



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Análisis comparativo de virulencia de dos cepas de *Leishmania mexicana* aislados de pacientes con distintos cuadros clínicos”.

”

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:

VILLALBA ANDRADE LUCIA



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER

FAUSER

(2015)
Ciudad Univeritaria, D. F.



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.

Agradecimientos

A mis padres por todo su incondicional apoyo.

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

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

A la Dra. Ingeborg Brecker Fauser por todo su apoyo para la realización de esta tesis.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez y al Biol. Jaime Zamora Chimal por su apoyo y asesoría en todas las metodologías en investigaciones realizadas a lo largo de todo el proceso de realización de este trabajo.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes por su apoyo con el manejo de los cultivos de *Leishmania* utilizados para este proyecto.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio por su apoyo con las ELISAS para analizas de citosinas que se realizaron a lo largo de esta tesis.

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

Dedicatorias

A mis padres, sin quienes no podría ser la persona que soy.

A mi hermana, por ser mi compañera de vida y por ser una inspiración para mí.

A mi tía Lucia, que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

A mis abuelos, por sentar las bases de una hermosa familia.

A mis amigos, por mantener y perder la cordura conmigo siempre que fuera necesario.

A Cristian, por motivarme a concluir esta etapa.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Leishmaniasis	7
1.2 Epidemiología.....	7
1.3 EL PARÁSITO.....	8
1.4 Morfología	9
1.5 Ciclo de vida	10
1.6 El vector.....	12
1.7. Clasificación de los cuadros clínicos en la leishmaniasis	13
1.7.1 Leishmaniasis visceral o Kala- Azar (LV).....	14
1.7.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC).....	15
1.7.3 Leishmaniasis cutánea (LC).....	16
1.7.3.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)	17
1.7.3.2 Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada (LCD).....	18
1.8 Patogenia.....	18
1.9 Factores de virulencia en <i>Leishmania</i>	24
1.10.1 Lipofosfoglicano (LPG).....	25
1.10.2 Glicoproteína de 63 kD (GP63).....	29
1.10.3 Fosfatidilserina (PS).....	31
2. JUSTIFICACIÓN	33
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1 Obtención de amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	38
5.2 Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	39
5.3 Obtención de macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c	40
5.4 Tinción de <i>Leishmania</i> con Anexina V para detección de fosfatidilserina	41
5.5. Tinción de <i>Leishmania</i> con anticuerpo monoclonal contra LPG	41
5.6 Tinción de <i>Leishmania</i> con anticuerpo monoclonal contra GP63	42
5.7 Ensayo de fagocitosis y del efecto de Glucantime en la infección <i>in vitro</i>	43
5.8 Infección de ratones BALB/c	43
5.9 Ensayo de estallido oxidativo	44
5.10 Análisis de sobrevida de parásitos intracelulares	44
5.11 Cuantificación de citocinas	45
5.12 Cuantificación de citocinas IL-10 e IL-12 por método de ELISA sándwich.....	46
6. RESULTADOS	47
6.1 Análisis de las curvas de crecimiento de cuatro aislados de <i>Leishmania mexicana</i>	47
6.2 Análisis de la expresión de Fosfatidilserina (PS).....	49
6.3 Análisis de la expresión de LPG.....	51
6.4 Análisis de la expresión de GP63	54
6.5 Análisis de la expresión de PS, LPG Y GP63 en parásitos al día de la infección de células <i>in vitro</i> y de ratones <i>in vivo</i>	56
6.6 Análisis de la infección <i>in vitro</i> a macrófagos murinos de médula ósea con los 4 aislados de <i>Leishmania mexicana</i>	59
6.7 Análisis de magnitud de infección en cojinete plantar en ratones BALB/c con 4 aislados de <i>Leishmania mexicana</i>	60
6.8 Análisis de la sobrevida de 4 aislados de <i>L. mexicana</i> en macrófagos murinos de médula ósea.	62

6.9. Análisis del efecto que ejercen los 4 aislados de <i>Leishmania mexicana</i> sobre el estallido oxidativo de macrófagos de ratones BALB/c.....	63
6.10 Análisis de la producción de citocinas IL-10 e IL-12 por macrófagos infectados por los 4 aislados de <i>L. mexicana</i>.....	65
<u>7. DISCUSIÓN</u>.....	67
<u>8. CONCLUSIONES</u>.....	76
<u>9. PERSPECTIVAS</u>.....	77
<u>10. BIBLIOGRAFIA</u>.....	78

RESUMEN

El parásito *Leishmania mexicana* es el agente causal de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Las variaciones en la severidad del cuadro clínico pueden ser causadas por la virulencia del parásito o por el estado inmune del paciente [1]. En este trabajo se analizaron cuatro aislados de *L. mexicana*, dos de ellas aisladas de pacientes con LCL (“Lacandona” y “68”) y dos de pacientes con LCD (“Solis” e “Isabel”), para determinar si el número de parásitos que expresan las moléculas Fosfatidilserina, Lipofosfoglicano y GP63, asociadas a la virulencia, varían entre los aislados y si estas variaciones ejercen un efecto inmunomodulador sobre el macrófago. Se encontró que estas moléculas no se determinan por la fase de crecimiento de los diferentes aislados. El efecto inmunomodulador ejercido por los cuatro aislados de *Leishmania* sobre macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c mostró diferencias que no siempre se lograron correlacionar con el número de parásitos expresando las moléculas de virulencia en la infección, tanto *in-vivo* como *in-vitro*. Estos resultados sugieren que los factores que determinan la virulencia de los cuatro aislados de *Leishmania mexicana* son variados y no todos los parásitos expresan estas moléculas en la misma fase de crecimiento y aparentemente tampoco se correlacionan directamente con la virulencia del aislado. Este trabajo aporta datos interesantes sobre como la gran variación entre aislados de una misma especie de *Leishmania* desencadena diferentes respuestas por parte del hospedero, dando como resultado un amplio espectro de cuadros clínicos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leishmaniasis

Leishmaniasis es el nombre con el que se denomina a un espectro de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. De las cuáles se han registrado al menos 20 que infectan al ser humano. La transmisión se da por la picadura de flebotomos hembra de dos géneros: *Lutzomyia* que se distribuye en América (Nuevo Mundo), y *Phlebotomus*, que se distribuye en el resto de los continentes.

1.2 Epidemiología

Esta enfermedad parasitaria se encuentra dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas. Es prevalente en 98 países, y en todos los continentes, siendo la Antártica el único lugar en el cual no se ha reportado la enfermedad [2]. Se estima que se dan unos 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta aproximadamente el 50%. De los casos reportados, un millón corresponden a la forma cutánea (principalmente en Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudita, Siria y Túnez) o a la mucocutánea (sobre todo en Brasil, Perú y Bolivia) mientras que unos 300 000 casos corresponden a la forma visceral (de los cuáles el 90% son principalmente de Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán) [3]. A nivel mundial se considera que 310 millones de personas están en riesgo de adquirir esta enfermedad.

1.3 EL PARÁSITO

Leishmania fue descrita en 1903 por Leishman y Donovan en la India y simultáneamente por Wright en un niño armenio. El género *Leishmania* spp. (Ross, 1903) pertenece al subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Dentro del género *Leishmania* se encuentran más de 20 especies, divididas en 3 subgéneros *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*), y *Leishmania* (*Sauroleishmania*)[4].

La clasificación de las especies y subespecies de *Leishmania* se basa en la biología del parásito, la bioquímica, patrones isoenzimáticos, y secuenciación de loci; la inmunología, que se realiza a través de análisis con anticuerpos monoclonales y su filogenia molecular.

La clasificación actual queda de la siguiente forma (Fraga, 2010): el género *Leishmania* se divide en tres subgéneros: *Leishmania* (*Leishmania donovani*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* y *Leishmania mexicana*), *Viannia* (*Leishmania lainsoni*, *Leishmania maiffi*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania braziliensis*) y *Sauroleishmania* (*L. tarentolae*). [4].

Son varias las especies de *Leishmania* involucradas en los diferentes cuadros clínicos: En Europa, la leishmaniasis cutánea, se asocia a: *Leishmania major* y *Leishmania tropica* mientras que para la enfermedad visceral el complejo causante es *Leishmania infantum*. En América, por otro lado, la enfermedad cutánea localizada se le atribuye a especies de ambos subgéneros *Leishmania* y *Viannia*: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*,

L. guyanensis, y *L. peruviana*. La enfermedad mucocutánea, se origina por una infección por las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis*, principalmente. Y *L. chagasi*, causa la forma visceral.

La leishmaniasis cutánea difusa es una forma de la enfermedad que se presenta como consecuencia de factores inmunes del hospedero y se asocia a *L. mexicana* y *L. amazonensis* [5].

1.4 Morfología

Las leishmanias son parásitos protozoarios, que se presentan dos formas principalmente: el amastigote que es la forma intracelular en macrófagos y células dendríticas de los hospederos mamíferos y la forma flagelada denominada promastigote, es extracelular y que se encuentra en el interior del intestino del vector .

El amastigote, conocido también como cuerpo de Leishman-Donovan, tiene una forma redonda u ovalada, es estrictamente intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de los fagocitos mononucleares, aunque se ha documentado la presencia de amastigotes en neutrófilos y fibroblastos en lesiones de piel[6, 7]. Los amastigotes llegan a medir de 2 a 6 μm de diámetro [8]; presenta un gran núcleo y un cinetoplasto puntiforme pequeño, y un filamento delgado que une el cinetoplasto y cuerpo basal, éste último apenas un punto visible con microscopio electrónico. El cinetoplasto es una subestructura de la gran mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. La presencia del cinetoplasto da el nombre al grupo de protozoos incluidos en el orden Kinetoplastida.

El promastigote es elongado y se desarrolla y se multiplica en el intestino del vector. Mide alrededor de 10–20 μm , por 2-3 μm [6, 8], sin contar la longitud de su único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15-25 μm ; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1-2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo.

Es importante señalar que el cinetoplasto contiene su propio genoma, que podría ser lo que es el genoma mitocondrial en los mamíferos, por lo que las leishmanias cuentan con dos genomas [9, 10]. El genoma del cinetoplasto está sujeto a importantes modificaciones en la transcripción del DNA, cambiando de forma considerable las proteínas trasladadas desde un solo gen. En el núcleo se da una transcripción policistrónica en la que las unidades de transcripción incluyen varias docenas de genes. Además, el genoma de *Leishmania* tiene una notable plasticidad en respuesta a la presión exterior o incluso espontáneamente.

El cariotipo de *Leishmania* es de 34-36 cromosomas, y su tamaño (para *L. infantum*) es de 35,5 megabases [11, 12] y de 33,6 megabases para *L. major* (Proyecto para estudio del genoma de *Leishmania* del Centro Sanger).

1.5 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Leishmania* comienza cuando, para alimentarse, la hembra del vector pica al mamífero infectado. Así, los amastigotes que se encuentran en células fagocíticas infectadas pasan al tracto digestivo del mosquito y, una vez en el intestino medio se comienzan a transformar en promastigotes en un rango de 24-36 horas después de la

picadura y comienzan a multiplicarse [13]. Posteriormente el promastigote va sufriendo otros cambios morfológicos pasando a la fase de nectomona, que aún se encuentra sujeto a las microvellosidades del tubo digestivo, a una fase conocida como haptomona y finalmente a la de promastigote metacíclico, que ya se encuentra libre en la hipofaringe del insecto, donde permanecen llenando la faringe y la probóscide. [13]. Los parásitos permanecen ahí hasta una nueva picadura, cuando serán inoculados a un nuevo hospedero.

Se ha reportado que existe un cierto nivel de especificidad entre el vector y la especie de *Leishmania* que este transmita, ya que algunas características tanto del parásito, como es la estructura de su membrana, como las características genéticas del insecto, hace que una especie específica de flebótomo sea susceptible a solo ciertas especies de *Leishmania* y viceversa [14].

Con cada picadura entran en la dermis entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos [14] muchos de los cuales, son destruidos por los neutrófilos y eosinófilos, macrófagos, células de Langerhans y o bien con la activación del sistema de complemento, que se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos y son fagocitados [14]. Una vez dentro del macrófago, los parásitos se dividen por fisión binaria y cuando el macrófago se encuentra lleno de amastigotes, su membrana se rompe liberando los parásitos que a su vez vuelven a ser fagocitados por células vecinas. El ciclo se completa cuando el mosquito se alimenta de un individuo infectado.

1.6 El vector

La leishmaniasis se transmite por la picadura de mosquitos (Diptera: *Psychodidae*; *Phlebotominae*) infectados los géneros *Phlebotomus*, en el viejo mundo y *Lutzomyia*, en el Nuevo Mundo. Estos insectos pueden adquirir la infección por los humanos y reservorios tales como roedores, cánidos y primates. La primera identificación que se logró de estos flebótomos como vectores fue en 1925 por Adler y Theodor. Se cree que un 10% de las 600 especies conocidas está involucrado en la transmisión de la leishmaniasis humana.

Los mosquitos flebótomos son de un tamaño pequeño, de aproximadamente 3mm de longitud y de color variable que va desde un tono blanquecino hasta llegar a ser casi completamente negros, presentan tres pares de patas muy largas, así como sedas en todo el cuerpo incluyendo a las alas, estas son lanceoladas y cuando se posan quedan en una posición de V. Presentan dos ojos compuestos y la probóscide es de tipo picador-chupador.

Dentro de su ciclo de vida pasan por una metamorfosis completa: huevo, cuatro estadios de larva, uno de pupa y la forma adulta. En cuanto a su ciclo reproductivo, hacen sus puestas en zonas arenosas con poca iluminación y en presencia de humedad, y ricas en material orgánico. Presentan actividad nocturna principalmente, aunque también pican de día y no tienden a alejarse de su entorno habitual ya que su vuelo es corto. Se ha descrito que su velocidad máxima al volar es de menos de 1m/seg [15].

Principalmente pican en el exterior de edificaciones, por lo que se dice que son exofágicas, además de que la mayoría de los flebótomos son fototrópicos, lo que hace que penetren en las viviendas iluminadas durante la noche.

Cuando están inactivas se refugian en bodegas, establos, casas, en los agujeros de las paredes, madrigueras de mamíferos reservorios y en la vegetación.

Solo las mosquitas hembras pican para alimentarse de sangre, son hematófagas, ya que necesitan un alimento rico en proteínas para poder producir sus huevos. [15-17].

1.7 Clasificación de los cuadros clínicos en la leishmaniasis

Las manifestaciones clínicas que se presentan en la infección por *Leishmania* son muy variadas y tienen que ver con diversos factores que involucran al parásito, como son, la especie, su capacidad infectiva, patogenicidad y virulencia, además de la especie del vector, el número de picaduras y la composición de la saliva. Así mismo, el huésped también juega un factor importante dependiendo de su situación inmunitaria y su susceptibilidad genética [18].

Dentro del cuadro de enfermedades que se presentan por infecciones con *Leishmania* se encuentran tres principalmente:

Leishmaniasis visceral o *Kala azar*, también conocida como fiebre negra.

Leishmaniasis mucocutánea o espundia

Leishmaniasis cutánea: localizada (LCL) o difusa (LCD)

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

Este cuadro clínico es causado principalmente por *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*. Sin embargo, *L. amazonensis* y *L. tropica* también la pueden producir. En México los reportes corresponden a *L. chagasi* [5]. La infección puede ser asintomática, aguda o crónica y el tiempo de incubación va desde meses hasta varios años.

Las características generales de este cuadro clínico son: fiebre irregular, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia. Para el caso de los niños, los signos y síntomas que se presentan son: fiebre, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis; esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatías, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades. El bazo grande, firme, puede aparecer con consistencia blanda en casos agudos [18].



Figura1. Hepatoesplenomegalia.WHO



Figura 2. Síndrome de desgaste. WHO

1.7.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

Este cuadro clínico se da después de una enfermedad cutánea, se presenta incluso años después y se debe a la metástasis de las lesiones cutáneas. Estas lesiones se inician en las mucosas, principalmente en la nasal.

Se observa inflamación de la mucosa comprometida e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico. Puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, hipofaringe, laringe y tráquea. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar y deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia. Presenta resistencia a la quimioterapia específica. En el caso de los niños, no es muy frecuente pero tiene una alta mortalidad si se presenta [5].



Figura 3. Leishmaniasis mucocutánea. WHO



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

1.7.3 Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es la forma de infección más común a nivel mundial. Los principales agentes causales en América son *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. Se puede presentar de manera localizada, en la que la infección no se disemina y una difusa en la que la infección se disemina por la piel [5].

1.7.3.1 Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

Las principales especies causales son *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major* [19]. Para este cuadro clínico la incubación va desde una a doce semanas. En el lugar de la picadura del mosquito aparece una pápula eritematosa, generalmente es asintomática, y en algunos casos se presenta una adenopatía regional. En un lapso de 1 a 3 meses se presenta la úlcera que es de borde elevado, bien definido, indurado y paulatinamente se va tornando de un tono rojizo.

Este cuadro clínico tiene la tendencia a curar en un tiempo de 3 y 18 meses en más del 90 % de los casos [19]. La reparación de la lesión comienza desde el centro hasta el exterior, en un tiempo variable y culmina con la formación de una cicatriz [5].



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



Figura 6. Leishmaniasis cutánea. CDC

1.7.3.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

Este cuadro se produce en el Viejo Mundo por *L. aethiopica* y en el Nuevo Mundo por el complejo de *L. mexicana* [20]. Se inicia con un nódulo que se disemina por toda la piel. Estos nódulos presentan un gran número de parásitos y abarcan todo el tegumento a excepción del cuero cabelludo, las regiones inguinal y axilar, genitales, plantas y palmas. Las lesiones tienden a ser asintomáticas y sin tendencia a ulcerarse. Se presenta resistencia al tratamiento y se asocia a recaídas. La causa de este cuadro radica en las características de la respuesta inmune del paciente hacia *Leishmania* [5, 21]

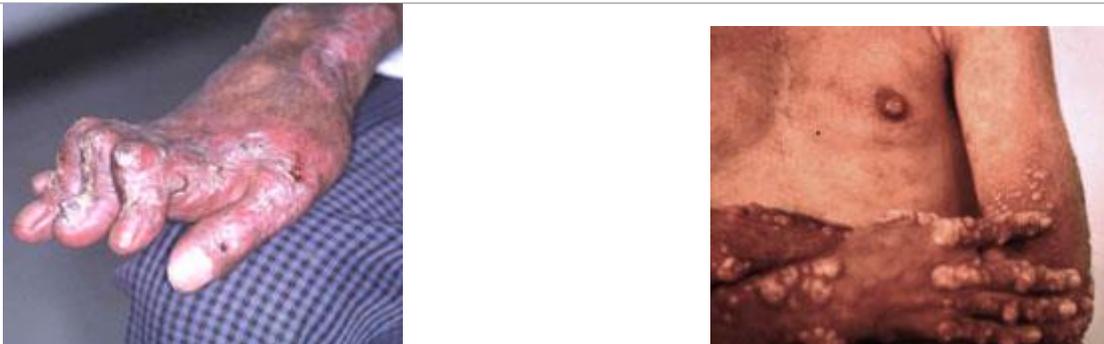


Figura 7. Leishmaniasis cutánea difusa o diseminada. WHO

1.8 Patogenia

El desarrollo de la leishmaniasis se determina desde el momento en que se da la picadura del mosquito. La eficiencia en la transmisión del parásito se relaciona con dos factores: el número de picaduras y la composición de la saliva del vector, así como el número de parásitos que se inoculan.

En cuanto a la frecuencia de las picaduras, estas varían de una especie de flebótomo a otra. La introducción de las piezas bucales lacera los vasos sanguíneos de la unión dermo-epidérmica. Los componentes salivares no solo son capaces de provocar reacciones de hipersensibilidad retardada local en algunos sujetos, sino que también presentan ciertos componentes proteicos que tienen un papel determinante sobre los mecanismos de defensa del huésped: son anti-agregantes plaquetarios, vasodilatadores, inmunosupresores, difusores y potenciadores de la infectividad del parásito [22].

Una vez que los promastigotes son depositados en la dermis con la picadura del mosquito, interviene el sistema inmune innato para detener el proceso mediante la activación del complemento. La liberación de cininas produce vasoconstricción y la activación de la cascada de coagulación produce trombosis de los vasos lacerados. Cerca del 90% de los promastigotes son eliminados en el espacio extracelular por neutrófilos y eosinófilos sanguíneos que llegan al sitio de la lesión, así como por la cascada del complemento que se activa una vez que los promastigotes son inoculados. Otros promastigotes son fagocitados por los macrófagos dentro de los que se transforman en amastigotes e inician su multiplicación.

Una vez que los promastigotes son inoculados, se activa la cascada del complemento, que ayuda a lisar casi el 90% de los promastigotes metacíclicos inyectados. Los promastigotes de *Leishmania* se unen a los receptores de complemento CR1 y CR3 que favorece su fagocitosis. El parásito puede inhibir el complemento mediante cininas que fosforilan a C3, C5 y C9, provocando su inactivación [23].

La fagocitosis de los promastigotes está regulada por receptores de superficie del macrófago. Los ligandos de *Leishmania*, como los glicoconjugados de superficie que incluyen a la GP63 y a los lipofosfoglicanos, favorecen la unión de C3bi a la superficie del parásito [24, 25]. Así es como el parásito favorece su propia opsonización, y su posterior fagocitosis. Estos y otros factores se cree que juegan un papel importante para la supervivencia de las leishmanias dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas, donde inician su replicación.

Otro mecanismo que favorece la infectividad es la disminución en la producción de óxido nítrico (NO) por el macrófago activado, a través de la inhibición de la proteína fosfatasa. La producción de NO es un factor muy importante, fundamental en la defensa del macrófago activado y el hecho de que las leishmanias puedan evadir este mecanismo, es determinante para su supervivencia [26].

Así mismo, se ha descrito la capacidad de los amastigotes de inducir una elevada producción de IL-10 por parte de los macrófagos. Esto los hace refractarios al efecto activador de IFN- γ y disminuye su producción de IL-12 y TNF- α , lo que impide la lisis del parásito [27].

Para que la enfermedad se pueda desarrollar es necesario que se dé una respuesta inmune inadecuada a ciertos determinantes patogénicos del parásito. Por una parte, el huésped desplegará su capacidad defensiva mediante una respuesta inflamatoria local y sistémica, así como la interacción de moléculas y células en su respuesta inmune adaptativa. Por otro lado, el parásito explotará al máximo sus capacidades de

infectividad, patogenicidad y virulencia para contrarrestar las defensas del huésped, eludiéndolas o anulándolas.

La inmunidad celular es parte fundamental en la defensa contra *Leishmania* y está ligada específicamente a la función de los linfocitos T CD4 cooperadores, mientras que la inmunidad humoral no presenta un papel tan importante [28]. La activación de los linfocitos T necesita de la función de las células presentadoras de antígeno (CPA), de la interacción de los ligandos del linfocito con otros receptores de dichas células y de moléculas coestimuladoras (citocinas y moléculas de adhesión). En este punto tienen un papel fundamental ciertos componentes de la respuesta inmune innata como son el complemento, las células NK y macrófagos, entre otros.

Así mismo, la determinación genética de susceptibilidad o resistencia del huésped a la infección, también es importante. Esto se ha demostrado en modelos murinos experimentales y posiblemente también podría funcionar igual en humanos [29, 30].

El conocimiento sobre la respuesta inmune en la infección por *Leishmania* se ha desarrollado a partir de modelos experimentales, principalmente en ratones, que han permitido conocer el desarrollo de dos sub-poblaciones de linfocitos T: Th1 y Th2, basado en un perfil de citocinas que producen ante la estimulación antigénica [31, 32].

Los linfocitos Th1 producen IFN- γ , IL-2 y TNF- α , y se relacionan con funciones de la inmunidad celular, como lo son, activación de macrófagos (IFN- γ) y la hipersensibilidad retardada. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 E IL-13 y se relacionan con la inmunidad humoral [28].

De acuerdo con estos perfiles, las cepas de ratones que son capaces de generar una respuesta de tipo Th1 presentaran resistencia a la infección por *Leishmania*, mientras que las que desarrollan una respuesta Th2, sucumbirán ante la infección.

Para la activación de los linfocitos Th1, es necesaria la presencia de la IL-12, mientras que los Th2 se diferencian ante la presencia de IL-4. La IL-13 también tiene un papel importante en la respuesta Th2, ya que bloquea la respuesta a la IL-12 de los linfocitos T, inhibiendo la expresión de la segunda cadena (β -2) del receptor de IL-12. La interacción de las citocinas es determinante en la respuesta inmunitaria y en el progreso de la infección [33, 34].

Los linfocitos T CD8, también intervienen en la reacción inmune frente a *Leishmania*, ya que además de ser células citotóxicas, son capaces de generar IFN- γ , lo que lleva a la activación del macrófago con producción de NO y lisis del parásito [35].

También se ha señalado el papel de los linfocitos CD18, cuya deficiencia en el modelo murino provoca la diseminación por alteración de la función del macrófago y una reducción de la respuesta Th1, lo que implica una reducción de NO y una alteración en el patrón de producción de citocinas [36].

Las infecciones humanas no cursan con el patrón de citocinas Th1/Th2, como se ha descrito en modelos murinos. En humanos se han encontrado perfiles mixtos, y el predominio de Th1 y/o de linfocitos T CD8 se asocia con la resolución. Lo que sugiere que, en seres humanos, lo que determina la progresión o no de la enfermedad es el balance entre linfocitos que activan o suprimen la actividad macrofágica [37].

Las primeras interacciones de las células de la respuesta inmune innata, como las dendríticas, con los parásitos se dan a través de los receptores tipo Toll (Toll Like Receptors). Todos los TLR, con excepción del TLR-3, señalizan a través de la proteína adaptadora MyD88, que es codificada por el gen de respuesta de diferenciación primaria. Adicionalmente, los TLR también son importantes para la activación de las células NK (TLR9) y son necesarios para que el macrófago pueda destruir los amastigotes de *L. donovani* ante la estimulación con IFN- γ (TLR-2 y TLR-3)[38].

Las células dendríticas también fagocitan parásitos para realizar la presentación antigénica. Estas células fagocitan amastigotes principalmente a través de los receptores CD16 y CD64. Esta fagocitosis favorece la activación de las células dendríticas y aumenta la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), así como de moléculas coestimuladoras. Las células dendríticas son unas de las pocas células con capacidad de procesar el antígeno por ambos complejos, es por esto que al migrar a los ganglios linfáticos pueden activar a linfocitos T CD4 y T CD8 [39].

Otra manera de lograr la infección, es a través de la inhibición de apoptosis de células dendríticas por los amastigotes de *L. mexicana*, descrita en el modelo murino, lo que favorece la invasión y la persistencia del parásito en estas células infectadas [40].

Una de las células que desempeña un papel central en la infección por *Leishmania*, es el macrófago, ya que lleva a cabo un triple papel: 1) es célula hospedera, 2) es célula presentadora de antígenos que activa linfocitos T y 3) es célula efectora, capaz de eliminar al parásito [41].

1.9 Factores de virulencia en *Leishmania*

El término factor de virulencia surgió a partir de la observación de que existen microorganismos capaces de generar enfermedad en el hospedero, mientras que otros pueden entrar en contacto con este sin que se presente la enfermedad. Esto generó la idea que existían diferencias entre aquellos organismos que son virulentos que causaban la enfermedad y aquellos que el hospedero era capaz de controlar. A partir de diferentes estudios desde principios del siglo XX, se han encontrado diferentes factores que determinan si un microorganismo es más, o menos virulento. Se considera un factor de virulencia a cualquier atributo del microorganismo capaz de generar daño en el hospedero. En la infección por *Leishmania*, los factores de virulencia que permiten al parásito invadir y establecer la infección en el hospedero mamífero son diversos y agrupables en diferentes categorías. Estas incluyen aquellos que le confieren al microorganismo la capacidad de entrada al huésped, la habilidad para evadir las defensas del sistema inmune, la capacidad de crecer dentro del hospedero, la cualidad de contrarrestar la respuesta inmune, así como poder adquirir los nutrientes necesarios de su hospedero y la capacidad de percibir cambios en su ambiente [42].

La leishmaniasis es una enfermedad con un amplio rango de cuadros clínicos dependiendo de la especie, donde la severidad del cuadro clínico se ha asociado a distintos factores de virulencia del parásito. Los factores de virulencia se pueden dividir en dos, de acuerdo con Rodríguez (2003)[43]. Los primeros son los llamados determinantes invasivos/evasivos que *Leishmania* presenta en su superficie, que ayudan al parásito a establecerse, sobrevivir y multiplicarse exitosamente dentro de la

célula hospedera. Entre estos se encuentran el glicofosfatidilinositol (GPI), glicosilfosfolípidos, lipofosfoglicanos (LPG), fosfoglicanos, proteofosfoglicanos (PPGs), glicoproteína GP63, proteasas de cisteína, histonas, ATPasas y la fosfatidilserina (PS), aunque esta última también se relaciona con una muerte parecida a apoptosis del parásito por lo que se le considera un mecanismo alturista [44-46]. Por otro lado se encuentran los determinantes antigénicos, que incluyen proteínas del citoesqueleto como kinesinas y tubulinas, proteínas chaperonas como las histonas HSP 60, 70 y 83, proteínas ribosomales, nucleosomas y proteosomas [43].

Los promastigotes de *Leishmania* están cubiertos por el glicocalix, compuesto de abundantes glicoconjugados, que, como ya se mencionó, son importantes para la sobrevivencia y patogénesis del parásito.

1.9.1 Lipofosfoglicano (LPG)

El LPG es la molécula más abundante en la superficie del promastigote y está constituido por una ancla lipídica que consiste en un 1-Oalquilo-2-lisofosfatidil(*myo*)inositol, con un núcleo de glicano heptasacárido, al que se une un polímero PG (fosfoglicano) compuesto por 15-30 unidades repetidas de [6-Gal(β 1,4)Man(α 1)-PO₄-] y concluye con un oligosacárido. Las unidades repetidas de azúcares son cruciales para la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago y el establecimiento de la infección [47].

Distintas especies de *Leishmania* presentan variación de esta molécula, donde los principales cambios se observan en las cadenas de azúcares que conforman la molécula, aunque también puede variar la composición de glicanos y su posición en parte central de la molécula [48].

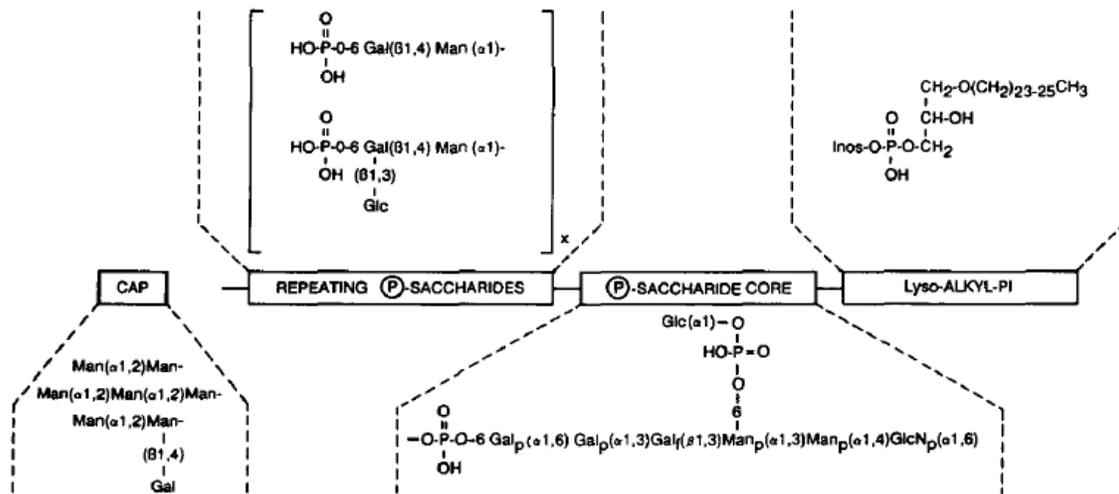


Figura 8. Estructura del LPG de *Leishmania mexicana*.

Todos los dominios del LPG comprendidos por el PG, las cadenas laterales y los oligosacáridos, pueden ser compartidos con otras moléculas de superficie del parásito, ya que también se encuentran en el PPG. [25].

La molécula de LPG se sintetiza en el estadio de promastigotes y una vez que estos se transforman en amastigotes, se reducen los niveles de expresión hasta el punto de casi estar ausente, lo cual se asocia a una alteración en su estructura bioquímica.

Leishmania tiene que sobrevivir diferentes obstáculos durante la fase del ciclo de vida dentro del vector, como el tracto digestivo de la mosca. El denso glicocalix que presentan los promastigotes metacíclicos al iniciar su diferenciación, está formado por LPG y PPG. Estos le brindan protección contra las enzimas hidrolíticas del intestino.

Para el caso de los promastigotes procíclicos, el LPG provee la habilidad de adherirse a las células epiteliales del intestino medio, lo que impide que el parásito sea excretado. Una vez que el parásito madura al estadio metacíclico, cambia la conformación del LPG, que le permite ser liberado de las células epiteliales[47].

El promastigote metacíclico presenta un dominio PG de en la molécula de LPG que es aproximadamente dos veces más largo que cuando el parásito se encuentra en la fase de promastigote procíclico, lo que evita la unión del complejo de ataque a membrana del complemento. Así mismo, LPG, junto con la proteasa GP63, permiten la generación de las opsoninas C3b y C3bi que se unen a la superficie del promastigote y permiten su fagocitosis por los receptores CR1 y CR3, dos receptores que se asocian con bajo estallido oxidativo y desregulación en la producción de IL-12 [23].

El LPG también es un factor importante en la internalización del promastigote por el macrófago y le brinda protección contra los mecanismos efectores intracelulares durante las primeras etapas de la infección. Para facilitar la fagocitosis, el LPG se adhiere a las integrinas de superficie del macrófago CR3 y p150,95. Una vez dentro del macrófago, los promastigotes se encuentran en la vacuola parasitófora (PV), que tiene que llevar a cabo procesos de fusión antes de convertirse en fagolisosoma con capacidad de destruir al parásito. Sin embargo, las moléculas LPG pueden inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo que inhibe la biogénesis fagosomal. Esto retrasa la acidificación de la vacuola y la producción de enzimas lisosomales, permitiendo la sobrevivencia del parásito dentro del macrófago [49].

Existen varias hipótesis sobre los mecanismos responsables del retraso de la maduración del fagolisosoma, que ejerce LPG de *Leishmania*. Una de ellas, descrita por

Deconteaux en 1999 [49], propone que el LPG previene la fusión creando una repulsión estérica entre el fagosoma y la membrana del fagosoma y el endosoma. Otra hipótesis descrita por Holm en 2001 [50], establece que esto tiene que ver con el proceso de despolimerización de la F actina del perofagosoma. Holm describió que la F- actina se acumula progresivamente alrededor de los fagosomas que contenían a *L. donovani* durante la primera hora de fagocitosis. Debido a esta acumulación se da un impedimento físico para el tráfico vesicular, lo que impide la formación del fagolisosoma.

Adicionalmente, LPG inhibe a PKC y a la transducción de señales mediada por esta en el macrófago, lo que se asocia con un nivel más alto de infección. *Leishmania* inhibe la actividad de la PKC para asegurar su sobrevivencia. LPG interactúa con el dominio regulatorio de la PKC que contiene diacilglicerol, calcio y los sitios de unión a fosfolípidos o puede inhibir su activación previniendo que PKC se inserte en la membrana [49]. Otro mecanismo, mediante el cual LPG puede proteger al amastigote dentro del fagolisosoma, es la quelación del calcio, que es importante regulador de varias vías de activación celular. Esto se debe a que el calcio se une a las unidades repetidas del LPG sin perturbar la estructura del glicano. La movilización alterada de calcio puede llevar a una traducción de señales deteriorada lo que puede resultar en una deficiente activación de la PKC [51].

Otro mecanismo de protección mediada por las unidades repetidas de LPG es la eliminación de los radicales hidroxilo y los aniones superóxido generados durante el estallido oxidativo del macrófago, evitando que el promastigote esté expuesto a estos metabolitos tóxicos de oxígeno [49].

1.9.2 Glicoproteína de 63 kD (GP63)

Otra molécula de importancia para la infección por *Leishmania* es la glicoproteína GP63, que es una metaloproteasa dependiente de zinc y que entre sus sustratos se encuentran la caseína, la albumina, la hemoglobina y el fibrinógeno. Es la proteína más abundante en la superficie de *Leishmania* y esta codificada por múltiples genes que están agrupados en un cromosoma de 650 kb. Se ha encontrado en la forma de promastigote (1%) y en una pequeña proporción en el amastigote (0.1%) [51].

El papel más estudiado de la GP63 es su participación en la unión y sobrevivencia de los promastigotes en los macrófagos hospederos. Se ha propuesto que la unión del parásito al macrófago puede estar regulada de 2 maneras: 1) de manera indirecta a través de la opsonización por C3bi, que, después de ser generado por C3b, se une al receptor de complemento en el macrófago, actuando como un puente entre los promastigotes que presentan GP63 y el macrófago [52], y 2) GP63 interactúa directamente con un receptor de integrinas en el macrófago, ya que esta proteína presenta propiedades similares a la fibronectina: presenta el motivo SRYD que es antigénicamente similar a región RGDS de la fibronectina [53].

La GP63 es 10 veces menos abundante que LPG en casi todo el ciclo de vida del parásito, sin embargo, debido a la ausencia de LPG en el estadio de amastigote, posiblemente juega un papel importante en la sobrevivencia del amastigote intracelular y en la regulación de la respuesta inmune. En 1989 Chaudhuri [54] y su equipo, demostraron que las proteínas que se encontraban atrapadas en los liposomas eran protegidas de una degradación fagolisosomal cuando eran recubiertas de GP63 purificada de *Leishmania mexicana*, y que la protección se perdía cuando la actividad enzimática de GP63 se

desactivaba con temperatura. Así mismo se han hecho otros estudios en los que la baja expresión de GP63 lleva a un bajo índice de sobrevivencia dentro del macrófago [55].

También se ha reportado que la acción proteolítica puede favorecer la sobrevivencia del parásito. McGwire y su equipo reportaron la capacidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* de degradar componentes de matriz extracelular mediante GP63, favoreciendo la rápida migración del parásito cuando entra en contacto con la matriz extracelular de tejido subcutáneo [56]. Esta característica se ha discutido como un factor clave que incrementa la actividad de fosfatasa de la GP63 en macrófagos infectados, y también se cree que regula la resistencia de *Leishmania* a péptidos antimicrobianos de los fagolisosomas mediante su degradación por GP63.

Otra forma de acción de GP63 es la alteración de señales del macrófago y de funciones antimicrobiales, explotando el papel que tienen las fosfatasas como reguladores negativos de estos mecanismos. Al igual que en el caso de LPG, también GP63 modula la actividad de PKC, ya que esta proteasa afecta al sustrato de la cinasa C alanina miristoilada (MARCKS) y las proteínas relacionadas a MARCKS que son sustratos de la PKC, que conlleva la inhibición de agentes antimicrobiales de la célula, como son los radicales de oxígeno.

1.9.3 Fosfatidilserina (PS)

Este fosfolípido también tiene influencia en la virulencia de *Leishmania*, generalmente se encuentra en la pared interna de la membrana plasmática y se transloca al exterior principalmente durante procesos de muerte celular programada [57]. Su importancia radica en que es expresada tanto por células apoptóticas del hospedero como en la superficie del parásito. Se ha visto la expresión de esta molécula en ambas fases del ciclo de vida de *Leishmania*.

Durante la apoptosis, la PS en células apoptóticas es reconocida por células fagocíticas, llevando a la activación alternativa del fagocito y la producción elevada de TGF- β e IL-10 [57]. La expresión de PS en la superficie de amastigotes durante la infección representa un mecanismo de escape ya que induce una respuesta anti-inflamatoria en los macrófagos y en las células dendríticas, lo que crea un ambiente permisivo para el crecimiento y la diseminación del parásito, sin que necesariamente se lleve a cabo la muerte celular. Este mecanismo se le conoce como mimetismo apoptótico [58]. La fagocitosis de células apoptóticas es un ejemplo perfecto de un silenciamiento inmunitario en las que se suprimen las funciones del fagocito por la PS en la membrana y se evita que *Leishmania* sea reconocida como un agente extraño.

Por otro lado, la presencia de promastigotes apoptóticos en una infección por *Leishmania* induce un estado anti-inflamatorio en el hospedero y permite una mejor sobrevivencia de los parásitos viables, lo cual representa un comportamiento alturista (Van Zanderberg et al., 2006). Este estudio está basado en descubrimientos que indican que *Leishmania* presenta una muerte celular muy similar a la apoptosis, expresando PS en su superficie. Al progresar de fase logarítmica a fase estacionaria de crecimiento, los

promastigotes empiezan a expresar mayor cantidad de PS y muerte celular. Esto parece indicar que promastigote viables que no presentan PS son los infectivos, mientras que la subpoblación apoptótica que expresa PS inhibe la respuesta inflamatoria del macrófago [46].

2. JUSTIFICACIÓN

En México, la leishmaniasis es prevalente en al menos 22 de las 23 entidades federativas. La mayoría de los casos corresponden a las formas cutáneas de la enfermedad: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD), [59].

Las causas de variabilidad en los cuadros clínicos derivados de una infección por *Leishmania mexicana* incluyen la virulencia de la cepa así como el fondo genético del paciente [1]. Diferentes factores de virulencia del parásito pueden ser importantes en la infección y progresión de la enfermedad por su capacidad de modular el sistema inmune, entre los que se encuentran: fosfatidilserina (PS), lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína GP63.

Las distintas especies de *Leishmania* producen cuadros clínicos de diversa severidad. Sin embargo, poco se sabe de factores de virulencia en aislados de una especie de *Leishmania*. Por lo tanto, en el presente trabajo se buscó una posible asociación entre las variaciones en la expresión de fosfatidilserina, LPG y GP63 de cuatro diferentes aislados de *Leishmania mexicana* obtenidas de pacientes con cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea de distinta severidad (dos de LCL y dos de LCD). De estos aislados, dos fueron aislados recientes y dos son aislados “viejos”, que llevan varios años de ser cultivados en el laboratorio. Además de analizar la expresión de los marcadores de virulencia, se analizaron efectos funcionales sobre macrófagos diferenciados de médula ósea, tales como su capacidad de infectar al macrófago, su capacidad de inhibir el estallido oxidativo, su sobrevivencia intracelular, la producción de citocinas por los macrófagos infectados y su capacidad de infectar a ratones BALB/c.

Así mismo, se evaluó la posible resistencia al medicamento Glucantime de los distintos aislados. Este estudio comparativo sería el primero en analizar si aislados de pacientes con distinta severidad clínica presentan marcadores fenotípicos o funcionales de virulencia (*in vitro* e *in vivo*) que se pudieran correlacionar con la severidad clínica del paciente.

3. HIPÓTESIS

Aislados de *Leishmania mexicana* obtenidos de pacientes con cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea de diferente grado de severidad, ejercen distinto grado de inmunomodulación sobre macrófagos murinos, la cual se correlaciona con la expresión de fosfatidilserina, GP63 y LPG en los parásitos.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo es determinar si los aislados de *Leishmania mexicana*, obtenidos de pacientes con distinta severidad clínica, presentan variaciones en la expresión de sus factores de virulencia y si estas variaciones ejercen distinto grado de inmunomodulación sobre el macrófago murino.

Objetivos Particulares:

- 1.- Cultivar cuatro aislados de *Leishmania mexicana* aisladas de pacientes con distinta severidad clínica (dos con LCL y dos con LCD).
- 2.- Analizar mediante citometría de flujo la cinética de expresión de fosfatidilserina (PS) , lipofosfoglicano (LPG) y GP63 en promastigotes de *L. mexicana* aislados de pacientes con distinta severidad clínica.
- 3.- Analizar el índice de infección de macrófagos de ratones BALB/c por los cuatro asilados de *L. mexicana*.
- 4.- Evaluar la progresión de la enfermedad en el cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con los cuatro asilados de *L. mexicana*.
- 5.- Analizar si los aislados de *L. mexicana* tienen distinta capacidad de sobrevida en macrófagos de ratones BALB/c.
- 6.- Analizar el efecto del Glucantime sobre el índice de infección y en la sobrevida de los cuatro aislados de *L. mexicana*

7.- Analizar si los cuatro aislados de *L. mexicana* de distinta severidad clínica ejercen un efecto sobre el estallido oxidativo de los macrófagos de ratones BALB/c.

8.- Analizar la producción de IL-12 e IL-10 en macrófagos de ratones BALB/c infectados con los cuatro aislados de *L. mexicana*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización de los estudios se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c obtenidos del bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina UNAM. Los aislados de *Leishmania mexicana* utilizados fueron la MHOM/MX/84/SET GS “Solis” aislado de un paciente con LCD y MHOM/MX/92/UADY 68 “68”, de un paciente con LCL, ambos llevan muchos años de ser cultivados en el laboratorio. Los otros dos aislados fueron recientes, siendo “Lacandona” de un paciente con LCL aislado 2014, e “Isabel” de un paciente con LCD aislada en 2011.

5.1 Obtención de amastigotes de *Leishmania mexicana*

Los ratones infectados previamente con 10×10^6 parásitos en el cojinete plantar se sacrificaron cuando tenían aproximadamente 1.5 meses de evolución de la infección. El ratón fue sacrificado siguiendo las normas establecidas en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. En condiciones de esterilidad se cortó la pata infectada y se colocó en un tubo de 50 μ l estéril en alcohol al 75%. En condiciones de esterilidad se lavó cada pata dos veces con PBS 0.15 mM, pH 7.2 con antibiótico (Gibco, No. Cat. 15070-063), para eliminar el alcohol.

Para la obtención de las células, se realizaron 3 incisiones con el bisturí y se colocó la pata sobre una malla con poros de 100 μ m y se maceró en presencia del medio 199 (GIBCO- Invitrogen, Cat. No. 31800-022) con 10% de SFB (PAA, No. Cat. A15-751).

Se centrifugó la muestra a 1500 rpm durante 5 min a 22°C, con la finalidad de eliminar restos del tejido. Se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min (Centrifuge 5810 R Eppendorf). El pellet se suspendió en 1 ml de medio 199 con 10% de SFB, se llevó a 10 ml y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 23°C. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio Schneider (Sigma- Aldrich, No. Cat. S9895), el cual se aforó a 5 ml. Para realizar el conteo, fue necesario pasar la muestra por una jeringa de insulina varias veces, con la finalidad de disgregar los cúmulos de amastigotes. Para el conteo se realizó una dilución 1:10 con Glutaraldehído.

5.2 Cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Para iniciar el cultivo de promastigotes, se colocaron 1×10^6 amastigotes en una botella de cultivo de 25 c.c. en 1 ml de medio 199 y 10% de SFB a un pH de 7.2. Se incubó a 26°C y se monitoreó el cultivo diariamente. Se realizaron pases del cultivo cada 4 días, utilizando 5×10^5 parásitos por mililitro de medio. Una vez establecido el cultivo de promastigotes, se revisaron las características de sincronidad y de movilidad, verificándose la ausencia de contaminación. Previo a los ensayos experimentales, se lavaron los promastigotes tres veces en PBS, centrifugándolos a 4000 rpm durante 10 min a 23°C. Se contaron los parásitos diluidos 1:10 en glutaraldehído.

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

Se utilizaron ratones BALB/c machos de 12 semanas. Los ratones fueron sacrificados por desnucamiento. Se limpió la zona de la pata con alcohol al 70%. Se realizó un corte superficial con las tijeras en la ingle y se removió la piel del músculo. Después se realizó un corte a la altura de la cadera para remover el miembro por completo sin romper el fémur. Se limpiaron los huesos con una gaza hasta dejarlos completamente limpios de tejido y se colocaron en una caja de Petri con 10 ml con PBS y 10% de antibiótico. Con las tijeras se realizaron dos cortes a las orillas de cada hueso para dejar expuesta la médula. Para la perfusión se utilizó una jeringa con 10 ml de PBS a la que se le adaptó una aguja de insulina. Se perfundió la médula, obteniéndose células pluripotenciales que se colocaron en un tubo de 50 ml. Las células se lavaron en PBS durante 10 minutos, y se centrifugaron a 1500 rpm y 23°C. Después del lavado, se suspendió el pellet celular en 1ml de medio RPMI. Las células de médula ósea se colocaron en placas FALCON BD de 100 x 15 mm, en 1 ml medio RPMI, 20% de SFB y 10% de sobrenadante de un cultivo de la línea celular L929, productora de M-CSF, para la diferenciación de macrófagos. Las células se incubaron durante 7 días a 37 °C en una atmosfera de 5 % de CO₂. A los 7 días se removió el medio y se desprendieron las células mediante incubación en 5 ml PBS a 4°C durante 15 min. Por pipeteo se desprendieron los macrófagos adheridos a la placa. Una vez desprendidos, se lavaron con PBS durante 10 min, centrifugándolos a 1500 rpm. Las células se re-suspendieron en 1 ml de RPMI, suplementado con 10% de SFB, y se contaron en una cámara de Neubauer.

5.4 Tinción de *Leishmania* con Anexina V para detección de fosfatidilserina

Esta metodología se realizó en los cuatro aislados durante todos los días del cultivo, para conocer el día en el cual la mayoría de los parásitos expresaran el marcador.

Se utilizaron 1×10^6 de promastigotes para cada condición. Como controles se incluyeron una muestra sin teñir y una teñida con Anexina V (BD- Pharmigen 556419). Después del último lavado, los parásitos se re-suspendieron en 50 μ l del buffer de unión a Anexina (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4) y se agregó 1 μ l de Anexina V FITC, siguiendo instrucciones del fabricante. Se incubaron durante 15 min en oscuridad y se realizó un lavado con el mismo buffer de unión. Los parásitos se re-suspendieron en 200 μ l de buffer de unión y se analizaron por citometría de flujo (Facs Canto II y el software DIVA BD California).

5.5. Tinción de *Leishmania* con anticuerpo monoclonal contra LPG

Se analizaron 1×10^6 de parásitos para cada condición, que incluyeron una muestra sin marca, una muestra teñida con el anticuerpo secundario (como control de isotipo) marcado en FITC, (Dako No. Cat.F261) a una dilución 1:200 y la condición experimental teñida con el anticuerpo monoclonal anti-LPG, en una dilución 1:25. Las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Después de los lavados, se agregaron 50 μ l de Citofix/citoperm (BD Cytofix/CYTOPERM 51-2090k2), se incubaron durante 15 min y se realizó un lavado con Permwash (BD biosciences 51-2091K2) durante 10 min a 4000 rpm en la microcentrífuga (Centrifuge 5810 R Eppendorf). Después del lavado, se

bloquearon las muestras con 2.5% de suero de cabra diluido en Permwash (BD biosciences 51-2091K2), se dejaron incubar durante 10 min y se lavaron nuevamente con Permwash. Las muestras se suspendieron en 50 μ l de Permwash, a excepción de la condición sin teñir y la condición del control de isotipo. Las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal contra LPG durante 20 min, se lavaron con Permwash y se resuspendieron en 50 μ l de Permwash. Se tiñeron con el anticuerpo secundario durante 20 min en oscuridad, se realizó un último lavado y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. Se colocaron en tubos de citometría de flujo para ser analizados.

5.6 Tinción de *Leishmania* con anticuerpo monoclonal contra GP63

Se tiñeron 1×10^6 de parásitos para cada condición. Como control negativo se utilizaron parásitos sin teñir, y como control de isotipo se tiñeron con el anticuerpo secundario marcado en FITC, (Zymed 180117) en una dilución 1:50. Para la condición experimental se utilizó el anticuerpo policlonal anti GP63 en una dilución 1:50 y el anticuerpo secundario en FITC (Zymed 180117). Todas las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se lavaron y se suspendieron en 50 μ l de PBS. Las muestras experimentales se incubaron con el anticuerpo anti-GP63 durante 20 min, se lavaron con PBS durante 10 min a 4000 rpm, se suspendió el pellet en 50 μ l de PBS y se marcó con el anticuerpo secundario. Las muestras se dejaron incubando durante 20 minutos en oscuridad, se repitió el lavado con PBS y se re-suspendieron las muestras en 200 μ l de PBS y se analizaron por citometría de flujo.

5.7 Ensayo de fagocitosis y del efecto de Glucantime en la infección *in vitro*.

Bajo condiciones de esterilidad se dejaron adherir 5×10^5 macrófagos sobre portaobjetos (estériles y libres de grasa) durante 24 horas a 37°C. Se infectaron los macrófagos con cada una de los cuatro aislados de *Leishmania* en una relación 1:10. Otro grupo de macrófagos fueron infectados con las cuatro aislados en presencia de Glucantime (Sanofi aventis), y como control, se utilizó un grupo de macrófagos con Glucantime. El tiempo de infección fue de 3 horas a 26 °C, fueron lavados con PBS a temperatura ambiente y suspendieron en 1 ml de medio RPMI +10% SFB. A los macrófagos incubados con Glucantime se les agregaron 50 µl (15 µg) del medicamento y se dejaron 24 horas a 37 °C en la incubadora. Se retiró el sobrenadante y se fijaron en 200 µl de etanol durante 3 minutos. Para poder visualizar la fagocitosis, se tiñeron con 500 µl GIEMSA (SIGMA- Aldrich) (a una dilución 1:20 en agua destilada) durante 15 minutos a teñir. Para establecer el índice de infección se contaron 100 células, tomando en cuenta tanto las células no infectadas como las infectadas. También se contó el número de parásitos en las células infectadas.

5.8 Infección de ratones BALB/c

Se utilizaron ratones BALB/c machos de seis semanas para las infecciones. Los tres ratones controles se les aplicó PBS. Como grupo experimental se infectaron tres ratones con 1×10^6 promastigotes suspendidos en 10 µl de PBS de cada uno de los diferentes aislados de *L. mexicana*. La infección se realizó en el cojinete plantar y al grupo control

solo recibió 10 µl de PBS. Para evaluar el avance de la infección se realizaron mediciones semanales de las patas de los ratones utilizando un vernier.

5.9 Ensayo de estallido oxidativo

En placas de 24 pozos de baja adherencia se colocaron 1×10^6 macrófagos durante 24 horas a 37 °C previo a la infección. Como control se analizaron macrófagos sin infectar. Se coincubaron los macrófagos con los cuatro aislados de *L. mexicana* en una relación 1:10 durante 5 minutos. Se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 min y se suspendieron en 20 µl de PBS. Se colocaron las células en 10 µl de PBS en microtiras para fluorómetro (Labsystems). Se agregaron 210 µl de Luminol y 60 µl de PMA (acetato de forbol miristato) a $5 \times 10^{-4} \text{M}$ y se realizó la lectura del estallido oxidativo en un fluorómetro (Fluoroslon Ascent FL).

5.10 Análisis de sobrevida de parásitos intracelulares

En placas adherentes de 24 pozos se colocaron 1×10^6 macrófagos y se dejaron en incubación durante 24 horas a 37 °C previo a la infección. Para los ensayos se utilizaron las condiciones: un pozo control de macrófagos no infectados; un pozo de macrófagos infectados con 1×10^6 parásitos de los cuatro aislados de *L. mexicana* en una relación 1:10; un pozo de macrófagos en presencia de Glucantime; y un pozo con macrófagos infectados con *Leishmania* en una relación 1:10 con Glucantime. El tiempo de infección fue de 3 horas a 26°C, posteriores a las cuales se realizaron 2 lavados con PBS a temperatura ambiente y se agregó 1 ml de medio RPMI+10% SFB. A los pozos con Glucantime se les agregaron 50 µl del medicamento durante 24 horas a 37 °C. Se lavaron

los macrófagos con PBS a temperatura ambiente, y se colocaron en 1 ml de medio 199 con 10% de SFB. Se incubaron a 26°C sin CO₂, lo cual lleva a la muerte a los macrófagos pero permite la sobrevivencia de los promastigotes que se liberados. Se revisaron las placas de cultivo todos los días hasta ver liberación de parásitos al medio, después de lo cual se recuperó el sobrenadante, se centrifugó en una microcentrífuga (Mini Spin Plus Eppendorf) y se resuspendió en 1 ml de PBS con glutaraldehído en dilución 1:2 para el conteo de los parásitos.

5.11 Cuantificación de citocinas

Para la cuantificación de citosinas se colocaron 1×10^6 macrófagos incubados en placas adherentes de 24 pozos durante 24 horas a 37 °C previo a la infección. Los ensayos experimentales se estudiaron bajo las siguientes condiciones: macrófagos control no infectados, macrófagos infectados con los cuatro aislados de *L. mexicana* en una relación 1:10 y como control positivo se consideraron macrófagos incubados con LPS. Para definir el día de infección, se revisaron las características del cultivo, la expresión de PS, la sincronidad del cultivo y la movilidad de los promastigotes, verificando que no hubiera contaminación. Se contaron los parásitos fijados en glutaraldehído a una dilución 1:10, se lavaron tres veces con PBS a 4000 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron de manera que quedaran 10×10^6 parásitos en 10 µl de PBS. Se coincubaron con los macrófagos dejando un tiempo de infección de 3 horas a 26°C. Se lavaron los macrófagos infectadas 2X con PBS a temperatura ambiente, se agregó 1 ml de medio RPMI con 10% SFB Al control con LPS se agregó 1µg/1µl de LPS. Se cultivaron

las células infectadas o estimuladas con LPS durante 24 horas a 37 °C. Se colectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -3°C para su cuantificación de citocinas.

5.12 Cuantificación de citocinas IL-10 e IL-12 por método de ELISA sándwich.

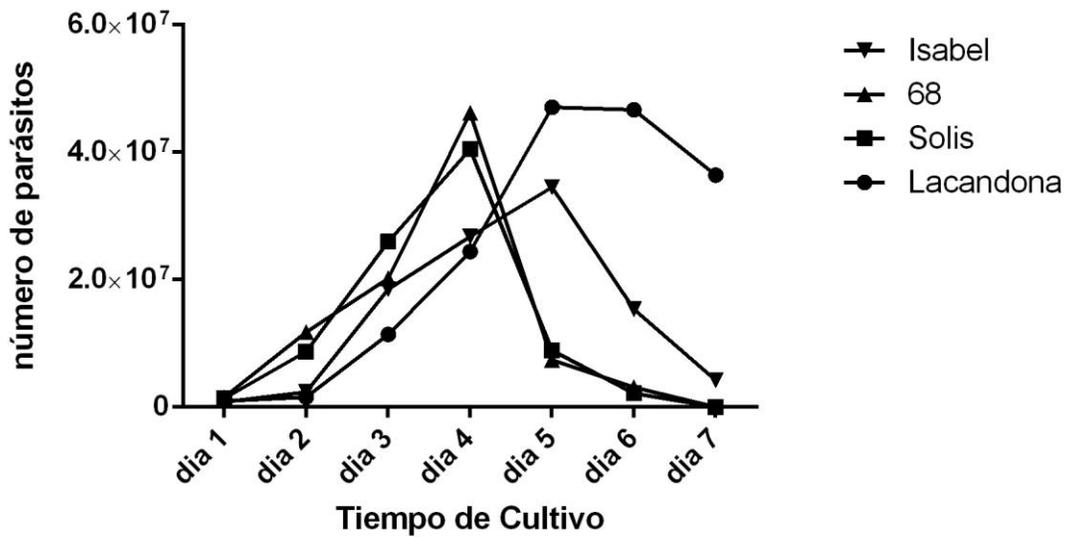
La cuantificación de citocinas se realizó mediante ELISA. El anticuerpo de captura se diluyó en un buffer de unión de fosfato dibásico de sodio 0.1 M a pH 9.0. Se colocaron 50 µl de anticuerpos de captura por pozo, se incubó la placa a 4°C toda la noche. Se lavó la placa 4 veces con PBS y Tween 80 al 0.01%. Se agregaron 200 µl de solución bloqueadora durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguidos por tres lavados. Se colocaron 100 µl de las muestras por pozo, junto con las muestras para realizar la curva estándar. Se incubaron a 4°C hasta el día siguiente. Se lavó de nuevo la placa 4 veces y se colocaron 100 µl del anticuerpo de detección disuelto en albúmina bovina al 1% en 0.05% de Tween 20. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó la placa 6 veces. Se agregaron (100 µl por pozo) estreptavidina-fosfatasa alcalina (Invitrogen, No. Cat. 19542-018) a una dilución 1:2000 en albúmina bovina al 1% con 0.05% Tween 20. Se incubó la placa durante 30 min a temperatura ambiente y se realizaron 8 lavados. Se reveló la placa con 100 µl por pozo de una solución reveladora compuesta de buffer de sustrato y sustrato de fosfatasa (Sigma, No. Cat. S-0942). Se leyó la placa en un lector de ELISA para microplacas (EL312e BIOTEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 405 nm y con la ayuda del programa KC4 se obtuvieron las concentraciones de citocinas en cada una de las muestras.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de las curvas de crecimiento de cuatro aislados de *Leishmania mexicana*

Para evaluar el comportamiento de los cuatro aislados de *L. mexicana* en cultivo, se realizaron curvas de crecimiento, lo cual permitió determinar los días de cultivo en los cuales los promastigotes se encontraban en metaciclologénesis, para ser utilizados en los ensayos experimentales.

Se estudió el comportamiento de los aislados durante todos los días de crecimiento *in vitro*. En el aislado “Lacandona” se observó que la fase logarítmica duró hasta el día 5 del cultivo, después de la cual se inició la fase estacionaria con una duración de 24 horas, obteniéndose 47 millones de parásitos por mililitro. Los aislados “68” y “Solis” mostraron un crecimiento logarítmico hasta el día 4 de cultivo, en el cual alcanzaron el mayor crecimiento con 46 y 40 millones de parásitos por mililitro, respectivamente. Para el día 5 se observó una disminución del 85% en el número de parásitos en ambos aislados, sin que se observara una fase estacionaria. El aislado “Isabel” mostró una fase logarítmica de crecimiento hasta el día 5 del cultivo, obteniéndose 34 millones de parásitos por mililitro. A partir del día 6 se observó una disminución del 55% en el número de parásitos (Gráfica 1).



Gráfica 1. Curvas de crecimiento de cuatro aislados de *Leishmania mexicana* (Isabel, 68, Solis y Lacandona). Se establecieron los días con mayor número de parásitos para cada aislado. El aislado "Lacandona" alcanzó el punto máximo de crecimiento en el día 5, con una fase estacionaria de un día de duración. Los aislados "68" y "Solis" alcanzaron su punto máximo de crecimiento en el día 4 del cultivo, sin entrar en fase estacionaria. El aislado "Isabel" presentó su punto más alto de crecimiento el día 5 de cultivo y tampoco mostró fase estacionaria. La gráfica muestra el promedio de 4 experimentos independientes para cada aislado.

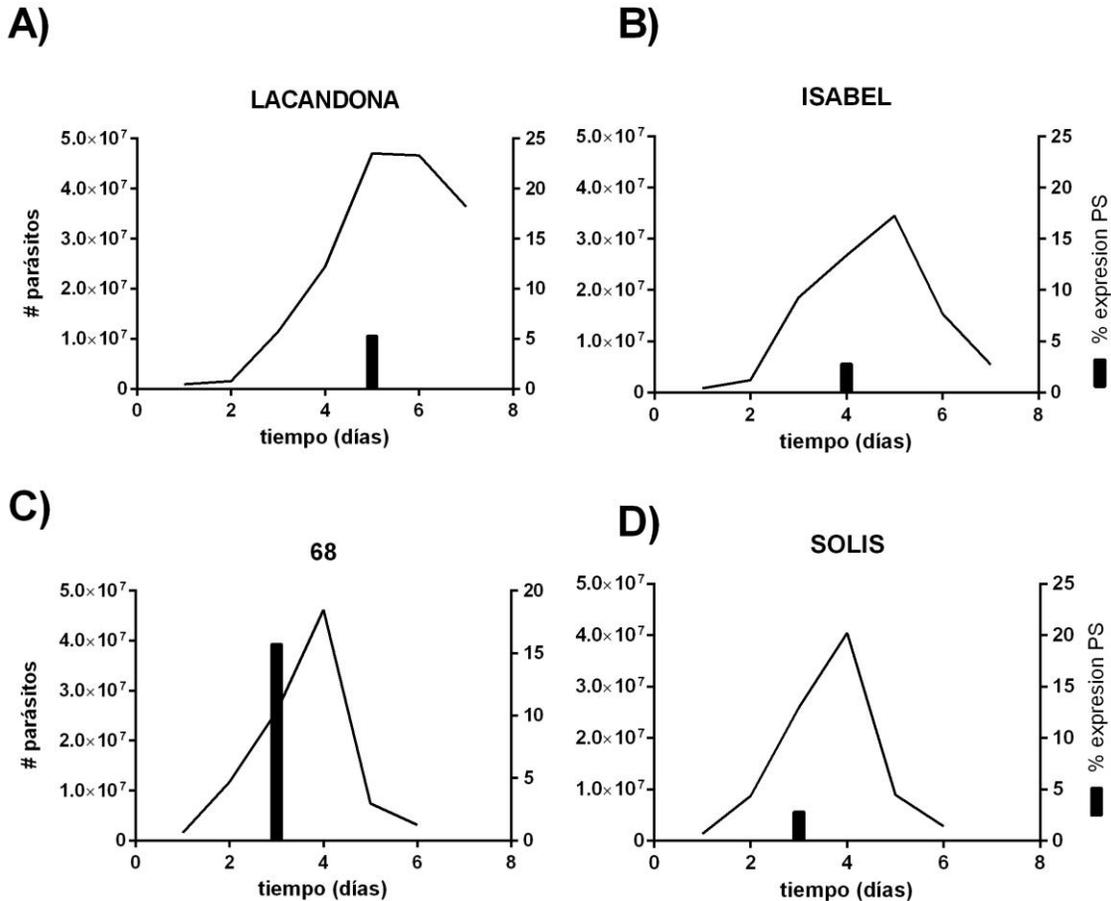
Posteriormente se evaluó, mediante citometría de flujo, si los promastigotes de los cuatro aislados de *Leishmania mexicana* presentaban diferencias en los días en los cuales la mayoría de los parásitos expresaban fosfatidilserina, LPG y GP63.

6.2 Análisis de la expresión de Fosfatidilserina (PS)

Se realizó una cinética de la expresión de la PS en los 4 aislados de *Leishmania* y se identificaron los días de cultivo donde el mayor número de parásitos expresaban la PS.

El aislado “Lacandona” presentó el mayor número de parásitos con expresión de PS el día 5 del cultivo, donde solo el 5.3% de los parásitos expresaban PS (Gráfica 2a). En el caso del aislado “Isabel”, solo el 2% de los parásitos expresaron PS, que se mantuvo constante desde el día 1 hasta el día 4 del cultivo (Gráfica 2b). El aislado “68” presentó la mayor cantidad de parásitos que expresaban PS el día 3, donde el 15% de los parásitos en cultivo expresaron esta molécula (Gráfica 2c). El aislado “Solis” presentó el máximo número de parásitos expresando PS (2.8%) en el día 3 (Gráfica 2d).

Expresión de Fosfatidilserina



Gráfica 2. Porcentaje del máximo número de parásitos que expresaron fosfatidilserina en los distintos días de crecimiento, analizado en 4 aislados de *L. mexicana*: “Lacandona” tuvo el más alto porcentaje de parásitos que expresaron PS (5.3%) en el día 5 (A); en “Isabel” fue el día 4 (B); en “68” fue el día 3 (C) y en “Solis” (D) fue el día 3. Cada barra representa el día en el cual el mayor % de parásitos expresaron PS. La la curva representa el número de parásitos por día de cultivo. La curva representa el promedio de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

6.3 Análisis de la expresión de LPG

Se analizó la expresión de LPG en los 4 aislados de *L. mexicana* registrando el día en el cual el mayor número de parásitos expresaron esta molécula. El aislado “Lacandona” presentó un aumento continuo en los parásitos que expresaban LPG durante los 5 días de crecimiento, observándose el máximo número en los días 4 y 5, donde el 89% y 82% de los parásitos expresaron esta molécula, respectivamente, y posteriormente decayeron a aproximadamente el 20% (Gráfica 3). El aislado “68” interesantemente mostró que desde el día 1, el 70% de los parásitos ya expresaban LPG. A partir del día 2 y hasta el día 4, el número de parásitos que expresaban LPG incrementó al 89%, posteriormente decayeron significativamente ($P < 0.0001$), quedando únicamente el 24% el día 5 (Gráfica 3). El aislado “Solis” mostró que el 70% de los parásitos expresaban LPG en los días 1 al 4 de la curva de crecimiento (sin diferencia significativa entre los días). Notablemente y al igual que el aislado “68”, en el día 5 disminuyeron los parásitos que expresaron LPG a un 21.8% ($P < 0.0001$) (Gráfica 3). El aislado “Isabel” mostró un número constante (aprox. Entre 30 y 40%) de parásitos que expresaron LPG a lo largo de los 6 días de la curva de crecimiento, aunque en el día 3 se observó una tendencia al incremento en el número de parásitos que llegó hasta el 49% (Gráfica 3).

En resumen, los días 3 y 4 de cultivos fueron los días donde la mayoría de los aislados tuvieron el mayor número de parásitos expresando LPG (Gráfica 3).

El estudio comparativo entre aislados y los diferentes días de cultivo reveló que:

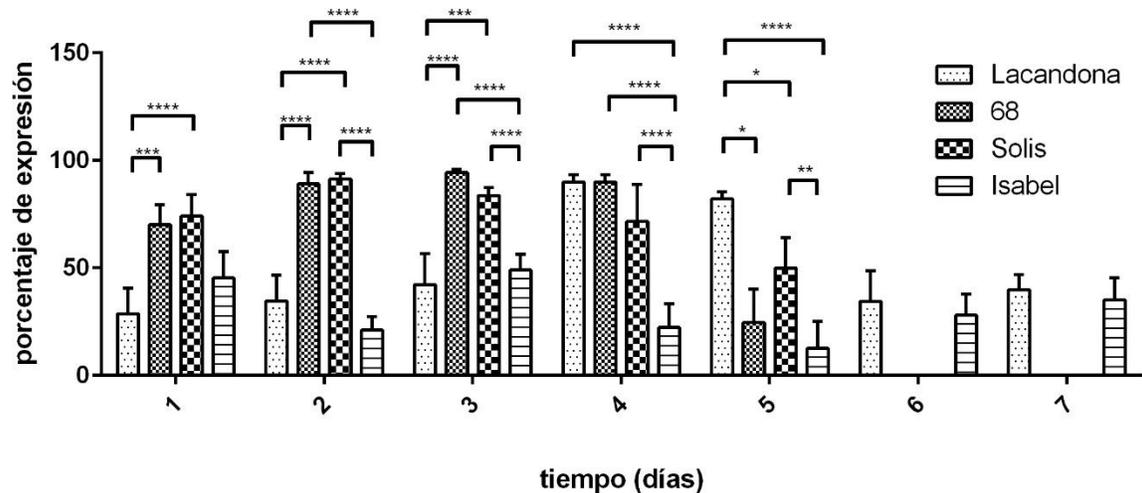
Para el día 3 de la curva se observó que los aislados con la más alta expresión de LPG fueron “68” y “Solis”, donde el 94.3% y 83.63% de los parásitos expresaron LPG

respectivamente (sin diferencias significativas entre ellos). Al comparar los aislados de pacientes con LCL, encontramos que un mayor número de parásitos del aislado “68” (94.3%) expresó LPG al día 3 en comparación con “Lacandona” (52.12%) ($P < 0.0001$). La comparación de la expresión de LPG entre aislados de pacientes con LCD reveló que “Solis” tenía significativamente más parásitos expresando LPG (83.63%) que “Isabel”, donde únicamente el 49% de los parásitos expresaron LPG ($P < 0.0001$). Al comparar el aislado “Lacandona” (LCL) con “Solis” (LCD) se observó que el aislado del paciente con LCL tuvo significativamente menos parásitos que expresaron LPG que el aislado de un paciente con LCD ($P < 0.0001$). Lo opuesto se observó entre aislados “Isabel” (LCD) tuvo menos parásitos que el aislado “68” (LCL) ($P < 0.0001$) (Gráfica 3).

En el día 4 de la curva se observó que los aislados con la más alta expresión de LPG fueron “Lacandona”, “68” y “Solis”, con un porcentaje de expresión de 89.96%, 89.96% y 71.73%, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellas. Al comparar dos aislados LCL “Lacandona” y “68” no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje que expresaban LPG. Sin embargo, al comparar dos aislados LCD “Solis” e “Isabel”, se encontraron diferencias significativas entre ellas, siendo que un 50% más parásitos de “Solis” expresan LPG, al compararlos con “Isabel” ($P < 0.0001$) (Gráfica 3).

En resumen, no se encontró una correlación entre el número de parásitos que expresan LPG de los distintos aislados y el cuadro clínico del paciente del cual fueron obtenidos (tanto en el día 3 como en el día 4 de cultivo). Sin embargo, en 3 de los aislados se encontró una correlación entre los días en los cuales el mayor número de parásitos expresan LPG y el día de mayor crecimiento en el cultivo, siendo el día 3 para “68” y “Solis” y el día 5 para “Lacandona”. El aislado “Isabel” se sale de este patrón ya que

alcanza el mayor número de parásitos expresando LPG el día 3, siendo que el día de mayor número de parásitos en cultivo es el día 4. Aparentemente también hay una correlación entre parásitos de reciente aislamiento vs parásitos que ya tienen años de ser cultivados en el laboratorio: parásitos recién aislados expresan menos LPG en el día 3 que los que tienen años de cultivo.

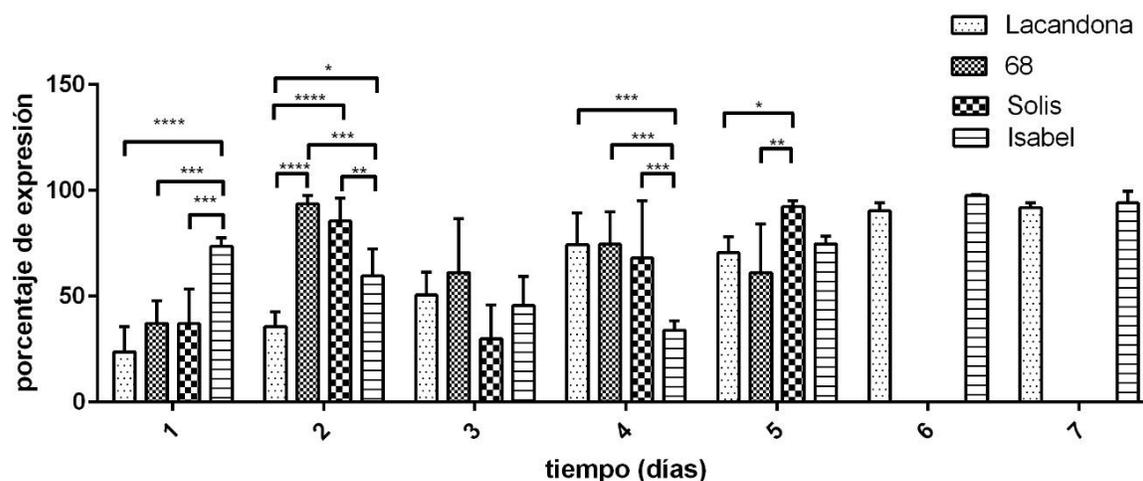


Gráfica 3. Porcentaje de parásitos de 4 aislados de *L. mexicana* que expresan LPG en distintos días de cultivo. El aislado “Lacandona” (LCL) tuvo el mayor número de parásitos expresando LPG los días 4 y 5 de cultivo, con el 89% y 82% respectivamente. El aislado “68” (LCL) tuvo el mayor número de parásitos LPG partir del día 2 y hasta el día 4, disminuyendo en día 5. El aislado “Solis” tuvo el mayor número de parásitos expresando LPG entre los días 1 a 4. El aislado “Isabel” no presentó diferencias significativas en la expresión de LPG a lo largo de su curva de crecimiento. Se puede observar que los días 3 y 4 son los días en que la mayoría de los parásitos expresaron LPG. Para el día 3 los aislados “68” (LCL) y “Solis” (LCD) tuvieron el mayor número de parásitos expresando LPG con un 94.3% y 83.63% respectivamente. En el día 4 de la curva se observó que los aislados en los cuales hubo mayor número de parásitos expresando LPG fueron “Lacandona”, “68” y “Solis”, con un porcentaje de expresión de 89.96%, 89.96% y 71.73% respectivamente. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.4 Análisis de la expresión de GP63

Se evaluó la expresión de la molécula GP63 a lo largo de la curva de cultivo de cada aislado de *L. mexicana* y se determinaron los días donde el mayor número de parásitos expresaron esta molécula.

En el aislado “Lacandona” se observó que el mayor número de parásitos que expresaron GP63 incrementó durante los días de cultivo, llegando a su punto máximo en los días 4, 5, 6, y 7 con aproximadamente el 74.43%, 70.53%, 90.3% y 91.33% respectivamente (Gráfica 4). Para el caso del aislado “68”, el mayor número de parásitos (93.66%) que expresaron GP63, se encontraron a partir el día 2, y se mantuvieron sin cambios significativos hasta el día 5 del cultivo (Gráfica 4). El aislado “Solis” mostró el mayor número de parásitos con expresión de GP63 en los días 2, 4 y 5 de cultivo, con un porcentaje de 85.56%, 68.03% y 92.33% respectivamente (Gráfica 4). El aislado “Isabel” mostró un importante número de parásitos expresando GP63 desde el día 1 de cultivo, que disminuyeron transitoriamente el día 4, para incrementar nuevamente a partir del día 5 y llegando al máximo número los días 6 y 7 de cultivo (Gráfica 4).



Gráfica 4. Análisis del número de parásitos de aislados de *L. mexicana* que expresan GP63 durante los distintos días del cultivo. El aislado “Lacandona” presentó el mayor aumento en el número de parásitos expresando GP63 el día 4, manteniéndose constante durante todos los días de la curva de crecimiento. En el aislado “68” se observó que el día 2 del cultivo presentó el mayor número de parásitos expresando GP63 (93.66%) que disminuyó ligeramente hasta el día 5. En el aislado “Solis” se encontró que los días con mayor número de parásitos expresando GP63 fueron los días 2, 4 y 5 con 85.6%, 68.03% y 92.33% respectivamente. En el caso del aislado “Isabel” el mayor número de parásitos expresando GP63 fueron los días 6 y 7, con un aumento de 22.84% ($P < 0.0225$) con respecto al día 5 de la curva. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

Una vez que se analizaron las tres moléculas en todos los aislados de *L. mexicana* durante los distintos días de cultivo *in vitro*, se infectaron ratones BALB/c y macrófagos derivados de médula ósea con los 4 aislados, tomando en cuenta el día de mayor número de parásitos en el cultivo.

6.5 Análisis de la expresión de PS, LPG Y GP63 en parásitos al día de la infección de células *in vitro* y de ratones *in vivo*.

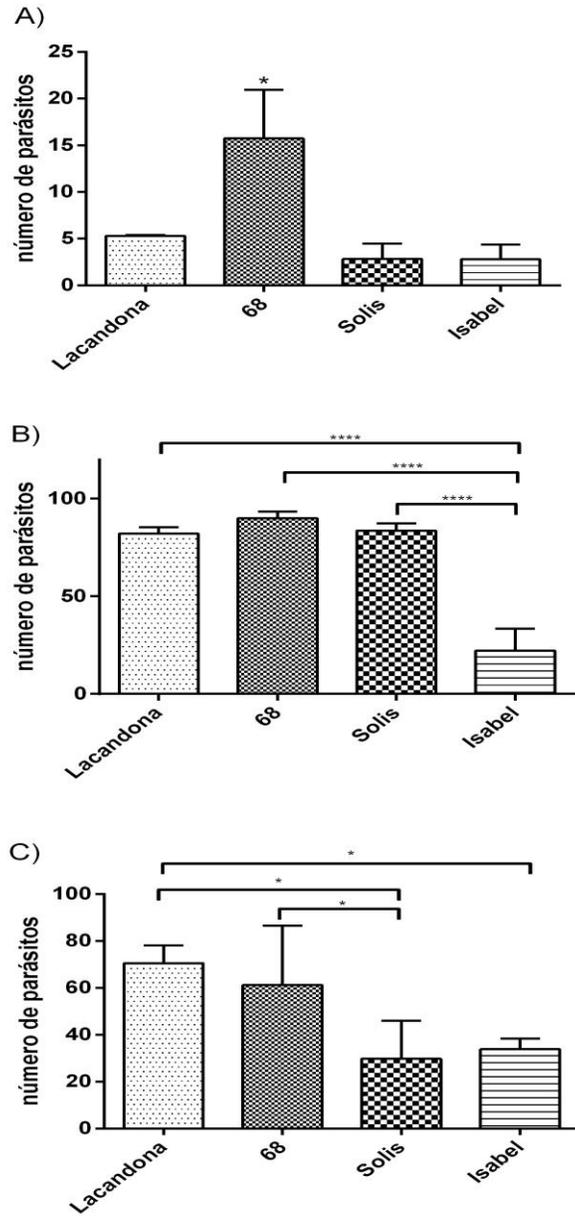
Una vez que se identificó el día de infección determinado por el día de máximo crecimiento, se analizaron el número de parásitos que expresaron estas moléculas en los cuatro aislados de *L. mexicana*.

Se encontró que el aislado “68” fue el que presentó significativamente más parásitos ($P < 0.0001$) expresando PS, aproximadamente un 10% más con respecto los otros aislados de *L. mexicana*. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de PS entre los aislados “Lacandona”, “Solis” e “Isabel” (Gráfica 5A).

Al analizar la expresión de LPG se observó que el 80% de los parásitos de los aislados “Lacandona”, “68” y “Solis” expresaron LPG. Interesantemente se observó que en el aislado “Isabel” solo el 22% de los parásitos expresaron LPG, lo cual fue significativamente menos ($P < 0.0001$) que los otros tres aislados (Gráfica 5B).

Al analizar el número de parásitos que expresaron GP63 en el momento de la infección se observó que los aislados de pacientes con LCL presentaron un mayor porcentaje de parásitos que expresaron GP63, siendo para “Lacandona” 70.53% y “68” 61.2%, que fue significativamente mayor ($P < 0.0001$) que el número de parásitos aislados de pacientes LCD (Gráfica 5 C), donde únicamente un 30% de los dos aislados de pacientes con LCD (“Solis” e “Isabel”) expresaron GP63 (Gráfica 5C). Se encontró un número significativamente mayor de parásitos que expresaron GP63 en el aislado de paciente con LCL “Lacandona” que en ambos aislados de pacientes con LCD (“Solis” e “Isabel”).

Con el aislado "Solis" la diferencia fue de 40.77% ($P < 0.0001$) y con "Isabel" fue de 36.63% ($P < 0.0001$). El aislado "68" de pacientes LCL también mostró un número significativamente mayor de parásitos que expresaron GP63 después de la infección que el aislado de pacientes con LCD "Solis" ($P < 0.0001$) (Gráfica 5C).



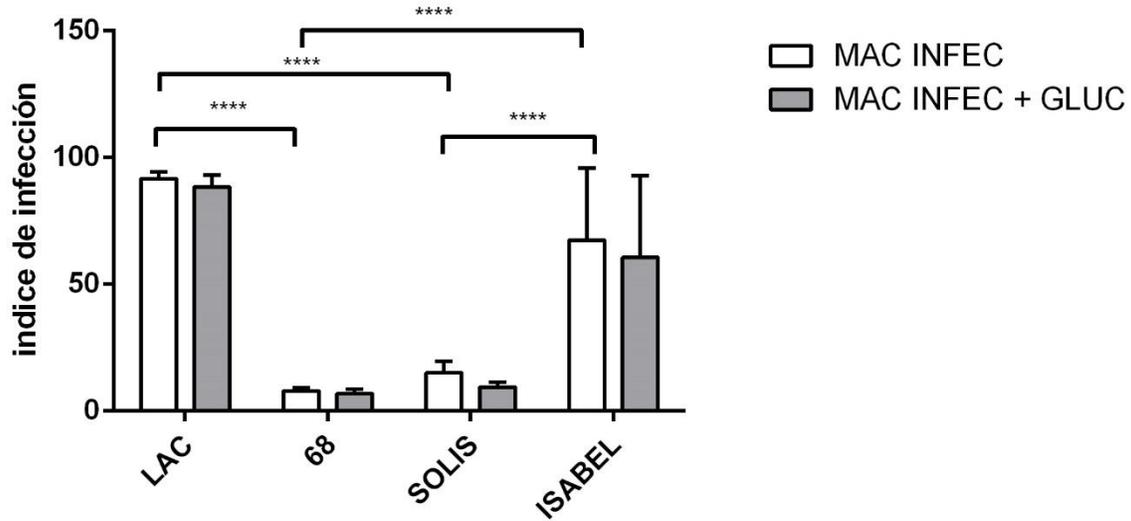
Gráfica 5. Análisis del porcentaje de parásitos de 4 aislados de *L. mexicana* que expresaron fosfatidilserina, LPG y GP63 al momento de la infección *in vivo* e *in vitro*. A) El aislado “68” (LCL) presentó el mayor número de parásitos expresando PS, con una diferencia de 10% con respecto a los demás. B) En el caso de LPG, únicamente el 22% del aislado “Isabel” (LCD) expresó LPG, mientras que los otros tres aislados alcanzaron el 80% de parásitos expresando LPG. C) Para GP63 se observó que los aislados de pacientes con LCL presentaron un mayor porcentaje de parásitos expresando esta molécula. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

6.6 Análisis de la infección *in vitro* a macrófagos murinos de médula ósea con los 4 aislados de *Leishmania mexicana*.

Para determinar el índice de infección de cada uno de los aislados de *L. mexicana* utilizados para este estudio, se infectaron macrófagos murinos derivados de médula ósea extraídos de ratones machos BALB/c de 12 semanas de edad. Se incluyó una condición a la cual se adicionó el medicamento Glucantime para analizar si alguno de los aislados presentaba resistencia al tratamiento.

Se observó que no hubo diferencias significativas en el índice de infección utilizando el medicamento Glucantime en los 4 aislados (Gráfica 6).

En el caso de los aislados de pacientes con LCL se encontró que “Lacandona” tiene un índice de infección mayor (83.75%) al del aislado “68” ($P < 0.0001$). Para los aislados de pacientes con LCD se observó que “Isabel” tiene un índice de infección mayor (52.25%) que “Solis” ($P < 0.0001$) (Gráfica 6). Los aislados “Lacandona” (LCL) e “Isabel” (LCD) fueron los que tuvieron un mayor índice de infección con un 91.5% y 67.5% respectivamente, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellos (Gráfica 6). Llama la atención que los aislados más recientes “Lacandona” e “Isabel” presentaron mayores índices de infección que los parásitos que llevan muchos años de cultivo en el laboratorio.

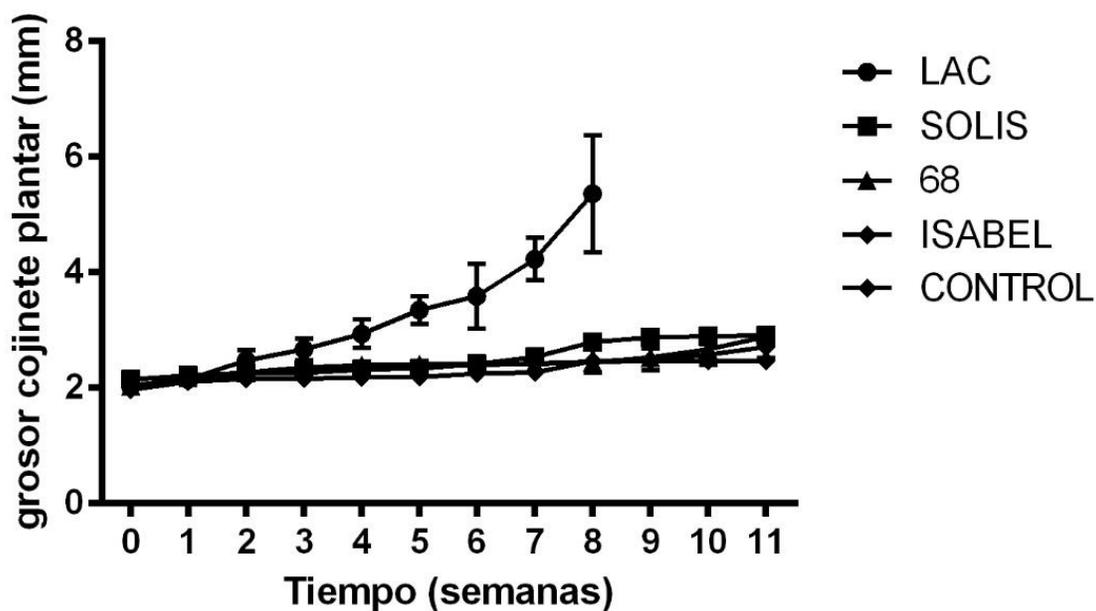


Gráfica 6. Análisis de infección *in-vitro* de macrófagos murinos derivados de médula ósea con 4 aislados de *L. mexicana*. El Glucantime no tuvo ningún efecto en el índice de infección de los aislados de *L. mexicana*. “Lacandona” (LCL) presentó un índice de infección significativamente mayor que “68” (LCL) y “Solis” (LCD) en un 83.75% y 76.5% respectivamente ($P < 0.0001$). Entre “Isabel” (LCD) y “Solis” (LCD) se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$). Las barras representan el promedio de 4 experimentos independientes \pm desviación estándar. MAC INFEC=macrófagos infectados; GLUC= glucantime.

6.7 Análisis de la progresión de la infección en cojinete plantar en ratones BALB/c con 4 aislados de *Leishmania mexicana*.

Para poder evaluar la progresión de la enfermedad de los 4 aislados de *L. mexicana* se infectaron ratones BALB/c machos de 4 semanas en el cojinete plantar, usando la inoculación de PBS como control negativo y se evaluó la evolución de la infección durante 11 semanas.

Cuando se evaluó la progresión de la enfermedad en los ratones infectados con el aislado “Lacandona” (LCL) se pudo observar que a partir de la semana cuatro presentaba un incremento significativo con respecto al control, ya que fue aumentando progresivamente, mientras que los otros 3 aislados únicamente presentaron un ligero aumento en el grosor de la pata. En la semana ocho se sacrificaron los ratones infectados con el aislado “Lacandona” para evitar el sufrimiento de los animales (Gráfica 7).

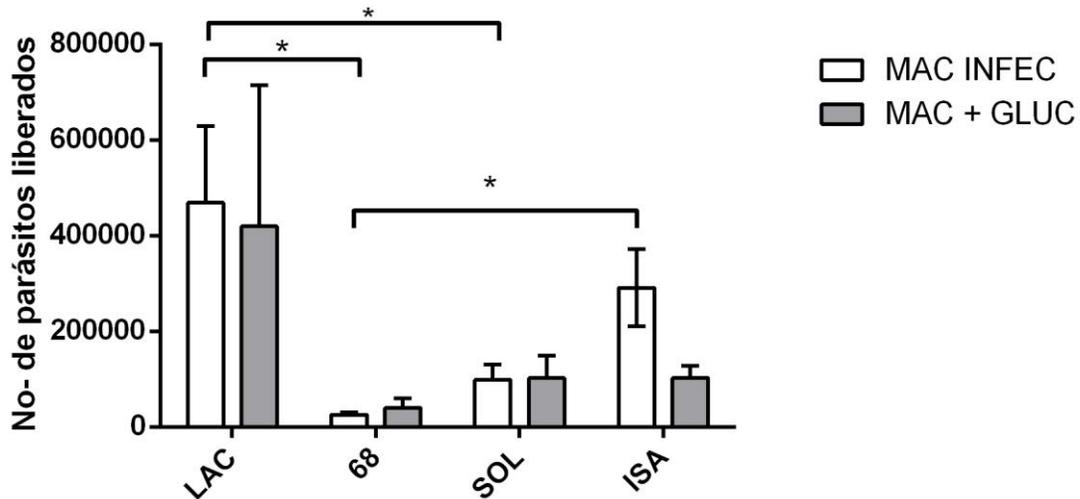


Gráfica 7. Análisis de la progresión de la enfermedad en ratones Balb/c infectados con 4 aislados de *L. mexicana*. El aislado que presentó la mayor inflamación del cojinete plantar fue “Lacandona” con una diferencia significativa de 2.89 mm con respecto al control (no infectado) en la semana 8. En los otros 3 aislados la progresión de la enfermedad fue mínima. Cada punto representa el promedio de 3 mediciones independientes \pm su desviación estándar.

6.8 Análisis de la sobrevida de 4 aislados de *L. mexicana* en macrófagos murinos de médula ósea.

Para poder determinar si la capacidad de sobrevida de parásitos de los distintos aislados en el macrófago se correlacionaba con la severidad del cuadro clínico de los aislados de *Leishmania*, se evaluó la liberación de parásitos posterior a la infección de macrófagos murinos de médula ósea. Se incluyó una condición con Glucantime para evaluar su efecto en la sobrevida de los aislados.

Se encontró que el medicamento Glucantime inhibió significativamente la sobrevida del aislado “Isabel”, reduciéndola un 50% (Gráfica 8). En el caso de los aislados de pacientes con LCL, “Lacandona” presentó una liberación de 468,000 parásitos por mililitro, mientras que del aislado “68” se liberaron solo 25,000 parásitos ($P < 0.0001$) (Gráfica 8). Los aislados de pacientes con LCD, “Isabel” presentó una liberación de 291,000 parásitos por mililitro, mientras que del aislado “Solis” únicamente se liberaron 98,150 parásitos por mililitro ($P < 0.0001$) (Gráfica 8).



Gráfica 8. Ensayo de sobrevivencia de 4 aislados de *Leishmania* en macrófagos murinos de médula ósea. El medicamento Glucantime (15 µg) redujo en un 50% la sobrevivencia del aislado Isabel, mientras que en los otros aislados no se observó efecto. “Lacandona” fue el aislado con la liberación más alta, siendo la diferencia con “68” altamente significativa (468,000 parásitos), la diferencia con “Solis” (255,670 parásitos) también fue significativa. Mientras que con el aislado “Isabel” (95,187 parásitos), la diferencia no fue significativa. Cada barra representa el promedio de 3 mediciones independientes ± su desviación estándar.

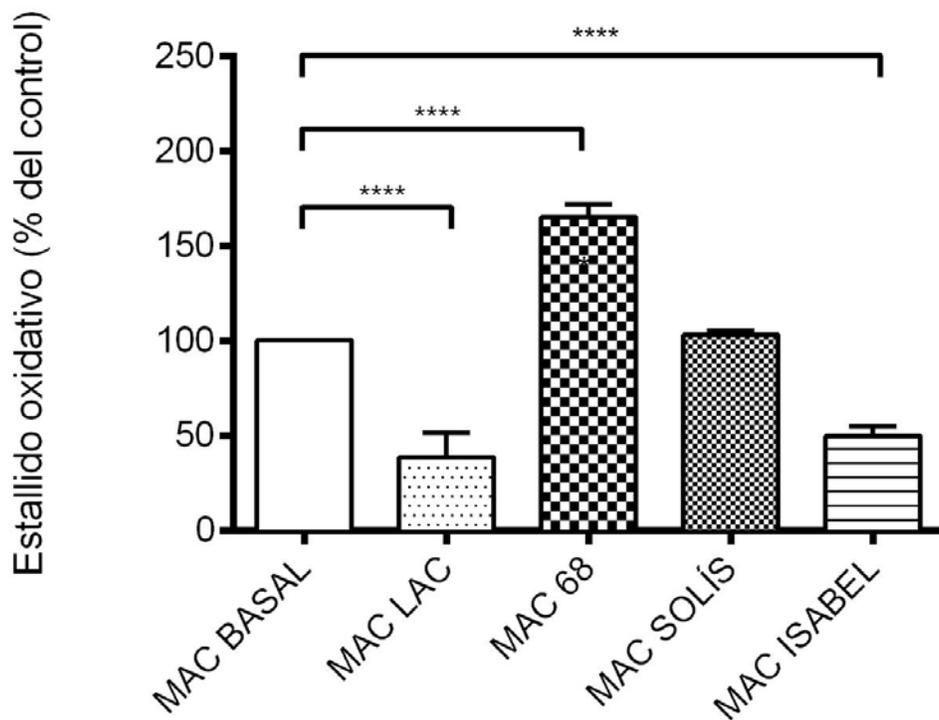
6.9. Análisis del efecto que ejercen los 4 aislados de *Leishmania mexicana* sobre el estallido oxidativo de macrófagos de ratones BALB/c

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

Se encontró que el aislado “Lacandona” (LCL) inhibió el estallido oxidativo de los macrófagos en un 60% con respecto a los macrófagos en condiciones basales (sin parásitos) ($P < 0.0001$). El aislado “68” (LCL) incrementó el estallido en un 65% ($P <$

0.0001) con respecto al basal. Para el caso de los aislados de pacientes con LCD, se observó que el aislado “Solís” no modificó el estallido oxidativo, mientras que el aislado “Isabel” inhibió el estallido oxidativo un 50% ($P < 0.0001$) (Gráfica 9).

La diferencia en la modulación del estallido oxidativo entre los aislados de pacientes con LCL “Lacandona” y “68” fue de 126% ($P < 0.0001$) (Gráfica 9)



Gráfica 9. Análisis del efecto de los diferentes aislados de *L. mexicana* sobre el estallido oxidativo en macrófagos murinos de médula ósea. Los resultados se normalizaron para una mejor evaluación del porcentaje de variación entre las condiciones. El aislado “Lacandona” inhibió significativamente el estallido oxidativo un 60%, mientras que para el aislado “68” incrementó el estallido un 65%. El aislado “Solís” no modificó el estallido, mientras que el aislado “Isabel” disminuyó significativamente el estallido oxidativo en un 50% con respecto al control. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos independientes \pm la desviación estándar. MAC= macrófago.

6.10 Análisis de la producción de citocinas IL-10 e IL-12 por macrófagos infectados por los 4 aislados de *L. mexicana*.

Para determinar si los diferentes aislados de *L. mexicana* tenían diferente capacidad de modular la producción de citocinas por el macrófago, se infectaron macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y se analizó la producción de las citocinas IL-10 (Th2) e IL-12 (Th1). Como control negativo se utilizaron macrófagos basales (sin estímulo) y como control positivo se utilizaron macrófagos estimulados con LPS.

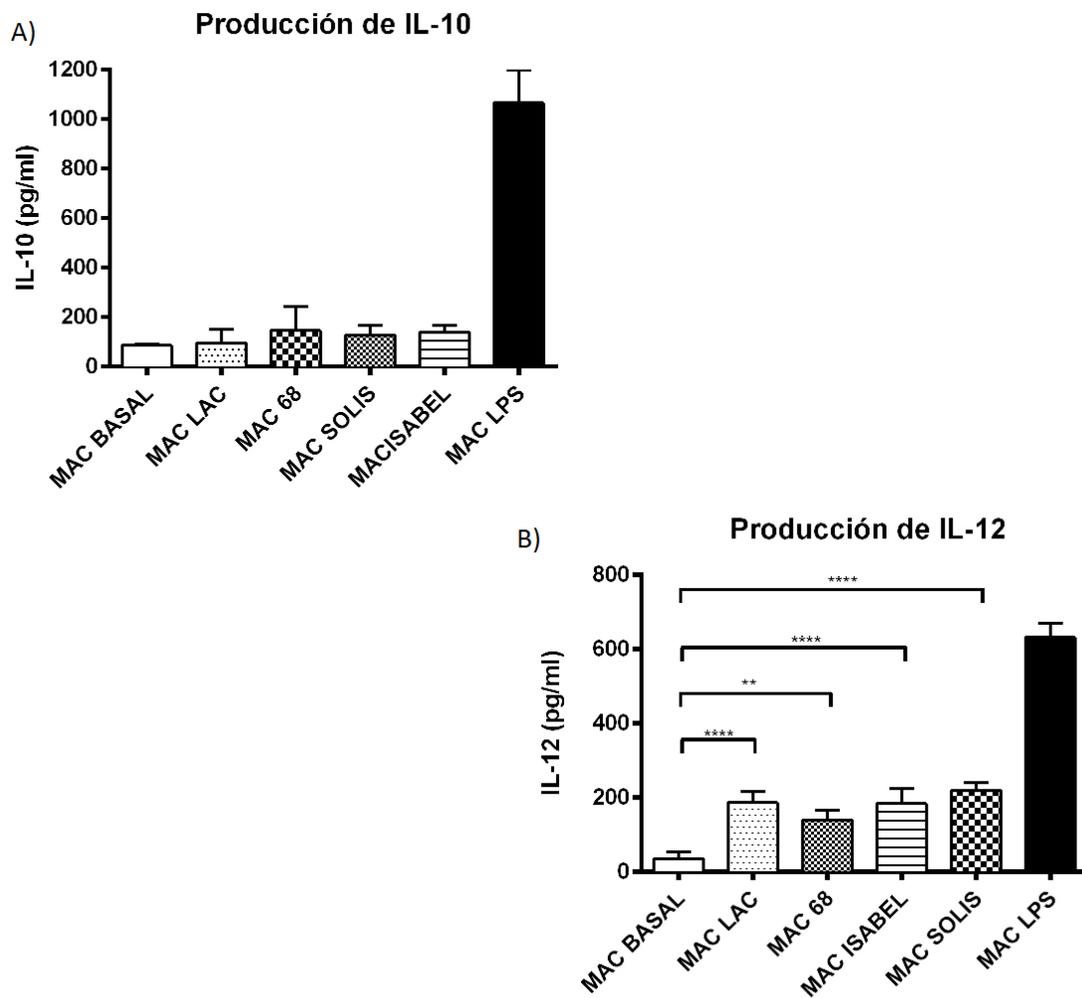
Producción de IL-10:

Los macrófagos infectados con los cuatro aislados de *L. mexicana* no presentaron diferencias significativas en la producción de IL-10, con respecto al control negativo. La producción de IL-10 en el control con LPS fue significativamente mayor que en todos los aislados de *Leishmania* ($P < 0.0001$). Únicamente macrófagos incubados con el aislado “68” incrementaron ligeramente la producción de IL-10 (42.79 pg/ml) (Gráfica 10A)

Producción de IL-12:

Los aislados de pacientes con LCL “Lacandona” y “68” presentaron un incremento de 150.67 pg/ml y 104.49 pg/ml, respectivamente, en relación al basal ($P < 0.0001$). Mientras que en el caso de los aislados de pacientes con LCD “Solis” e “Isabel” presentaron un incremento mayor de IL-12 (183.54 pg/ml y 147.69 pg/ml, respectivamente) en relación al basal ($P < 0.0001$). Interesantemente cuando se

comparó la producción de IL-12 entre los diferentes aislados de *Leishmania* no se encontraron diferencias (Gráfica 10B).



Gráfica 10. Análisis de la producción de citocinas IL-10 e IL-12 por macrófagos de médula ósea infectados por los 4 aislados de *L. mexicana*. A) No se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-10 en macrófagos infectados con los 4 aislados, con respecto a los macrófagos basales. B) En el caso de la citocina IL-12, todas los aislados presentaron un incremento de al menos 100pg/ml con respecto al basal. No se encontraron diferencias significativas entre los aislados de *L. mexicana*. Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

Leishmania mexicana es el agente causal de la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Puede haber variaciones en la severidad del cuadro clínico causadas por la virulencia del parásito o por el estado inmune del paciente [1]. En este trabajo se analizaron cuatro aislados de *L. mexicana*, dos de ellas aisladas de pacientes con LCL (“Lacandona” y “68”) y dos de pacientes con LCD (“Solis” e “Isabel”), para determinar si el número de parásitos que expresan las distintas moléculas de virulencia varían entre los aislados y si estas variaciones ejercen un efecto inmunomodulador sobre el macrófago.

La metaciclologénesis es un proceso de maduración de los promastigotes de *Leishmania* en el tracto digestivo del vector y cuya finalidad es transformar los promastigotes en formas infectivas y capaces de sobrevivir dentro del hospedero mamífero, evadiendo su sistema inmune. La metaciclologénesis también ocurre en los cultivos *in vitro* y en algunas especies se asocia con la fase estacionaria del cultivo.

En un cultivo *in vitro*, *Leishmania* presenta dos fases de crecimiento: la primera es la fase logarítmica durante la cual hay replicación importante del parásito y la fase estacionaria, donde el número de parásitos permanece constante y generalmente ocurre la metaciclologénesis [60]. Al evaluar las curvas de crecimiento de los aislados, se encontró que presentan patrones de crecimiento distintos. Los aislados “Solis”, “68” e “Isabel” presentaron una rápida fase de crecimiento, seguida de una abrupta disminución en el número de parásitos en el cultivo. Esto fue muy distinto a lo observado en el aislado “Lacandona” (Gráfica 1). Esta observación está de acuerdo con

la literatura, donde Valencia-Pacheco y cols. encontraron variaciones en las fases de crecimiento de tres diferentes cepas de *L. mexicana* [61]. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el pH, metabolitos de desecho y el tiempo que llevan en cultivo *in vitro* las distintas cepas.

El fenómeno de metacicloogénesis se ha relacionado con la expresión de ciertas moléculas de superficie implicadas con la virulencia como fosfatidilserina (PS), lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína de 63 kDa (GP63). Se ha reportado que el número de parásitos que expresan estas moléculas aumentan durante la fase logarítmica del cultivo, cuando los parásitos se diferencian de promastigotes procíclicos (no infectivos) a metacíclicos (infectivos) [60, 62]. En este trabajo se encontró que el número de parásitos que expresaban fosfatidilserina, LPG y GP63 no se correlacionaba con la curva de crecimiento, ya que el mayor número de parásitos que expresaban las moléculas no ocurría en el pico del crecimiento o en fase estacionaria del cultivo. Esto únicamente ocurrió en el aislado “Lacandona” con las moléculas LPG y GP63, aunque no ocurrió con fosfatidilserina (Gráficas 2, 3 y 4). Estos resultados sugieren que la expresión de moléculas de superficie no está determinado por la fase del crecimiento en estos aislados de *L. mexicana*. En el caso de la LPG, una posible explicación pudiera radicar en que el anticuerpo utilizado para medir su expresión por citometria de flujo, únicamente detecte el lípido de anclaje de LPG y no sea capaz de detectar los cambios que ocurren durante la metacicloogénesis, consistentes en el incremento del tamaño y en modificaciones en la composición de los azúcares del dominio terminal de la molécula [62, 63]. En el caso de GP63, se ha documentado que durante la metacicloogénesis aumenta la glicosilación de la molécula, sin necesariamente aumentar

su expresión, lo cual podría ocurriendo en estos aislados de *L. mexicana* [60]. La fosfatidilserina se ha observado en promastigotes apoptóticos, por lo que podría ser un indicador de la salud de los cultivos y no necesariamente estar implicada en la virulencia [46].

Las expresiones de fosfatidilserina, LPG y GP63 han sido asociadas como factores importantes para la infección de hospederos mamíferos. Nuestros resultados revelaron que en el caso del aislado “Lacandona”, la infección con un alto porcentaje de parásitos expresando estas tres moléculas si se correlacionó con un alto índice de infección. Sin embargo, esto no ocurrió con los otros 3 aislados, ya que el aislado “68” fue el menos infectivo y sin embargo no fue el que tuvo el menor número de parásitos expresando estas moléculas (Gráficas 5, 6 y 7). Esto aparentemente indica que el número de parásitos expresando fosfatidilserina, LPG, y GP63 no se relaciona con la infectividad en todos los aislados de *L. mexicana*. Esto concuerda con estudios realizados por Hilley y cols., quienes demostraron en la supresión de 6 de los 7 genes que codifican para GP63 no modifica la infectividad de *L. major* en ratones BALB/c [64]. Así mismo, Zufferey y cols. Reportaron que los fosfolípidos y glicosilinositolfosfolípidos no eran necesarios para la infección con amastigotes de *L. major* [65]. Por otro lado, Thomas Ilg reportó que LPG no se correlacionaba con la capacidad de infección, ya que mutantes de *L. mexicana*, que no expresaban LPG, conservaban su capacidad infectiva en ratones C57BL/6 [66].

El efecto inmunomodulador ejercida por los cuatro aislados de *L. mexicana* sobre macrófagos de médula ósea de ratones BALB/c también mostró diferencias que no

siempre se correlacionaban con el número de parásitos que expresaban las moléculas de virulencia. Encontramos que el aislado “Lacandona” tuvo mayor sobrevivencia dentro del macrófago y también fue la más virulenta generando grandes lesiones en las infecciones de ratones. Por otro lado, el aislado “68” tuvo la menor sobrevivencia en el macrófago y también fue la menos virulenta en el ratón (Gráfica 8). Para su sobrevivencia intracelular *Leishmania* retarda la unión de la vacuola parasitófora con el lisosoma. Este fenómeno fue demostrado en experimentos en los cuales se incubaron macrófagos infectados con un anticuerpo que detecta la proteína LAMP1, un marcador lisosomal. Mediante microscopía confocal se identificó que después de dos horas posteriores a la fagocitosis, esta proteína no se encontraba cerca de la vacuola parasitófora que contenía a los parásitos, cuando ya debería de haberse unido el lisosoma con el fagosoma [67]. Especulamos que los aislados que presentaron mayor sobrevivencia fueron aquellos que lograron inhibir eficazmente la unión fagosoma-lisosoma, aunque esto queda por demostrarse.

Actualmente el método de tratamiento más utilizado para la infección por *L. mexicana* es el antimonio de meglumina (Glucantime), sin embargo, se han reportado efectos adversos en respuesta a este medicamento [68], así como resistencia de ciertas cepas a este. Al evaluar el efecto de este medicamento sobre nuestros aislados de *L. mexicana*, no se encontraron diferencias en la infección *in-vitro*, ni en la sobrevivencia del parásito con excepción del aislado “Isabel”, que presentó una disminución en su sobrevivencia del 50%. Se esperaba que los aislados con cuadro clínico severo presentaran una mayor resistencia al fármaco, sin embargo esto no ocurrió (Gráficas 7 y 8). Nuestros datos concuerdan con la literatura donde se estudió la sensibilidad de 37 cepas de *Leishmania*

infantum aisladas de pacientes con leishmaniasis visceral, encontrando diferencias significativas en la resistencia al medicamento entre las distintas cepas [69].

Otro de los mecanismos efectores del macrófago para combatir la infección por *Leishmania* es el estallido oxidativo, mediante el cual se generan intermediarios reactivos de oxígeno [70]. Sin embargo, *Leishmania* ha desarrollado mecanismos de evasión ante esta función del macrófago, tal como la inhibición de la proteína cinasa C por LPG [71]. Nuestros resultados ahora muestran que el índice de infección de los aislados se puede correlacionar con el grado de modulación del estallido oxidativo del macrófago infectado, ya sea hacia la activación o la inhibición (Gráficas 6 y 9). En el aislado “Lacandona”, un aislado con alta virulencia en el ratón, se observó que el porcentaje de parásitos expresando LPG era alto, lo cual se correlacionó con la inhibición del estallido oxidativo del macrófago. Interesantemente, el aislado “Isabel” presentó un porcentaje bajo de parásitos expresando LPG, sin embargo fue suficiente para inhibir el estallido oxidativo. Por otro lado, los aislados “68” y “Solis” no mostraron correlación entre el estallido y el porcentaje de parásitos expresando LPG (Gráficas 5b y 9), lo que posiblemente se deba a que estos aislados llevan muchos años de ser cultivados en el laboratorio.

La modulación de los cuatro aislados sobre la liberación de citocinas por el macrófago reveló que ningún aislado indujo la liberación de IL-10 (Gráfica 10A). Esto fue llamativo, ya que IL-10 es una citocina importante para favorecer la sobrevivencia intracelular del parásito [27]. Interesantemente, todos los aislados indujeron el mismo aumento en la producción de IL-12, con respecto al control (Gráfica 10B). Estos resultados muestran

que la infección de los macrófagos de médula ósea con los cuatro aislados lleva a una tendencia hacia una respuesta protectora Th1, lo que está de acuerdo con el bajo grado de infección observado en ratones con los aislados “68” y “Solis”. Sin embargo, este resultado contrasta con la alta infectividad de los aislados “Lacandona” e “Isabel”, lo cual es indicativo que IL-12 por si sola, no garantiza el control de la infección por *L. mexicana*. Nuestros resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se encontró que un aislado de *L. major* obtenido de un paciente cuyas lesiones no sanaban, también generó una importante infección en ratones C57BL/6, a pesar de haber desarrollado una respuesta fuertemente polarizada hacia Th1, que debería de haber protegido al ratón [72].

Este trabajo demuestra que los factores que determinan la virulencia de los 4 aislados de *Leishmania mexicana* son variados y no todos los parásitos expresan estas moléculas en la misma fase de crecimiento y aparentemente tampoco se correlacionan directamente con la virulencia del aislado. Un ejemplo de esto se puede observar en los 2 aislados de pacientes con LCL: “Lacandona” y “68” que comparten un alto porcentaje de parásitos expresando moléculas de superficie asociadas con virulencia y sin embargo presentan grados de infección totalmente opuestos.

En resumen, en el presente trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

- El aislado “Lacandona” (un aislado reciente de un paciente LCL) mostró altos porcentajes de expresión de las moléculas de superficie PS, GP63 y LPG, que se correlacionaron con su alto índice de infección, tanto *in vivo* como *in vitro*, y con

la inhibición del estallido oxidativo del macrófago infectado, resultando en un elevado índice de sobrevivencia del parásito intracelular.

- El aislado “68” (un aislado viejo de un paciente LCL), también expresó altos porcentajes de las moléculas PS, GP63 y LPG, sin embargo su índice de infección tanto *in vitro* como *in vivo* fue muy bajo. No se observó inhibición del estallido oxidativo del macrófago infectado y como consecuencia su índice de sobrevivencia fue muy bajo.
- El aislado “Isabel” (aislado LCD reciente) presentó alta % de parásitos expresando LPG y PS, y pocos expresando GP63. Mostró inhibición del estallido oxidativo del macrófago infectado en un 50% y como consecuencia su índice de sobrevivencia intracelular fue alto. El índice de infección *in vitro* fue muy alta, sin embargo su índice de infección *in vivo* no se encontró diferencia significativa con respecto al control.
- El aislado “Solis” (un aislado viejo de un paciente LCD) mostró alto % de parásitos expresando PS, GP63 y LPG, no mostró inhibición del estallido oxidativo y su índice de infección fue bajo, tanto *in vitro* como *in vivo*. A pesar de no inhibir el estallido oxidativo, su índice de sobrevivencia dentro del macrófago fue bajo.
- Entre más virulenta fue el aislado de *Leishmania mexicana*, mayor era su inhibición del estallido oxidativo y su sobrevivencia dentro del macrófago.
- No se encontraron diferencias en la producción de IL-10 e IL-12 entre los cuatro aislados de *Leishmania mexicana*.

- El Glucantime disminuyó la sobrevivencia *in vitro* del aislado “Isabel”, y no tuvo efecto sobre la capacidad infectiva *in vitro* de los cuatro aislados de *L mexicana*.

	Cuadro clínico localizado	Cuadro clínico difuso
Mucho tiempo en laboratorio	<p><u>Aislado "68"</u></p> <p>Día de mayor crecimiento del cultivo: 4</p> <p>PS: día 3 el más alto en el número de parásitos expresando, 15%</p> <p>LPG: días 2-4 los más altos en el número de parásitos expresando, 89%</p> <p>GP63: días 2-5 los más altos en el número de parásitos expresando, 93%</p> <p>Infección in vitro: 5%</p> <p>Infección in vivo: sin diferencias con respecto al control</p> <p>Sobrevida: baja</p> <p>Modulación del estallido oxidativo: Aumento del 50% con respecto al control.</p>	<p><u>Aislado "Solis"</u></p> <p>Día de mayor crecimiento del cultivo: 4</p> <p>PS: día 3 el más alto en el número de parásitos expresando, 2.8%</p> <p>LPG: días 1-4 el más alto en el número de parásitos expresando, 70%</p> <p>GP63: días 2, 5 y 5 los más altos en el número de parásitos expresando, 68% - 90%</p> <p>Infección in vitro: 70%</p> <p>Infección in vivo: sin diferencias con respecto al control</p> <p>Sobrevida: baja</p> <p>Modulación del estallido oxidativo: Sin diferencia con respecto al control</p>
Recién aislados	<p><u>Aislado "Lacandona"</u></p> <p>Día de mayor crecimiento del cultivo: 5-6</p> <p>PS: día 5 el más alto en el número de parásitos expresando, 5.3%</p> <p>LPG: días 4 y 5 los más altos en el número de parásitos expresando, 85%</p> <p>GP63: días 4-7 los más altos en el número de parásitos expresando, 90%</p> <p>Infección in vitro: 90%</p> <p>Infección in vivo: aumento de 2.89mm con respecto al control</p> <p>Sobrevida: alta</p> <p>Modulación del estallido oxidativo: Disminución del 50% con respecto al control.</p>	<p><u>Aislado "Isabel"</u></p> <p>Día de mayor crecimiento del cultivo: 5</p> <p>PS: días 1 a 4 los más altos en el número de parásitos expresando, 2%</p> <p>LPG: todos los días de su curva presento un numero constante de parásitos expresando, 30%- 40%</p> <p>GP63: días 6-7 los más altos en el número de parásitos expresando, 90%</p> <p>Infección in vitro: 70%</p> <p>Infección in vivo: sin diferencias con respecto al control</p> <p>Sobrevida: alta</p> <p>Modulación del estallido oxidativo: Disminución del 50% con respecto al control.</p>

Tabla 1. Comparación entre los diferentes aislados de *Leishmania*.

8. CONCLUSIONES

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

- 1.- Las moléculas PS, GP63 y LPG no se correlacionan directamente con la virulencia del aislado.
- 2.- El cuadro clínico del paciente del cual se obtuvieron los aislados (LCL vs LCD), no se traduce en menor o mayor virulencia del aislado.
- 3.- La virulencia *in vitro* e *in vivo* del aislado se relaciona con el tiempo que lleva el aislado en cultivos en el laboratorio, siendo que aislados recientes son más virulentos
- 4.- No se encontró una correlación entre la virulencia y la expresión de PS, GP63 o LPG con la metodología utilizada.

9. PERSPECTIVAS

Sería interesante analizar otros factores de virulencia descritos, como las GPIs [73] así como intentar analizar la composición de azúcares y péptidos en las moléculas LPG y GP63, ya que la posible variación en la estructura y composición de estas moléculas se correlaciona con la virulencia de los diferentes aislados.

10. BIBLIOGRAFIA

- [1] Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. Experimental and molecular pathology 2002;72:132-41.
- [2] Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. Advances in parasitology 2007;64:1-109.
- [3] World health organization.
- [4] Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol 2010;10:238-45.
- [5] LS G. Diagnostic Medical Parasitology. Washington DC2006.
- [6] Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania* major and other intracellular microbes? Trends in microbiology 2003;11:210-4.
- [7] Berrueta DTU. LEISHMANIOSIS o LEISHMANIASIS. 2014.
- [8] Chang PC. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. The Journal of parasitology 1956;42:126-36.
- [9] Dedet JP, Pratlong F, Lanotte G, Ravel C. Cutaneous leishmaniasis. The parasite. Clinics in dermatology 1999;17:261-8.
- [10] González González G. RGC, SimónMerchán Morfología de la leishmania trópica en su estado intracelular en la dermis humana. Actas Dermo-Sif 1976;67:527-34.
- [11] Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. Nucleic acids research 1996;24:1688-94.
- [12] L.R KCAOT. Molecular biology. Clinics in dermatology 1996;14:533-40.
- [13] Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. The American journal of tropical medicine and hygiene 1985;34:456-9.
- [14] Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. Parasitology 2000;121 (Pt 1):25-33.
- [15] Killick-Kendrick R, Wilkes TJ, Bailly M, Bailly I, Righton LA. Preliminary field observations on the flight speed of a phlebotomine sandfly. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1986;80:138-42.
- [16] Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clinics in dermatology 1999;17:279-89.
- [17] Lane RP. Medical Insects and Arachnids: Chapman & Hall; 1996.
- [18] Ríos JM SO. INMUNOLOGÍA EN LA INFECCIÓN POR *LEISHMANIA*: CONCEPTOS ACTUALES
- INMUNOLOGY IN *LEISHMANIA* INFECTION: CURRENT CONCEPTS. Revista médico científica 2010;23:19-31.
- [19] Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. The Indian journal of medical research 2004;119:238-58.
- [20] Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. Clinics in dermatology 1999;17:291-6.
- [21] Convit J. Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela. Clinics in dermatology 1996;14:479-87.

- [22] Kamhawi S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2000;2:1765-73.
- [23] Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 1989;143:617-22.
- [24] Chang KP, Akman L, Nielsen JS. *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. *Clinics in dermatology* 1999;17:269-73.
- [25] Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual review of microbiology* 1992;46:65-94.
- [26] Liew FY. The role of nitric oxide in parasitic diseases. *Annals of tropical medicine and parasitology* 1993;87:637-42.
- [27] Kane MM, Mosser DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol* 2001;166:1141-7.
- [28] McSorley S, Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Immunology of murine leishmaniasis. *Clinics in dermatology* 1996;14:451-64.
- [29] Lara ML, Layrisse Z, Scorza JV, Garcia E, Stoikow Z, Granados J, et al. Immunogenetics of human American cutaneous leishmaniasis. Study of HLA haplotypes in 24 families from Venezuela. *Human immunology* 1991;30:129-35.
- [30] Petzl-Erler ML, Belich MP, Queiroz-Telles F. Association of mucosal leishmaniasis with HLA. *Human immunology* 1991;32:254-60.
- [31] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. *J Immunol* 2005;175:5-14.
- [32] Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology* 1989;68:369-72.
- [33] Bourreau E, Prevot G, Pradinaud R, Launois P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. *The Journal of infectious diseases* 2001;183:953-9.
- [34] Nashed BF, Maekawa Y, Takashima M, Zhang T, Ishii K, Dainichi T, et al. Different cytokines are required for induction and maintenance of the Th2 type response in DBA/2 mice resistant to infection with *Leishmania major*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2000;2:1435-43.
- [35] Stefani MM, Muller I, Louis JA. *Leishmania major*-specific CD8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *European journal of immunology* 1994;24:746-52.
- [36] Schonlau F, Scharffetter-Kochanek K, Grabbe S, Pietz B, Sorg C, Sunderkotter C. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. *European journal of immunology* 2000;30:2729-40.
- [37] Jaffe CL. Recent trends in vaccine development and immunization. *Clinics in dermatology* 1999;17:339-44.
- [38] Vargas-Inchaustegui DA TW, Xin L, Hogg AE, Corry DB, Soong L. Distinct roles for MyD88 and Toll-Like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. *Infection and immunity* 2009;77:2948-56
- [39] Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol* 2007;17:115-22.
- [40] Gutiérrez-Kobeh L dOE, Argueta J, Wilkins A, Salaiza N, Fernández E, López O, Aguirre M, Becker Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitol Res* 2013;112:1755-62.

- [41] Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 2007;29:671-8.
- [42] Pirofski LA, Casadevall A. Immunomodulators as an antimicrobial tool. *Current opinion in microbiology* 2006;9:489-95.
- [43] Rodriguez N. Factores de virulencia en *Leishmania* y su relacion con el desarrollo de la leishmaniasis. *Dermatologia Venezolana* 2003;41.
- [44] Franca-Costa J, Wanderley JL, Deolindo P, Zarattini JB, Costa J, Soong L, et al. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PloS one*;7:e36595.
- [45] Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & vectors*;4:44.
- [46] van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:13837-42.
- [47] Franco. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by *Leishmania* Lipophosphoglycan. *Journal of Parasitology Research* 2011;2012:11.
- [48] McConville MJ, Ralton JE. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Institute Mitteilungen* 1997:34-43.
- [49] Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et biophysica acta* 1999;1455:341-52.
- [50] Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. *Cellular microbiology* 2001;3:439-47.
- [51] Descoteaux A, Turco SJ, Sacks DL, Matlashewski G. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *J Immunol* 1991;146:2747-53.
- [52] Frommel TO, Button LL, Fujikura Y, McMaster WR. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology* 1990;38:25-32.
- [53] Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 1995;155:3102-11.
- [54] Chaudhuri G, Chaudhuri M, Pan A, Chang KP. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *The Journal of biological chemistry* 1989;264:7483-9.
- [55] Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, Lu HG, Gilman-Sachs A, Peterson DA, et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infection and immunity* 2000;68:80-6.
- [56] McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and immunity* 2003;71:1008-10.
- [57] Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, Henson PM. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochemical Society transactions* 1998;26:653-6.
- [58] Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 2006;176:1834-9.

- [59] Informe de morbilidad.
- [60] Muskus CE, Marin Villa M. [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. *Biomedica* 2002;22:167-77.
- [61] Guillermo Valencia-Pacheco BMV-K, Ana G. Flores-Serrano, Fernando J. Andrade-Narvaez. Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de *Leishmania (Leishmania) mexicana* a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México. *Rev Biomed* 1998;9:206-13.
- [62] Moody SF. Molecular variation in *Leishmania*. *Acta tropica* 1993;53:185-204.
- [63] Sacks DL, Saraiva EM, Rowton E, Turco SJ, Pimenta PF. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. *Parasitology* 1994;108 Suppl:S55-62.
- [64] Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI):protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Molecular biology of the cell* 2000;11:1183-95.
- [65] Zufferey R, Allen S, Barron T, Sullivan DR, Denny PW, Almeida IC, et al. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:44708-18.
- [66] Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *The EMBO journal* 2000;19:1953-62.
- [67] Ueno N. Host and parasite determinants of *Leishmania* survival following phagocytosis by macrophages [PHD]. Iowa: University of Iowa; 2011.
- [68] von Stebut E. Cutaneous *Leishmania* infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental dermatology* 2007;16:340-6.
- [69] Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, et al. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997;41:827-30.
- [70] Locksley RM, Klebanoff SJ. Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular protozoa. *Journal of cellular biochemistry* 1983;22:173-85.
- [71] Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol* 1992;149:3008-15.
- [72] Rodriguez-Sosa M, Monteforte GM, Satoskar AR. Susceptibility to *Leishmania mexicana* infection is due to the inability to produce IL-12 rather than lack of IL-12 responsiveness. *Immunol Cell Biol* 2001;79:320-2.
- [73] Ilgoutz SC, Zawadzki JL, Ralton JE, McConville MJ. Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. *The EMBO journal* 1999;18:2746-55.