



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la producción de citocinas y la fagocitosis  
en macrófagos infectados con diferentes aislados de  
*Leishmania mexicana***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**MUÑOZ HERRERA JUAN CARLOS**



**DIRECTORA DE TESIS:**

**DRA. INGEBORG BECKER FAUSER**

**CIUDAD DE MÉXICO, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno: Muñoz  
Apellido materno: Herrera  
Nombre(s): Juan Carlos  
Teléfono: 57322647  
Universidad: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad: Facultad de Ciencias  
Carrera: Biología  
Nº de cuenta: 310247441

### 2. Datos del tutor

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

### 3. Sinodal 1

Grado: Dr.  
Nombre(s): Luis Felipe  
Apellido paterno: Jiménez  
Apellido materno: García

### 4. Sinodal 2

Grado: Dra.  
Nombre(s): Mayra  
Apellido paterno: Silva  
Apellido materno: Miranda

### 5. Sinodal 3

Grado: Dra.  
Nombre(s): Edith Araceli  
Apellido paterno: Fernandez  
Apellido materno: Figueroa

### 6. Sinodal 4

Grado: M. en C.  
Nombre(s): Isabel Cristina  
Apellido paterno: Cañeda  
Apellido materno: Guzmán

### 7. Datos del trabajo escrito

Título: Análisis de la producción de citocinas y la fagocitosis en macrófagos infectados con aislados diferentes de *Leishmania mexicana*

Nº de páginas: 45 p.  
Año: 2018

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología, Departamento de Medicina Experimental, UNAM, Hospital General de México, bajo la asesoría de la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser y el apoyo de la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos CONACYT 221405 y PAPIIT IN211418.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser por haberme permitido realizar este proyecto en las instalaciones del Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental y por su apoyo durante toda la tesis.

A la M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán por sus asesorías para la finalización del trabajo escrito, por una visión crítica para el desarrollo del trabajo y su gran apoyo.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal por ayudarme con la extracción de células y diferenciación a macrófagos.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia por enseñarme diversas técnicas de montajes y fijación de células.

A la Dra. Norma Salaiza Suazo por su apoyo en la captura de las imágenes.

A la M. en C. Adrian Ruiz Remigio por el apoyo en el análisis de la citocinas por medio de la Técnica ELISA (tipo sandwich).

Al Dr. José Sotero Delgado Dominguez por asesoría con el manejo de animales de Laboratorio y su apoyo para concluir este proyecto.

A la Bióloga Elizabeth Nallely Cabrera González por la enseñanza de técnicas de biología molecular y sus valiosos consejos para mi formación.

Al Dr. César Antonio Ríos Muñoz por la enseñanza para la estructuración de un trabajo de investigación.

A la Sra. Susana Saldaña (Q.E.P.D.) y a Zaide Rivera por mantener siempre el material de laboratorio limpio y en perfectas condiciones.

Al Sr. Ricardo Vargas Orozco del Bioterio del Departamento de Medicina Experimental por las facilidades otorgadas para la disposición de los animales de laboratorio.

## Dedicatoria

A mi mamá **Felicitas Herrera Hernández** por su apoyo para lograr todo por imposible que parezca el camino.

A mis primos José Orlando y Karen por siempre estar ahí y enseñarme a tener grandes hermanos y a mi tía Gloria y mi tío Orlando por ser una gran familia.

A mis amigos de la carrera (Aquino, Marco, Pochin, Carlos, Hilda, Hugo, Coyote, Robert), César Becerril y Mariana Dinazar por acompañarme en los buenos y malos momentos y siempre ser amigos sin importar el tiempo y espacio.

A Miguel Ortiz por ser un gran compañero de viaje tanto en lo académico como en las aventuras conociendo el mundo Maya, Cubano y lo que nos falta.

A Luis Eduardi Perez (Lala pa la banda) por ser un gran amigo, compañero y enseñarme que para lograr lo que queremos hay que esforzarse y que nunca estamos solos para lograrlo.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Inmunoparasitología del Departamento de Medicina Experimental por su apoyo.

A Maricela por iniciar junto conmigo este grandioso camino y siempre escuchar mis penas.

A Nadia, Rosa, Andii, Ronna por ser unos excelentes amigos dentro y fuera del laboratorio y por siempre acompañarme a comer sushi, tacos, hamburguesa, etc y engordar juntos.

Miguel Peralta por ser un gran hermano, amigo y siempre apoyar sin condición.

A mis amigos del deporte Roberto de la Rosa y a los Profesores Cerón por el apoyo y la motivación para nunca rendirse y hacer las cosas con sabiduría.

# ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
LEISHMANIASIS	3
EL PARÁSITO	3
VECTOR	3
CICLO DE VIDA	4
FORMAS CLÍNICAS	6
Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)	6
Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)	7
Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)	7
Leishmaniasis Visceral (LV)	8
LEISHMANIASIS EN MÉXICO	8
RESPUESTA INMUNE	9
LOS MACRÓFAGOS	9
ACTIVACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS	10
FAGOCITOSIS	10
Quimiotaxis	11
Reconocimiento	11
Actividad Microbicida	12
Producción de Citocinas	14
MECANISMOS DE EVASIÓN DE LEISHMANIA	15
Sobrevida en el Fagosoma	15
Vías de Señalización	16
Citocinas y Quimiocinas	16
JUSTIFICACIÓN	17
OBJETIVOS PARTICULARES	17
MATERIAL Y MÉTODOS	17
OBTENCIÓN DE LOS AISLADOS DE L. MEXICANA	17
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA Y DIFERENCIACIÓN A MACRÓFAGOS	18
ANÁLISIS DE LA MARCA F4/80 EN MACRÓFAGOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	19
INFECCIÓN DE MACRÓFAGOS CON L. MEXICANA	19
ANÁLISIS DE LA FAGOCITOSIS POR LA TINCIÓN DE GIEMSA	20
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINAS Y CITOCINAS POR ELISA (TIPO SÁNDWICH)	20
ANÁLISIS DE RESULTADOS	22
RESULTADOS	22
EXPRESIÓN DEL MARCADOR F4/80 EN MACRÓFAGOS DIFERENCIADOS	22
MACRÓFAGOS INFECTADOS CON LOS DIFERENTES AISLADOS DE L. MEXICANA	23
ANÁLISIS DE FAGOCITOSIS	23
Porcentaje de infección	23
Número de vacuolas	25
Número de parásitos en vacuolas	28
Número de parásitos sin vacuola	29
Número total de parásitos	31
ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE QUIMIOCINA Y CITOCINAS	32
MIP-1 $\alpha$	32
TNF- $\alpha$	33
IL-12 p70	34
IL-10	35
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfología de Leishmania y sus organelos en cada fase	3
<b>Figura 2.</b> <i>Lutzomyia longipalpis</i> uno de los transmisores de la leishmaniasis	4

<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .....	5
<b>Figura 4.</b> Úlcera de paciente con LCL .....	6
<b>Figura 5.</b> Nódulos de paciente con LCD .....	7
<b>Figura 6.</b> Paciente con daño en mucosas orales de una LMC.....	7
<b>Figura 7.</b> Paciente con hepatomegalia y esplenomegalia con LV .....	8
<b>Figura 8.</b> Distribución de casos de leishmaniasis cutánea en México .....	9
<b>Figura 9.</b> Etapas de la fagocitosis .....	11
<b>Figura 10.</b> Formación y maduración del fagosoma .....	12
<b>Figura 11.</b> Estallido oxidativo .....	13
<b>Figura 12.</b> Vías de Señalización de MAPK, TLRs y JAK/STAT.....	15
<b>Figura 13.</b> Análisis de la pureza de macrófagos diferenciados de médula ósea .....	22
<b>Figura 14.</b> Fotos de macrófagos infectados con diferentes aislados de <i>L. mexicana</i> .....	23
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de infección de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	24
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de infección en grupos de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	25
<b>Figura 17.</b> Macrófagos infectados con amastigotes de <i>L.mexicana</i> .....	25
<b>Figura 18.</b> Diferencias en la morfología y tamaño de las vacuolas de macrófagos infectados con promastigotes de <i>L.mexicana</i> .....	26
<b>Figura 19.</b> Número de vacuolas de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	26
<b>Figura 20.</b> Número de vacuolas en grupos de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	28
<b>Figura 21.</b> Número de parásitos en vacuolas de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	28
<b>Figura 22.</b> Número de parásitos en vacuolas en grupos de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> ..	29
<b>Figura 23.</b> Número de parásitos sin vacuola en macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	30
<b>Figura 24.</b> Número de parásitos sin vacuolas en grupos de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> ..	30
<b>Figura 25.</b> Número de parásitos totales de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	31
<b>Figura 26.</b> Número de parásitos totales en grupos de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	32
<b>Figura 27.</b> El análisis de la producción de MIP-1 $\alpha$ de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	33
<b>Figura 28.</b> El análisis de la producción de TNF- $\alpha$ de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	34
<b>Figura 29.</b> El análisis de la producción de IL-12p70 de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	35
<b>Figura 30.</b> El análisis de la producción de IL-10 de macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i> .....	36



## Resumen

*Leishmania* es un parásito protozoario que infecta a macrófagos, donde prolifera evadiendo las diferentes estrategias de defensa de la célula y modulando su respuesta inmune. *Leishmania mexicana* es el agente causal de diferentes formas cutáneas de la enfermedad: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) es una forma benigna y la más común. Entre las formas crónicas se encuentra la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que es una infección progresiva y la leishmaniasis mucocutánea (LMC) que afecta a las mucosas. La severidad de la enfermedad depende de múltiples factores del parásito, del hospedero y la especie del vector.

En este trabajo se analizó la infección de macrófagos, la localización intracelular del parásito y la respuesta de las células a la infección por promastigotes de *Leishmania mexicana* aislados de pacientes con distintas formas clínicas: LCL (4), LCD (5) y LMC (1). El estudio incluyó el análisis de la fagocitosis, la localización del parásito dentro y fuera de vacuolas fagocíticas, el número de vacuolas, la producción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IL-10) así como la quimiocina MIP-1 $\alpha$  en macrófagos infectados.

Los resultados mostraron que hay importantes diferencias entre los parásitos de pacientes con LCD que fueron aislados recientemente (menores a 3 años) y los que tenían más tiempo en cultivo en el laboratorio. Al comparar todos los aislados recientes se encontró que el aislado de LCD se asocia a una mayor fagocitosis por el macrófago, un mayor número de vacuolas y un incremento significativo de parásitos dentro y fuera de la vacuolas fagocíticas en comparación con los otros aislados. Adicionalmente se encontró que estos fenómenos se correlacionan con la severidad clínica del paciente del cual fue aislado el parásito, siendo mayor en aislados LCD, seguido por LMC y con los valores más bajos en aislados de pacientes con LCL. Se encontró diferencias significativas en la producción de TNF- $\alpha$  entre los grupos LCL y LMC. No se encontraron diferencias significativas en la producción de citocinas IL-12p70 e IL-10 y quimiocina MIP-1 $\alpha$  por macrófagos infectados con los diferentes aislados.

Se concluye que aunque los parásitos pertenecen a la misma especie, existe una diferencia importante en su capacidad de infección del macrófago y su número dentro y fuera de vacuolas fagocíticas que se puede correlacionar con la severidad clínica de los pacientes de los cuales fueron aislados. Sin embargo, estas capacidades diferenciales se pierden cuando los parásitos permanecen en cultivos de laboratorio por tiempo prolongado (más de 3 años).

## Introducción

*Leishmania mexicana* es un parásito intracelular causante de la leishmaniasis cutánea en México, que genera dos cuadros clínicos. La leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). La LCL es una forma benigna de la enfermedad que en la mayoría de los casos se cura. En el 90% de los casos se presenta una sola lesión en forma de úlcera. En cambio, la LCD es una forma crónica que daña casi todo el tegumento presentándose en forma de nódulos. Los parásitos de pacientes con LCD son refractarios al tratamiento (Reithinger et al., 2007).

El resultado de estos cuadros clínicos depende de una compleja interacción entre la respuesta inmune y la genética del hospedero, así como de la virulencia de las diferentes especies de *Leishmania*. Una respuesta celular inmune tipo Th-1 favorece la resolución de la enfermedad y se caracteriza por la activación de los macrófagos para la eliminación del parásito y controlar la enfermedad. Pacientes con LCL presentan predominantemente una respuesta tipo Th-1. La forma crónica (LCD) generalmente presenta una respuesta tipo Th-2, que favorece la proliferación del parásito (Von Stebut y Tenzer, 2018).

Son pocos los estudios que han analizado la participación de los macrófagos durante la infección con diferentes aislados de *Leishmania mexicana*, así como su producción de citocinas. En este trabajo se estudió la fagocitosis y la producción de la quimiocina (MIP-1 $\alpha$ ) y citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10) de macrófagos infectados con aislados de pacientes con las dos formas clínicas LCL y LCD.

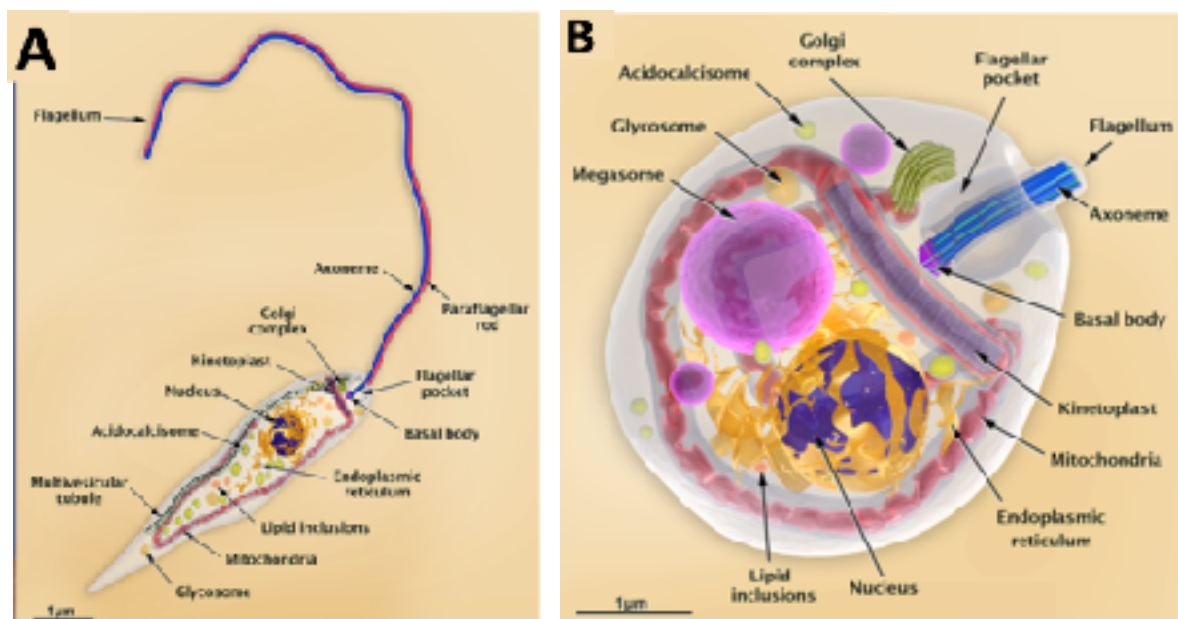
## Marco Teórico

### Leishmaniasis

La leishmaniasis es considerada un grupo de enfermedades causadas por 20 especies del género *Leishmania* (Pigott et al., 2014).

### El Parásito

*Leishmania* es un protozooario flagelado, unicelular del orden Kinetoplastida. Durante su ciclo de vida presenta dos formas (Fig. 1): la forma de promastigote, que es móvil de cuerpo alargado, con un flagelo en la región anterior. Esta forma se localiza en el intestino del vector. La otra forma es el amastigote, que es esférico, presenta un núcleo y cinetoplasto pero carece de flagelo. Esta forma se encuentra en el interior de las células del hospedero vertebrado (Burza et al., 2018; Ríos y Sousa, 2010; Reithinger et al., 2007).



**Figura 1.** Morfología de *Leishmania* y sus organelos en cada fase. A) Promastigote y B) Amastigote (Tomado y modificado de Teixeira et al., 2013).

### Vector

La transmisión de esta enfermedad se da por la mordedura de dípteros hembras de la subfamilia *Phlebotominae*, que se caracterizan por ser pequeñas (1.5 a 3.5 mm). Su cuerpo está cubierto de sedas. La coloración varía desde amarilla, café, gris o negra, dependiendo del hábitat. La cabeza es pequeña, posee antenas y patas largas con las alas posicionadas en forma de "V". Todas las hembras son hematófagas, debido a que

requieren la sangre para el desarrollo de los huevos (Fig. 2). Se han registrado alrededor de 400 especies de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* de las cuales sólo 50 especies se involucran en la transmisión de la leishmaniasis (Kamhawi, 2006).



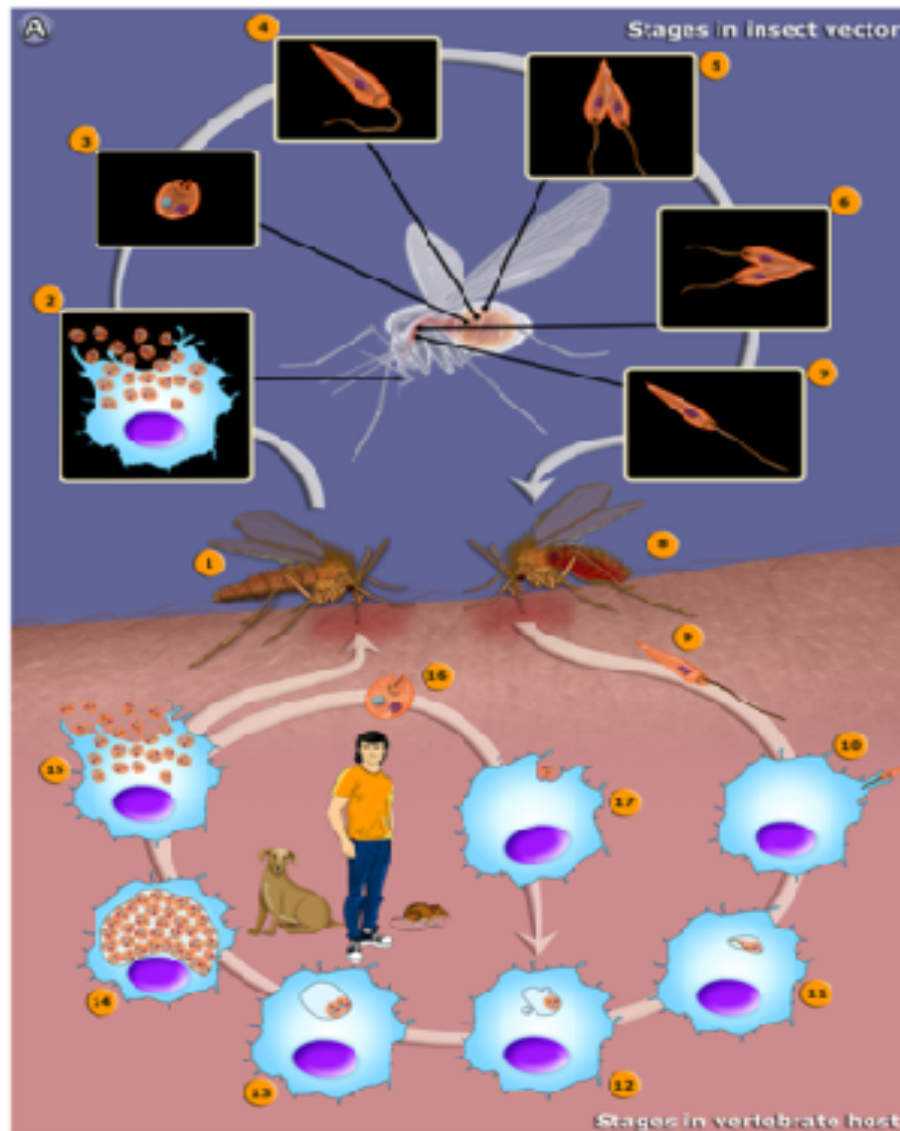
**Figura 2.** *Lutzomyia longipalpis* uno de los transmisores de la leishmaniasis. (Tomada de: [www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand\\_fly.html](http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html))

#### Ciclo de Vida

*Leishmania* necesita de dos hospederos: un vertebrado y un vector (Fig. 3). El vector se infecta con leishmanias al tomar sangre de un hospedero vertebrado infectado, el cual succiona macrófagos infectados o amastigotes libres provenientes de células lisadas. En el interior del vector, el parásito sufre una serie de cambios morfológicos: el amastigote se transforma a promastigote procíclico, en esta fase ocurre la primera división. El promastigote procíclico es relativamente resistente a las enzimas de la matriz peritrófica. Posteriormente, los promastigotes procíclicos se transforman en nectomonas y escapan de la matriz peritrófica. Las nectomonas van migrando hacia la pared anterior del intestino, donde se transforman en leptomonas y ocurre una segunda división. Las leptomonas continúan con la migración hasta llegar a la válvula estomoidea, en donde se transforman en haptomonas o promastigotes metacíclicos. Las haptomonas destruyen la válvula estomoidea, por lo que pasan los promastigotes metacíclicos al alimentarse nuevamente del vertebrado (Kamhawi, 2006; Teixeira et al., 2013).

El vector inocula a los promastigotes metacíclicos que son la fase infectiva. Estos son fagocitados por las diferentes células del sistema inmune del hospedero, por ejemplo: células dendríticas, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, basófilos, pero también

pueden ser fagocitados por células residentes como: fibroblastos y queratinocitos. Una vez fagocitado el parásito, se transforma en amastigote y se replica varias veces por fisión binaria hasta lisis la célula. Los amastigotes liberados pueden ser fagocitados por otras células o pueden ser tomados por el vector al momento de alimentarse (Teixeira et al., 2013).



**Figura 3.** Ciclo de vida de *Leishmania*. (1) El díptero toma sangre de un vertebrado infectado, (2-3) los amastigotes son liberados de las células infectadas. (4) y se transforman en promastigotes procíclicos (5, 6) que se dividen por fisión binaria dos veces. (7) Posteriormente, se transforman en promastigotes metacíclicos. (8-9) Son inoculados por el vector al vertebrado. (10) El macrófago reconoce al parásito y (11) lo fagocita. Se transforma en amastigote (12). Se divide (13-14) hasta lisis la célula (15). Los amastigotes son liberados (16). Son fagocitados por otras células (17) o pueden ser tomados por el vector (Imagen tomada de Teixeira et al., 2013).

## Formas clínicas

Existen diferentes formas clínicas de leishmaniasis que se agrupan en formas cutáneas y visceral. Estas pueden depender de la especie de *Leishmania* que infecta y del sistema inmune del hospedero (Ríos y Sousa, 2010; Gupta et al., 2013). La leishmaniasis cutánea es la forma más común a nivel mundial. Existen tres formas: localizada, difusa y mucocutánea (Ríos y Sousa, 2010).

### Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

La LCL se caracteriza por la presencia de una pápula que aumenta de tamaño, este tipo de lesiones se ulceran, son de coloración rojiza y con bordes indurados. Estas úlceras se localizan en el sitio de la mordedura del vector (Fig. 4). Las especies causantes son *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major* (Ríos y Sousa, 2010; Prajwal y Thirumala-Devi, 2015; Reithinger et al., 2007).



**Figura 4.** Úlcera de paciente con LCL. (Foto donada por el Laboratorio de Inmunoparasitología, Fac. Medicina, UNAM).

### Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

La LCD se caracteriza por la presencia de nódulos en todo el tegumento que contienen abundantes parásitos dentro de los macrófagos (Fig. 5), a excepción del cuero cabelludo, axilas, palmas de las manos y la planta de los pies. Las especies causantes son *L. mexicana* y *L. aethiopica* (Ríos y Sousa, 2010; Prajwal y Thirumala-Devi, 2015; Reithinger et al., 2007).



**Figura 5.** Nódulos de paciente con LCD. (Foto donada por el Laboratorio de Inmunoparasitología, Fac. Medicina, UNAM).

### Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)

La LMC se caracteriza por la invasión de la mucosa de la nariz, la cavidad oral y faringe. Esto puede ocasionar la destrucción de la faringe, paladar, laringe y el labio superior (Fig. 6). Las especies causantes son *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* (Ríos y Sousa, 2010; Prajwal y Thirumala-Devi, 2015).



**Figura 6.** Paciente con daño en mucosas orales de una LMC. (Foto: WHO/TDR/Crump.)

## Leishmaniasis Visceral (LV)

Es una de las formas clínicas con mayor mortalidad, afectando principalmente a niños o personas inmunosuprimidas. Se caracteriza por la presencia de fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía e hiperpigmentación (Fig. 7). Las especies causantes son: *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) y *L. donovani*, aunque también se ha registrado que *L. amazonensis* y *L. tropica* pueden provocar este cuadro clínico (Ríos y Sousa, 2010; Prajwal y Thirumala-Devi, 2015).



**Figura 7.** Paciente con hepatomegalia y esplenomegalia con LV.  
(Foto: WHO/TDR/Crump.)

## Leishmaniasis en México

*L. mexicana* es el principal agente causal de leishmaniasis en México y genera dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Los casos de leishmaniasis cutánea se han registrado principalmente al sureste del país, con mayor número de casos en los estados de: Tabasco, Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Oaxaca, Nayarit y Veracruz. Por otro lado, el menor número de casos se ha registrado en los estados de Jalisco, Durango y Sinaloa (Fig. 8) esto entre los años 2004-2008 (Alvaret al., 2012).





**Figura 8.** Distribución de casos de leishmaniasis cutánea en México entre los años 2004-2008. (Tomado de Alvar et al., 2012).

### Respuesta Inmune

La respuesta colectiva y coordinada frente a sustancias extrañas es conocida como respuesta inmunitaria que se divide en innata y adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra cualquier agente extraño, en cambio la inmunidad adaptativa es estimulada por la exposición a los agentes extraños y aumenta su capacidad de defensa conforme a cada exposición de un microorganismo determinado. Los componentes del sistema inmune innato son las células NK, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Además, de diferentes tipos de moléculas antimicrobianas, así como citocinas y el sistema del complemento. Las citocinas sirven para la comunicación celular, que pueden activar a otras células o regular la producción de otras citocinas (Sierra, 2010; Hernández y Alvarado, 2001).

### Los Macrófagos

Los macrófagos desempeñan un papel importante en la respuesta inmune innata y son un puente para activar a la respuesta adaptativa. Estos se originan en la médula ósea a partir del linaje mieloide, circulan en sangre, maduran y se activan en diferentes tejidos. En circulación periférica se encuentran los monocitos. Estos miden  $\approx 18 \mu\text{m}$  y presentan un núcleo en forma de riñón. El citoplasma contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos. Una vez que los monocitos se establecen en tejido,

maduran y se diferencian en macrófagos (Mayani et al., 2007). Estas células están presentes en todos los órganos y tejidos conjuntivos, y reciben nombres especiales dependiendo del órgano, por ejemplo, en el sistema nervioso se les conoce como células de la microglía; en el hígado como células de Kupffer; en pulmón como células alveolares y en el hueso se les conoce como osteoclastos. Un marcador específico de los macrófagos en ratón es el F4/80, mientras que para humano son CD14 y CD68.

La función de estas células es importante en varios procesos, como la fagocitosis, en donde se lleva a cabo la actividad microbicida a través de agentes reactivos de oxígeno o nitrógeno y otras enzimas. Otras funciones efectoras son la producción de citocinas y la presentación antigénica.

Estas células del sistema inmune poseen en su membrana varios tipos de receptores como los receptores tipo Toll (TLRs) que reconocen patrones asociados a patógenos (del inglés PAMPs) y/o patrones asociados a daño (del inglés DAMPs). Estos receptores detectan a los microorganismos e inducen la producción de citocinas. Además, de otros receptores fagocíticos como los de Manosa, Mananas, Integrinas y Scavenger (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).

#### Activación de los macrófagos

Los macrófagos se pueden activar a través de diferentes receptores y estímulos entre los cuales participan los TLRs que reconocen moléculas de *Leishmania* como la lipofosfoglicano (LPG). Esto estimula la secreción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores lipídicos (Duque Correa y Rojas López, 2007; Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003). Por otro lado, los receptores de la fagocitosis participan en la eliminación del parásito mediante la producción de especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico y enzimas lisosómicas.

#### Fagocitosis

Los macrófagos al igual que los neutrófilos se les considera como células fagocíticas profesionales. Son unas de las primeras células en llegar al sitio de infección después de los neutrófilos (Cecilio, 2014). La fagocitosis es un proceso en el que se interiorizan partículas  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  de diámetro (Botelho y Grinstein, 2011). Se compone de varias etapas que comprenden la quimiotaxis (atracción), el reconocimiento de los

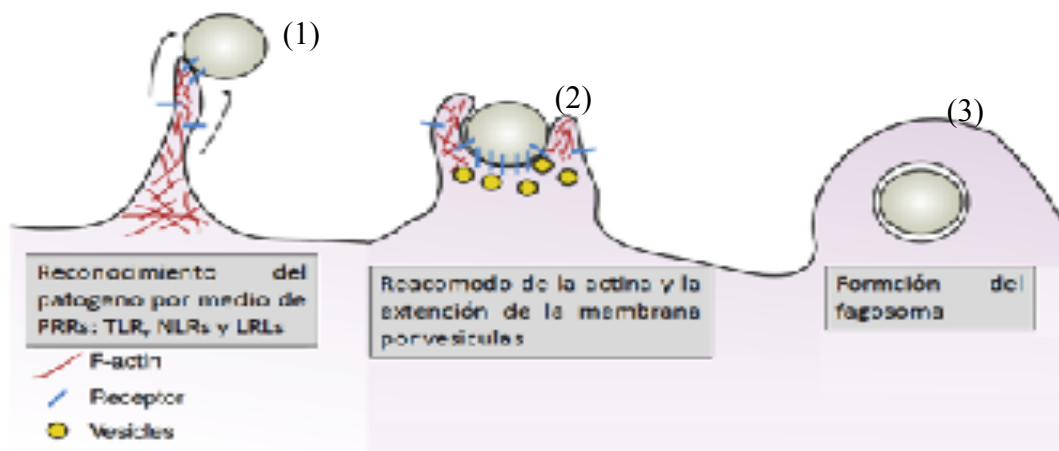
microorganismos por medio de los receptores, la internalización y la destrucción de este, mediante cambios físico-bioquímicos intracelulares que capacitan a la célula para endocitar y eliminar a los microorganismos (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).

### Quimiotaxis

Durante la quimiotaxis participan factores con actividad quimioattractante como por ejemplo las quimiocinas CXCL-8, MIP-1 $\alpha$  (CCL3) o productos de activación del complemento (C5 y iC3b), que son reconocidos por receptores en la membrana de las células fagocíticas y se induce una migración dirigida al sitio de infección (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).

### Reconocimiento

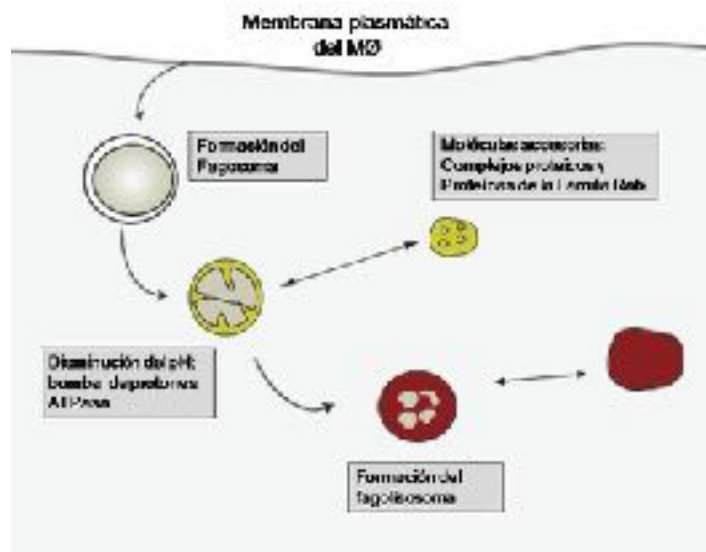
La interacción entre los receptores de la célula y el microorganismo (Fig. 9), generan una cascada de señalización, provocando el reacomodo de la actina del citoesqueleto y una extensión de la membrana hasta fagocitarla formando una vacuola que se define como fagosoma (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003; Botelho y Grinstein, 2011).



**Figura 9.** Etapas de la fagocitosis. Durante la fagocitosis hay **(1)** un reconocimiento del patógeno por medio de receptores que se encuentran en la membrana. Posteriormente, **(2)** hay un reacomodo de la actina, **(3)** el patógeno es fagocitado formando una vacuola (Imagen tomada y modificada de Botelho y Grinstein, 2011).

Una vez formado el fagosoma, su membrana madura sufriendo una serie de cambios, incluyendo la polaridad, la disminución de pH (bomba de protones ATPasa) y la adhesión de moléculas accesorias (proteínas de la familia Rab, proteínas SNARE y complejos proteicos). Estas moléculas se fusionan con el lisosoma que contiene proteínas enzimáticas. Las hidrolasas ácidas participan en la permeabilidad de la

membrana y tienen su máxima actividad a pH bajo (4 a 5). Las proteasas neutras tienen actividad hidrolítica destruyendo proteínas de los patógenos, así como la permeabilidad de la membrana. Los factores microbicidas poseen una actividad digestiva degradando algunas moléculas de los microorganismos (Fig. 10). La unión del lisosoma con el fagosoma forma el fagolisosoma (Botelho y Grinstein, 2011; Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).



**Figura 10.** Formación y maduración del fagosoma. Dentro del fagosoma hay una serie de cambios como la fusión de endosomas con el fagosoma y algunas moléculas accesorias, formando un fagolisosoma para destruir al patógeno (Imagen tomada y modificada de Botelho y Grinstein, 2011).

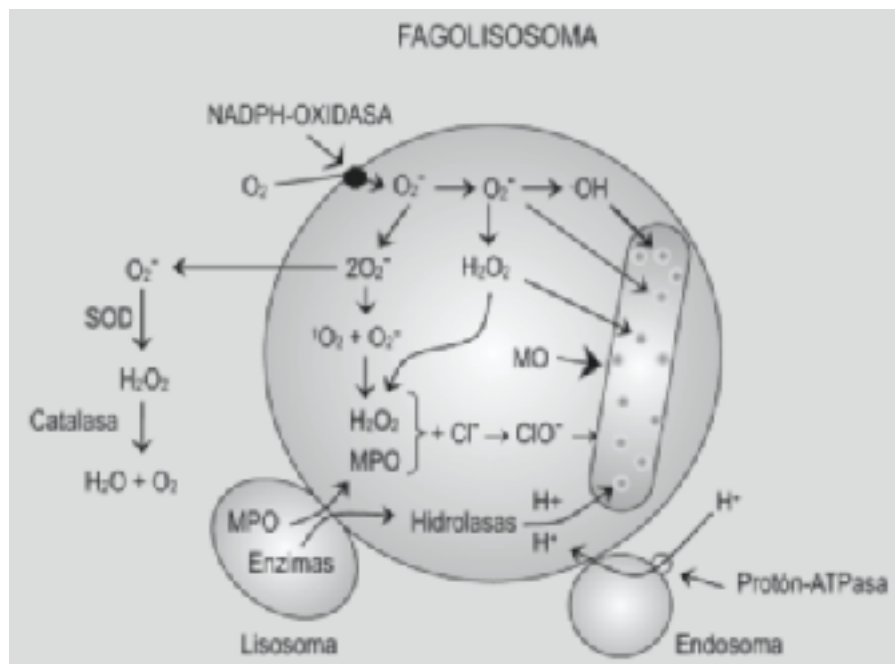
### Actividad Microbicida

En el fagolisosoma, los gránulos lisosomales poseen sustancias capaces de incrementar la permeabilidad de la membrana de los microorganismos, permitiendo la entrada de moléculas citotóxicas que llevan inducen su muerte (Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).

Otra actividad microbicida es el estallido oxidativo (Fig. 11). Durante el estallido hay un aumento en el consumo del oxígeno ( $O_2$ ) y glucosa. En este proceso se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo (OH) y hipohaluros como el ácido hipocloroso (OHCl) (Cascales, 2005). En el estallido oxidativo participa la enzima NADPH oxidasa, que se ensambla en la membrana del fagolisosoma y se activa con estímulos como:

partículas opsonizadas, complejos inmunes y citocinas. La NADPH oxidasa permite la entrada del oxígeno y lo reduce produciendo  $O_2^-$ , el cual puede reducirse de manera espontánea o por la catálisis de la enzima superóxido dismutasa (SOD), hasta formar  $H_2O_2$ . También,  $O_2^-$  puede reaccionar con el  $H_2O_2$  y con Hierro ( $Fe^+$ ) produciendo OH. Los hipohaluros como el OHCl se generan por la reacción del  $H_2O_2$  con el anión  $Cl^-$ , por medio de la catálisis de la enzima mieloperoxidasa (MPO). Las especies reactivas de oxígeno tienen un efecto microbicida, generando daño en la membrana del microorganismo. Un mecanismo de protección que tienen las células contra estos efectos tóxicos, son la generación de catalasa y superóxido dismutasa (SOD) (Cascales, 2005; Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003; Delgado et al., 2010).

Los macrófagos poseen otro mecanismo microbicida que es la producción óxido nítrico (NO), regulada por  $IFN-\gamma$ . El NO reacciona con el  $O_2^-$ , produciendo el peróxido nitrito (ONOO) que se descompone generando un radical nitroso y radical hidroxilo ( $-OH$ ) (Cascales, 2005).



**Figura 11.** Estallido oxidativo. Inicia con el consumo de  $O_2$  que es reducido por la NADPH-oxidasa generando especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, participa la bomba de protones ATPasa que disminuye el pH en el interior de la vacuola (In: Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003).

## Producción de Citocinas

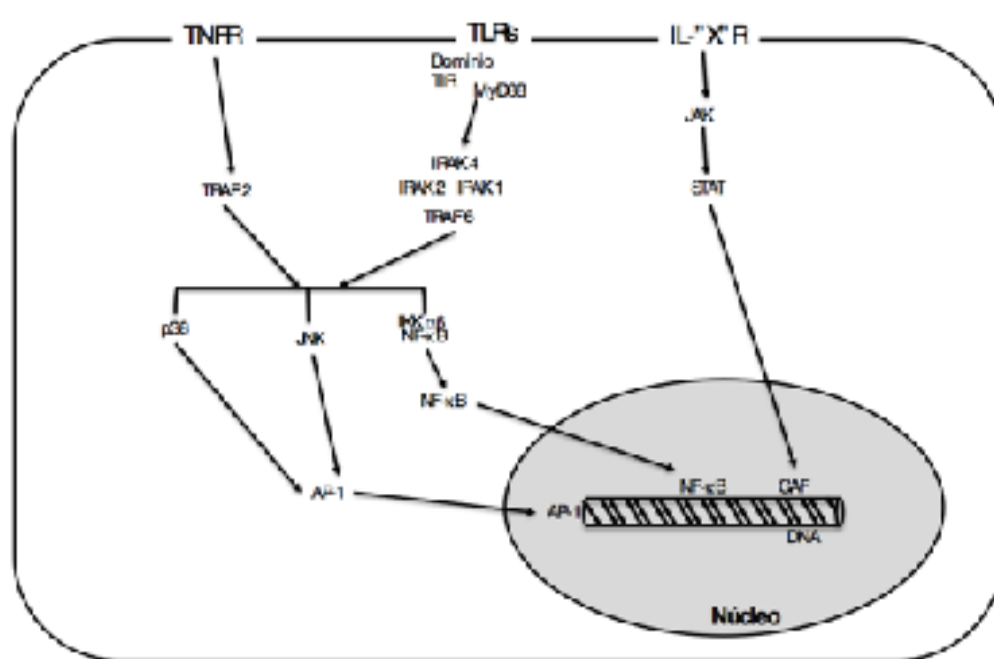
Las tres principales vías que participan en la producción de citocinas son los TLRs, las MAPK y JAK/STAT (Fig. 12).

La vía de los TLRs (receptores tipo Toll), se activan al unirse al ligando, por ejemplo, la LPG de *Leishmania* que es reconocida por el receptor TLR2. Estos receptores reclutan moléculas adaptadoras con dominio TIR como MyD88. El reclutamiento genera una cascada de señalización que activa a las IRAK 4, 2 y 1 (quinasas asociadas al receptor de IL-1), que fosforilan y activa a TRAF6 (factores asociados a receptores TNF) que fosforilan y degrada al complejo IKK $\alpha/\beta$ . Una vez fosforilado y degradado IKK $\alpha/\beta$ , el factor de transcripción NF- $\kappa$ B es liberado y se transloca al núcleo, donde se une a regiones promotoras de genes específicos que codifican para la regulación del sistema inmune como: la producción de citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8) y moléculas de adhesión (Tomicic y Guerrero, 2005; Hoesel y Schmid, 2013; Bremner y Heinrich, 2002; Moreno y Sánchez, 2003).

La vía MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), se activa por medio de los receptores de citocinas proinflamatorias (TNFR) o de TLRs. Estos receptores reclutan moléculas adaptadoras (TIR, MyD88, IRAK, TRAF6/2) que activan diversas MAPK como p38, JNKs (c-Jun N-terminal cinasas) y ERK1/2 (extracelular señal-reguladora de cinasas) que activan al factor de transcripción AP-1 (activador de proteína 1) o NF- $\kappa$ B. Ambos factores se translocan al núcleo para la producción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$  (Sabio y Davis, 2014).

La vía de señalización de JAK/STAT. En esta vía el receptor de citocina reconoce a su ligando, llevando a cabo una fosforilación de JAK (Janus cinasa) que se encuentra unida a los receptores en la parte citosólica. Al activarse fosforilan residuos de tirosina en las cadenas de los receptores creando sitios de reconocimiento para los dominios Src2 (SH2) de los Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STATs) y de moléculas adaptadoras Shc. El receptor fosforilado recluta a las proteínas STAT que van a ser fosforiladas por las proteínas JAKs. Después de que las STATs son fosforiladas se dimerizan, generando el complejo transcripcional GAF que se transloca al núcleo e induce la expresión de diversos genes como IFN- $\alpha/\beta$ , MHC-I e iNOS

(Rawlings, Rosler y Harrison, 2004; Valle Mendiola y Soto Cruz, 2005; Viday et al., 2017).



**Figura 12.** Vías de Señalización de MAPK, TLRs y JAK/STAT. En la vía MAPK participan las cinasas p38 y JNK que liberan el factor de transcripción AP-1, en cambio en la vía de TLRs liberan el factor de transcripción NF-kB. En JAK/STAT hay una cascada de fosforilación entre JAK y las STAT que generan el complejo de transcripción GAF.

### Mecanismos de evasión de *Leishmania*

*Leishmania* utiliza diversos mecanismos de evasión para su supervivencia en el fagosoma, alterando las vías de señalización y la producción de citocinas en células fagocíticas.

### Sobrevivencia en el Fagosoma

El macrófago reconoce y fagocita al promastigote metacíclico el cual se transforma en amastigote en la vacuola parasitófora. Sin embargo, el parásito escapa de la unión del fagosoma con el lisosoma inhibiendo la expresión de proteínas como Rab7 y LAMP-1, relacionadas con la maduración del fagosoma. Por lo tanto, *Leishmania* sobrevive y se divide en la vacuola resistiendo al ambiente de la vacuola que presenta un pH ácido y una temperatura elevada (Arango y Descoteaux, 2015; Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).

Una de las moléculas de superficie que participan en la supervivencia de *Leishmania* en el fagosoma es el LPG que impide la acidificación del fagosoma e interfiere con la bomba de protones de H<sup>+</sup> (V-ATPase), permitiendo que el promastigote se transforme en amastigote (Arango y Descoteaux, 2015; Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).

Un elemento importante para la supervivencia y proliferación del amastigote en el macrófago es la presencia de Hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). El amastigote secuestra la maquinaria Nramp1 que funciona como una bomba para el transporte del hierro al fagosoma de macrófagos.

Al igual que el  $\text{Fe}^{2+}$ , la arginina (Arg) es una molécula importante para el factor de crecimiento del amastigote. La arginina también es utilizada por los macrófagos para generar el óxido nítrico (Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).

#### Vías de Señalización

Otro mecanismo de supervivencia de *Leishmania* es alterando las vías de señalización para la producción de citocinas proinflamatorias y la activación del estallido oxidativo. Los macrófagos infectados con promastigotes de *Leishmania*, activan la proteína SHP-1 que interacciona con JAK2 generando una desactivación de la vía. Se ha demostrado que la SHP-1 inactiva a JAK2 lo que provoca la disminución del estallido oxidativo (Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013). Los macrófagos infectados con *L. mexicana* disminuyen la fosforilación de  $\text{STAT1}\alpha$  pero incrementan el dominio negativo que es  $\text{STAT1}\beta$  logrando regular de esta forma la vía de señalización de JAK/STAT que es independiente de la activación de SHP-1 (Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).

*Leishmania* también interfiere en la cascada de señalización asociada a la formación del complejo NADPH oxidasa. El LPG del promastigote desactiva a la PKC obstruyendo su translocación a la membrana, impidiendo la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y el diacilglicerol a la PKC. Al no permitir la translocación a la membrana a la PKC inactiva a la formación del complejo NADPH oxidasa y por ende no hay producción de especies reactivas de oxígeno (Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).

#### Citocinas y Quimiocinas

Las citocinas proinflamatorias ( $\text{TNF}\alpha$  e IL-12) participan en el control y la eliminación de leishmanias, pero estas citocinas son suprimidas por *Leishmania* para facilitar su entrada y su proliferación. Por otro lado, algunas citocinas reguladoras como IL-10 permite la supervivencia del parásito y la progresión de la enfermedad (Gupta, Oghumu y Satoskar, 2013).



## **Justificación**

Los macrófagos son células que hospedan a *Leishmania*, además, de ser el lugar ideal para la replicación de estos parásitos, son células fagocíticas que liberan citocinas, expresan moléculas coestimuladoras y son presentadoras del antígeno. Se conoce poco sobre la respuesta de macrófagos a *Leishmania mexicana* aislada de pacientes con cuadros clínicos de distinta severidad. En este trabajo se analizan las diferencias en la fagocitosis y la producción de citocinas de macrófagos infectados con *L. mexicana* aislada de pacientes con leishmaniasis de distinta severidad.

## **Objetivo General**

Analizar la fagocitosis, la localización intracelular y la producción de citocinas y quimiocina de macrófagos infectados con *L. mexicana* provenientes de diferentes aislados de pacientes con LCD, LMC y LCL.

## **Objetivos Particulares**

- Diferenciar macrófagos a partir de células de médula ósea y analizar su expresión de F4/80.
- Analizar la fagocitosis de *L. mexicana* aislados de pacientes con LCD, LMC y LCL por macrófagos.
- Analizar la localización intracelular de los parásitos fagocitados.
- Analizar la producción de la quimiocina y citocinas pro-inflamatorias (MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70) y reguladoras (IL-10) en macrófagos infectados.

## **Material y Métodos**

Obtención de los aislados de *L. mexicana*

Los aislados de *L. mexicana* fueron obtenidos de pacientes con 3 formas clínicas LCL, LCD y LMC. Los aislados que tenían menos de 3 años en cultivo en el laboratorio fueron considerados aislados “recientes”.

- A) Pacientes con LCL: 4 aislados totales, de los cuales todos fueron aislados recientes (LCL1, LCL2, LAL3, LCL4).
- B) Pacientes con LCD: 5 aislados totales, de los cuales únicamente LCD 5 es aislado reciente.

### C) Paciente con LMC de aislado reciente.

Cada aislado se inoculó en el cojinete plantar de ratones hembras de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas. Los ratones se obtuvieron del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM y se sacrificaron conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). El sacrificio se realizó por desnucamiento, evitando siempre que no hubiera sufrimiento del animal. La infección se dejó durante 1 a 3 semanas que dependió del desarrollo de la lesión sin ulcerar. Posteriormente, se sacrificaron los ratones y se aislaron los parásitos para lo cual se introdujo una jeringa con 2 mL de PBS en el sitio de la lesión. Con la punta de la jeringa se rompió el tejido y se aspiró el PBS para obtener los parásitos (se observó el PBS turbio con los precipitados de tejidos). Se introdujo la muestra de tejido en el medio de cultivo M-199 para las *Leishmanias*. Se realizó una curva de crecimiento para conocer el día óptimo para la infección que fue en el día 4 (fase estacionaria).

#### Obtención de células de médula ósea y diferenciación a macrófagos

Se utilizaron 5 ratones hembra de 6 a 8 semanas de la cepa BALB/c, de los cuales se tomaron los huesos largos de las patas posteriores (fémur y tibia), evitando la fisura de los huesos. Los huesos se colocaron en alcohol al 70% durante 2 minutos y en PBS con 20% de antibiótico (estreptomina y penicilina) durante 3 minutos. Se extrajo la médula ósea cortando los dos extremos del hueso y con la ayuda de una jeringa de insulina se realizaron 3 lavados del centro del hueso con PBS (hasta que el hueso cambió de color). El PBS con células se colectó en tubos de 15 mL que se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregó 20 mL de PBS para que los restos de los huesos (debris) quedaran en el fondo del tubo. Se recolectaron las células de la médula ósea en un tubo de 50 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Se decantó y se resuspendió el botón de células en medio RPMI, suplementado con 10% de SFB, y se le agregó 20% de medio L929 conteniendo M-CSF. Se analizó la viabilidad de las células, mediante azul tripano en una cámara de Neubauer.

Se colocaron  $2 \times 10^6$  células por caja Petri y se dejaron durante 7 días a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las células se desprendieron de la caja Petri mediante 4 lavados con PBS frío cuatro y se colectaron en tubos de 50 mL, se centrifugaron a

1500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% SFB.

#### Análisis de la marca F4/80 en macrófagos por citometría de flujo

La pureza de la población de macrófagos murinos diferenciados de médula ósea se analizó por citometría de flujo, utilizando el marcador F4/80. Se tomó una alícuota de  $1 \times 10^6$  células del cultivo de macrófagos y se lavaron con PBS a 2000 rpm durante 10 min. Se decantó y se le agregó albúmina al 20% durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 2000 rpm. Se decantó y las células se marcaron con ficoeritrina (PE) F4/80 anti-ratón (2:50) y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FAC Scan junto con el software (BD ImmunocytometrySystems).

#### Infección de macrófagos con *L. mexicana*

Se utilizaron un total de 5 ratones, por cada uno se usó una placa de 24 pozos. A cada pozo se colocó un cubreobjetos redondo y se agregaron  $2 \times 10^5$  macrófagos en 500  $\mu$ L de RPMI. Se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para su adhesión. Se infectaron con los diferentes aislados (LCL: 4 aislados totales; LCD: 5 aislados y LMC: un aislado) un aislado por pozo. Por otro lado, se colocó también el control positivo que se estimuló con lipopolisacárido (LPS) y se colocaron macrófagos sin estímulo(s/e) como basal. Los parásitos se lavaron con PBS (tres veces) y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. Se contaron los parásitos fijados con glutaraldehído 0.1% (diluido en PBS) en una dilución 1:10.

En la placa de 24 pozos se colocaron los macrófagos con los parásitos en una relación 1:10 (células: parásitos) por pozo, en un volumen total de 1 mL. Se centrifugó la placa a 1300 rpm durante 3 minutos y se incubó durante 2 horas a 26 °C. Posteriormente, se lavó cada pozo con PBS a temperatura ambiente tres veces y se agregó 500  $\mu$ L de RPMI con 10% SFB y se incubó durante 24 horas a 37°C. Esto se analizó la fagocitosis por medio de la tinción de Giemsa y el sobrenadante obtenido se conservó a -70 °C para el análisis de las citocinas por ELISA tipo sandwich.

### Análisis de la fagocitosis por la tinción de Giemsa

Los cubreobjetos redondos con los macrófagos sin infectar e infectados se lavaron 3 veces con PBS a temperatura ambiente, se fijaron con metanol durante 3 minutos, se dejaron secar y se tiñeron con Giemsa a una dilución 1:20 durante 15 minutos. Se lavaron los cubreobjetos con agua y se colocaron sobre papel para secar. Los cubreobjetos secos se montaron sobre portaobjetos con resina y se etiquetaron.

Se tomaron fotos de las laminillas y de 100 células tomadas al azar, se contaron el número de células infectadas, el número de vacuolas parasitóforas, el número de parásitos en una vacuola, el número de parásitos fagocitados que no se encontraban dentro de una vacuola y el número de parásitos totales en cada célula infectada. A estos datos se les realizó un análisis estadístico para comparar entre grupos y aislados.

### Análisis de la producción de quimiocinas y citocinas por ELISA (tipo sándwich)

En una placa de 96 pozos de fondo plano, se colocó el anticuerpo de captura que se diluyó con su buffer de unión correspondiente para cada citocina y quimiocina, el cual variaba en la dilución y en el volumen final (Tabla 1). Una vez, colocado el anticuerpo de captura se incubó a 4°C durante 24 horas.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para los diferentes anticuerpos de captura.

Anticuerpos de captura para:	Buffer de Unión	Dilución	Vol. Final
Citocinas			
TNF- $\alpha$	pH = 6	4:1000	50 $\mu$ l
IL-12 p70	pH = 9	8:1000	50 $\mu$ l
IL-10	pH = 9	5:1000	50 $\mu$ l
Quimiocina			
MIP-1 $\alpha$	pH = 9	4:1000	100 $\mu$ l

La placa se lavó 4 veces con PBS 1X/Tween 80 al 0.01% en el lavador de micro-placas EL<sub>x</sub>50 Auto StripWasher, (BIO-TEK Instruments, INC). Después del último lavado, se secaron los pozos y se colocaron 200  $\mu$ l de la solución bloqueadora durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se lavó la placa nuevamente con PBS 1X/Tween 80 al 0.01% tres veces y se colocaron 100 µl de la citocina recombinante por pozo para la curva estándar, así como las muestras. La curva estándar consiste en una serie de diluciones 1:2 de la citocina recombinante que sirve de control positivo (Tabla 2). Posteriormente, en los siguientes pozos, se colocaron las muestras de los sobrenadantes de los macrófagos infectados con los diferentes aislados (LCL: 4 aislados totales; LCD: 5 aislados y LMC: un aislado), con lipopolisacárido (LPS) y se colocaron macrófagos sin estímulo (s/e). Se incubó a 4°C por 24 horas.

Tabla 2. Concentraciones iniciales para cada citocina utilizadas en la curva estándar.

Citocina y/o quimiocina	Concentración inicial
TNF- $\alpha$	2000
IL-12 p70	2000
IL-10	2000
MIP-1 $\alpha$	4000

Se lavó la placa 4 veces eliminando todo el líquido y se agregaron 100 µl del anticuerpo de detección diluido, el cual se incubó por una hora a temperatura ambiente. La concentración del anticuerpo de detección varió para cada citocina y se diluyó en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween20. Se realizaron 6 lavados y se dejó secar la placa entre cada lavado. Se agregó estreptavidina fosfatasa alcalina diluida 1:2000 en albúmina bovina al 1% con 0.05% de Tween 20. Se colocaron 100 µl en cada pozo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa 8 veces y se agregaron 100 µl de solución reveladora que compuesta de un buffer de sustrato y p-

nitrofenil fosfato (pNPP). Se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante tiempos variables dependiendo de cada citocina (15 min). La placa se analizó en el espectrofotómetro EL-312E (BIO-TEK INSTRUMENTS) a una longitud de onda de 405 nm, utilizando el programa KC4.

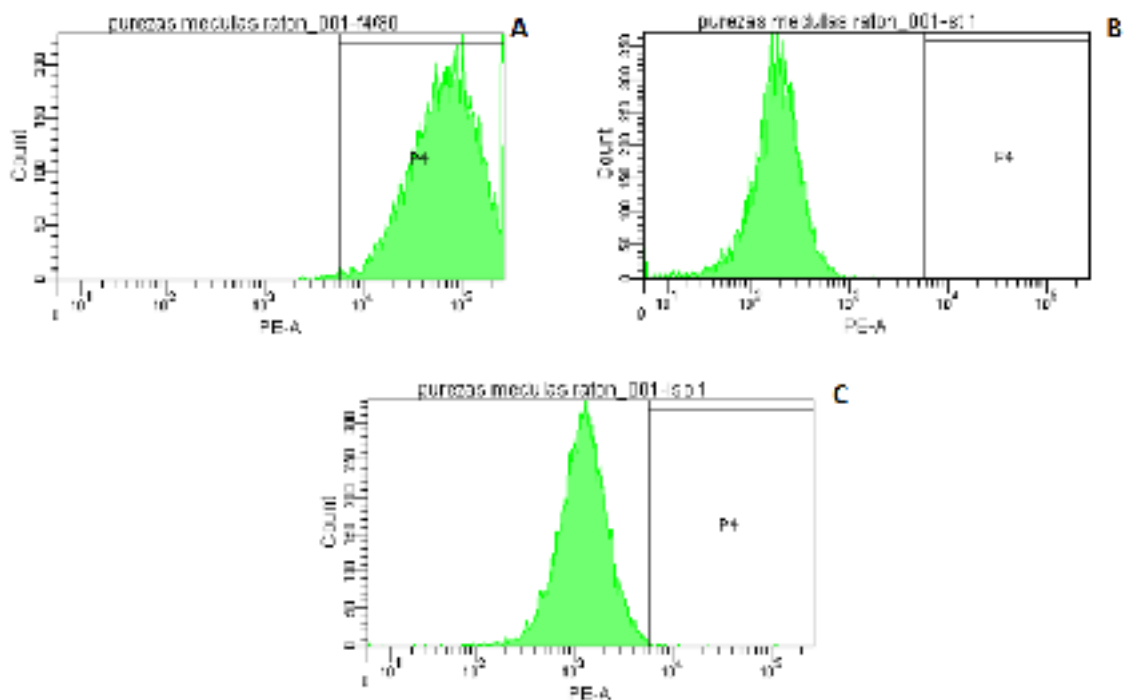
### Análisis de resultados

Los ensayos experimentales de cada aislado se repitieron 5 veces. Todos los datos se expresaron como la media de los valores obtenidos  $\pm$  error estándar (ES). Se utilizó la prueba de U Mann-Whitney para comparar las diferencias entre dos muestras. Se consideró estadísticamente significativo cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Expresión del marcador F4/80 en macrófagos diferenciados

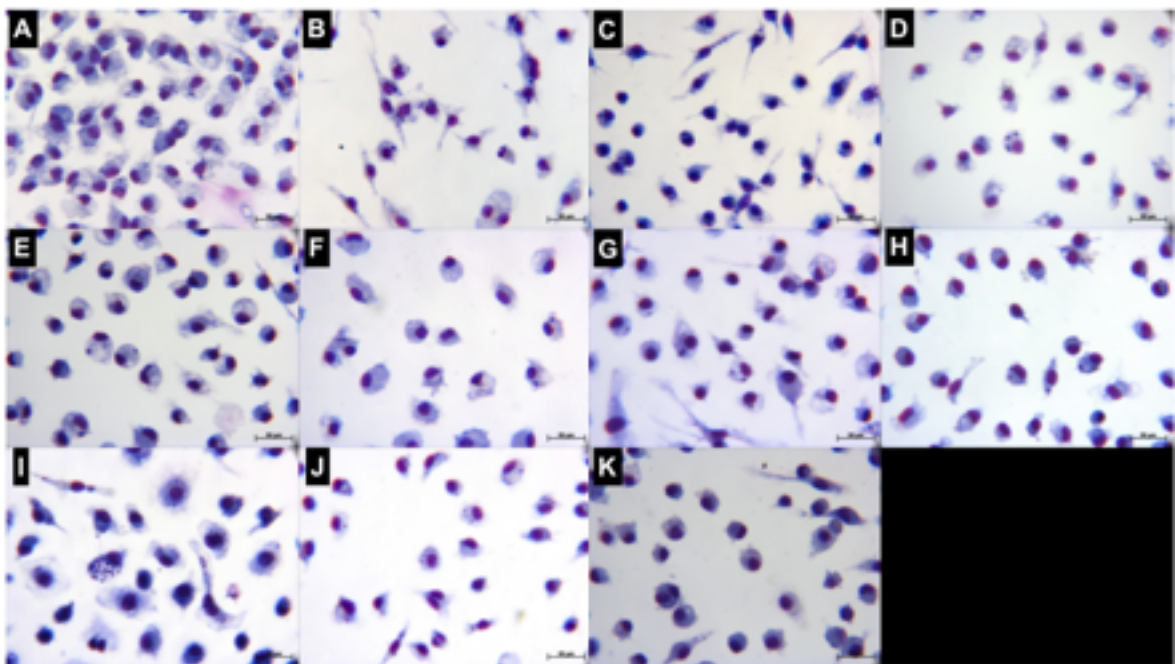
El grado de pureza de los macrófagos diferenciados de médula ósea se midió con el fluorocromo F4/80 PE anti-ratón por medio de citometría de flujo (Fig. 13). La población de macrófagos mostró una pureza mayor al 90.5% (Fig. 13A).



**Figura 13.** Análisis de la pureza de macrófagos diferenciados de médula ósea. En el histograma (A) se muestra la población de macrófagos marcados con F4/80. (B) Se muestra la población de macrófagos sin teñir. (C) Se muestra el control isotipo.

## Macrófagos infectados con los diferentes aislados de *L. mexicana*

Para este análisis se utilizaron parásitos de *L. mexicana* aislados de diferentes pacientes con cuadros clínico de leishmaniasis cutánea (Figura 14). Estos tenían diferentes tiempos en cultivo *in vitro* y en ratones en el laboratorio. Se consideraron como recién aislados cuando tenían menos de 3 años de haber sido aislados de pacientes. Todos los parásitos de pacientes con la forma LCL (Fig. 14 A-D) y LMC (Fig. 14J) fueron recién aislados. En cambio, de los 5 aislados de pacientes con LCD, únicamente 1 fue de aislamiento reciente (LCD 5) (Fig. 14 I).



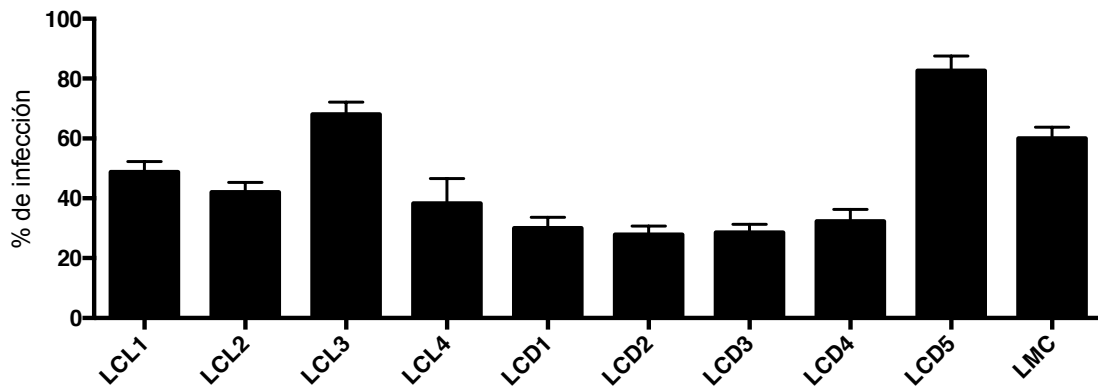
**Figura 14.** Fotos de macrófagos infectados con diferentes aislados de *L. mexicana*. A-D. aislados de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL). E-I. aislados de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD). J. aislados de un paciente con Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) y K. macrófagos sin infectar. (Fotos a 40X).

## Análisis de Fagocitosis

### Porcentaje de infección

Se analizó el porcentaje de macrófagos infectadas con *L. mexicana* obtenido de cada aislado (Figura 15). Los aislados provenientes de pacientes con LCD muestran un menor porcentaje de infección en un rango entre 27 y 32%, con excepción del aislado

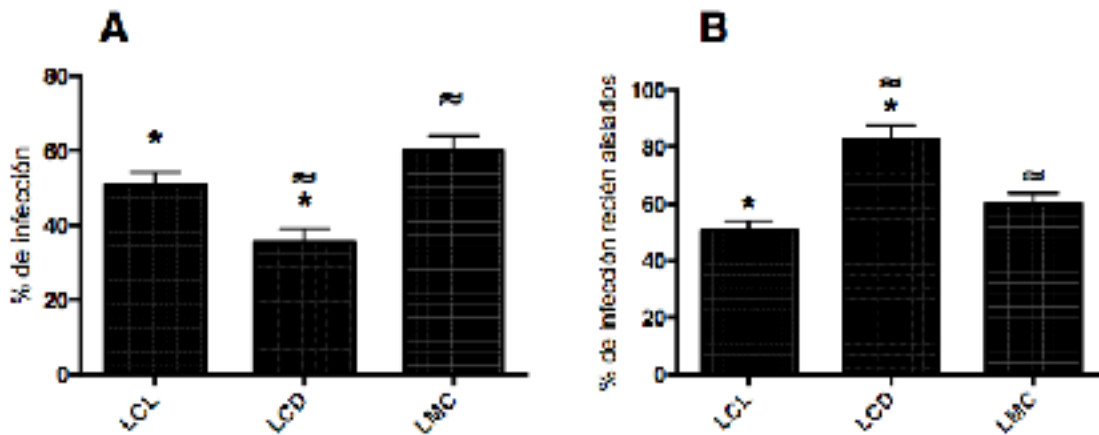
LCD 5 donde el 82.6% de los macrófagos estaban infectados. En cambio, los aislados LCL presentan un rango del 40 al 68% y en LMC con un 60%.



**Figura 15.** Porcentaje de infección de macrófagos infectados con *L. mexicana* provenientes de diferentes aislados: LCL (1-4), LCD (1-5) y LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado.

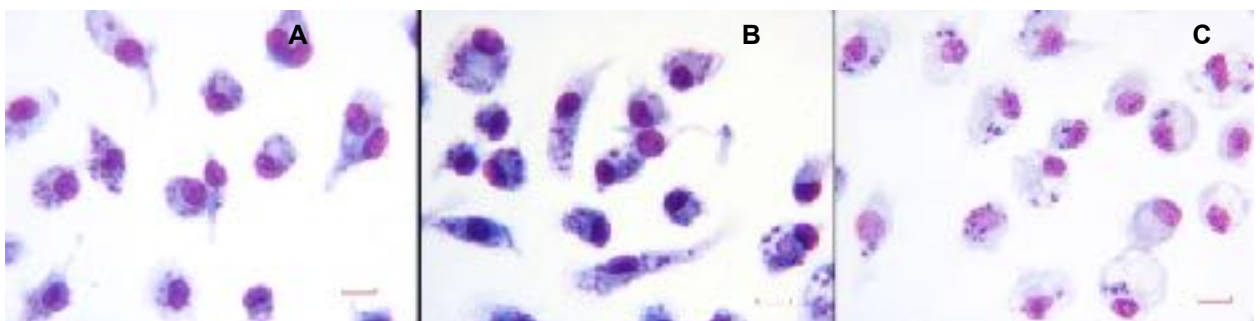
Al analizar los aislados, respectivamente de su tiempo de cultivo en el laboratorio, se encontró que el porcentaje de infección de macrófagos infectadas con *L. mexicana* de los diferentes aislados LCL, LCD y LMC mostró que LCL tuvo un 50.6%, LCD un 35.4% y LMC un 60%. Se encontraron diferencias significativas entre LCL vs LCD y LCD vs LMC (Figura 16 panel A). El panel B muestra el porcentaje de infección en macrófagos infectados únicamente con parásitos recién aislados (<3 años) de pacientes con LCL, LCD y LMC. Se observaron diferencias significativas entre LCL vs LCD y LCD vs LMC, siendo que el aislado de LCD 5 mostró el mayor porcentaje de infección con un 82.6%.





**Figura 16.** Porcentaje de infección en grupos de macrófagos infectados con *L. mexicana* de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestra todos los aislados: 4 aislados LCL, 5 aislados LCD y un aislado LMC. (B) Se muestran los recién aislados (<3 años): 4 aislados LCL, un aislado LCD5 y un aislado LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE) para cada grupo de aislado. Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \* $\approx p < 0.05$ .

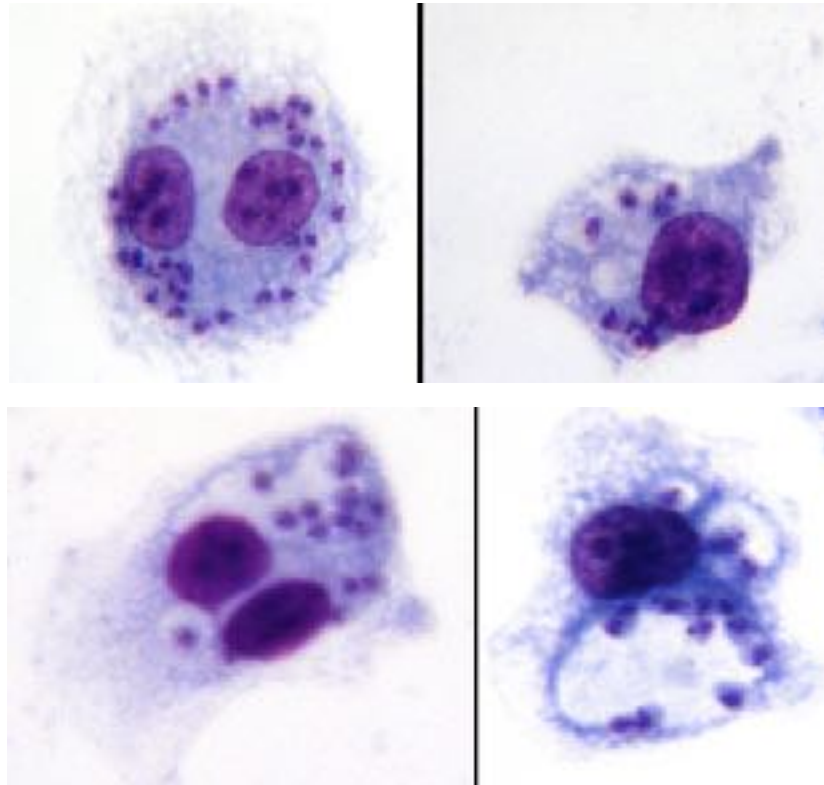
Las diferencias en el porcentaje de infección de macrófagos de aislados LCL, LCD y LMC también se observan en las fotografías representativas (Figura 17), donde el mayor número se observó en LCD (Figura 17 B)



**Figura 17.** Macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Imágenes representativas de A) aislado de paciente con Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL); B) aislado de paciente con Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y C) aislado de un paciente con Leishmaniasis Mucocutánea (LMC). (Fotos a 63X escala de 10 $\mu$ ).

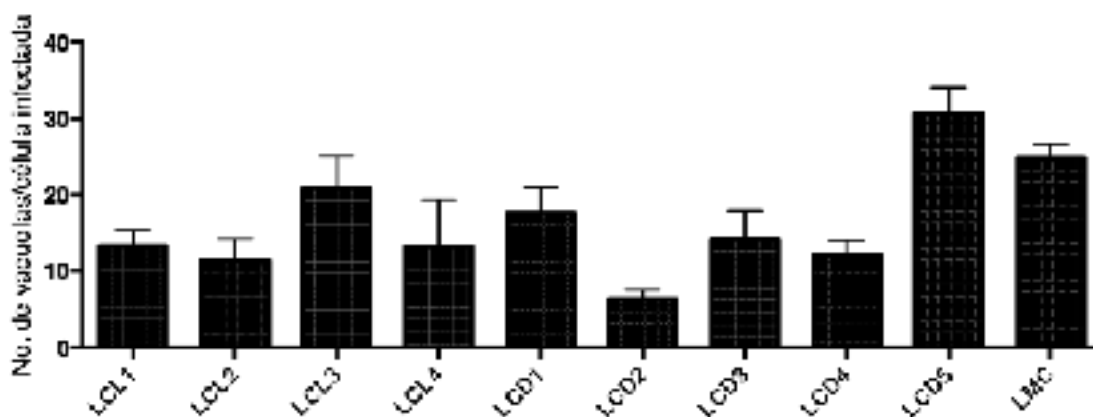
#### Número de vacuolas

Se observó que existe una variación en la morfología y tamaño de las vacuolas. En algunos casos no se define claramente el límite de la vacuola, pero en otros casos el tamaño suele ser muy grande (Figura 18).



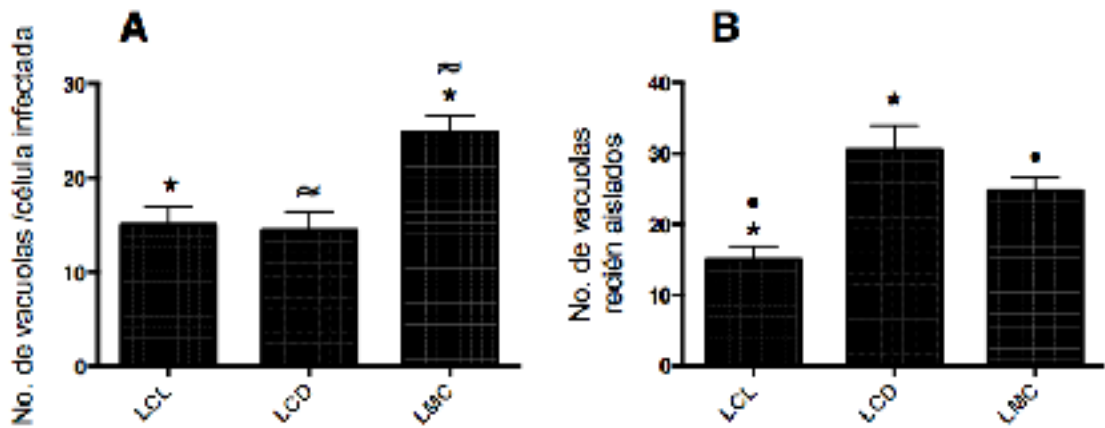
**Figura 18.** Diferencias en la morfología y tamaño de las vacuolas de macrófagos infectados con promastigotes de *L. mexicana* de paciente LCD de recién aislado.

El número de vacuolas en macrófagos infectados con *L. mexicana* de los distintos aislados se muestran en la Figura 19. En los diferentes aislados el número de vacuolas se encuentran en un rango de 6 y 30 vacuolas. El aislado LCD 5 presentó el mayor número con 30 vacuolas, seguida de LMC con 24 vacuolas y LCL3 con 20 vacuolas. Por otro lado, el menor número de vacuolas fue de 6 para el aislado LCD2.



**Figura 19.** Número de vacuolas de macrófagos infectados con *L. mexicana*, provenientes de diferentes aislados: LCL, LCD y LMC. Las barras muestran la media del número de vacuolas  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado.

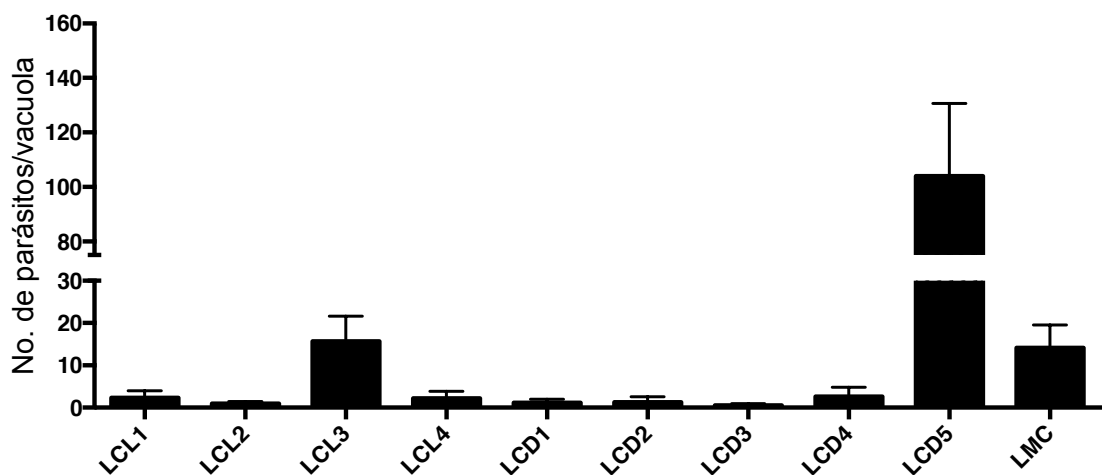
El análisis del número de vacuolas por grupos de aislados mostró diferencias entre los 3 grupos de pacientes (Figura 20). En el panel A se incluyen a todos los aislados del laboratorio, donde se observa que los valores promedio de vacuolas en macrófagos infectados con aislados de LCL y LCD de 5 experimentos fue de 15 vacuolas. Esto contrasta con el promedio de 24 vacuolas que se observaron en macrófagos infectados con parásitos del paciente LMC. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre LCL vs LMC y LCD vs LMC. En el panel B únicamente se muestran los resultados comparativos de los parásitos recién aislados (<3 años). El aislado reciente del paciente LCD5 mostró en promedio el doble del número de vacuolas (30 vacuolas) al compararlo con el promedio total del grupo LCD. Los grupos de LCL y LMC se mantuvieron con el mismo número (15 y 24 vacuolas). Se encontraron diferencias significativas entre LCL vs LCD y LCL vs LMC.



**Figura 20.** Número de vacuolas de macrófagos infectados con *L. mexicana*, en dos grupos: >3 años aislados y recién aislados (<3 años) de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestra todos los aislados: 4 aislados de LCL, 5 aislados de LCD y un aislado de LMC. (B) Se muestra el grupo de los recién aislados: 4 aislados de LCL, uno de LCD5 y uno de LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\approx$   $p < 0.05$ .

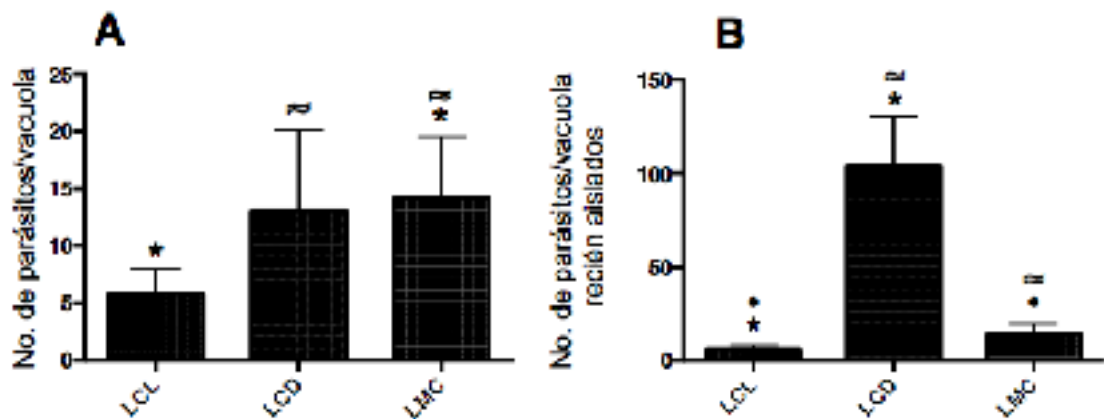
#### Número de parásitos en vacuolas

El análisis del número de parásitos dentro de las vacuolas en macrófagos infectados con *L. mexicana* de cada uno de los aislados (LCL, LCD y LMC) mostró que para la mayoría de los aislados hay entre uno y dos parásitos por vacuola. Únicamente los aislados LCL3 y LMC presentaron en promedio 15 parásitos y LCD5 mostró un promedio de 104 parásitos. Figura 21



**Figura 21.** Número de parásitos en vacuolas de macrófagos infectados con *L. mexicana*, aislados provenientes de pacientes con LCL, LCD y LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado.

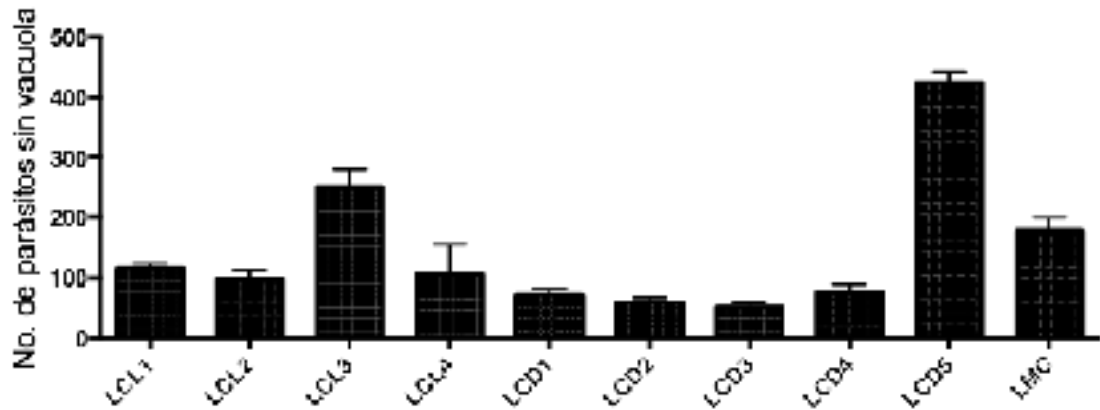
El análisis del número de parásitos por vacuola también mostró variaciones de acuerdo con el tiempo de cultivos en el laboratorio. El promedio de los aislados LCL, LCD y el LMC se muestra en Figura 22 A, donde el promedio del grupo de LCL fue de 5 parásitos, el LMC de 14 parásitos y el promedio de aislados de LCD mostraron 13 parásitos por vacuolas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, LCL vs LMC y LCD vs LMC. Sin embargo, las comparaciones entre parásitos recién aislados mostraron que el mayor número de parásitos en promedio por vacuola correspondió al aislado LCD5 con 104 parásitos por vacuola. En cambio, los aislados LCL y el aislado LMC mostraron tener un promedio menor a 15 parásitos por vacuola. Las diferencias fueron estadísticamente significativas entre LCL vs LCD, LCL vs LMC y LCD vs LMC (Figura 22).



**Figura 22.** Número de parásitos en vacuolas de macrófagos infectados con *L. mexicana*, en dos grupos: todos los aislados y recién aislados de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestra todos los aislados: 4 aislados de LCL, 5 aislados de LCD y un aislado de LMC. (B) Se muestra el grupo de los recién aislados: 4 aislados de LCL, el aislado LCD 5 y el aislado LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\approx$   $p < 0.05$ .

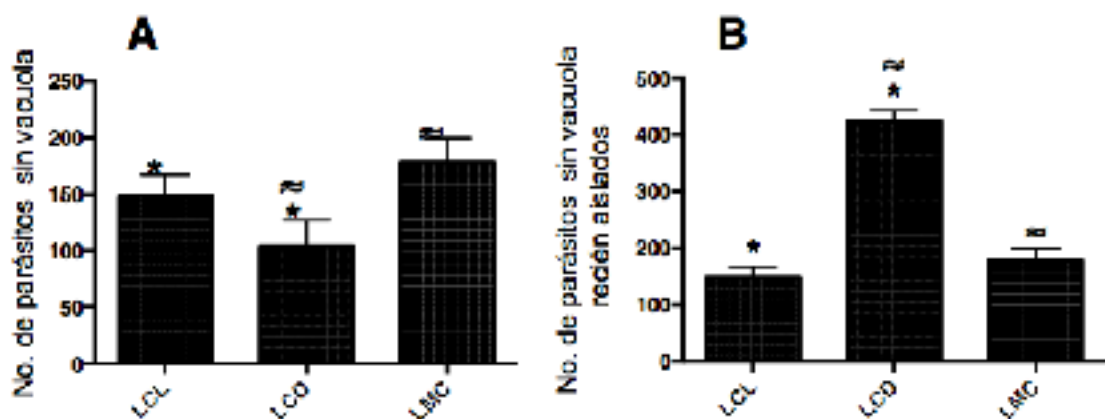
#### Número de parásitos sin vacuola

Se analizó el número de parásitos que se encontraban en el “citosol”, fuera de vacuolas en macrófagos infectados con *L. mexicana* de los aislados LCL, LCD y LMC (Figura 23). El aislado LCD5 presentó el mayor número con 424 parásitos, seguido de LCL3 con 250 parásitos y LMC con 178 parásitos. El resto de los aislados se encontraron entre 51 a 116 parásitos.



**Figura 23.**Número de parásitos libres en citosol, fuera de vacuolas en macrófagos infectados con *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL, LCD y LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado.

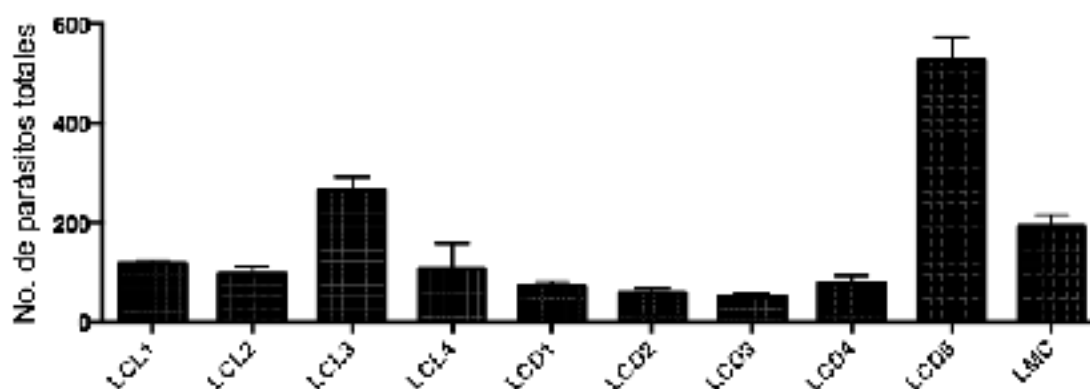
El promedio de los parásitos de pacientes LCL, LCD y LMC que se encontraban en el exterior de las vacuolas (Figura 24) se presentan en el panel A que muestra los promedios de los grupos de aislados por enfermedad LCL, LCD y LMC. El mayor número de parásitos se detectó en el aislado LMC con 178 parásitos, seguida del grupo LCL con 148 parásitos y 103 parásitos para el grupo LCD. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos LCL vs LCD y LCD vs LMC. El panel B muestra la comparación entre los parásitos recién aislados, donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre LCL vs LCD y LCD vs LMC. El mayor número de parásitos fue del paciente LCD5 con 424 parásitos.



**Figura 24.**Número de parásitos sin vacuolas de macrófagos infectados con *L. mexicana* provenientes de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestran todos los aislados: 4 aislados de LCL, 5 aislados de LCD y un aislado de LMC. (B) Se muestra el grupo de los recién aislados (<3 años): 4 aislados de LCL, uno de LCD5 y uno de LMC. La barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\approx$   $p < 0.05$ .

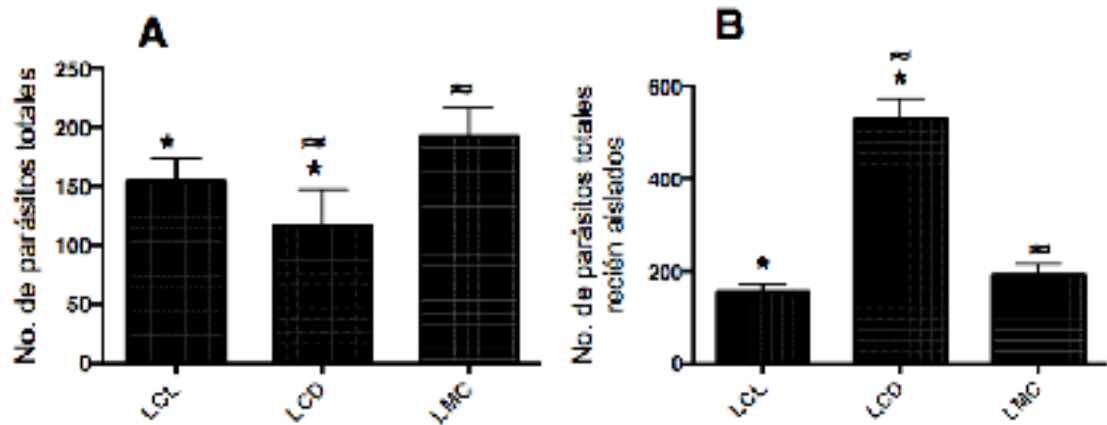
## Número total de parásitos

El análisis del número total de amastigotes en macrófagos infectados con *L. mexicana* de todos los aislados mostró que el aislado LCD 5 presentó los niveles más altos con un promedio de 528 amastigotes, seguido de LCL3 con 266 parásitos y en LMC con 192 parásitos. El resto de los aislados se encontraron en un rango de 51 a 118 parásitos totales (Figura 25).



**Figura 25.** Número de parásitos totales de macrófagos infectados con *L. mexicana*, aislados provenientes de pacientes con LCL, LCD y LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron para cada aislado cinco experimentos.

El análisis de los promedios de los grupos (Figura 26) reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos LCL vs LCD y LCD vs LMC (26A). El análisis comparativo del promedio de los aislados recientes de pacientes LCL, con el paciente LCD5 y el paciente LMC reveló diferencias estadísticamente significativas entre LCL vs LCD y LCD vs LMC, siendo LCD el que tuvo mayor número de parásitos (26B).



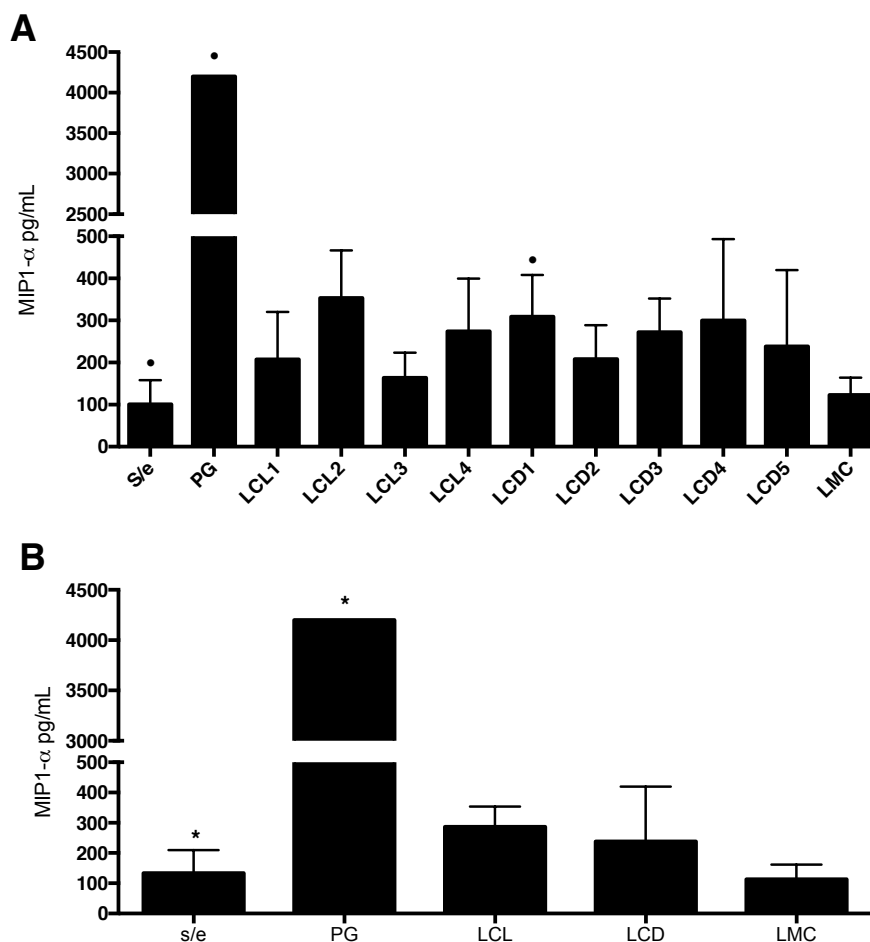
**Figura 26.** Número de parásitos totales en grupos de macrófagos infectados con *L. mexicana* aislados de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestra todos los aislados: 4 aislados de LCL, 5 aislados de LCD y un aislado de LMC. (B) Grupos con parásitos recién aislados: 4 aislados de LCL, uno de LCD y uno de LMC. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\approx$   $p < 0.05$ .

#### Análisis de la Producción de Quimiocina y Citocinas

##### MIP-1 $\alpha$

El análisis de la producción de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  de los macrófagos infectados con *L. mexicana* obtenida de diferentes aislados de LCL, LCD y LMC mostró variación entre los aislados, con una alta producción únicamente en el caso del control positivo con péptidoglicano (Figura 27). El panel A muestra el promedio de 5 experimentos de cada aislado, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre macrófagos sin estímulo (s/e) vs LCD1 con 309 pg/mL y el peptidoglicano (PG) con 4200 pg/mL. En el panel B, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las únicas diferencias se encontraron entre los macrófagos sin estímulo (s/e) con el peptidoglicano (PG) como control positivo.

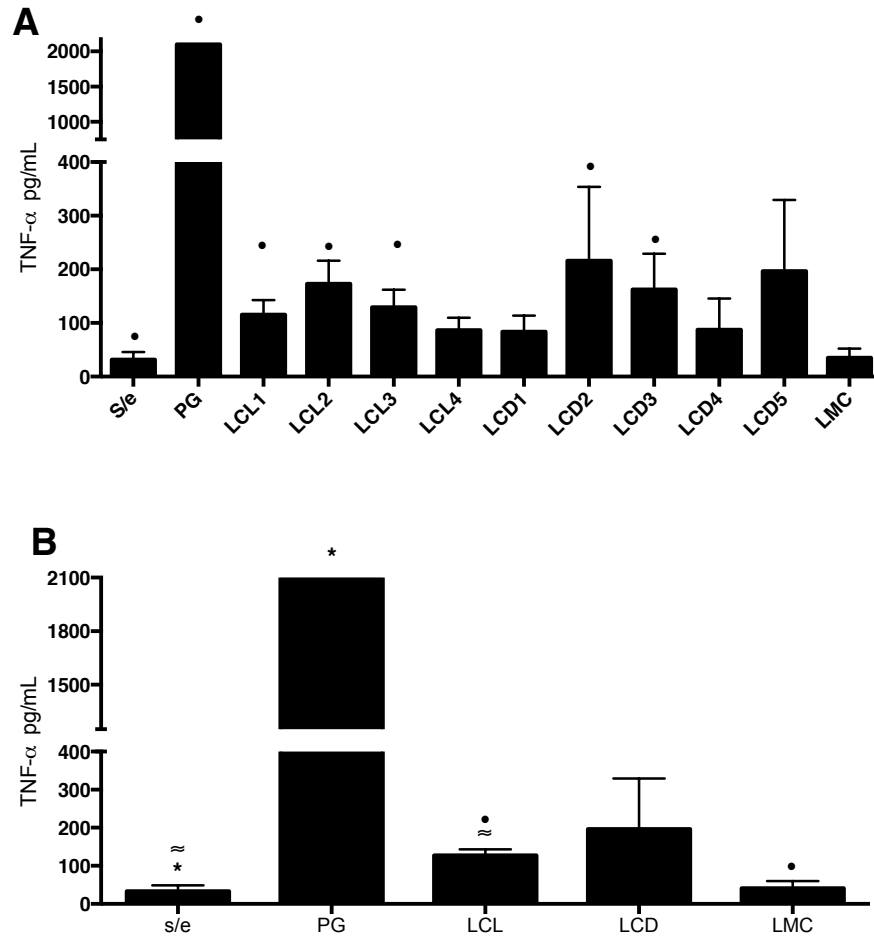




**Figura 27.** El análisis de la producción de MIP-1 $\alpha$  de macrófagos infectados con *L. mexicana* aislado de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestran los aislados de manera individual. (B) Los aislados en grupos. Las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $p < 0.05$ .

### TNF- $\alpha$

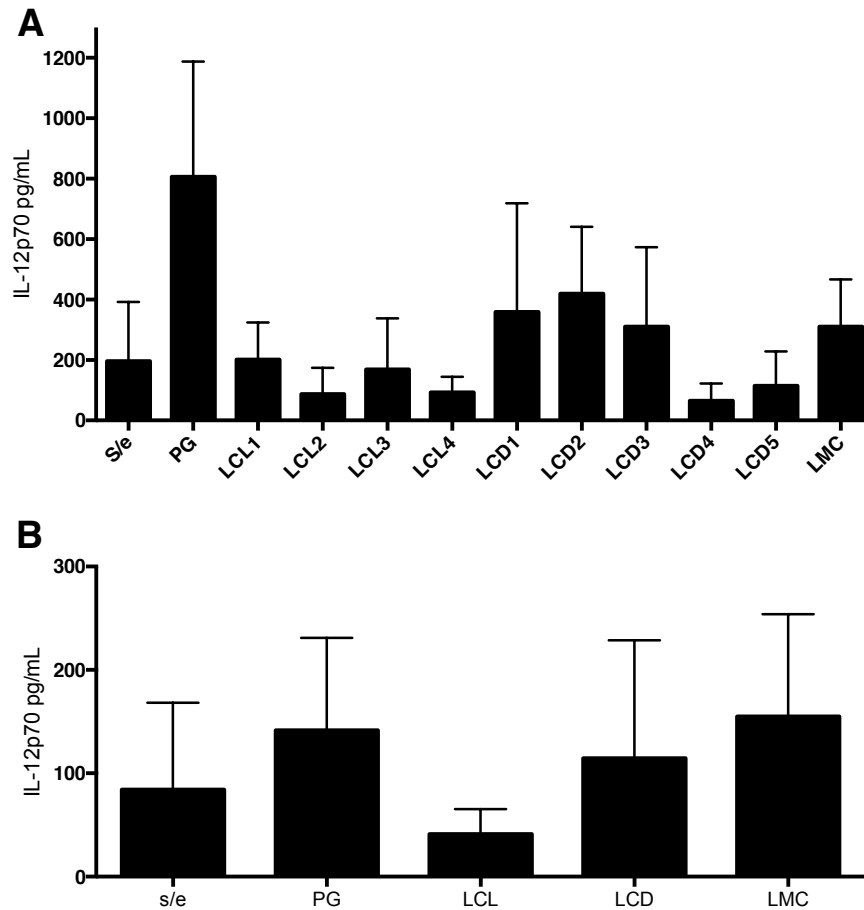
El análisis de la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos infectados con *L. mexicana* obtenidos de diferentes aislados de LCL, LCD y LMC mostró importante variación (Figura 28). El panel A muestra el promedio de 5 experimentos de cada aislado donde se observa una baja producción de TNF- $\alpha$  (50-200  $\mu\text{g/L}$ ). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los macrófagos sin estímulo (s/e) vs los aislados LCL1, LCL2, LCL3, LCD2, LCD3 y el peptidoglicano (PG). El panel B muestra las diferencias estadísticamente significativas en la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos infectados por los grupos de aislados. Se observa que macrófagos estimulados con PG producen significativamente más TNF- $\alpha$  que macrófagos sin estímulo (s/e). De igual manera, los aislados LCL inducen más TNF- $\alpha$  que el aislado LMC.



**Figura 28.** El análisis de la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos infectados con *L. mexicana*, aislado de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestran los aislados de manera individual. Se utilizaron para cada aislado cinco experimentos. (B) Los aislados en grupos. En las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\approx$   $p < 0.05$ .

### IL-12 p70

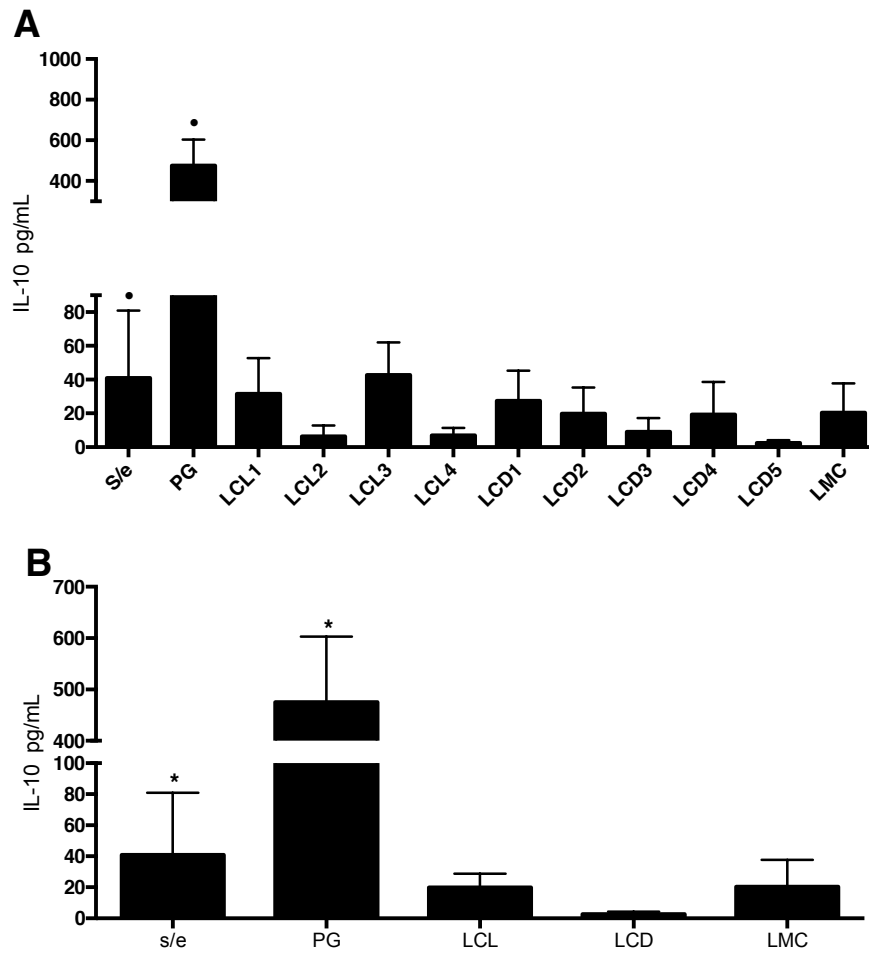
La producción de IL-12p70 de macrófagos infectados con *L. mexicana* de diferentes aislados de LCL, LCD y LMC no varió entre los diferentes grupos (Figura 29). El panel A revela que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los aislados. El panel B muestra el grupo de LCL obtuvo una menor producción de esta citocina (41 pg/mL). Para el grupo LCD se registró 114 pg/mL y para LMC se obtuvo 155 pg/mL.



**Figura 29.** El análisis de la producción de IL-12p70 de macrófagos infectados con *L. mexicana* aislado de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestran los aislados de manera individual. (B) Se muestran los aislados en grupos. En las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado.

## IL-10

La producción de IL-10 por macrófagos infectados con *L. mexicana* aislada de pacientes LCL, LCD y LMC mostraron baja producción (2-40 pg/ $\mu$ L) que no fue estadísticamente significativo con respecto de macrófagos control sin estímulo (Figura 30). El panel A muestra los aislados individuales, donde únicamente el PG indujo una producción elevada (475 pg/mL). El panel B compara los promedios entre los grupos donde únicamente el valor elevado de PG es significativamente distinto al control sin estímulo.



**Figura 30.** El análisis de la producción de IL-10 de macrófagos infectados con *L. mexicana* de aislado de pacientes con LCL, LCD y LMC. (A) Se muestran los aislados de manera individual. (B) Se muestran los aislados en grupos. En las barras muestran la media  $\pm$  error estándar (SE). Se utilizaron cinco experimentos para cada aislado. \*  $\bullet$   $p < 0.05$ .

## Discusión

El macrófago es importante durante la infección con *Leishmania* debido a que ejerce un triple papel: es célula fagocítica, es leishmanicida y es presentadora de antígenos (Mougneau et al., 2011; Espinosa Rojas y Arce Paredes, 2003; von Stebut y Tenzer, 2017). En este estudio se analizó la fagocitosis y la producción de citocinas por macrófagos infectados con diferentes aislados provenientes de pacientes con tres formas clínicas causadas por *L. mexicana*: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y leishmaniasis mucocutánea (LMC).

Una de las primeras observaciones del estudio fue la detección de diferencias entre el tiempo de aislamiento de los parásitos de pacientes con el mismo cuadro clínico. En el grupo LCD un aislado fue reciente (<3 años: LCD5) y el resto de los aislados fueron mantenidos en cultivo por más de 3 años. Por tal motivo, se realizaron 2 análisis para los distintos aislados: por un lado se analizaron todos los aislados LCD como grupo, y adicionalmente se comparó el aislado reciente del paciente LCD (LCD5) con el grupo de aislados recientes de pacientes LCL y con el aislado reciente LMC. Se encontraron diferencias en los macrófagos infectados con los diferentes aislados. El aislado LCD5 infectó a un mayor porcentaje de macrófagos (83%), seguido del aislado LMC con el 60% y el menor porcentaje de macrófagos fueron infectados por los aislados LCL con un promedio de 51%. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura para pacientes con LCD infectados con *L. mexicana*. Argueta et al., (2016) utilizaron la misma cepa *L. mexicana* y obtuvieron un porcentaje de infección del 74% en células dendríticas. En contraste, von Stebut y Tenzer (2017) encontraron un porcentaje de infección menor al 50% en células dendríticas infectadas con *L. major*. Por tal motivo en estudios de fagocitosis es importante considerar el tipo de células, el tiempo de incubación y la relación entre célula: parásito, así como la virulencia y la especie de los parásitos.

Durante la fagocitosis el parásito es internalizado y se localiza en la vacuola parasitófora, donde se replica (Real y Mortara, 2012; Semini y Aebischer, 2018). En este trabajo se analizó el número de vacuolas y el número promedio de parásitos por vacuola en macrófagos infectados con los distintos aislados. Los macrófagos

infectados con el aislado reciente LCD5 tuvieron un promedio de 30 vacuolas con 104 amastigotes, mientras macrófagos infectados con el aislado del paciente LMC mostraron en promedio 24 vacuolas con 14 amastigotes y macrófagos infectados de aislados del grupo LCL mostraron un promedio de 15 vacuolas con 6 amastigotes. Nuestros hallazgos están en acuerdo con lo reportado en la literatura, donde se ha reportado que el tamaño de las vacuolas así como el número de parásitos dentro de las vacuolas varía dependiendo de la especie de *Leishmania*. Real et al., (2008) demostraron diferencias en la fagocitosis de macrófagos infectados con *L. amazonensis* y concluyeron que las vacuolas se pueden fusionar después de 24 horas, generando una gran vacuola. Estos valores pueden cambiar con el tiempo de interacción, la relación célula: parásito y la especie de *Leishmania*.

Nuestros datos revelaron que los parásitos aislados de pacientes con LCD cambian su comportamiento en el macrófago después de cultivos prolongados en comparación con los parásitos de aislamientos más recientes (menores de 3 años). Aunque esto se puede asociar al tiempo de cultivo en el laboratorio, no se puede descartar la posible heterogeneidad entre los diferentes aislados provenientes del hospedero (Carrada et al., 2007).

Nuestros datos de la virulencia diferencial de distintos aislados está de acuerdo con la literatura. Cruz et al., (2001) definió que “La virulencia se mide por el número de parásitos de una especie determinada para matar o destruir al hospedero, en condiciones establecidas y en un periodo de tiempo definido”, mientras que Ali et al., (2003) reportaron que los parásitos pierden la virulencia al mantenerlos en cultivos sin pasar por un hospedero. Se ha reportado que en improntas de pacientes con LCD se observan un mayor número de parásitos en células (>20 amastigotes/célula) que en los pacientes con LCL (<5 amastigotes/célula) (Ritter et al., 1996; Real et al., 2008; Scott y Novais, 2016). De igual manera, se ha reportado que el número de parásitos en tejido de pacientes con LCD es mayor que en pacientes con LCL (Berzunza et al., 2009). Los datos de ambas formas clínicas se pueden extrapolar al modelo murino, donde los ratones susceptibles BALB/c presentan un mayor número de parásitos dentro de los macrófagos, siendo comparables a pacientes LCD. Por otro lado, los ratones

resistentes C57BL/6 se asemejan a la forma LCL (Villaseñor et al., 2008) conteniendo menos parásitos.

Interesantemente, el análisis comparativo del efecto que ejercen parásitos aislados recientemente de pacientes con cuadros clínicos de distinta severidad mostró que la infectividad del macrófago se correlaciona con la severidad clínica del paciente del cual fue aislado el parásito. El aislado reciente de LCD 5 correspondiente al paciente con la forma clínica de mayor severidad, también mostró mayor cantidad de parásitos en los macrófagos, generando mayor número de vacuolas altamente parasitadas. Estos valores fueron seguidos por el aislado de un paciente con LMC, un cuadro clínico menos severo que el LCD, y así mismo su comportamiento en el macrófago fue menos agresivo, mostrando menor número de parásitos en los macrófagos y en sus vacuolas. Por último, los aislados de pacientes con LCL correspondientes al cuadro clínico más benigno, también mostraron la menor infectividad en los macrófagos.

Por otro lado, el estudio de citocinas reveló que macrófagos infectados con los distintos aislados liberan citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-12p70, así como citocinas reguladoras como IL-10 y quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ . Aunque hubo variaciones entre los aislados de los distintos pacientes, estos no fueron significativos y tampoco se encontró correlación con la severidad de los cuadros clínicos de los pacientes de los cuales fueron aislados.

Se ha reportado que la producción de TNF- $\alpha$  en monocitos estimulados con LPG de *L. mexicana* es mayor que en células no estimuladas (Argueta et al., 2008; Carrada et al., 2007). No obstante, esta producción puede variar dependiendo del cuadro clínico del paciente y del tipo celular. Cañeda et al., (2014) encontraron diferencias en la producción de esta citocina en células NK estimuladas con LPG de *L. major* entre pacientes LCL y LCD. También se ha registrado una mayor producción de TNF- $\alpha$  en biopsias de pacientes con LCL en comparación con pacientes LCD (Ritter et al., 1996; Salaiza-Suazo et al., 1999). El TNF- $\alpha$  tiene un papel dual ya que por un lado participa en la eliminación y control del parásito pero también genera daño tisular por inducir una intensa inflamación como ha sido demostrado en pacientes con LMC ( Nylén y Eidsmo,

2012). Esta citocina también puede estar relacionada con el tiempo de evolución de la enfermedad (Melby et al., 1994).

En el presente estudio tampoco se encontraron diferencias significativas en la producción de la quimiocina MIP-1 $\alpha$  entre macrófagos infectados con los diferentes aislados. Los pocos estudios sobre MIP-1- $\alpha$  en la leishmaniasis son controversiales. Ritter et al., 1995 encontraron que hay una mayor expresión de MIP-1- $\alpha$  en lesiones de pacientes LCD versus los LCL. Villaseñor et al., (2008) muestran diferencias en la producción de esta quimiocina en células cebadas entre la cepa susceptible BALB/c y la resistente C57BL6. En la leishmaniasis, esta quimiocina favorece la diseminación del parásito por ser un quimioattractante de diversas células fagocíticas y células T y por inducir la producción de mediadores inflamatorios (Valencia et al., 2014).

Otra de las citocinas analizadas en el presente estudio fue la IL-12 que está compuesta de dos subunidades p35 y p40 y que juntas forman p70 que favorece la inducción de una respuesta tipo Th1 que es protectora en la leishmaniasis. En contraste, IL-12p40 es antagonista de su forma activa p70, por lo que una mayor concentración de p40 favorece un tipo de respuesta tipo Th2. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre macrófagos infectados con los distintos aislados. Estos datos están en acorde con lo observado por Carrada et al., (2008), quien no encontró variaciones en esta citocina entre monocitos de pacientes LCL y LCD. Sin embargo, será importante analizar ambas subunidades de IL-12 (p70 y p40) y buscar posibles correlaciones con la severidad de la enfermedad (Maspi et al., 2016; Carrada et al., 2008; Argueta et al., 2008).

La IL-10 es una citocina inmunoreguladora que bloquea la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, suprimiendo la activación del macrófago. En el presente trabajo tampoco se encontraron diferencias significativas en la producción de IL-10 entre los distintos aislados. Este estudio coincide con otros estudios que han mostrado una baja expresión de esta citocina en leishmaniasis. Akuffo et al., (1997) analizaron la expresión de mRNA IL-10 a diferentes tiempos en pacientes encontrando que pacientes con LCL tienen una mayor expresión a las 24 horas que pacientes con LCD. Sin embargo, a las 48 horas se revirtió el efecto. Por otro lado, Valencia et al., (2014)



mostraron que no hay diferencias en la expresión de mRNA IL-10 entre sujetos sanos y pacientes con lesiones activas o asintomáticos. Villaseñor et al., (2008) observaron diferencias significativas entre cepas resistentes C57BL/6 y cepas susceptibles BALB/c, mostrando valores más altos en estos últimos, lo cual posiblemente se correlaciona con una respuesta tipo Th2 en ratones BALB/c (Valencia et al., 2014).

Los resultados de este estudio revelaron datos novedosos sobre la correlación entre la severidad de la forma clínica de pacientes y la infectividad *in vitro* de sus parásitos.

## **Conclusiones**

1) Este trabajo demostró que para realizar estudios comparativos de virulencia entre distintos parásitos es importante trabajar con parásitos aislados recientemente (menos de 3 años de cultivo en el laboratorio).

2) Este trabajo también demostró que parásitos de la misma especie (*L. mexicana*) aislados recientemente de pacientes con cuadros clínicos de distinta severidad, muestran que su grado de infectividad de macrófagos *in vitro* se correlaciona con la severidad del cuadro clínico de los pacientes de los cuales fueron aislados.

## Bibliografía

- Akuffo H., Maasho K., Blostedt M., Höjeberg B., Britton S., and Bakhiet M. 1997. *Leishmania aethiopica* Derived from Diffuse Leishmaniasis Patients Preferentially Induce mRNA for Interleukina-10 while Those from Localized Leishmaniasis Patients Induce Interferon- $\gamma$ . The Journal of Infectious Diseases 175:737-741.
- Ali K. S., Rees R. C., Terrell N. C., and Ali S. A. 2013. Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*. Parasite Immunology 35(12): 441-456. doi: 10.1111/pim.12056
- Alvar J., Vélez I. D., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J., Jannin J., den Boer M., and WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Arango Duque G., and Descoteaux A. 2015. *Leishmania* survival in macrophage: where the ends justify the means. Microbiology and Immunoparasitology 26: 32-40. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007
- Argueta Donohué J., Carrillo N., Valdez Reyes L., Zentella A., Aguirre García M., Becker I., and Gutiérrez Kobeh L. 2008. *Leishmania mexicana*: Participation of NF- $\kappa$ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). Experimental Parasitology 120(1): 1-9. doi:10.1016/j.exppara.2008.04.002
- Argueta Donohué J., Wilkins Rodríguez A., Aguirre García M., and Gutiérrez Kobeh L. 2016. Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cell. Microbiology and Immunology 60: 369-381. doi: 10.1111/1348-0421.12325
- Berzunza Cruz M., Bricaire G., Salaiza Suazo N., Perez Montfort R., and Becker I. 2009. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. Parasitology Research 104(3): 691-699. doi: 10.1007/s00436-008-1247-2
- Botelho R. J., and Grinstein S. 2011. Phagocytosis. Current Biology 21(14): 533-538. doi: 10.1016/j.cub.2011.05.053
- Bremner P., and Heinrich M. I. 2002. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway. Journal Pharmacy and pharmacology 54(4): 453-72. doi: 10.1211/0022357021778637
- Burza S., Croft S.L., and Boelaert M. 2018. Leishmaniasis. The Lancet 15;392(10151): 951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- Cañeda Guzmán I.C., Salaiza N., Figueroa Fernandez E.A., Carrada Figueroa G., Aguirre Garcia M. and 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. doi:10.1371/journal.pone.0112410
- Carrada G., Cañeda C., Salaiza N., Delgado J., Ruiz A., Sanchez B., Gutiérrez Kobeh L., Aguirre Garcia M., and Becker I. 2007 Monocyte cytokine and costimulatory

- molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunology* 29:117-126. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00924.x
- Cascales Angosto M. 2005. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 71(2): 365-386.
- Cecilio P., Pérez-Cabezas B., Santarém N., Maciel J., Rodrigues V., and Cordeiro da Silva A., 2014. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Frontiers in Immunology* 5: 480. doi: 10.3389/fimmu.2014.00480
- Cruz Reyes A y Camargo Camargo B. 2001. *Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines*. Instituto de Biología, UNAM. Primera Edición. Editorial Plaza y Valdés.
- Delgado Dominguez J., González Aguilar H., Aguirre García M., Gutiérrez L., Berzunza Cruz M., Ruiz Remigio A., Robles Flores M., and Becker I. 2010. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differential regulates PKC  $\alpha$ -induce oxidative burst in macrophage of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunology*. 32(6): 440-449. doi: 10.1111/j.1365-3024.2010.011205.x.
- Duque Correa M. A y Rojas López M. 2007. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de inmunidad innata ante la complejidad de los eventos. *Inmunología* 26(2): 73-86.
- Espinosa Rojas O y Arce Paredes P. 2003. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. Primera Parte. *Bioquímica* 28(4): 14-28.
- Espinosa Rojas O y Arce Paredes P. 2003. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. Segunda Parte. *Bioquímica* 29(1): 18-31.
- Espinosa Rojas O y Arce Paredes P. 2003. Fagocitosis: Mecanismos y consecuencias. Tercera Parte. *Bioquímica* 29(2): 55-67.
- Gupta G., Oghumu S., and Satoskar A. R. 2013. Mechanism of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Advances in Applied Microbiology* 82: 155-184. doi:10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3
- Hernandez Urzúa M. A., and Alvarado Navarro A. 2001. Interleucina e inmunidad innata. *Revista Biomédica* 12: 272-280.
- Hoesel B., and Schmid J.A. 2013. The complexity on NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer* 12:86 doi: 10.1186/1476-4598-12-86.
- Kamhawi S. 2006. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasite: friends and foes? *Trends in Parasitology* 22(9): 339-445. doi:10.1016/j.pt.2006.06.012
- Maspi N., Abdoli A., and Ghaffarifar F. 2016. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health* 110(6): 247-260. doi: 10.1080/20477724.2016.1232042
- Melby P.C., Andrade N. F. J., Darnell B.J., Valencia P. G., Tryon V. V., and Palomo C. A. 1994. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 62(3):837-42.
- Mayani H., Flores Figueroa E., Pelayo R., Montesinos J. J., Flores Guzmán P., and Chavez González A. 2007. Hematopoiesis. *Cancerología* 2: 95-107.

- Moreno C y Sanchez Ibarrola A. 2003. Receptores Tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario. *Revista Médica Universitaria* 47(3): 29-33.
- Mougneau Evelyne, Bihl F., and Glaichenhaus N. 2011. Cell and immunology of *Leishmania*. *Immunological Reviews* 240: 286-296.
- Nylén S., and Eidsmo L. 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 34(12):551-61 doi: 10.1111/pim.12007
- Pigott D. M., Bhatt S., Golding N., Duda K.A., Battle K.E., Brady O.J., Messina J.P., Balard Y., Bastien P., Pratlong F., Brownstein J.S., Freifeld C.C., Mekaru S.R., Gething P.W., George D.B., Myers M.F., Reithinger R., and Hay S.I. 2014. Global distribution maps of the leishmaniasis. *eLife* 23(1): 19-31. doi: 10.7554/eLife.02851.
- Prajwal G., and Kanneganti Thirumala D. 2015. Innate immunity against *Leishmania* infection. *Cell Microbiology* 17(9): 1286-1294. doi: 10.1111/cmi.12484
- Rawlings J. S., Rosler K. M., and Harrison D. A. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal Cell Science* 117: 1281-1283. doi: 10.1242/jcs.00963
- Real F., and Moratara R.A. 2012. The Diverse and Dynamic Nature of *Leishmania* Parasitophorous Vacuoles Studied by Multidimensional Imaging. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 6(2): e1518. doi: 10.1371/journal.pntd.0001518.
- Real F., Pouchelet M., and Rabinovitch M. 2018. *Leishmania (L.) amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone-marrow derived mouse macrophages. *Experimental Parasitology* 119(1):15-23.
- Reithinger R., Dujardin J.C., Louzir H., Pirmez C., Alexander B., and Brooker S. 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7(9):581-596.
- Ritter U., Moll H., Laskay T., Bröcker E., Velazco O., Becker I., and Gillitzer R. 1996. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 173(3): 699-709.
- Ríos Yuil J. M y Sousa O. 2010. Inmunología en la infección por *Leishmania*: conceptos actuales. *Revista Médico Científica* 23(1): 19-31.
- Sabio G. y Davis R.J. 2014. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in Immunology* 26(3):237-245. doi: 10.1016/j.smim.2014.02.009.
- Semini G., and Aebischer T. 2018. Phagosome proteomics to study *Leishmania's* intracellular niche in macrophages. *International Journal of Medical Microbiology* 308:68-76. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.003.
- Scott P. and Novais F.O. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature reviews immunology* 16(9): 581-92. doi: 10.1038/nri.2016.72
- Sierra Filardi E. 2010. Marcadores de activación alternativa de Macrófagos: DC-SIGN y FR $\beta$ . Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, España. P.13-21.

- Teixeira D. E., Benchimol M., Rodrigues J. C. F., Crepaldi P. H., Pimenta P. F. P., and de Souza W. 2013. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations PLoS Pathology 9(10): e1003594. doi: 10.1371/journal.ppat.1003594
- Tomicic Flores V. y Guerrero Peralta J. 2005. Endotelio y Sepsis. Medicina Intensiva 29(3): 142-50.
- Valencia P. G., Loria Cervera N., Sosa Bibiano E., Canche Pool E., Vargas Gonzalez A., Melby P., and Andrade Narvaez F. 2014. *In situ* cytokines (IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ ) and chemokines (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ ) gene expression in human *Leishmania (Leishmania) mexicana* infection. Cytokines 69(1): 56-61. doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.016
- Valle Mendiola Ay Soto Cruz I. 2005. Vía JAK-STAT: una visión general. Revistas Especializadas en Ciencias de la salud 8(1-2): 14-25.
- Viday M. K., Kumar V. G., Sejian V., Bagath M., Kirshman G., and Bhatta R. 2017. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. International Reviews of Immunology 20(1) :1-17. doi: 10.1080/08830185.2017.1380200
- Villaseñor Cardoso M., Salaiza N., Delgado J., Gutierrez Kobeh L., Perez Torrez A., and Becker I. 2008. Mast cells are activated by *Leishmania mexicana* LPG and regulate the disease outcome depending on the genetic background of the host. Parasite Immunology 30: 425-434. doi: 10.1111/j.365-3024.2008.01042.x
- VonStebut E., and Tenzer S. 2018. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. International Journal of Medical Microbiology. 308:206-214. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.11.002.