



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“MODULACIÓN DE CÉLULAS NKT POR RU41.740
(BIOSTIM) Y SU REPERCUSIÓN EN LA
LEISHMANIASIS MURINA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ERIKA RUBÍ LUIS GARCÍA

TUTORA:

INGEBORG BECKER FAUSER



2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Luis
Apellido materno: García
Nombre(s): Erika Rubí
Teléfono: 56-03-63-93
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad: Facultad de Ciencias
Carrera: Biología
No. de cuenta: 30012716-6

2. Datos del tutor

Grado: Dra.
Nombre(s): Ingeborg Dorothea
Apellido paterno: Becker
Apellido materno: Fauser

3. Datos del sinodal 1

Grado: Dra.
Nombre(s): Laila
Apellido paterno: Gutiérrez
Apellido materno: Kobeh

4. Datos del sinodal 2

Grado: Dr.
Nombre(s): Julio César
Apellido paterno: Carrero
Apellido materno: Sánchez

5. Datos del sinodal 3

Grado: Dr.
Nombre(s): Óscar
Apellido paterno: Velasco
Apellido materno: Castrejón

6. Datos del sinodal 4

Grado: Dra.
Nombre(s): Norma
Apellido paterno: Salaiza
Apellido materno: Suazo

7. Datos del trabajo escrito

Título: Modulación de células NKT por RU41.740 (Biostim) y su repercusión en la leishmaniasis murina
No. de páginas: 86
Año: 2009

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México, a cargo de la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser.

DEDICATORIAS

A mis padres quienes me brindaron su apoyo incondicional, cariño, confianza y amor para que lograra cumplir todas mis metas, entre ellas terminar de manera satisfactoria mi tesis.

A mis hermanos Fernando y Pedro por estar siempre a mi lado apoyándome y brindándome sus consejos y su cariño en todo momento.

A mis tías Lety y Nora que siempre me apoyaron brindándome sus consejos, y principalmente dándome su amor y cariño en momentos difíciles. Las quiero muchísimo.

A mi mejor amigo Omar Cardiel quien estuvo al pendiente de mi salud y quien colaboró ayudándome en todos los trámites para la realización de la tesis. Te quiero mucho.

A mis compañeros Hugo, Guillermo, Miguel y Marco Antonio a quienes agradezco su amistad incondicional y sus consejos los cuales me ayudaron a salir adelante después de mi operación.

Y en especial quisiera agradecer a una persona muy importante en mi vida y sin la cual no hubiera sido posible todo este trabajo, Alfonso mil gracias por todo.

A G R A D E C I M I E N T O S

A la Dra. Ingeborg D. Becker Fauser por su apoyo, enseñanzas y sobre todo por su amistad gracias.

Al M. en C. José Sotero Delgado Domínguez por su asesoría durante el desarrollo de esta tesis, por corregir mis errores y por todos sus consejos y enseñanzas gracias.

A la Dra. Norma Salaiza quien me ayudó a realizar la parte histológica de mi trabajo.

Al Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez del InDRE, SSA., por la donación del Biostim.

A todas las personas que laboran en el Bioterio del Departamento de Medicina Experimental, en especial al Sr. Ricardo, a Carlos y Daniel por mantener y cuidar a nuestros ratones experimentales gracias.

A todas las personas que son parte del laboratorio de Inmunoparasitología de Medicina Experimental por su apoyo gracias.

A mi querida amiga Beatriz por estar conmigo durante la realización de este trabajo, por su amistad y por los buenos momentos vividos en la Facultad de ciencias, gracias.

Quisiera agradecer especialmente al encargado del área de Cómputo: Marco E. Gudiño Zayas, quien me ayudo en todo momento en la realización de mi tesis, por su compañía, amistad y consejos, mil gracias.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Leishmaniasis	2
1.2 Clasificación de <i>Leishmania</i>	2
1.3 Morfología de <i>Leishmania</i>	4
1.4 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	6
1.4.1 Vector	8
1.4.2 Reservorios	9
1.5 Cuadros clínicos de leishmaniasis	9
1.5.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)	10
1.5.2 Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD)	10
1.5.3 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)	11
1.5.4 Leishmaniasis Visceral (LV)	12
1.6 Modelo murino de la leishmaniasis experimental	14
1.6.1 Resistencia a la leishmaniasis experimental	14
1.6.2 Susceptibilidad a la leishmaniasis experimental	15
1.7 Respuesta inmune	16
1.7.1 Inmunidad innata	17
1.7.2 Inmunidad innata en leishmaniasis	18
1.8 Células NKT en la respuesta inmune	20
1.8.1 Clasificación de las células NKT	21
1.8.2 Ligandos de las células NKT	23
1.8.3 Marcadores de superficie de las células NKT	24
1.8.4 Antígenos glicolipídicos reconocidos por las células NKT	24
1.8.5 Funciones de las células NKT	25
2. ANTECEDENTES	27
2.1 Células NKT en las infecciones causadas por <i>Leishmania</i>	27
2.2 Modulación de la respuesta inmune por RU 41.740 (Biostim)	30

	Página
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVO GENERAL	35
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
7. METODOLOGÍA	37
7.1 Cultivo de <i>Leishmania mexicana</i>	37
7.2 RU 41.740 (Biostim)	37
7.3 Leishmaniasis experimental	37
7.4 Papel del Biostim en la leishmaniasis experimental	38
7.5 Evaluación de la infección experimental	39
7.6 Obtención de esplenocitos	40
7.7 Obtención de células peritoneales	40
7.8 Estimulación <i>in vitro</i> de células peritoneales y esplenocitos con Biostim	41
7.9 Detección de citocinas por la técnica de ELISA	41
7.10 Cuantificación de células NKT	42
7.11 Análisis Estadístico	42
8. RESULTADOS	43
8.1 Determinación de la susceptibilidad de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ a la infección por <i>L. mexicana</i>	43
8.2 Porcentaje de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con <i>L. mexicana</i>	45
8.3 Producción de IL-10 por células peritoneales de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ estimuladas <i>in vitro</i> con Biostim	46
8.4 Efecto del inmunomodulador Biostim sobre el desarrollo de lesiones de los ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i>	47
8.5 Correlación entre el tamaño del cojinete plantar con su peso	50
8.6 Porcentaje de células NKT en el bazo de ratones los ratones BALB/c hembras infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con diferentes dosis de Biostim	51
8.7 Determinación de IL-10 en células peritoneales de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y estimuladas con Biostim	52

	Página
8.8 Aspecto macroscópico y microscópico de las lesiones causadas por <i>L. mexicana</i>	54
8.9 Determinación de la carga parasitaria en ratones BALB/c tratados con Biostim	55
9. DISCUSIÓN	57
10. CONCLUSIÓN	61
11. PERSPECTIVAS	61
12. REFERENCIAS	62
13. ANEXO: REACTIVOS	71
14. ABREVIATURAS	74
15. Lista de Figuras	76
16. Lista de Cuadros	79

RESUMEN

La leishmaniasis es una parasitosis de distribución mundial causada por diferentes especies del género *Leishmania* que se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas en el humano. En México, esta parasitosis es causada principalmente por *Leishmania mexicana*. Para estudiar la resistencia natural a la leishmaniasis se han utilizado diversos modelos murinos y se ha propuesto que la respuesta inmune innata puede determinar la susceptibilidad a la infección. Para el control de esta enfermedad, es necesario el análisis de las células de la respuesta inmune que lleven a la protección, así como el diseño de fármacos eficaces en el control de ésta. Se ha reportado que la administración oral del inmunomodulador RU41.740 (Biostim) en ratones infectados con diversos organismos patogénicos favorece el control de la infección. Por lo anterior, en el presente trabajo se analizó el efecto del Biostim en la leishmaniasis experimental murina. Nuestros resultados muestran que el Biostim redujo significativamente el tamaño de las lesiones causadas por *L. mexicana*, así como la carga parasitaria en el cojinete plantar de ratones susceptibles de la cepa BALB/c. Estos cambios se asociaron con un incremento en la población de las células NKT en el bazo. Nuestros datos demuestran por primera vez que el inmunomodulador Biostim es un inductor de células NKT y que dicha inducción se correlaciona con la protección a la infección por *L. mexicana*. La importancia de las células NKT en la protección coincide con nuestras observaciones en las que ratones resistentes (C57BL/6 y C3HeB/FeJ) a la infección por *L. mexicana* presentan significativamente más células NKT en el bazo, que los susceptibles (BALB/c). Debido a que el Biostim potencialmente representa una nueva alternativa terapéutica para el control de infecciones causadas por *L. mexicana*, es necesario el conocimiento detallado de los mecanismos moleculares de acción de esta molécula.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una parasitosis causada por diferentes especies de protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos por la picadura de moscos hembras pertenecientes a la familia *Phlebotomidae* (Malla & Mahajan, 2006). Existen más de 20 especies diferentes del género *Leishmania* que infectan al ser humano, las cuales generan diversos cuadros clínicos que incluyen lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales (Becker *et al.*, 2006). A nivel mundial, este padecimiento es responsable de 70,000 muertes por año y afecta a 12 millones de personas que viven en áreas endémicas de los trópicos y subtropicos. Cada año 2 millones de casos nuevos son reportados, de los cuales 0.5 millones de éstos corresponden a leishmaniasis visceral y 1.5 millones a leishmaniasis cutánea. (Reithinger *et al.*, 2007; Awasthi *et al.*, 2004). La leishmaniasis es endémica en 88 países y su propagación ha incrementado por co-infecciones con el virus del VIH-SIDA. Más del 90% de los casos de leishmaniasis cutánea se observan en países subdesarrollados o en vías de desarrollo tales como: Afganistán, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Pakistán, Perú, Arabia Saudita y Siria (Malla & Mahajan, 2006; McConville, 2007; Reithinger *et al.*, 2007) (Figura 1). En México, esta parasitosis constituye un grave problema de salud pública ya que se presenta en la mayoría de los estados, siendo los más frecuentes: Quintana Roo, Tabasco, Campeche, Nayarit, Chiapas, Oaxaca y Veracruz (Velasco, 1994) (Figura 2).

1.2 Clasificación de *Leishmania*

Las primeras clasificaciones taxonómicas de las especies de *Leishmania* se basaron en diferentes criterios tales como: el patrón clínico de la enfermedad, la distribución geográfica y las especies

de reservorios. Posteriormente en 1979, Lainson y Shaw dividieron al género *Leishmania* en dos subgéneros: *Leishmania (Leishmania)* y *Leishmania (Viannia)*, de acuerdo al sitio de desarrollo de los parásitos dentro del mosquito transmisor; (*L.*) *Leishmania* se localiza en el área suprapilórica (próxima a la probóscide), mientras que la (*L.*) *Viannia* se encuentra en el intestino medio posterior (Kamhawi, 2006) (Figura 3).

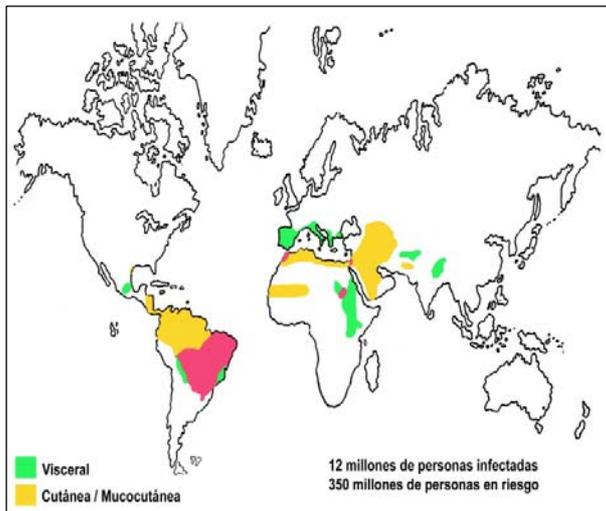


Figura 1. Distribución mundial de la Leishmaniasis Cutánea. Tomado de: Reithinger R., 2007.

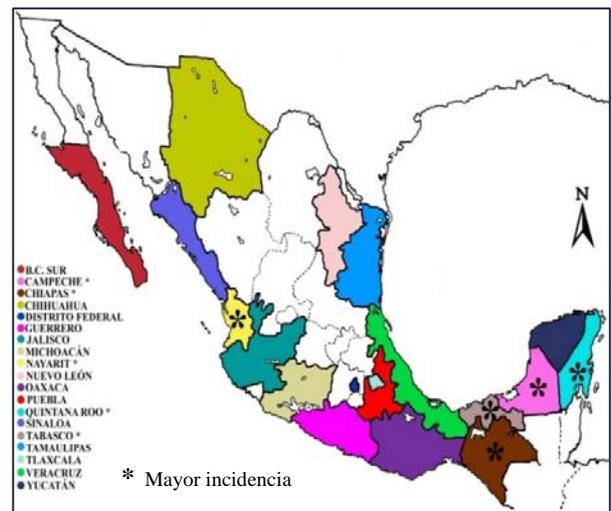


Figura 2. Distribución de la Leishmaniasis en México. Tomado de: Informe Final OMS, 2005.

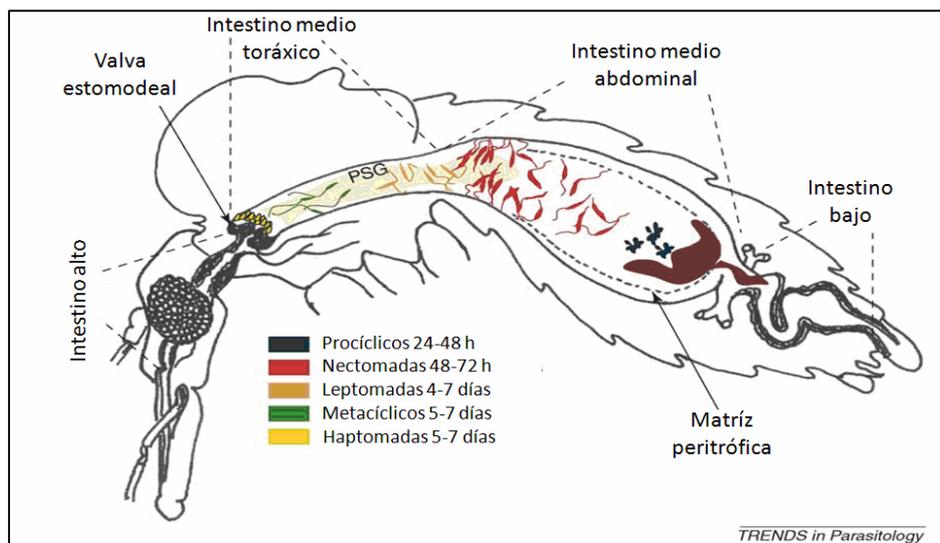


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania* en el insecto vector. Tomado de: *TRENDS in Parasitology*, 2006.

El cuadro 1 muestra las especies más comunes de *Leishmania* que infectan al hombre, su distribución geográfica y las formas clínicas de la enfermedad.

Cuadro 1. Características geográficas y clínicas de la leishmaniasis

Complejo	Especie	Distribución Geográfica	Enfermedad
<i>Leishmania donovani</i>	<i>L. (L.) donovani</i>	India, África	LV, LCL
	<i>L. (L.) infantum</i>	Mediterráneo	LV, LCL
	<i>L. (L.) chagasi infantum</i>	México, América del Sur	LV, LCL
No pertenece a complejos	<i>L. (L.) major</i>	África, Asia, Medio Oriente	LCL
	<i>L. (L.) tropica</i>	Medio Oriente, Asia	LCL
	<i>L. (L.) aethiopica</i>	Etiopia, Kenia	LCL, LCD, LCM
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	México, Centroamérica	LCL, LCD
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	América del Sur	LCL, LCD
	<i>L. (L.) venezuelensis</i>		
	<i>L. (L.) garnhami</i>	Venezuela	LCL
	<i>L. (L.) pifanoi</i>		
<i>Leishmania (Viannia) Braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Brasil, Centroamérica	LMC, LCL
	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Guyana, Surinam, Colombia	LMC, LCL
	<i>L. (V.) panamensis</i>	Panamá, Costa Rica,	LMC, LCL
	<i>L. (V.) peruviana</i>	Colombia Perú, Argentina	LMC, LCL

LMC: Leishmaniasis Mucocutánea, LCL: Leishmaniasis Cutánea Localizada, LV: Leishmaniasis Visceral
Tomado de: Becker, 2006.

1.3 Morfología de *Leishmania*

Las diferentes especies de *Leishmania* durante su ciclo de vida pasan por dos estadios que son promastigote y amastigote. El promastigote es la forma extracelular infectiva, con cuerpo elongado, cuyo desarrollo y multiplicación se llevan a cabo en el tracto digestivo de los insectos vectores pertenecientes al género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo. Esta forma parasitaria mide de 10 a 20 μm , sin contar la longitud de su único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 y 25 μm . El promastigote presenta un núcleo central, ribosomas, retículo

endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas, mitocondria y un flagelo anteronuclear que nace del cuerpo basal situado por delante del cinetoplasto. (Becker, 2006) (Figura 3). Los promastigotes dentro del tracto digestivo del insecto pasan por dos fases: la fase procíclica (logarítmica o de crecimiento), en la cual los promastigotes no son infectivos. Estos presentan forma elipsoidal, con un cuerpo pequeño que mide de 6 a 8 μm de longitud, son lentos y presentan flagelos cortos y la fase metacíclica (estacionaria e infectiva), que está sumamente adaptada para la transmisión acertada al hospedero mamífero; estos presentan un flagelo elongado, son delgados, rápidos y resistentes a la lisis mediada por complemento (Kamhawi, 2006). El amastigote es la forma intracelular replicativa, inmóvil, de cuerpo redondeado u ovalado que se produce a las pocas horas de la penetración del promastigote en las células fagocíticas del hospedero vertebrado. Esta forma reside y se multiplica por fisión binaria dentro de los fagolisosomas de las células mononucleares del hospedero, aunque también se ha documentado su presencia en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel (Laskay T, *et al.* 2003). Los amastigotes carecen de flagelo, miden de 2.5 a 3.5 μm de diámetro y cuando son teñidos con Giemsa se puede observar un gran núcleo excéntrico, un cinetoplasto pequeño que consta de blefaroplasto (ambos de color púrpura) y un filamento delgado que une el cinetoplasto con el cuerpo basal. El cinetoplasto es una subestructura de la mitocondria, que se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. En los tejidos de los vertebrados infectados, esta forma parasitaria se observa dentro y fuera de las células fagocíticas; y algunas veces en medios de cultivo (Figuras 4-5) (Becker, 2006; Velasco, 1994).

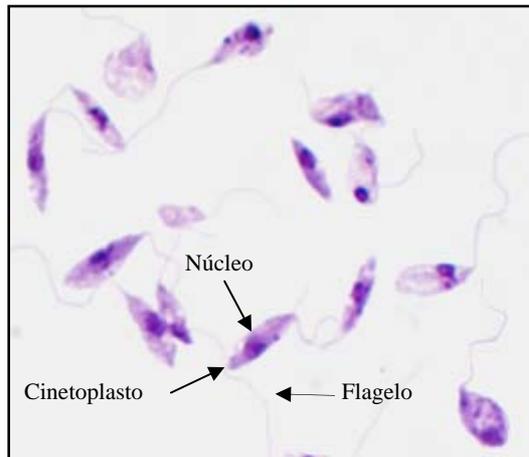


Figura 4. Morfología del promastigote de *Leishmania*.

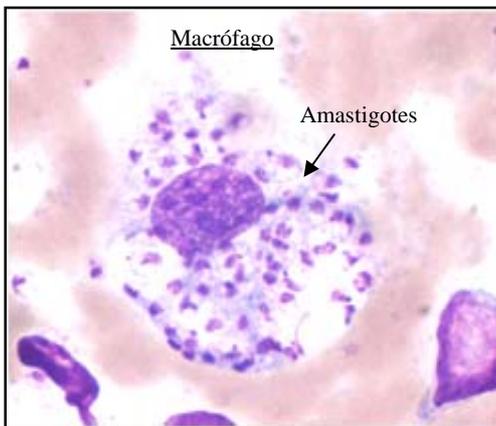


Figura 5. Célula fagocítica con amastigotes de *Leishmania*

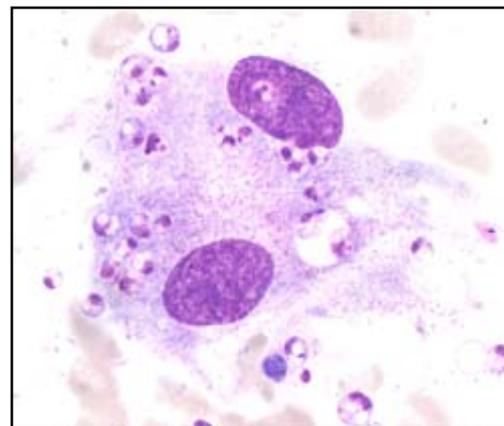


Figura 6. Célula fagocítica lisada por amastigotes de *Leishmania*

(Tomada del Laboratorio de Inmunoparasitología Depto. de Medicina Experimental, UNAM. Hospital General de México)

1.4 Ciclo biológico de *Leishmania*

El ciclo biológico de *Leishmania* inicia cuando el vector ingiere la sangre de un hospedero infectado, que contiene células fagocíticas parasitadas con amastigotes. Dentro del vector, la sangre infectada llega al intestino medio abdominal donde es retenida en una envoltura denominada matriz peritrófica (saco de glicoproteínas secretado por el epitelio del insecto

vector). En esta envoltura los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos. Aproximadamente tres días después de la ingesta, los promastigotes son liberados de la matriz peritrófica y pasan hacia la parte anterior del intestino medio. En este sitio los promastigotes pasan por cuatro etapas de desarrollo: a) nectomonas, b) leptomonas, c) haptomonas, hasta llegar a diferenciarse en d) promastigotes metacíclicos infectivos (Figura 3) . La virulencia del parásito es adquirida durante la metaciclogénesis, un proceso por el cual los promastigotes procíclicos se transforman a metacíclicos. Posteriormente, los promastigotes metacíclicos, que se encuentra en el intestino medio torácico del insecto vector, migran hacia su faringe en donde se mantiene hasta la próxima ingesta de sangre. El ciclo biológico del parásito continúa cuando el vector ingiere la sangre de un nuevo hospedero, en el que nuevamente los promastigotes infecciosos son regurgitados e introducidos al tejido. Una vez que el promastigote ingresa al hospedero vertebrado, rápidamente es capturado por células fagocíticas del tejido, (monocitos y neutrófilos) las cuales son atraídas al sitio del daño creado por la picadura del vector. Dentro de las células fagocíticas, los promastigotes pierden su flagelo y se transforman en amastigotes no-móviles. El amastigote sobrevive, se reproduce dentro del ambiente ácido del fagolisosoma y finalmente lisa a la célula hospedera liberando amastigotes que infectan a células vecinas. El ciclo biológico reinicia cuando un mosco vector ingiere nuevamente la sangre de un hospedero infectado (Mosser D. M & Brittingham A., 1997; Kamhawi, 2006; Descoteaux & Turco, 1999) (Figura 7).

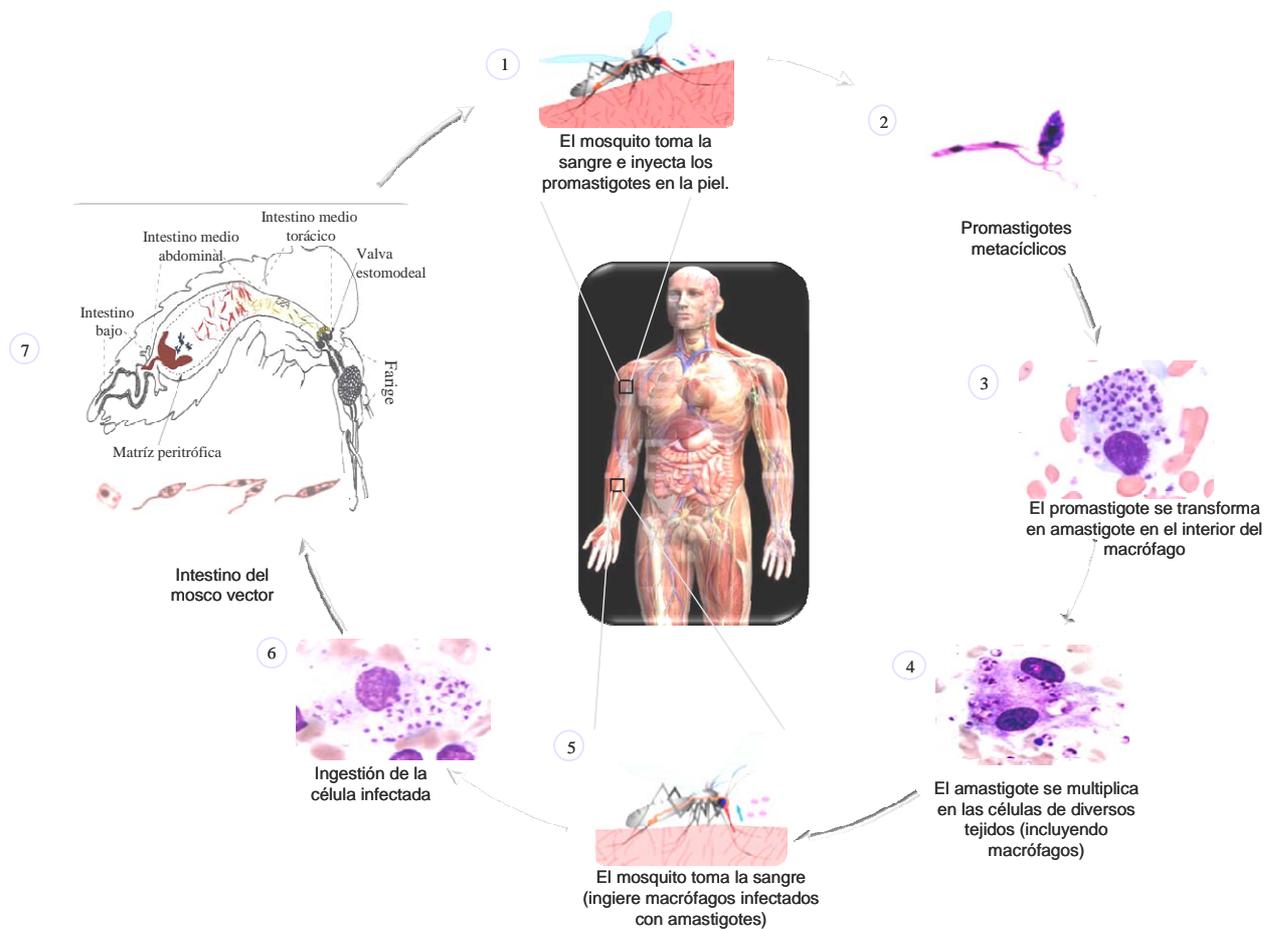


Figura 7. Ciclo Biológico de *Leishmania*

1.4.1 Vector

Los vectores de la leishmaniasis son pequeños dípteros pilosos que pertenecen a la subfamilia *Phlebotomidae* que contiene unas 600 especies y sub-especies, de las cuales 70 son transmisoras de la enfermedad. Los flebotomos realizan su ciclo vital completo durante todo el año dentro de áreas geográficas tropicales. A estas especies se les conoce comúnmente como papalotillas y pueden describirse como mosquitos que miden de 3 a 5 mm de longitud con cuerpo con alas muy pilosas, las cuales se mantienen erectas durante el reposo o cuando se alimentan. Además, las hembras son las únicas hematófagas. (Velasco, 1994) (Figura 8).

1.4.2 Reservorio

En general, los reservorios de la leishmaniasis pueden ser zoonóticos (animales salvajes o domésticos) o antroponóticos, donde el hombre es el hospedero. Los reservorios animales son en su mayoría roedores, zarigüeyas, coatíes, marsupiales, puerco espines, tejones y animales domésticos como el perro (Velasco, 1994; Kamhawi, 2006) (Figura 9).



Figura 8. Vector transmisor de *Leishmania* (*Phlebotomus*)
<http://www.anaaweb.org/img/leishmania1.jpg>



Figura 9. Perro infectado con Leishmaniasis
<http://www.scalibor.es/imagenes/leish/perro-leishmania.jpg>

1.5 Cuadros clínicos de la leishmaniasis

La leishmaniasis se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones clínicas tales como: desarrollo de lesiones ulcerativas en la piel, múltiples nódulos ulcerativos, inflamación destructiva de la mucosa e infecciones viscerales diseminadas (Reithinger, *et al.*, 2007). Los principales factores que contribuyen a la manifestación de esta enfermedad son: el tipo de especie del parásito, el estado inmunológico del hospedero y su variación genética (Alexander & Bryson, 2005).

1.5.1 Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

Esta enfermedad es conocida en México como “ulcera de los chicleros”. Los principales agentes causales en el Continente Americano son tres especies del complejo *L. mexicana*: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) pifanoi*. En México, esta enfermedad se distribuye por el Golfo, desde la frontera con los Estados Unidos hasta la península de Yucatán y de Chiapas a Nayarit por el Pacífico (Velasco, 1994). Por otra parte, en Europa, principalmente en África, la LCL es causada por *L. aethiopica*. Esta forma clínica se caracteriza por una pápula asintomática, que se agranda y se transforma en una úlcera de bordes indurados y de coloración violácea en el sitio de la picadura. Las úlceras pueden ser únicas o múltiples (dependiendo del número de picaduras que haya recibido el sujeto), redondeadas, con fondo limpio e indoloras (Figura 10). Las personas que padecen LCL suelen curar espontáneamente en un lapso de seis meses a dos años, excepto cuando la lesión es en la oreja, en donde se vuelve crónica y mutilante. A nivel microscópico, la lesión en personas con LCL se caracteriza por un infiltrado inflamatorio que consiste de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Los individuos que presentan este tipo de leishmaniasis, tienen una buena respuesta inmune celular de tipo Th1 con la producción de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-2 que generan una intradermoreacción de Montenegro positiva (Becker, 2006; Velasco, 1994).

1.5.2 Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD)

En México, esta forma clínica es producida también por *L. mexicana mexicana*. La LCD se caracteriza por una anergia hacia antígenos del parásito, lo cual permite la diseminación de éste y el desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel, con excepción de: a) el cuero cabelludo, b) la región axilar e inguinal y c) las palmas de las manos (Figura 11) (Velasco, 1994). Los pacientes

con LCD presentan una respuesta inmune de tipo Th2, debido a que sus linfocitos CD4⁺ secretan citocinas supresoras de macrófagos como son IL-10, TGF-β e IL-4 que inhiben a los mecanismos leishmanicidas del macrófago (generación de radicales de oxígeno y de óxido nítrico). Esto permite la multiplicación del parásito dentro de las vacuolas parasitóforas y el bloqueo de la producción de las citocinas activadoras como IFN-γ y TNF-α. En los pacientes esta respuesta determina el control de la infección. Generalmente los individuos que padecen LCD presentan una enfermedad que se prolonga por toda su vida debido a que son refractantes a los tratamientos farmacológicos, en parte debido al desarrollo de la resistencia del parásito a ésta (Becker, 2006).

1.5.3 Leishmaniasis Mucocutánea ó Espundia (LMC)

La leishmaniasis mucocutánea es producida por *L. braziliensis*, aunque también puede ser causada por: *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. trópica*, y *L. infantum*. Esta forma clínica es encontrada principalmente en el Continente Americano. En México se han observado algunos casos de LMC en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca, aunque es más frecuente en los países de Bolivia y Perú. Los pacientes con esta enfermedad presentan lesiones metastásicas en la mucosa nasofaríngea, causando una degradación del tejido blando y cartilaginoso (labios, nariz, paladar y cuerdas vocales). Estas lesiones comienzan a nivel del septum nasal y presentan eritema, infiltrado inflamatorio y como consecuencia perforación del tabique nasal, debido a la destrucción de la parte distal del cartílago de la nariz, originando el aspecto conocido como “nariz de tapir” (Cunningham, 2001; Velasco 2001; Becker, 2006) (Figura 12). A nivel microscópico, las lesiones de los pacientes con LMC presentan linfocitos CD4⁺ con características tanto tipo Th1 como de tipo Th2.; sin embargo, se ha visto que

predomina la respuesta Th1. El periodo de incubación ocurre en un rango de 2 a 6 semanas (Velasco, 1994; Becker, 2006; Awasthi *et al.*, 2004).

1.5.4 Leishmaniasis Visceral (LV)

La leishmaniasis visceral, también conocida como kala-azar o fiebre negra (denominada así debido a la hiperpigmentación de la piel), es causada predominantemente por *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. En el Viejo Mundo esta parasitosis es causada principalmente por *L. donovani* y en el Nuevo Mundo por *L. chagasi*. En esta forma clínica, los amastigotes residen en células reticuloendoteliales de las vísceras, incluyendo el bazo, nódulos linfoides, hígado e intestino. Normalmente, el periodo de incubación es de 2 a 4 meses. Los signos y síntomas incluyen fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, caquexia, incremento en el tamaño del abdomen debido a la hepatoesplenomegalia, edema; especialmente de la cara, sangrado de las mucosas, insuficiencia respiratoria y diarrea. La población en riesgo son niños, pacientes inmunosuprimidos y personas desnutridas (Figura 13). Los pacientes con LV presentan una respuesta inmune de tipo Th2 con producción de IL-10, por lo que son negativos a la prueba de intradermoreacción de Montenegro. La LV presenta una mortalidad del 85 al 95% de los casos, si no es tratada. (Malla & Majan., 2006; Cunningham, 2001).

CUADROS CLÍNICOS DE LEISHMANIASIS



Figura 10. Forma clínica de leishmaniasis cutánea localizada (LCL). Tomada del laboratorio de Inmunoparasitología Depto. De Medicina Experimental, UNAM)



Figura 11. Paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Tomada del laboratorio de Inmunoparasitología Depto. de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México)



Figura 12. Paciente con leishmaniasis mucocutánea. Tomada de: http://www.facmed.unam.mx/dirije/index.php?dir_ver=11



Figura 13. Paciente con leishmaniasis visceral. Tomado de: http://www.facmed.unam.mx/dirije/index.php?dir_ver=11

1.6 Modelos murinos de la leishmaniasis experimental

Para el estudio de los mecanismos de patogenicidad de las diferentes especies de *Leishmania* se han utilizado diversos modelos murinos en los que ha sido posible reproducir la forma susceptible (LCD) y resistente (LCL) de la leishmaniasis humana. Dichas formas clínicas pueden variar dependiendo de la especie de *Leishmania*, de la cepa de ratón y del número de parásitos inoculados (Cuadro 2) (Awasthi *et al.*, 2004).

1.6.1 Resistencia a la leishmaniasis experimental

En la leishmaniasis cutánea murina la resistencia a la infección está determinada por la activación de los linfocitos T CD4⁺, los cuales generan un patrón de citocinas Th1 tales como: IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-2. Estas moléculas inducen en el fagocito la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NOS), que a su vez son responsables de la eliminación del parásito (Liew *et al.*, 1990). Diversos estudios han demostrado que las cepas de ratones C57BL/6, CBA, C3H/HeJ y AKR son resistentes a *L. major* y *L. mexicana*. Durante las etapas iniciales de la infección estos animales desarrollan pequeñas lesiones en el sitio de inoculación de los parásitos, las cuales curan después de pocas semanas, de manera similar a lo que ocurre en los pacientes con LCL. (Behin *et al.*, 1979; Pérez *et al.*, 1979; Sacks & Melby, 1998). Por otra parte, algunos estudios recientes han demostrado que el género de los ratones también puede influir en el desarrollo de la leishmaniasis, ya que los ratones hembras de la cepa resistente C57BL/6 infectados con *L. mexicana* desarrollaron lesiones mayores respecto a los ratones machos (Maldonado *et al.*, 2004).

1.6.2 Susceptibilidad a la leishmaniasis experimental

De manera contraria a los animales resistentes, los ratones de las cepas BALB/c, DBA/2 y A/jax son altamente susceptibles a la infección por *Leishmania* spp debido a que desarrollan una respuesta tipo Th2 que se caracteriza por la producción de citocinas tales como: IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β (Locksley & Scott., 1991). Estos animales desarrollan lesiones ulcerativas progresivas en el sitio del inóculo, las cuales se vuelven crónicas y son similares a las que presentan los pacientes con LCD (Pérez, *et al.*, 1979; Howard *et al.* 1980).

Lo anterior quedó demostrado debido a que, a diferencia del ratón resistente C57BL/6, las células de los nódulos linfáticos de los ratones BALB/c infectados con *L. major* produjeron cantidades elevadas de transcritos de IL-4 en suero a las pocas horas después de la infección. Lo contrario ocurrió con los transcritos de IFN- γ , los cuales solo se produjeron en los ratones C57BL/6. La IL-4 regula negativamente la expresión de la sub-unidad β de la IL-12, (citocina necesaria para la inducción de la respuesta Th1), lo que favorece la expansión de los linfocitos T CD4⁺ Th2 y la producción de anticuerpos contra el parásito (Etges *et al.*, 1998; Solbach y Laskay, 2000). Por otra parte, se ha observado que tres locis génicos murinos designados como *Imr1*, 2 y 3 determinan la susceptibilidad o resistencia a la infección por *L. major*. Estos fenotipos son independientes de las respuestas Th1 o Th2, sin embargo, solo el fenotipo resistente se correlaciona con la respuesta inmune innata involucrada en el proceso de cicatrización (Baldwin *et al.*, 2007). Los diferentes modelos experimentales de leishmaniasis cutánea en las cepas de ratones genéticamente susceptibles y resistentes pueden observarse en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Características de la leishmaniasis en diferentes modelos murinos.

Hospedero	Respuesta en células T CD4 ⁺	<i>L. major</i> ^a	<i>L. mexicana</i> ^a	<i>L. braziliensis</i> ^a	<i>L. donovani</i> ^b
BALB/c	Th2	Progresiva	Progresiva	Sin lesión	Susceptibilidad /no cura
C3H	Th1	Curativa	Crónica	ND	Resistencia
C57BL/6	Th1	Curativa	Crónica	ND	Susceptibilidad /cura

^aInfección Subcutánea o intradérmica con 10⁴ a 10⁷ parásitos. ND, no determinada. ^bInfección Intravenosa con 10⁶ a 10⁷ parásitos. Tomado de: *Current Protocols in Immunology* (1998). 19.2.1-19.2.20

1.7 Respuesta Inmune

La respuesta inmune puede ser clasificada en dos fases que son respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. El sistema inmune de las diferentes especies animales ha evolucionado junto con los microorganismos que le rodean y está constituido por factores humorales y celulares que llevan a cabo distintas funciones como: a) reconocer lo propio de lo extraño, b) evitar o controlar la invasión de agentes infecciosos y c) reparar el daño tisular causado por agentes infecciosos, físicos o mecánicos; e inclusive por el propio organismo (Medzhitov R. & Janeway Jr., 2000).

La inmunidad adquirida es capaz de reconocer y eliminar de manera selectiva a los microorganismos. Esta inmunidad tiene cuatro características: 1) especificidad antigénica, 2) diversidad de respuesta, 3) memoria inmunológica y 4) reconocimiento de lo propio y lo extraño. Para que se inicie dicha respuesta se requiere la proliferación de células T y células B antígeno específicas. Las células B son las únicas células capaces de producir anticuerpos, reconocen antígenos extracelulares y además actúan como mediadores de la inmunidad humoral; mientras

que los linfocitos T son responsables de la inmunidad celular ya que destruyen a los patógenos externos y a células infectadas mediante el reconocimiento de antígenos peptídicos. Además, los linfocitos T, llevan a cabo su maduración en el timo y son diferenciadas en dos subtipos celulares Th1 y Th2 que se distinguen por las citocinas que secretan. Es importante señalar que las características de la respuesta inmune adquirida se establecen durante la respuesta inmune innata (Abbas, 2004).

1.7.1 Inmunidad Innata

La respuesta inmune innata inicia inmediatamente después del reconocimiento de antígenos extraños y es la primera barrera de defensa del hospedero contra diversos organismos patogénicos. Esta respuesta puede eliminar a los diferentes microorganismos mediante mecanismos efectores solubles como el sistema del complemento, el cual tiene tres funciones principales: lisis, ayuda a la fagocitosis y al reclutamiento de células al sitio de infección (Brittingham & Mosser, 1996). Además, los agentes patógenos también pueden ser eliminados por células fagocíticas tales como macrófagos, células dendríticas (DCs), células de Langerhans y polimorfonucleares (PMNs). Todas estas células presentan receptores en su superficie llamados receptores Toll-like (TLRs), que son capaces de reconocer a familias de moléculas presentes en los patógenos (PAMPs). Este reconocimiento conduce a la activación del factor de transcripción NF- κ B que a su vez induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como: IL-6, IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-12 y especies reactivas (ROS) y (NOS), las cuales favorecen la generación de una respuesta tipo Th1 y la eliminación del patógeno (Ruslan Medzhitov, Ph. D & Charles Janeway Jr. 2000).

Las DCs desempeñan un papel importante en la respuesta inmune innata así como en la adaptativa, ya que estas células son capaces de activar y potenciar la activación de células T (Campos-Martín *et al.*, 2006). Otras de las células de la respuesta inmune innata son las células NK, NKT y $T\gamma\delta$ que favorecen la eliminación de organismos patogénicos mediante la liberación rápida de citocinas Th1, mediante citotoxicidad directa a través de las vías perforinas/granzimas y por la vía Fas/FasL. Además, se ha demostrado que durante la infección de ratones con *Trypanosoma cruzi* dichas células incrementan en cepas de ratones resistentes, lo cual contribuye a la eliminación del parásito a través de la producción de IFN- γ (Antúnez & Cardoni, 2004).

1.7.2 Respuesta inmune innata en la leishmaniasis

En la leishmaniasis, la respuesta inmune innata se inicia inmediatamente después de la picadura del mosquito vector en el hospedero. Una vez que los promastigotes metacíclicos entran al tejido activan la cascada del complemento, que es la primera línea de defensa contra *Leishmania* (A. Brittingham & D. M. Mosser, 1996). Sin embargo, *Leishmania* al igual que otros parásitos ha desarrollado estrategias que le permiten evadir la respuesta inmune para su proliferación y permanencia en el hospedero. Una de estas estrategias es que los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* resisten la acción lítica del complemento debido a: 1) la liberación espontánea de los complejos C5b-C9 que se encuentran unidos a LPG de la superficie del parásito, los cuales pueden causar la elongación de la cadena de fosfoglicanos de la superficie del LPG (Puentes S. M *et al.*, 1990), 2) la fosforilación de algunos componentes del sistema de complemento (C3, C5 y C9), con la consecuente inhibición de la vía clásica y alterna (Hermoso T *et al.*, 1991; Sacerdoti-Sierra N *et al.*, 1997) y 3) que degrada C3b a C3bi mediante la metaloproteasa gp63 presente en su membrana, evitando de esta manera la formación del complejo de ataque a membrana (MAC).

Una vez que el parásito es opsonizado por C3bi, es reconocido por el receptor CR3 y CR1 del macrófago, lo cual favorece la fagocitosis de éste (Brittingham, *et al.*, 1995; Wright D. D. *et al.*, 1983; da Silva R *et al.*, 1989). Dicha opsonización mejora la supervivencia intracelular del parásito ya que reduce el estallido oxidativo del macrófago. Por otra parte, la superficie rica en carbohidratos de *Leishmania* también puede ser reconocida de manera directa por el macrófago mediante receptores de fucosa-manosa (Channon *et al.*, 1984; Russell and Wilhelm, 1986; Wilson and Pearson, 1986), el CR4 (Talamas-Rohana *et al.*, 1990), el receptor de fibronectina (Rizvi *et al.*, 1988), el receptor para productos finales de glicosilación (Mosser *et al.*, 1989), el receptor Fc (Chang, 1981) y el receptor de la proteína C-reactiva (Culley *et al.*, 1996). Lo anterior no solo favorece la entrada del parásito al macrófago, sino también a otras células como las células de Langerhans, las cuales permiten que el parásito se replique, debido a una falla en la producción de iNOS. Una vez que el parásito penetra en el macrófago, inhibe el ensamblaje de la NADPH oxidasa (que da lugar a ROS inflamatorio) y la expresión de iNOS las cuales generan compuestos altamente leishmanicidas (Bogdan C., *et al.*, 1998). Por otra parte, el LPG de *Leishmania* forma una barrera alrededor del parásito que es capaz de neutralizar algunos radicales libres de oxígeno, e inhibe la actividad de la PKC y la fusión del fagosoma-endosoma, lo cual favorece la transformación de promastigote en amastigote (Alexander *et al.*, 1999). Los amastigotes que se encuentran en el interior de los macrófagos, pueden ser destruidos por las ROS y por las proteasas lisosomales. Sin embargo, la gp63, dada su actividad proteolítica, favorece la sobrevivencia del parásito ya que degrada a dichas enzimas (Vannier-Santos, *et al.*, 2002). Diversos estudios han demostrado que una vez que los amastigotes son liberados por células hospederas, utilizan diversas estrategias para invadir nuevas células (Mosser & Rosenthal, 1994), por ejemplo los amastigotes de *L. major* y *L. mexicana* utilizan la opsonización con inmunoglobulinas para entrar a otros macrófagos por medio del receptor Fc (Guy & Belosevic,

1993; Peters *et al.*, 1995). Durante la infección de células fagocíticas, los parásitos liberan moléculas que se asocian al MHC y son transportados a la superficie del macrófago. Cuando los antígenos del parásito se asocian con moléculas del MHC clase I son reconocidos por las células T del tipo CD8⁺ (Tc o citotóxicas), mientras que cuando se asocian a las de la clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4⁺ (Th o cooperadoras). La activación de las células Tc permite la producción de una citotoxina que provoca la lisis del parásito y de otras que activan a los macrófagos (Bogdan & Rollinghoff, 1998). Sin embargo, estudios han demostrado que *L. donovani* inhibe en los macrófagos la expresión de moléculas del MHC clase I y clase II; ésta inhibición se asoció con un incremento en la producción de la PGE₂ (Reiner *et al.*, 1987). Además, se ha observado que los macrófagos infectados con parásitos vivos de *Leishmania mexicana* son incapaces de presentar antígenos intracelulares del parásito a los linfocitos T; este fenómeno parece ser independiente del de degradación antigénica ya que los productos de secreción del parásito si pueden ser presentados (Wolfran *et al.*, 1996). Para inducir una inmunidad protectora contra *Leishmania* se requiere de la producción de citocinas pro-inflamatorias (Th1), principalmente IL-12 e IFN- γ . Sin embargo, se ha observado que los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* son potentes inhibidores de la producción de IL-12 en macrófagos tanto *in vitro* (Carrera *et al.*, 1996; Sartori *et al.*, 1997) como *in vivo* (Belkaird *et al.*, 1998).

1.8 Células NKT en la respuesta inmune

Las células NKT son un subtipo especializado de células T derivadas del timo que expresan el receptor TCR y algunos de los marcadores de las células NK tales como NK1.1 (NKR1C) y Ly-49, lo que llevó a denominarlas “células T Asesinas Naturales” ó “células NKT”. Esta subpoblación de linfocitos fue descrita por primera vez en 1987 en la cepa de ratones C57BL/6

(Godfrey *et al.*, 2004). La cantidad de células NKT en los diferentes tejidos es muy variable. En ratón, estas células representan del 30 al 50% de células T en hígado, del 20 al 30% en médula ósea y del 10 al 20% en timo y en menor proporción en bazo 3%, nódulo linfático 0.3%, sangre 4% y pulmón 7%. Sin embargo, en el humano la proporción de las células NKT constituye del 0.01% al 1% del total de los linfocitos presentes en sangre periférica (Godfrey *et al.*, 2000; Román *et al.*, 2006). Las células NKT a través de su TCR $\alpha\beta$ invariante, poseen la capacidad de reconocer antígenos glicolipídicos de origen endógeno o exógeno mediante la unión con CD1d que es una molécula de la vía no clásica del MHC, expresada en la superficie tanto de APCs profesionales como en la de células epiteliales. La importancia de las células NKT radica en su potente acción inmunorreguladora debida a la liberación rápida y masiva de citocinas tipo Th1 y Th2, especialmente de IFN- γ e IL-4 luego de la activación a través de su TCR invariante. Después de la activación, las células NKT estimulan a otros tipos celulares como: NK, monocitos, DC, linfocitos B y linfocitos T cooperadores o citotóxicos, lo cual establece un puente entre el desarrollo de la respuesta inmune innata y la adaptativa (Campos Martín *et al.*, 2006; Mercer *et al.*, 2005).

1.8.1 Clasificación de las células NKT

En el modelo murino se han identificado tres subtipos de células NKT, los cuales se diferencian de acuerdo a su repertorio del TCR, su especificidad de moléculas presentadoras de antígeno y a su fenotipo de superficie. Al primer subtipo de las células NKT se le conoce como “células NKT clásicas” o “células NKT del tipo I”. Estas células pueden ser activadas específicamente a través de CD1d con α -galactosilceramida (α -GalCer), un ligando artificial específico derivado de la esponja marina *Agelas mauritanus* (Godfrey *et al.*, 2004). Las células NKT pueden ser divididas en tres subtipos de acuerdo a la expresión de moléculas CD4⁺ y CD8 (CD4⁺, CD8⁺ y DN). Las

células iNKT CD4⁺ producen tanto citocinas Th1 como Th2, aunque preferencialmente producen citocinas Th2. Por otro lado, las células iNKT CD8⁺ y DN producen selectivamente citocinas del tipo Th1 (altos niveles de IFN- γ , TNF- α e IL-2) y sintetizan perforinas en respuesta al estímulo con IL-2 e IL-12 (Román *et al.*, 2006). Las iNKT murinas expresan en su superficie un repertorio restringido del TCR $\alpha\beta$, el cual consiste de una cadena α invariante V α 14 J α 281, la cual se une con un grupo restringido de la cadena β semi-invariante V β 8.2, V β 2, V β 7; mientras que en el humano son las cadenas V α 24 J α Q y V β 11, respectivamente (Godfrey *et al.*, 2000). El segundo grupo es nombrado “células NKT del tipo II” ó “Células NKT no clásicas”, las cuales son dependientes de la interacción con CD1d. Esta población se diferencia de las células NKT del tipo I en la diversidad del repertorio de su TCR, que en este caso consta de un TCR compuesto por la cadena α : V α 3-J α 9 ó V α 8, asociada con V β 8.2 (Cuadro 3). Así mismo, estas células al igual que las células NKT del tipo I reconocen diferentes ligandos a través de CD1d. El tercer grupo consiste de “células NKT independientes de la unión con CD1d” llamadas T NK1.1⁺ CD8⁺. Estas células están presentes en los diferentes órganos y predominan sobre las células T NK1.1⁺ CD4⁺ y DN (Godfrey *et al.*, 2004; Soulard *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Clasificación de las células NKT

	Células del Tipo I (Células NKT clásicas)	Células del Tipo II (Células NKT No-clásicas)	Células T NK1.1 independientes de CD1d)
Dependientes a CD1d	Si	Si	No
Reactivas a α-GalCer	Si	No (humano)	No
Cadena-α del TCR	V α 14-J α 18 (ratón) V α 24-J18 (humano)	Diversa, pero en ocasiones V α 3.2-J α 9 , V α 8 (ratón)	Diversa
Cadena-β del TCR	V β 8.2, V β 7 y V β 2 (ratón) V β 11 (humano)	Diversa, pero en ocasiones V β 8.2	Diversa
NK1.1 (CD161)	+ (en células maduras) -/low (células inmaduras o post- activación)	+/-	+
Subtipos	CD4+ y DN (ratón) CD4+, CD8+ y DN (humanos)	CD4+ y DN (ratón)	CD4+, CD8+ y DN
Producción de IL-4	Si	Si	No
Producción de IFN-γ	Si	Si	Si

Tomado de: Godfrey *et al.*, 2004.

1.8.2 Ligandos de células NKT

Las células NKTs reconocen a diversas moléculas glicolípídicas presentadas por CD1d tales como: ligandos endógenos como isoglobotrihexosilceramida (iGb3) y ligandos exógenos artificiales como α -GalCer (Zhou *et al.*, 2004; Crowe *et al.*, 2003). Actualmente se sabe que el activador más potente de células NKTs murinas es α -GalCer. La administración de éste activador en ratones induce la proliferación de células NKT, la expresión de moléculas de activación, incremento de su actividad citotóxica y la secreción de una variedad de citocinas como TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-4 (Mercer *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que el iGb3 que es presentado por las células dendríticas estimula el desarrollo de células NKT en el ratón, ya que

los ratones carentes de la enzima β -hexosaminidasa, que cataliza la formación de iGb3, mostraron deficiencia de células NKT. Además, se ha propuesto que la expresión de iGb3 en el tejido periférico del ratón y del ser humano puede desempeñar un papel importante en controlar la respuesta de células NKT a infecciones y enfermedades autoinmunes (Zhou *et al.*, 2004).

1.8.3 Marcadores de superficie de las células NKT

En el ratón, las células iNKT $V\alpha 14$ maduras expresan marcadores fenotípicos de células memoria tales como: $CD62^-$, $CD69^+$, $CD44^{high}$, $IL-2R\beta^{high}$, $NK1.1^+$, $IL-7R\alpha$, $CD122$, $Ly49G2$, $Ly49C/I$, $NKG2D$, $2B4$, $CD94$, $Ly6C$, T-beta, $IFN-\gamma$, $IL-12R$, $IL-4$ y $DX5^+$. La expresión de estas moléculas, diferencia a las células iNKT $V\alpha 14$ del resto de los linfocitos T, lo cual explica su capacidad de respuesta inmediata ante las señales de activación mediadas por el TCR (Wilson *et al.*, 2002; Matsuda & Gapin, 2005). Recientemente, se ha demostrado que al igual que las células fagocíticas, las células NKT expresan en su superficie TLRs, principalmente TLR-2, TLR-4 y TLR-5 (Shimizu *et al.*, 2002)

1.7.4 Antígenos glicolipídicos reconocidos por las células NKT

La pared bacteriana es una estructura enriquecida con una variedad de glicolípidos y lipoproteínas. Por esta razón, dichas moléculas son candidatos antigénicos como potenciales vacunas ya que son capaces de unirse a moléculas de CD1 y de activar la respuesta inmune. Se ha observado que los fosfatidilinositolmanósidos (PIM) presentes en la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis* estimulan a células NKT a través de CD1d (Apostolou *et al.*, 1999). Por otra parte, las glicoproteínas unidas a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de *Plasmodium falciparum*, *L. major*, *Trypanosoma brucei* y *T. cruzi* también son reconocidos por CD1d ya que compiten con α -GalCer por la unión a CD1d (Shofield *et al.*, 1999; Procopio *et al.*, 2002).

También, se ha reportado que algunos antígenos lipídicos microbianos que se encuentran estructuralmente relacionados a iGb3 y α -GalCer (como los glicosefingolípidos (GSL) aislados de bacterias Gram-negativas o fosfatidilinositolmanósidos (PIM) expresados por algunas micobacterias) son capaces de unir a CD1d y estimular a células NKTs (Campos-Martín *et al.*, 2006). Además, Kinjo *et al.*, 2005, mostraron que *Sphingomonas* expresa en su superficie α -glicoesfingolípidos que son compuestos capaces de unirse a CD1d y de activar tanto a células NKT humanas como de ratón.

1.8.5 Funciones de las células NKT

La función efectora de las células NKT es mediada por su capacidad de producir rápidamente grandes cantidades de citocinas Th1 y Th2 (IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-13 e IL-4) en respuesta a la activación de su TCR (Wilson *et al.*, 2002). Esta liberación eficaz de citocinas se debe a que las células NKT tienen mRNA preformado para algunas citocinas, aún en ausencia de la activación por antígenos exógenos. El mecanismo que controla la transcripción y la síntesis rápida de dichas citocinas se desconoce (Mercer *et al.*, 2005). Además, las células NKT pueden mediar la actividad citotóxica a través de perforinas/granzimas y Fas/FasL (Kawano *et al.*, 1998). Una de las características de células NKT CD4⁺ y DN tímicas es la rápida producción de elevados niveles de las citocinas inmunoregulatoras IL-4, IFN- γ y TNF- α , después de la estimulación *in vitro*. Las células NKT CD4⁺ esplénicas también producen estas citocinas durante una corta estimulación *in vitro*, aunque en menor cantidad que en células NKT tímicas. A pesar de esto, se ha observado que las células NKT DN y CD4⁺ aisladas de bazo, minutos después de la estimulación *in vivo* con anti-CD3, incrementaron la producción de IL-4, IFN- γ y TNF- α . Interesantemente, esto no fue observado en células NKT esplénicas en cultivo o en fragmentos de

bazo cultivados con anti-CD3, lo que sugiere que en el bazo la producción de citocinas por células NKT puede ocurrir rápidamente en respuesta a la activación *in vivo*. Por otra parte, la estimulación de células NKT de ratones por NK1.1 (NKR1P1C/CD161) condujo a un incremento en la producción de IFN- γ en la ausencia de IL-4 (Godfrey *et al.*, 2000).

La respuesta de las células NKT puede ser modulada por algunas citocinas, ya que IL-7 aumenta la producción de IL-4 por células NKT tímicas y esplénicas, mientras que IL-12 aumenta la producción de IFN- γ en ambos grupos celulares. Esto muestra que las células NKT tienen diferente capacidad para producir citocinas dependiendo del microambiente en donde se encuentren (Godfrey, 2000). A pesar de que en el hígado de ratones se ha observado expansión clonal de células NKT asociada a la producción de citocinas, su participación en la inmunidad podría estar subestimada (Godfrey *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 Células NKT en las infecciones causadas por *Leishmania*.

El papel de las células NKT durante el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra diversos organismos patogénicos ha sido explorada utilizando varios modelos murinos. Estos estudios muestran que las células NKT restringidas a CD1d son indispensables para el control de la infección contra diferentes especies de virus, bacterias y parásitos tales como: Adenovirus, Herpes Simple Tipo I, Citomegalovirus, Hepatitis B, *Ehrlichia muris*, *Pseudomona aeruginosa*, *Sphingomonas paucimobilid*, *S. typhimurium*, *S. pneumoniae*, *T. gondii*, *T. cruzi* (cepa CL), *L. donovani* y *L. major* (Mattner, *et al.*, 2006). En el caso particular de la Leishmaniasis experimental murina causada por *L. major*, se ha observado que en los ratones resistentes de las cepas DBA/2 y C57BL/6, las células NKT CD4⁺ incrementan en sus nódulos linfoides y son esenciales para la expresión de HSP65 en macrófagos. Esto último a su vez inhibe la apoptosis de macrófagos infectados y contribuye con la protección temprana a la infección. Contrario a esto, en los ratones susceptibles de la cepa BALB/c infectados con *L. major*, no se observaron incrementos en el porcentaje de células NKT CD4⁺ ó en la expresión HSP65 en macrófagos de nódulos linfoides (Ishikawa *et al.*, 2000). Por otra parte, Mattner *et al.*, (2006) exploraron el papel de las células NKT durante la infección de ratones resistentes C57BL/6 con *L. major* y observaron que éste parásito estimula ligeramente a las células NKT y antagoniza la respuesta de estas últimas al activador α -GalCer en condiciones *in vitro*; lo anterior sugiere que muy probablemente en condiciones *in vivo* la infección con *L. major* inhibe la activación de células NKT. En la misma infección también se observó que los ratones carentes de células NKT restringidas a CD1d condujeron a un incremento inicial en las lesiones de la piel, pero no interfirieron con: a) la cura clínica de la infección, b) la citotoxicidad de las células NK, c) la

producción de IFN- γ , d) la expresión de NOS y e) el control de los parásitos en los nódulos linfoides. Sin embargo, en el bazo, las células NKT fueron necesarias para la citotoxicidad de células NK y para la producción inicial de IFN- γ ; interesantemente estos dos componentes son los encargados de reducir la carga parasitaria y de estimular la respuesta de células T antígeno específica durante la Leishmaniasis. De esta manera, las células NKT realizan funciones órgano-específicas protectoras durante la infección con *L. major*. También, se ha reportado que durante la infección de ratones C57BL/6 con *L. donovani* las células NKT son importantes para la expresión hepática del gen CXCL10 a través de la producción de IFN- γ . El gen CXCL10 ha sido implicado en diferentes procesos inflamatorios dependientes de células T los cuales son importantes para la eliminación de diversos patógenos (Svensson *et al.*, 2005). Además, Amprey *et al.*, (2004), observaron que los ratones susceptibles BALB/c carentes de CD1d incrementaron la susceptibilidad a la infección por *L. donovani* sugiriendo que de manera natural (en ratones “wild type”) las células NKT son responsables de la eliminación de algunos parásitos. En este sentido, el LPG de *L. donovani* podría ser responsable de la activación de las células NKT ya que encontraron que LPG purificado estimula en las células iNKT del hígado de ratones C57BL/6 la producción de IFN- γ de manera dependiente a CD1d. Recientemente Campos-Martín *et al.*, (2006) observaron que las células dendríticas inmaduras (iDCs) humanas infectadas con *L. infantum* sobre-expresan HLA-E en su superficie, lo cual las protege de la lisis por células NK. Sin embargo debido a que dichas células (iDCs) sobre-expresan CD1d en su superficie, éstas pueden ser reconocidas eficientemente y eliminadas por las células iNKT que producen IFN- γ . Finalmente, Wiethe *et al.*, (2008) mostraron que tanto el estado de diferenciación de las células dendríticas así como su interacción con las células NKT participan en la polarización de la respuesta inmune Th1/Th2, durante la infección de ratones susceptibles BALB/c con *L. major*. En el cuadro 4 se muestra el porcentaje de células NKT en diferentes trabajos experimentales.

Cuadro 4. Porcentaje de células NKT en diferentes especies de ratones

% de células NKT	Cepa de Ratón	Especies de parásitos	Localización	Referencias
0.87%	BALB/c	-----	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
0.97%	BALB/c	<i>L. major</i>	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
3.24%	C57BL/6	-----	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
7.85%	C57BL/6	<i>L. major</i>	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
0.89%	DBA/2	-----	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
5.22%	BDA/2	<i>L. major</i>	Nódulos linfoides	Ishikawa <i>et al.</i> , 2000.
1.0%	BALB/c	-----	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
1.0%	BALB/c	<i>T. cruzi</i>	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
0.5%	C3H	-----	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
2.5%	C3H	<i>T. cruzi</i>	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
0.4%	C57BL/6	-----	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
4.7%	C57BL/6	<i>T. cruzi</i>	Células de bazo	Antúnez & Cardoni, 2004.
2.6%	BALB/c	-----	Células de bazo	Trabajo actual
3.1%	BALB/c	<i>L. mexicana</i>	Células de bazo	Trabajo actual
12.7%	C57BL/6	-----	Células de bazo	Trabajo actual
14.2%	C57BL/6	<i>L. mexicana</i>	Células de bazo	Trabajo actual
3.4%	C3HeB/FeJ	-----	Células de bazo	Trabajo actual
6.7%	C3HeB/FeJ	<i>L. mexicana</i>	Células de bazo	Trabajo actual

2.2 Modulación de la respuesta inmune por Biostim

Los inmunomoduladores son moléculas que regulan la función del sistema inmune. Algunos productos bacterianos que inducen respuestas innatas y modifican la respuesta inmune adaptativa han sido usados como inmunoestimulantes para promover o mejorar la respuesta protectora del hospedero (Pedraza-Sánchez *et al.*, 2006). Uno de los inmunomoduladores más estudiados es el RU41.740 (Biostim®), que es una mezcla de dos glicoproteínas (P1 de 95kDa y F1 de 350kDa), extraídas de la cepa K₂O₁ de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (Griscelli *et al.*, 1982). El Biostim ha sido utilizado desde los años 80's como un inmunoestimulante que induce efectos benéficos en humanos y animales al ser administrado por diferentes vías, incluyendo la vía oral (Pedraza-Sánchez *et al.*, 2006). Se ha reportado que la administración oral del inmunomodulador Biostim en ratones tiene efecto protector durante infecciones causadas por bacterias (*Listeria monocytogene*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*), hongos (*Candida albicans*) y virus (Estaquier *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha observado que el tratamiento con Biostim reduce la frecuencia de infecciones en pacientes con bronquitis crónica (Pedraza-Sánchez *et al.*, 2006). Los efectos benéficos inducidos por Biostim han sido asociados con el mejoramiento de la respuesta inmune innata y adaptativa, ya que se ha observado que las glicoproteínas de *Klebsiella* no solo activan de manera eficiente al sistema inmune innato sino que también mejoran la expresión de moléculas involucradas en el procesamiento y presentación antigénica en células APCs del sistema inmune adaptativo (Pedraza-Sánchez *et al.*, 2006).

Diversos estudios han demostrado el efecto inmunoestimulante de biostim. Wood y Möller (1984), demostraron que la inyección i.p. con 100 µg/kg de Biostim en las cepas de ratones C3H/HeJ y C57BL/10ScCr (híbridos que no responden a LPS), estimula la síntesis de anticuerpos IgM e IgG. Posteriormente, en 1986, Sozzani *et al.*, mostraron que la administración de Biostim (100 µg/kg) por vía intraperitoneal en ratones de la cepa C3H/HeN, incrementa la

actividad citotóxica de células NK obtenidas de pulmón, sangre y bazo. Por otra parte, en 1987, Rajagopalan, *et al.*, demostraron que la multiplicación intracelular de *Legionella pneumophila* en macrófagos derivados de monocitos humanos fue inhibida por la aplicación de Biostim; así mismo, observaron que la activación de macrófagos cultivados *in vitro* con Biostim indujo un incremento en la producción del anión superóxido lo cual permitió la eliminación de *Legionella pneumophila*. Más tarde, en el año de 1990, Meredith *et al.*, mostraron que Biostim es capaz de incrementar los niveles de mRNA de IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α en poblaciones de macrófagos peritoneales. Por su parte Aloui *et al.*, (1996), mostraron que la estimulación *in vitro* con 10 μ g/ml Biostim induce a un incremento en la producción de GM-CSF e IL-8 en células epiteliales humanas. La producción de GM-CSF e IL-8 son importantes para el reclutamiento local de células involucradas en la defensa del hospedero. Pedraza-Sánchez *et al.*, (2006), observaron que en condiciones *in vitro* Biostim induce la expresión de CD69 en diferentes subtipos celulares de sangre obtenida de pacientes sanos (monocitos, células NK y linfocitos T y B). Además, observaron que en monocitos los niveles de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 así como TNF- α , IL-6 e IL-12 incrementaron. Por otra parte, los niveles de HLA-DR incrementaron en linfocitos B y monocitos. Hasta la fecha, los receptores involucrados en el reconocimiento de Biostim se desconocen; sin embargo, se ha sugerido a los TLRs como los principales responsables. Recientemente, se reportó que la proteína de superficie de *K. pneumoniae* (KpOmPA) es reconocida por células NK a través de TLR-2 y TLR-5, lo cual da lugar a un incremento en la producción de β -defensinas e IFN- γ . Estaquier *et al.*, (1997), reportaron que el inmunomodulador Biostim mejora la supervivencia de monocitos *in vitro*, mediante un efecto supresor de la apoptosis. Spisek *et al.*, (2004) observaron que la estimulación *in vitro* de DC con Biostim conduce a: a) un incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, b) un incremento en la expresión de CD83 que es una molécula asociada a la

maduración y presentación de Ag, c) un aumento en la expresión de las moléculas HLA-ABC y HLA-DR y d) un incremento en la producción de IL-12. De esta manera, Biostim ejerce un efecto estimulante en la maduración de DC. Finalmente, Nimier *et al.*, (1999), observaron que la administración vía oral con el inmunomodulador Biostim en ratones DBA/2, protege a éstos contra infecciones causadas por bacterias Gram-negativas y en menor grado contra la bacteria Gram-positiva *L. monocytogenes*. Además, la incubación de células linfoides de nódulos mesentéricos y células de bazo con biostim, las induce a la liberación de citocinas pro-inflamatorias como: TNF- α , IFN- γ e IL-12, así como de IL-10 (citocina involucrada en la inhibición de la síntesis de IFN- γ e IL-12). Por otra parte, la administración oral de Biostim en ratones DBA/2 estimula la producción de IgG (principalmente: IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃), las cuales tienen un efecto protector contra infecciones bacterianas. A pesar de los múltiples efectos protectores de Biostim ya mencionados, se desconoce su efecto en el desarrollo de la Leishmaniasis experimental causada por *Leishmania mexicana*.

El cuadro 5 muestra las propiedades del Inmunomodulador Biostim en diferentes modelos experimentales.

Cuadro 5. Propiedades del Inmunomodulador RU41740 (Biostim)

Propiedades del Inmunomodulador Biostim	Referencias
Estimula a las células T y B	(Griscelli, 1982)
Estimula las funciones fagocíticas de monocitos y macrófagos e incrementa la biosíntesis de IL-1 y prostaglandinas.	(Griscelli <i>et al.</i> , 1982; Fujiki & Kato, 1982)
Mejora algunas funciones de leucocitos polimorfonucleares	(Guenounou <i>et al.</i> , 1984; Guenounou, 1985; Valand & Blomgren, 1987)
Induce la producción de IL-1 y TNF- α en monocitos humanos.	(Sozzani <i>et al.</i> , 1988)
Induce la producción de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12 e IFN- γ en células de bazo y en células linfoides mesentéricas de ratón.	(Nimier <i>et al.</i> , 1999)
Induce la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12 en monocitos humanos. Mejora la expresión de moléculas como: HLA-DR, CD80 y CD69 en células NK, B y Monocitos.	(Pedraza <i>et al.</i> , 2006)
Induce un incremento en la producción de IL-12 en células dendríticas inmaduras de humano (iDCs)	(Spisek <i>et al.</i> , 2004)
Mejora la capacidad citotóxica de macrófagos infectados con <i>Candida albicans</i> y <i>Legionella pneumophila</i> , incrementando la producción del anión superóxido.	(Smets <i>et al.</i> , 1987; Nielsen H., 1986; Rajagopalan, <i>et al.</i> 1987)
Incrementa el número de células NK y su actividad citotóxica en ratón.	(Sozzani <i>et al.</i> , 1986; Migliorati <i>et al.</i> , 1989)
<i>In vitro</i> , incrementa la actividad fagocítica de monocitos/macrófagos	Nielsen & Bonde, 1986; Meredith <i>et al.</i> , 1990)
En ratones, protege contra infecciones causadas por bacterias (<i>Listeria monocytogene</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>), hongos (<i>Candida albicans</i>) y virus	(Nimier <i>et al.</i> , 1999; Fujiki, 1986; Rudent <i>et al.</i> , 1985)
Incrementa la producción de anticuerpos: IgM e IgG (IgG _{2a} , IgG _{2b} , IgG ₃)	(Griscelli <i>et al.</i> , 1982; Takada <i>et al.</i> , 1982; Wood & Möller, 1984; Nimier <i>et al.</i> , 1999)
Incrementa el número de esplenocitos en ratones.	(Wood & Möller, 1984)
Incrementa la expresión de receptores C3b y C3bi de neutrófilos y monocitos humanos.	(Capsoni <i>et al.</i> , 1991)

3. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es un problema de salud pública que cada año afecta a 12 millones de personas en el mundo. Para el tratamiento de dicha enfermedad se han utilizado diversos fármacos tales como: antimoniales pentavalentes, anfotericina B, pentamidina isotionato, aminosidina (sulfato de pantomicina), ketoconazol, itraconazol, alopurinol y miltefosine. Sin embargo, el tratamiento presenta varios inconvenientes debido a que dichos fármacos requieren de la administración parenteral repetida, su eficacia es variable y no absoluta, y la mayoría de ellos inducen efectos adversos en el paciente. Además el costo elevado y el surgimiento de formas resistentes a dichos fármacos han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (McConville y Handman, 2007). El tratamiento de la leishmaniasis experimental con inmunomoduladores en combinación con agentes antiparasitarios ha mostrado buenos resultados. Se ha observado que el inmunoestimulante BCG (Bacille Calmette Guerin) y el levamizol inhiben el desarrollo de la infección por *L. donovani* y *L. tropica* respectivamente, en ratones BALB/c (Smrkovski & Larson, 1977; Butler, 1987) y por otra parte, se ha observado que el inmunomodulador Imiquimod R848, en combinación con Leshcutan (ungüento compuesto de sulfato de paromicina y cloruro de metilbenzetonio), inhibe el desarrollo de las lesiones causadas por *L. major* en ratones susceptibles BALB/c, debido a que se ha demostrado que dicho inmunomodulador es capaz de estimular de manera eficiente la actividad leishmanicida de macrófagos y por otra parte induce la secreción de citocinas Th1 como IFN- α , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 en células de humano y de ratón e inhibe la producción de IL-4 e IL-5 (Buates and Matlashewski, 1999). Sin embargo, a la fecha no se han estudiado inmunomoduladores en la infección por *Leishmania mexicana*. El estudio sobre el efecto de diferentes inmunomoduladores en la leishmaniasis experimental con *Leishmania mexicana* probablemente permitirá el diseño de nuevas estrategias profilácticas y/o terapéuticas. El efecto del inmunomodulador Biostim en la Leishmaniasis no ha sido explorado a

pesar de que ha mostrado efectos benéficos en el tratamiento contra diferentes enfermedades infecciosas en humanos y animales. Por otra parte, debido a que las células NKT son importantes para el control de las infecciones experimentales causadas por algunas especies de *Leishmania*, es importante explorar si Biostim ejerce un efecto sobre células NKT y de qué manera esto modula el desarrollo de la infección por *Leishmania mexicana* en modelos murinos.

4. HIPÓTESIS

El inmunomodulador Biostim induce un aumento en el número de células NKT en ratones BALB/c infectados con *Leishmania mexicana*, lo cual favorece el control de la infección.

5. OBJETIVO GENERAL:

Determinar el número de células NKT presentes en el bazo de ratones susceptibles y resistentes a la infección con *Leishmania mexicana* y analizar si el tratamiento *in vivo* de los ratones susceptibles con Biostim modifica: la evolución de la infección, el nivel de células NKT en bazo y la producción de la citocina IL-10 en células peritoneales.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.- Analizar la evolución de la enfermedad en ratones de las cepas susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6 y C3H/HeJ), infectados con promastigotes de *Leishmania mexicana*, mediante la medición del cojinete plantar, el peso de la pata y la cuenta de los parásitos en los cortes histológicos de las lesiones.
- 2.- Analizar si el tratamiento por vía oral con el inmunomodulador Biostim, modifica la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
- 3.- Cuantificar el número de células NKT presentes en el bazo de ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3H/HeJ en estado basal y después de 6 meses de infección.
- 4.- Analizar el efecto del inmunomodulador Biostim sobre el número de células NKT de bazo en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.
- 5.- Determinar la producción de citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ en células peritoneales y de bazo provenientes de las cepas de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3H/HeJ, estimuladas *in vitro* con Biostim.
- 6.- Determinar si Biostim modifica la producción de IL-10, IL-12 e IFN- γ en células peritoneales de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.

7. METODOLOGÍA

7.1 Cultivo de *L. mexicana*

Para el aislamiento de promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* se sacrificó un ratón infectado con la cepa MHOM/MX/92/UADY68 (aislada originalmente de un paciente con LCL), se seleccionó el cojinete plantar no ulcerado y en condiciones estériles se inyectaron 50 µl de solución salina a la lesión. Posteriormente se realizó un aspirado, el cual se cultivo en 5 ml de RPMI 1460 (GIBCO) con 10 % de suero fetal bovino (SFB) a 25°C. Del tubo de aislamiento se tomó una alícuota cada tercer día para analizar la viabilidad y proliferación del parásito. Una vez establecido el cultivo *in vitro*, se cosecharon los parásitos en el quinto día de cultivo mediante centrifugación a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Por otra parte, para mantener la virulencia del parásito, se establecieron cultivos *in vivo* en el cojinete plantar izquierdo de ratones BALB/c de 8 semanas, posteriormente los parásitos fueron aislados en condiciones axénicas.

7.2 RU41740 (BIOSTIM)

Para los ensayos *in vitro* se utilizó RU41740 (glicoproteína de *Klebsiella pneumoniae*) o también llamado Biostim. Stock con 1g/500ml donado por el Dr. Sigifredo Pedraza Sánchez del InDRE, SSA.

7.3 Leishmaniasis experimental

Para determinar la correlación entre los niveles de células NKT de diferentes cepas de ratones con la susceptibilidad a la infección de *Leishmania mexicana*, se emplearon diferentes cepas de ratones machos de 8 semanas de edad obtenidos del Bioterio del Departamento de Medicina

Experimental, de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los grupos experimentales se dividieron de la siguiente manera:

Cuadro 6. Grupos Experimentales

Grupo	# de ratones	Cepa	Resistencia/Susceptibilidad
A	6	BALB/c	Susceptible
B	6	C57BL/6	Resistente
C	6	C3HeB/FeJ	Resistente

Para el manejo de los animales se siguieron los lineamientos bioéticos establecidos por la Comisión de Bioética de la Facultad de Medicina UNAM.

Tres ratones de cada grupo fueron infectados en el cojinete plantar de la extremidad inferior izquierda con 1×10^6 promastigotes de *L. mexicana* (20 μ l c/u). Por otra parte, los tres ratones restantes de cada grupo fueron inyectados solo con PBS (control negativo). Después de 6 meses de infección todos los animales se sacrificaron por dislocación cervical. A cada grupo de ratones se les evaluó el grado de infección mediante: a) el grosor del cojinete plantar y el peso de la pata, b) los niveles de las células NKT del bazo y c) niveles de expresión de citocinas.

7.4 Papel del Biostim en la leishmaniasis experimental

Para analizar el efecto del Biostim en la leishmaniasis experimental, se emplearon 15 ratones hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad. Estos se distribuyeron en 5 grupos experimentales.

Cuadro 7. Grupos Experimentales tratados con Biostim

Grupo	# de ratones	<i>L. mexicana</i>	Dosis de Biostim	Duración
1.- Control negativo	3	-----	-----	-----
2.- Control positivo	3	1X10 ⁶	-----	-----
3.- Biostim	3	1X10 ⁶	10 mg/kg	Lunes a viernes por 5 semanas
4.- Biostim	3	1X10 ⁶	20 mg/kg	Lunes a viernes por 2 semanas
5.- Biostim	3	1X10 ⁶	20 mg/kg	Lunes, miércoles y viernes por 3 semanas

El tratamiento con Biostim se inició 2 meses después de la infección.

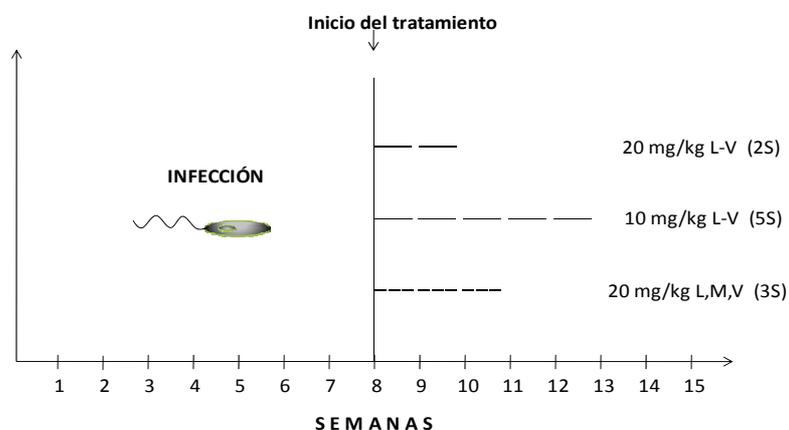


Figura 14. Esquema de tratamiento farmacológico de Biostim en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.

7.5 Evaluación de la infección experimental

Para evaluar la evolución de la enfermedad, a cada uno de los grupos se les midió el grosor del cojinete plantar, antes, durante y después del tratamiento con Biostim. Dichas mediciones fueron

realizadas con un Vernier de calibre (1-50 mm). Una vez que los ratones fueron sacrificados se les cortó la extremidad inferior izquierda (infectada) y se pesó en una balanza analítica. Posteriormente se fijaron en formol al 10%, se les realizaron cortes de 4 μm y se tiñeron con hemotoxilina/eosina. Además, en cada condición experimental se determinó el número de parásitos presentes en los cortes teñidos con hematoxilina/eosina mediante el conteo de 3 cuadrantes de 1 mm^2 .

7.6 Obtención de esplenocitos

El bazo de cada ratón se extrajo en condiciones estériles y cada uno de ellos se colocó en tubos cónicos de 15 ml que contenían 5 ml de medio RPMI 1640 SFB 10%. Después, cada bazo se disgregó en un tamiz de 120 micras y la suspensión celular obtenida se colocó en tubos cónicos de 15 ml. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 2000 rpm durante 10 min a 4° C. Con el objeto de romper a los eritrocitos, el sedimento obtenido se resuspendió en 5ml de solución lítica (NH_4Cl , KHCO_3 , Na_2EDTA). Finalmente, los tubos se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 4° C, los esplenocitos se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1640 estéril y la viabilidad celular se determinó en una cámara de Neubauer mediante la exclusión del azul de Trypan.

7.7 Obtención de células peritoneales

Una vez sacrificados los ratones de los diferentes grupos experimentales, a cada uno se le inyectaron 10 ml de PBS frío y estéril en su cavidad peritoneal. Posteriormente se retiró la piel abdominal, la capa muscular expuesta se golpeó suavemente y el líquido peritoneal se extrajo con la misma jeringa. El líquido obtenido se lavó dos veces con PBS centrifugando a 2000 rpm por 10 min a 4° C. Las células sedimentadas se resuspendieron en 1ml de RPMI 1640-10%

(SFB) y la viabilidad celular fue determinada con una cámara de Neubauer mediante la exclusión de azul de Trypan.

7.8 Estimulación *in vitro* de células peritoneales con Biostim

Las células peritoneales obtenidas de cada ratón (2×10^6) fueron resuspendidas en 1 ml de medio RPMI-1640-SFB10%, depositadas en una placa de cultivo de 24 pozos y estimuladas bajo las siguientes condiciones: a) Biostim (10 μ g/ml), b) LPS (100ng/ml) y c) células en estado basal (sin estímulo). Las placas fueron incubadas a 37° C con 5% de CO₂ durante 24 h. El sobrenadante se colectó y se le determinó la concentración de la citocina IL-10 mediante la técnica de ELISA.

7.9 Detección de IL-10 en células peritoneales por ELISA

La determinación de la citocina IL-10 se llevó a cabo como lo describe el procedimiento de “BD-Pharmingen Cytokine ELISA”. En una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano (Costar, Corning, NY) se colocaron 50 μ l de anticuerpo de captura (anti-IL-10) diluido en 100 mM Na₂HPO₄, pH 9.0 y se incubó durante 12 h a 4°C y bloqueado con PBS pH 7.4 suplementado con 5% de caseína disuelta previamente en NaOH 0.1N. Se agregaron 200 μ l de los sobrenadantes de las muestras y 100 μ l de la citocina estándar (IL-10), la cual fue incubada en medio RPMI-1640-SFB 10% por 2 h a temperatura ambiente. La citocina unida fue detectada mediante la incubación por 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-citocina biotinilado en presencia de 1% de albúmina sérica bovina (cabra anti-IL-10 de ratón). Posteriormente, la placa fue revelada usando estreptavidina-fosfatasa alcalina en presencia de P-nitrofenil fosfato como sustrato (4mg/ml; Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). En todos los pozos la absorbancia fue detectada a 405 nm usando un lector de microplacas (Bioteck). Las lecturas de los duplicados de las muestras se promediaron y las concentraciones de citocinas se calcularon utilizando la curva estándar de

citocinas recombinantes construida mediante regresión lineal (Ab vs. concentración) utilizando el programa KC4. El anticuerpo y la citocina recombinante fue comprada a BD-Pharmingen, San José, CA, USA.

8.0 Cuantificación de células NKTs

Los esplenocitos (2×10^6) se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugaron a 2000 rpm y el sedimento se resuspendió en 1ml de paraformaldehído al 2% en PBS y se incubó durante 30 min protegido de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS centrifugándolas a 2000 rpm por 10 min. El sedimento obtenido fue resuspendido en 47 μ l de PBS al cuál se le adicionaron 3 μ l de anticuerpo anti-NKT marcado con Ficoeritrina (PE) (Beckton Dickinson). Como control negativo, se utilizó el isotipo del anticuerpo (anti-*IgG2 α κ) marcado con PE. Posteriormente las muestras se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente el porcentaje de células NKT presentes en las muestras se determinó mediante citometría de flujo usando el programa Cell Quest (Beckton Dickinson).

8.1 Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar. La evaluación estadística de los datos se realizó mediante la prueba de U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Además, un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la susceptibilidad de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ a la infección por *L. mexicana*.

Para confirmar la resistencia o susceptibilidad de las diferentes cepas de ratones utilizadas en nuestros experimentos, se realizaron mediciones del grosor del cojinete plantar y peso de la pata de los ratones “resistentes” C57BL/6, C3HeB/FeJ y “susceptibles” (BALB/c) a la infección por *L. mexicana*. Los resultados muestran que los ratones de la cepa BALB/c infectados con *L. mexicana* incrementaron 2.07 veces el grosor de su cojinete plantar, respecto a su control negativo ($P < 0.00055$); mientras que los ratones de las cepas C57BL/6 y C3HeB/FeJ solo mostraron un ligero incremento de 0.02 veces en el grosor del cojinete plantar respecto a su control. Sin embargo, se observó que el grosor del cojinete plantar de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* presentó una diferencia significativa con respecto a los ratones infectados de las cepas C57BL/6 y C3HeB/FeJ ($P \leq 0.05$) (Figura 15).

Por otra parte, cuando se analizó el peso de la pata de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, se observó un incremento significativo de aproximadamente 6 veces con respecto a su control ($P < 0.019$). Sin embargo, las cepas de ratones C57BL/6 y C3HeB/FeJ únicamente mostraron un ligero aumento en el peso de sus patas en relación a su control (Figura 16). Los resultados mostraron que los ratones de las cepas C57BL/6 y C3HeB/FeJ presentaron resistencia a la infección por *L. mexicana*, ya que como se observa en las gráficas, a diferencia de los ratones BALB/c, éstos son capaces de controlar la infección.

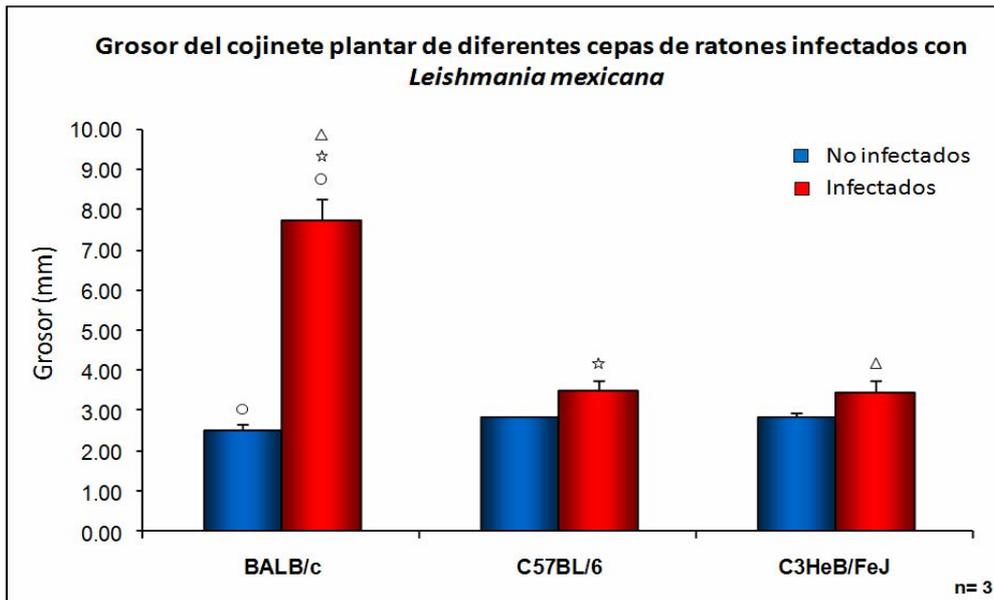


Figura 15. Grosor del cojinete plantar de los ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ. Como se observa en la gráfica, solo el cojinete plantar de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* aumentó significativamente ($P < 0.0005$). Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

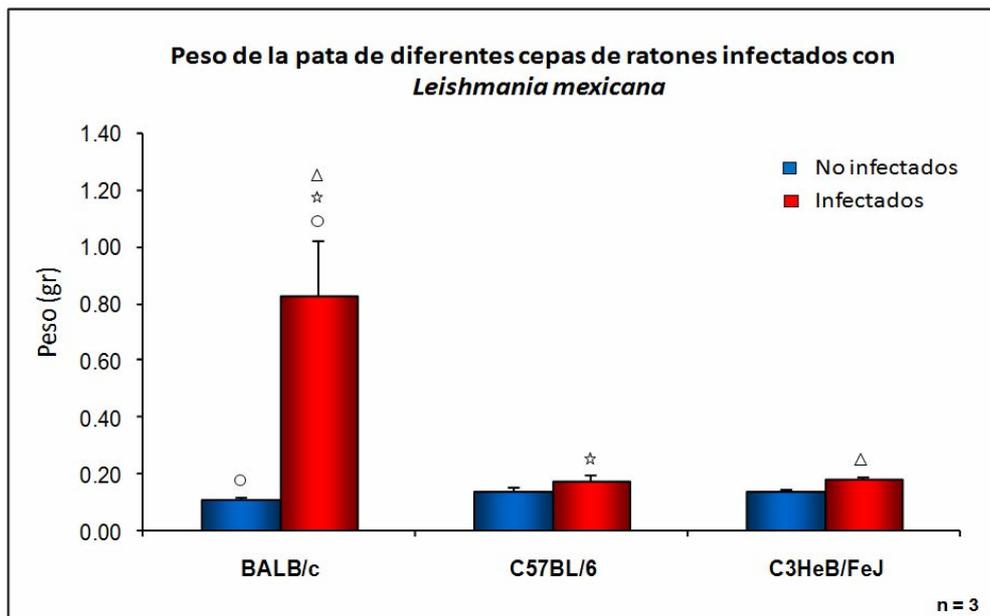


Figura 16. Peso de la pata de los ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ. Como se observa en la gráfica, solo el peso de la pata de los ratones BALB/c infectados aumentó significativamente ($P < 0.019$). Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

8.2 Porcentaje de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con *Leishmania mexicana*.

Con el objeto de conocer si las células NKT participan en la protección a la infección con *L. mexicana*, se analizó el porcentaje de estas células en el bazo de ratones susceptibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6 y C3HeB/FeJ) a la infección. El análisis por citometría de flujo mostró que los niveles basales de las células NKT en el bazo de los ratones resistentes C3HeB/FeJ y C57BL/6 sin infección fueron 0.3 y 5 veces mayor respecto al de los ratones susceptibles BALB/c no infectados, con una diferencia significativa de $P < 0.049$ / $P < 0.005$ respectivamente. Este resultado muestra que el porcentaje basal de células NKT es mayor en las cepas de los ratones resistentes a la leishmaniasis, respecto al de los susceptibles BALB/c.

Por otro lado, los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana* no mostraron un incremento en el número de células NKT de bazo. Sin embargo, en los ratones de la cepa C3HeB/FeJ infectados con *L. mexicana*, se observó un incremento significativo en el número de células NKT de bazo (0.93 veces más con respecto a su basal, $P < 0.036$). Interesantemente, este incremento de células NKT durante la infección con *Leishmania mexicana* en la cepa de ratones C3H, es similar a lo reportado por Antúnez & Cardona 2004, quienes observaron un incremento significativo en el porcentaje de células NKT de bazo, durante la infección con *T. cruzi* (Figura 17).

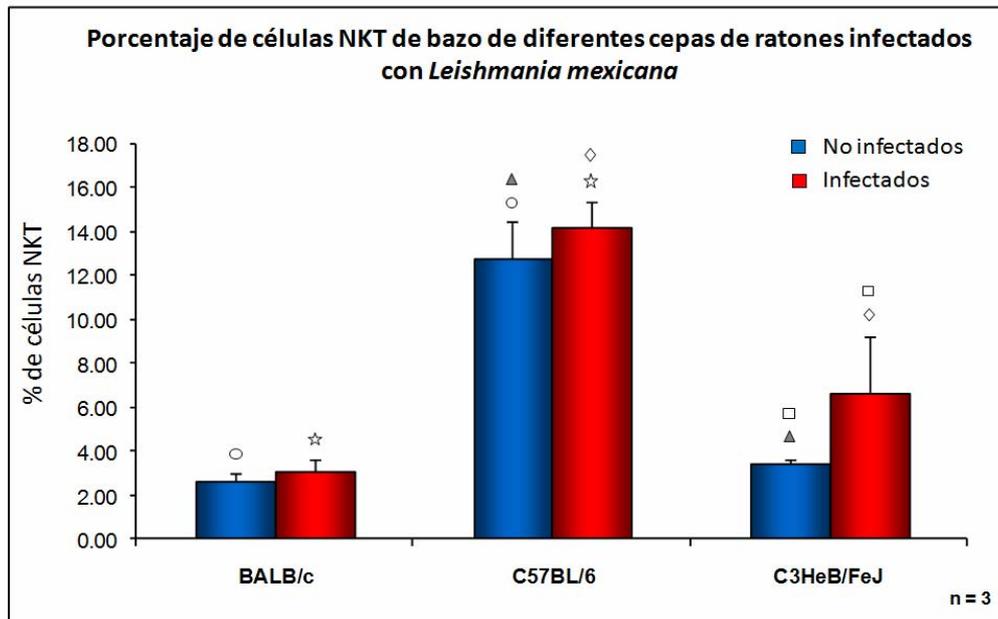


Figura 17. Porcentaje de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con *L. mexicana*. Durante la infección con *Leishmania mexicana* los niveles de células NKT solo incrementaron significativamente en el bazo de los ratones C3HeB/FeJ ($P < 0.036$). Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

8.3 Producción de IL-10 por células peritoneales de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ estimuladas *in vitro* con Biostim.

Debido a la importancia que IL10 tiene en el control de una respuesta inflamatoria intensa y a que las citocinas provenientes de las células peritoneales son importantes en la respuesta inmune sistémica, decidimos determinar si Biostim es capaz de inducir la producción de IL-10 en las células peritoneales provenientes de las cepas de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ. Los resultados mostraron que las células peritoneales estimuladas *in vitro* con 10 $\mu\text{g/ml}$ de Biostim estimularon la producción de IL-10 en células de ratones sanos e infectados con *L. mexicana*. A pesar de que el incremento de IL-10 fue observado en las tres cepas de ratones, los niveles

basales de IL-10 fueron mayores en los ratones de las cepas BALB/c y C57BL/6 respecto al C3HeB/FeJ (Figura 18).

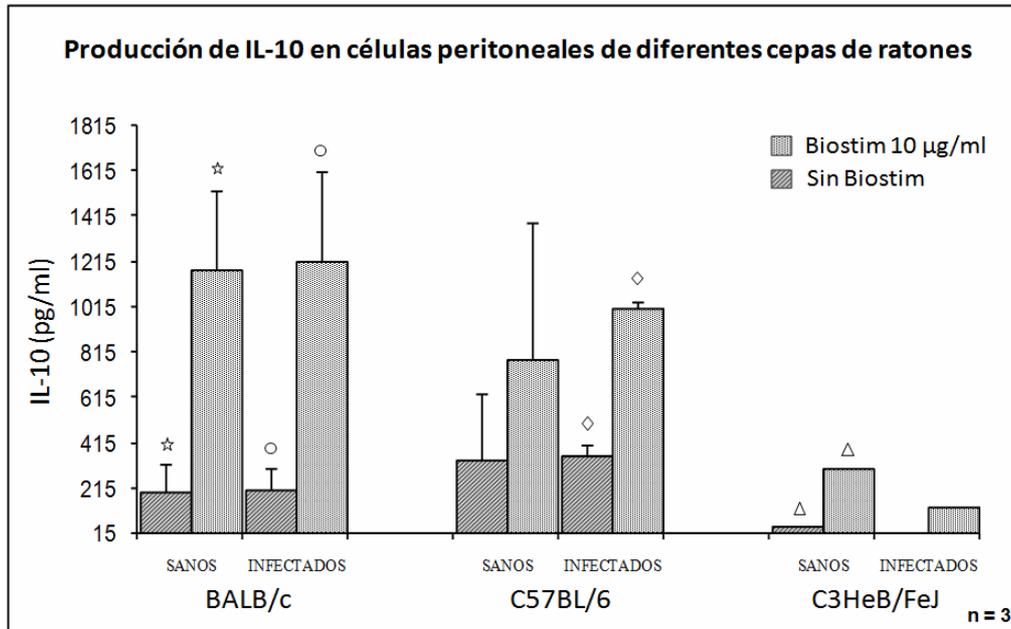


Figura 18. Producción de IL-10 en células peritoneales de ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ sanos e infectados con *L. mexicana*. En todos los casos Biostim estimuló la producción de IL-10. Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes

8.4 Efecto del inmunomodulador Biostim sobre el desarrollo de las lesiones de los ratones BALB/c infectados *Leishmania mexicana*.

Para evaluar el efecto del Biostim durante el desarrollo de las lesiones en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, realizamos mediciones semanales del cojinete durante el tratamiento vía oral con Biostim. Los resultados mostraron que durante la infección el tamaño de las lesiones ocasionadas por *L. mexicana* disminuyó con las diferentes dosis del inmunomodulador Biostim, teniendo mayor efecto con la dosis de 20mg/kg (300µl), aplicada durante 5 semanas consecutivas de lunes a viernes (L-V). La aplicación de 10mg/kg (150µl) durante 5 semanas de L-V, también

logró disminuir el tamaño de la lesión con respecto al control. Al reducir el número de aplicaciones de 20mg/kg (300µl) de Biostim a 3 veces por semana (L, M y V) durante 3 semanas, se redujo ligeramente su capacidad para controlar la infección. Lo anterior sugiere que la estimulación continua por Biostim en una dosis elevada puede ayudar a controlar la Leishmaniasis experimental murina (Figura 19).

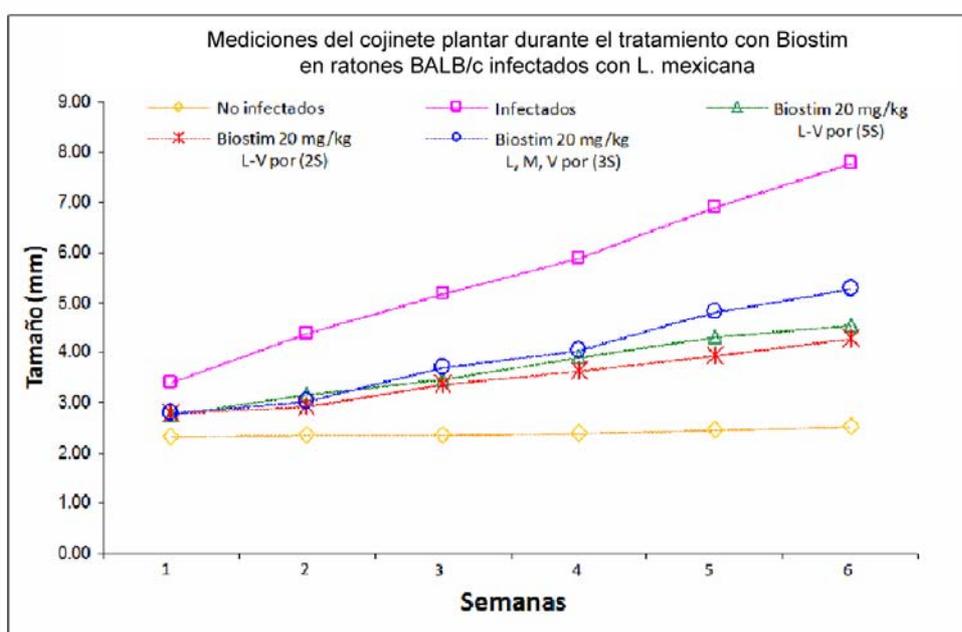


Figura 19. Medición del cojinete plantar de ratones BALB/c hembras infectadas con *L. mexicana*, durante el tratamiento vía oral con el inmunomodulador Biostim. Las diferentes dosis administradas de Biostim inhibieron el desarrollo de la infección con *Leishmania mexicana*. Abreviaturas: L-V: Lunes a Viernes, L, M, V: Lunes, Miércoles y Viernes, (S): semanas de tratamiento (n=3).

Para evaluar el grado de infección de los ratones tratados con Biostim determinamos el grosor y el peso de su cojinete plantar. Los resultados mostraron que el grosor del cojinete plantar del grupo de ratones infectados con *L. mexicana* incrementó alrededor de 2.07 veces más, respecto a su control sin infección ($P < 0.0495$). Por otra parte, los ratones BALB/c infectados y tratados con las tres dosis de Biostim (10mg/kg de L-V por 5 semanas; 20mg/kg de L-V por 2 semanas y 20mg/kg L, M y V por 3 semanas), mostraron una reducción significativa en el grosor de su

cojinete plantar respecto al grupo control infectado ($P < 0.0049$, $P < 0.0028$ y $P < 0.0241$ respectivamente). Además, como se observa en la Figura 20, los grupos de los ratones tratados con Biostim 20mg/kg de lunes a viernes por 2 semanas y con 20mg/kg administrado de lunes a viernes durante 5 semanas, fueron los que presentaron una mayor disminución en el grosor de su cojinete plantar. Por otra parte, el peso de las patas de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* incrementó de manera significativa respecto a su control sin infección ($P < 0.0494$). Contrario a esto, en todos los grupos tratados con Biostim se observó una disminución del peso de la pata respecto a su control infectado. Sin embargo, solo en los grupos de ratones tratados con Biostim 20mg/kg de lunes a viernes durante 2 semanas y 10mg/kg de lunes a viernes durante 5 semanas, la disminución fue significativa; ($P < 0.0463$ y $P < 0.0495$) (Figura 21).

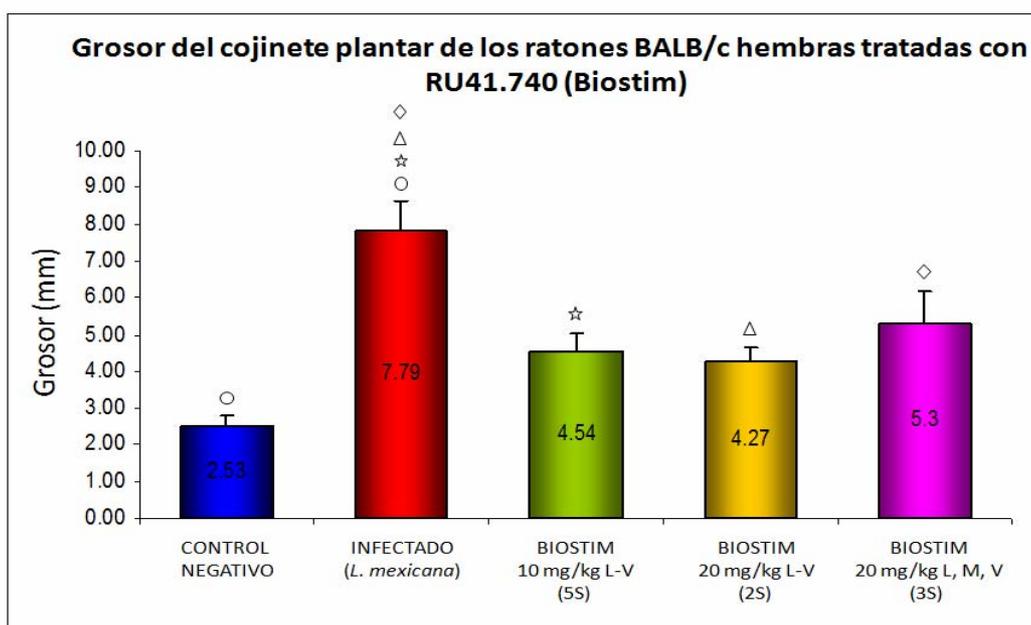


Figura 20. Tamaño del cojinete plantar en los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con diferentes dosis de Biostim. En las tres dosis, Biostim inhibió de manera significativa el incremento del cojinete plantar. Se grafica el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes ($n=3$). Abreviaturas: L-V: Lunes a Viernes; L, M, V: Lunes, Miércoles y Viernes; (S): Semanas de tratamiento.

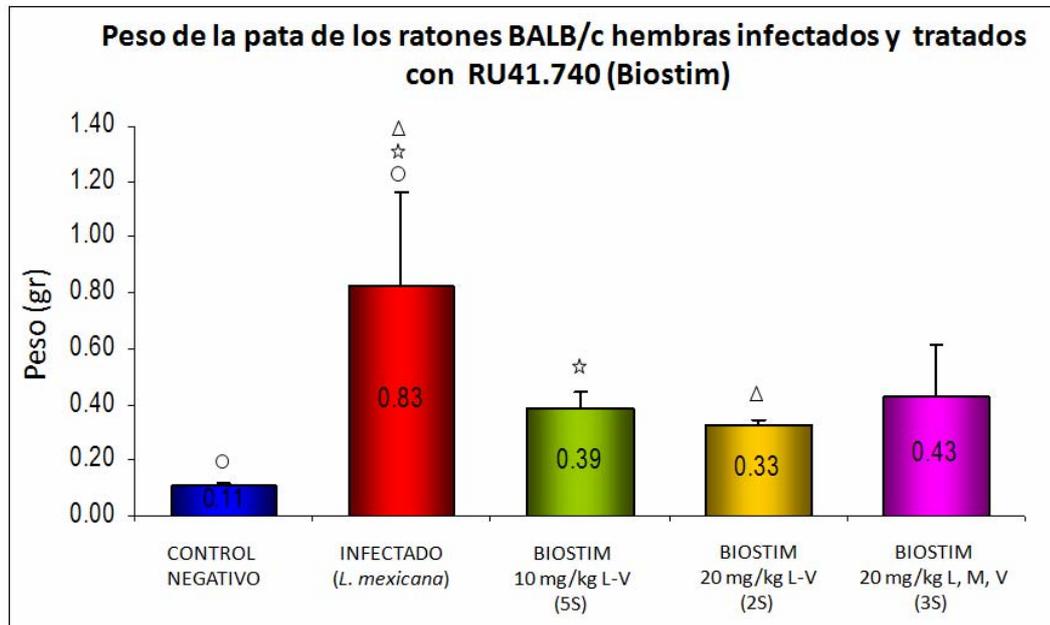


Figura 21. Peso de la pata de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados con diferentes dosis de Biostim. El peso de las patas disminuye con el tratamiento con Biostim y es estadísticamente significativo solo en las dosis de 10 mg/kg y 20 mg/kg. Se grafica el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3). Abreviaturas: L-V: Lunes a Viernes; L, M, V: Lunes, Miércoles y Viernes; (S): Semanas de tratamiento.

8.5 Correlación entre el tamaño del cojinete plantar con su peso

El grosor y el peso del cojinete plantar reflejaron de igual manera el grado de infección, ya que en todos los grupos (control negativo, ratones infectados con *L. mexicana* y ratones infectados y tratados con Biostim) se observó una correlación positiva entre estos dos parámetros (R de Spearman 0.89, $P < 0.00019$) (Figura 22).

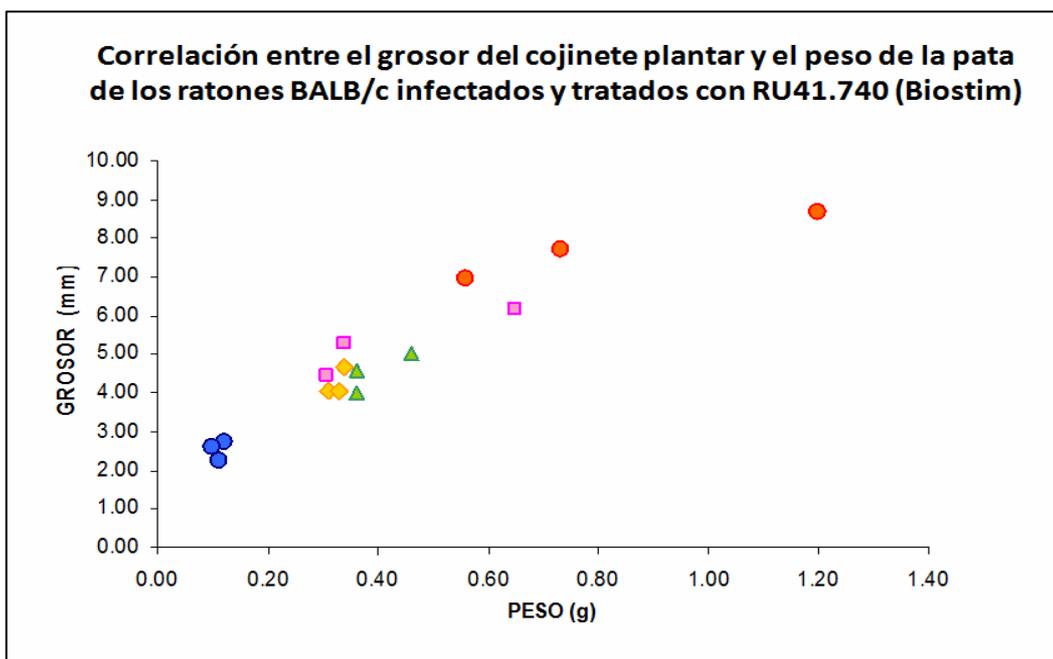


Figura 22. Correlación entre el peso de la pata y el grosor del cojinete plantar de los ratones BALB/c normales, infectados con *L. mexicana* e infectados y tratados con diferentes dosis de Biostim. ● Control Negativo, ● Infectado con *Leishmania mexicana*, ▲ Biostim 10 mg/kg L-V (5S), ◆ Biostim 20 mg/kg L-V (2S), ■ Biostim 20 mg/kg L, M, V (3S). Ambos parámetros son utilizados para evaluar el grado de infección, $R = 0.89$ y una $P < 0.00019$, de tres experimentos independientes.

8.6 Porcentaje de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c hembras infectados con *Leishmania* y tratados con diferentes dosis de Biostim

Debido a que el inmunomodulador Biostim fue capaz de controlar la infección con *L. mexicana* (probablemente a través del estímulo de la respuesta inmune innata) y a que las células NKT desempeñan un papel importante en la protección temprana contra *L. major*, decidimos determinar si estas células participan en el efecto protector de Biostim. El análisis mediante citometría de flujo mostró que los grupos de ratones BALB/c sin infección (control negativo) y con infección, contenían alrededor del 1% de células NKT en bazo. En cambio los niveles de

dichas células en los ratones infectados y tratados con Biostim en sus diferentes dosis incrementaron; aunque solo la dosis de 10mg/kg de Biostim (Lunes a viernes durante 5 semanas) mostró un incremento significativo ($P < 0.036$) (Figura 23).

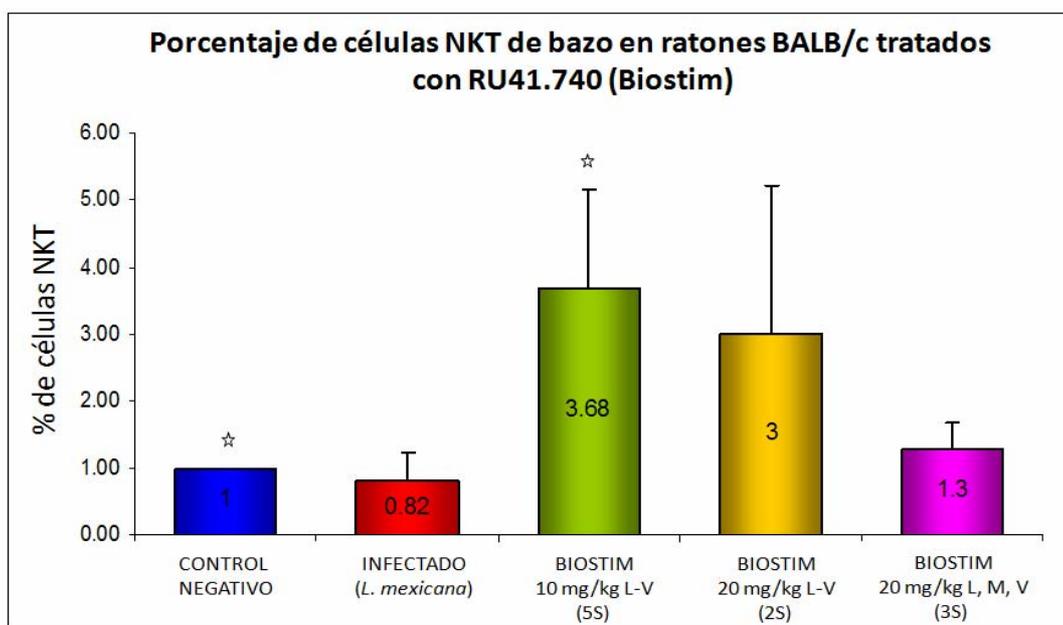


Figura 23. Porcentaje de células NKT de bazo de ratones infectados con *L. mexicana* y tratados con diferentes dosis de Biostim. Las células NKT incrementaron en los animales infectados y tratados con las dosis continuas de Biostim de 10 y 20 mg/kg de L a V, pero solo la dosis de 10 mg/kg de L a V mostró diferencia significativa ($p < 0.036$). Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

8.7 Determinación de IL-10 en células peritoneales de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* incubadas y estimuladas *in vitro* con Biostim.

Para determinar si el inmunomodulador Biostim es capaz de activar a las células peritoneales extraídas de los grupos de ratones infectados y tratados con diferentes dosis de Biostim, determinamos su producción de IL-10 después de ser incubadas *in vitro* con dicho inmunomodulador. Los resultados mostraron que en las células peritoneales estimuladas con 10 μ g/kg de Biostim provenientes de todos los grupos, este inmunomodulador indujo la liberación

de IL-10. Este incremento osciló de 2 a 4 veces más respecto a sus niveles basales, siendo los grupos de 10mg/kg y 20mg/kg a los cuales se les aplicó el tratamiento de forma continua, los que presentaron mayor incremento. Sin embargo como se muestra en la figura 24 observamos que no existen diferencias significativas en la producción de IL-10 de células peritoneales con los diferentes tratamientos con Biostim.

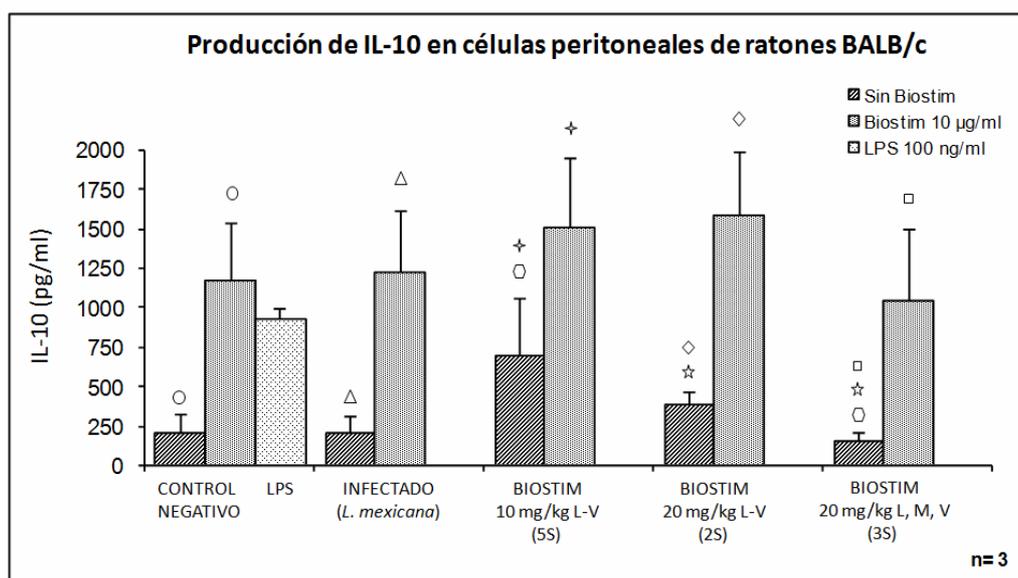


Figura 24. Producción de IL-10 en células peritoneales de ratones BALB/c hembras infectadas con *L. mexicana* y tratadas con diferentes dosis de Biostim. Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

8.8 Aspecto macroscópico y microscópico de las lesiones causadas por *L. mexicana*.

El tamaño de las patas de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* es claramente superior al de los ratones sin infección. Interesantemente, los ratones infectados y tratados con las diferentes dosis de Biostim muestran una disminución en el tamaño de su cojinete plantar siendo la dosis de 10 mg/kg aplicada de lunes a viernes durante 5 semanas la que mostró mayor reducción.

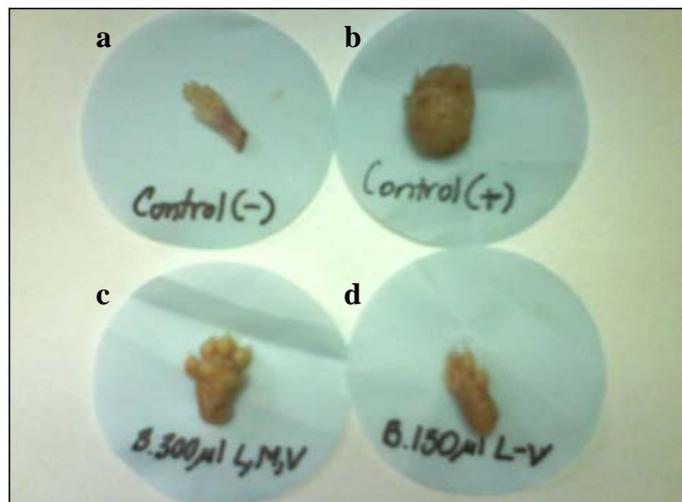


Figura 25. Aspecto macroscópico de las patas de los ratones BALB/c hembras tratados con biostim: a) Control sin infección, b) infectados con *L. mexicana*, c y d) infectados con *L. mexicana* y tratados oralmente con 20 mg/kg (300µl L, M, V) y 10 mg/kg (150µl L-V) de Biostim, respectivamente.

El análisis histológico de las patas de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* se caracterizó por una extensa destrucción del tejido acompañada por infiltrado de macrófagos parasitados y la compactación de la epidermis. Por otra parte, los ratones infectados y tratados con diferentes dosis de Biostim mostraron reducción del daño tisular, menor carga parasitaria y preservación de la epidermis. Además, solo en el grupo tratado con 10 mg/kg de Biostim de lunes a viernes por 5 semanas, se observó la formación de algunos granulomas.

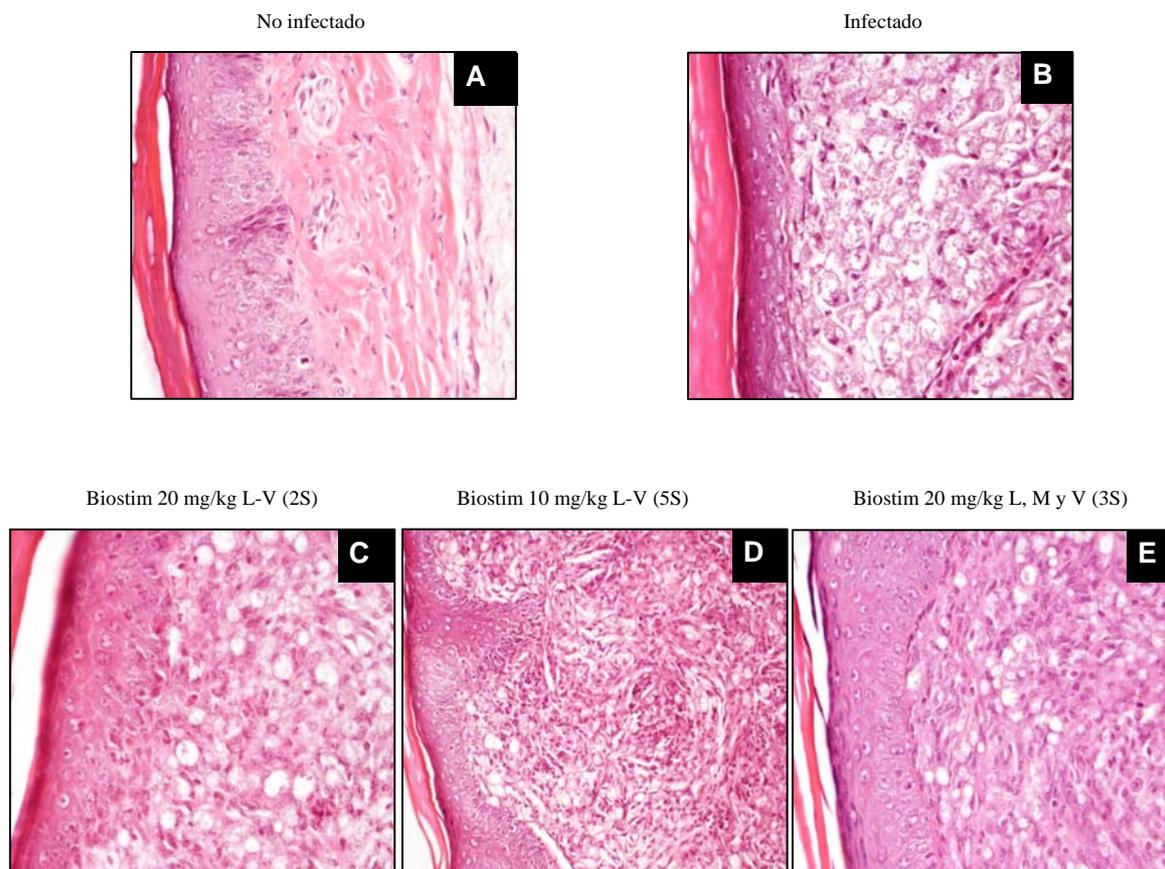


Figura 26. Aspecto microscópico de las patas de los animales infectados con *L. mexicana* y tratados con diferentes dosis de Biostim. A) Control sin infección, B) Control infectado, C) Biostim 20 mg/kg de L-V por 2 semanas, D) Biostim 10 mg/kg de L-V por 5 semanas y E) Biostim 20 mg/kg aplicado L, M y V por 3 semanas.

8.9 Determinación de la carga parasitaria en ratones BALB/c tratados con Biostim.

Para realizar el conteo de la carga parasitaria, utilizamos cortes histológicos de 4 μm^2 teñidos con hematoxilina/eosina y contamos los parásitos presentes en 1 mm^2 . Nuestros resultados muestran una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y los grupos de ratones tratados con Biostim en sus diferentes dosis (Figura 27). Esto quiere decir, que Biostim es capaz de reducir de manera significativa la carga parasitaria, independientemente de la dosis administrada.

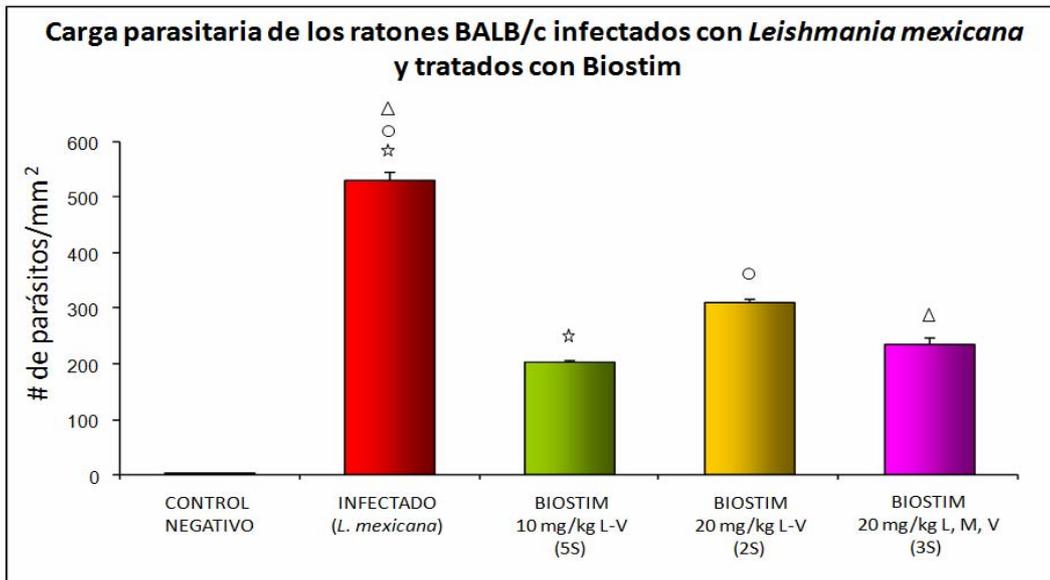


Figura 27. Carga parasitaria en ratones BALB/c tratados con diferentes dosis del inmunomodulador Biostim. La gráfica muestra que en todos los ratones tratados con las diferentes dosis de Biostim se redujo la carga parasitaria de manera significativa ($P \leq 0.05$). Se grafica el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

9. DISCUSIÓN

La leishmaniasis es considerada por la Organización Mundial de la Salud como la cuarta enfermedad tropical más importante del mundo. A pesar de que existen tratamientos para el control de esta parasitosis, ninguno elimina por completo al parásito y además la mayoría de ellos provocan efectos adversos en el paciente (McConville, 2007). En los últimos años el inmunomodulador Biostim ha sido utilizado para el control algunas infecciones causadas por bacterias, hongos y virus (Fujiki, 1986; Rudent *et al.*, 1985). Debido a que no existen datos sobre el empleo de este inmunomodulador en el tratamiento de enfermedades parasitarias, en el presente trabajo analizamos el efecto de diferentes dosis de Biostim administrado vía oral durante el desarrollo de la infección experimental con *L. mexicana* en ratones susceptibles BALB/c. Los resultados mostraron que las lesiones en el cojinete plantar de estos ratones fueron inhibidas en diferente grado por el inmunomodulador Biostim (Figura 19). Este efecto protector fue asociado con la disminución en la carga parasitaria (Figuras 26 y 27) y con la frecuencia de aplicación del tratamiento; siendo las dosis de 20mg/kg y 10mg/kg aplicadas de lunes a viernes las que mostraron mejor resultado (Figuras 20 y 21). Esto sugiere que la constante estimulación de la respuesta inmune por Biostim favorece el control de la infección por *L. mexicana*. Nimier *et al.* (1999) utilizando la misma vía de administración observaron un efecto similar durante la infección por *L. monocytogenes*, sugiriendo que el efecto protector de Biostim pudo ser debido a la estimulación de linfocitos B y T en placas de Peyer y nódulos linfoides mesentéricos, con lo cual se aumenta la síntesis de citocinas Th1 y anticuerpos protectores. El efecto protector de Biostim también ha sido asociado con la activación de células de la respuesta inmune innata como: monocitos, macrófagos, células dendríticas y NK; mejorando así el procesamiento y presentación antigénica, lo que a su vez estimula al sistema inmune adaptativo. Por otra parte, a pesar del importante papel que desempeñan las células NKT en la respuesta inmune innata contra

diversas infecciones, su participación en el efecto protector de Biostim no ha sido explorado. Nuestros resultados muestran que además de reducir el tamaño de las lesiones del cojinete plantar y de la carga parasitaria, Biostim es capaz de inducir un incremento en la población de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* (Figura 23). La participación de las células NKT en el efecto protector de Biostim podría ser explicado mediante su activación y consecuente producción de IFN- γ y TNF- α las cuales estimularían una respuesta inmune Th1 que es necesaria para el control de la enfermedad. Esta activación podría ser a través de APC ya que se ha observado que Biostim es capaz de: a) estimular la maduración de células dendríticas, b) incrementar la expresión de MHC clase I y II, c) aumentar la producción de moléculas co-estimuladoras y d) incrementar la producción de IL-12, todas ellas necesarias para la activación y proliferación de las células NKT (Spisek *et al.*, 2004). Actualmente, estamos realizando estudios para determinar si Biostim es capaz de inducir la proliferación de células NKT de manera directa. Por lo anterior el efecto protector de Biostim podría ser atribuido a una respuesta inmune tipo Th1. Además, debido a que una excesiva respuesta inmune Th1 puede estimular el daño tisular del hospedero, es necesario el control de esta respuesta a través de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13. En nuestros experimentos *in vitro* observamos que la incubación de células peritoneales con 10 μ g/ml de Biostim incrementó la producción de IL-10 en los diferentes grupos de ratones BALB/c (sanos, infectados e infectados y tratados con Biostim). El efecto inductor de Biostim en la producción de IL-10 por células de bazo y nódulo linfático, ha sido observado previamente por Nimier y colaboradores (1990), quienes le atribuyen a IL-10 un papel inhibitorio sobre la citocina IL-12. Debido a que IL-10 es una citocina inhibitoria de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, es probable que ésta desempeñe un papel importante en la regulación de la respuesta inmune innata, evitando de esta manera una inflamación intensa y la consecuente diseminación de *Leishmania*, ya que se sabe que la fagocitosis del parásito lo

protege de la lisis por complemento y además estimula su diseminación por vía linfática a otros órganos. Además, la reducción temprana del infiltrado inflamatorio durante la infección murina con *L. mexicana* se ha asociado con la producción de IL-10 (Villaseñor *et al.*, 2008). Aunque la generación de IL-10 por Biostim posiblemente represente un mecanismo de protección durante las etapas tempranas de la Leishmaniasis, ésta podría evitar la eliminación completa del parásito en las etapas tardías mediante un efecto inhibitorio sobre el macrófago en su capacidad leishmanicida. Por otra parte, el efecto protector de Biostim también se refleja en las características histopatológicas de las lesiones inducidas por *L. mexicana*. El análisis microscópico de las lesiones mostró que Biostim redujo tanto el daño inflamatorio como el número de parásitos, lo cual a su vez se correlacionó con la disminución del grosor de la pata infectada. La aplicación continua de Biostim, además de aumentar el número de células NKT en bazo, indujo la formación de granulomas en las lesiones, lo cual se sabe que limita la diseminación del parásito. La participación de células NKT en la formación de granulomas causados por paredes desproteinizadas de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones C57BL/6 ha sido reportado previamente por Apostolou *et al.*, (1999). Además, la importancia de la formación de granulomas en nuestro estudio se vio reflejada en la reducción significativa de la carga parasitaria. Como ya se ha mencionado, durante la infección de ratones BALB/c con *L. mexicana* Biostim indujo un efecto protector que se asoció con un incremento en el porcentaje de células NKT de bazo. Debido a que este incremento también se ha observado durante la infección de ratones resistentes C57BL/6 infectados con *L. major* (Mattner *et al.*, 2006), es probable que durante la leishmaniasis experimental el incremento en el porcentaje de células NKT en diferentes especies murinas se relacione con su resistencia natural a dicha infección. Por lo anterior, esta propuesta fue analizada durante la infección con *L. mexicana* utilizando el ratón susceptible BALB/c y los resistentes C3HeB/FeJ y C57BL/6. Nuestros resultados mostraron que

la resistencia de los ratones C57BL/6 se asoció con un mayor porcentaje de células NKT de bazo, tanto en estado basal como después de la infección, con respecto a la cepa susceptible BALB/c. Así mismo, en los ratones C3HeB/FeJ, la resistencia fue asociada con un incremento significativo de células NKT durante la infección. A diferencia de lo anterior, en los ratones susceptibles BALB/c el porcentaje de células NKT en estado basal fue menor al de los resistentes y además dicho porcentaje no se modificó con la infección. Otros reportes que coinciden con estos hallazgos son los de Antúnez & Cardoni (2004), quienes analizaron el porcentaje de células NKT en el bazo de diferentes cepas de ratones (BALB/c, C3H y C57BL/6) después de la infección aguda con *T. cruzi*, los cuales observaron que el porcentaje de células NKT solo incrementó en los ratones resistentes C3H y C57BL/6. Sin embargo, en nivel basal de células NKT fue similar en las tres cepas de ratones, a diferencia de los niveles basales observados por nosotros en la cepa C57BL/6. Además, de forma similar durante la infección murina con *L. mayor*, Hiroyuki *et al.*, (2000) observaron un incremento en el porcentaje de células NKT CD4⁺ del nódulo linfoide sólo en las cepas de los ratones genéticamente resistentes C57BL/6 y DBA/2. Lo anterior sugiere un papel importante de las células NKT en la resistencia natural a la leishmaniasis murina.

Finalmente, el presente trabajo describe por primera vez que el inmunomodulador Biostim induce un incremento en la población de células NKT del bazo en ratones susceptibles BALB/c, lo cual se asocia con la reducción de la carga parasitaria y con la inhibición de las lesiones causadas por *L. mexicana*.

10. CONCLUSIÓN

- Biostim confiere protección contra la infección causada por *L. mexicana*.
- El efecto protector inducido por Biostim en ratones susceptibles BALB/c infectados con *L. mexicana* se correlaciona con un incremento en el porcentaje de las células NKT de bazo y con una disminución en la carga parasitaria.
- En condiciones *in vitro*, el inmunomodulador Biostim induce la secreción de IL-10 en células peritoneales (esto puede representar un mecanismo regulador de una inflamación excesiva).
- La resistencia natural de los ratones C57BL/6 y C3HeB/FeJ a la infección por *L. mexicana* se correlaciona con su nivel basal de células NKT.
- Potencialmente, Biostim constituye una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de la leishmaniasis.

11. PERSPECTIVAS

- Optimizar la dosis terapéutica de Biostim en los ratones susceptibles BALB/c.
- Analizar si Biostim induce la producción de citocinas en las células NKT.
- Analizar si Biostim induce la actividad citotóxica de las células NKT.
- Analizar si Biostim activa a las células NKT a través de receptores TLR.

13. ANEXO: REACTIVOS

13) Preparación celular

13.1 Medio RPMI 1640 (GIBCO, no. catálogo. 31800-014)

Para preparar 2 lt de medio RPMI se adicionan 0.586 mg de Glutamina, 20 ml de penicilina, dos sobres de medio RPMI 1640 y 4 g de Bicarbonato de Sodio; se agita, se ajusta el pH con HCl a 7.2 y se filtra en condiciones estériles. El medio se coloca en botellas de 500 ml y se almacena a 4°C.

3.2 Solución amortiguadora de fosfatos salinos (PBS)

3.3 Solución Lítica

Para preparar 500 ml se toman 4.14g de cloruro de amonio, 0.4g de bicarbonato de potasio, 0.02g de EDTA y se diluyen en 500 ml de agua desionizada; se lleva a un pH de 7.4 y se filtra en condiciones estériles. La solución se coloca en una botella de 500 ml y se mantiene a 4°C.

2) Citometría de Flujo

2.1 FACS diluido

Para 2 lt se diluye 200 ml de solución FACS (Becton Dickinson) en 1800 ml de agua bidestilada.

2.2 Anticuerpos

(BD biosciences, no. cat. 553178) r-phycoerythrin (r-pe)-conjugated hamster anti-mouse NKT monoclonal antibody.

(BD biosciences, no. cat. 550085) r-phycoerythrin (r-pe)-conjugated hamster IgG2*, κ inmunoglobulina monoclonal control de isotipo.

2.3 Paraformaldehído al 2%

En un vaso de precipitados se diluyen 4 g de paraformaldehído en 200 ml de PBS agitando y calentando al mismo tiempo. Cuando la solución se ve clara y transparente se coloca en hielo, se esteriliza por filtración y se almacena a 4°C.

ELISA

1) Buffer de unión:

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 0.1 M, pH 9.0

Na_2HPO_4 : P.M. 142.0

1 M -----142 g ----- 1 lt de agua destilada

0.1 M ---- 14.2 g ---- 1 lt de agua destilada

Ajustar el pH con HCl concentrado a pH 9.0 filtrar y almacenar a 4°C.

1.1 Solución para lavar las placas: PBS 1X con 0.01% de Tween 80

A un litro de PBS se agregan 100 µl de Tween 80 y se agita suavemente; se filtra y se almacena a temperatura ambiente.

1.2 Solución bloqueadora:

Se preparan 100 ml de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio (NaOH)

NaOH: P.M. 40.0

1 N ----40 g ---- 1 lt de agua destilada

0.1 N ----4 g ---- 1 lt de agua destilada

0.1 N ----0.4 g ---- 100 ml de agua destilada

Para disolver el NaOH en los 100 ml de agua se calienta (en un agitador con calor) y cuando empieza a hervir se agregan lentamente 5.0 g de caseína. Se agita lentamente hasta que la caseína se disuelva, cuando esto ocurre se apaga el calor y se van agregando lentamente 900 ml de PBS pH 7.2 a 7.4 mientras se sigue agitando. Una vez que la solución se enfría se le ajusta el pH a 7.4 con HCl concentrado. Se hacen alícuotas de aproximadamente 40 ml y se congelan a -20°C. La caseína es de marca SIGMA, con no. de catálogo A-7078 y se almacena a 4°C.

1.3 Soluciones utilizadas para diluir el anticuerpo de detección:

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

Se disuelve 1 g de albúmina bovina en 100 ml de PBS 1X pH=7.2 a 7.4 y se agregan 50 µl de Tween 20. Se filtra y se guarda a 4°C. La albúmina bovina es de marca SIGMA, con no. de catálogo A- 7888 y esta a 4°C.

Albúmina humana:

1 % ---- 1 ml de albúmina ---- 100 ml de agua destilada

0.1 % ---- 0.1 ml de albúmina ---- 100 ml de agua destilada

0.1 % ----50 µl de albúmina ---- 50 ml de agua destilada

Tween 20:

1 % ---- 1 ml de Tween 20 ---- 100 ml de agua destilada

0.05 % ---- 0.05 ml de Tween 20 ---- 100 ml de agua destilada

0.05 % ----25 µl de Tween 20 ---- 50 ml de agua destilada

1.4 Buffer de sustrato:

Pesar en un vaso de precipitado de plástico 10 g de dietanolamina, agregar 70 ml de agua destilada y 500 µl de una solución 0.1 M de cloruro de magnesio (MgCl₂), agitar y ajustar el pH 9.8 con HCl concentrado. Se filtra y se guarda a 4°C tapado con papel aluminio. La dietanolamina es de marca SIGMA, con no. de catálogo D-2286 y está a temperatura ambiente.

MgCl₂: P.M. 203.31

14. ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
APC	Célula Presentadora de Antígeno
CD1d	Molécula Presentadora de Antígenos
DC	Célula Dendrítica
DN	Doble Negativa
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
FACS	Florescencia que activa la clasificación de las células
FITC	Florescencia ininisoitiocyanat
gp63	Glicoproteína 63
GSL	glicoesfingolípidos
GPI	
h	Horas
HSP65	Proteína de choque térmico de 65 kDa
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
iGb3	Isoglobotrihexosilceramida
IL	Interleucina
iNKT	Células NKT invariantes
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa Inducible
kDa	Kilodaltones
LAM	Lipoarabinomannan
LCD	Leishmaniasis Cutánea Diseminada
LCL	Leishmaniasis Cutánea Localizada
LMC	Leishmaniasis Mococutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LV	Leishmaniasis Visceral
MAC	Complejo de ataque a membrana
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milimetro
ng	Nanogramo
NKT	Células T asesinas naturales
nm	Nanómetros
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido Nítrico Sintasa
°C	Grados Centígrados
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos
PE	Ficoeritrina
PIM	Fosfatidilinositolmanósidos
PRR	Patrón de receptores de reconocimiento
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio RPMI 1640
spp.	Especies
TCR	Receptor de células T
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Factor de Necrosis Tumoal
α -GalCer	alfa-GalactosilCeramida
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetro

15. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea	3
Figura 2. Distribución de leishmaniasis en México	3
Figura 3. Ciclo de Vida de <i>Leishmania</i> en el insecto vector	3
Figura 4. Morfología del promastigote de <i>Leishmania</i>	6
Figura 5. Célula fagocítica con amastigotes de <i>Leishmania</i>	6
Figura 6. Célula fagocítica lisada por amastigotes de <i>Leishmania</i>	6
Figura 7. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	8
Figura 8. Vector transmisor de <i>Leishmania</i>	9
Figura 9. Perro infectado con leishmaniasis	9
Figura 10. Forma clínica de la leishmaniasis cutánea localizada	13
Figura 11. Paciente con leishmaniasis cutánea difusa	13
Figura 12. Paciente con leishmaniasis mucocutánea	13
Figura 13. Paciente con leishmaniasis visceral	13
Figura 14. Esquema del tratamiento con Biostim	39
Figura 15. Grosor del cojinete plantar de los ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con <i>L. mexicana</i>	44
Figura 16. Peso de la pata de los ratones de las cepas BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con <i>L. mexicana</i>	44
Figura 17. Porcentaje de células NKT en el bazo de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ infectados con <i>L. mexicana</i>	46

Figura 18. Producción de IL-10 en células peritoneales de los ratones BALB/c, C57BL/6 y C3HeB/FeJ <i>L. mexicana</i>	47
Figura 19. Mediciones del cojinete plantar durante el tratamiento con Biostim en ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i>	48
Figura 20. Grosor del cojinete plantar de los ratones BALB/c tratados con Biostim	49
Figura 21. Peso de la pata de los ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con Biostim	50
Figura 22. Correlación entre el tamaño del cojinete plantar y el peso de la pata de los ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con Biostim	51
Figura 23. Porcentaje de células NKT de el bazo en ratones BALB/c tratados con Biostim	52
Figura 24. Producción de IL-10 en células peritoneales de ratones BALB/c estimuladas con Biostim	53
Figura 25. Aspecto macroscópico de las lesiones causadas por <i>L. mexicana</i>	54
Figura 26. Aspecto microscópico de las lesiones causadas por <i>L. mexicana</i>	55
Figura 27. Carga parasitaria de los ratone BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y tratados con Biostim	56

16. LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características geográficas y clínicas de la leishmaniasis	4
Cuadro 2. Características de la leishmaniasis en diferentes modelos murinos	16
Cuadro 3. Clasificación de células NKT	23
Cuadro 4. Porcentaje de células NKT en diferentes cepas de ratones	29
Cuadro 5. Propiedades del inmunomodulador RU41740 (Biostim)	33
Cuadro 6. Grupos Experimentales	38
Cuadro 6. Grupos Experimentales tratados con Biostim	39