



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO DE LOS AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana* EN
LA FAGOCITOSIS Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN
CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ILSE RIVERA FERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
2016**

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
Ilse
Rivera
Fernández
5512340735
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307110024
2. Datos del tutor
Dra.
Laila
Gutiérrez
Kobeh
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Paz María Silvia
Salazar
Schettino
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez
5. Datos del sinodal 3
Dra.
María Eugenia
Gonsebatt
Bonaparte
6. Datos del sinodal 4
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana*
en la fagocitosis y producción de citocinas en células dendríticas murinas
69 p
2016

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh, por dirigir esta tesis, por sus valiosos consejos, paciencia, apoyo y confianza hacia conmigo.

A mis sinodales: Dra. Paz María Salazar, Dr. Andrés Castell, Dra. María Eugenia Gonsebatt y Dra. Laura Kawasaki. Agradezco sus valiosas aportaciones y tiempo para mejorar este trabajo.

Al biólogo Arturo Wilkins, por su ayuda durante el tiempo que duró este proyecto, por los conocimientos compartidos y el tiempo invertido.

Al M. en C. Jesús Argueta, por su apoyo en los ensayos de citometría y observaciones a este trabajo.

A la M. en C. Adriana Ruíz Remigio por su apoyo para que yo aprendiera a realizar los ELISA.

Al técnico Marco Gudiño, por su apoyo en la toma de las imágenes de microscopia.

A mis compañeros del laboratorio por sus consejos, anécdotas, apoyo y amistad. Alma, Ana, Fabián, Óscar, Omar y Jorge.

Al personal del bioterio, por mantener en óptimas condiciones a los animales.

A los ratoncitos, que en todo momento fueron respetados y tratados de la mejor manera, sin ellos no se salvarían tantas vidas.

A la UNAM, mi alma mater. A la Facultad de Ciencias. Al Hospital General y la UME.

Al proyecto IN225116 PAPIIT DGAPA, UNAM. Por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS PERSONALES

A mis padres Raúl y Vicky, por su amor y apoyo infinito en cada etapa de mi vida, porque a pesar de mis errores ustedes siempre están para mí incondicionalmente. Nunca tendré suficientes palabras y acciones para demostrarles lo mucho que los amo y admiro. Gracias por su ejemplo, su fortaleza en cada reto que nos ha puesto la vida, por mantener un hogar unido y lleno de amor. Los amo.

A mis amadas hermanas Abi y Yoce, sin ustedes la vida no sería igual, las amo con todo mi corazón, gracias por llenar mi vida, ser mis mejores amigas, por esos días de risas a veces de llanto, por las miles de anécdotas vividas y compartidas, y ser mis motores para seguir adelante.

A Ofe y David por ser mis segundos padres, por cuidarme siempre, por sus consejos, por consentirme, también por regañarme y darme un chanzazo cuando fue necesario. Los amo.

A Guille y Miguel. Por estar al pendiente de nosotros y por su cariño. Gracias por las muchas reuniones familiares llenas de alegría.

A Jesús por su mucho cariño, apoyo y paciencia. Por las largas caminatas y las pláticas de todo lo que se nos ocurra.

A Ciri, que nunca leerá esto, pero le agradezco su cariño perruno, compañía desde que llegó a mi vida y sus largas esperas mientras escribí esta tesis.

A mis mejores amigos: Ara, Diana, Nancy, N. Aridahí, Martín, Sergio y Adolfo, los quiero mucho.

A mis profesores y amigos, que he admirado y de quienes he aprendido a lo largo de mi vida y carrera.

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”

Gregorio Marañón

CONTENIENIDO

ABREVIATURAS	7
I. INTRODUCCIÓN	9
I.1. LEISHMANIASIS	9
I.1.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y CUADROS CLÍNICOS	9
I.1.1.1. LEISHMANIASIS CUTÁNEA (LC)	11
I.1.1.1.1. LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA (LCL)	12
I.1.1.1.2. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA (LCD)	13
I.1.1.2. LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA (LMC)	13
I.1.1.3. LEISHMANIASIS VISCERAL (LV)	14
I.1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA LEISHMANIASIS EN MÉXICO	15
I.2. EL PARÁSITO <i>LEISHMANIA</i>	16
I.2.1. TAXONOMÍA	16
I.2.2. CICLO DE VIDA	18
I.2.3. ESTADIOS MORFOLÓGICOS	20
I.2.3.1. EL AMASTIGOTE	20
I.2.3.2. EL PROMASTIGOTE	20
I.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS (CD)	21
I.3.1. FUNCIONES DE LAS CD	22
I.3.2. MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	23
I.3.3. TIPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	24
I.3.3.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES (CDP)	24
I.3.3.2. CÉLULAS DENDRÍTICAS CLÁSICAS O CONVENCIONALES (CDC)	25
I.3.3.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS MIGRATORIAS	25
I.3.3.4. CÉLULAS DENDRÍTICAS RESIDENTES DE TEJIDO	26
I.3.3.5. CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS	27
I.3.4. PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INFECCIÓN POR EL PARÁSITO <i>LEISHMANIA</i>	27
I.3.4.1. MOLÉCULAS DEL PARÁSITO QUE PARTICIPAN EN LA INTERACCIÓN CON LA CÉLULA HOSPEDERA	27
I.3.4.2. MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DURANTE LA INFECCIÓN POR <i>LEISHMANIA</i>	27
I.3.4.2.1. FAGOCITOSIS	29
I.3.4.2.2. PAPEL DE LAS CITOCINAS EN LA INFECCIÓN CON <i>LEISHMANIA</i>	31
II. JUSTIFICACIÓN	33
III. HIPÓTESIS	34
IV. OBJETIVOS	34
IV.1. GENERAL	34
IV.2. PARTICULARES	34
V. MATERIAL Y MÉTODOS	35

V.1. MODELO DE INVESTIGACIÓN	35
V.2. AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i>	35
V.3. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS PRECURSORAS PRESENTES EN LA MÉDULA ÓSEA DE RATÓN	35
V.4. DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA A BMDC	36
V.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS BMDC.....	37
V.6. ESTIMULACIÓN E INFECCIÓN DE LAS BMDC CON AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> DE DOS CEPAS	37
V.7. DETERMINACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> DE LAS DOS CEPAS POR LAS BMDC	38
V.7.1. MARCAJE DE LOS PARÁSITOS CON ESTER SUCCINIMIDIL DIACETATO DE CARBOXIFLUORESCÉINA (CFDA-SE) ..	38
V.7.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCALASINA-D PARA LOS ENSAYOS DE FAGOCITOSIS.....	38
V.7.3. CUANTIFICACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> POR LAS BMDC MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	39
V.7.4. ANÁLISIS DE LA FAGOCITOSIS MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	39
V.7.5. ANÁLISIS DE LA FAGOCITOSIS DE LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> POR LAS BMDC MEDIANTE TINCIÓN CON GIEMSA.....	40
V.8. CUANTIFICACIÓN DE LAS CITOCINAS IL-12 P40, IL-12 P70, IL-10 Y TNF- α MEDIANTE ELISA TIPO SANDWICH	41
<u>VI. RESULTADOS</u>	42
VI.1. CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS BMDC	42
VI.2. DETERMINACIÓN DE LA FAGOCITOSIS DE LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> POR LAS BMDC	44
VI.2.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CITOCALASINA-D PARA LOS ENSAYOS DE FAGOCITOSIS	44
VI.3 COMPARACIÓN DE LA FAGOCITOSIS POR LAS BMDC DE LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> DE LA CEPA LAC Y DIACT MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO, MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	46
VI.3.1 CITOMETRÍA DE FLUJO	47
VI.3.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA ÓPTICA	51
VI.4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR LAS BMDC INFECTADAS CON LOS AMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> DE LAS CEPAS LAC Y DIACT	55
<u>VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</u>	58
<u>VIII .REFERENCIAS.....</u>	64

ABREVIATURAS

BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CD	Células dendríticas
CDp	Células dendríticas plasmacitoides
CDc	Células dendríticas convencionales o clásicas
CDm	Células dendríticas migratorias
CFDA-SE	Ester succinimidildiacetato de carboxifluoresceína
CRs	Receptores de complemento
CD80	Molécula coestimuladora de células T
CD86	Molécula coestimuladora de células T
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FcγR	Receptor de inmunoglobulina-G
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IL-10	Interleucina 10
IL-12 p40	Subunidad p40 de la interleucina 12
IL-12 p70	Interleucina 12
IFN-γ	Interferón gamma
LC	Leishmaniasis cutánea
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada

LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
PBS	Buffer de fosfatos salino
PRRs	Receptores de patrones moleculares asociados a patógenos
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral tipo alfa
NLs	Nódulos linfáticos

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades parasitarias causadas por un protozoario del género *Leishmania*; este parásito es transmitido mediante la picadura de moscos hembras infectados (WHO, 2016) tales como *Phlebotomus spp.* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia spp.* en el Nuevo Mundo. Esta parasitosis afecta a las poblaciones más pobres del planeta y está asociada a la malnutrición, la debilidad del sistema inmune, los desplazamientos de la población, las malas condiciones de vivienda, y la falta de recursos. La leishmaniasis también está vinculada a los cambios ambientales, tales como la deforestación, la construcción de presas, los sistemas de riego y la urbanización (Kumar A., 2013). De acuerdo con la OMS se estima que cada año se producen 1.3 millones de nuevos casos y entre 20,000 y 30,000 defunciones (WHO, 2016; Bailey M.S. *et al.* 2007). Se ha estimado que aproximadamente 350 millones de personas a nivel mundial están en riesgo de ser infectadas y alrededor de 12 millones de personas se encuentran infectadas. De acuerdo con esta característica, la leishmaniasis ocupa el segundo lugar entre las enfermedades causadas por parásitos después de la malaria (Kaye P. y Scott P., 2011).

I.1.1. Distribución geográfica y cuadros clínicos

El grupo de enfermedades denominado leishmaniasis presenta diferentes e importantes formas clínicas que van desde lesiones ulcerativas en la piel, nódulos diseminados no ulcerativos, inflamaciones que destruyen el tejido mucoso o infección visceral. En todos los cuadros clínicos se encuentran tres principales características: La duplicación intracelular del parásito, la respuesta inflamatoria del hospedero que regula la expresión y resolución de la enfermedad y la infección persistente en el tejido (Murray H.W., *et al.* 2005). La leishmaniasis es causada por alrededor de 20 especies, subespecies y cepas y, aunado a la respuesta inmune del hospedero, conduce a diferentes presentaciones de la enfermedad o cuadros clínicos que son: leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (Desjeux P., 2004; Razmjou S. *et al.*, 2009). Esta enfermedad es endémica en distintas áreas alrededor del mundo, las cuales incluyen desiertos y zonas de bosques tropicales, en las regiones tropicales y subtropicales de África, América, Asia y en áreas del sur de Europa (Figura 1). Se ha reportado en 88 países, de los cuales 72 son considerados en vías de desarrollo o subdesarrollo (Kumar A., 2013). La LV se encuentra en la mayoría de estos países y se presenta comúnmente en zonas rurales o zonas pobres de África, América y Asia. La LMC se presenta principalmente en América del Sur y América

Central mientras que la mayoría de los casos de LC ocurre en el Medio Oriente, Brasil , Perú y México en donde se estima que cada año se reportan nuevos pacientes con LC (Ponte-Sucre A., et al. 2013; Cañeda-Guzmán C., et al. 2014).

Tabla 1. Principales especies de *Leishmania* y su distribución geográfica (tomado y modificado de Bates P.A., 2006)

Especies	Forma clínica en humanos	Distribución geográfica	Vector
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	Leishmaniasis cutánea	Norte de África, Sáhel de África, este y centro de Asia	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>P. duboscqi</i> , <i>P. salehi</i>
<i>L. (L.) tropica</i>	Leishmaniasis cutánea	Este y centro de Asia	<i>Phlebotomus sergenti</i>
<i>L. (L.) aethiopica</i>	Leishmaniasis cutánea difusa	Etiopía y Kenia	<i>Phlebotomus longipes</i> , <i>P. pedifer</i>
<i>L.(L.) donovani</i>	Leishmaniasis visceral (kala azar)	India y Este de África	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. martin</i>
<i>L (L.) infantum</i>	Leishmaniasis visceral infantil	Mediterráneo, este y centro de Asia, América central y sur	<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	Leishmaniasis cutánea	América central América del norte	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>
<i>L (L.) chagasi</i>	Leishmaniasis cutánea Leishmaniasis visceral	América del sur América del norte	<i>Lutzomyia longipalpis</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América del sur	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Leishmaniasis mucocutánea	América central y América del sur	<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. Carrerai</i>
<i>L. (V.) peruviana</i>	Leishmaniasis cutánea	Perú	<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lu. Verrucarum</i>
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América del sur	<i>Lutzomyia umbratilis</i>
<i>L. (V.) panamensis</i>	Leishmaniasis cutánea	América central	<i>Lutzomyia trapidoi</i>



Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis marcada en color amarillo (Bates P.A., 2006).

I.1.1.1. Leishmaniasis cutánea (LC)

La leishmaniasis cutánea es endémica en más de 70 países alrededor del mundo, es la forma más común de la enfermedad y se caracteriza por la presencia de úlceras en zonas expuestas del cuerpo. Cerca de un 95% de los casos de LC se producen en América, la Cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central (WHO, 2016). Los ciclos de transmisión se han adaptado a áreas peridomésticas y el parásito se ha dispersado en áreas que previamente no eran endémicas, esto como consecuencia de factores tales como la urbanización, la deforestación y la presencia de animales domésticos que se convierten en reservorios potenciales. Existen diferencias notables entre la LC del Viejo Mundo y la LC del Nuevo Mundo. En el contexto ecológico de los ciclos de transmisión de la enfermedad, la LC del Viejo Mundo ocurre usualmente en áreas semiáridas o en zonas con condiciones desérticas, mientras que en el Nuevo Mundo la LC está comúnmente asociada con zonas de bosques. Los focos de LC tienen una amplia variación ecológica y los vectores tienen la capacidad de sobrevivir en micro hábitats fríos, con sombra y húmedos, por ejemplo en grietas de rocas, madrigueras de animales, en zonas secas, en raíces expuestas de árboles y hojarasca de bosques (Reithinger R., *et al.* 2007).

La LC presenta dos formas clínicas que son la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (Reithinger R., *et al.* 2007).

I.1.1.1.1. Leishmaniasis cutánea localizada (LCL)

La LCL es la forma que más prevalece de la enfermedad y se caracteriza por el desarrollo de una lesión típicamente localizada en el sitio de la picadura del mosquito hembra. Las lesiones comienzan con el desarrollo de un eritema que eventualmente evoluciona hacia una pequeña pápula con una ulceración progresiva en un periodo que va de semanas a meses.

La lesión se caracteriza por una úlcera pero puede variar de una a diez úlceras localizadas en un área expuesta del cuerpo. La úlcera no es dolorosa, es de color rosa y redonda, bien delimitada, con bordes elevados, la base de la úlcera se presenta endurecida y con un fondo limpio en el cual aparece una costra central que puede sangrar en ocasiones. Puede haber una resolución espontánea de la enfermedad dejando un área hipo pigmentada, lisa y con una cicatriz delgada, sin embargo en algunos casos esta puede evolucionar a otras formas de la enfermedad (Goto H. y Lauletta J.A., 2012).

El desarrollo de la lesión y el tiempo de resolución de la infección varían dependiendo de las especies del parásito, así como el estado inmunológico del hospedero. La LCL es causada por *Leishmania major*, *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* en las regiones del Norte y Este de África, Asia Central y Medio Oriente. Por otro lado, *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* son especies que producen LCL en zonas de América Central, América del Sur, Estados Unidos y México (Natarajan G. *et al.* 2014; Reithinger R., *et al.* 2007).



Figura 2. Úlcera característica de LCL (Reithinger R. *et al.* 2007).

I.1.1.1.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)

La LCD es una forma clínica menos común que se asocia a una respuesta inmune celular defectuosa al parásito lo que permite una multiplicación descontrolada. Se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares no ulcerativas en la piel, una proliferación exacerbada del parásito, resistencia a la mayoría de los tratamientos terapéuticos y ausencia o reducción de la respuesta inmune celular contra los antígenos del parásito (França-Costa J., *et al.* 2012). Las pápulas o nódulos suelen presentarse en sitios determinados tales como la cara, extremidades o superficies extensas del cuerpo, de manera asimétrica y en números que van de 10 a 300 lesiones (Goto H. y Lauletta J.A., 2012). Las lesiones pueden permanecer en un único lugar por un periodo largo y subsecuentemente diseminarse sobre la superficie corporal (Zerpa O. *et al.* 2007). Algunas especies causantes de LCL tales como *L. aethiopica*, *L. mexicana* y *L. amazonensis* pueden causar bajo ciertas condiciones LCD (Natarajan G. *et al.* 2014; Minodier P. y Parola P. 2006).



Figura 3. Lesiones características de LCD (Goto H. y Lauletta J.A., 2012)

I.1.1.2. Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La LMC, también conocida como espundia, se considera una enfermedad mutilante debido a que causa una destrucción extensiva de las cavidades oro faríngea y nasal (Desjeux P. 2004; Natarajan G. *et al.* 2014). La LMC puede ocurrir de manera simultánea a la LC, usualmente ocurre en un periodo que va de meses a años después de la LC debido a la migración de los parásitos a la mucosa oro faríngea (Goto H. y Lauletta J. A., 2012). Inicialmente esta forma clínica puede aparecer sin síntomas específicos tales como picazón en la nariz, formación de costras y sangrado, lo que dificulta el diagnóstico.



Figura 4. LMC (Kumar A., 2013)

Al examinar las fosas nasales se observa una inflamación y congestión y la ulceración y perforación del septo nasal se producen de manera lenta, lo mismo que la afectación de otras partes de la cara tales como paladar, faringe y laringe (Goto H. y Lauletta J. A., 2012). La destrucción de la mucosa nasofaríngea está asociada con una respuesta inmune exacerbada en donde predomina la presencia de células T CD4⁺ y las infiltraciones en las lesiones tienen cantidades elevadas de células plasmáticas y linfocitos (Farias L.H., *et al.* 2013).

Las especies involucradas en este cuadro clínico pertenecen al subgénero *Viannia* que típicamente se localiza en el Continente Americano y entre ellas se encuentran *L. (V) braziliensis*, *L. (V) amazonensis*, *L. (V) panamensis* y *L. (V) guyanensis* (David C.V. y Craft N., 2009).

I.1.1.3. Leishmaniasis visceral (LV)

Este cuadro clínico también se conoce como kala-azar y es la forma más severa de la enfermedad, siendo mortal si no es tratada. Es endémica de África oriental y el subcontinente indio (WHO, 2016). La LV tiene un periodo de incubación que va de los 2 a los 6 meses y los pacientes presentan síntomas como son fiebre, tos, dolor abdominal, diarrea, epistaxis, esplenomegalia, hepatomegalia, caquexia y



Figura 4. Paciente con LV (Chappuis J. *et al.*, 2007)

pancitopenia. En algunos casos puede existir linfadenopatía, así como hiperpigmentación, lo cual probablemente da el nombre de kala-azar (fiebre negra en idioma hindi). La principales especies causantes de la LV son *L. (L.) donovani*, *L.(L.) infantum* y *L.(L.) chagasi* (Guerin P.J., *et al.* 2002; Chappuis J., *et al.* 2007).

I.1.2. Distribución de la leishmaniasis en México

En México se presentan las cuatro formas clínicas de la leishmaniasis. La LV es endémica en estados tales como Chiapas, Guerrero y Morelos y afecta principalmente individuos entre 1 y 4 años de edad. El primer caso se describió en 1952 en el estado de Guerrero y años más tarde se reportaron casos en Puebla, Oaxaca y Morelos. Posteriormente, se descubrió el foco más importante del país en el estado de Chiapas y adicionalmente han aparecido nuevos casos en la Cuenca del Río Balsas y un nuevo foco en Guerrero (Becker I., *et al.* 2005). Se ha identificado a *L. (L.) chagasi* como el agente causal de la LV en México con el mayor número de casos en Chiapas. La LMC es endémica de Tabasco y Chiapas y la LC se ha reportado como endémica de Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán y recientemente en Sinaloa (Pastor-Santiago, J. A., *et al.* 2012). En el periodo de 2000-2012 se registraron 10,498 casos de los cuales el 64% se registraron en Tabasco y Quintana Roo, con 88 casos de LV, siendo el estado de Chiapas el que acumula el 92% de casos. Los estados de Campeche, Chiapas, Veracruz, Oaxaca reportaron 20 casos de LMC y Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo y Tamaulipas registraron 23 casos de LCD en este mismo periodo (CENAPRECE, 2013). La LCL y LCDA en México son causadas por *L. (L.) mexicana*, especie que presenta diferencias importantes en el progreso de la enfermedad, ya que a diferencia de otras especies, *L. (L.) mexicana* cuando causa LCD se presentan lesiones en genitales, palmas de las manos, plantas de los pies e invade mucosas oro faríngeas y nasales (Becker I., *et al.* 2005).



Figura 5. Distribución de la leishmaniasis en México en el periodo de 2000-2012. (CENAPRECE, 2013)

I.2. El parásito *Leishmania*

I.2.1 Taxonomía

El género *Leishmania* spp. pertenece al reino Protista, filo Kinetoplastida, clase Kinetoplastea, subclase Metakinetoplastina, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae (Akhoundi M., et al. 2016). La primera descripción de este género se realizó en 1903 y el número de especies ha variado desde ese año. Las diferentes especies que presenta el género *Leishmania* no pueden distinguirse por criterios morfológicos. Debido a esto, las diferentes especies se han clasificado empleando otros criterios tales como el cuadro clínico que desencadenan, la biología, distribución geográfica y datos inmunológicos y bioquímicos (Fraga, J., et al. 2010). El esquema de la jerarquía taxonómica se ha propuesto usando las categorías de especie, subespecies y subgéneros (Schönian G. et al. 2010) y se han utilizado diversas clasificaciones para este género. Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación (Figura 6), basada en datos moleculares, distribución geográfica, manifestaciones clínicas y desarrollo en el vector, que divide al género *Leishmania* en dos grandes linajes filogenéticos referidos como *Euleishmania* y *Paraleishmania* (Akhoundi M., et al. 2016). *Euleishmania* comprende 4 subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y el complejo *L. enriettii*. *Paraleishmania* incluye a las especies *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* y *L. colombiensis* (patógena en humanos), así como al antiguo género *Endotrypanum* (Akhoundi M., et al. 2016).

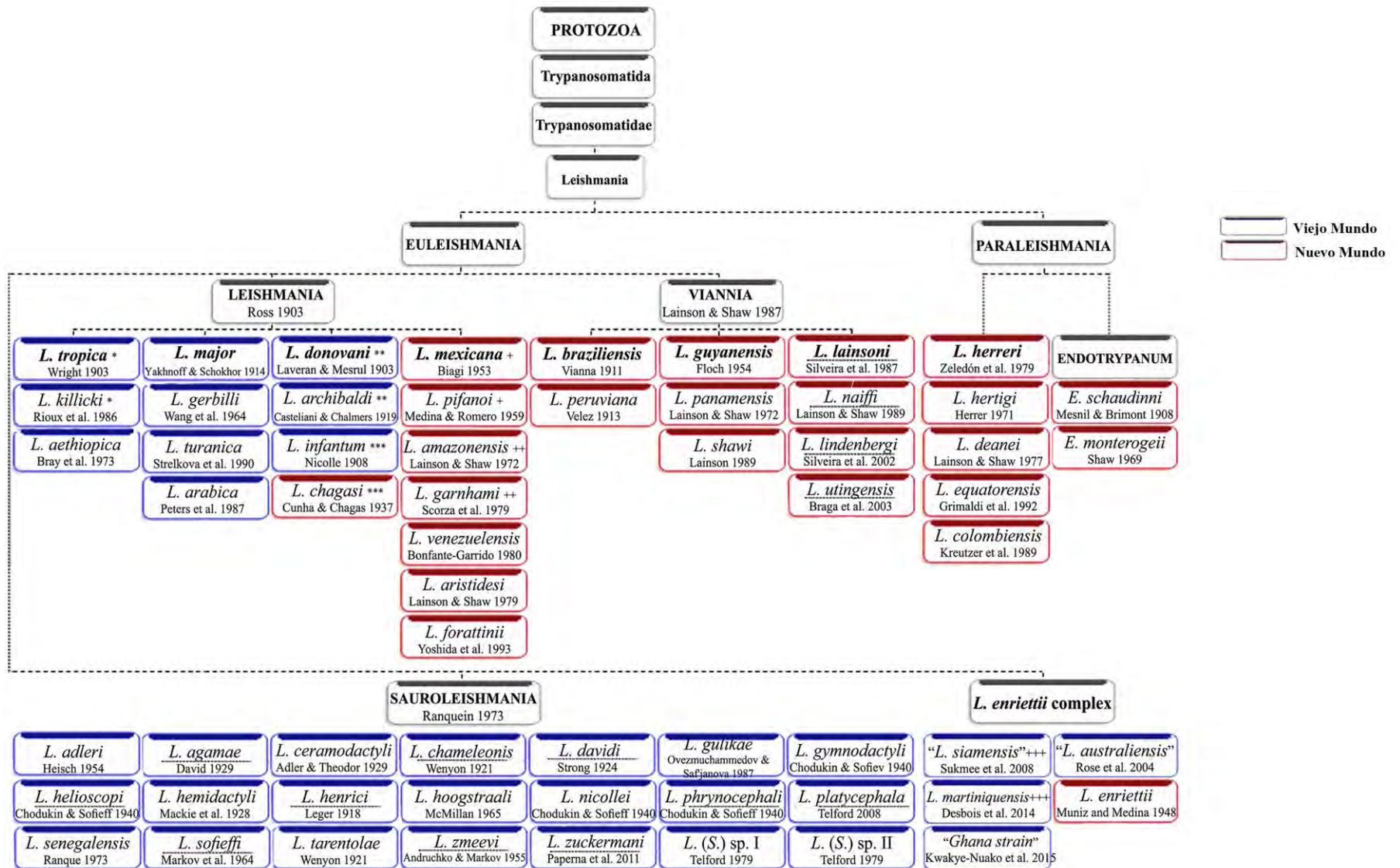


Figura 6. Clasificación del género *Leishmania* (Akhoundi M., et al. 2016).

I.2.2. Ciclo de vida

El parásito *Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético, es decir, alterna entre dos ambientes extremos a los cuales el parásito debe estar adaptado; estos ambientes son proporcionados por el hospedero mamífero y el vector. Ambos ambientes tienen características específicas que incluyen temperatura, pH, osmolaridad, cantidad y calidad de nutrientes necesarios para la sobrevivencia del parásito (Ponte-Sucre A., *et al.* 2013). Durante el ciclo de vida, en el vector se localiza en el tracto digestivo donde se desarrollan los promastigotes procíclicos que se diferencian a los promastigotes metacíclicos que no se dividen, son la fase infectiva y se localizan en la válvula estomodeal donde son regurgitados durante la alimentación a base de sangre. Al ingresar al hospedero mamífero, en donde en una infección en condiciones naturales generalmente son inyectados de 10-1000 promastigotes metacíclicos (Prina E., *et al.* 2004), éstos son fagocitados por diferentes células tales como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas. En el fagolisosoma de los macrófagos, los parásitos se diferencian y duplican hacia una forma sin flagelo denominada amastigote (Adaui V., *et al.* 2011; Kaye P. y Scott P., 2011). La duplicación excesiva de los amastigotes provoca la lisis de la célula y la subsecuente liberación de los mismos gracias a lo cual pueden infectar otras células. El ciclo se inicia nuevamente cuando una mosca pica a un hospedero infectado y al alimentarse de sangre ingiere amastigotes que se transforman en promastigotes en el intestino medio del vector.

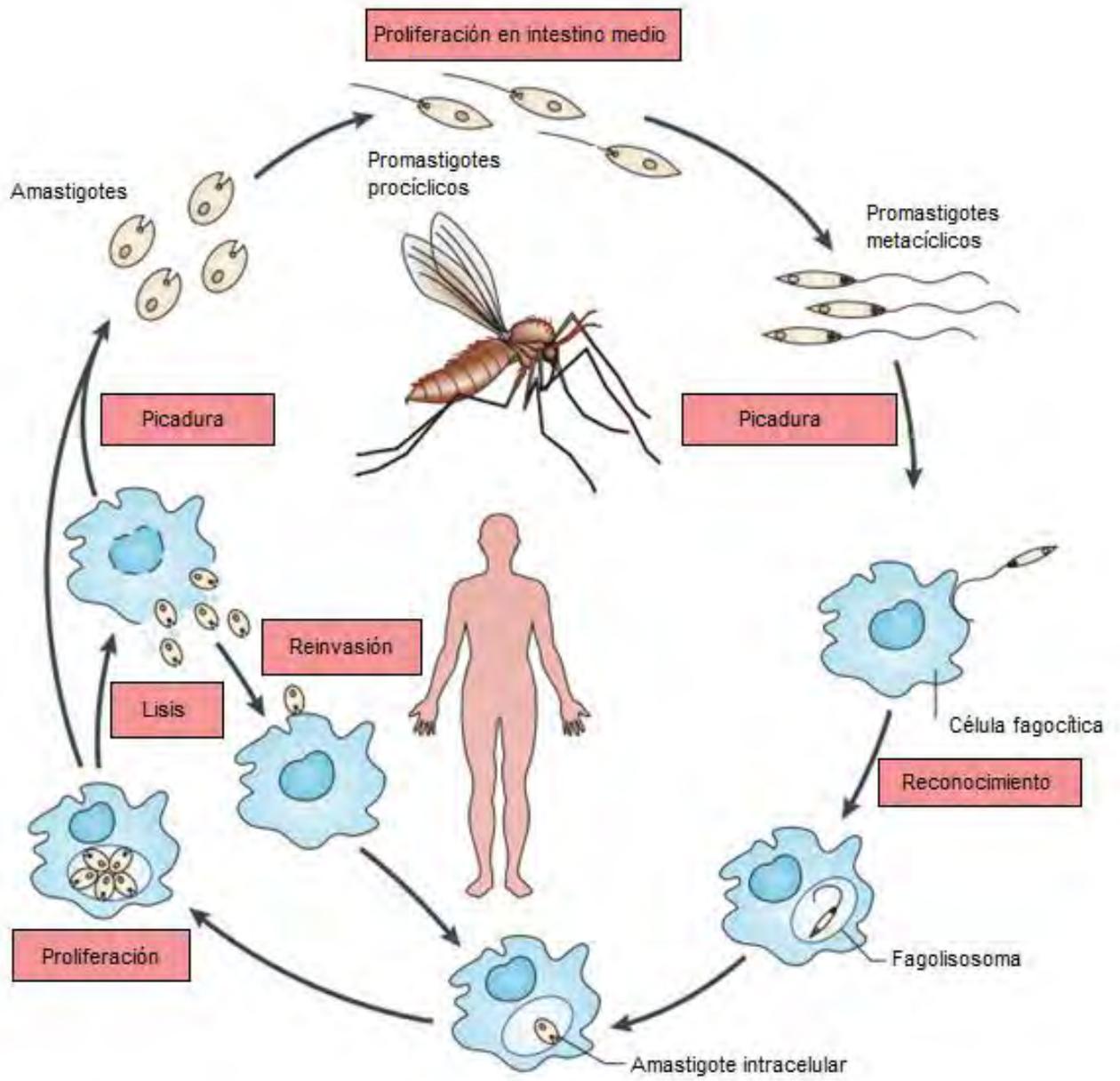


Figura 7. Ciclo de vida digénético de *Leishmania* (Kaye & Scott, 2011)

I.2.3. Estadios morfológicos

I.2.3.1. El amastigote

Los amastigotes se encuentran entre las células eucariontes más pequeñas, son de forma ovoide, miden entre 3-5 μm , poseen un flagelo muy pequeño y no funcional, cuya base se origina en el bolsillo flagelar. El núcleo está localizado centralmente y es adyacente a un cinetoplasto pequeño en el que se localiza aproximadamente el 10% del total del ADN celular, mientras que el resto se encuentra en el núcleo. Esta forma del parásito tiene la capacidad de dividirse y se encuentra dentro de los fagolisosomas de células del sistema fagocítico mononuclear tales como macrófagos y células dendríticas (Laskay T., *et al.* 2003; Bates P.A., 2006).

I.2.3.2. El promastigote

Los promastigotes son la forma extracelular que se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los flebótomos transmisores (género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo). Son alargados, el cuerpo mide alrededor de 5-15 μm , sin contar la longitud del flagelo, cuyo tamaño oscila entre los 15-25 μm . Presentan un núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria, dentro de la cual se encuentra una banda granular que es el cinetoplasto. Éste se localiza a 1- 2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo, el cual es funcional, se proyecta desde el bolsillo flagelar fuera del cuerpo celular y le confiere un movimiento de tracción (Laskay T., *et al.* 2003; Bates P.A., 2006).

Ambos estadios del parásito (promastigotes metacíclicos y amastigotes) pueden ser fagocitados por células dendríticas y macrófagos. Cuando los promastigotes metacíclicos son inoculados, son rápidamente fagocitados principalmente por macrófagos residentes de los tejidos (Prina E., *et al.* 2004). Por otro lado, las células dendríticas fagocitan principalmente amastigotes para la posterior presentación antigénica (Natarajan G., *et al.* 2014).

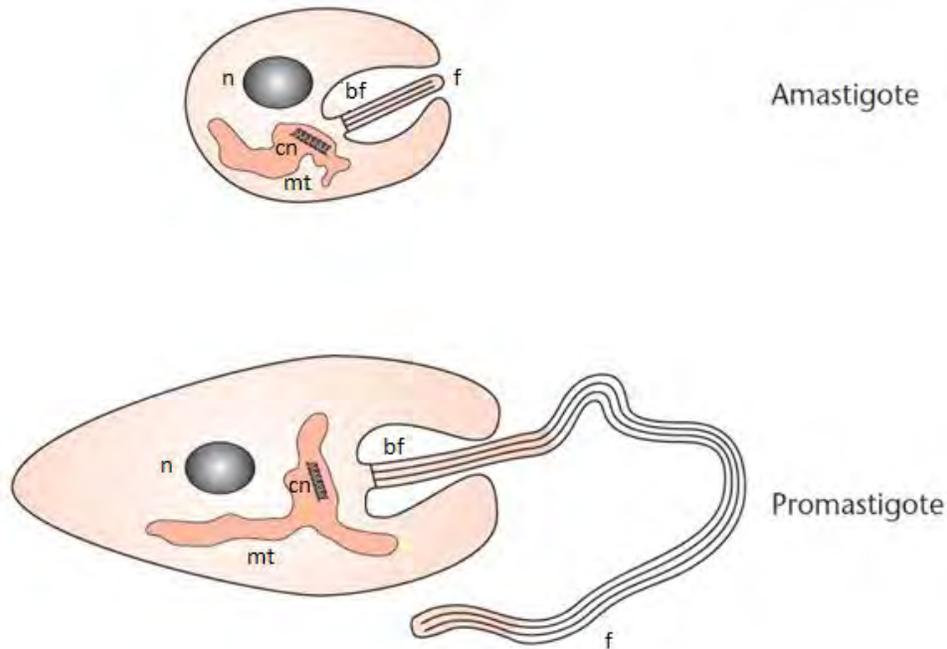


Figura 8. Estadios morfológicos del parásito *Leishmania*. Se muestra el amastigote y el promastigote con las diferentes estructuras que los caracterizan: (n) núcleo, (mt) mitocondria, (cn) cinetoplasto, (bf) bolsillo flagelar y (f) flagelo (Bates P. A., 2006).

I.3 Células dendríticas (CD)

Las células dendríticas (CD) son células hospederas del parásito *Leishmania* y su descubrimiento se remonta al año de 1868, cuando fueron observadas por primera vez en la piel por el histólogo alemán Paul Langerhans. Sin embargo, la función inmunológica de estas células pasó inadvertida y fue hasta el año de 1973 que Ralph Steinman junto con Zanvil Cohn en la Universidad de Rockefeller descubrieron en el bazo de ratón un tipo celular que presentaba proyecciones parecidas a las ramas de un árbol. Se refirió a estas células como células dendríticas, cuyo nombre proviene de la palabra griega *dendron* que significa árbol. Estos estudios postularon a las CD como una población celular minoritaria de los órganos linfoides caracterizada morfológicamente por múltiples prolongaciones en forma de ramas (dendritas) y que era capaz de activar linfocitos T sin experiencia antigénica previa (Pulendran B., 2015).

I.3.1. Funciones de las CD

Las CD son un grupo heterogéneo de leucocitos migratorios derivados de la médula ósea especializados para captar, transportar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T (Shortman K. y Liu Y., 2002). Estas células se encuentran distribuidas en tejidos linfoides y no linfoides, especialmente en los sitios en donde hay una interacción con el ambiente (piel y mucosas), y cuando se someten a un proceso de maduración que involucra cambios morfológicos y fenotípicos migran hacia los nódulos linfáticos. Las CD son capaces de reconocer diferentes patrones microbianos, así como señales de daño, esto debido al arreglo de receptores sobre la superficie, denominados PRRs (receptores de patrones moleculares asociados a patógenos) tales como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores de lectinas tipo C (CLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs) expresados en las CDs. Además, las CDs producen citocinas y quimiocinas que determinan la respuesta inmune a través del reconocimiento y respuesta a diferentes estímulos vía los PRRs (Ashok y Acha-Orbea 2013; Khochenkov D.A., 2008; Pulendran B., 2015). Son las principales células presentadoras de antígeno por lo que juegan un papel muy importante tanto en la estimulación/activación como en la regulación de la intensidad de la respuesta de los linfocitos T y los linfocitos B. En tejidos periféricos las CD realizan funciones de protección sobre el microambiente en el que se encuentran, continuamente internalizan antígenos (propios y externos) lo que dispara la maduración y migración hacia los nódulos linfáticos en donde interactúan con las células efectoras al procesar y presentar antígenos en forma de péptidos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, esto aunado a su capacidad para migrar (Khochenkov B., 2008; Miller J.C., *et al.* 2012). Debido a estas características las CD se consideran un vínculo entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa mediante el reconocimiento de patógenos a través de los PRRs y la integración y presentación de la información derivada de los estímulos patogénicos a las células T para iniciar una respuesta inmune adaptativa. Las CD no funcionan de manera aislada, interactúan con diversos tipos celulares tales como basófilos, eosinófilos, células T y macrófagos (Pulendran B., 2015). Una característica importante de las CD, presente en varios estados de diferenciación, es la movilidad. Las CD migran desde la médula ósea hacia el tejido periférico en donde interactúan con antígenos que disparan la migración hacia los órganos linfoides secundarios (Banchereau J., *et al.* 2008).

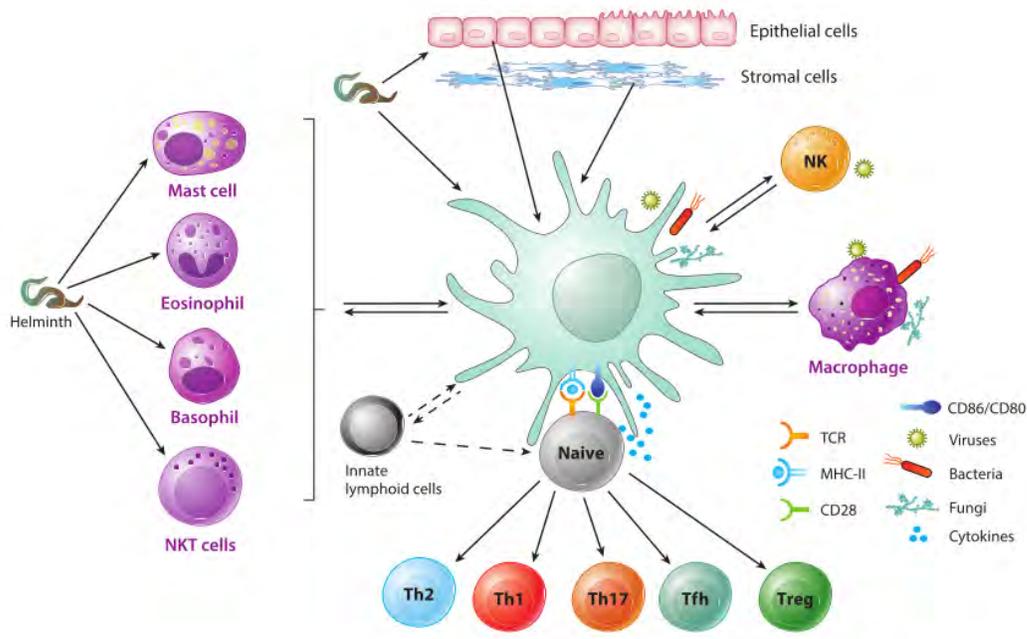


Figura 9. CD como vínculo entre la respuesta inmune innata y adaptativa (Pulendran B., 2015)

I.3.2. Maduración de las células dendríticas

En ausencia de estímulos microbianos o inflamatorios, las CD se encuentran en un estado inmaduro en el cual pueden captar antígenos por endocitosis o fagocitosis y la capacidad de activación de los linfocitos T se encuentra reprimida. La exposición de las CD ante agentes infecciosos provoca varios cambios funcionales y de expresión génica, los cuales en forma coordinada disminuyen la capacidad de captación de antígenos y aumentan la capacidad para interactuar con los linfocitos T, a los que presentan el antígeno y promueven su proliferación y diferenciación funcional. Esta activación funcional se conoce como maduración de las CD (Alfaro C., *et al.* 2013). Las CD en estado inmaduro expresan PRRs tales como los TLRs que les permiten detectar y capturar organismos patogénicos mediante el reconocimiento de patrones moleculares conservados en ellos. Otra característica importante de las CD inmaduras es la expresión de niveles bajos de MHC-II y moléculas coestimuladoras tales como CD80 y CD86 por lo que son estimuladoras débiles para la activación de los linfocitos T y pueden inducir tolerancia inmunológica. Durante la migración de las CD hacia áreas de células T, las CD inmaduras disminuyen la capacidad de capturar antígenos y aumentan la expresión de MHC-II, moléculas coestimuladoras, la producción de citocinas y la expresión de diferentes receptores de quimiocinas diferenciándose a CD maduras. En esta condición las células tienen la capacidad para estimular la activación de las células T (Pulendran B., 2015; Contreras I., *et al.* 2014).

I.3.3. Tipos de células dendríticas

Dentro del grupo de las células dendríticas existen diferentes tipos, los cuales se han clasificado de acuerdo a la función, fenotipo de superficie y distribución anatómica (Ashok y Acha-Orbea, 2014; Pulendran B., 2015). Una de las clasificaciones más recientes las agrupa en tres clases principales que son: células dendríticas plasmacitoides (CDp), células dendríticas convencionales o clásicas (CDc) y células dendríticas derivadas de monocitos (CDmo) (Malissen B., *et al.* 2014). En el ratón se han clasificado tres grupos principales de CD en estado basal: células dendríticas plasmacitoides (CDp), células dendríticas convencionales o clásicas (CDc) y células dendríticas migratorias (CDm) (Malissen B., *et al.* 2014). Las CD surgen de un progenitor bipotente que está en la médula ósea, se conoce como precursor de macrófagos y CD (MDP) y da origen a las CD y los monocitos. Los MDP se diferencian hacia precursores comunes de CD y se restringen a la generación de células dendríticas plasmacitoides (CDp) y células dendríticas convencionales (CDc) (Schraml U.S. y Reis e Sousa C., 2015).

I.3.3.1. Células dendríticas plasmacitoides (CDp)

Las CDp representan un pequeño subgrupo de CD que comparten un origen similar, pero un ciclo de vida diferente, presentan una morfología esférica y carecen de las llamadas dendritas (Reizis B., *et al.* 2011). Estas células se encuentran principalmente en la sangre y los tejidos linfoides y entran a los nódulos linfáticos a través de la circulación sanguínea, se encuentran en porcentajes que van de 0.3 a 0.5% en humanos y ratones. Las CDp en estado de reposo expresan niveles bajos del MHC-II y moléculas coestimuladoras, así como también de CD11c (cadena α de la integrina CR4). En humanos las CDp no expresan CD11c, pero expresan el receptor para IL-3 y CD303. Además, presentan una estrecha gama de PRRs que incluye a TLR 7 y TLR 9. Las CDp reconocen ácidos nucleicos a través de los TLR, producen grandes cantidades de IFN tipo I y adquieren la capacidad para presentar antígenos (Merad M., *et al.* 2013; Pulendran B. 2015; Khochenkov D.A., 2008; Reizis B., *et al.* 2011). En algunos casos ante infecciones virales las CDp pueden diferenciarse hacia células con funciones y expresión de genes características de las CDc, siempre en ausencia del factor de transcripción E2-2, migrando a los órganos y tejidos linfoides. Por lo tanto, la pérdida del E2-2 resulta en la conversión funcional y fenotípica muy similar a las CDc (Reizis B., *et al.* 2011; Pulendran B., 2015).

1.3.3.2. Células dendríticas clásicas o convencionales (CDc)

Las CDc son células presentadoras de antígenos (CPA) que tienen una morfología dendrítica y expresan altos niveles de moléculas del MHC-II y otros marcadores hematopoyéticos tales como CD45 y CD11c y moléculas coestimuladoras tales como CD80, CD86 y CD40; el incremento de estos marcadores se relaciona con la activación de las CDc (Merad M., *et al.* 2013; Khochenkov D.A., 2008). Forman un pequeño grupo de células que se encuentra en la mayoría de los tejidos linfoides y no linfoides. En estos últimos se encuentran en estado de no activación. Se caracterizan por una gran capacidad de reconocimiento de daño tisular, captura de antígenos externos, así como asociados a células, y presentación de los antígenos fagocitados a los linfocitos T. Una vez que captan los antígenos, migran a los nódulos linfáticos donde activan a los linfocitos T (Merad M., *et al.* 2013). Las CDc de ratón se clasifican a su vez en CDc residentes de tejidos linfoides CDc CD8⁺ y CDc CD8⁻ y las CDc de tejidos no linfoides se clasifican en CDc CD103⁺ y CDcCD11b⁺ (Ganguly D., *et al.* 2013; Miller J.C., *et al.* 2012). Las CDc residentes de tejido CD8⁺ están especializadas funcionalmente en la presentación cruzada de antígenos asociada a células T CD8⁺, mientras que las CDc CD8⁻ son las estimuladoras más potentes de células T CD4⁺ (Miller J.C. *et al.* 2012). Las CDc no residentes de tejido linfoide presentan características similares a las CDc CD8⁺. Las CD103⁺ son eficientes en la presentación cruzada de antígenos y son potentes estimulando células T CD8⁺, pero además facilitan la inducción de células T reguladoras en el intestino (Miller J., *et al.* 2012). Las CDc CD11b⁺ se originan de precursores restringidos para CDc y monocitos, se caracterizan por la falta de expresión de la integrina CD103 y en su lugar expresan la integrina CD11b en músculo y en la lámina propia (Merad M., *et al.* 2013). De acuerdo con la localización en los tejidos, las CD se han dividido también en células residentes de los nódulos linfáticos y células dendríticas migratorias (Ashok y Acha-Orbea, 2014).

1.3.3.3. Células dendríticas migratorias

Las CD migratorias actúan como centinelas contra patógenos o bien antígenos propios. Estas células se localizan en tejidos periféricos no linfoides y tienen la capacidad de migrar vía el sistema linfático hacia los órganos linfoides. Las células de Langerhans y las células dendríticas dérmicas están consideradas dentro de la clasificación de las células dendríticas migratorias (Merad M., *et al.* 2013; Naik S.H., 2008). El proceso de migración, como ya se mencionó, provoca la maduración de las CD, lo que involucra un cambio en el fenotipo que incluye la sobreexpresión del MHC-II y moléculas coestimuladoras en la superficie celular.

Las células de Langerhans (CL) son células dendríticas que se encuentran únicamente en la epidermis y se identifican por la presencia de una lectina transmembranal con especificidad de unión a manosa llamada langerina. Las CL migran desde la piel hacia los nódulos linfáticos en un proceso controlado por quimiocinas gracias al receptor de quimiocinas CCR6 presente en las CL inmaduras (Khochenkov D.A., 2008). La migración se produce en respuesta a una infección o ante estímulos inflamatorios aproximadamente 72 horas después del estímulo, aunque también pueden migrar cuando están en estado quiescente. Se ha observado que en esta última participa el receptor IRF4, ya que en ratones “knockout” en IRF4 no hay migración de CL en estado quiescente (Pulendran B., 2015). Ya en los NLs las CL tienen el fenotipo $CD11c^{high} CD8\alpha CD11b^{+}DEC205^{high} Langerin^{+} XCR1^{-} CD103^{-}$ (Pulendran B. 2015; Ashoky Acha-Orbea, 2014). Las células dendríticas dérmicas migran hacia los NLs desde las capas dérmicas de la piel, estas células están conformadas por los subgrupos basados en su fenotipo y vías de desarrollo: CD dermales $CD11b^{+}$ que se divide de acuerdo con el nivel de expresión de CD11b en: $CD11b^{high} (CD11c^{high} CD8\alpha^{-}CD11b^{high}DEC205^{+}Langerina^{-}XCR1^{-}CD103^{-}yCD11b^{low}(CD11c^{high}CD8\alpha^{-}CD11b^{low}DEC205^{+}Langerina^{-}XCR1^{-}CD103^{-})$ y las CD dérmicas $CD103^{+}$ (Pulendran B., 2015).

1.3.3.4. Células dendríticas residentes de tejido

Las células dendríticas residentes de tejido linfóide se encuentran localizadas en todos los órganos linfoides del ratón, se originan de precursores sanguíneos y se localizan muy próximas a los conductos de los NLs donde pueden obtener y presentar antígenos solubles en la linfa. Estas células se encuentran en un estado inmaduro demostrado por una baja expresión de MHC-II, lo cual permite hacer una clara distinción entre estas células y las CD migratorias que tienen un fenotipo maduro y una expresión elevada de MHCII (Allenspach E.J., *et al.* 2008). Las CD residentes de tejido constituyen alrededor del 50% del total de CDs en los NLs y representan a la mayoría de CD esplénicas (Khochenkov D.A., 2008). Las CD $CD8^{+}$ se localizan en zonas ricas en células T y dependen del factor BATF3 para su desarrollo. Las $CD8^{-}$ se localizan en las regiones medulares y en los senos subcapsulares de los NLs y no dependen del BATF3 para su desarrollo (Pulendran B., 2015).

1.3.3.5 Células dendríticas derivadas de monocitos

Se ha demostrado que los monocitos que se desarrollan en la médula ósea tienen el potencial para diferenciarse hacia CD durante un proceso inflamatorio. Las CD derivadas de monocitos juegan un papel importante en la inducción y regulación de respuestas inmunes contra patógenos y el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (León B. y Ardavín C., 2008). Se caracterizan por la expresión de marcadores de origen mielóide como Ly-6C y Gr-1; y los receptores de quimiocinas CCR2 y CX3CR1.

1.3.4. Papel de las células dendríticas en la infección por el parásito *Leishmania*

1.3.4.1. Moléculas del parásito que participan en la interacción con la célula hospedera

Algunos componentes del parásito *Leishmania* han sido reconocidos como factores de virulencia, ya que contribuyen activamente a la patogénesis y permiten que el parásito invada y establezca la infección en el hospedero mamífero. Entre los factores de virulencia que se conocen se encuentran los glicoinositolfosfolípidos (GILPs), el lipofosfoglicano (LPG), los proteofosfoglicanos (PPG), la proteína de membrana del cinetoplasto de 11kDa (KMP-11), proteasas como la metaloproteasa gp63, proteasas de serina y proteasas de cisteína (Choudhury R., *et al.* 2010; Silva-Almeida M., *et al.* 2012; Kima P.E., 2014). Existen muchas diferencias en los factores de virulencia entre las diferentes especies de *Leishmania*. Por ejemplo, el LPG que es el principal componente de la superficie de los promastigotes de *Leishmania* contiene estructuras específicas de los estadios morfológicos y las especies. Presenta una gran conservación en el ancla lipídica y el núcleo de glicanos y muchas variaciones en la composición de los azúcares y la estructura del capuchón (Descoteaux A. y Turco S.J., 2002). Las diferencias en los componentes de la superficie de *Leishmania* entre las distintas especies y los estadios morfológicos repercuten en la interacción con las células hospederas. Por ejemplo, existen diferencias en los receptores utilizados por *Leishmania* para entrar a las células entre diferentes especies y entre amastigotes y promastigotes (Kima P.E., 2014; Farias L.H., *et al.* 2012).

1.3.4.2. Mecanismos inmunológicos durante la infección por *Leishmania*

En el curso natural de la infección, la respuesta inmune ante el parásito inicia en la dermis en donde las CD pueden actuar como células hospederas, así como los neutrófilos, macrófagos y fibroblastos (Colmenares M., 2004; Kautz-Neu K., 2012; Contreras I., *et al.* 2014). Las CD que son infectadas son críticas para el inicio de una respuesta inmune protectora del tipo Th1 (Kautz-

Neuk., 2012). Gracias a estudios llevados a cabo en el modelo murino, se han definido varios de los mecanismos inmunológicos que se presentan durante la infección con *Leishmania*. Los principales elementos del sistema inmune que participan durante la infección por *Leishmania* son células tales como los macrófagos (M ϕ), células dendríticas (CD), células asesinas naturales (NK), células T CD4⁺ y CD8⁺, citocinas tales como IFN- γ e IL-12 que contribuyen al control de *Leishmania* y moléculas efectoras como el óxido nítrico (NO) (Liese J., *et al.* 2013; Kima P.E., 2014). La respuesta inmune inicial ante la infección por el parásito es llevada a cabo por la inmunidad innata del hospedero que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria local y en la regulación de la diseminación del parásito (Kumar A., 2013). Además, el modelo murino ha permitido establecer el papel de las respuestas de los linfocitos Th en la infección por *Leishmania*. La cepa de ratones BALB/c responde a la infección con una respuesta de tipo Th2, la cual se asocia con un progreso de la enfermedad. En contraste, la cepa C57BL/6 tiene una respuesta de tipo Th1 que resulta en la activación de los macrófagos y la eliminación del parásito (von Stebut E., 2007). Las CD son un componente muy importante de la respuesta inmune innata y son potentes activadoras de las células T vírgenes (naive) en las infecciones con *Leishmania*, estableciendo un puente entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa frente a los parásitos. Debido a estas características se ha considerado que las CD actúan como las principales células presentadoras de antígenos en la leishmaniasis (Benett C.L., 2001; Contreras I., *et al.* 2014) y juegan un papel muy importante en el inicio y dirección de las respuestas por parte de las células T, permitiendo ya sea el control o la progresión de la enfermedad. Cuando las células dendríticas reconocen al parásito *Leishmania* a través de diferentes receptores tales como Fc γ R, CLRs y TLRs (Contreras I., *et al.* 2014) resulta en la maduración y producción de citocinas como IL-12, lo cual parece ser un pre-requisito para generar una respuesta de protección tipo Th1 (Markikou-Ouni W., 2012). Posteriormente al reconocimiento del parásito por las CD, éstas tienen la capacidad de fagocitarlo. De acuerdo a resultados obtenidos con el modelo murino de infección con *L. major* se ha observado que las CD fagocitan preferencialmente amastigotes a través de receptores Fc γ R (Woelbing F. *et al.*, 2006) y en CD humanas se ha observado la participación del receptor de lectina tipo C, DC-SIGN, en el reconocimiento y fagocitosis de promastigotes de *L. pifanoi*, *L. infantum* y *L. mexicana*. Finalmente, las CD presentan los antígenos de *Leishmania* a través del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II a las células T con la participación de moléculas coestimuladoras (Natarajan G., *et al.* 2014).

I.3.4.2.1. Fagocitosis

Como ya se mencionó, las CD tienen la capacidad de fagocitar amastigotes y promastigotes de *Leishmania*. La fagocitosis se define como la ingestión por parte de células de partículas que miden $\geq 0.5 \mu\text{m}$ e involucra el reconocimiento y unión de receptores que se encuentran en la superficie celular. Diferentes cuerpos extraños tales como microorganismos, células muertas y detritos celulares pueden ser eliminados por células mieloides fagocíticas tales como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, ya que estas células expresan los receptores y la maquinaria requerida para el proceso eficiente de la fagocitosis. La fagocitosis participa como primera línea de defensa contra infecciones y juega también un papel importante en el inicio de una respuesta inmune adaptativa promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias (Underhill D.M. y Goodridge H.S, 2012; Flannagan R.S., *et al.* 2012). Los mecanismos que participan en la fagocitosis son variados y dependen tanto del cuerpo a fagocitar como de los receptores específicos sobre la superficie celular que dirigen distintos tipos de fagocitosis. Los receptores fagocíticos reconocen moléculas propias de los microorganismos o moléculas opsonizadas. El proceso involucra una serie de pasos que inician con el reconocimiento, adhesión y señalización y continúa con la extensión de la membrana de la célula fagocítica alrededor de la partícula reconocida y el englobamiento de la partícula, que resulta en la formación del fagosoma intracelular (Bohlsón S., 2011). La fagocitosis dependiente de opsoninas involucra a los $\text{Fc}\gamma\text{R}$ y a los receptores del complemento que reconocen partículas extrañas que tienen IgG o moléculas del complemento unidas a la superficie. La fagocitosis independiente de opsoninas se da gracias a una variedad de receptores celulares que reconocen PAMPs en la superficie de los patógenos. Estos receptores incluyen receptores de manosa, receptores scavenger tipo A e integrinas (Celli J. y Finlay B., 2002). Los TLRs juegan un papel importante, ya que reconocen y responden a componentes de patógenos que están ausentes en las células hospederas y componentes asociados con la replicación viral; estos receptores son importantes en el proceso de la fagocitosis ya que no tienen un reconocimiento únicamente en la superficie celular, sino que pueden reconocer moléculas después de la internalización (Stuart L.M. y Ezekowitz R., 2004).

Tabla 2. Tipos de fagocitosis, receptores participantes y ligandos (Underhill D. M., y Goodridge H. S., 2012)

Tipo de fagocitosis	Receptores	Ligandos
Fagocitosis por opsonización	Receptores de la familia Fc (FcγRI, FcγRIIA)	Opsonización por anticuerpos
	Receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4)	Opsonización por complemento
	Integrina α5β1	Fibronectina
Fagocitosis sin opsonización	Dectina 1	β–glucacón
	Receptor de macrófago MARCO	Bacteria
	Receptor scavenger A	Bacteria
	Integrina αVβ5	Células apoptóticas
	Receptor de manosa	Manosa
Fagocitosis no específica	Receptores tipo Toll	Lipopolisacáridos y lipopéptidos

La fagocitosis puede resultar en un obstáculo o una oportunidad para ciertos patógenos. Algunas bacterias han desarrollado mecanismos para prevenir ser fagocitadas como parte de su perfil patogénico. De manera contraria, otros organismos patogénicos como por ejemplo parásitos que tienen un ciclo de vida con estadios intracelulares han desarrollado estrategias sofisticadas que les permiten ser internalizados y sobrevivir dentro de las células fagocíticas (Celli J. y Finlay B., 2002). Este es el caso del parásito *Leishmania* que presenta diferentes mecanismos que le permiten ser fagocitado y sobrevivir dentro de los macrófagos y las células dendríticas. Ambos estadios del parásito (promastigotes metacíclicos y amastigotes) pueden ser fagocitados por ambos tipos celulares. En el inicio de la infección, cuando los promastigotes metacíclicos son inoculados por el vector éstos son rápidamente fagocitados principalmente por macrófagos residentes de tejido (Prina E., *et al.* 2004). En la piel las células de Langerhans y las células dendríticas dérmicas son las más eficientes presentadoras de antígenos y también cumplen con

una actividad fagocítica importante. Las CD dérmicas tienen la capacidad de fagocitar cantidades pequeñas de parásitos, pero la mayoría son infectadas a través del contacto con neutrófilos parasitados. Varias semanas después de la infección hay un aumento en el número de CD (CD11c⁺) en la lesión. Las células dendríticas fagocitan principalmente amastigotes para la posterior presentación antigénica (Natarajan G., *et al.* 2014; Woelbing F., *et al.* 2006; Prina P.E., *et al.* 2004). Entre los receptores que reconocen al parásito involucrados en la fagocitosis por las células dendríticas se han identificado a los FCγR (Woelbing F., *et al.* 2006) y receptores de lectina tipo c (Colmenares M., 2004; Argueta-Donohué J., *et al.* 2016).

I.3.4.2.2. Papel de las citocinas en la infección con *Leishmania*

Las CD presentan diferentes PRR, como por ejemplo los TLR, que al ser acoplados por diferentes moléculas de la superficie del parásito desencadenan una cascada de señalización que conduce a la producción de diferentes citocinas, las cuales promueven el desarrollo de poblaciones particulares de células T. En el desarrollo de las diferentes poblaciones de linfocitos T influye también el microambiente presente en el momento de la infección (Murray H.W., *et al.* 2005). Está demostrado que el perfil de citocinas que se produce está correlacionado con el cuadro clínico que se manifieste por la infección con *Leishmania*. Las CD son una fuente muy importante de producción de citocinas ante la infección con *Leishmania*. Entre las citocinas más importantes que se producen durante la infección con *Leishmania* se encuentran:

1. IL-10. Esta citocina es un potente supresor de la activación de los macrófagos, inhibe la maduración de las CD y es secretada por células del sistema inmune adaptativo, incluyendo células de los subgrupos Th1, Th2 y Th17, células T CD8 y células B. Es secretada también por células del sistema inmune innato, incluyendo CD, macrófagos, mastocitos, células NK, eosinófilos y neutrófilos (Saraiva M. y O'Garra A., 2010). Es la citocina con mayor efecto inmunosupresor en la leishmaniasis y es esencial para la persistencia del parásito y durante la exacerbación de la infección. Su papel crucial en la supresión de la respuesta inmune ha sido demostrado en la infección con *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Kedzierski L. y Evans K.J., 2013). En la leishmaniasis murina, la resistencia a la enfermedad se ha asociado con la respuesta de tipo Th1 que se caracteriza por la producción de citocinas tales como IL-12 e IFN- γ y la susceptibilidad se ha asociado a una respuesta inmune de tipo Th2 con la producción de citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-10 (Bomfim G., 1996). Se ha demostrado que el acoplamiento de complejos inmunes al Fc γ R es una manera de inhibir la producción de citocinas proinflamatorias tales como la IL-12. Este

acoplamiento no sólo inhibe la producción de esta citocina, sino que induce la producción de IL-10 en células que presentan receptores Fc con la cadena γ funcional que es esencial para la producción de ésta (Kane M.M. y Mosser D.M., 2001; Ribeiro de Jesús, *et al.* 1998). En el modelo murino de infección de ratones BALB/c, que son susceptibles a *L. major*, la IL-10 se ha correlacionado con la exacerbación de la infección debido a que suprime la síntesis de IFN- γ y la producción del NO en los macrófagos, así mismo puede reducir la expresión de MHC I y II y moléculas coestimuladoras. (Padigel U.M., *et al.* 2003). Esta correlación entre la IL-10 y la exacerbación de la infección por *Leishmania* ha sido observada también en humanos en donde la severidad de la leishmaniasis visceral y la progresión de las lesiones en los pacientes con leishmaniasis cutánea están muy relacionadas con los incrementos en el nivel de IL-10 (Kane M.M. y Mosser D.M., 2001).

2. IL-12. Es una citocina proinflamatoria que está compuesta por dos subunidades denominadas p35 y p40 codificadas en cromosomas separados tanto en el humano como en el ratón (Liu J., *et al.* 2003; Trinchieri G., *et al.* 2003). Ambas subunidades se asocian para formar la forma activa denominada IL-12 p70 y son producidas por células fagocíticas (monocitos, macrófagos, neutrófilos y CD) (Trinchieri G., *et al.* 2003). Esta citocina es esencial para la defensa del hospedero contra patógenos intracelulares, ya que genera una respuesta de tipo Th1. Activa a células NK para la producción de IFN- γ y promueve también la proliferación de éstas y de los linfocitos T, con lo que se induce y aporta resistencia a infecciones bacterianas y parasitarias incluyendo la leishmaniasis (Oliveira M. a P., *et al.*, 2005; Xin L., *et al.* 2008; Biron y Gazzinelli, 1995; Trinchieri G., *et al.* 2003). Interesantemente, los promastigotes de *Leishmania*, como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune tienen la capacidad de inhibir la síntesis de IL-12 en macrófagos de diferentes tejidos. De manera similar, los macrófagos cultivados a partir de médula ósea no producen IL-12 ante la estimulación con promastigotes metacíclicos (Oliveira M., *et al.* 2005). Por el contrario, *Leishmania* no inhibe la producción de IL-12 en células dendríticas infectadas (von Stebut E., *et al.* 1998).

3. Factor de necrosis tumoral (TNF- α). Es una citocina que pertenece a una familia de proteínas de dominio trimérico y se expresa de manera no glicosilada unida a la membrana celular y de forma soluble (Stevens S.R. y Chang T.H., 2006; Pfeffer K., 2003). Tanto la forma soluble como la forma unida a membrana son biológicamente activas y se diferencian por la afinidad que presentan a distintos receptores. Esta citocina es producida por una variedad de células que

incluyen a los queratinocitos activados, células dendríticas dérmicas, monocitos, macrófagos, mastocitos y células B y T activadas, aunque se considera que los macrófagos activados son los principales productores de TNF- α (Stevens S.R. y Chang T.H., 2006). El TNF- α se caracteriza por la capacidad de estimular la necrosis de tumores malignos y es un mediador de la inflamación cutánea y otras, ya que es una citocina promotora de respuestas inflamatorias gracias al aumento del reclutamiento de neutrófilos que a su vez producen diferentes citocinas y es uno de los principales activadores de macrófagos que induce la producción de NO, citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Además de regular respuestas inflamatorias, el TNF- α también participa en la regulación de la motilidad celular y la apoptosis (Stevens S.R. y Chang T.H., 2006).

En la leishmaniasis el TNF- α es esencial para el hospedero, ya que por la inducción de un perfil Th1, ayuda en el control de la infección. Sin embargo, una producción descontrolada de citocinas proinflamatorias como el TNF- α puede resultar en lesiones severas (Oliveira F., *et al.* 2011). Los pacientes con lesiones crónicas como las que se presentan en la LMC y en la LCD muestran una fuerte expresión de esta citocina (Ribeiro de Jesus A., *et al.* 1998).

II. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis comprende a un grupo de enfermedades tropicales con una variedad de formas clínicas que abarcan desde lesiones cutáneas leves y curables hasta daño a varios órganos que conduce en muchas ocasiones a la muerte. La diversidad de las formas clínicas en la leishmaniasis se ha adjudicado a la respuesta inmune del hospedero y a la especie infectante. Las especies y cepas de *Leishmania* son un determinante importante en la evolución de la enfermedad. Es esencial conocer la identidad de los parásitos en cada foco donde se presenta la enfermedad, ya que este dato influye en la comprensión de la epidemiología, en el control y en el tratamiento. Otro aspecto importante está relacionado al hecho de que una misma especie, como es el caso de *L. mexicana*, puede provocar dos formas clínicas, en este caso la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), con lo cual resulta importante analizar aspectos intrínsecos a las cepas que pudieran ser responsables de provocar una forma clínica u otra. Diversos estudios han demostrado que existe gran variabilidad en el comportamiento entre las diferentes especies y cepas de *Leishmania* (Sanyal T., *et al.* 1994; Marikikou- Ouni W., 2012).

Por otro lado, la interacción del parásito *Leishmania* con las células dendríticas juega un papel muy importante en el inicio y direccionamiento de la respuesta inmune mediada por las células T. Debido a esto resulta muy importante analizar el efecto de cepas de *L. mexicana* de reciente aislamiento de pacientes con LCL y LCD en la interacción con células dendríticas, específicamente en la fagocitosis del parásito por las células y en la producción de citocinas.

III. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la fagocitosis y producción de citocinas en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón cuando éstas interactúan con amastigotes de *L. mexicana* de dos cepas diferentes, una aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y otra aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

IV. OBJETIVOS

IV.1 General

Analizar la fagocitosis y la producción de citocinas por células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón incubadas con amastigotes de *L. mexicana* de dos cepas diferentes, una aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y otra de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

IV.2 Particulares

IV.2.1. Diferenciar y caracterizar células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDC).

IV.2.2. Analizar la fagocitosis de los amastigotes de dos cepas diferentes de *L. mexicana*, una aislada de un paciente con LCL y otra aislada de un paciente con LCD, por las BMDC mediante citometría de flujo, tinción con Giemsa e inmunofluorescencia.

IV.2.2. Analizar la producción de las citocinas IL-10, IL-12 y TNF- α por las BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de dos diferentes cepas, una aislada de un paciente con LCL y otra de un paciente con LCD, mediante ELISA.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V.1. Modelo de investigación

Para la realización de este trabajo se empleó un modelo murino utilizando ratones hembra de la cepa BALB/c, cuya edad osciló entre las 6 y 8 semanas. Los animales empleados fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos dentro de las instalaciones del bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

V.2. Amastigotes de *L. mexicana*

Se utilizaron amastigotes de dos cepas de la especie *Leishmania mexicana*. La cepa LAC aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la cepa DIACT aislada de paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Posteriormente al aislamiento, ambas cepas fueron mantenidas en ratones susceptibles de la cepa BALB/c para mantener la virulencia de las mismas y los amastigotes fueron aislados de las lesiones en el cojinete plantar y mantenidos en cultivo de acuerdo a técnicas reportadas previamente (Wilkins-Rodríguez A., *et al.* 2010; Bates P.A., *et al.* 1992). Ambas cepas fueron aisladas, inoculadas en ratones, obtenidas de éstos y cultivadas por el Biól. Arturo Wilkins Rodríguez, Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM.

V.3. Obtención de las células precursoras presentes en la médula ósea de ratón

Los ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas se sacrificaron mediante dislocación cervical, se empaparon con etanol al 96% y se disectaron las extremidades inferiores. Con ayuda de pinzas y tijeras de disección se retiró la piel y el músculo de las extremidades inferiores con la finalidad de obtener el fémur y la tibia de ambas extremidades. Los huesos obtenidos se colocaron en una caja de Petri bacteriológica con 10ml de PBS (Caisson, North Logan, UT, US) adicionado con 100 U de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A continuación se extrajo la médula ósea bajo condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar. Para esto, las epifisis de los huesos se cortaron con un bisturí dejando expuesta la médula. Los huesos se sujetaron con ayuda de pinzas de disección estériles sobre un tubo de 50 ml y con ayuda de una jeringa de 10 ml con una aguja de calibre 23G se inyectó PBS adicionado con los antibióticos dentro de los huesos para extraer la médula dentro del tubo de 50 ml. La médula obtenida se centrifugó a 300 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente y después de un lavado con PBS,

el botón de células se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640, (GibcoLife Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 2mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal bovino (FBS) (GibcoLife Technologies Corporation) descomplementado por calor (56° C, 30'). Se tomó una alícuota de la suspensión de células, se hizo una dilución 1:2 con el colorante vital azul Tripano (Gibco Invitrogen Corporation) para descartar a las células muertas y se contaron en una cámara de Neubauer descartando en el conteo los eritrocitos presentes de la suspensión de células.

V.4. Diferenciación de las células de médula ósea a BMDC

Las CD se diferenciaron a partir de los precursores de la médula ósea de acuerdo a la metodología descrita por Lutz, *et al.* 1999 con algunas modificaciones. Para el cultivo se utilizó medio R-10 compuesto por medio RPMI-1640 (GibcoLife Technologies Corporation) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 2mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol y 10% suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor. Se sembraron 2×10^6 células de la suspensión obtenida de la médula ósea en cajas de Petri bacteriológicas de 100 mm de diámetro en 10 ml de medio R-10 al que se le adicionó 10% del sobrenadante de cultivo de la línea celular X-63. La línea celular X-63 posee un gen que codifica para el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) murino y fue donada por la Dra. Brigitta Stockinger (Medical Research Council, Mil Hill, London, UK). Las cajas de cultivo se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El día 0 se consideró como el día de inicio del cultivo y en el día 3 el cultivo se alimentó con 10ml de medio R10 adicionado con 10% del sobrenadante de la línea celular X-63. En el día 6 de cultivo se reemplazaron 10 ml de medio de cada caja por R10 fresco adicionado con 10% del sobrenadante de la línea celular X-63. Las células dendríticas diferenciadas se cosecharon al 7° día de cultivo para caracterizarlas y realizar los ensayos de infección.

V.5. Caracterización de las BMDC

Las BMDC del 7° día de cultivo se cosecharon y lavaron con PBS. 1×10^6 BMDC se resuspendieron en 1ml de buffer de tinción FACS (PBS adicionado con suero de caballo al 5% y 2 μ M de EDTA) durante 30 min a 4°C para bloquear los Fc γ R y evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos marcados. Las células se lavaron con el buffer de tinción FACS y se tiñeron con los siguientes anticuerpos marcados con fluorocromos: anti CD11c de ratón acoplado a ficoeritrina (PE), anti CD11b de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti MHC-II de ratón acoplado a FITC y anti CD86 de ratón acoplado a FITC (BD Pharmigen, San Jose, CA, USA). Los anticuerpos se agregaron a la suspensión de células a una dilución 1:200 en buffer de tinción FACS y se incubaron durante 20 minutos. Pasado el periodo de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS a 300 x g, 10 minutos por cada lavado y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron 3 veces para eliminar el paraformaldehído y las células fijadas se resuspendieron en PBS para posteriormente analizar mediante citometría de flujo. Las células se analizaron con un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) y utilizando el software FlowJo V.10.1 (TreeStar Inc., Ashland, OR) para el análisis de los datos.

V.6. Estimulación e infección de las BMDC con amastigotes de *L. mexicana* de dos cepas

Las BMDC obtenidas en el día 7 de cultivo se sembraron en placas de 24 pozos (Corning, LifeSciences, NY, USA) a una densidad de 1×10^6 BMDC por pozo. Las células se incubaron durante periodos que oscilaron entre 2 y 24 h y posteriormente se estimularon de la siguiente manera: 1) BMDC, 2) BMDC+ LPS (10ng/ml) (*E. coli* 0111B:4, Sigma), 3) BMDC+IFN- γ (100 U/ml) (PeproTech, Rock Hill, NJ, USA), 4) BMDC + LPS 10 ng/ml + IFN- γ , 5) BMDC + amastigotes de la cepa LAC (cociente de infección 5:1, es decir 5 parásitos por cada BMDC), 6) BMDC + amastigotes de la cepa LAC (5:1) + LPS (10ng/ml), 7) BMDC + amastigotes de la cepa LAC (5:1) + INF- γ (100U/ml), 8) BMDC + amastigotes de la cepa LAC (5:1) + LPS 10ng/ml + INF- γ , 9) BMDC + amastigotes cepa DIACT 5:1, 10) BMDC + amastigotes de la cepa DIACT (5:1) + LPS (10ng/ml), 11) BMDC + amastigotes de la cepa DIACT (5:1) + IFN- γ (100 U/ml), 12) BMDC + amastigotes de la cepa DIACT (5:1) + LPS (10ng/ml) + IFN- γ (100U/ml). Las BMDC con los diferentes estímulos se incubaron a 33°C con 5 % de CO₂ durante 24 h. Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se centrifugaron durante 10 minutos a una velocidad de 300 xg para obtener los sobrenadantes libres de células.

V.7. Determinación de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* de las dos cepas por las BMDC

V.7.1. Marcaje de los parásitos con ester succinimidilacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE)

Para realizar las infecciones de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* se tomaron 5 ml del cultivo de los amastigotes de cada cepa, se colocaron en tubos de 15 ml, se centrifugaron a 2,000 $\times g$ durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS centrifugándolos cada vez a 2,000 $\times g$ durante 10 min. Al terminar los lavados, los amastigotes de ambas cepas se colocaron en tubos de 1.5 ml, se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril, se pasaron 5 veces por jeringas de insulina para deshacer los agregados de parásitos y finalmente se tomó una pequeña porción de los parásitos resuspendidos para fijarlos con paraformaldehído al 2% durante 5 min en una cámara húmeda y se contaron en una cámara de Neubauer. 50×10^6 amastigotes se resuspendieron en 1ml de PBS y se les agregó el marcador fluorescente ester succinimidilacetato de carboxifluoresceína (CFDA-SE) (Molecular Probes/Invitrogen, Eugene, OR, USA) a una concentración de 5 μM diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) y se incubaron durante 10 min en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente los parásitos se lavaron tres veces con PBS a 2,000 $\times g$ durante 10 minutos por cada lavado para eliminar el exceso del marcador CFDA-SE.

V.7.2. Estandarización de la concentración de citocalasina-D para los ensayos de fagocitosis

Con el objetivo de diferenciar entre el número de amastigotes que se adhieren a las BMDC y los que son fagocitados por éstas, se utilizó citocalasina-D (Sigma) como control de fagocitosis. La citocalasina-D es un metabolito fúngico que se une a las moléculas de actina evitando que los filamentos de ésta se polimericen en el citoesqueleto y con esto se impide que se lleve a cabo el proceso de fagocitosis. Para conocer la concentración de citocalasina-D que disminuyera la actividad fagocítica de las BMDC y no afectara la morfología y viabilidad de las células, se realizó una curva con diferentes concentraciones de citocalasina-D que fueron: 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM y 5 μM . La citocalasina-D se diluyó en medio RPMI-1640, se adicionó a las BMDC y se incubaron durante 30 minutos previos a la infección. Posteriormente, las células se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* (5:1) a 33°C con 5% de CO₂ durante 24 h. Al final de la incubación,

las BMDC se fijaron con formaldehído al 4% y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos obtenidos se procesaron con ayuda del programa FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR).

V.7.3. Cuantificación de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC mediante citometría de flujo

El análisis de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas aisladas de un paciente con LCL y uno con LCD se realizó por citometría de flujo. Los amastigotes de las 2 cepas de *L. mexicana*, LAC y DICT, marcados con CFDA-SE, se incubaron con las BMDC con un cociente de infección 5:1 (amastigotes : BMDC) a 33 °C con 5% de CO₂ durante 24 h con los tratamientos siguientes: 1) BMDC, 2) BMDC + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, 3) BMDC + citocalasina-D (3 μM)+amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, 4) BMDC + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DICT y 5) BMDC + citocalasina-D (3μM) +amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DICT. La citocalasina-D se adicionó 30 min antes de la infección con los amastigotes. Al término de la incubación de las BMDC con los parásitos, éstas se fijaron con formaldehído al 4% durante 10 minutos y se lavaron con PBS tres veces. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur) con el programa CellQuest. El análisis y gráficas finales se realizaron con el programa FlowJo V.10.1 para datos de citometría y el programa estadístico Graphpad Prism 6.

V.7.4. Análisis de la fagocitosis mediante microscopia de fluorescencia

Se utilizaron cubreobjetos redondos tratados con poli-L-lisina y se colocaron en una placa de 16 pozos. En cada cubre objeto se colocaron 1×10^5 BMDC que se infectaron con las dos cepas de *L. mexicana* (LAC y DICT) en un cociente de 5:1 durante 24 h. Pasado el tiempo de adherencia e infección, se retiró el medio de los pozos y las BMDC se fijaron con metanol absoluto durante 15 min. A continuación se lavaron 2 veces con PBS, se agregó solución bloqueadora compuesta de PBS y suero fetal bovino (FBS) al 10% y se incubaron durante 20 min. Pasado el tiempo de incubación se agregó suero anti-*Leishmania mexicana* obtenido de un ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* en una dilución 1:100 en PBS y se incubó durante 30 min. Se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar el exceso del suero y se incubaron durante 20 min con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido 1:100 en PBS. Después de lavar 3 veces con PBS se incubaron durante 20 min con concanavalina A (ConA) acoplado a TRITC (Sigma), un marcador de membrana celular, a una concentración de 1:100 diluido en PBS. Pasado el tiempo de incubación se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 5 min con 4', 6

diamino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (Sigma) a una dilución 1:1000 en PBS. Finalmente se lavaron 5 veces con PBS y se montaron con medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y se obtuvieron las micrografías con ayuda de un microscopio de fluorescencia Microphot-FXA con filtros rojo DM 430, verde DM 400 y azul DM 580 con una cámara digital NikonDXm 1200F.

V.7.5. Análisis de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC mediante tinción con Giemsa

Con el objetivo de complementar el análisis de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC, se llevó a cabo una tinción de las células con Giemsa para cuantificar los parásitos dentro de las BMDC en un microscopio óptico. Se trataron cubreobjetos redondos de 13 mm con poli-L-lisina (Sigma) a una concentración de 0.01% diluida en PBS. La poli-L-lisina se puso sobre la superficie de los cubreobjetos durante 10 minutos, se dejaron secar y se colocaron en una placa de 24 pozos. Se adicionaron 1×10^5 BMDC por pozo sobre los cubreobjetos tratados y las células se dejaron en reposo durante un periodo de 24 h. Posteriormente, las células adheridas a los cubreobjetos se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* bajo las siguientes condiciones: 1) BMDC + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, 2) BMDC + citocalasina-D ($3\mu\text{M}$) + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, 3) BMDC + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT y 4) BMDC + citocalasina-D ($3\mu\text{M}$) + amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT. Las BMDC con los estímulos se incubaron durante 24 h a 33 °C con 5% de CO₂, se realizaron 4 lavados con PBS y los cubreobjetos se fijaron con metanol absoluto durante 5 minutos. A continuación se adicionó el colorante Giemsa a una dilución de 1:20 en agua inyectable, los cubreobjetos se lavaron con agua destilada y se fijaron sobre portaobjetos con bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron en un microscopio Microphot-FXA y las micrografías se tomaron con una cámara digital NikonDXm 1200F.

V.8. Cuantificación de las citocinas IL-12 p40, IL-12 p70, IL-10 y TNF- α mediante ELISA tipo sandwich

El efecto de los amastigotes de las dos diferentes cepas de *Leishmania mexicana* sobre las BMDC se analizó a través de la secreción de las citocinas IL-12 p40, IL-12 p70, IL-10 y TNF- α mediante la técnica de ELISA tipo sandwich. Se utilizó una placa de 96 pozos de alta adherencia (Costar-Corning Corning, NY, USA), a la cual se fijaron los diferentes anticuerpos de captura para las citocinas de interés de la siguiente manera: anticuerpo de conejo anti-TNF- α de ratón (BD Pharmigen San Diego, CA, USA no. cat. 5575516) diluido en buffer de fosfatos de sodio concentración 0.1M y pH 6.0, anticuerpo de conejo anti-IL-12 p40 de ratón (BD Pharmigen, no. cat. 20011D) a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo de conejo anti-IL-12 p70 de ratón (BD Pharmigen, no. cat. 20171D) a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo de conejo anti-IL-10 (BD Pharmigen no. cat. 551215) a una concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$, estos tres anticuerpos se diluyeron en buffer de fosfatos de potasio concentración 0.1 M, y pH 9.0. En cada pozo se colocaron 50 μl de los anticuerpos de captura y la placa se incubó a 4 °C durante 10 h. Después de la incubación la placa se lavó 4 veces con buffer de lavado compuesto por PBS y 0.01% Tween-80 (Sigma) en un lavador de placas para ELISA (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). La placa se bloqueó con 200 μl por pozo de solución bloqueadora, se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavó 3 veces con buffer de lavado. Después de lavar la placa, se adicionaron 100 μl por pozo de los sobrenadantes de cultivo de las BMDC estimuladas y de las curvas patrón de las diferentes citocinas que se prepararon con concentraciones conocidas de las citocinas recombinantes (BD Pharmigen) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado el tiempo de incubación, la placa se lavó 4 veces con el buffer de lavado por y se adicionaron los anticuerpos de detección marcados con biotina para cada citocina: anticuerpo de conejo anti-TNF- α de ratón (BD Pharmigen, no cat. 557432) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, anticuerpo de conejo anti-IL-12 p40/p70 de ratón (BD Pharmigen no. cat. 554476) a una concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente y anticuerpo de conejo anti-IL-10 de ratón a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Los anticuerpos de detección se diluyeron en albúmina sérica bovina al 1% (Sigma) con 0.05% Tween-20 (Sigma) en 100 ml de PBS, se colocaron en un volumen total de 100 μl por pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después de la incubación, la placa se lavó 6 veces con buffer de lavado y se agregó estreptavidina-fosfatasa alcalina (Gibco Invitrogen Corporation) para la detección de los anticuerpos marcados con biotina en una dilución 1:2000 durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, la placa se lavó 8 veces con el buffer de

lavado y se agregaron 100 μ l por pozo de la solución reveladora que se compone de buffer de sustrato (10g de dietanolamina y $MgCl_2$ 0.1M, pH 9.8 que se ajustó con HCl diluido) y una tableta del sustrato de fosfatasa (Sigma) que se diluyó a una concentración final de 0.005 mg/ml. La placa se leyó a 405 nm en un lector de ELISA para microplacas (Bio-Tek Instruments). Cada citocina se leyó cada 5 minutos por un periodo de 40 min con ayuda del programa KC4, los resultados de la concentración de las diferentes citocinas se expresaron en pg/ml con gráficas de barra realizadas con ayuda del programa Graphpad Prism 6.

VI. RESULTADOS

VI.1. Cultivo y caracterización de las BMDC

Para poder analizar el efecto que ejercen dos cepas de la especie *L. mexicana* se utilizó un modelo *in vitro* a partir de precursores de médula ósea de ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad. Las células precursoras presentes en la médula ósea se diferenciaron a CD mediante la incubación durante 7 días con el factor estimulador para la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) presente en el sobrenadante de cultivo de la línea celular X-63. Para determinar si la diferenciación de las BMDC se llevó a cabo de manera correcta, las células se caracterizaron mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos acoplados a fluorocromos dirigidos contra marcadores característicos de las CD. Los marcadores que se utilizaron fueron CD11c, CD11b, MHC-II y CD86. Se analizó un total de 20,000 eventos y se obtuvo que el 71.64% de las BMDC fueron positivas para el marcador CD11c, que es la cadena α del CR4 y es una molécula ampliamente expresada en CD de origen mieloide (Fig. 10A). Para el marcador CD11b (cadena α del CR3) que es un marcador de células de linaje mieloide se obtuvo un 98.13% de células positivas (Fig. 10B). Se midieron también los porcentajes de las BMDC positivas para los marcadores de superficie MHC-II y CD86 para conocer el estado de maduración de las BMDC, ya que estos marcadores se expresan en mayor grado en las CD maduras en comparación con las inmaduras. Las BMDC fueron un 68.48% positivas para el marcador MHC-II (Fig. 10C) y para el marcador CD86 sólo el 10.56% de las BMDC fue positivo. CD86 es una molécula coestimuladora necesaria en la presentación de antígenos a los linfocitos T y aumenta su expresión en las CD maduras (Fig. 10D).

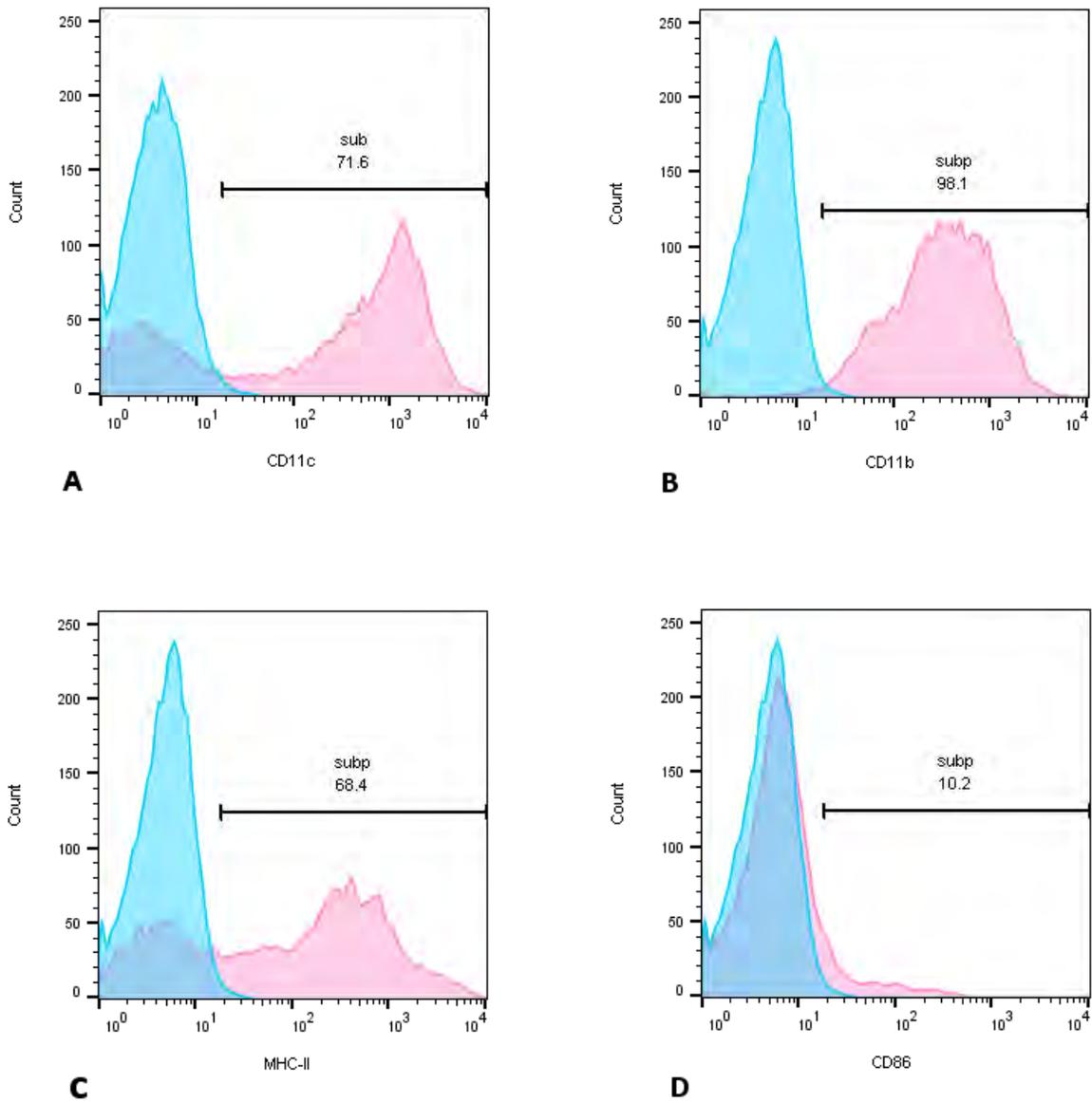


Figura 10. Caracterización de las BMDC por citometría de flujo. Las BMDC se diferenciaron a partir de células precursoras presentes en la médula ósea de ratón mediante la incubación con GM-CSF durante 7 días y se analizó por citometría de flujo la expresión de los marcadores: A) CD11c, B) CD11b, C) MHC-II y D) CD86. Los histogramas azules muestran la población de BMDC sin teñir (control), los histogramas rosas muestran la población de células positivas a los diferentes marcadores. El eje de las X representa la intensidad de fluorescencia y el eje de las Y representa el número de eventos.

Además de la caracterización de las BMDC por citometría de flujo, se realizó una tinción con Giemsa para observar en un microscopio óptico la morfología de las células. Como se observa en la Fig. 11 las BMDC obtenidas muestran la morfología característica como lo es el núcleo excéntrico y las prolongaciones citoplasmáticas.

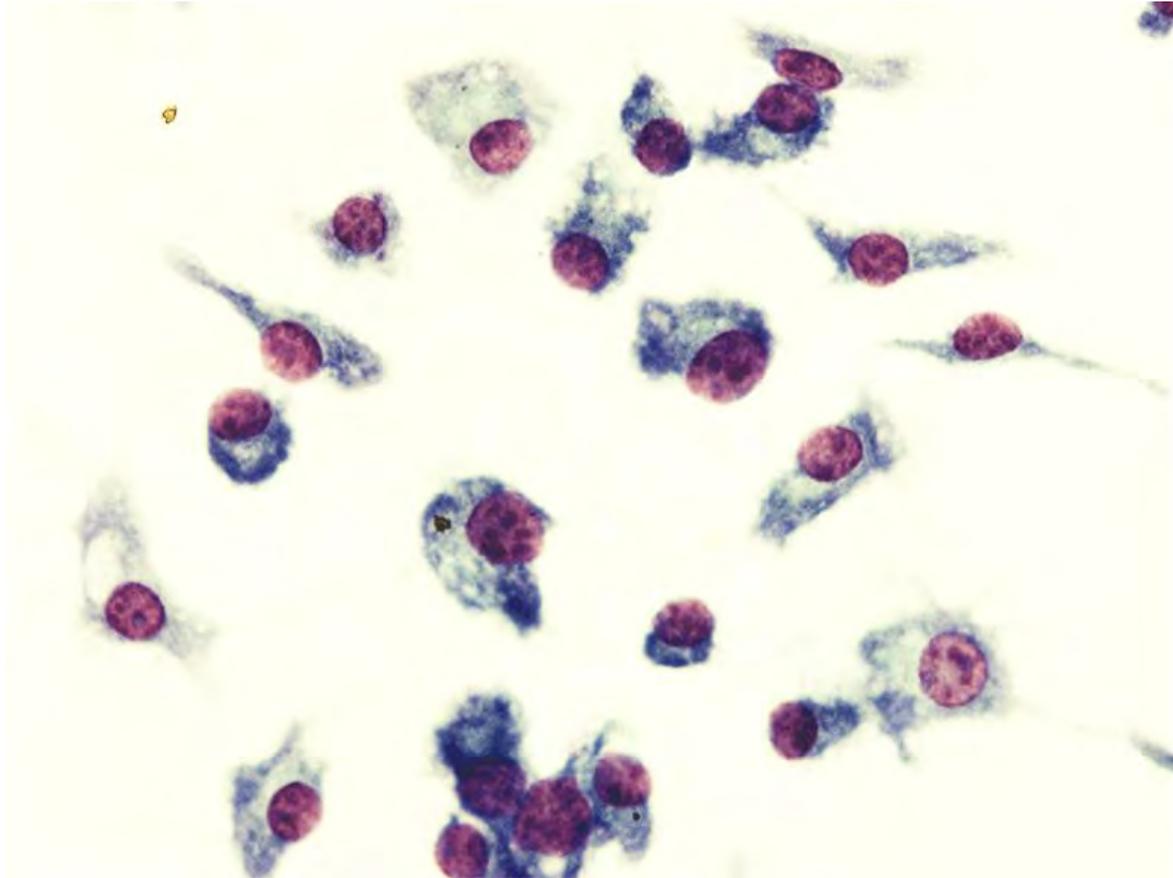


Figura 11. BMDC teñidas con Giemsa. Las BMDC diferenciadas durante 7 días con GM-CSF se tiñeron con Giemsa y se observaron en un microscopio óptico a un aumento de 60X. Se observa el núcleo excéntrico de color rojo y el citoplasma de color azul.

VI.2. Determinación de la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC

VI.2.1 Estandarización de la concentración de citocalasina-D para los ensayos de fagocitosis

Una vez diferenciadas y caracterizadas las BMDC, se inició el estudio sobre el efecto de los amastigotes de *L. mexicana* de diferentes cepas en la fagocitosis por las BMDC. Para esto, se realizó una curva de concentración de citocalasina-D para determinar la cantidad adecuada del

inhibidor de la fagocitosis que no provocara daño a las células. En el laboratorio se había determinado la dosis adecuada para inhibir la fagocitosis en células dendríticas derivadas de monocitos humanos, pero no así para las BMDC murinas. Como se observa en la Fig. 12, de un total de 20,000 eventos el 54.4% de las células que se incubaron con los amastigotes de *L. mexicana* marcados con CFDA-SE en ausencia de citocalasina-D fueron positivas a la marca del CFDA-SE lo que indica que tenían parásitos unidos o fagocitados. Para distinguir entre los parásitos unidos y los que se encontraban en el interior de las células se utilizó citocalasina-D que es un inhibidor de la fagocitosis. Primero se hizo una curva dosis-respuesta para conocer la concentración óptima de citocalasina-D que disminuyera el porcentaje de fagocitosis, pero no dañara a las células. En la Fig. 13 se muestran las diferentes concentraciones de citocalasina-D utilizadas y los porcentajes de fagocitosis obtenidos. Se observa que con la concentración de 3 μ M de citocalasina-D se obtuvo el menor porcentaje de fagocitosis y la morfología de las células se mantuvo por lo que se eligió como la concentración óptima.

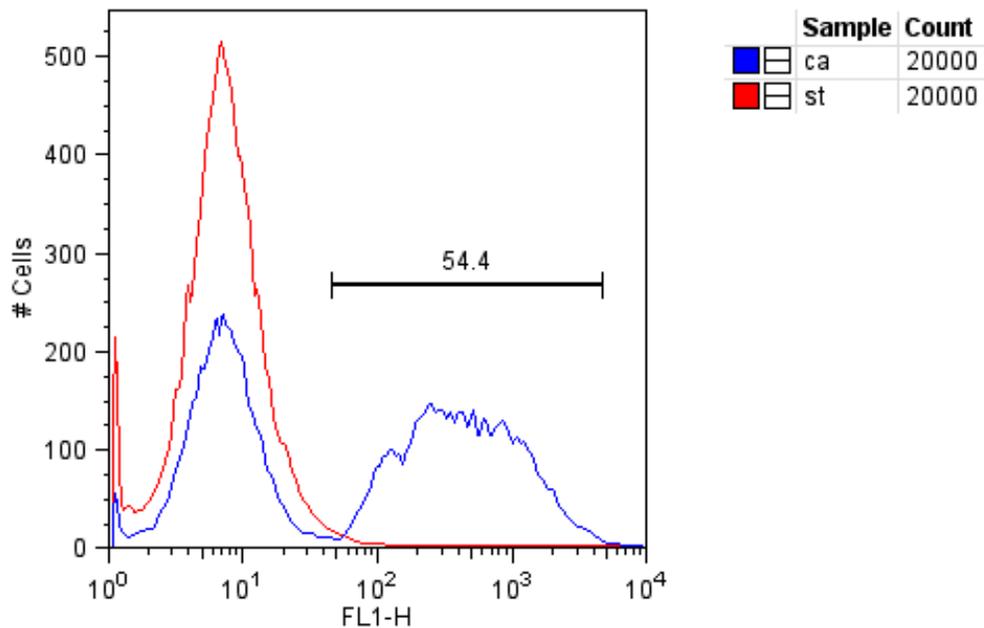


Figura 12. Fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC. Las BMDC se incubaron con amastigotes de *L. mexicana* marcados con CFDA-SE con un cociente de infección de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h. El histograma rojo (st) muestra la población de BMDC sin parásitos. El histograma azul (ca) muestra la población de BMDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* durante 24 h, donde se aprecia que el porcentaje de células con la marca del CFDA-SE es del 54.4%. El eje de las X representa el número de eventos mientras que el eje de las Y representa la intensidad de fluorescencia.

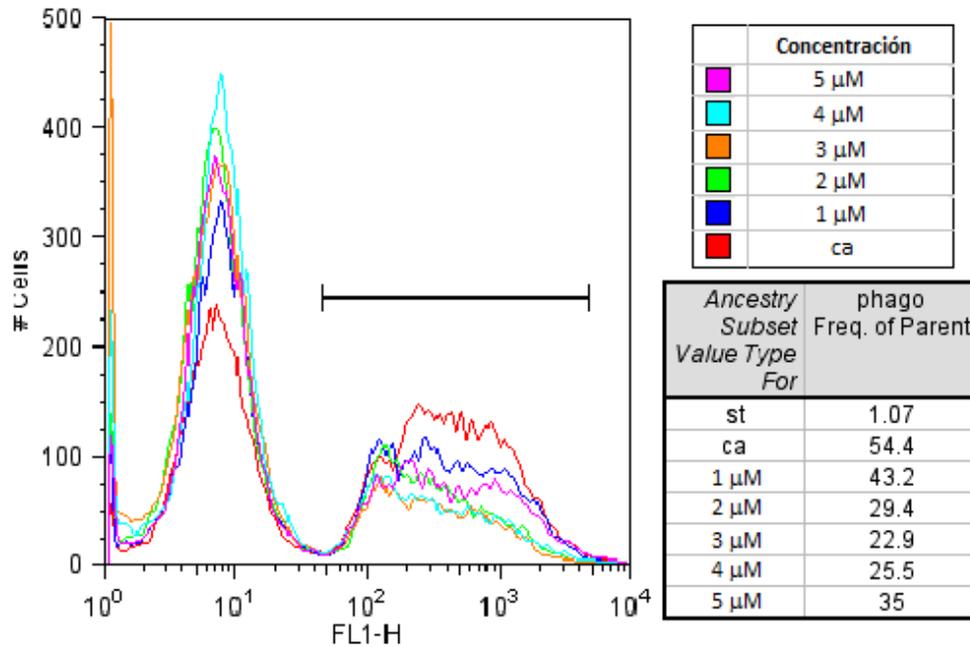


Figura 13. Determinación de la concentración óptima de citocalasina-D. 1×10^6 BMDC se incubaron con diferentes concentraciones de citocalasina-D (1 μ M a 5 μ M) y se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* teñidos con CFDA-SE con un cociente de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h. La fagocitosis de los parásitos por las BMDC se analizó por citometría de flujo evaluando 20,000 eventos. (st) muestra a la población de BMDC sin amastigotes, (ca) muestra a la población de BMDC infectadas con amastigotes sin citocalasina-D.

VI.3 Comparación de la fagocitosis por las BMDC de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC y DIACT mediante citometría de flujo, microscopía óptica y microscopía de fluorescencia

Una vez determinada la concentración óptima de la citocalasina-D, procedimos a analizar la fagocitosis por las BMDC de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC (aislada de un paciente con LCL) y de la cepa DIACT (aislada de un paciente con LCD). Para esto, las BMDC se infectaron con los amastigotes de una u otra cepa marcados con CFDA-SE con un coeficiente de infección de 5:1 (amastigotes:célula) durante 24 h y la fagocitosis se analizó por citometría de flujo.

VI.3.1 Citometría de flujo

El análisis se llevó a cabo evaluando 20,000 eventos por condición y el porcentaje de células que fagocitaron a los amastigotes se analizó mediante gráficas de punto o dot plot con las que se definieron las poblaciones celulares de acuerdo a granularidad o complejidad contra tamaño celular. La población celular registrada por el citómetro se dividió en cuatro regiones con la finalidad de descartar poblaciones celulares que no eran de interés como por ejemplo células muertas. Los porcentajes obtenidos en cada región se muestran en los histogramas en los que el eje de las X muestra la intensidad de fluorescencia y el de las Y el número de células. La Figura 14 muestra la condición basal de BMDC sin infectar en la que se observa una intensidad de fluorescencia entre 1 y 2% debida a la fluorescencia basal de las células, ya que éstas no fueron infectadas con amastigotes marcados con CFDA-SE.

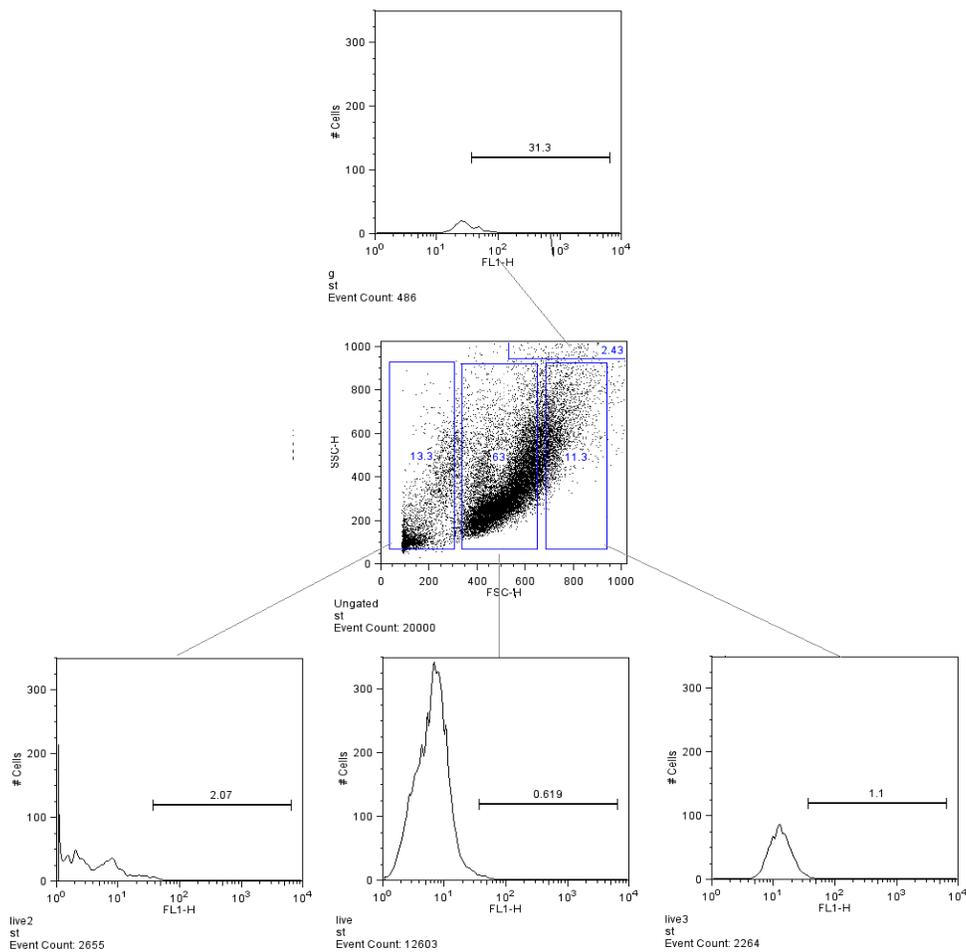


Figura 14. Análisis por citometría de flujo de las BMDC sin infectar. Las BMDC se fijaron y analizaron por citometría de flujo. La población total de BMC se regionalizó en 4 poblaciones y se muestra la intensidad de fluorescencia presentada por cada una de las poblaciones. Se muestra un experimento representativo (n=4).

Las BMDC infectaron con amastigotes de la cepa LAC, obtenida de un paciente con LCL, o con la cepa DICT, obtenida de un paciente con LCD, marcados con CFDA-SE con un cociente de infección de 5:1 (parásitos:célula) a 33 °C con 5% de CO₂ durante 24 h durante 24 h. Posteriormente las células se fijaron y se analizaron por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 15, la población total de BMDC infectadas con la cepa LAC (A) y con la cepa DICT (B) se regionalizó en 4 poblaciones y se evaluó la intensidad de fluorescencia de las cuatro regiones que se indica en los diferentes histogramas. La región en la que se concentró el mayor número de células se indica con el símbolo ▲. En esta población el porcentaje promedio de 4 experimentos fue 39.87%, de las BMDC fluorescieron, lo que indica que tenían amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC unidos o fagocitados, en la Fig. 15 A se muestra un experimento representativo. En el caso de las BMDC infectadas con la cepa DICT, en la región donde se ubicó el mayor número de células, el porcentaje promedio fue de 33.75% (Fig. 15 B experimento representativo) que mostraron amastigotes unidos o fagocitados. Debido a que el porcentaje de células fluorescentes nos indicaba que las BMDC podían tener a los amastigotes unidos o en el interior, empleamos citocalasina-D, un inhibidor de la polimerización de actina, el cual impide que se lleve a cabo el proceso de fagocitosis. Previamente se realizó una curva dosis-respuesta con la que se determinó que la concentración de 3 μM era la concentración idónea con la que no se dañaban las células (Fig. 13). Las BMDC se incubaron con 3 μM de citocalasina-D durante 30 min y posteriormente se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC o de la cepa DICT. Las células se trataron y se analizaron por citometría de flujo en la forma ya descrita. El porcentaje de BMDC fluorescentes que no fueron tratadas con la citocalasina-D (Fig. 15) se restó al porcentaje de BMDC tratadas con la citocalasina-D (Fig. 16 A y B), (experimentos representativos de una n=4) con lo cual se obtuvo el porcentaje de BMDC que fagocitaron a los amastigotes marcados con CFDA-SE. El porcentaje promedio de BMDC que fagocitaron a los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC fue de 13.85% mientras que el porcentaje de BMDC que fagocitaron a la cepa DICT fue del 9.6%. Se realizó una prueba estadística de t de student, la cual no arrojó diferencias significativas entre los porcentajes de fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC y la DICT. Se observó una mayor interacción de las BMDC con la cepa LAC en comparación con la cepa DICT después de 24 h de incubación (Fig. 17).

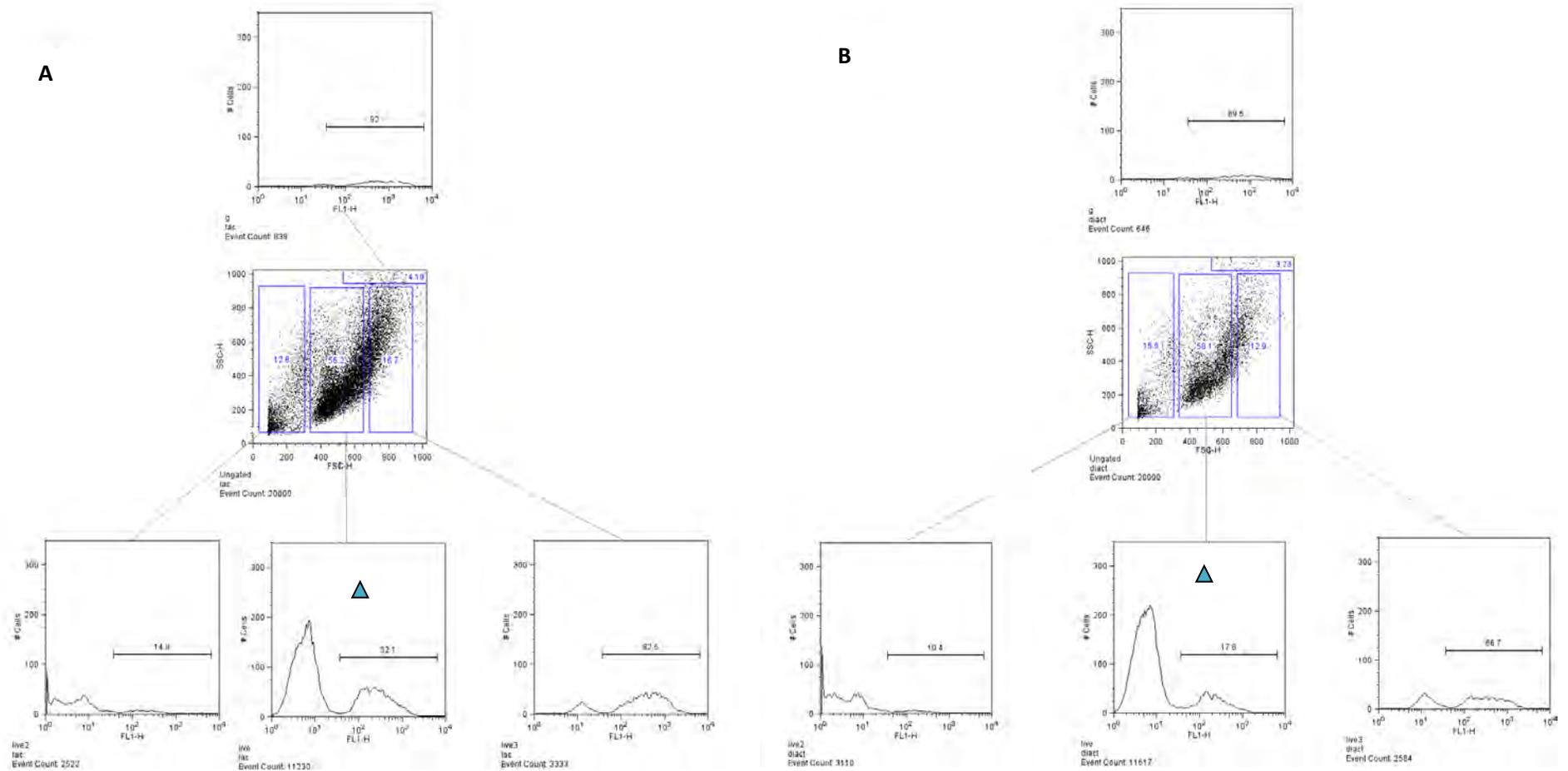


Figura 15. Interacción de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT. Las BMDC se incubaron con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC o DIACT con un cociente de infección de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h, posteriormente las células se fijaron y se analizaron por citometría de flujo. Se evaluaron 20000 eventos, la población total de BMDC infectadas se regionalizó en 4 poblaciones y se tomó como población principal la población marcada en los histogramas con un ▲. A) BMDC infectadas con la cepa LAC. B) BMDC infectadas con la cepa DIACT. Se muestra un experimento representativo de (n=4).

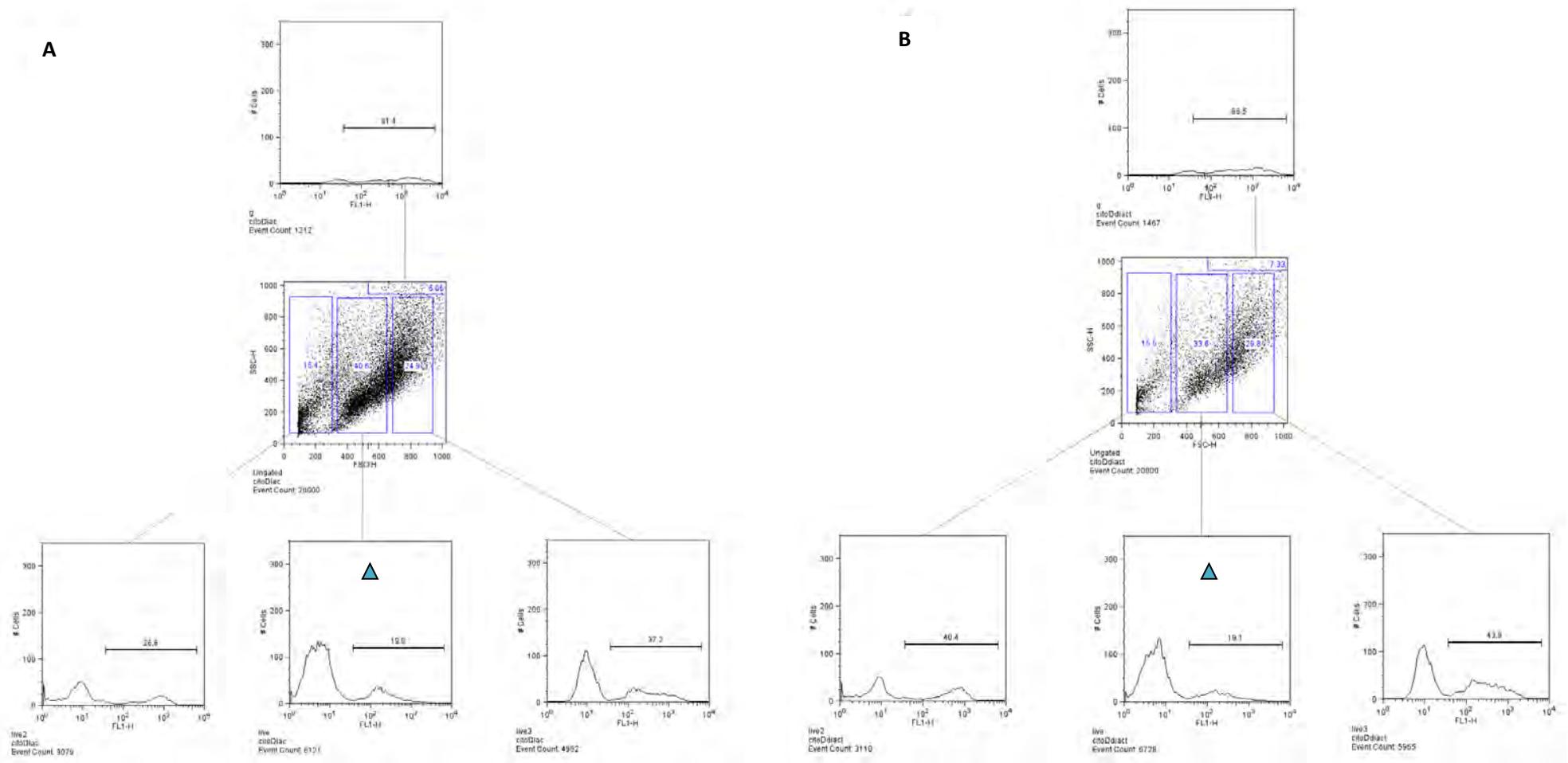


Figura 16. Interacción de las BMDC tratadas con citocalasina-D con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACt. Las BMDC se incubaron con 3 μ M de citocalasina D durante 30 min y posteriormente se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC o DIACt con un cociente de infección de 5:1 (paísitos:célula) durante 24 h, posteriormente las células se fijaron y se analizaron por citometría de flujo. Se evaluaron 20000 eventos, la población total de BMDC infectadas se regionalizó en 4 poblaciones y se tomó como población principal la población marcada en los histogramas con un \blacktriangle . A) BMDC infectadas con la cepa LAC. B) BMDC infectadas con la cepa DIACt. Se muestra un experimento representativo de (n=4).

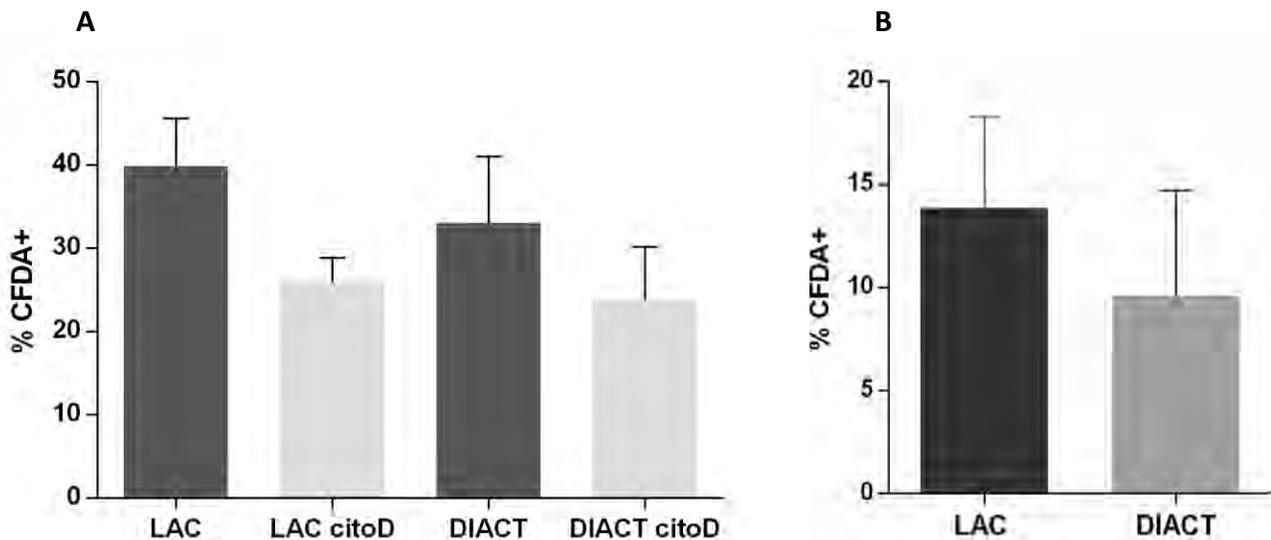


Figura 17. Comparación de los porcentajes de fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT determinados mediante citometría de flujo. A) porcentaje de BMDC tratadas con citocalasina-D (gris claro) o sin tratamiento (gris oscuro) que interactuaron con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC o DIACT marcados con CFDA-SE. B) porcentaje total de BMDC con amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas marcados con CFDA-SE. Se muestran los promedios \pm S.E.M. de 4 experimentos independientes.

VI.3.2 Microscopía de fluorescencia y microscopía óptica

Para reforzar la hipótesis de que los amastigotes estaban siendo fagocitados por las BMDC, se procedió a realizar un análisis mediante microscopía de fluorescencia y óptica bajo las mismas condiciones que se utilizaron en el análisis por citometría de flujo. Esto con la finalidad de demostrar si efectivamente los amastigotes se encontraban en el interior de las células en la condición sin citocalasina-D y únicamente adheridos o fagocitados en menor proporción con el tratamiento con la citocalasina-D. Las BMDC se adherieron a cubreobjetos tratados con poli-L-lisina, se trataron con citocalasina-D, se infectaron con las dos cepas de *L. mexicana* (LAC y DIACT) en un cociente de 5:1 durante 24 h y posteriormente se incubaron con suero anti-*Leishmania mexicana mexicana* durante 30 min. El marcaje fluorescente de las células se realizó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), con concanavalina A (ConA) acoplado a TRITC y DAPI. Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia con una cámara digital. Se observó que los amastigotes de ambas cepas de *L. mexicana* fueron

fagocitados por las BMDC después de 24 h de interacción con las células. En la figura 18 (A y C) se observa que los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y D1ACT se encuentran dentro de las BMDC. El tratamiento de las BMDC con 3 μ M de citocalasina-D (Figura 18 B y D), disminuyó la fagocitosis de los amastigotes, ya que no se observa que los parásitos de ambas cepas se encuentren dentro de las BMDC. En estas condiciones se observa que los amastigotes de ambas cepas formaron cúmulos fuera de las BMDC. Esto probablemente se debió a la interacción de la citocalasina-D con los filamentos de actina de las células dendríticas, lo que evitó la polimerización de dichos filamentos e inhibió el proceso de fagocitosis. Las imágenes obtenidas por microscopia de fluorescencia permiten confirmar que los amastigotes fueron reconocidos y fagocitados por las BMDC que no fueron tratadas con citocalasina-D y en el caso de las BMDC tratadas con el inhibidor de la fagocitosis los parásitos no fueron internalizados por las células.

Para observar la formación de vacuolas y cuantificar el número de amastigotes contenidos en dichas vacuolas, se realizó una tinción con Giemsa de las BMDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* de ambas cepas durante 24 h (Figura 19). De igual manera se utilizó 3 μ M de citocalasina-D para inhibir la fagocitosis (Fig. 19 A y C). En este caso, tanto para la cepa LAC (Fig. 19 A) como para la cepa D1ACT (Fig. 19 C) no hubo formación de vacuolas y se puede observar que los amastigotes se encuentran adheridos a las células o fuera de éstas. Contrariamente, en las condiciones de infección en donde no se utilizó citocalasina-D, tanto para la cepa LAC (Fig. 19B) como la D1ACT (Fig. 19 D), se observa la formación de múltiples vacuolas dentro de las cuales se alberga a más de un parásito, esto es característico de la especie *L. mexicana* a diferencia de otras especies, fenómeno que fue claramente observado. Se observó que el número de amastigotes fagocitados para la cepa LAC fue un promedio de 375 parásitos por cada 100 BMDC, es decir 3.7 amastigotes por cada BMDC, y para la cepa D1ACT fue un promedio de 451.5 por cada 100 BMDC, es decir 4.51 amastigotes por cada BMDC, sin diferencias significativas entre cada cepa (Fig. 20 A y B). El número de vacuolas parasitóforas para la cepa LAC fue un promedio de 138.8 por cada 100 BMDC, es decir 1.3 vacuolas por cada BMDC, mientras que para la cepa D1ACT el promedio fue de 244.7 vacuolas por cada 100 BMDC, es decir 2.4 vacuolas por cada BMDC, con diferencias significativas entre ambas cepas ($p < 0.05$), de acuerdo a la prueba t de student. Siendo la cepa D1ACT de leishmaniasis cutánea difusa, la que mayor número de vacuolas indujo durante la infección *in vitro* de las BMDC comparada con la cepa LAC de leishmaniasis cutánea difusa (Fig. 20 A y B).

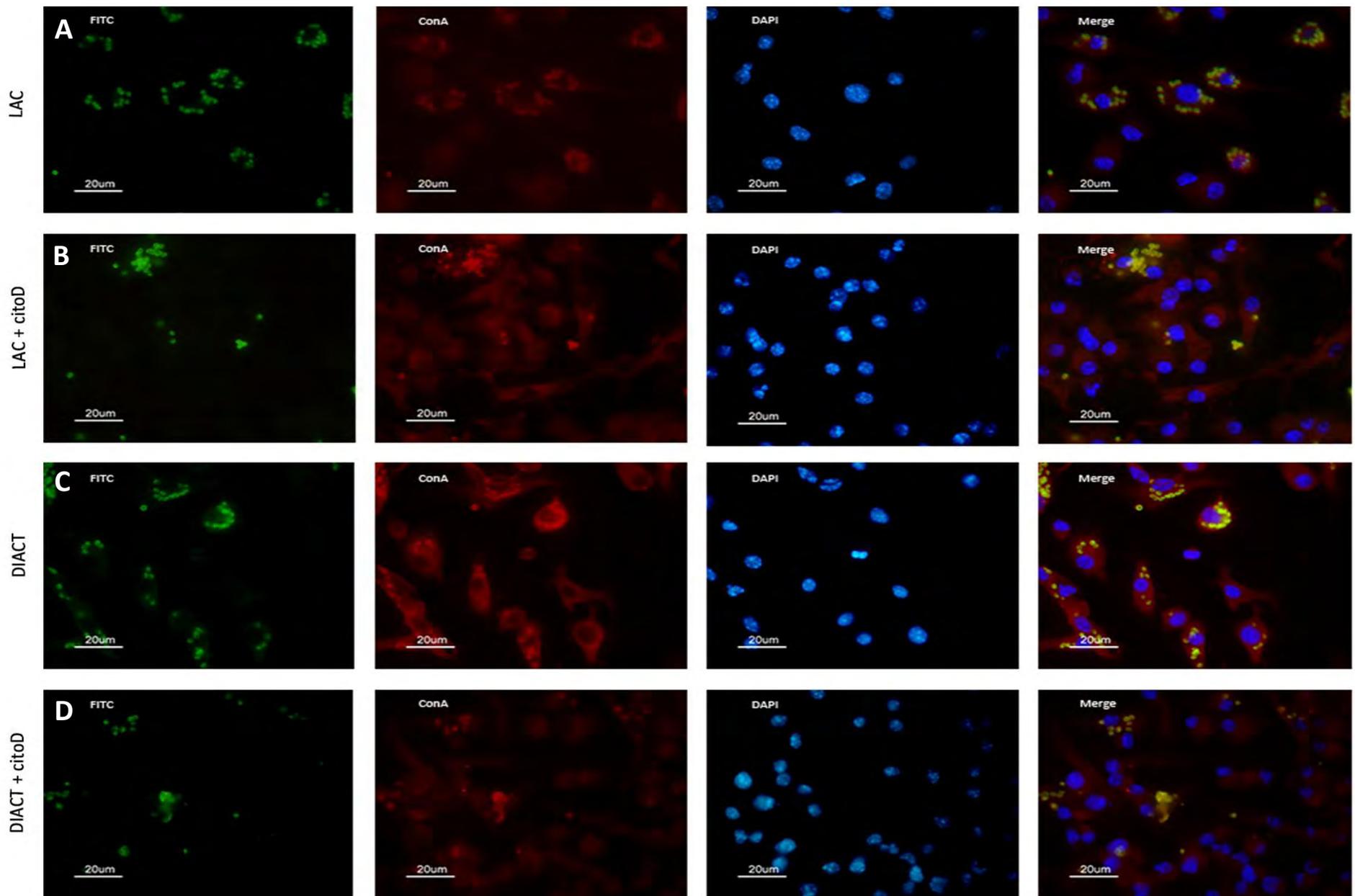


Figura 18. Microscopía de fluorescencia de la interacción de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT. Las BMDC se adhirieron a cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina, se trataron con citocalasina-D y se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC o DIACT durante 24 h. Las BMDC se incubaron con un suero anti-*Leishmania* y un anticuerpo anti-IgG-FITC, concanavalina-A TRITC y DAPI. A) amastigotes de la cepa LAC teñidos con FITC (verde), membranas de las BMDC con Con A (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul). B) amastigotes de la cepa LAC más citocalasina-D. C) amastigotes de la cepa DIACT teñidos con FITC (verde), membranas de las BMDC con Con-A (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul). D) amastigotes de la cepa DIACT más citocalasina-D.

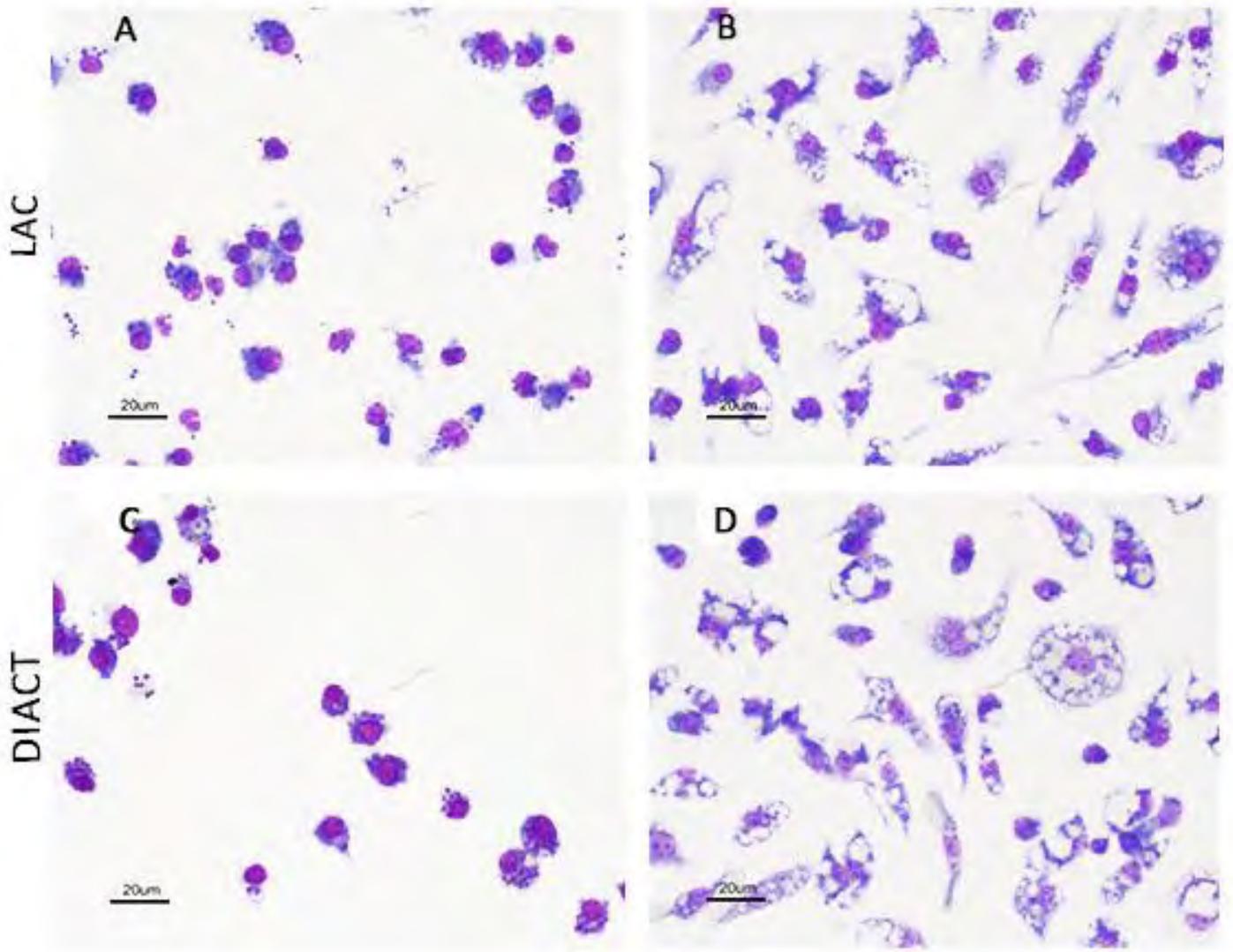


Figura 19. Tinción con Giemsa de las BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT. Las BMDC se adhirieron a cubreobjetos tratados con poli-L-Lisina, se trataron con citocalasina-D, se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT y se tiñeron con Giemsa. A) BMDC tratadas con citocalasina-D (3µM) e infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC. B) BMDC infectadas con amastigotes de la cepa LAC. C) BMDC tratadas con citocalasina-D (3µM) e infectadas con amastigotes de la cepa DIACT. D) BMDC infectadas con amastigotes de la cepa DIACT.

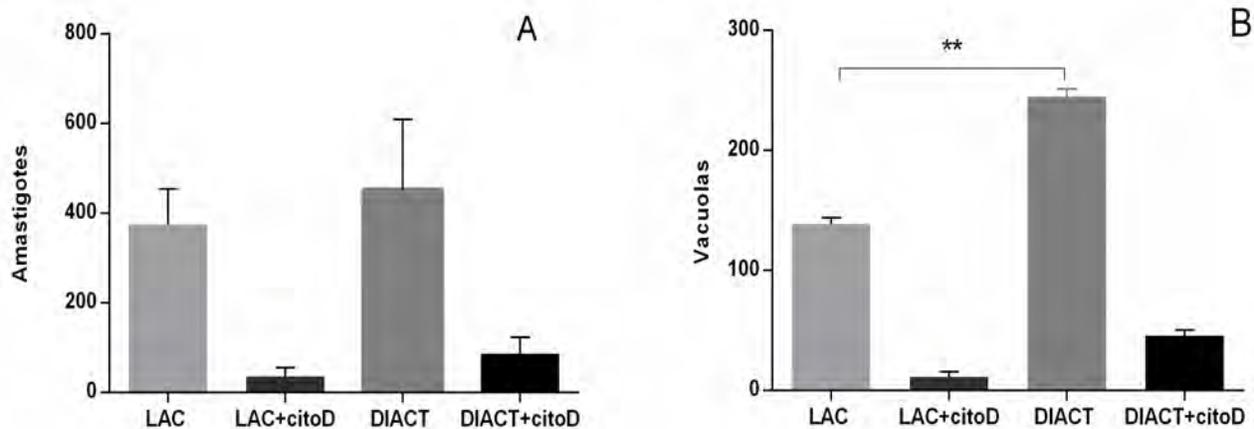


Figura 20. Cuantificación de las vacuolas parasitóforas y amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT en las BMDC. Las BMDC se infectaron con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC o DIACT con un cociente de infección de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h, se tiñeron con Giemsa y realizó un conteo del número de amastigotes (A) y de vacuolas parasitóforas (B) por cada 100 BMDC. (** $p < 0.05 \pm$ S.E.M.).

VI.4. Determinación de la producción de citocinas por las BMDC infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT

Una vez determinada la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT por las BMDC, procedimos a analizar el efecto de ambas cepas en la producción de citocinas por las BMDC. Se analizó la producción de IL-10, TNF- α e IL-12. 1×10^5 BMDC se estimularon con LPS, IFN- γ y LPS+IFN- γ y se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC o DIACT con un coeficiente de infección de 5:1 (parásitos:célula) durante 24 h. Posteriormente se obtuvieron los sobrenadantes y la producción de las diferentes citocinas se determinó mediante la técnica de ELISA. Como se observa en la Fig. 21 A, la interacción de las BMDC con los amastigotes de *L. mexicana* de la cepa DIACT indujo una mayor producción de IL-10 en comparación con la obtenida al incubar las BMDC con la cepa LAC o en las BMDC sin estímulo. En las BMDC estimuladas con IFN- γ (citocina pro-inflamatoria que reduce la producción de IL-10), se observó que los niveles de IL-10 en efecto fueron menores en comparación con los niveles en las BMDC no estimuladas con esta citocina, y se observó la tendencia de la cepa DIACT de estimular una mayor producción de IL-10 en comparación con la cepa LAC y las BMDC sin infectar (Fig. 21A). El estímulo de las BMDC con LPS provocó una menor producción de IL-10 en las BMDC infectadas con la cepa DIACT en comparación con las BMDC infectadas con la cepa LAC. El LPS estimula la maduración de las BMDC y se sabe que en etapas tempranas de maduración este producto microbiano eleva la producción de IL-10 y no así durante un estímulo prolongado (superior a 22 horas). El estímulo que se aplicó fue prolongado por lo que se esperaban niveles menores de esta citocina. Se observa que

el estímulo de las BMDC con LPS provocó una mayor producción de IL-10 en las células infectadas con la cepa LAC en comparación con la infección con la cepa DIACT y la producción de la IL-10 en las BMDC sin estímulo estuvo por debajo de ambas. Cuando las BMDC se estimularon con LPS e IFN- γ se observó la misma tendencia en la que células infectadas con la cepa DIACT produjeron niveles mayores de IL-10 en comparación con el control y la infección con la cepa LAC, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En relación a la producción de la citocina pro-inflamatoria TNF- α (Fig. 21B) se observó que la producción obtenida en las BMDC infectadas con la cepa DIACT (sin estímulos adicionales) fue mayor en comparación con la producción obtenida por las BMDC estimuladas con IFN- γ e infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*. Ambas cepas inhibieron la producción de TNF- α , siendo este fenómeno más visible en la cepa LAC comparado con las células que no se infectaron con los amastigotes de *L. mexicana*, en las cuales hubo un aumento considerable en la producción de TNF- α .

La citocina pro-inflamatoria IL-12 está compuesta por dos subunidades que son p40 y p35. Se analizó la producción de p40 y de la forma biológicamente activa que es la p70. Como se muestra en la Fig. 21 C, las BMDC sin estímulos e infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* produjeron una mayor cantidad de IL-12 p40 cuando fueron infectadas con la cepa LAC. Cuando las BMDC se estimularon con IFN- γ o con LPS, las células sin infectar produjeron una mayor cantidad de IL-12 p40 en comparación con las células infectadas con los amastigotes de la cepa LAC o la DIACT que produjeron cantidades similares sin diferencias significativas. El estímulo de las BMDC con LPS+IFN- γ indujo en las BMDC infectadas con la cepa DIACT una mayor producción de IL-12 p40 en comparación con las infectadas con la cepa LAC, la cual fue estadísticamente significativa. La producción de IL-12 p40 por las BMDC estimuladas con LPS + IFN- γ y sin infectar fue muy similar a la obtenida con las células infectadas con la cepa LAC. En relación a la producción de la forma bioactiva de la IL-12, la p70, en la Fig. 21 D se muestra que las BMDC no estimuladas e infectadas con amastigotes de la cepa DIACT produjeron una mayor cantidad de IL-12 p70 en comparación con la producción por las BMDC no infectadas o infectadas con la cepa LAC (sin diferencias significativas). Las BMDC estimuladas con IFN- γ y no infectadas produjeron una mayor cantidad de IL-12 p70 en comparación con las infectadas con las cepas LAC o DIACT, siendo menor la producción en las BMDC infectadas con la DIACT. Las BMDC estimuladas con LPS o con LPS + IFN- γ mostraron un aumento en la producción de IL-12 p70 cuando se infectaron con la cepa

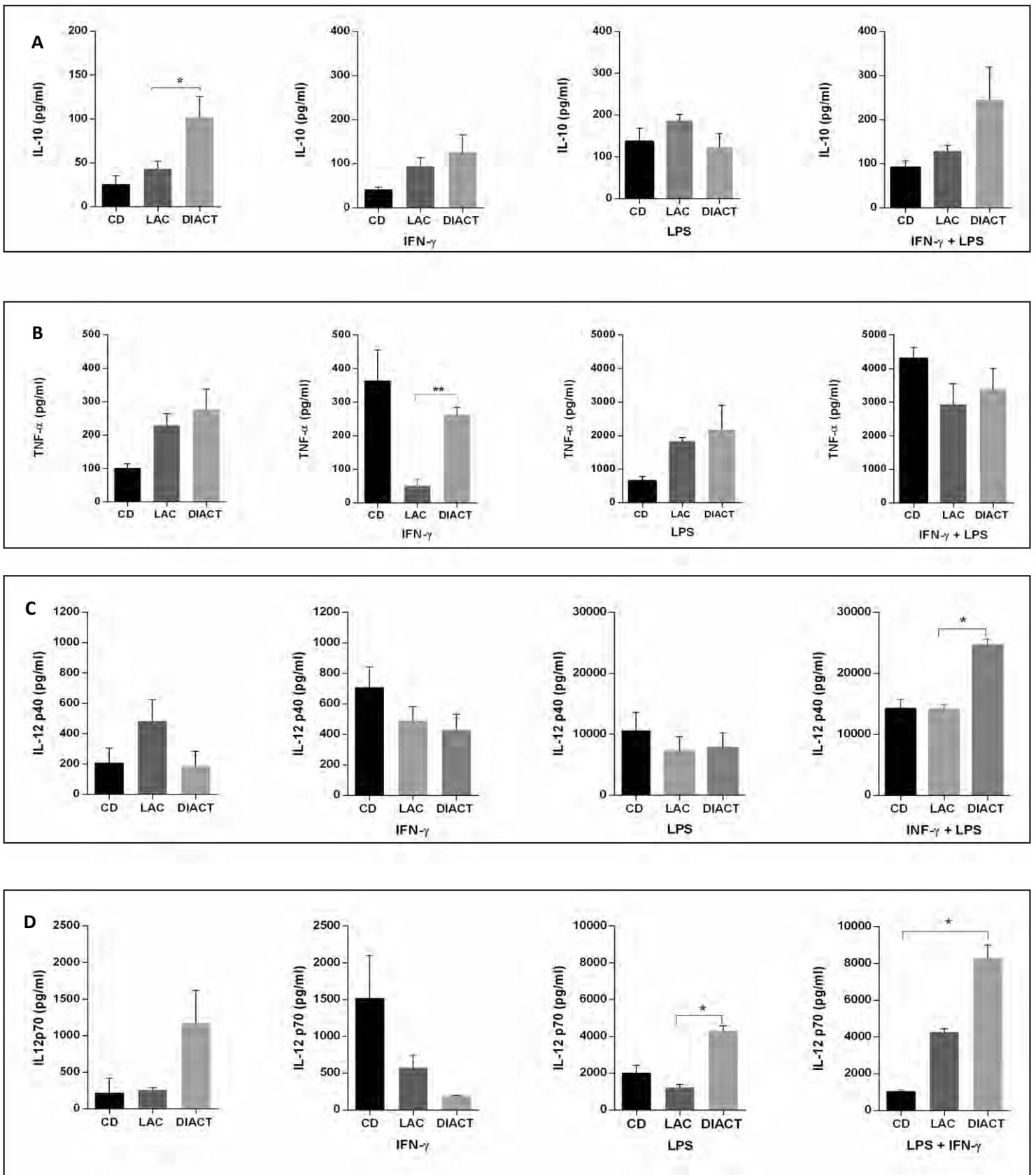


Figura 21. Producción de citocinas por las BMDC infectadas con amastigotes de *L. mexicana* de las cepas LAC y DIACT. A) producción de IL-10 (pg/ml) sin estímulos, con IFN- γ , LPS y LPS+IFN- γ . **B)** producción de TNF- α (pg/ml) sin estímulos, con IFN- γ , LPS y LPS+IFN- γ . **C)** producción de IL-12 p40 sin estímulos, con IFN- γ , LPS y LPS+IFN- γ . **D)** producción de IL-12 p70 sin estímulos, con IFN- γ , LPS y LPS+IFN- γ . (*, ** p < 0.05 \pm S.E.M.)

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por parásitos del género *Leishmania* que se caracterizan por presentar diversas formas clínicas, las cuales se atribuyen principalmente a la respuesta inmune de los individuos infectados y a la especie del parásito. Una misma especie de *Leishmania*, como es el caso de *L. mexicana*, puede causar dos formas clínicas de características muy diferentes como son la leishmaniasis cutánea localizada y la leishmaniasis cutánea difusa. Debido a esto, es probable que existan diferencias intraespecíficas que influyan en el desarrollo de una forma clínica u otra. *Leishmania* es un parásito intracelular que infecta diferentes tipos celulares, pero principalmente macrófagos y células dendríticas. La fagocitosis de *Leishmania* por los macrófagos ha sido ampliamente estudiada y se han determinado los receptores implicados en la fagocitosis de los promastigotes y los amastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (Real, F. *et al.* 2008; Moradin y Descoteaux, 2012; Descoteaux y Turco, 2002). En el caso de las células dendríticas, la fagocitosis de *Leishmania* ha sido mayormente estudiada en el modelo murino con *L. major* (Woelbing F., *et al.* 2006; Kautz-NeuK., *et al.* 2012; Ritter U., *et al.* 2004) y en el modelo humano con otras especies. Recientemente nuestro grupo de trabajo demostró que las células dendríticas derivadas de monocitos humanos fagocitan promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* y en la fagocitosis de los promastigotes participa el receptor DC-SIGN (Argueta-Donohué J., *et al.* 2015). Se ha determinado que en la fagocitosis de *Leishmania* por los macrófagos existen diferencias importantes entre distintas especies de *Leishmania*, ya que la composición molecular en la superficie de las diferentes especies tiene variaciones, lo que hace que las interacciones con los receptores celulares del hospedero sean diversas (Ueno N. y Wilson M.E., 2012). Debido a esto seleccionamos al proceso de fagocitosis como un parámetro para analizar si existen diferencias entre una cepa de *Leishmania* aislada de una paciente con leishmaniasis cutánea localizada y una cepa aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea difusa. Como ya se mencionó, la respuesta inmune del hospedero juega un papel muy importante en el desarrollo de una forma clínica u otra. Se ha demostrado que una respuesta de tipo Th1 lleva al control de la enfermedad, mientras que el desarrollo de una respuesta Th2 conduce a la exacerbación. Analizamos también el efecto de las dos diferentes cepas en la producción de citocinas por células dendríticas murinas obtenidas a partir de médula ósea de ratones susceptibles a la infección por *L. mexicana*. Esta especie es la principal causante en México de LCL y LCD.

Se diferenciaron células dendríticas a partir de precursores presentes en la médula ósea de ratón. La diferenciación se logró por la adición del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) presente en el sobrenadante de cultivo de la línea X-63. Después de 7 días de incubación de las células de la médula ósea con el GM-CSF se obtuvieron células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC). El proceso de diferenciación se llevó a cabo de manera eficiente, ya que el 71.6% presentó el marcador CD11c, 98.1% el marcador CD11b, 68.4% fueron positivas a MHCII. Las BMDC presentaron niveles bajos de moléculas coestimuladoras (10.2%), lo cual indicó que las células se encontraban en estado inmaduro lo cual era muy importante, ya que evaluamos el efecto de las diferentes cepas de *L. mexicana* en la fagocitosis y requeríamos células inmaduras que son células fagocíticas. Una vez diferenciadas y caracterizadas las BMDC procedimos a analizar si existían diferencias en la fagocitosis de amastigotes de dos diferentes cepas de *L. mexicana* por las BMDC. Se utilizó la cepa LAC obtenida de una paciente con leishmaniasis cutánea localizada que se infectó en la Selva Lacandona y la cepa DIIACT obtenida de una paciente de Tabasco con leishmaniasis cutánea difusa. Los amastigotes de ambas cepas se tiñeron con CFDA-SE que es un compuesto fluorescente que no afecta la viabilidad de los parásitos. Las BMDC se infectaron con los amastigotes de la cepa LAC o DIIACT durante 24 h y la fagocitosis se evaluó mediante citometría de flujo. Se encontró que las BMDC fueron capaces de fagocitar los amastigotes de ambas cepas de *L. mexicana*, aunque la cepa LAC fue mayormente fagocitada en comparación con la DIIACT. Se puede apreciar que el cociente de infección de las BMDC con amastigotes de ambas cepas después de 24 h es mayor en comparación con cociente de infección inicial. Nuestros resultados sobre la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* coinciden con resultados previos que demostraron que las CD en un estado inmaduro son capaces de fagocitar a los promastigotes y los amastigotes de *L. major*, siendo la forma de amastigote mayormente fagocitada por las BMDC (Prina E., 2004). En la fagocitosis de los amastigotes de *L. major* por las células dendríticas murinas se ha demostrado que el receptor implicado es el FcγR (Woelbing F., et al. 2006), lo que involucra a la opsonización de los amastigotes como un requisito para ser fagocitados. En este trabajo utilizamos amastigotes axénicos, los cuales no tienen IgG en la superficie (Argueta-Donohué J., et al, 2015). El análisis de la fagocitosis por citometría de flujo se basa en la detección de los parásitos marcados fluorescentemente en las células, los cuales pueden estar en el interior o unidos a la superficie. Para poder distinguir entre las BMDC con parásitos unidos o fagocitados empleamos citocalasina-D, un inhibidor de la polimerización de actina, el cual impide que se lleve a cabo el proceso de fagocitosis. Los porcentajes de fagocitosis

se obtuvieron al restar el porcentaje de BMDC con citocalasina-D al porcentaje de BMDC tratadas con citocalasina-D. Los porcentajes de fagocitosis obtenidos fueron bajos, (13.85% para la cepa LAC y 9.6% para la cepa DIACT). Esto podría deberse a la correcta discriminación entre parásitos unidos y fagocitados y a que los amastigotes no fueron opsonizados, lo que impidió la utilización del receptor FcγR para lograr la fagocitosis. Diversos estudios han encontrado diferencias en la fagocitosis de amastigotes y promastigotes opsonizados y sin opsonizar. Por ejemplo, se ha reportado que los amastigotes de *L. mexicana* y *L. braziliensis* son eficientes infectando CD en ausencia de anticuerpos (Soong L., 2008). De igual manera se han encontrado diferencias *in vitro* donde la fagocitosis se ha visto reducida en comparación con la fagocitosis *in vivo* (Kautz-Neu K., *et al.* 2012).

De manera interesante encontramos que los amastigotes de la cepa LAC, obtenida de un paciente con LCL fueron fagocitados por las BMDC en mayor grado en comparación con la cepa DIACT obtenida de un paciente con LCD. La diferencia no fue estadísticamente significativa, pero se observó esta tendencia. Esto podría hablar de diferencias en las moléculas de superficie de los amastigotes que favorecen más la fagocitosis de una cepa en comparación con la otra. Se ha demostrado que existen numerosos glicoconjugados que se encuentran expresados diferencialmente dependiendo del estadio del parásito, dichos glicoconjugados podrían estar involucrados en la unión del parásito a las CD (Prina E., *et al.* 2004). En macrófagos se ha encontrado que hay un reconocimiento de múltiples ligandos del parásito tales como LPG, carbohidratos de superficie y fosfatidilserina, los cuales podrían contribuir a producir diferentes cuadros clínicos. De acuerdo con resultados obtenidos por Farias y cols. (Farias, *et al.*, 2013) se ha sugerido que la expresión diferencial de la fosfatidilserina y carbohidratos en la superficie de dos diferentes cepas de *L. braziliensis* podrían modular el curso de la enfermedad. A diferencia de los promastigotes, los amastigotes de *Leishmania* son en gran medida deficientes de LPG y presentan características diferentes. Se ha demostrado que algunas especies del parásito tales como *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. donovani* pueden ser reconocidos por el receptor de superficie DC-SIGN de manera independiente de LPG y dicha unión no induce la maduración de las CD (Soong L., 2008). Así mismo se han observado diferencias en la interacción de *Leishmania* y las CD a través de DC-SIGN entre especies de *Leishmania* que causan LC (Colmenares M., *et al.* 2004). Además de analizar la fagocitosis de los amastigotes de *L. mexicana* por las BMDC por citometría de flujo lo hicimos por microscopía óptica y microscopía de fluorescencia. En ambos casos corroboramos las BMDC sin tratamiento con citocalasina-D fagocitaron en mayor grado a los amastigotes de *L.*

mexicana en comparación con las células tratadas con el inhibidor de la fagocitosis. Además, las preparaciones teñidas con Giemsa nos permitieron analizar las vacuolas y cuantificar el número de parásitos en el interior y observamos que el número de amastigotes al interior de las BMDC fue similar entre las dos cepas, pero hubo un mayor número de vacuolas parasitóforas cuando las BMDC fueron infectadas con amastigotes de la cepa DICT en comparación a las BMDC infectadas con la cepa LAC. Estos resultados concuerdan con los reportados por Pereira y cols. (Pereira C.G, *et al.* 2009) en los que observaron que diferentes aislados de *L. braziliensis* tuvieron un patrón diferente en la formación de vacuolas en macrófagos y en las lesiones causadas a ratones BALB/c. De igual manera Alimohamadian y cols. (Alimohamadian M.H., *et al.* 2010) demostraron que cuatro aislados de *L. major* presentaban polimorfismos y diferencias significativas en cuanto a tamaño de las lesiones y carga parasitaria en los nódulos linfáticos de ratones susceptibles. Otro estudio analizó 19 cepas de *L. major* y observaron que los promastigotes y los amastigotes presentaron una variabilidad significativa en la patogenicidad en ratones susceptibles BALB/c. Las cepas fueron clasificadas en 3 diferentes niveles de virulencia (alto, intermedio y bajo). Así mismo se encontró que las cepas con alta virulencia infectaron *in vitro* a macrófagos derivados de médula ósea durante las primeras 2 horas de infección y presentaron una mayor sobrevivencia dentro de los macrófagos en comparación con las cepas de menor virulencia (Kébaïer C., *et al.* 2001). Estas diferencias entre la formación de vacuolas podrían atribuirse a la manera en que los amastigotes pueden influenciar el ambiente alterando el sistema endocítico de la célula hospedera para la adquisición de nutrientes del parásito (Burchmore R. J. y Barret M., 2001).

Está demostrado que el perfil de citocinas que se produce durante la infección con *Leishmania* está correlacionado con el cuadro clínico que se manifieste y las CDs son una fuente muy importante de producción de citocinas ante la infección con *Leishmania*. En la leishmaniasis murina la resistencia a la enfermedad se ha asociado con la respuesta de tipo Th1 que se caracteriza por la producción de citocinas tales como IL-12 e IFN- γ y la susceptibilidad se ha asociado a una respuesta inmune de tipo Th2 con la producción de citocinas tales como IL-4, IL-5 e IL-10 (Bomfim G., 1996). Debido a esto nos interesó estudiar el efecto de las diferentes cepas de *L. mexicana* en la producción de citocinas por las BMDC. Analizamos la producción de IL-10, IL-12 (p40/p70) y TNF- α en células infectadas con la cepa LAC o la DICT y estimuladas con LPS, IFN- γ o LPS + IFN- γ . Observamos que en las BMDC infectadas, pero sin ningún estímulo, la producción de IL-10 aumentó con la cepa DICT en comparación con la infección con la cepa LAC. El aumento en la producción de esta citocina anti-inflamatoria con la cepa DICT, de mayor virulencia en

comparación con la LAC dado el cuadro clínico que provoca, correlaciona con lo observado por Kebái y cols. que analizaron el efecto de las diferentes cepas de *L. major* en la producción de citocinas y encontraron que las cepas de mayor virulencia fueron capaces de inducir tempranamente IL-4 (Kébaïer C., *et al.* 2001). Encontramos que cuando las BMDC fueron estimuladas con de IFN- γ e infectadas con los amastigotes de *L. mexicana*, hubo una mayor producción de IL-10 con la cepa DIACT en comparación con la cepa LAC. Este resultado no era esperado, ya que se ha demostrado que el IFN- γ inhibe la producción IL-10 (Hu X., *et al.* 2006). Estudios realizados en células de pacientes con LCL demostraron una baja expresión del RNA mensajero para IFN- γ e IL-2 que se asoció con altos niveles del RNA mensajero para IL-10 (Bomfim *et al.* 1996). La producción de IL-10 se ha relacionado con la progresión de las lesiones en pacientes con LC en humanos y en ratones infectados con *L. major* se ha visto un patrón similar a pesar de la producción de IFN- γ . Se ha observado también que la inducción de IL-10 vía TLR2 promueve respuestas de tipo Th2 in vivo. Además, ratones BALB/c IL-10^{-/-} mostraron cierta resistencia a la infección por *Leishmania* (Kane M.M., y Mosser D.M., 2001). La mayor inducción de citocinas anti-inflamatorias por cepas de *Leishmania* de mayor virulencia se demostró también en un estudio realizado por Baptista-Fernandes y cols. (Baptista-Fernandes T., *et al.* 2007) en el que infectaron ratones BALB/c y macrófagos *in vitro* con promastigotes metacíclicos de *L. infantum* MON-1 de 6 cepas. Encontraron variabilidad en la virulencia de las cepas de acuerdo a las lesiones producidas en los ratones y los macrófagos infectados con las cepas de mayor virulencia produjeron TGF- β en mayor cantidad en comparación con los macrófagos infectados con cepas de menor virulencia. De igual forma con diferentes cepas de *L. major* se ha visto un incremento en el patrón de citocinas anti-inflamatorias en macrófagos y células dendríticas infectadas con las cepas de mayor virulencia, lo cual parece ser un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. El patrón de citocinas expresadas por el hospedero puede resultar en una ventaja para la supervivencia y replicación del parásito, en *L. major*, por ejemplo, se ha encontrado que este perfil de citocinas puede favorecer el reclutamiento de células que permiten que la infección persista. En humanos se ha demostrado que la expresión diferencial de genes para citocinas y quimiocinas puede cambiar dependiendo del tiempo y evolución de las lesiones en pacientes con LC (Costa-Silva M., *et al.* 2014).

En relación a la producción de citocinas pro-inflamatorias nosotros encontramos una disminución en la presencia de IL-12 p70 cuando las células fueron infectadas con los amastigotes de *L. mexicana* y estimuladas con IFN- γ y esta disminución se observó más marcadamente con la

cepa DICT (LCD) en comparación con la cepa LAC (LCL), lo cual nos permite suponer que existe una modulación por parte de los parásitos para disminuir la expresión de IL-12. Por otro lado, observamos que las BMDC infectadas con los amastigotes y estimuladas con LPS + IFN- γ produjeron una mayor cantidad de IL-12 p70, estos resultados coinciden con los reportados por Bennett y cols. (Bennett C.L., *et al.* 2001). Esto muy probablemente se debió a que estos dos estímulos son fuertes activadores para la producción de esta citocina. Se ha demostrado que el LPG puede inhibir la expresión de IL-12 (Kima P. E., 2007), siendo que en este trabajo la infección se llevó a cabo con amastigotes que son deficientes en esta molécula, no observamos el fenómeno de inhibición de la IL-12.

Otros estudios realizados con diferentes cepas de *Leishmania* como el citado anteriormente llevado a cabo por (Kébaïer C., *et al.* 2001) analizaron el perfil de citocinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ e IL-12 y encontraron que la expresión fue variable entre las cepas. Las cepas con una patogenicidad intermedia o baja mostraron una respuesta de tipo Th1, mientras que los aislados que provocaron mayor carga parasitaria indujeron una respuesta de tipo Th2. La producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias puede resultar en daño y toxicidad para el tejido del hospedero (Hu, X., *et al.* 2006).

Estos resultados sugieren que pueden existir diferencias entre las cepas, posiblemente por variabilidad genética, lo que nos llevaría a tener una heterogeneidad en la patogenicidad de las cepas de una misma especie, en este caso de *Leishmania mexicana*, aislada de pacientes que presentaron diferentes formas clínicas. Las diferencias entre ambas cepas analizadas en este trabajo demostraron que hay una tendencia entre las diferencias en cuanto a producción de citocinas, así como en la fagocitosis, siendo la cepa DICT la mayor inductora de las citocinas IL-10, TNF- α , IL-12 p70 y de la formación de vacuolas ante la cepa LAC. Sin embargo, aunque estos resultados sugieren que las cepas podrían tener diferentes efectos en la infección *in vitro*, se deben analizar más aspectos sobre los mecanismos de internalización del parásito, así como los mecanismos de regulación de las citocinas que el parásito ejerce sobre las células dendríticas, las moléculas y receptores involucrados en estas interacciones.

VIII .REFERENCIAS

1. Adai, V., Castillo, D., Zimic, M., Gutierrez, A., Decuyper, S., Vanaerschot, M., Doncker S., Schnorbusch, K., Maes, I., Van der Auwera, G., Maes, L., Llannos-Cuentas A., Arevalo, J. & Dujardin, J. C. (2011). Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: diversity of expression profiles among clinical isolates. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(5), e1021.
2. Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), e0004349.
3. Alfaro, C., Oñate, C., Rodríguez, A., Perez-Gracia, J. L., Fernández de Sanmamed, M., & Melero, I. (2013). Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. Vol. 36, No. 3, pp. 519-537.
4. Alimohammadian, M. H., Darabi, H., Ajdary, S., Khaze, V., & Torkabadi, E. (2010). Genotypically distinct strains of *Leishmania major* display diverse clinical and immunological patterns in BALB/c mice. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 10(7), 969–75.
5. Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. A., & Laufer, T. M. (2008). Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity*, 29(5), 795-806.
6. Argueta-donohué, J., Wilkins-rodríguez, A. a, & Aguirre-, M. (2015). Differential phagocytosis of *Leishmania* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells Running title : *L. mexicana* phagocytosis by DC. *Microbiology and Immunology*, 1–34.
7. Ashok, D., & Acha-orbea, H. (2014). Timing is everything : dendritic cell subsets in murine *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology*, 30(10), 499–507.
8. Bailey, M. S., & Lockwood, D. N. J. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, 25(2), 203–211.
9. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*, 18(1), 767-811.
10. Baptista-Fernandes, T., Marques, C., Roos Rodrigues, O., & Santos-Gomes, G. M. (2007). Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 30(1), 41–53.
11. Bates P.A., Robertson C.D., Tetley L., Coombs G.H. (1992). Axenic cultivation and characterization of *Leishmania Mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology* 105 (Pt 2): 1993-202.
12. Bates, P. a. (2006). *Leishmania*. <http://doi.org/10.1038/npg.els.0004265>
13. Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097-1106.
14. Becker I., Carrada G., Gudiño Z.M., González C., Berzunza C. M., Rivas S. B., Velasco C. O. (2005). Análisis de leishmaniasis en México. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, Río de Janeiro. PANAFTOSA. 27-31pp.

15. Bennett, C. L., Misslitz, A., Colledge, L., Aebischer, T., & Clare Blackburn, C. (2001). Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *European Journal of Immunology*, 31(3), 876–883.
16. Biron, C. A. and Gazzinelli, R. T., Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol.* 1995. 7: 485–496.
17. Bohlsón, S. (2011). Phagocytosis. *Molecular Life Sciences : Current*, 1–77.
18. Bomfim, G., Nascimento, C., Costa, J., Carvalho, E. M., Barral-Netto, M., & Barral, a. (1996). Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 84(2), 188–194.
19. Burchmore, R. J., & Barrett, M. P. (2001). Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*, 31(12), 1311–1320.
20. Cañeda-Guzmán, I. C., Salaiza-Suazo, N., Fernández-Figueroa, E., Carrada-Figueroa, G., Aguirre-García, M., & Becker, I. (2014). NK Cell Activity Differs between Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Infected with *Leishmania mexicana*: A Comparative Study of TLRs and Cytokines. *PLoS ONE*, 9 (11), e112410.
21. Celli, J., & Finlay, B. B. (2002). Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends in Microbiology*, 10(5), 232–237.
22. CENAPRECE. (2013). Programa de acción específico. Prevención y control de las leishmaniasis 2013-2018. Programa sectorial de salud. http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PrevencionControlLeishmaniasis_2013_2018.pdf
23. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews. Microbiology*, 5(11), 873–882.
24. Choudhury, R., Das, P., De, T., & Chakraborti, T. (2010). Immunolocalization and characterization of two novel proteases in *Leishmania donovani*: Putative roles in host invasion and parasite development. *Biochimie*, 92(10), 1274–1286.
25. Colmenares, M., Corbi, a. L., Turco, S. J., & Rivas, L. (2004). The Dendritic Cell Receptor DC-SIGN Discriminates among Species and Life Cycle Forms of *Leishmania*. *The Journal of Immunology*, 172(2), 1186–1190.
26. Costa-Silva, M. F., Gomes, L. I., Martins-Filho, O. A., Rodrigues-Silva, R., Freire, J. D. M., Quaresma, P. F., Teixeira-Carvalho, A. (2014). Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Molecular Immunology*, 57(2), 74–85.
27. Contreras, I., Estrada, J. a., Guak, H., Martel, C., Borjian, A., Ralph, B., Olivier, M. (2014). Impact of *Leishmania mexicana* Infection on Dendritic Cell Signaling and Functions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9), e3202.
28. David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22(6), 491-502.
29. Descoteaux, A., & Turco, S. J. (2002). Functional aspects of the *Leishmania Donovanii* lipophosphoglycan during macrophage infection. *Microbes Infect*, 4(9), 975–981.
30. Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 27(5), 305-318.
31. Farias, L. H. S., Rodrigues, A. P. D., Silveira, F. T., Seabra, S. H., Damatta, R. a., Saraiva, E. M., & Silva, E. O. (2013). Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two leishmania (*Viannia*) *braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 207(3), 537–543.

32. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., & Grinstein, S. (2012). The Cell Biology of Phagocytosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7(1), 61–98.
33. Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C., & Van der Auwera, G. (2010). Phylogeny of Leishmania species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10(2), 238-245.
34. França-Costa, J., Wanderley, J. L. M., Deolindo, P., Zarattini, J. B., Costa, J., Soong, L., Borges, V. M. 2012. Exposure of phosphatidylserine on leishmania amazonensis isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. *PLoS ONE*, 7(5).
35. Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., & Reizis, B. 2013. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 566-577.
36. Goto, H., & Lauletta Lindoso, J. A. 2012. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 293–307.
37. Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., Bryceson, A. D. M. (2002). Personal view Visceral leishmaniasis Visceral leishmaniasis : current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda Personal view, 2(August), 494–501.
38. Hu, X., Paik, P. K., Chen, J., Yamilina, A., Kockeritz, L., Lu, T. T., Ivashkiv, L. B. (2006). IFN- γ Suppresses IL-10 Production and Synergizes with TLR2 by Regulating GSK3 and CREB / AP-1 Proteins, (May), 563–574.
39. Kane, M. M., & Mosser, D. M. (2001). The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(2), 1141–1147.
40. Kaye, P., & Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604-615.
41. Kautz-Neu, K., Schwonberg, K., Fischer, M. R., Schermann, A. I., & von Stebut, E. (2012). Dendritic cells in Leishmania major infections: mechanisms of parasite uptake, cell activation and evidence for physiological relevance. *Medical Microbiology and Immunology*, 1–12.
42. Kébaïer, C., Louzir, H., Chenik, M., & Salah, a Ben. (2001). Heterogeneity of Wild Leishmania major Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response Heterogeneity of Wild Leishmania major Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response, 69(8), 4906–4915.
43. Kedzierski, L., & Evans, K. J. (2013). *The Role of the Immune System in Resistance to Infection* (pp. 87-112). Springer Vienna.
44. Khochenkov, D. A. (2008). Biology of dendritic cells. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2(4), 296-311.
45. Kima, P. E. (2007). The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1087–1096.
46. Kima, P. E. (2014). Leishmania molecules that mediate intracellular pathogenesis. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 16(9), 8–13.
47. Kumar, A. (2013). Leishmania and Leishmaniasis (Vol. 3). New York, NY: Springer New York.
48. Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes–Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends in microbiology*, 11(5), 210-214.
49. León, B., & Ardavín, C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunology and Cell Biology*, 86(4), 320–324.

50. Liese, J., Schleicher, U., & Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, 213(3-4), 377–387.
51. Liu, J., Cao, S., Herman, L. M., & Ma, X. (2003). Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(8), 1265–1276.
52. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rossner S., Koch F., Romani N., Schuler G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92
53. Malissen, B., Tamoutounour, S., & Henri, S. 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 417-428.
54. Markikou-Ouni, W., Ben Achour-Chenik, Y., & Meddeb-Garnaoui, a. (2012). Effects of *Leishmania* major clones showing different levels of virulence on infectivity, differentiation and maturation of human dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 169(3), 273–80.
55. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*, 31.
56. Miller, J. C., Brown, B. D., Shay, T., Gautier, E. L., Jojic, V., Cohain, A., Benoist, C. (2012). Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nature Immunology*, 13(9), 888–899.
57. Minodier, P., & Parola, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3), 150–158.
58. Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496), 1561–1577.
59. Naik, S.H. (2008) Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell Biol.* 86, 439–452
60. Natarajan, G., Oghumu, S., Varikuti, S., Thomas, A., & Satoskar, A. (2014). Mechanisms of Immunopathology of Leishmaniasis. In *Pathogenesis of Leishmaniasis* (pp. 1-13). Springer New York.
61. Oliveira, F., Bafica, A., Rosato, A. B., Favali, C. B. F., Costa, J. M., Cafe, V., Barral, A. (2011). Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(1), 70–73.
62. Oliveira, M. a P., Tadokoro, C. E., Lima, G. M. C. a, Mosca, T., Vieira, L. Q., Leenen, P. J. M., & Abrahamsohn, I. a. (2005). Macrophages at intermediate stage of maturation produce high levels of IL-12 p40 upon stimulation with *Leishmania*. *Microbes and Infection*, 7(2), 213–223.
63. Padigel, U. M., Alexander, J., & Farrell, J. P. (2003). The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(7), 3705–3710.
64. Pastor-Santiago, J. A., Chávez-López, S., Guzmán-Bracho, C., Flisser, A., & Olivo-Díaz, A. (2012). American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 86(1), 108-114.
65. Pereira, C. G., Silva, A. L. N., de Castilhos, P., Mastrantonio, E. C., Souza, R. a, Romão, R. P., Souza, M. a. (2009). Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology*, 165(3-4), 231–40.

66. Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 14(3-4), 185–191.
67. Prina, E., Abdi, S. Z., Lebastard, M., Perret, E., Winter, N., & Antoine, J.-C. (2004). Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 2), 315–325.
68. Ponte-Sucre, A., Diaz, E., & Padrón-Nieves, M. (Eds.). (2012). *Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments*. Springer Science & Business Media.
69. Pulendran, B. (2015). The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 150209162007004.
70. Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7(9), 581–596.
71. Reizis, B., Colonna, M., Trinchieri, G., Barrat, F., & Gilliet, M. (2011). Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 558–65.
72. Ribeiro-de-Jesus, a, Almeida, R. P., Lessa, H., Bacellar, O., & Carvalho, E. M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica [et Al.]*, 31(1), 143–8.
73. Sanyal, T., Gangopadhyay, P., Ghosh, D. K., & Sarkar, D. (1994). Expression of antigens in virulent and avirulent Indian strains of *Leishmania donovani*, 19(3), 291–299.
74. Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181.
75. Schönian, G., Mauricio, I., & Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26(10), 466–469.
76. Schraml, B. U., & Reis e Sousa, C. (2015). Defining dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 32, 13–20.
77. Shortman, K., & Liu, Y.-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2(3), 151–61.
78. Silva-Almeida, M., Pereira, B. A. S., Ribeiro-Guimarães, M. L., & Alves, C. R. (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, 5, 160.
79. Soong, L. (2008). Modulation of Dendritic Cell Function by *Leishmania* Parasites. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4355–4360.
80. Stevens, S. R., & Chang, T. H. (2006). History of development of TNF inhibitors. In *TNF- α Inhibitors* (pp. 9-22). Birkhäuser Basel.
81. Stuart, L. M., & Ezekowitz, R. a B. (2005). Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity*, 22(5), 539–550.
82. Trinchieri, G., Pflanz, S., & Kastelein, R. a. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: New players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), 641–644.
83. Underhill, D. M., & Goodridge, H. S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 492–502.
84. von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of *Leishmania* major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *The Journal of experimental medicine*, 188(8), 1547-1552.

85. von Stebut, E. (2007). Cutaneous Leishmania infection: Progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental Dermatology*, 16(4), 340–346.
86. Wilkins-Rodríguez, A. A., Escalona-Montaña, A. R., Aguirre-García, M., Becker, I., & Gutiérrez-Kobeh, L. (2010). Regulation of the expression of nitric oxide synthase by *Leishmania mexicana* amastigotes in murine dendritic cells. *Experimental parasitology*, 126(3), 426-434.
87. Woelbing, F., Kostka, S. L., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., von Stebut, E. (2006). Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fc gamma receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(1), 177–188.
88. World Health Organization (WHO). (2016). Leishmaniasis [Fact sheet]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
89. Xin L., Li K., Soong L. 2008. Down-regulation of dendritic cell signaling pathways by *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Mol Immunol* 45: 3371-82
90. Zerpa, O., Ulrich, M., Blanco, B., Polegre, M., Avila, a., Matos, N., Convit, J. 2007. Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *British Journal of Dermatology*, 156(6), 1328–1335.