 e IL-12 (p40) y a pH=6 para el TNF-α, se colocaron 50 µl por pozo, se tapó la placa y se incubó a 4°C hasta el día siguiente (mínimo 10 hrs.). El anticuerpo de captura para la IL-10 se utilizó a una concentración de 5 µg/ml, el de IL-12 (p40) se utilizó a una concentración de 8 µg/ml y el de TNF-α a una concentración de 2 µg/ml.

2) Lavado de la placa:

la placa se metió a un lavador de placas para ELISA EL_x50 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC. con una solución de lavado compuesta de PBS 1 X y 0.01 % de Tween 80. En este paso la placa se lavó 4 veces.

3) Bloqueo de la placa:

se utilizó solución bloquedora de caseína y se agregaron 200 µl por pozo dejándola 30 min a temperatura ambiente.

4) Lavado de la placa:

se lavó 3 veces con PBS 1 X y 0.01 % de Tween 80.

5) Colocación de la curva estándar y las muestras problema:

se colocaron 100 µl por pozo tanto para la curva estándar como para las muestras. Se dejaron 2 hrs a temperatura ambiente o bien, a 4°C hasta el día siguiente. Las curvas estándar fueron hechas de una serie de diluciones de la citocina recombinante y además de funcionar como control positivo de la técnica sirvieron de referencia para calcular la concentración de citocinas en las muestras.

La preparación para la curva estándar de la IL-10 (BD PharMingen) fue la siguiente: se utilizaron 2000 pg/ml contenidos en 20 µl y se agregaron 480 µl de RPMI 1640. Se tomaron 250 µl y se agregaron 250 µl de RPMI 1640 para obtener una concentración de 1000 pg/ml. Se realizaron diluciones 1:2 para obtener las concentraciones de 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml, 15.62 pg/ml y finalmente solo RPMI 1640 con 0 pg/ml de la citocina. El punto de corte o valor basal considerado como negativo para la IL-10 fue de 15 pg/ml.

La preparación para la curva estándar de la IL-12 (p40) (BD PharMingen) fue la siguiente:

se utilizaron 4000 pg/ml contenidos en 10 μ l y se agregaron 490 μ l de RPMI 1640, se tomaron 375 μ l y se agregaron 125 μ l de RPMI 1640 para tener una concentración de 3000 pg/ml, de esta se tomaron 333 μ l y se agregaron 167 μ l de RPMI 1640 obteniendo una concentración de 2000 pg/ml, después se tomaron 250 μ l y se agregaron 250 μ l de RPMI 1640 obteniendo una concentración de 1000 pg/ml. Se realizaron diluciones consecutivas 1:2 para obtener las concentraciones de 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml y finalmente solo RPMI 1640 con 0 pg/ml de esta citocina. El punto de corte o valor basal considerado como negativo para la IL-12 (p40) fue de 30 pg/ml.

La preparación para la curva estándar del TNF- α (BD PharMingen) fue la siguiente: se utilizaron 2000 pg/ml contenidos en 20 μ l y se agregaron 480 μ l de RPMI 1640, se tomaron 250 μ l y se agregaron 250 μ l de RPMI 1640 para obtener una concentración de 1000 pg/ml. Se realizaron diluciones 1:2 para obtener las concentraciones de 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml, 15.62 pg/ml y finalmente solo RPMI 1640 con 0 pg/ml de la citocina. El punto de corte o valor basal considerado como negativo para la TNF- α fue de 15 pg/ml.

6) Lavado de la placa:

se lavó 4 veces con PBS 1 X y 0.01 % de Tween 80.

7) Colocación del anticuerpo de detección:

se diluyó el anticuerpo en albúmina bovina al 1 % con 0.05 % de Tween 20 para obtener una concentración adecuada para cada citocina, siendo de 0.5 μ g/ml de anticuerpo para la IL-10,

de 1 µg/ml para la IL-12 (p40) y de 1 µg/ml para el TNF-α. Se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente.

8) Lavado de la placa:

se lavó 6 veces con PBS 1 X y 0.01 % de Tween 80.

9) Colocación de la estreptavidina-fosfatasa alcalina:

se diluyó la estreptavidina fosfatasa-alcalina en una dilución 1:2000 con albúmina bovina al 1 % con 0.05 % de Tween 20 y se agregaron 100 µl por pozo. Se incubó 30 min a temperatura ambiente.

10) Lavado de la placa:

se lavó 8 veces con PBS 1 X y 0.01 % de Tween 80.

11) Revelado de la reacción:

la reacción se reveló utilizando como sustrato fosfatasa alcalina. Se disolvió una pastilla del sustrato de fosfatasa en 5 ml de buffer de sustrato y se agregaron 100 µl por pozo. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad de 10 a 30 min.

12) Lectura de la placa:

se leyó en un lector de ELISA para micro placas (EL 3-12e BIO-TEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 405 nm y con ayuda del programa KC4 que nos proporcionó las concentraciones de las citocinas en las muestras.

8) Análisis estadístico

Se realizó un análisis no paramétrico de los resultados obtenidos utilizando la prueba de “U de Mann-Whitney”.

VI) DISCUSIÓN

La primera respuesta de un organismo hacia cualquier agente extraño es una reacción inflamatoria que se caracteriza por la migración de varios tipos celulares con funciones de defensa, hay alteraciones en la permeabilidad vascular y se presenta secreción de mediadores solubles tales como quimiocinas y citocinas. Las células inflamatorias tienen una potente actividad microbicida (Trinchieri, 2003). La respuesta inmune innata representa la primer línea de defensa contra microorganismos y se caracteriza por no tener memoria y reconocer a moléculas compartidas entre patógenos (Janeway Jr. *et al.*, 2003).

Se sabe poco sobre la participación de DC y M ϕ en la respuesta inmune innata ante la infección por parásitos como *Leishmania*, sin embargo, se ha estudiado exhaustivamente la respuesta inmune adquirida en la leishmaniasis. En modelos murinos de cepas susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la leishmaniasis se encontró que la cura de esta enfermedad está determinada por una respuesta inmune tipo Th1, con la producción de citocinas activadoras del M ϕ tales como IFN- γ y TNF- α . Por otro lado, la progresión del padecimiento se asoció con una respuesta tipo Th2, con producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10 que ejercen un efecto inhibitorio sobre los mecanismos leishmanicidas del M ϕ (Awasthi *et al.* 2004). Sin embargo, se desconoce mediante que mecanismos se induce una respuesta Th1 o Th2 y se considera que es a nivel de respuesta inmune innata que se establecen las condiciones decisivas.

Aún se sabe poco sobre la participación de la respuesta inmune innata en el desarrollo de esta parasitosis pues los estudios hasta ahora realizados se han enfocado más a la respuesta inmune adaptativa. Además, se sabe poco sobre la participación de las DC y de los M ϕ , así como del efecto que ejerce *Leishmania major* sobre la producción de citocinas

por estas células. Debido a que ambas células pueden producir tanto IL-12 y TNF- α (inductoras de una respuesta Th1) así como IL-10 (inductora de una respuesta Th2), se analizó el patrón de citocinas secretadas por estas células al enfrentarse al parásito, ya que posiblemente las citocinas producidas durante la fase inicial de la parasitosis pudieran ser decisivas para establecer las características de la respuesta inmune adquirida.

Las DC son una de las primeras células que entran en contacto con *L. major* cuando el parásito es inoculado por regurgitación durante la hematofagia de la hembra del mosquito transmisor *Lutzomyia sp.* Se sabe que la proboscis permanece en una posición muy superficial afectando principalmente epidermis. Las células fagocíticas que pueden captar al parásito en la epidermis son principalmente las células de Langerhans, consideradas como DC inmaduras y las citocinas que son secretadas durante las fases iniciales de la infección pueden ser decisivas para el desenlace del padecimiento (Banchereau *et al.*, 2000).

Gorak y colaboradores (1998) trabajando con *L. donovani*, causante de la leishmaniasis visceral, encontraron que las DC de bazo de ratones BALB/c producen IL-12 (p40) en etapas tempranas a la infección con el parásito a diferencia de los M ϕ que no producen IL-12 cuando son infectados por *Leishmania*. El mismo fenómeno fue descrito por Awasthi y colaboradores (2004) quienes reportan que la incubación de promastigotes de *Leishmania* con DC inducen una producción temprana de IL-12 *in vitro*, mientras que *L. major* inhibe la producción de IL-12 por los M ϕ . Por otro lado, Mentink y Mosser (2001) reportan que *Leishmania* induce la producción de IL-10 en M ϕ con disminución en su producción de IL-12 y TNF- α lo cual es responsable de la inhibición del M ϕ . Los datos obtenidos en el presente trabajo, aparentemente se contradicen con los datos reportados por

los autores antes citados, ya que ellos reportan que M ϕ infectados con *Leishmania* no producen IL-12 y sin embargo, en el presente estudio si se detectó producción de IL-12. Esta aparente discrepancia pudiera deberse a que en este trabajo se utilizaron promastigotes procíclicos, que han sido reportados como estimuladores de la producción de IL-12 en M ϕ y posiblemente estos autores utilizaron promastigotes metacíclicos que se han reportado como inhibidores de la producción de IL-12 en M ϕ (Sartori *et al.*, 1997). Otra de las posibles razones por las que pueden existir estas diferencias, se puede deber a la especie de *Leishmania* con la que se trabajó, pues las usadas en los estudios citados anteriormente fueron *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. donovani* y en este trabajo se utilizó *L. major*. Se sabe que la especie de *Leishmania* puede afectar el tipo de citocinas producidas por las células inflamatorias (Satoskar, comunicación personal).

El presente estudio realizado con *L. major*, causante de la leishmaniasis cutánea, reveló que las DC posiblemente participen en la determinación de la evolución clínica, ya que encontramos que, las DC de ratones susceptibles BALB/c tienden a producir mayor cantidad de IL-10 cuando entran en contacto con *L. major* en comparación con las DC de ratones resistentes C57BL/6, aunque esta diferencia no es significativa. La IL-10 liberada por las DC durante la fase inicial de la infección ejerce un efecto inhibitorio sobre la capacidad leishmanicida del M ϕ y este efecto posiblemente predetermine una progresión del padecimiento. Interesantemente, las DC de ratones susceptibles BALB/c al igual que los datos reportados, también incrementan significativamente y de manera simultánea los niveles de IL-12 (p40) cuando entran en contacto con *L. major*, en comparación con DC de ratones C57BL/6. Posiblemente en este caso la presencia de IL-10 elevada ejerce un efecto

inhibidor mayor que el efecto activador inducido por la elevación de IL-12 (p40) por la misma célula, ya que el ratón BALB/c sufre de una parasitosis progresiva.

Para que la IL-12 pueda ejercer un efecto activador sobre la capacidad leishmanicida del M ϕ , se requiere que active a otra célula de la respuesta inmune innata, que es la célula NK. La célula NK produce IFN- γ en respuesta al estímulo de IL-12 y la presencia de IFN- γ en combinación con TNF- α son un fuerte inductor de dos potentes mecanismos leishmanicidas del M ϕ que son la producción de radicales tóxicos de oxígeno generados durante el estallido oxidativo y la presencia de NO generado por la inducción de iNOS (Trinchieri, 2003; Awasthi, 2004).

Aún se desconoce si las células NK en estos ratones responden a la IL-12 producida por las DC con producción de IFN- γ . Sin embargo, la presencia de la IL-10 producida por las DC posiblemente inhiba el efecto estimulador de IFN- γ . Interesantemente, las DC de ambos grupos de ratones no producen TNF- α cuando son estimulados por *L. major*.

Interesantemente, los M ϕ de ratones BALB/c estimulados con *L. major* produjeron de manera simultánea citocinas anti y pro-inflamatorias, ya que incrementó su producción tanto de IL-10 como de IL-12 (p40), contrario a lo descrito donde se menciona una regulación entre esta citocinas. Llama la atención que tanto las DC como los M ϕ pueden producir una citocina pro-inflamatoria importante como la IL-12 y sin embargo, la presencia simultánea de una citocina anti-inflamatoria como la IL-10 aparentemente anula el efecto protector que pudiera causar la IL-12 en estos ratones.

También de manera interesante, los M ϕ de ratones C57BL/6 incrementaron significativamente su producción de IL-10 cuando entraron en contacto con *L. major* y no produjeron IL-12, pero sin embargo son resistentes a la leishmaniasis. Posiblemente la

protección de estos ratones se correlacione con la ausencia de IL-10 por DC durante la fase inicial de la infección.

En resumen, estos datos reflejan que posiblemente la producción temprana de IL-10 por DC en ratones BALB/c sea el factor más importante en determinar la progresión de la enfermedad. La presencia o ausencia de IL-12 no parece ser relevante en conferir protección, ya que su ausencia en ratones C57BL/6 no afecta la resistencia a la leishmaniasis que se presenta en estos ratones y su presencia en ratones susceptibles BALB/c no garantiza que se puedan proteger de la infección con *L. major*.

V) RESULTADOS

A) PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c

i) Las DC de ratones BALB/c estimuladas con *Leishmania major* produjeron 52 pg/ml de IL-10 (Tabla 3 y Figura 12 A), es decir hubo un aumento de 2.88 X con respecto al basal (Tabla 4). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-10 fue el de DC incubadas con *L. major* y LPS con un aumento significativo ($P=0.0006$) de 630 pg/ml (Tabla 3 y Figura 12 A), es decir 35 X más con respecto al basal (Tabla 4).

BALB/c CÉLULAS DENDRÍTICAS					
CITOCINA (pg/ml)	DC	DC+ <i>L.major</i>	DC+LPS	DC+ <i>L.m.</i> +LPS	DC+Poly I:C
IL-10 n=14	18	52	** 390	* 630	63
IL-12 (p40) n=14	30	* 91	** 761	** 738	** 597
TNF- α n=6	15	15	* 166	* 283	84

Tabla 3. Producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α (pg/ml) por células dendríticas (DC) de ratones BALB/c ante diferentes estímulos. Son datos estadísticamente significativos:

*estímulo vs basal, *BALB/c vs C57BL/6 y *DC vs M ϕ .

BALB/c CÉLULAS DENDRÍTICAS				
CITOCINA (INCREMENTO)	DC+ <i>L.major</i>	DC+LPS	DC+ <i>L.m.</i> +LPS	DC+Poly I:C
IL-10	2.88 X	21.66 X	35 X	3.5 X
IL-12 (p40)	3.03 X	25.36 X	24.6 X	19.9 X
TNF- α	1 X	11.06 X	18.86 X	5.6 X

Tabla 4. Incremento (X) con respecto a la producción basal de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α por células dendríticas (DC) de ratones BALB/c ante diferentes estímulos.

ii) Los M ϕ de ratones BALB/c estimulados con *L. major* produjeron 65 pg/ml de IL-10 significativamente ($P=0.03$) (Tabla 5 y Figura 12 B), es decir hubo un aumento de 4.33 X con respecto al basal (Tabla 6). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-10 fue el de M ϕ incubados con LPS con un aumento significativo ($P=0.00004$) de 195 pg/ml (Tabla 5 y Figura 12 B), es decir 13 X más con respecto al basal (Tabla 6).

BALB/c MÁCROFAGOS					
CITOCINA (pg/ml)	M ϕ	M ϕ + <i>L.maj</i> or	M ϕ +LPS	M ϕ + <i>L.m.</i> +LPS	M ϕ +Poly I:C
IL-10 n=12	15	* 65	* 195	* 106	* 32
IL-12 (p40) n=12	30	67	* 53	* 35	* 79
TNF- α n=6	19	45	* 120	128	75

Tabla 5. Producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α (pg/ml) por macrófagos (M ϕ) de ratones BALB/c ante diferentes estímulos. Son datos estadísticamente significativos: * estímulo vs basal, *BALB/c vs C57BL/6 y *DC vs M ϕ .

BALB/c MÁCROFAGOS				
CITOCINA (INCREMENTO)	M ϕ + <i>L.maj</i> or	M ϕ +LPS	M ϕ + <i>L.m.</i> +LPS	M ϕ +Poly I:C
IL-10	4.33 X	13 X	7.06 X	2.13 X
IL-12 (p40)	2.23 X	1.76 X	1.16 X	2.63 X
TNF- α	2.36 X	6.31 X	6.73 X	3.94 X

Tabla 6. Incremento (X) con respecto a la producción basal de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α por macrófagos (M ϕ) de ratones BALB/c ante diferentes estímulos.

B) PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6

i) Las DC de ratones C57BL/6 estimuladas con *L. major* produjeron la mínima cantidad de 17 pg/ml de IL-10 (Tabla 7 y Figura 12 C) considerándose como negativo pues solo aumentó 1.13 X con respecto al basal (Tabla 8). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-10 fue el de DC incubadas con LPS con un aumento de 77 pg/ml (Tabla 7 y Figura 12 C), es decir 5.13 X más con respecto al basal (Tabla 8).

C57BL/6 CÉLULAS DENDRÍTICAS					
CITOCINA (pg/ml)	DC	DC+ <i>L.major</i>	DC+LPS	DC+ <i>L.m.</i> +LPS	DC+Poly I:C
IL-10 n=7	15	17	* 77	46	* 15
IL-12 (p40) n=6	36	30	* 383	** 495	118
TNF- α n=5	24	20	26	** 206	* 15

Tabla 7. Producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α (pg/ml) por células dendríticas (DC) de ratones C57BL/6 ante diferentes estímulos. Son datos estadísticamente significativos:

* estímulo vs basal, *BALB/c vs C57BL/6 y *DC vs M ϕ .

C57BL/6 CÉLULAS DENDRÍTICAS				
CITOCINA (INCREMENTO)	DC+ <i>L.major</i>	DC+LPS	DC+ <i>L.m.</i> +LPS	DC+Poly I:C
IL-10	1.13 X	5.13 X	3.06 X	1 X
IL-12 (p40)	0.83 X	10.63 X	13.75 X	3.27 X
TNF- α	0.83 X	1.08 X	8.58 X	0.62 X

Tabla 8. Incremento (X) con respecto a la producción basal de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α por células dendríticas (DC) de ratones C57BL/6 ante diferentes estímulos.

ii) Los M ϕ de ratones C57BL/6 estimulados con *L. major* produjeron 70 pg/ml de IL-10 significativamente ($P=0.02$) (Tabla 9 y Figura 12 D), es decir hubo un aumento de 4.66 X con respecto al basal (Tabla 10). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-10 fue el de M ϕ incubados con LPS con un aumento significativo ($P=0.004$) de 232 pg/ml (Tabla 9 y Figura 12 D), es decir 15.46 X más con respecto al basal (Tabla 10).

C57BL/6 MACRÓFAGOS					
CITOCINA (pg/ml)	Mϕ	Mϕ+<i>L. major</i>	Mϕ+LPS	Mϕ+<i>L.m.</i>+LPS	Mϕ+Poly I:C
IL-10 n=9	15	* 70	* 232	150	** 110
IL-12 (p40) n=6	31	30	53	* 41	45
TNF-α n=5	15	37	26	* 15	** 100

Tabla 9. Producción de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α (pg/ml) por macrófagos (M ϕ) de ratones C57BL/6 ante diferentes estímulos. Son datos estadísticamente significativos:

* estímulo vs basal, *BALB/c vs C57BL/6 y *DC vs M ϕ .

C57BL/6 MACRÓFAGOS				
CITOCINA (INCREMENTO)	Mϕ+<i>L. major</i>	Mϕ+LPS	Mϕ+<i>L.m.</i>+LPS	Mϕ+Poly I:C
IL-10	4.66 X	15.46 X	10 X	7.33 X
IL-12 (p40)	0.96 X	1.7 X	1.32 X	1.45 X
TNF-α	2.46 X	1.73 X	1 X	6.66 X

Tabla 10. Incremento (X) con respecto a la producción basal de IL-10, IL-12 (p40) y TNF- α por macrófagos (M ϕ) de ratones C57BL/6 ante diferentes estímulos.

C) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6

i) Cuando se estimularon las DC con *L. major*, solo hubo producción de IL-10 por las células de ratones BALB/c con un aumento de 2.88 X con respecto al basal pues las DC de los ratones C57BL/6 no produjeron IL-10 (Tabla 11).

CITOCINA (INCREMENTO)	BALB/c		C57BL/6	
	DC+ <i>L.major</i>	Mφ+ <i>L.major</i>	DC+ <i>L.major</i>	Mφ+ <i>L.major</i>
IL-10	2.88 X	4.33 X	1.13 X	4.66 X
IL-12 (p40)	3.03 X	2.23 X	0.83 X	0.96 X
TNF-α	1 X	2.36 X	0.83 X	2.46 X

Tabla 11. Incremento (X) con respecto a la producción basal de IL-10, IL-12 (p40) y TNF-α por células dendríticas (DC) y macrófagos (Mφ) de ratones BALB/c y C57BL/6 estimulados con *Leishmania major*.

ii) Al estimular a los Mφ con *L. major*, ambas cepas de ratones se comportaron de manera similar pues las células de los ratones BALB/c incrementaron 4.33 X su producción de IL-10 con respecto al basal y los Mφ de los ratones C57BL/6 la incrementaron 4.66 X (Tabla 11).

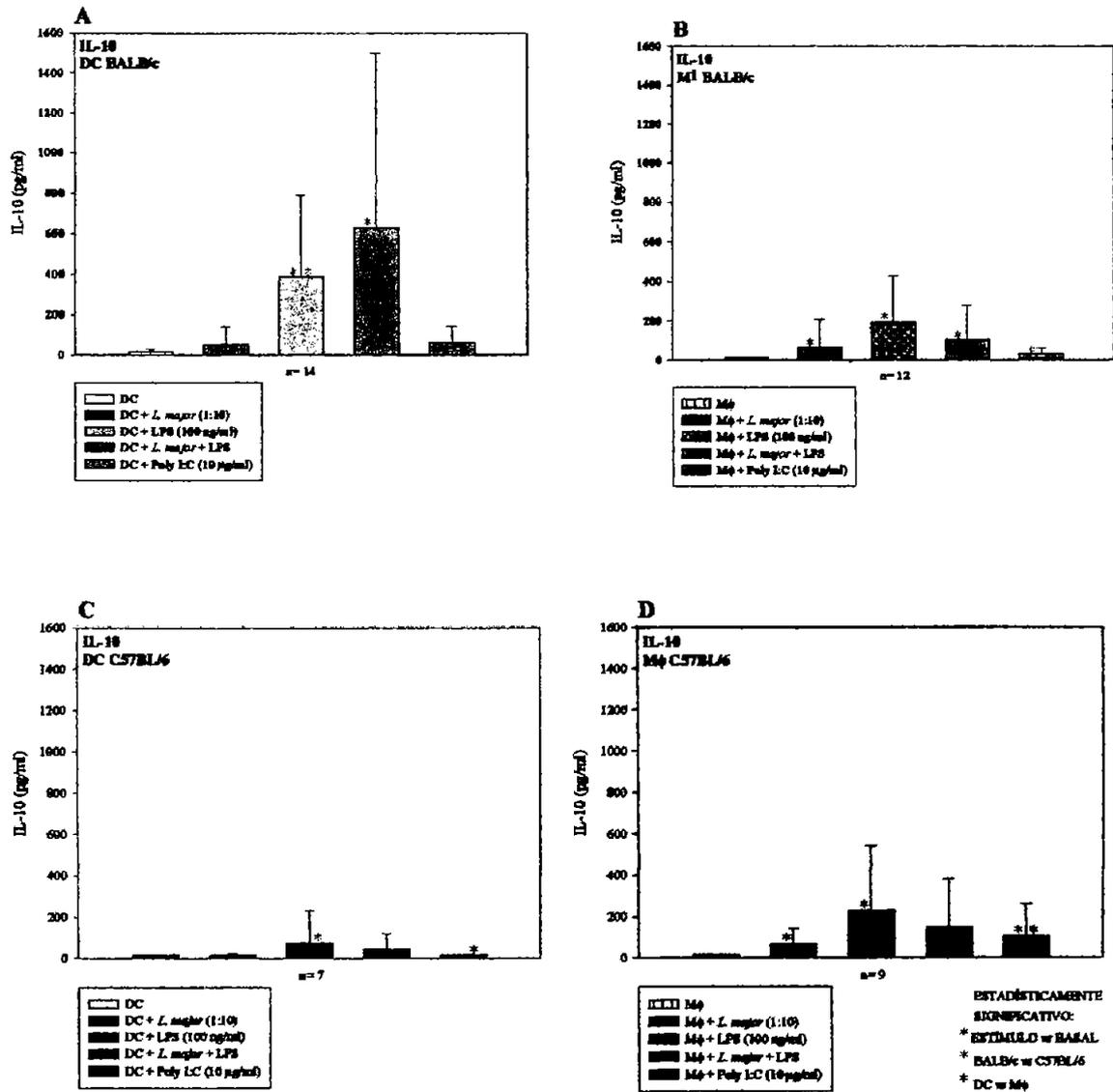


Figura 12. Producción de IL-10 por células dendríticas (DC) y macrófagos (Mφ) derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6. (A) IL-10 secretada por DC de ratones BALB/c. (B) IL-10 secretada por Mφ de ratones BALB/c. (C) IL-10 secretada por DC de ratones C57BL/6. (D) IL-10 secretada por Mφ de ratones C57BL/6. En todos los casos las células fueron estimuladas con *L. major*, LPS, *L. major* + LPS y Poly I:C.

D) PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c

i) Las DC de ratones BALB/c estimuladas con *L. major* produjeron significativamente ($P=0.006$) mayor cantidad de IL-12 (p40) (91 pg/ml) (Tabla 3 y Figura 13 A), es decir hubo un aumento de 3.03 X con respecto al basal (Tabla 4). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-12 (p40) fue el de DC incubadas con LPS con un aumento significativo ($P=0.000002$) de 761 pg/ml (Tabla 3 y Figura 13A), es decir 25.36 X más con respecto al basal (Tabla 4).

ii) Los M ϕ de ratones BALB/c estimulados con *L. major* produjeron 67 pg/ml de IL-12 (p40) (Tabla 5 y Figura 13 B), es decir hubo un aumento de 2.23 X con respecto al basal (Tabla 6). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-12 (p40) fue el de M ϕ incubados con Poly I:C con un aumento de 79 pg/ml (Tabla 5 y Figura 13 B), es decir 2.63 X más con respecto al basal (Tabla 6).

E) PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6

i) Las DC de ratones C57BL/6 estimuladas con *L. major* no produjeron IL-12 (p40) (Tabla 7, Tabla 8 y Figura 13 C). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-12 (p40) fue el de DC incubadas con *L. major* y LPS con un aumento significativo ($P=0.04$) de 495 pg/ml (Tabla 7 y Figura 13C), es decir 13.75 X más con respecto al basal (Tabla 8).

ii) Los M ϕ de ratones C57BL/6 estimulados con *L. major* no produjeron IL-12 (p40) (Tabla 9, Tabla 10 y Figura 13 D). El control positivo que presentó la mayor producción de IL-12 (p40) fue el de M ϕ incubados con LPS con un aumento de 53 pg/ml (Tabla 9 y Figura 13 D), es decir 1.7 X más con respecto al basal (Tabla 10).

F) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-12 (p40) ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6

i) Las DC estimuladas con *L. major* solo produjeron IL-12 (p40) en los ratones BALB/c con un aumento de 3.03 X con respecto al basal pues en las DC de los ratones C57BL/6 no se presentó secreción de esta citocina (Tabla 11).

ii) El caso de los M ϕ estimulados con *L. major* fue el mismo que el de las DC pues solo se secretó IL-12 (p40) en los ratones BALB/c con un aumento de 2.23 X con respecto al basal y no hubo secreción de IL-12 (p40) por los M ϕ de los ratones C57BL/6 (Tabla 11).

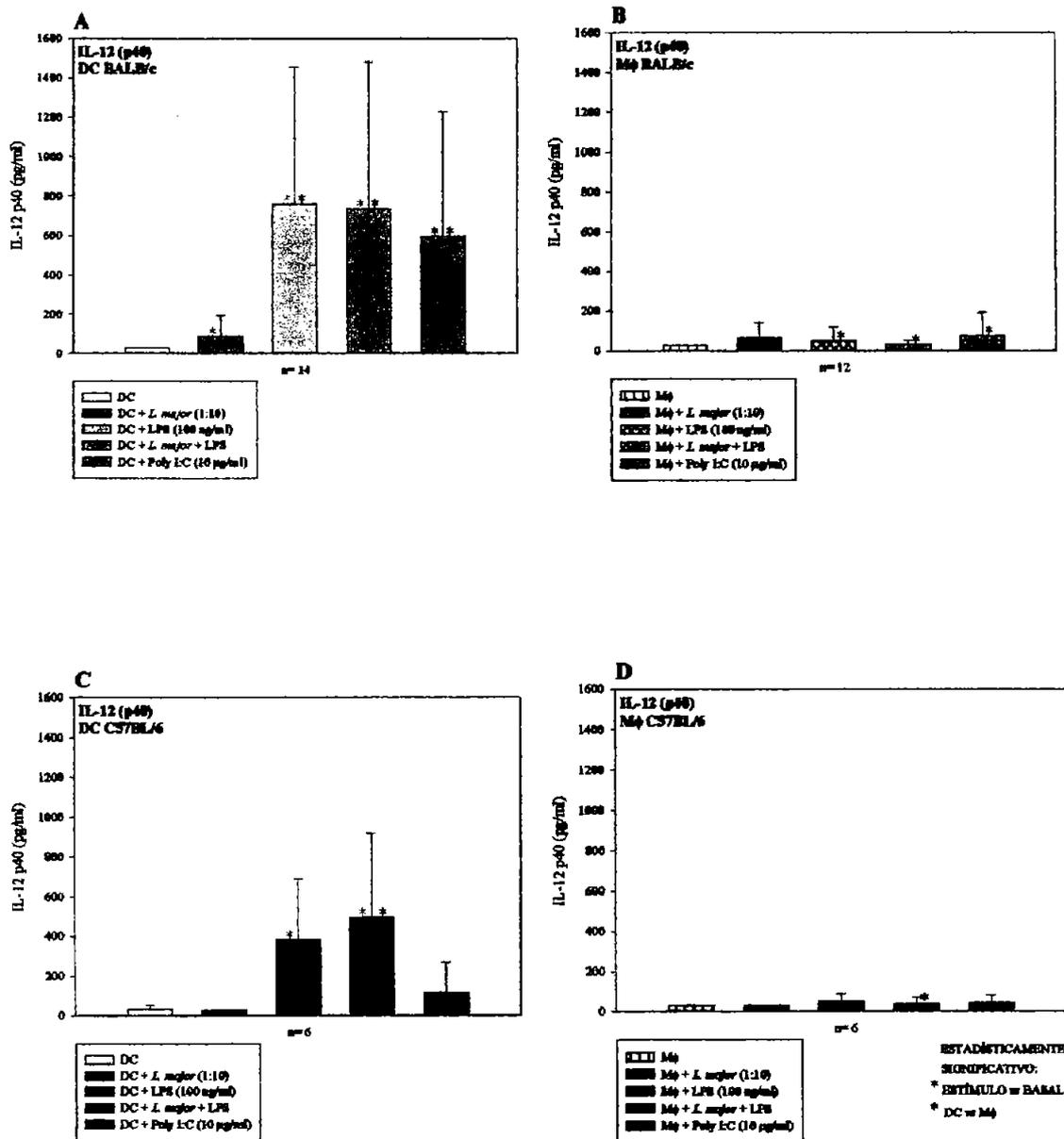


Figura 13. Producción de IL-12 (p40) por células dendríticas (DC) y macrófagos (Mφ) derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6. (A) IL-12 (p40) secretada por DC de ratones BALB/c. (B) IL-12 (p40) secretada por Mφ de ratones BALB/c. (C) IL-12 (p40) secretada por DC de ratones C57BL/6. (D) IL-12 (p40) secretada por Mφ de ratones C57BL/6. En todos los casos las células fueron estimuladas con *L. major*, LPS, *L. major* + LPS y Poly I:C.

G) PRODUCCIÓN DE TNF- α EN CÉLULAS DE RATONES BALB/c

i) Las DC de ratones BALB/c estimuladas con *L. major* no produjeron TNF- α (Tabla 3, Tabla 4 y Figura 14 A). El control positivo que presentó la mayor producción de TNF- α fue el de DC incubadas con *L. major* y LPS con un aumento significativo ($P=0.02$) de 283 pg/ml (Tabla 3 y Figura 14 A), es decir 18.86 X más con respecto al basal (Tabla 4).

ii) Los M ϕ de ratones BALB/c estimulados con *L. major* produjeron 45 pg/ml de TNF- α (Tabla 5 y Figura 14 B), es decir hubo un aumento de 2.36 X con respecto al basal (Tabla 6). El control positivo que presentó la mayor producción de TNF- α fue el de M ϕ incubados con *L. major* y LPS con un aumento de 128 pg/ml (Tabla 5 y Figura 14 B), es decir 6.73 X más con respecto al basal (Tabla 6).

H) PRODUCCIÓN DE TNF- α EN CÉLULAS DE RATONES C57BL/6

i) Las DC de ratones C57BL/6 estimuladas con *L. major* no produjeron TNF- α (Tabla 7, Tabla 8 y Figura 14 C). El control positivo que presentó la mayor producción de TNF- α fue el de DC incubadas con *L. major* y LPS con un aumento significativo ($P=0.01$) de 206 pg/ml (Tabla 7 y Figura 14 C), es decir 8.58 X más con respecto al basal (Tabla 8).

ii) Los M ϕ de ratones C57BL/6 estimulados con *L. major* produjeron 37 pg/ml de TNF- α (Tabla 9 y Figura 14 D), es decir 2.46 X más con respecto al basal (Tabla 10). El control positivo que presentó la mayor producción de TNF- α fue el de M ϕ incubados con Poly I:C con un aumento significativo ($P=0.01$) de 100 pg/ml (Tabla 9 y Figura 14 D), es decir 6.66 X más con respecto al basal (Tabla 10).

I) COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α ENTRE CÉLULAS DE RATONES BALB/c Y C57BL/6

i) En ninguna de la cepas de ratones hubo producción de TNF- α cuando las DC fueron estimuladas con *L. major* (Tabla 11).

ii) El comportamiento de los M ϕ estimulados con *L. major* fue similar en ambas cepas de ratones pues la secreción de TNF- α en los ratones BALB/c incrementó 2.36 X con respecto al basal y en los ratones C57BL/6 aumentó 2.46 X (Tabla 11).

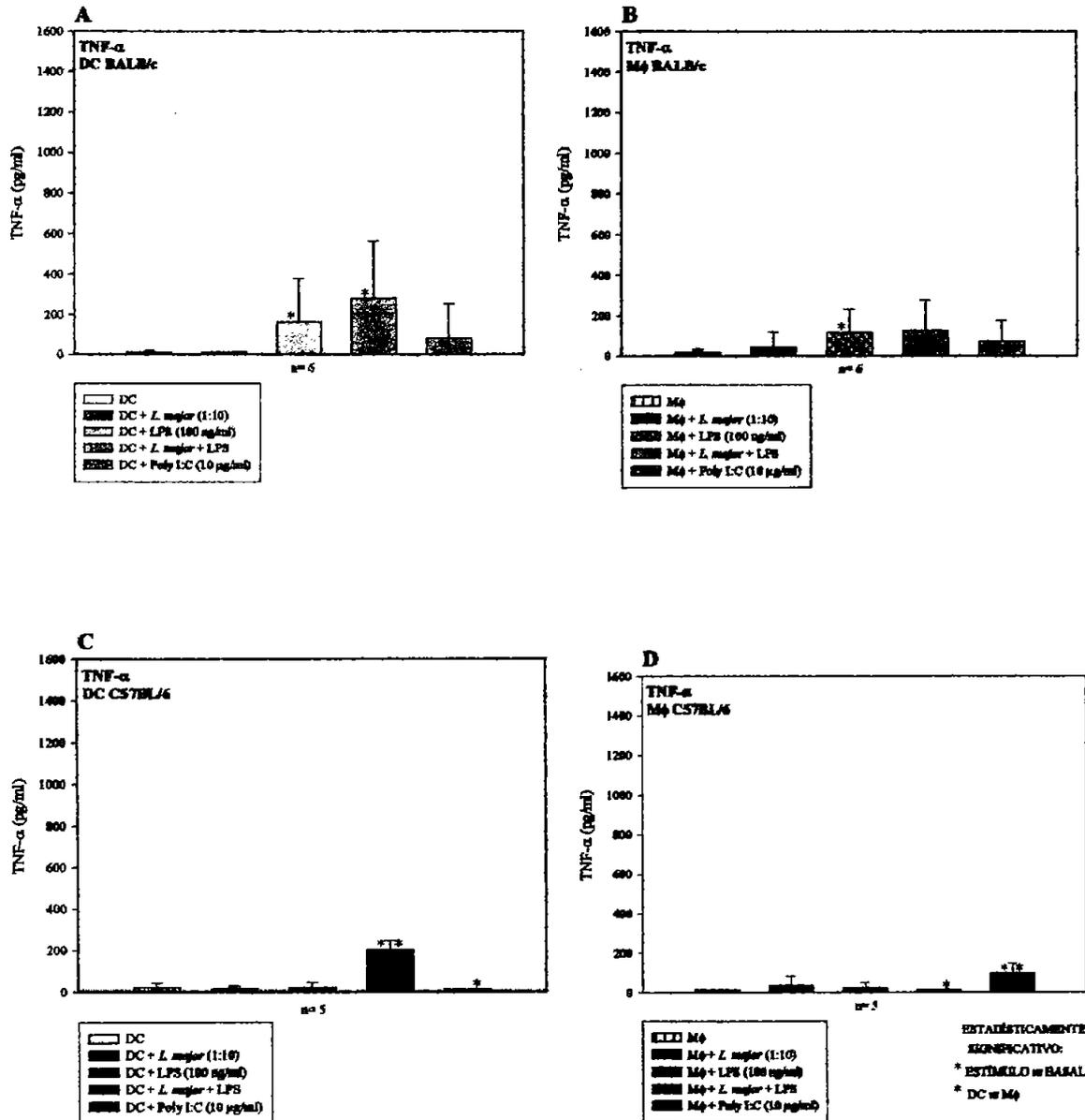


Figura 14. Producción de TNF- α por células dendríticas (DC) y macrófagos (M ϕ) derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6. (A) Comparación en la secreción de TNF- α por DC de ratones BALB/c y C57BL/6. (B) Comparación en la secreción de TNF- α por M ϕ de ratones BALB/c y C57BL/6. (C) Comparación en la secreción de TNF- α por DC y M ϕ de ratones BALB/c. (D) Comparación en la secreción de TNF- α por DC y M ϕ de ratones C57BL/6. En todos los casos las células fueron estimuladas con *L. major*, LPS, *L. major* + LPS y Poly I:C.

VII) CONCLUSIONES

1.- La susceptibilidad de ratones BALB/c a la leishmaniasis posiblemente se pueda correlacionar con la secreción de IL-10 por sus DC estimuladas con *L. major*, pues las DC de ratones resistentes no secretaron IL-10.

2.- La susceptibilidad de ratones BALB/c a la leishmaniasis no se puede correlacionar con la secreción de IL-10 por sus M ϕ , ya que es muy similar a la secretada por los M ϕ de ratones resistentes.

3.- La resistencia de ratones C57BL/6 a la leishmaniasis no se puede correlacionar con la IL-12, pues ni DC ni M ϕ incubados con *L. major* la secretaron.

4.- La producción simultánea de citocinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF- α) así como anti-inflamatorias (IL-10) por M ϕ estimulados con *L. major*, en ratones BALB/c y en menor grado en ratones C57BL/6, revelan que probablemente los M ϕ no participan de manera determinante en la inducción de una respuesta adaptativa tipo Th1 en ratones C57BL/6 y tipo Th2 en ratones BALB/c.

5.- Con este estudio se puede concluir que la IL-10 producida por DC posiblemente sea el factor determinante para el pronóstico del padecimiento y que el fondo genético del ratón es determinante para establecer si la DC responde a la infección por *L. major* con una elevada producción de IL-10. Aunque aparentemente la IL-10 secretada por las DC es una de las citocinas que se puede asociar con la susceptibilidad a la leishmaniasis en ratones BALB/c, queda por establecerse si hay otras citocinas producidas por distintas células de la respuesta inmune innata que también participen en la modulación de la respuesta inmune adaptativa hacia una respuesta tipo Th1 o Th2.

VIII) BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A., Lichtman, A. y Jordan, P. 1995. Inmunología celular y molecular. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid. 517 pp.
- Accolla, R. S., Adorini, L., Sartorio, S., Sinigaglia, F. y Guardiola, J. 1995. MHC: orchestrating the immune response. *Immunol. Today*. 16: 8-11.
- Awasthi, A., Mathur, R. y Saha, B. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.* 119: 238-258.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B. y Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.
- Becker, I., Volkow, P., Velasco-Castrejón, O., Salaiza-Suazo, N., Berzunza-Cruz, M., Delgado-Domínguez, J. S., Morales-Vargas, A., Ruiz-Remigio, A. y Pérez-Montfort, R. 1999. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 85: 165-170.
- Berzunza-Cruz, M., Bricaire, G., Romero, S., Pérez-Becker, R. Saavedra, E., Pérez-Montfort, R., Crippa-Rossi, M., Velasco-Castrejón, O. y Becker, I. 2000. *Leishmania mexicana mexicana*: genetic heterogeneity of mexican isolates revealed by restriction length polymorphism análisis of kinetoplatic DNA. *Exp. Parasitol.* 95: 277-284.
- Boltz-Nitulescu, G., Wiltschke, C., Holzinger, C., Fellingner, A. Scheiner, O., Gessl, A. y Förster, O. 1987. Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. *J. Leuk. Biol.* 41: 83-91.

- Brandonisio, O., Spinelli, R. y Pepe, M. 2004. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and Infect.* 6(15): 1402-1409.
- Castes, M., Agnelli, A., Verde, O. y Rondon, A. J. 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 27: 176-186.
- Figdor, C. G., Kooyk, Y. y Adema, G. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature.* 2: 77-84.
- Flores-Romo, L. 2001. *In vivo* maturation and migration of dendritic cells. *Immunology.* 102: 255-262.
- Gaafar, A., Fadl, A., El Kadar, A. Y., El Hassan, M. M., Kemp, M., Ismail, A. I. A., Morgos, S. A. y El Hassan, A. M. 1994. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major* of different zymodemes in the Sudan and Saudi Arabia: a comparative study. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 552-554.
- Gielen, V., Schmitt, D. y Thivolet, J. 1988. HLA class I antigen (heavy and light chain) expression by Langerhans cells and keratinocytes of the normal human epidermis: ultrastructural quantification using immunogold labeling procedure. *Arch. Dermatol. Res.* 280: 131-142.
- Gorak, P. M. A., Engwerda, C. R. y Kaye, P. M. 1998. Dendritic cells, but no macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* 28: 687-695.
- Haldar, J. P., Ghose, S., Saha, K. C. y Ghose, A. C. 1983. Cell-mediated immune response in indian kala azar and post-kala azar dermal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 42: 702-707.

- Hertz, C. J., Kiertscher, S. M., Godowski, P. J., Bouis, D. A., Norgard, M. V., Roth, M. D. y Modlin, R. L. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-Like Receptor 2. *J. Immunol.* 166: 2444-2450.
- James, P. W., Schmidt, S. M., Greer, K. E., McCall, C. O. y Pearson, R. D. 1997. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis in a traveler. *South. Med. J.* 90(3): 325-327.
- Janeway Jr., C. A., Travers, P., Walport, M. y Shlomchik, M. J. 2003. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* Masson, Barcelona. 731 pp.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D. H. y Ashford, R. W. 1974. *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *Proc. Royal Soc. London* 187: 409-419.
- Lezama, D. C. e Isaac, M. A. 1995. *Inmunobiología de las leishmaniasis.* Universidad Autónoma de Campeche. México. 115 pp.
- Lotze, M. T. y Thomson, A. W. 1999. *Dendritic cells, biology and clinical applications.* Academic Press. 733 pp.
- Martínez, J. y Gutiérrez, M. 1985. *Introducción a la protozoología.* Trillas, México. 207 pp.
- Mentink, M. y Mosser, D. M. 2000. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 7: 26-31.
- Mentink, M. y Mosser, D. M. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 166: 1141-1147.
- Moll, H. 1993. Epidermal Langerhans cells are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today.* 14(8): 383-387.
- Murray, W. H. y Nathan, F. C. 1999. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189(4): 741-746.

- OPS/OMS. 1994. Epidemiología, diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis en América Latina. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud.
- Padigel, U. M., Alexander, J. y Farell, J. P. 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. J. Immunol. 171: 3705-3710.
- Parslow, T. G., Stites, D. P., Terr, A. I. e Imboden, J. B. 2002. Inmunología básica y clínica. Manual Moderno. México. 917 pp.
- Proudfoot, A. E. I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nature. 2: 106-115.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. y Schuler, G. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J. Exp. Med. 180: 83-93.
- Salaiza-Suazo, N., Volkow, P., Pérez Tamayo, R., Moll, H., Gillitzer, R., Pérez-Torres, A., Pérez-Montfort, R., Delgado Domínguez, J., Velasco-Castrejón, O., Crippa, M. y Becker, I. 1999. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but no the disease outcome. Trop. Med. and Internat. Health. 4(12): 801-811.
- Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony- stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. J. Exp. Med. 179: 1109-1118.

- Sartori, A., Oliveira, M. A. P., Scott, P. y Trinchieri, G. 1997. Metacyclogenesis modulates the ability of *Leishmania* promastigotes to induce IL-12 production in human mononuclear cells. *J. Immunol.* 159: 2849-2857.
- Sathaporn, S. y Eremin, O. 2001. Dendritic cells (I): biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 46: 9-20.
- Stafford, J. L., Neumann, N. F. y Belosevic, M. 2002. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit. Rev. in Microbiol.* 28(3): 187-248.
- Steinman, R. y Cohn Z. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp. Med.* 137: 1142-1162.
- Tang, A., Amagai, M., Granger, L. G., Stanley, J. R. y Udey, M. C. 1993. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 361: 82-85.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol.* 3: 133-146.
- Velasco, C. O. 1987. Las leishmaniasis en México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 119-126.
- Velasco, C. O., Savarino, S. J. y Walton, B. 1989. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4: 280-289.
- Velasco, C. O. 1991a. La magnitud de una infección endémica: las leishmaniasis. En: *La seroepidemiología en México-volumen 1* (A. Escobar ed.). Publicación Técnica del INDRE # 9. México, D.F. 67-76 pp.
- Velasco, C. O., Guzmán, B. C., Cruz, R. J. y González, D. F. 1991b. Las leishmaniasis con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE # 7. México, D.F. 56 pp.

- Velasco-Castrejón, O., Rivas, B., Lázaro, G. y Hobart, S. 1997. Leishmaniasis cutánea pseudodifusa. Una nueva forma de leishmaniasis cutánea en México. XXIII Congreso Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología. Nov. 1997. Oaxaca, Oaxaca. México.
- Walton, B. 1984. New World cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis. En: Tropical Diseases. R. S. Goldsmith, J. R. Heyneman (ed). Lang. Pub.
- Walton, B. y Velasco, C. O. 1987. The distribution and aetiology of diffuse cutaneous leishmaniasis in the New World. Proc. NATO Advances Study Institute on Leishmaniasis. Zakitnos, Grecia.
- World Health Organization. 1984. "The Leishmaniasis". W.H.O. Technical Report Series No. 701. W.H.O. Geneva.

APÉNDICE 1
LISTA DE EQUIPOS

1. Campana de flujo laminar de bioseguridad NUAIRE Biological Safety Cabinets CLASS II TYPE A/B3, modelo no. NU-425-400.
2. Campana de flujo laminar horizontal NUAIRE, modelo NU-201-230.
3. Centrifuga refrigerada Sorvall RT 6000 B, DU PONT.
4. Incubadora con CO₂ Forma Scientific, modelo 3110.
5. Lavador de placas para ELISA EL_x50 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.
6. Lector de ELISA para micro placas EL 3-12e BIO-TEK INSTRUMENTS.
7. Potenciómetro BECKMAN Φ 340 pH/Temp Meter.

APÉNDICE 2
LISTA DE REACTIVOS

1. Ácido clorhídrico (HCl), J.T.Baker.
2. Albúmina bovina, SIGMA.
3. Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) polvo, J.T.Baker.
4. Biotinylated rat anti-mouse IL-10 monoclonal antibody (ELISA detection) [0.5 mg/ml], BD PharMingen.
5. Biotinylated rat anti-mouse IL-12 (p40/p70) monoclonal antibody (ELISA detection) [0.5 mg/ml], BD PharMingen.
6. Biotinylated rabbit anti-mouse/rat TNF- α polyclonal antibody (ELISA detection) [0.5 mg/ml], BD PharMingen.
7. Caseína, SIGMA.
8. Cloruro de magnesio 6 hidrato (MgCl₂·6H₂O) cristal, J.T.Baker.
9. Cloruro de sodio (NaCl) cristal, J.T.Baker.
10. Dietanolamina (C₄H₁₁NO₂), SIGMA.
11. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) polvo, GIBCO.
12. 2-mercaptoetanol [1000 X], GIBCO BRL.
13. EDTA ((ethylenedinitrilo) tetra acetic acid) polvo (C₁₀H₁₆N₂O₈), J.T.Baker.
14. Estreptavidina-fosfatasa alcalina, Invitrogen.
15. Etanol absoluto (C₂H₆O), MERCK.
16. Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na₂HPO₄), SIGMA.
17. Fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH₂PO₄·H₂O), SIGMA.
18. Gentamicina solución [10 mg/ml], GIBCO.
19. HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine N'-[2-ethanesulfonic acid]) polvo (C₈H₁₈N₂O₄S), SIGMA.
20. Hidróxido de sodio (NaOH) escamas, J.T.Baker.
21. L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃) polvo, SIGMA.
22. L-glutamina [200 mM, 100 X] solución, GIBCO BRL.

23. Penicilina-estreptomicina (5,000 unidades/ml de penicilina y 5,000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina) solución, GIBCO.
24. Poly I:C (Polyinosinic-polycytidylic acid) sal de sodio [10 mg/ml], SIGMA.
25. Purified rat anti-mouse IL-10 monoclonal antibody (ELISA capture) [1.0 mg/ml], BD PharMingen.
26. Purified rat anti-mouse IL-12 (p40/p70) monoclonal antibody (ELISA capture) [1.0 mg/ml], BD PharMingen.
27. Purified hamster anti-mouse/rat TNF- α monoclonal antibody (ELISA capture) [0.5 mg/ml], BD PharMingen.
28. Recombinant mouse GM-CSF [10 μg a 100 $\mu\text{g /ml}$], BD PharMingen.
29. Recombinant mouse IL-4 [10 μg a 200 $\mu\text{g /ml}$], BD PharMingen.
30. Recombinant mouse IL-10 [10 μg a 200 $\mu\text{g /ml}$], BD PharMingen.
31. Recombinant mouse IL-12 (p40) [2 μg a 40 $\mu\text{g /ml}$], BD PharMingen.
32. Recombinant mouse TNF- α [10 μg a 200 $\mu\text{g /ml}$], BD PharMingen.
33. RPMI medio 1640 polvo, GIBCO.
34. Suero de ternera (donor calf serum), GIBCO BRL.
35. Suero fetal bovino (fetal bovine serum), GIBCO.
36. Substrato de fosfatasa tabletas, SIGMA.
37. Tween 20 (Polyoxiethylenesorbitan monolaurate), SIGMA.
38. Tween 80 (Polyoxiethylenesorbitan monooleate), SIGMA.

APÉNDICE 3

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Albúmina bovina al 1 % con 0.05 % de Tween 20

Se disolvió 1 g de albúmina bovina en 100 ml de PBS 1 X pH = 7.2 y se agregaron 50 μ l de Tween 20. Una vez preparada se filtró y se guardó a 4°C.

2. Buffer de sustrato

A 10 g de dietanolamina se agregaron 70 ml de agua destilada y 500 μ l de una solución 0.1 M de cloruro de magnesio. Se agitó y ajustó el pH a 9.8 con ácido clorhídrico concentrado. Una vez preparado se filtró y se guardó a 4°C protegido de la luz.

3. Buffer de unión

Es una solución de fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH=9 o pH=6, el pH se ajustó con ácido clorhídrico concentrado, ya que estuvo listo se filtró y se guardó a 4°C.

4. DMEM

Se disolvió el contenido de un sobre de medio DMEM en 900 ml de H₂O tridestilada y desionizada, se agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio y 1 % de una solución de penicilina estreptomicina. Una vez mezclados se aforó a 1 lt con H₂O tridestilada y desionizada y se ajustó el pH a 7.2. El medio fue filtrado y guardado a 4°C.

5. PBS 1 X

Consta de una solución compuesta por fosfato monobásico de sodio 0.15 M y fosfato dibásico de sodio 0.15 M. Se agregó fosfato monobásico de sodio al fosfato dibásico de sodio hasta llegar a un pH=7.2. A esta solución se le agregaron 9 partes de cloruro de sodio 0.0205 M y se ajustó el pH final a 7.2. Una vez preparado se filtró y se guardó a 4°C.

6. PBS 1 X con 0.01 % de Tween 80

Por cada litro de PBS 1 X pH=7.2 se agregaron 100 μ l de Tween 80 y se agitó suavemente. Una vez listo se filtró y se guardó a temperatura ambiente.

7. RPMI 1640

Se disolvió el contenido de un sobre de medio RPMI 1640 en 900 ml de H₂O tridestilada y desionizada, se agregaron 2 g de bicarbonato de sodio, 290 mg de L-glutamina, 1 % de una solución de HEPES 10 mM y 1 % de una solución de penicilina-estreptomicina. Una vez mezclados se aforó a 1 lt con H₂O tridestilada y desionizada y se ajustó el pH a 7.2. El medio fue filtrado y guardado a 4°C.

8. Solución bloqueadora

Se prepararon 100 ml de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio con 5 g de caseína. El hidróxido de sodio se disolvió en 100 ml de agua caliente en un agitador con calor y cuando empezó a hervir se agregaron lentamente 5.0 g de caseína. Se agitó lentamente hasta que la caseína se disolvió, posteriormente se agregaron lentamente 900 ml de PBS 1 X pH=7.2 bajo agitación constante y sin aplicación de calor. Una vez que la solución se enfrió se le ajustó el pH a 7.4 con ácido clorhídrico concentrado, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20°C.