



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio de la participación de MIF en la respuesta
inmune innata en la infección con *Leishmania mexicana*
en un modelo murino

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A

P R E S E N T A
DIANA ALEXIA SÁNCHEZ ARTEAGA

DIRECTOR DE TESIS:

Directora de Tesis: Dra. Miriam Rodríguez Sosa



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2019



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.

*“Feliz aquel que lleva consigo un ideal,
un Dios interno,
sea el ideal de la patria,
el ideal de la Ciencia
o simplemente las virtudes del evangelio.”*

Louis Pasteur

– Epitafio.

DEDICATORIA

A mis padres, por su paciencia, comprensión y apoyo durante todo este tiempo, porque siempre confiaron en que podría hacerlo sin importar las múltiples dificultades que se presentaron en el proceso. Por darme ánimos a continuar e ir más allá de lo que creí era mi límite. Gracias a sus enseñanzas, pero principalmente su ejemplo, es que pude obtener las fuerzas para seguir y crecer académicamente y más importante, como persona. Porque me dieron mucho más de lo que pueden imaginar.

A mis hermanos Tiffany y Herandy, porque me enseñaron tantas cosas directa e indirectamente. Porque también formaron parte importante en mi crecimiento. Espero verlos llegar tan lejos como quieran, cumpliendo nuestros sueños y metas, juntos.

A la familia Sánchez y a la familia Arteaga, por estar pendientes de mis avances y futuro. Al tío Salomón, Paola, tía Carmen, tía Gloria A., tía Rosa, tía Virginia por su apoyo incondicional. Porque sus palabras y actos realmente influyeron y ayudaron a cumplir esta meta.

A mis amigos, Frida pequeña, Frida Suarez, Tony, Laura, personas maravillosas con las que pude entablar una bella amistad a lo largo de la carrera. Porque pudimos conocernos mientras recorríamos esta gran carrera, por animarnos siempre que creímos que ya no podíamos seguir más.

A Eli mi sol y Dianita mi flor de cerezo, por ser tan grandes amigas y confidentes, por estar siempre a mi lado, saliendo adelante juntas. Porque aprendí que aunque no puedes hacerlo todo. Es por eso que tienes amigos que pueden ayudarte y asegurarse de que no pierdas las cosas que todavía puedes alcanzar.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de proyecto A1-S-10463, y por el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), número de proyecto IN209718 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco también, a la Dra. Miriam por haberme abierto las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar el presente trabajo bajo su tutela. Por brindarme su tiempo y apoyo cuando era requerido, y principalmente por mostrar siempre interés en la formación de todos sus estudiantes, otorgándoles múltiples oportunidades y herramientas.

A los miembros del comité tutorial: Dr. Santiago Martínez Calvillo, Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra, M. en C. Imelda Juárez Avelar, Dr. José Luis Reyes Hernández; por sus comentarios y ayuda para la mejora del manuscrito final.

A la M. en C. Imelda, por su tiempo, asesoramiento, paciencia y apoyo tanto en el área práctica para el desarrollo del presente trabajo, como en la vida cotidiana. Por hacer agradables y llevaderos los días de experimentación, espero haber podido retribuir ese apoyo.

A Tona, por su asesoramiento, ayuda y consejos en múltiples ocasiones, permitiéndome mejorar en diversos aspectos de mi vida. Por hacer más amenos los días de pesada escritura con tus múltiples bromas y conversaciones.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer más ameno todo este proceso. Octavio por ayudarme a llegar al Lab. 5. Thalia y Betsaida, por ser las primeras persona en brindarme ayuda al llegar. Al Dr. Oscar Illescas, por brindar siempre apoyo en diversos aspectos. A Caro, Marhita y Ulises, agradezco los pocos aunque muy agradables momentos que pude compartir con ustedes. Andrés, Memo, Víctor y Sonia, por su ayuda durante este proceso.

Finalmente agradezco a Danae, porque más que una compañera se convirtió en una gran amiga que ayudó de diversas formas a que este proyecto pudiera realizarse. Por ser siempre sincera y ayudarme a mejorar diversos aspectos de mí. Porque contigo siempre pude ser yo misma, y porque no importa como sean las cosas, siempre serás la gemela malvada.

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO DE FIGURAS	7
CONTENIDO DE CUADROS	8
ABREVIATURAS	9
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1. Respuesta inmune	12
1.1.1. Inmunidad innata	12
1.1.2. Inmunidad adaptativa	13
1.2. Sistema inmune y sistema endócrino	13
1.3. Dimorfismo sexual en enfermedades parasitarias	16
1.4. MIF en la respuesta inmune	18
1.4.1. MIF en enfermedades parasitarias	19
1.5. Leishmaniosis	20
1.5.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	22
1.5.2. Respuesta inmune a la leishmaniosis	24
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo general	26
3.1.1. Objetivos particulares	26
4. HIPÓTESIS	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Modelo experimental	28
5.2. Determinación del genotipo del modelo experimental	28
5.3. Mantenimiento del parásito e infección	29
5.4. Obtención de Ag total de <i>Leishmania mexicana</i>	29
5.5. Obtención de suero	30
5.6. Índice esplénico	30
5.7. Cultivo celular de ganglios linfáticos	30
5.8. Cuantificación de citocinas	31
5.9. Cuantificación de óxido nítrico	31

	Pág.
6. RESULTADOS	32
6.1. Confirmación del genotipo del modelo experimental	32
6.2. Establecimiento de la infección	32
6.3. Respuesta inmune temprana a nivel sistémico	35
6.3.1. Citocinas en suero	35
6.3.2. Producción de óxido nítrico en suero	37
6.3.3. Índice esplénico	38
6.4. Respuesta inmune temprana a nivel local	38
6.4.1. Citocinas pro-inflamatorias en cultivo de células de ganglios poplíteos	39
6.4.2. Producción de óxido nítrico en ganglios linfáticos	41
6.4.3. Citocinas anti-inflamatorias en cultivo de células de ganglios poplíteos	41
6.5. Recopilación de resultados	44
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIÓN	49
9. BIBLIOGRAFÍA	50
10. ANEXO	54

CONTENIDO DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Lesiones en una leishmaniosis en humanos	21
Figura 2 Mapa epidemiológico	21
Figura 3 Incidencia de leishmaniosis cutánea en México	22
Figura 4 Vector y estadios de vida de <i>Leishmania</i> spp	23
Figura 5 Ciclo de vida de <i>Leishmania mexicana</i>	24
Figura 6 Electroforesis de PCR para el genotipo de los grupos de ratones	32
Figura 7 Crecimiento de la lesión (A). Cuantificación de MIF (B)	33
Figura 8 Niveles de IL-12 en suero de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	35
Figura 9 Niveles de TNF- α en suero de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	36
Figura 10 Niveles de IL-4 en suero de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	36
Figura 11 Producción de óxido nítrico en suero obtenido de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	37
Figura 12 Índice esplénico	38
Figura 13 Niveles de IL-12 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos	39
Figura 14 Niveles de TNF- α en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos	40
Figura 15 Niveles de IFN- γ en sobrenadante de cultivo de ganglios linfáticos	40
Figura 16 Producción de óxido nítrico en sobrenadante de cultivo de ganglios linfáticos de ratones infectados con <i>L. mexicana</i>	41
Figura 17 Niveles de IL-10 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos	42
Figura 18 Niveles de IL-6 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos	43
Figura 19 Niveles de IL-4 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos	43

CONTENIDO DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Hormonas sexuales que influyen en la respuesta inmune	15
Cuadro 2 Variación en la susceptibilidad a infecciones parasitarias según el sexo	17
Cuadro 3 Cantidad de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> con lesión cutánea	34
Cuadro 4 Lesión en ratones infectados con <i>L. mexicana</i> 56 días post-infección	34
Cuadro 5 Resumen de resultados 48 hpi	44
Cuadro 6 Preparación de tubos para método de Lowry modificado	55

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
CD	Células dendríticas
CPA	Células presentadoras de antígeno
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (por su traducción ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas)
ES	Error estándar
H	Hembra
hpi	Horas post-infección
IFN- γ	Interferón tipo gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL-	Interleucina
LPG	Lipophosphoglycan (por su traducción lipo-fosfoglicano)
M	Macho
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (por su traducción Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos)
M ϕ	Macrófagos
M1	Macrófagos activados clásicamente
M2	Macrófagos activados alternativamente
MHC	Major histocompatibility complex (por su traducción complejo principal de histocompatibilidad)
n=	Número de muestras
NF κ β	Factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas
NK	Natural killer (por su traducción células naturales asesinas)
nm	Nanómetros
NO	Nitric oxide (por su traducción óxido nítrico)
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (por su traducción patrones moleculares asociados a patógenos)
PIBF	Progesterone induced blocking factor (por su traducción factor de bloqueo inducido por progesterona)

pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (por su traducción reacción en cadena de la polimerasa)
pg/ml	Picogramos por mililitro
PI3K/Akt	Fosfatidil-inositol 3-cinasa / protein-cinasa B
RG	Receptor de glucocorticoides
ROS	Reactive oxygen species (por su traducción especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
sp.	Especie
spp.	Más de una especie del mismo género
S.S.	Solución salina
TCD8+	Linfocitos T citotóxicos
TCD4+	Linfocitos T cooperativos
TGF- β	Transforming growth factor beta (por su traducción factor de crecimiento transformante tipo beta)
Th1	T helper cell type 1 (por su traducción células T cooperadoras de tipo 1)
Th2	T helper cell type 2 (por su traducción células T cooperadoras de tipo 2)
Th17	T helper cell type 17 (por su traducción células T cooperadoras de tipo 17)
TNF- α	Tumor necrosis tumoral type alpha (por su traducción factor de necrosis tumoral tipo alfa)

RESUMEN

El factor inhibidor de la migración de macrófago (MIF) es una citocina pro-inflamatoria que funciona como inmuno-modulador de algunas hormonas. Además, es una molécula importante en la resistencia a la infección por parásitos intracelulares, como *Plasmodium falciparum* y *Leishmania major* (*L. major*), en los cuales se demostró que la respuesta inmune inflamatoria contiene la infección. Además, en infecciones con *Leishmania* sp. Es sabido que el sexo del hospedero influye confiriendo susceptibilidad o resistencia. En el caso de *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*), no es clara la asociación entre el tipo de respuesta inmune y la resistencia a la infección. Asimismo, se desconoce si MIF juega un papel en la respuesta inmune contra *L. mexicana* y si puede verse afectada por el sexo del hospedero. Por tal motivo, se propuso establecer la participación de MIF en la respuesta inmune innata en la infección por *L. mexicana* en un modelo murino.

Se usaron ratones machos (♂) y hembras (♀) BALB/c genéticamente deficientes para MIF (*Mif*^{-/-}) y silvestres (*Mif*^{+/+}), infectados con 2×10⁶ promastigotes de *L. mexicana*. A las 24 y 48 horas post-infección (hpi), se evaluó el índice esplénico, nivel de NO y algunas citocinas de perfil pro y anti-inflamatorio a nivel sistémico en suero, y a nivel local en el sobrenadante de los cultivos de células de los ganglios poplíteos.

Se demostró que las hembras desarrollaron una respuesta inmune más eficiente, con cambios en los niveles de citocinas pro-inflamatorias e índice esplénico. Mientras que los machos no mostraron una respuesta efectiva a tiempos cortos de la infección (24 y 48 horas). En estos mismos tiempos MIF no influyó, sin embargo a tiempos más avanzados se observó que la ausencia de MIF en machos (*Mif*^{-/-}) confirió mayor resistencia a la infección resolviendo la lesión incluso mejor que las hembras. Para confirmar de manera más sólida estos resultados, se requiere de más estudios.

En conclusión, se demostró que MIF tiene influencia en la respuesta inmune, sin embargo es mínima a tiempos cortos de infección. . Además, el sexo del hospedero es capaz de conferir resistencia ante la infección con *L. mexicana*, haciendo a las hembras más resistentes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta inmune

El cuerpo humano se expone constantemente a una gran cantidad de agentes capaces de comprometer la salud y sobrevivencia del organismo, para evitar esto el cuerpo se vale del sistema inmune; compuesto de múltiples órganos, células y moléculas capaces de activar diversos mecanismos para detectar, neutralizar y eliminar estas amenazas (ya sea bacterias, helmintos, protozoos u otro cuerpo extraño) con el fin de preservar la integridad del hospedero [7].

El sistema inmune se ha dividido, en inmunidad innata (respuesta inmediata) e inmunidad adquirida (respuesta tardía) para llevar a cabo esta tarea; estos tipos de inmunidad están constituidos por distintos mecanismos y se activan a distintos tiempos después de la interacción con el agente extraño o infeccioso.

Es importante mencionar que ambas respuestas están estrechamente relacionadas por diversas células [8, 9], como citocinas capaces de activar o inhibir la función de algunas células, regular su diferenciación o reclutarlas al sitio donde se requieren, ya sea para combatir la amenaza o reparar el tejido. Así mismo, éstas funcionan como puente entre ambas respuestas [10, 11].

1.1.1. Inmunidad innata

La inmunidad innata se caracteriza por ser activada de forma inmediata siendo la primer línea de defensa, una de sus principales características es la incapacidad de generar memoria inmune (a diferencia de la inmunidad adquirida) [11]. Se encarga de eliminar la infección de diversos patógenos y su ausencia puede aumentar la susceptibilidad del organismo, aun cuando la respuesta tardía funcione a la perfección.

En caso de que la respuesta inmune innata no sea suficiente, su importancia recae en la capacidad de contener la infección hasta que la respuesta adaptativa sea activada [7], a través de la respuesta inflamatoria conformada principalmente por neutrófilos, células naturales asesinas (NK), monocitos o macrófagos (M ϕ) tipo M1.

Otra función crucial de la inmunidad innata es la eliminación de células dañadas por una infección o por daño estéril, iniciando así el proceso de reparación tisular por medio del reconocimiento de moléculas expresadas en la superficie celular, de esta tarea se encargan principalmente los M ϕ tipo M2 [12-14]. Estas células son capaces de identificar a su blanco a través del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en organismos externos, y

ausentes en las moléculas propias [15]. El reconocimiento, como se mencionó anteriormente, se lleva a cabo por medio de diversos receptores de superficie capaces de desencadenar una cascada de señalización que resulta en la secreción de diversas moléculas que definirán la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune por medio de la liberación de citocinas y con ello la activación de otras células inmunes [16].

En caso de ser necesaria una respuesta más específica, la inmunidad innata se encarga de activar la respuesta adaptativa con ayuda de las células presentadoras de antígeno (CPA) [11].

1.1.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa comienza en el momento en que el antígeno es fagocitado por las células presentadoras de antígeno profesionales, llamadas células dendríticas (CDs) quienes presentan péptidos del antígeno a los linfocitos T circulantes por medio de un conjunto de moléculas llamado complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos clases de moléculas MHC, las MHC-I y las MHC-II. Las MHC-I presentan péptidos de patógenos intracelulares a los linfocitos TCD8+ citotóxicos. Mientras que las MHC-II presentan péptidos de patógenos extracelulares a los linfocitos TCD4+ o colaboradoras. Estas últimas son capaces de generar diversos tipos de respuesta, Th1, Th2, o Th17 [7].

Una respuesta de tipo Th1 activa principalmente Mφ, responsables de la inmunidad mediada por células y la respuesta protectora dependiente de fagocitos, ambas de gran importancia en infecciones por patógenos intracelulares. Por otro lado, una respuesta de tipo Th2 se encarga de regular la producción de anticuerpos, activación de eosinófilos e inhibir la función de los Mφ, esta respuesta predomina en respuesta a parásitos extracelulares.

Esta polarización puede generarse o inhibirse por medio del microambiente generado por diversas citocinas secretadas. Por ejemplo, el IFN-γ puede inhibir la respuesta Th2 y la IL-4 puede inhibir la respuesta Th1 [7, 10].

1.2. Sistema inmune y sistema endócrino

La respuesta inmune también puede ser influenciada por otros sistemas, entre los cuales destaca el sistema endocrino. Recientes estudios han demostrado la estrecha interacción existente entre éstos a través de redes conformadas por moléculas de señalización, entre las cuales destacan neurotransmisores, hormonas y citocinas los cuales pueden ser reconocidos por medio de diversos receptores y ligandos celulares que se encuentran en células nerviosas así como en monocitos, Mφ, linfocitos y otros tipos celulares inmunes que permiten mantener una comunicación bidireccional entre ambos sistemas [17, 18].

Las citocinas y hormonas afines a estos receptores llevan a cabo un papel como inmunoreguladores en el cerebro o sensores en el sistema inmune [19]. Diversos estudios han demostrado que las hormonas esteroideas son capaces de modificar la respuesta inmune innata permitiendo desencadenar una cascada de eventos que pueden comprometer al organismo ante infecciones [20]. Asimismo, algunos glucocorticoides secretados por las glándulas suprarrenales actúan como reguladores de la respuesta inmune suprimiendo la síntesis de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α , favoreciendo a su vez la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 [21-23].

Las hormonas sexuales también son capaces de ser reconocidas por el sistema inmunológico, la diferencia en el tipo de hormonas sexuales y la concentración de éstas en el organismo durante su tiempo de vida son factores influyentes en procesos de circulación, proliferación, apoptosis o diferenciación de células del sistema inmune [18]. Por ejemplo, el estrógeno es capaz de ser reconocido por receptores homodímeros o heterodímeros de ER α y ER β (receptor de estrógenos α y β), que se encuentran en tejido cardiovascular, órganos reproductivos y órganos linfoides, M ϕ , linfocitos B y T, células NK y células dendríticas, mostrando sobre estas células un efecto inmunomodulador anti-inflamatorio suprimiendo la activación de NF κ B. De manera contraria, a bajas concentraciones de esta hormona promueven la proliferación de células Th1 y producción de IFN- γ [24], además es capaz de prevenir la producción de radicales libres por parte de los neutrófilos [25] (Cuadro 1).

Asimismo, el 17- β -estradiol, hormona predominante en la etapa reproductiva y fluctuante durante el ciclo estral de las hembras [18], puede ser reconocida por las células inmunes por medio de receptores nucleares específicos para estradiol, permitiendo su unión como homodímero a elementos de respuesta al estrógeno en los promotores de determinados genes. En consecuencia a esto, se ha reportado un incremento de células T CD8+, un impulso en la maduración y activación de células B, así como la secreción de anticuerpos [24]; en células mononucleares estimula la producción de IFN- γ , IL-10 e IL-12, así como la formación de CDs [17]. Por otra parte, disminuye la síntesis de TNF- α y por lo tanto inhibe la apoptosis vía PI3K/Akt [20] (Cuadro 1).

Otra hormona estrechamente ligada al ciclo estral es la progesterona, que es capaz de interferir con el metabolismo de ácido araquidónico permitiendo el establecimiento de una respuesta Th2 controlando la actividad de las células NK [18], también es capaz de disminuir la producción de IL-1 β e IL-12 por medio de la expresión de FasL, e inhibir la producción de TNF- α en M ϕ [20] (Cuadro 1).

Por otro lado, también se han reportado a los andrógenos como hormonas inmunosupresoras capaces de ser reconocidas por células B y T, macrófagos (Mφ), monocitos, CDs y mastocitos funcionando como moduladores o supresores de la inmunidad innata y adaptativa. Se ha reportado que en comparación con las hembras que presentan niveles más bajos de esta hormona, los machos son capaces de producir más IL-12, IL-1β y TNF-α producido por monocitos [18], por otro lado el bloqueo de esta hormona se asocia al incremento de inflamación asociada a Mφ [24] (Cuadro 1).

Cuadro 1. Hormonas sexuales que influyen en la respuesta inmune			
Hormona	Interacción	Regulación de la respuesta inmune	Referencias
Glucocorticoide	Receptor de Glucocorticoides (RG) en múltiples células inmunes	Inhíbe transcripción de NF-κβ, disminuye e inhibe rutas pro-inflamatorias	[22]
		Favorece la producción de IL-4 e IL-10	[23]
Progesterona	Por medio del factor de bloqueo inducido por progesterona (por sus siglas en inglés PIBF)	Interviene en el metabolismo del ácido araquidónico permitiendo una respuesta Th	[18]
	Por inducción de la proteína FasL	Controla la actividad de células NK Disminuye la producción de IL-12 e IL-1β en monocitos ante una infección viral Inhíbe la síntesis de TNF-α en macrófagos	[20]
Estrógenos	RE en células inmunes	Ejerce efectos anti-inflamatorios	[22]
		Se asocia con la resistencia ante la infección con <i>L. mexicana</i>	[23]
		Previene la producción de radicales libres en neutrófilos	[20]
17-β-estradiol	Receptor interno específico de estradiol	Incrementa la población celular T CD8+; promueve la maduración y activación de células B así como la secreción de anticuerpos	[24]
		Estimula la producción de IFN-γ, IL-10 e IL-12, así como la proliferación de células dendríticas	[17]
			[20]

Inhibe la apoptosis mediada por TNF- α en neutrófilos			
Testosterona	Receptor intracelular de andrógenos en múltiples células inmunes	En comparación con las hembras, permite un incremento de IL-12, IL-1 β y TNF- α en monocitos Disminución de IL-2 en linfocitos	[18]
		Su presencia disminuye producción de NO. Así mismo, su inhibición permite un aumento de M ϕ de tipo M1	[24]

1.3. Dimorfismo sexual en enfermedades parasitarias

La resistencia o susceptibilidad inmune ante las infecciones parasitarias ha sido asociada al tipo de respuesta, Th1 o Th2, el fondo genético, el tipo de parásito, la vía de entrada o el inóculo del mismo [21, 26]. Por otra parte, la susceptibilidad también es atribuida a las diferencias específicas que implica el sexo del hospedero sobre el sistema inmune [27, 28].

Numerosos estudios han demostrado que la heterogeneidad inmune basada en el sexo juega un papel importante ante infecciones parasitarias difiriendo en la intensidad de la respuesta, evolución de la infección y virulencia de la misma [27-29].

Debido a estas diferencias actualmente se busca establecer la influencia del sexo en las enfermedades parasitarias. Recientemente se ha reportado que en humanos infectados con *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) [30] y *Schistosoma haematobium* (*S. haematobium*), las hembras son más susceptibles a desarrollar formas adultas del gusano, aumentando la severidad de la infección y la tasa de mortalidad, la cual se ha sugerido podría ser mediada por testosterona [28].

En el caso de una infección con *Mycobacterium marinum* (*M. marinum*) en ratones, los machos desarrollan más lesiones y carga parasitaria asociado a una disminución de anticuerpos parásito-específicos, lo que resulta en una mayor mortalidad; contrario a esto las hembras expresan un esclarecimiento del parásito mucho más rápida y eficiente [31].

Es posible entonces que las citocinas, influenciadas por hormonas sexuales, sean en muchos casos responsables de regular la susceptibilidad de los hospederos en las infecciones parasitarias. Por ejemplo, se ha visto que las citocinas MIF e IL-6 se encuentran implicadas en la susceptibilidad

a la infección por el helminto *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*), presentando un efecto de feminización en los machos provocado por el aumento de 17-β estradiol [32] (Cuadro 2).

Por otra parte, en la infección por *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) en mujeres primigrávidas, se encontró una alta parasitemia, asociada a una alta producción de MIF en la placenta [23] (Cuadro 2).

En la leishmaniosis también se presenta la susceptibilidad ligada al género. Se ha reportado que los machos suelen ser más susceptibles a una infección con *Leishmania donovani* (*L. donovani*) en comparación con las hembras; contrario a esto, las hembras presentan menor resistencia ante *Leishmania tropica* (*L. tropica*) [23]. Otro reporte realizado en ratones DBA/2 indica que los estrógenos están involucrados en la resistencia a *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*), contribuyendo al desarrollo de la lesión más lenta y en menor tamaño en comparación con los machos. Asimismo, se confirmó que esta resistencia se debía al incremento de IFN-γ y con ello una respuesta inflamatoria por parte de las hembras y que no sucedía en el género opuesto [33, 34] (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variación en la susceptibilidad a infecciones parasitarias según el sexo			
Parásito	Hospedero	Dimorfismo sexual	Referencias
<i>S. mansoni</i>	Ratones CBA/J y C57BL/6 ♂ y ♀	♀: Con una mortalidad del 80%, desarrollan mayor parasitemia así como formas adultas del parásito	[30]
		♂: Mortalidad mediada por testosterona	[28]
<i>S. haematobium</i>	Humanos	♀: Niveles elevados de IL-10 y TGF-β, inhibiendo la respuesta Th1. Alta producción de IgA	[28]
<i>M. marinum</i>	Ratones C3H/He, A/J, BALB/c, DBA/2 y C57BL/6	♀: Se mostró un rápido y eficiente esclarecimiento de la infección	[31]
		♂: Con mayor susceptibilidad, carga parasitaria y mortalidad, así como desarrollo de lesiones y menor producción de anticuerpos	[28]
<i>T. crassiceps</i>	Humanos	♀: Mayor susceptibilidad a infección y hemoaglutinación en comparación con machos. Niveles elevados de IL-5, IL-6 e IL-10	[32]

	Ratones	♂: La infección induce feminización en machos	[28]
<i>P. falciparum</i>	Humanos	♀: Primigrávidas muestran mayor parasitemia	[23]
<i>L. donovani</i>	Humanos	♂: Mayor incidencia de infección	[33]
<i>L. tropica</i>	Humanos y ratones	♀: Lesiones cutáneas mucho más persistentes que en machos	[33]
<i>L. mexicana</i>	Ratones DBA/2	♀: IFN- γ , permite menor desarrollo en las lesiones y resistencia ante la infección	[34]
		♂: Mayor producción de TNF- α , rápido desarrollo de lesiones y susceptibilidad ante la infección	[33]

H=Hembras; M=Machos.

Si bien se ha descrito que las hembras muestran mayor resistencia a primeros tiempos de infección expresando una respuesta antiparasitaria más fuerte, los machos exhiben elevada susceptibilidad a la infección inicial y contrario a mostrarse resistentes, son capaces de tolerar una infección persistente y sostenida (Cuadro 2). Sin embargo se sabe muy poco referente a una infección con *L. mexicana*, y cómo el sexo del hospedero influye en la presencia de algunas citocinas indispensables para desarrollar una respuesta inmune protectora.

1.4. MIF en la respuesta inmune

El factor inhibidor de la migración de macrófagos es una proteína de bajo peso molecular con acción pleiotrópica producida por diversos tejidos (endócrino, endotelial, epitelial y neuronal), así como diversos tipos celulares (células corticotrópicas de la pituitaria, neutrófilos, células T, eosinófilos, fibroblastos, monocitos y macrófagos). En las células, MIF se encuentra preformado y su reconocimiento canónico se lleva a cabo a través del receptor CD74, pero también se ha observado que hay un reconocimiento no canónico a través de los receptores CXCR2 y CXCR4. En cualquiera de los casos estos receptores interactúan con CD44 como proteína co-activadora intracelular para desencadenar la función de MIF [35].

Entre las principales características de MIF, destaca su ensamblaje en trímero similar al de las enzimas, particularmente a la de una tautomerasa, sin embargo no se le ha visto desempeñar función de tautomerasa u óxido-reductasa en condiciones fisiológicas [36-38].

A pesar de ser una citocina, MIF también puede funcionar como una hormona en respuesta al estrés, actuando como regulador negativo de la inmunosupresión y de la actividad anti-inflamatoria de los glucocorticoides [35, 39]. Esto sucede gracias a la habilidad de MIF de activar las cascadas de señalización ERK1/2 que desencadenan la expresión de genes pro-inflamatorios, entre los cuales destaca la regulación positiva de las citocinas TNF- α , IL1 β , IL-6 e IL-12, y óxido nítrico (NO) [35-37].

Se ha comprobado además, que MIF inhibe la migración aleatoria de los M ϕ , suprime el mecanismo de apoptosis y la estimulación de la quimiotaxis de leucocitos, además de aumentar la capacidad microbicida de los fagocitos [35, 36, 39, 40].

Si bien estas características pueden conferir protección ante algunas patologías, diversos antecedentes han demostrado que el bloqueo de MIF permite un desarrollo más lento tanto de enfermedades autoinmunes [23], como en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, donde se ha asociado fuertemente el desarrollo de los tumores debido a su estimulación sobre factores de crecimiento y angiogénesis, falta de apoptosis celular y señalización autócrina celular quedando claramente demostrada su función como mediador crucial que participa activamente en diversos desordenes inmuno-inflamatorios [39, 41, 42].

A diferencia de las claras evidencias del papel de MIF en las enfermedades autoinmunes, su participación en la respuesta a infecciones parasitarias se está dilucidando.

1.4.1. MIF en enfermedades parasitarias

Mientras que existen muchas investigaciones para tratar de establecer la participación de MIF en el cáncer y las enfermedades autoinmunes, la determinación de su papel ante infecciones parasitarias es escasa, aunque algunos esfuerzos están en proceso. Como se mencionó anteriormente, debido a que MIF es un factor determinante en el inicio de la cascada inflamatoria, su sobreexpresión es determinante en el camino que toma la respuesta inmune. Sin embargo, si su influencia confiere resistencia o susceptibilidad en las infecciones parasitarias, debe estudiarse debido a que el resultado puede verse influenciado por la naturaleza del parásito o el género del hospedero.

Se ha visto que ratones de la cepa BALB/c carentes de la proteína de MIF e infectados con *Toxoplasma gondii* son propensos a una rápida infección y mayor mortalidad debido a una deficiente producción de citocinas pro-inflamatorias y NO [40]. Secundando la importancia de MIF en esta patología, otro estudio demostró la disminución de TNF- α R (receptor de TNF- α), IFN- γ R

(receptor de IFN- γ) y TLR-4, sugiriendo que la ausencia de esta citocina provoca una incapacidad de respuesta rápida por parte de las células [43].

Además, experimentos *in vitro* demostraron que MIF activa las funciones microbicidas de los fagocitos favoreciendo la producción de NO y de especies reactivas de oxígeno (ROS), y de citocinas como TNF- α e IFN- γ , contribuyendo de esta manera a disminuir la carga parasitaria en las células ya infectadas [44].

Ratones de la cepa C57BL/6 deficientes del gen de MIF son más susceptibles a una infección con *Leishmania major* (*L. major*), presentando valores más altos de IL-4 e IFN- γ cuando se comparan con los ratones silvestres, experimentos *in vitro* demostraron que se produce una deficiente activación de M ϕ y con ello menor producción de NO y superóxido, de esta manera se sugirió que la susceptibilidad se debe a la regulación negativa de la respuesta Th1, que limita la actividad leishmanicida [36].

Por otro lado, se sabe que MIF es capaz de conferir susceptibilidad en la infección con *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) y que su inhibición favorece la eliminación de parásitos gracias al incremento de la expresión de Gata 3 (factor de transcripción que participa en el desarrollo de linfocitos T) y al aumento de la producción de IL-13 [38].

Si bien la participación de MIF dentro en la respuesta inmune a infecciones parasitarias está emergiendo, aún no está del todo definida debido a la capacidad de algunos patógenos de escapar de la detección y eliminación de la respuesta inmune regulando el proceso de defensa y utilizándolo a su favor como es el caso de muchas especies de *Leishmania* [45].

En el caso de *L. major*, se han encontrado dos genes en el parásito que producen proteínas similares a MIF, capaces de interactuar con CD74 presente en los fagocitos del hospedero [46]. Años más tarde, se comprobó que estos homólogos de MIF son capaces de promover la persistencia del parásito evitando a los fagocitos recurrir a la apoptosis, a su vez funciona como quimio-atrayente e incluso promueve la diferenciación de las células TCD4⁺, sin embargo éstas tienen baja funcionalidad fallando en la eliminación del parásito [47].

1.5. Leishmaniosis

Leishmania spp. es un parásito protozoo perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Este género se compone de alrededor de 53 especies y es responsable de provocar la leishmaniosis, una enfermedad transmitida a reptiles y mamíferos. A la fecha, se sabe que al menos 21 de estas especies son patógenas para el humano [48].

La leishmaniosis es capaz de desarrollar lesiones, principalmente a tres distintos niveles: cutánea (Figura 1 A), muco-cutánea (Figura 1 B) y visceral (Figura 1 C); dependiendo de la severidad de ésta, puede ser mortal o dejar secuelas [48].



Figura 1. Lesiones en una leishmaniosis en humanos. Lesión de leishmaniosis de tipo cutáneo (A), mucocutáneo (B) [4] y visceral (C) [5].

Esta enfermedad solía afectar a las poblaciones más pobres, distribuidas de forma endémica en países tropicales y subtropicales a nivel mundial [49]. Sin embargo, en años recientes, el territorio dentro de la distribución del mosquito transmisor (*Lutzomyia* spp. y *Phlebotomus* spp.) se ha extendido a causa del cambio climático, ampliando la lista de países y la cantidad de personas que padecen leishmaniosis. De igual manera, la migración de personas infectadas ha hecho que en países como España, Suecia, Reino Unido y Ucrania se presenten actualmente reportes de leishmaniosis, ampliando el mapa de distribución del parásito [2] (Figura 2).

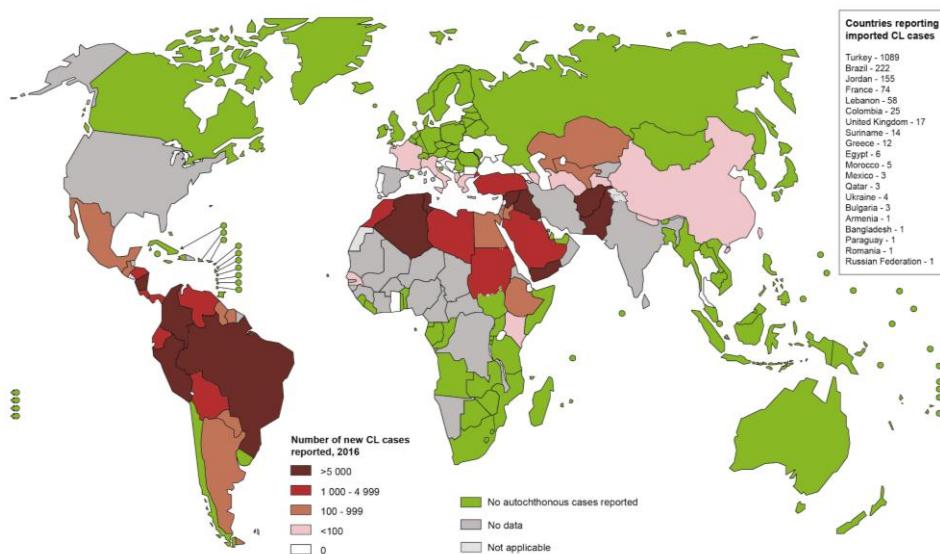


Figura 2. Mapa Epidemiológico. Reporte de casos de leishmaniosis cutánea por incidencia hasta 2016 [2].

El último estudio epidemiológico realizado en 2016 reportó aproximadamente 12 millones de nuevos casos a nivel mundial, de los cuales 1.2 millones pertenecen a leishmaniosis cutánea y 48,915 de estos casos se registraron en el continente americano, distribuidos en 17 de los 18 países endémicos. Aunado a esto, en el 2016 hubo un aumento de 6.5% de casos con relación al año anterior [5, 48, 50].

En 2017 se registró en México un incremento notable de casos en comparación al año anterior [2]. El 99.3% de los casos de leishmaniosis registrados hacen referencia a patologías de tipo cutáneo, provocadas principalmente por *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Esta última especie destaca por ser endémica del país y posiblemente responsable de una gran parte de los casos reportados por la Secretaría de Salud [51] (Figura 3).

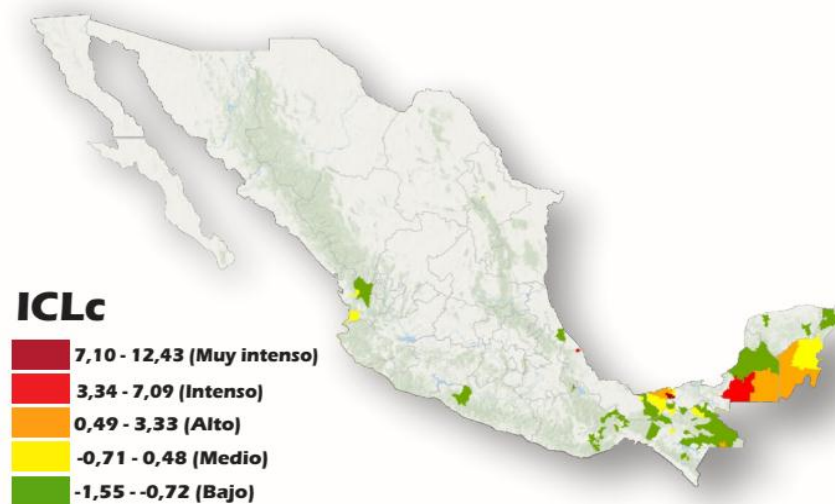


Figura 3. Incidencia de leishmaniosis cutánea en México. Reporte de casos por incidencia hasta 2016 [2]

1.5.1. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

El ciclo de vida de *Leishmania* es complejo ya que involucra muchas especies de parásitos e insectos vectores de los géneros *Phlebotomus* (en África, Asia y Europa) y *Lutzomyia* (en América), mostrando también una ecología y epidemiología complejas (Figura 4 A). Se compone de dos fases, en que se ven involucrados dos distintos estadios. El estadio principal o infectivo conocido como promastigote (Figura 4 B) y que se encuentra dentro de un díptero, mejor conocido como “la mosca de la arena”, que funciona como vector y reservorio [3].

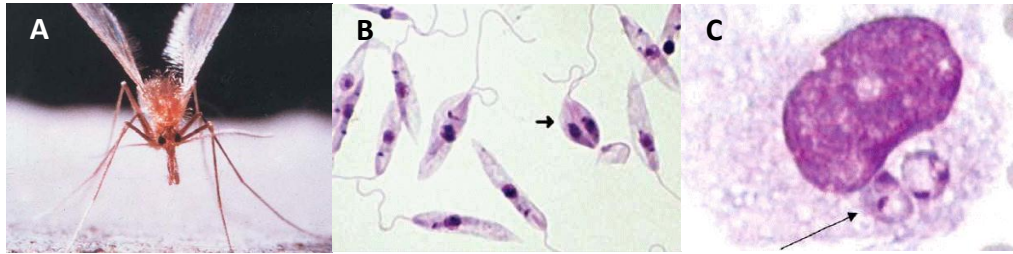


Figura 4. Vector y estadios de vida de *Leishmania*. *Lutzomyia* sp., díptero, vector de *Leishmania* spp en el nuevo mundo (A) [3]. Promastigote, forma infectiva de *Leishmania* spp en el intestino del díptero (B). Amastigote, forma resistente de *Leishmania* spp dentro del hospedero (C) [6].

Durante la fase infectante, los promastigotes viajan a la probóscide del díptero donde se mezcla con la saliva para ser inoculado con ésta cuando la hembra del mosquito se alimenta de algún mamífero dando inicio a la segunda y más relevante fase del ciclo de vida [3, 52].

Dentro del hospedero, *Leishmania* es detectado por medio de receptores de membrana iniciando la liberación de citocinas quimio-atrayentes entre las cuales se incluye a MIF. Su papel es reclutar células inmunes innatas con el fin de controlar y contener la infección. Algunos promastigotes serán eliminados por rutas de complemento o por células NK. Por otra parte, los monocitos diferenciados y neutrófilos se encargan de fagocitar al parásito y eliminarlo por medio de la liberación de diversas enzimas y compuestos microbicidas que se encargan de digerir el tejido y acoplarlo a diversos receptores que más tarde saldrán a la membrana para activar otras células [53].

Durante la fagocitosis, algunos promastigotes son capaces de evadir los mecanismos inmunes dentro del fago-lisosoma pasando a su segundo estadio, amastigote (Figura 4 C) también llamado de resistencia. En esta fase el parásito utiliza al fagocito o célula epitelial para protegerse de la respuesta inmune y al mismo tiempo replicarse hasta lisar la célula e infectar otras cercanas. Cuando este último proceso prevalece, se generan las lesiones cutáneas características de la leishmaniosis [53, 54].

El ciclo continúa cuando un nuevo vector se alimenta del mamífero e ingiere células infectadas con amastigotes y una vez en el intestino sucede la fase de crecimiento. *Leishmania* se desarrolla en la parte terminal del intestino del mosquito en donde se diferencia y una vez alcanzada la maduración viaja a la probóscide, se transformará nuevamente en promastigotes y continuará el ciclo [3, 52] (Figura 5).

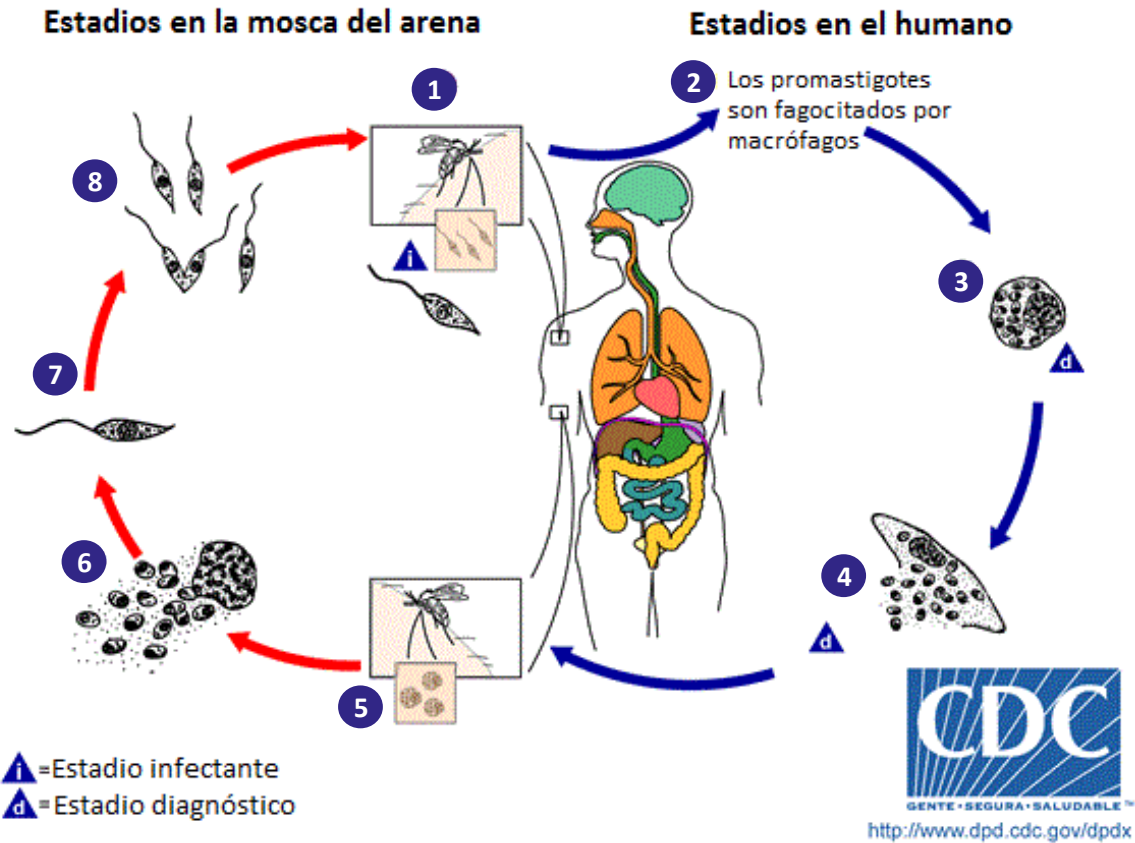


Figura 5. Ciclo de Vida de *Leishmania mexicana*. Diagrama obtenido del CDC en 2019 [1].

1.5.2. Respuesta inmune a la leishmaniosis

Dentro del organismo, *Leishmania spp* es reconocida por proteínas del complemento que se unen a su membrana con el fin de opsonizar o lisarla. Por su parte, *Leishmania spp.* evade estos mecanismos inhabilitando las proteínas del complemento con ayuda de diversas proteasas y lipofosfoglicanos (LPG) ubicados en la membrana del parásito, evitando así la conformación del complejo proteico requerido para llevar a cabo la vía alternativa del complemento y la vía de las lectinas [54-56].

Las especies del género *Leishmania* facilitan su fagocitosis por medio de estas mismas proteínas desactivadas y otros receptores (receptores de manosa/fructosa, CR4, receptores de fibronectina y de proteína C, entre otros) ubicados en las células de Langerhans y otras células fagocíticas del sistema inmune. Ya dentro de las células, *Leishmania spp.* en su estadio de amastigote obstaculiza su eliminación alterando mecanismos de respuesta como la formación del fagolisosoma, producción de óxido nítrico sintasa, muerte celular programada, migración celular

y expresión de quimio atrayentes [40, 45, 57]. Luego de que el parásito asegura su sobrevivencia intracelular, éste inicia la fase de replicación hasta lisis de la célula [3, 52].

En la actualidad se han descrito múltiples mecanismos que usa el sistema inmune para contrarrestar una infección con *Leishmania*, sin embargo, algunos de éstos pueden tener efectos contradictorios. Un ejemplo son los neutrófilos, las primeras células inmunes en llegar al sitio de infección para tratar de eliminar a los promastigotes meta-cíclicos por medio de la fagocitosis y por la producción de ROS. Sin embargo, una vez infectadas estas células entran en apoptosis, y este fenómeno puede inhibir la activación de M ϕ en el mismo sitio [53].

Por otro lado, se ha demostrado que en ratones deficientes del gen MIF se evita el desarrollo de la respuesta protectora contra *L. major* a través de inhibir la activación de los M ϕ que reflejan una disminución notable en la producción de citocinas pro-inflamatorias [36]. En este sentido, hay evidencias de que *L. major* puede inhibir la acción de MIF ya que produce un ortólogo proteico estructuralmente muy parecido el cual se une al mismo receptor del MIF humano (CD74) inhibiendo así la apoptosis de los M ϕ [46, 58], lo que permite la persistencia de *L. major* dentro del macrófago, de esta manera evade el sistema inmune y favorece la replicación del parásito dentro de la célula y en consecuencia el progreso de la enfermedad [59].

En *L. donovani* y *L. major* existen evidencias de que MIF participa en la activación de la respuesta inmune protectora a través de la activación de los M ϕ [40]. En el caso de la infección por *L. mexicana*, son escasos y poco claros los estudios referentes a la participación de MIF en esta infección, de igual forma, se ha descrito muy poco de las diferencias asociadas al sexo en la leishmaniosis cutánea causada por *L. mexicana*. Para contribuir en este campo de conocimiento, se planteó el presente trabajo.

2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo pretende aportar conocimiento sobre el papel de MIF en la infección temprana con *Leishmania mexicana*, estableciendo su impacto en el desarrollo de la respuesta inmune protectora. Además, se estudiará la influencia del sexo del hospedero sobre MIF y si éste impacta en el desarrollo de la infección.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la participación de MIF en el desarrollo de la respuesta inmune innata en una infección con *Leishmania mexicana* utilizando ratones ♂ y ♀ de fondo genético BALB/c, genéticamente deficientes de MIF (*Mif*^{-/-}) y silvestres (*Mif*^{+/+}) ambos.

3.1.1 Objetivos particulares

- Confirmar el establecimiento de la infección con *L. mexicana* en ratones BALB/c ♂ y ♀ *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+}
- Evaluar la respuesta pro-inflamatoria temprana a la infección a nivel sistémico por cuantificación de IL-12 y TNF- α en la sangre de los ratones en ratones BALB/c ♂ y ♀ *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+}
- Evaluar la respuesta anti-inflamatoria temprana a la infección a nivel sistémico por cuantificación de IL-4 en la sangre de los ratones
- Determinar la afectación al bazo en la respuesta temprana de la infección con *L. mexicana* en ratones BALB/c ♂ y ♀ *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+}
- Evaluar la respuesta pro-inflamatoria temprana a la infección a nivel local por cuantificación de IL-12, TNF- α e IFN- γ en el sobrenadante del cultivo de ganglios linfáticos poplíteos de ratones BALB/c ♂ y ♀ *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+}
- Evaluar la respuesta anti-inflamatoria temprana a la infección a nivel sistémico por cuantificación de IL-10, IL-4 e IL-6 en el sobrenadante del cultivo de ganglios linfáticos poplíteos

4. HIPÓTESIS

MIF es una molécula capaz de influir en la respuesta inmune inflamatoria y además está conectada directamente con el sistema endócrino, proponemos que:

MIF participa en la respuesta inmune innata confiriendo resistencia a la infección provocada por *L. mexicana*. Además, la magnitud de la resistencia se verá asociada al sexo del hospedero.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se llevaron a cabo con base en el manual de procedimientos del laboratorio de inmunología (Laboratorio 5), de la Unidad de Biomedicina en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

5.1. Modelo experimental

Se utilizaron ratones ♂ y ♀ de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los ratones se dividieron en cuatro grupos: *Mif*^{+/+} ♂ y *Mif*^{+/+} ♀. Así como *Mif*^{-/-} ♂ y *Mif*^{-/-} ♀. Los animales experimentales se manejaron todo el tiempo según los lineamientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio, establecidos en la NOM-062-ZOO-1999, 2001.

5.2. Determinación del genotipo del modelo experimental

Para confirmar la presencia o ausencia del gen de MIF según el grupo, se realizó una extracción de ADN de cada ratón por digestión de tejido a 56 °C durante 24 horas con buffer de lisis (500 µl) (Anexo 1), usando Proteinasa K (20 µl) (Invitrogen 10/ml) para facilitar la obtención del material genético. Seguido de esto se centrifugó cada muestra a 14,000 rpm, extrayendo el sobrenadante donde se encontraba el ADN, que posteriormente se purificó con isopropanol frío (Sigma-Aldrich, 19516-500ML), realizando después un lavado con etanol (Sigma-Aldrich, E7148-500ML) al 75% con agua grado molecular (PiSA). Finalmente, se adicionaron 200 µl de agua grado molecular, y se incubó por 30 minutos a 56 °C, para su posterior procesamiento por PCR (Anexo 1). Se amplificaron los genes de *mif* y de *neomicina* utilizando oligonucleótidos específicos MIF F 5'-AGA CCA CGT GCT TAG CTG AG' y R 5'-GCA TCG CTA CCG GTG GAT AA' y NEO F- 5'ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC' y R 5'-CGT CCA GAT CAT CCT GAT C'. Las condiciones usadas fueron, para desnaturalización: 95 °C por 35 segundos; alineamiento: 58 °C por 35 segundos; extensión: 72 °C por 35 segundos (35 ciclos).

Las muestras del producto del PCR, fueron procesadas en cámara de electroforesis a 90 volts por 45 minutos en gel de agarosa al 1.5% en TBE (Anexo 1). El reconocimiento de los genes: *mif* a 200 pb, y *neo* a 500 pb se llevó a cabo con ayuda de un marcador molecular (); se observó el gel bajo trans-iluminador de fluorescencia Gel Doc EZ Imager de Bio-Rad, usando el programa Image Lab Software versión 5.2.1.

5.3. Mantenimiento del parásito e infección

El parásito *L. mexicana*, cepa MNYC/BZ/62/M379, fue donado por la Dra. Ingeborg D. Becker de la Facultad de Medicina (UNAM) en un ratón previamente infectado. Se realizó la extracción por biopsia de la herida dorsal avanzada de un ratón previamente infectado con *L. mexicana*. El tejido se maceró en 5 ml de solución salina (ss) (PiSA) y del sobrenadante se tomó 1 ml, y se colocó en botellas de cultivo con 5 ml de medio Schneider (In Vitro), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) de complementado y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco); se incubó a 28.5 °C. El cultivo se purificó en dos tiempos cada 48 horas. Seguido de esto, se concentró el parásito por centrifugación, 2,500 rpm por 5 minutos y se realizó un conteo celular con cámara de Neubauer y paraformaldehído al 4% (en solución PBS), en una concentración de 1:1 se ajustó a 2×10^6 promastigotes que fueron re-suspendidos en 50 μ l de S.S. para su posterior inoculación en la base de la cola en la región dorsal de cada ratón de los cuatro distintos grupos (*Mif*+/- ♀, ♂ y *Mif*-/- ♀, ♂), excepto controles. La zona de infección fue rasurada previamente para facilitar la inoculación en los ratones.

Para el mantenimiento de la cepa se inocularon ratones de la misma manera con 10×10^6 promastigotes en 50 μ l de S.S. En este caso, se permitió desarrollar la infección de manera normal para la conservación del parásito.

5.4. Obtención de Ag total de *Leishmania mexicana*

Los amastigotes se obtuvieron por biopsia de la herida dorsal avanzada de un ratón previamente infectado con *L. mexicana*. El tejido fue macerado en 5 ml de S.S. y del sobrenadante se tomó 1 ml, el cual se colocó en botellas de cultivo con 5 ml de medio Schneider (In Vitro), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco).

El cultivo se mantuvo en incubación a 28.5°C, realizando lavados con S.S. cada 48 horas con el fin de purificar el cultivo. Una vez diferenciados los parásitos a promastigotes, se concentraron por centrifugación a 2,500 rpm durante 5 minutos y el botón fue lavado tres veces con S.S. La lisis del parásito realizó por crio-fractura con nitrógeno líquido y baño maría a 56 °C congelando y descongelando por 20 ciclos. Para determinar la concentración de proteína total se usó el método modificado de Lowry modificado (Anexo 1). El Ag*Lmex* se mantuvo a -70°C hasta su uso.

5.5. Obtención del suero

Previo a la infección y a los tiempos de 24 y 48 horas post-infección (hpi), los ratones se llevaron a eutanasia en cámara de CO₂ para una posterior extracción de sangre por punción cardíaca, usando una jeringa para tuberculina. Se obtuvo el suero por centrifugación a 2,500 rpm por 10 minutos en dos ciclos. El suero se resguardo a -20 °C hasta su uso para evaluación de citocinas y NO.

5.6. Índice esplénico

Todos los ratones fueron pesados antes de ser sacrificados. Posteriormente se obtuvo el bazo de ratones sanos (*Mif*+/+ ♀, ♂ *Mif*-/- ♀, ♂), así como de ratones de los mismos grupos, 24 y 48 hpi. Para obtener el índice esplénico se usó el peso del bazo sobre el peso total del ratón.

5.7. Cultivo celular de ganglios linfáticos

En condiciones asépticas en campana de esterilidad (VECO), se extrajeron los ganglios linfáticos poplíteos (cercanos al sitio de infección) a las 24 y 48 hpi, se utilizaron ratones no infectados como controles. Por medio de maceración con S.S. se liberaron las células, que fueron aisladas con separadores celulares (B.D. Falcón cell strainer; 40 µm nylon) y centrifugadas a 2,500 rpm por 5 minutos. Los botones obtenidos se resuspendieron en 1 ml de medio D-MEM (Gibco) suplementado (5% SFB, 1% antibiótico penicilina-estreptomina) para realizar el conteo pertinente de células/ml en cámara de Neubauer utilizando el método de exclusión con azul tripano.

Las células de ganglios linfáticos de cada ratón (infectados y controles) se ajustaron a 3×10⁶ células/ml con medio D-MEM suplementado. Se sembraron 3×10⁵ células por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos (Sarstedt, TC Platte 96 Well.Standard.F). Las células de cada ratón se subdividieron en tres grupos: células estimulados con *AgLmx* (20 µg/ml en medio DMEM 5% SFB, 1% antibiótico) y no estimuladas.

Las placas se incubaron por cinco días a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez concluido el tiempo de incubación se congeló a -20 °C hasta su uso para cuantificación de citocinas IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α y NO.

5.8. Cuantificación de citocinas

La determinación de citocinas en suero y sobrenadante de los cultivos celulares a los tiempos 0, 24 y 48 hpi se realizó por la técnica ELISA de tipo sandwich (Anexo 1), en placas Maxisorp con pares de anticuerpos de PreProtech para IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α y anticuerpos de R&D SYSTEMS para MIF. Se tomaron 30 μ l para cuantificación en suero y 50 μ l de sobrenadante de los cultivos celulares. El procedimiento se realizó según lo establecido en el protocolo de cada kit. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro de placas (Epoch) a 405 nm.

5.9. Cuantificación de óxido nítrico en suero

Para la evaluación de NO se prepararon dos soluciones: N-(1-naftil) etilendiamina dicloridato al 0.1% en agua destilada (solución A) y Sulfanil-amida al 1% en ácido fosfórico al 5% (solución B).

En suero se usaron 15 μ l de muestra y en tubos Eppendorf de 1.5 ml se adicionaron 5 μ l de nitrato reductasa (*Aspergillus niger*, Sigma 2U/ml) y 15 ml de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH 1.25 mg/ml: Boehringer Mannheim), incubando por 30 minutos. Posterior a la incubación, se adicionaron 50 μ l de la solución B y se incubó por dos minutos a temperatura ambiente, cubierto de la luz. A continuación se añadieron 50 μ l de la solución A, y se incubó nuevamente por dos minutos a oscuridad y temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 μ l de ZnSO₄ (15 mg/ml) y seguido de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, se removi6 el exceso de proteínas por centrifugación a 13,500 rpm por 10 minutos. Del sobrenadante se tomaron 100 μ l y en placas de 96 pozos con fondo plano (Thermo-Fisher nunc; PolySorp) se leyeron en un espectrofotómetro a 540 nm.

Para el análisis de NO en ganglios linfáticos. En una placa de 96 pozos (Thermo-Fisher nunc; PolySorp) se colocaron 50 μ l de sobrenadante de cultivos celulares de cada grupo. Colateralmente se realizó una mezcla 1:1 de la solución A y la solución B, adicionando 35 μ l de esta a cada pozo (muestras y curva patrón). Después de una incubación de 10 minutos, las placas se leyeron a 550 nm en un espectrómetro de placas (Epoch).

Para extrapolar las concentraciones, se utiliz6 una solución de NaNO al 0.01 M, y se realizaron diluciones al doble con agua destilada (0.01, 0.005, 0.0025, 0.00125, 0.000625 y 0.000315 Molar). Se agregaron 35 μ l de la solución A y la solución B 1:1 y se leyeron en espectrofotómetro junto con las muestras.

6. RESULTADOS

6.1. Confirmación del genotipo del modelo experimental

Se realizó un genotipo de todos los ratones experimentales por medio de PCR para confirmar la condición silvestre de los grupos *Mif+/+* ♀ y ♂ y la deficiencia de MIF en los grupos *Mif-/-* ♀ y ♂. En la figura 6, en los carriles 2 y 3 se muestra el resultado de la amplificación del gen funcional de MIF (200 pb) en ratones silvestres. En los carriles 4, 5, 6, 7 y 8 se amplificó el gen de inserción de neomicina (NEO) (500 pb), que se utilizó como marcador de la inserción del genoma con el bloqueo del gen de MIF.

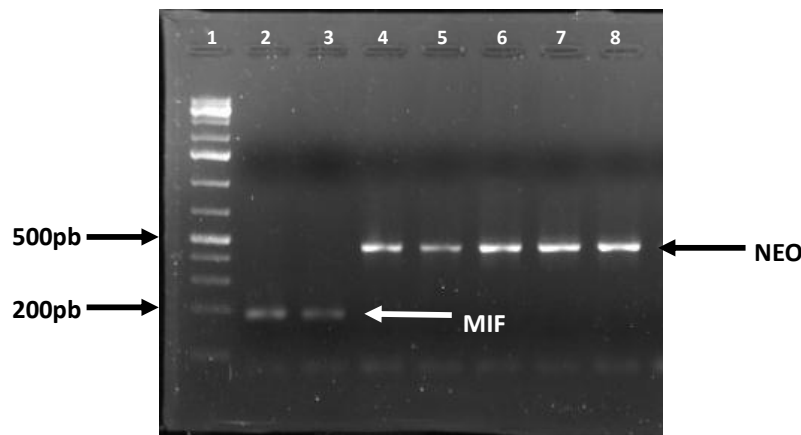


Figura 6. Electroforesis de PCR para el genotipo de los grupos de ratones. Se muestra el producto obtenido de la amplificación del gen de MIF a 200 pares de bases (carril 2 y 3) y el gen de inserción neomicina (NEO) a 500 pares de bases (carriles del 4 al 8). El primer carril pertenece al marcador molecular. Gel de agarosa al 1.5% en TBE.

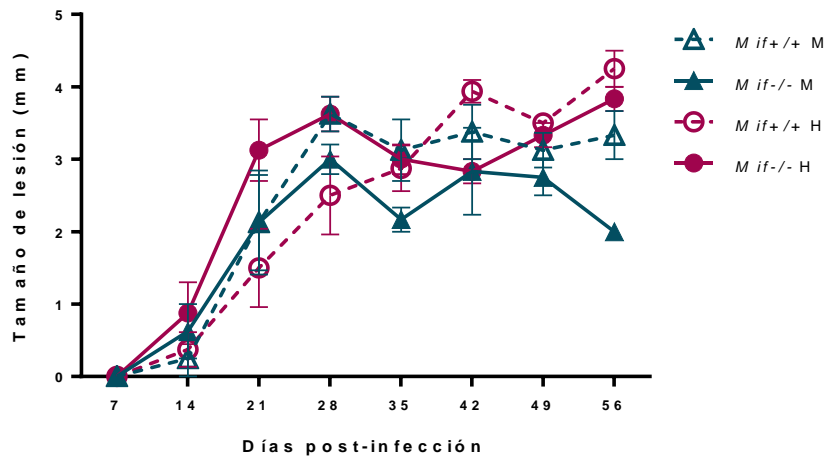
6.2. Establecimiento de la infección

Para corroborar la viabilidad del modelo, se monitoreó por 56 días el tamaño de la lesión generada después de una infección con 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana*.

Los grupos silvestres (*Mif+/+* ♀ y ♂) presentaron un aumento progresivo del tamaño de la lesión durante las siete semanas post-infección, sin diferencias significativas entre ♀ y ♂. El grupo *Mif-/-* ♀, desarrolló en promedio una lesión similar respecto al tamaño de la lesión observada en los grupos *Mif+/+*, mientras que el grupo *Mif-/-* ♂ mostró una disminución en la semana cinco, siete y ocho en comparación con el resto de los grupos. Este comportamiento fue más evidente en el día 56 post-infección (Figura 7a).

Los niveles de MIF en el grupo *Mif*^{+/+} ♂ estuvieron por arriba de los niveles detectados en el grupo *Mif*^{+/+} ♀ antes de ser infectados por *L. mexicana*. Posterior a la infección, esta diferencia desapareció, los niveles de MIF se fueron incrementando de manera similar en ambos grupos conforme la infección avanzó (Figura 7b). Como era de esperarse, en los grupos *Mif*^{-/-} no se detectó MIF (datos no mostrados).

a)



b)

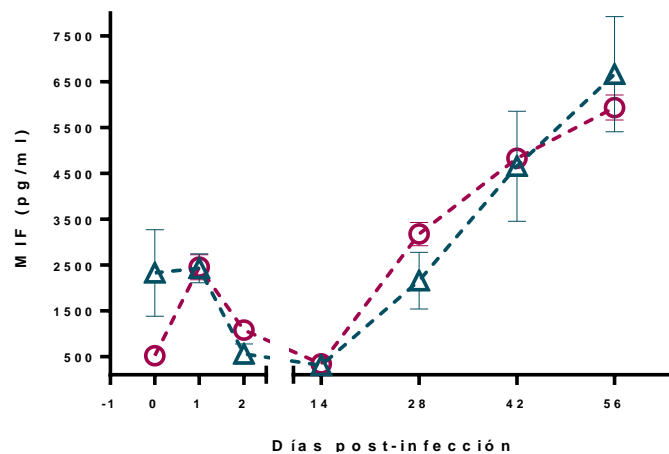


Figura 7. Crecimiento de la lesión (A). Los grupos *Mif*^{+/+} ♀, ♂ y *Mif*^{-/-} ♀ círculo abierto y triángulo abierto y círculo cerrado en su respectivo orden mostraron un aumento similar respecto al tamaño de la lesión; el grupo *Mif*^{-/-} ♂ (cuadro cerrado) presentó los valores bajos desde el día 35 post-infección. **(B) Cuantificación de MIF en ratones infectados con *L. mexicana*.** Durante la infección, los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ mostraron valores similares. Los datos representan el promedio \pm ES, n=4. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, * p \leq 0.05.

La evaluación de la resolución de la infección es indicativa de la resistencia a la misma. Cada grupo inició con una n=4, para los 56 días post-infección se observó: en el grupo *Mif+/+* ♂ tres ratones con lesión, y uno que la pudo resolver; mientras que en el grupo *Mif+/+* ♀ dos ratones tuvieron lesión y dos la resolvieron.

En el grupo *Mif-/-* ♂ se observó solo un ratón con lesión, y tres ratones que la resolvieron. Mientras que en el grupo *Mif-/-* ♀ tres ratones presentaron lesión, y un ratón la resolvió (Cuadros 3 y 4).

Cuadro 3. Cantidad de ratones infectados con <i>L. mexicana</i> con lesión cutánea					
Días post-infección					
	28	35	42	49	56
<i>Mif+/+</i> ♂	△△△△	△△△△	△△△△	△△△△	△△△△
<i>Mif+/+</i> ♀	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○	○ ○
<i>Mif-/-</i> ♂	▲ ▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲ ▲	▲ ▲	▲
<i>Mif-/-</i> ♀	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ●	● ● ●	● ● ●

Se muestra la cantidad total inicial de ratones infectados, y el curso de la infección hasta el día 56. La ausencia de símbolos indica que el (los) ratones resolvieron la infección.



6.3. Respuesta inmune temprana a nivel sistémico

6.3.1. Citocinas en suero

Con el fin de evaluar la respuesta inmune innata a las 24 y 48 hpi se obtuvo suero de los ratones *Mif*^{+/+} ♀ y ♂; y *Mif*^{-/-} ♀ y ♂ para determinar en suero los niveles de NO, IL-12 y TNF- α , factores característicos de una respuesta pro-inflamatoria; e IL-4, citocina que destaca en una respuesta anti-inflamatoria.

Como se mencionó inicialmente, IL-12 y TNF- α influyen en la activación de células como M ϕ y la eliminación de parásitos intracelulares. Es importante destacar que MIF promueve la síntesis de estas citocinas, determinantes en la respuesta inmune ante *Leishmania*.

Los niveles basales de IL-12 detectados en el suero de los ratones no infectados fluctuaron de 20-50 pg/ml. A las 24 h y 48 hpi se observó una tendencia a incrementar, no obstante, esto no fue estadísticamente significativo, los niveles de esta citocina se mantuvieron alrededor de 30-60 pg/ml (Figura 8).

Los niveles basales de TNF- α detectados en el suero de los ratones no infectados fluctuaron de 26-29 pg/ml. A las 24 y 48 hpi, también tuvieron una tendencia a incrementar, sus valores de 27-31 pg/ml, pero no fueron estadísticamente significativos (Figura 9).

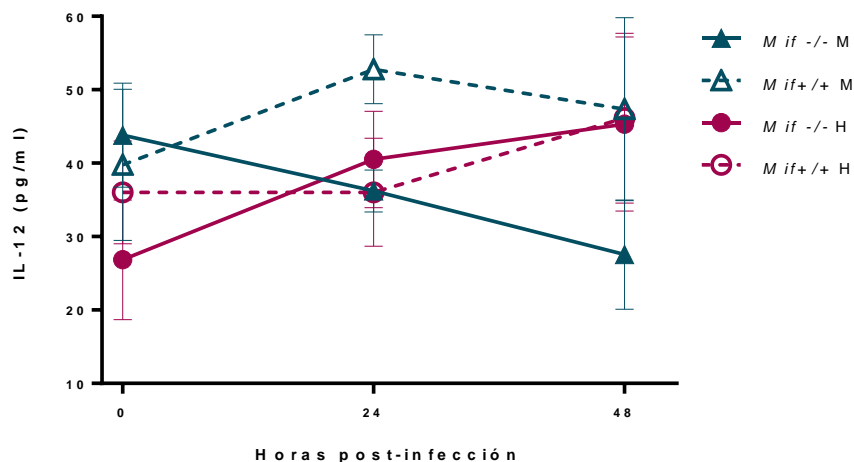


Figura 8. Niveles de IL-12 en suero de ratones infectados con *L. mexicana*. Los grupos *Mif*^{-/-} ♀ y ♂ (círculo cerrado y triangulo cerrado en su respectivo orden) mostraron un comportamiento estadísticamente similar a los grupos controles *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ (círculo y triangulo abierto). Los datos representan el promedio \pm ES, n=4. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, *p \leq 0.05.

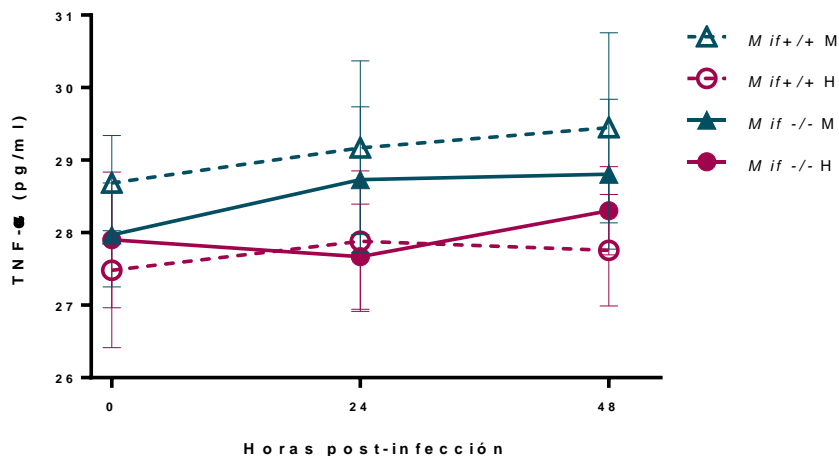


Figura 9. Niveles de TNF- α en suero de ratones infectados con *L. mexicana*. Los grupos *Mif*^{-/-} ♀ y ♂ (círculo cerrado y triángulo cerrado en su respectivo orden) mostraron un comportamiento estadísticamente similar a los grupos controles *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ (círculo y triángulo abierto). Los datos representan el promedio \pm ES, n=4. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, *p \leq 0.05.

Los valores de IL-4 detectados en el suero fueron mínimos, no se observaron cambios significativos entre los grupos *Mif*^{+/+} ♂, ♀ y *Mif*^{-/-} ♂, ♀ sin infección. Tampoco se observaron cambios significativos a las 24 y 48 hpi entre los grupos controles *Mif*^{+/+} ♂, ♀ y los grupos *Mif*^{-/-} ♂, ♀ (Figura 10).

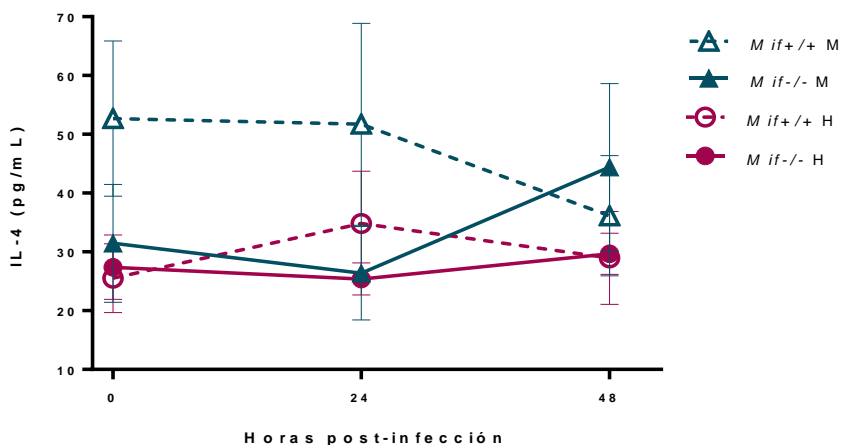


Figura 10. Niveles de IL-4 en suero de ratones infectados con *L. mexicana*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de los grupos, así como el tiempo pasado después de la infección. Los datos representan el promedio \pm ES, n=4. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, *p \leq 0.05.

En resumen, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en ninguna de estas citocinas, tampoco hubo diferencias entre ♂ y ♀.

6.3.2. Producción de óxido nítrico en suero

Como parte de la respuesta inmune contra parásitos intracelulares, MIF también se encarga de promover la liberación de NO por parte de las células inmunes, como Mφ. Por tal motivo se evaluó este parámetro en el suero obtenido de los ratones a las 24 y 48 hpi.

En la figura 11, puede observarse que los niveles basales de NO en los ratones no infectados fue similar entre ♂ y ♀; y entre los ratones *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}.

A las 24 hpi se observó un incremento significativo de NO en los ratones *Mif*^{+/+} ♂ mientras que los ratones *Mif*^{+/+} ♀ no presentaron este incremento. Los niveles de los ratones *Mif*^{-/-} ♂ y ♀ se mantuvieron en niveles basales, tampoco se observó incremento de NO. A las 48 hpi los grupos *Mif*^{+/+} ♂ y ♀ tuvieron un incremento significativo de NO, mientras que los ratones *Mif*^{-/-} ♂ y ♀ mantuvieron sus niveles basales de NO ($p < 0.05$).

En síntesis, los cambios en la concentración de NO fueron observables únicamente en los grupos silvestres: *Mif*^{+/+} ♂ y ♀.

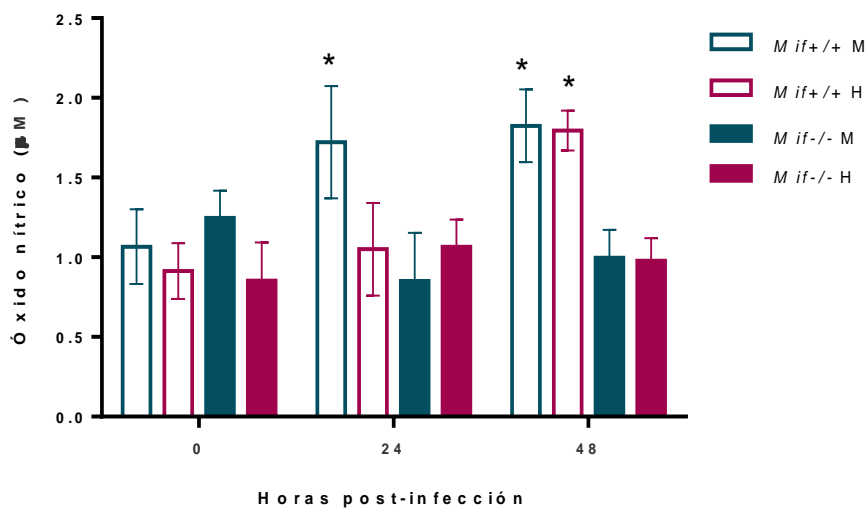


Figura 11. Producción de óxido nítrico en suero obtenido de ratones infectados con *L. mexicana*. El grupo *Mif*^{-/-} ♂ (24h) y *Mif*^{-/-} ♀ (48h) mostraron niveles más bajos de NO en sus respectivos tiempos. Los datos representan el promedio \pm ES de cinco ratones por grupo; Para el análisis estadístico se utilizó *t*-student, $*p \leq 0.05$.

6.3.3. Índice esplénico

El bazo, uno de los principales órganos inmunes, se encarga de “limpiar” la sangre y juega un papel importante como centro de regulación de células infectadas en circulación. Es un hecho que la esplenomegalia está presente en todos los tipos de infección por *Leishmania* spp., incluso en la infección de tipo cutánea. Por tal motivo, se monitoreó el tamaño del bazo de todos los grupos estudiados.

La figura 12 muestra el índice esplénico calculado como el peso del bazo/el peso corporal de cada ratón. El crecimiento del bazo en los grupos *Mif*+/+ infectados aumentó ligeramente a las 48 hpi, pero únicamente hubo diferencias estadísticamente significativas en el grupo *Mif*+/+ ♀ a las 48 hpi en comparación con el mismo grupo no infectado.

En el grupo de ratones *Mif*-/- ♀ también se observó aumento significativo a las 48 hpi, en comparación con el grupo *Mif*-/- ♀ no infectado.

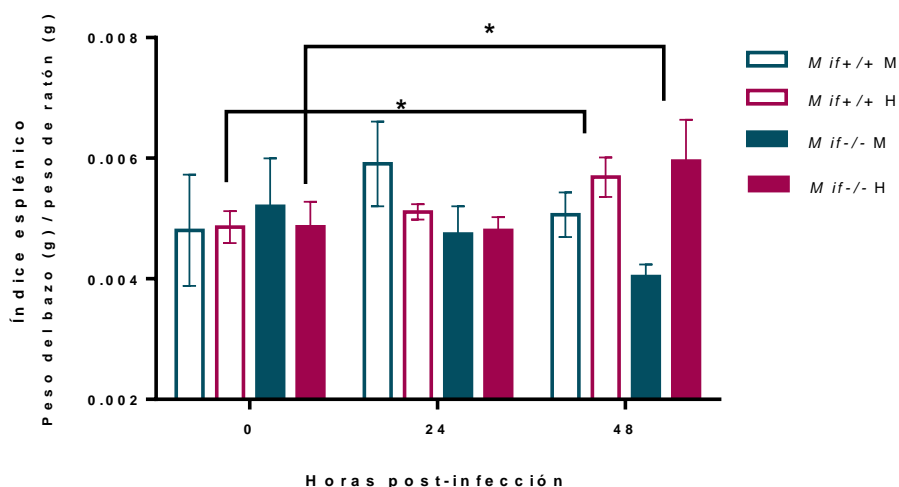


Figura 12. Índice esplénico. Únicamente el grupo de *Mif*+/+ ♀ mostró un evidente crecimiento del bazo en comparación con el resto de los grupos. Los datos representan el promedio \pm ES, n=4. Para el análisis estadístico se utilizó una prueba comparativa de dos grupos, *t*-de student no paramétrica, * $p \leq 0.05$.

6.4. Respuesta inmune temprana a nivel local

Con el fin de evaluar la respuesta inmune innata de manera más eficiente, y poder observar de manera más clara la influencia de MIF en esta respuesta, se obtuvieron células totales de ganglios linfáticos poplíteos (cerca del sitio de infección) a las 24 y 48 hpi y fueron cultivados como se refiere en la sección de materiales y métodos. En el sobrenadante de los cultivos de cada grupo

(*Mif*^{+/+} ♂, ♀ y *Mif*^{-/-} ♂, ♀) fueron cuantificados los niveles de tres citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-12 y TNF- α) y tres citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-6).

6.4.1. Citocinas inflamatorias en cultivo de células del ganglio poplíteo

Los niveles basales de IL-12 en los grupos de ratones no infectados (tiempo 0) *Mif*^{+/+} ♂, ♀ y *Mif*^{-/-} ♂, ♀ fueron de 15-40 pg/ml sin diferencias significativas entre ellos. La producción de IL-12 a las 24 y a las 48 hpi no varió significativamente, no hubo significancia estadística entre los diferentes grupos (Figura 13).

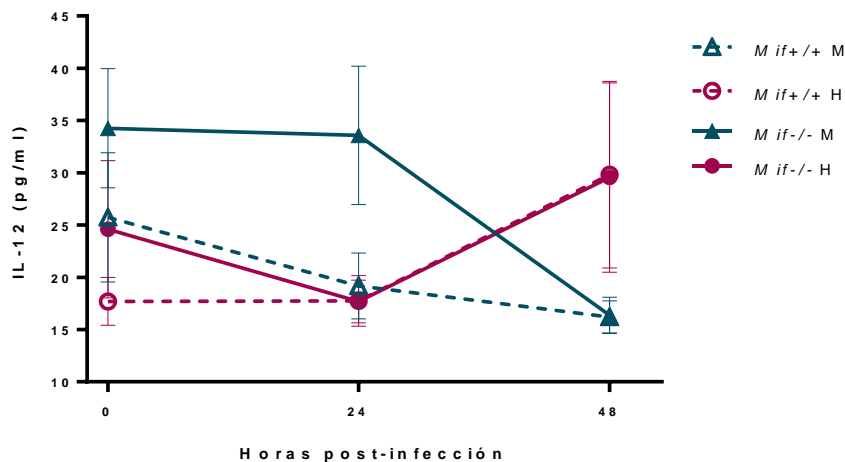


Figura 13. Niveles de IL-12 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. Se muestran los valores obtenidos, posterior a una re-estimulación con *Ag. L.mexicana* con incubación por cinco días. Los datos representan el promedio \pm ES de cinco ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, * $p \leq 0.05$.

En el caso de TNF- α , los niveles obtenidos en los diferentes grupos de ratones no infectados (tiempo 0) *Mif*^{+/+} ♂, ♀ y *Mif*^{-/-} ♂, ♀ fueron de 40-50 pg/ml sin diferencias significativas entre ellos. A las 24 y 48 hpi se observó una tendencia a incrementar esta citocina, particularmente significativo ($p < 0.05$) a las 48 h en el grupo de ratones *Mif*^{+/+} ♀ y *Mif*^{-/-} ♀ comparados con *Mif*^{+/+} ♂ y *Mif*^{-/-} ♂, respectivamente (Figura 14).

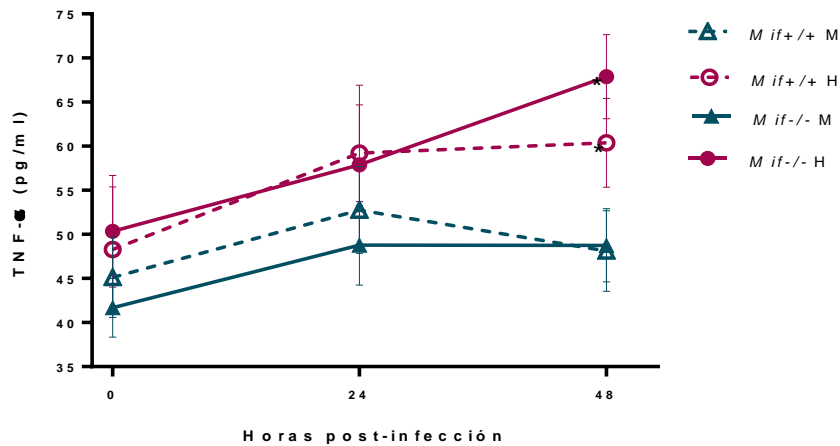


Figura 14. Niveles de TNF- α en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. Los grupos *Mif*^{+/+} ♀ (círculo abierto) y *Mif*^{-/-} ♀ (círculo cerrado) mostraron un aumento considerable de niveles en comparación con los grupos *Mif*^{+/+} ♂ y *Mif*^{-/-} ♂. Los datos representan el promedio \pm ES. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni $n=5$, $*p \leq 0.05$.

Los niveles de IFN- γ más elevados correspondieron a los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y *Mif*^{-/-} ♀ en comparación a los grupos de *Mif*^{+/+} ♂ y *Mif*^{-/-} ♂ a las 48 hpi (Figura 15).

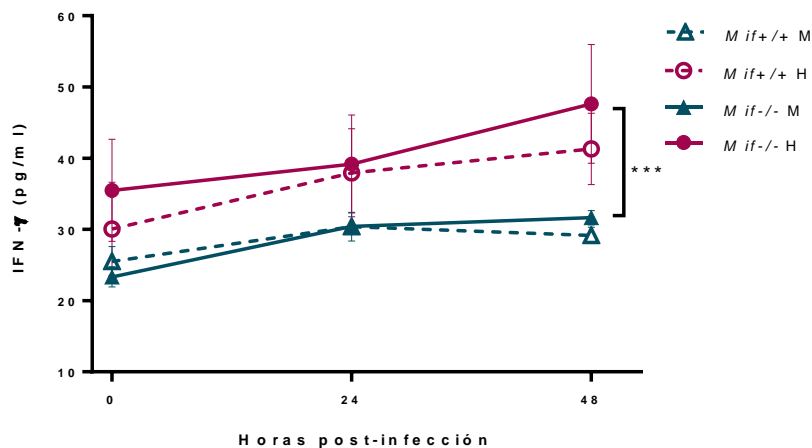


Figura 15. Niveles de IFN- γ en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. Ambos grupos de ratones hembras, *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} (círculo abierto y círculo cerrado en su respectivo orden) presentaron niveles considerablemente más elevados de IFN- γ durante los distintos tiempos de infección. Los datos representan el promedio \pm ES. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, $n=5$, $*p \leq 0.05$.

6.4.2. Producción de óxido nítrico en ganglios linfáticos

Los niveles de NO en el sobrenadante de los cultivos de ganglios linfáticos de *Mif*^{+/+} ♂, ♀ y *Mif*^{-/-} ♂, ♀ tuvieron una tendencia a incrementar cuando provienen de la infección por 24 h en comparación con los niveles basales de su grupo respectivo. Cuando las células cultivadas provinieron de 48 hpi se observó disminución significativa de NO en los grupos *Mif*^{+/+} ♂ y *Mif*^{-/-} ♂ en comparación con los cultivos de los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y *Mif*^{-/-} ♀ que mantuvieron la producción de NO (Figura 16, $p < 0.05$).

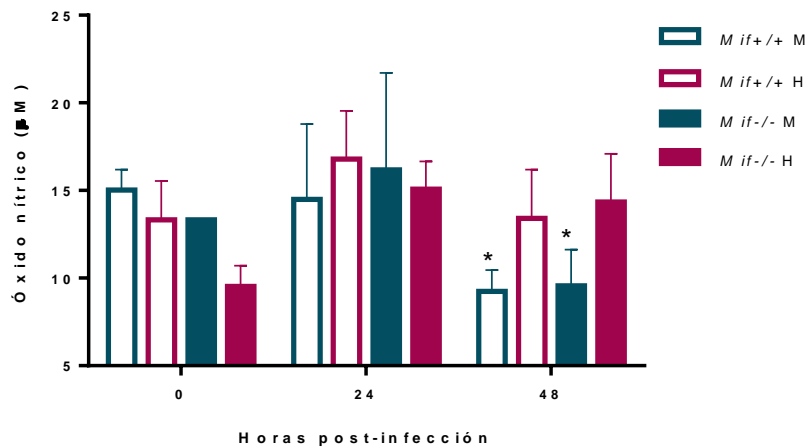


Figura 16. Producción de óxido nítrico en sobrenadante de cultivo de ganglios linfáticos de ratones infectados con *L. mexicana*. Se muestran los valores obtenidos, posterior a una re-estimulación con *Ag. L. mexicana* con incubación por cinco días. No se registraron cambios significativos entre los grupos. Los datos representan el promedio \pm ES de 4 ± 1 ratones por grupo. Para el análisis estadístico se utilizó *t*-student. $n=5$, $*p \leq 0.05$.

6.4.3. Citocinas anti-inflamatorias en cultivo de células del ganglio poplíteo

Una vez que se estableció el comportamiento de algunas citocinas pro-inflamatorias producidas por células del ganglio, se dispuso a evaluar los niveles de citocinas anti-inflamatorias para tener un panorama más amplio de la respuesta inmune innata.

Como se mencionó anteriormente, IL-10 e IL-4 son citocinas capaces de definir el grado de susceptibilidad en infecciones parasitarias. Particularmente, IL-10 es capaz de suprimir la activación de células del sistema inmune innato que son importantes en el control y/o eliminación de *Leishmania* sp.

Los niveles de IL-10 en el grupo *Mif*^{+/+} ♀ fueron más altos comparados con los niveles detectados en el grupo *Mif*^{+/+} ♂ en todos los tiempos; sin infección (día 0), a las 24 y 48 hpi (Figura 17,

p<0.05). Esta misma tendencia se observó entre los grupos *Mif*^{-/-} ♂ ♀ pero no fue estadísticamente significativa la diferencia entre ellos.

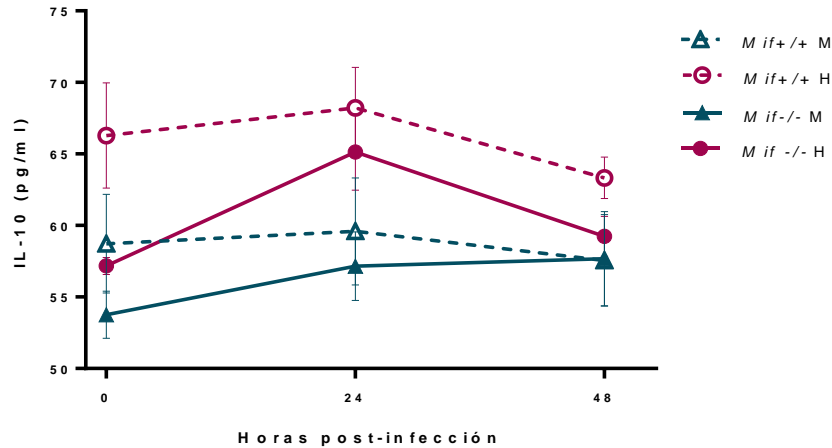


Figura 17. Niveles de IL-10 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de los grupos. Los datos se presentan con el promedio ± ES, n=5. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, *p≤0.05.

Diversos estudios han reportado que IL-6 es una citocina promotora de una respuesta Th2, capaz de suprimir la producción de TNF-α e IFN-γ; ambos importantes para una respuesta inflamatoria antiparasitaria.

La producción de IL-6 en los *Mif*^{-/-} ♀ y ♂ fue muy similar sin diferencias significativas entre ambos. Mientras que los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ tuvieron una producción diferente a los *Mif*^{-/-} ♀ y ♂. A las 24 hpi los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ tuvieron niveles basales de IL-6, pero a las 48 hpi el grupo *Mif*^{+/+} ♀ tuvo un incremento estadísticamente significativo (Figura 18).

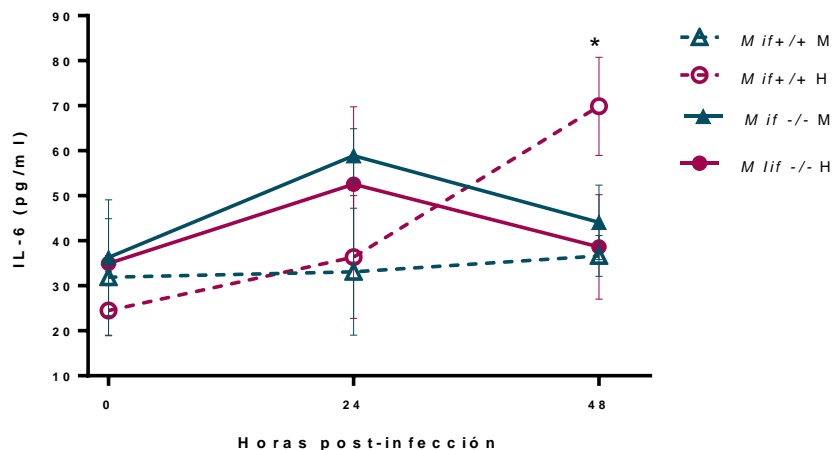


Figura 18. Niveles de IL-6 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. A las 48 hpi, los grupos *Mif*^{-/-} ♀, *Mif*^{-/-} ♂ y *Mif*^{+/+} ♂ muestran un comportamiento similar en comparación con el grupo *Mif*^{+/+} ♀. Los datos se presentan con el promedio ± ES, n=5. Para el análisis estadístico se utilizó t-student, *p≤0.05.

Los niveles de IL-4 detectados fueron mínimos, y no hubo diferencias entre los grupos. Además, los ratones *Mif*^{-/-} ♀ y ♂ y ratones *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ no muestran variaciones significativas entre ellos (Figura 19).

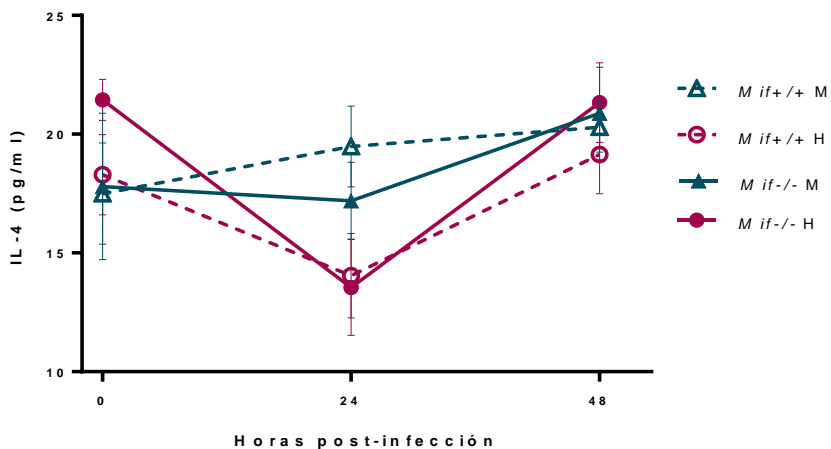


Figura 19. Niveles de IL-4 en sobrenadante de cultivo de células de ganglios linfáticos. El grupo *Mif*^{-/-} ♀ mostró una marcada variación en los niveles de IL-4, posterior a la infección. n=5. Los datos representan el promedio ±ES. Para el análisis estadístico se utilizó Anova de dos vías y la prueba de Bonferroni, *p≤0.05.

6.5. Recopilación de resultados

Cuadro 5. Resumen de resultados 48 horas de la infección				
	<i>Mif+/+</i> ♂	<i>Mif+/+</i> ♀	<i>Mif-/-</i> ♂	<i>Mif-/-</i> ♀
Tamaño de la lesión (56 días post-infección)	+++	++++	++	++++
Resolución de la lesión	1:4	2:4	3:4	1:4
Valores de MIF	+++	+++		
Respuesta inmune sistémica				
IL-12	+++	+++	+	+++
TNF- α	+++	+	++	+
IL-4	++	+	+++	+
NO	+++	+++	+	+
Índice esplénico	+	++	+	++
Respuesta inmune local				
IL-12	++	++	++	++
TNF- α	+	++	+	+++
IFN- γ	+	+++	+	+++
NO	-	+	-	+
IL-10	++	++	++	++
IL-6	++	+++	++	++
IL-4	++	++	++	++

Donde “+” representa una tendencia a disminuir; “++” representa ausencia de cambios; “+++” representa una tendencia a aumentar y “++++” representa un aumento significativo.

7. DISCUSIÓN

En diversas enfermedades parasitarias MIF participa como una citocina determinante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria Th1 [38, 43, 44, 60]. Sin embargo, la participación de MIF en la leishmaniosis ha sido circunscrita a la infección por *L. major*. En esta infección se demostró que MIF tiene una participación importante en la eliminación del parásito a través de la activación y diferenciación de los macrófagos a un perfil de tipo M1, promoviendo la síntesis de NO [61, 62]. Se ha demostrado también, que la ausencia de MIF en ratones de fondo genético BALB/c o C57BL/6 (ratones *knockout*) los hace más susceptibles ante la infección, y desarrollan lesiones más grandes con mayor número de parásitos [36].

En este sentido, parece ser claro el papel que juega MIF en la infección por *L. major*. No es el caso para la infección por *L. mexicana* McMorris [63], Akhoundi y colaboradores [48] han descrito diferencias a nivel cromosómico entre *L. major* y *L. mexicana*. Estas diferencias inmunogénicas pueden enmarcarse considerando que corresponden al “Viejo” y “Nuevo” Mundo en su respectivo orden, modificando la genética de *L. mexicana*. Sumado a estas diferencias filogenéticas, diversos autores han hecho referencia a la distinción en la respuesta inmune entre ambas especies [33, 34, 36, 64]. Por tal motivo el presente proyecto se planteó establecer la participación de MIF en el desarrollo de la respuesta inmune a la infección con *L. mexicana* desde tiempos tempranos post-infección.

Estudios previos por Satoskar y colaboradores [34] demostraron que los ratones machos de fondo genético DBA/2 infectados experimentalmente con *L. mexicana* son más susceptibles a la infección que los ratones hembras. Debido a estas diferencias entre sexos, en este trabajo experimental se consideró trabajar con los dos sexos, para explorar si esta característica puede estar relacionada o verse modificada por la presencia o ausencia de MIF.

Para corroborar la viabilidad del modelo, se infectaron ratones *Mif*^{+/+} ♀, ♂ y *Mif*^{-/-} ♀, ♂ y se monitoreo el área de infección por 56 días. Durante el curso de la infección los niveles de MIF en los ratones *Mif*^{+/+} ♀, ♂ se incrementaron de manera significativa a partir del día 14 post-infección, antes de este tiempo los niveles de MIF se mantuvieron como los basales (Figura 7b). Como era de esperarse, los ratones *Mif*^{-/-} ♀, ♂ no tuvieron niveles detectables de MIF. Al término de los 56 días, el tamaño de la lesión fue ligeramente mayor tanto en las hembras *Mif*^{+/+}, como en las *Mif*^{-/-} (Figura 7a). El hecho de que los ratones *Mif*^{+/+} ♀ y *Mif*^{-/-} ♀ desarrollaron lesiones similares sugiere que MIF no tiene una participación importante en el desarrollo de la lesión.

Tomando en cuenta que algunos ratones pudieron resolver la infección, los resultados obtenidos en los grupos *Mif*^{+/+} ♀ (resolvieron la infección 2:4 ratones), y *Mif*^{+/+} ♂ (resolvieron la infección 1:4 ratones) (Cuadro 3) concuerdan con lo reportado por Satoskar [33, 34] quien demostró que las hembras en ratones DBA/2 tienen mayor resistencia a la infección por *L. mexicana*. Así mismo, se ha hecho referencia a la similitud de respuesta inmune en ratones DBA/2 y BALB/c [64].

Es importante hacer notar que esta capacidad de resolución de la infección se invirtió en los ratones deficientes para MIF. Los ratones *Mif*^{-/-} ♂ (resolvieron la infección 3:4 ratones) y *Mif*^{-/-} ♀ (resolvieron la infección 1:4) (Cuadro 3). Estos resultados sugieren que la ausencia de MIF en los ratones *Mif*^{-/-} ♂ permitió una mejor resolución de la infección; lo cual es interesante, considerando que no había sido reportado anteriormente, y que además confirma la distinción en la respuesta inmune influida por la presencia de MIF, así como del sexo en los ratones.

Con la finalidad de establecer las posibles diferencias a nivel inmunológico en ratones *Mif*^{+/+} ♀, ♂ y *Mif*^{-/-} ♀, ♂ se analizaron varios parámetros como el crecimiento del bazo (esplenomegalia). En infecciones parasitarias intracelulares, el bazo juega un papel importante controlando y evitando la propagación de los parásitos. En el caso de la leishmaniosis a nivel cutáneo, la esplenomegalia ha sido escasamente reportada, no obstante, Aguilar y colaboradores [64] describieron un crecimiento constante en el bazo de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, durante 34 semanas de evaluación. El bazo se ha caracterizado como un órgano con presencia de MIF, atribuido principalmente a macrófagos asociados a este órgano [65]. Debido a esta observación, se esperaba que los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y ♂ desarrollaran un aumento significativo en el tamaño del bazo, detectable al menos en 48 hpi. No obstante, fueron los grupos *Mif*^{+/+} ♀ y *Mif*^{-/-} ♀ los que mostraron un aumento significativo a las 48 hpi (Figura 12), independientemente de la presencia de MIF. Coincidentemente, estos mismos grupos fueron los que presentaron mejor resolución de la lesión a largo plazo (Cuadro 3).

Es importante mencionar que el aumento de tamaño en el bazo no necesariamente sugiere que la infección haya llegado al órgano. El crecimiento del bazo también puede ser indicativo de una respuesta del sistema inmune activa a nivel sistémico contra el parásito, basado en que, si bien Aguilar [64] evidenció el crecimiento del bazo a partir de la segunda semana, no fue hasta 24 semanas post-infección que se encontraron parásitos dentro del órgano. Considerando esta observación, se esperaba que esta respuesta activa se reflejara a nivel sistémico, con el consecuente aumento de citocinas como IL-12 y TNF- α así como NO y la disminución de IL-4, de acuerdo con lo descrito por Maspi y colaboradores [66]. Esta respuesta sería más evidente en el

grupo *Mif+/+* ♀ en comparación con *Mif-/-* ♀ haciendo referencia a la influencia de MIF sobre estas citocinas, según lo mencionado por algunos autores [33, 34, 36, 37, 39].

Los resultados obtenidos mostraron que las concentraciones de IL-12, TNF- α y NO se mantuvieron sin cambios significativos a las 24 hpi. Aun con esto, a las 48 hpi se vislumbraron tendencias (sin que fueran estadísticamente significativas debido a la $n=4$) que indicaron que la IL-12, TNF- α y NO tuvieron un incremento en los grupos *Mif+/+* ♀, ♂ en comparación con los grupos *Mif-/-* ♀, ♂ (Figuras 8, 9 y 11).

Estas tendencias observadas puede explicarse asumiendo que, cantidades elevadas de TNF- α , así como el manejo de una respuesta más inflamatoria han sido atribuidas a machos [18, 29, 36]. A su vez, la presencia de MIF favoreció la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-12 [33, 36, 40]. Referente a un perfil anti-inflamatorio, no se detectó producción de IL-4 en ningún grupo, lo cual es completamente entendible porque es una citocina de la respuesta inmune celular que se establece en tiempos más largos de la infección (Figura 10).

Hasta aquí se ha podido observar un comportamiento distinto, referente a la presencia de MIF, así como el sexo del hospedero; no obstante, es necesario extender el número de sujetos estudiados para demostrar la resistencia o susceptibilidad asociada a MIF, y la influencia del sexo del hospedero sobre ésta.

También fue necesario estudiar la respuesta más localizada, por lo que se evaluó la respuesta a nivel de ganglios linfáticos poplíteos, determinando los niveles de IL-12, TNF- α e IFN- γ , así como NO.

Se midió IFN- γ por ser una citocina producida por múltiples células en ganglios linfáticos y que funciona inhibiendo el crecimiento de parásitos intracelulares y estimulando la producción de TNF- α y NO, efecto que se incrementa en presencia de MIF [62]. Diversos autores han atribuido niveles altos de IFN- γ en ratones que presentan lesiones de menor tamaño. Además, se ha reportado que esta citocina se produce más eficientemente en hembras que en machos en condiciones normales y en una infección con *L. mexicana* [29, 33].

La cuantificación de citocinas en el sobrenadante de los cultivos celulares confirmó los resultados observados a nivel sistémico. El sexo fue el factor con mayor influencia, los niveles de IL-12, TNF- α e IFN- γ de los grupos *Mif+/+* ♀ y *Mif-/-* ♀ fueron superiores a los detectados en los grupos *Mif+/+* ♂ y *Mif-/-* ♂ (Figuras 13, 14 y 15). Este comportamiento, en conjunto con el ligero aumento de NO en estos mismos grupos (Figura 16), confirma lo reportado por Satoskar [33] respecto a una mejor

respuesta inmune ante *L. mexicana* asociada a hembras. Cabe destacar que la ausencia de MIF no influyó de manera considerable en los niveles de IL-12, IFN- γ o TNF- α en la respuesta temprana a la infección.

Ahora bien, al emerger una respuesta inflamatoria, las citocinas de perfil anti-inflamatorio deberían verse modificadas. Se evaluaron los niveles de IL-4 en ganglios linfáticos (Figura 19), igualmente se consideró a IL-10 e IL-6 debido a que diversa literatura ha referido una influencia de éstas sobre una respuesta inflamatoria, ya sea moderando o impidiendo un perfil pro-inflamatorio [67]. De igual manera, se ha asociado su presencia a una persistencia por parte de algunas especies de *Leishmania* [36, 62, 66].

En el sobrenadante de los cultivos celulares, los niveles de IL-6 detectados presentaron un aumento a las 48 hpi en el grupo *Mif*^{+/+} ♀ (Figura 18). El hecho de que este comportamiento se haya observado en los grupos que a largo plazo tuvieron mejor resolución de la lesión, nos permite suponer que se debe a una respuesta moduladora de las citocinas pro-inflamatorias, más que como un factor que denote susceptibilidad ante la infección [39]. Referente a los niveles de IL-4 e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos celulares, tanto a las 24 como a las 48 hpi, no se produjeron niveles detectables de estas citocinas (Figuras 17 y 19), se puede explicar por los tiempos tan cortos post-infección.

El presente trabajo permitió evidenciar la resistencia de las hembras ante una infección con *L. mexicana*, atribuido posiblemente a la rápida activación de la respuesta inmune, en comparación con los machos. Colateralmente, la susceptibilidad asociada a machos podría deberse la ausencia de una respuesta a tiempos cortos de infección, no obstante la ausencia de MIF en el sistema juega un rol importante en la infección confiriendo resistencia. Por otro lado, aunque el grupo *Mif*^{-/-} ♂ no destacó en ningún parámetro 24 y 48 hpi, fue a tiempos más largos de evaluación que presentó mejor resolución y menor daño tisular. Así bien, se sugiere que esta misma respuesta tardía conferida a machos ante la infección, en conjunto con la ausencia de MIF, es capaz de disminuir el daño al tejido y conferir mayor resistencia ante el parásito.

Para finalizar, los resultados obtenidos durante la infección temprana coinciden con lo observado en la infección crónica. Para confirmar sólidamente estas sentencias, es necesario un análisis dirigido a la carga parasitaria y daño en el sitio directo de infección, sin embargo a los tiempos de evaluación (24 y 48 hpi) fue imposible detectar parásitos, la impronta en el sitio de infección no arrojó resultados y no fue posible estandarizar la técnica histológica en un tejido tan delgado y delicado como lo es la piel de los ratones.

8. CONCLUSIÓN

MIF parece no tener influencia en la respuesta inmune inmediata y sus posibles efectos promotores del perfil inflamatorio solo se ven en la infección crónica. Además, el sexo es un factor capaz de conferir resistencia ante una infección con *L. mexicana*, haciendo más susceptibles a los machos, que en general presentan una respuesta menos inflamatoria en las primeras horas post-infección. La resistencia presente en las hembras puede deberse a la rapidez con que se activa la respuesta inmune, así como los mecanismos que la regulan, desde tiempos tempranos de la infección.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. C.D.C. *Leishmaniasis*. Consultado en 2017; Disponible en <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
2. W.H.O. *Leishmaniasis. Status of Endemicity of Cutaneous Leishmaniasis: 2017*. Consultado en 2017; Disponible en: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html.
3. Neuber, H., *Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges*, 2008. **6**(9): p. 754-65.
4. Gomes, C.M., *et al.*, Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*, 2014. **89**(5): p. 701-9.
5. W.H.O. *Leishmaniasis*. Consultado en 2017; Disponible en: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.
6. Pereira, A.P., M., *Leishmaniosis. Offarm*, 2002. **21**(9): p. 116-124.
7. Abbas, *Inmunología Celular y Molecular*, ed. 8va. 2015: Saunders: p. 19-47.
8. Leliefeld, P.H., L. Koenderman, y J. Pillay, How neutrophils shape adaptive immune responses. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 471.
9. Stevenson, M.M., *et al.*, Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(9): p. 1311-22.
10. Murphy, K., *Janeway's immunobiology*. XIX ed. 2012, NewYork: Garland Science: p. 47-56.
11. Striz, I.B., E; Kolesar, L.; Sekerkova, A., Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin Sci*, 2014. **126**: p. 93–612.
12. Duque, C.R., L., Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, 2007. **26**(2): p. 73-86.
13. Ochoa, C.B., C., Los macrófagos, ángeles o demonios. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2013. **12**(1).
14. Venturin, G.L., *et al.*, M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF-alpha production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 2016. **38**(11): p. 698-704.
15. Rodrigues, M.M., A.C. Oliveira, y M. Bellio, The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. *J Parasitol Res*, 2012. **2012**: p. 507874.
16. Satoh, T. y S. Akira, Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol Spectr*, 2016. **4**(6).
17. Taub, D.D., Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunol*, 2008. **252**(1-2): p. 1-6.
18. Bhatia, A., H.K. Sekhon, y G. Kaur, Sex hormones and immune dimorphism. *ScientificWorldJournal*, 2014. **2014**: p. 159150.
19. Haddad, J.J., N.E. Saade, y B. Safieh-Garabedian, Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol*, 2002. **133**(1-2): p. 1-19.
20. Butts, C.L. y E.M. Sternberg, Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol*, 2008. **252**(1-2): p. 7-15.
21. Klein, S.L., Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunol*, 2004. **26**(6-7): p. 247-64.
22. Garcia-Reyero, N., The clandestine organs of the endocrine system. *Gen Comp Endocrinol*, 2018. **257**: p. 264-271.

23. Romero, G.M., Papel del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en la respuesta innata y adaptativa en la infección por *Leishmania mexicana* en un modelo murino, en *Unidad de Biomedicina*. 2008, Universidad Nacional Autónoma de México. p. 93.
24. Gubbels Bupp, M.R., Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell Immunol*, 2015. **294**(2): p. 102-10.
25. Buyon, J.P., *et al.*, Female hormones reduce neutrophil responsiveness in vitro. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(6): p. 623-30.
26. Bogdan, C. y M. Rollinghoff, How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today*, 1999. **15**(1): p. 22-8.
27. Duneau, D. y D. Ebert, Host sexual dimorphism and parasite adaptation. *PLoS Biol*, 2012. **10**(2): p. e1001271.
28. Cousineau, S.V. y S. Alizon, Parasite evolution in response to sex-based host heterogeneity in resistance and tolerance. *J Evol Biol*, 2014. **27**(12): p. 2753-66.
29. Roberts, C.W., W. Walker, y J. Alexander, Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(3): p. 476-88.
30. Eloi-Santos, S., *et al.*, *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Exp Parasitol*, 1992. **75**(2): p. 168-75.
31. Yamamoto, Y., *et al.*, Sex differences in host resistance to *Mycobacterium marinum* infection in mice. *Infect Immun*, 1991. **59**(11): p. 4089-96.
32. Morales-Montor, J. y C. Larralde, The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology*, 2005. **131**(Pt 3): p. 287-94.
33. Satoskar, A., H.H. Al-Quassi, y J. Alexander, Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN-gamma production by female but not male DBA/2 mice. *Immunol Cell Biol*, 1998. **76**(2): p. 159-66.
34. Satoskar, A. y J. Alexander, Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology*, 1995. **84**(1): p. 1-4.
35. Bucala, R. y S.C. Donnelly, Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity*, 2007. **26**(3): p. 281-5.
36. Satoskar, A.R., *et al.*, Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun*, 2001. **69**(2): p. 906-11.
37. Vermeire, J.J., *et al.*, Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. *Trends Parasitol*, 2008. **24**(8): p. 355-63.
38. Damle, S.R., *et al.*, Macrophage migration inhibitory factor deficiency enhances immune response to *Nippostrongylus brasiliensis*. *Mucosal Immunol*, 2017. **10**(1): p. 205-214.
39. Nobre, C.C., *et al.*, Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Biological activities and relation with cancer. *Pathol Oncol Res*, 2017. **23**(2): p. 235-244.
40. Rosado Jde, D. y M. Rodriguez-Sosa, Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(9): p. 1239-56.
41. Lan, H.Y., *et al.*, The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med*, 1997. **185**(8): p. 1455-65.
42. Boyce, N.W., P.G. Tipping, y S.R. Holdsworth, Lymphokine (MIF) production by glomerular T-lymphocytes in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, 1986. **30**(5): p. 673-7.
43. Ruiz-Rosado Jde, D., *et al.*, MIF promotes classical activation and conversion of inflammatory Ly6C(high) monocytes into TipDCs during murine toxoplasmosis. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 9101762.
44. Cutrullis, R.A., P.B. Petray, y R.S. Corral, MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor

- necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. *Immunobiology*, 2017. **222**(2): p. 423-431.
45. Figueiredo, A.B., M.C. Souza-Testasicca, y L.C.C. Afonso, Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response. *Biomed J*, 2016. **39**(4): p. 244-250.
 46. Kamir, D., *et al.*, A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol*, 2008. **180**(12): p. 8250-61.
 47. Holowka, T., *et al.*, *Leishmania*-encoded orthologs of macrophage migration inhibitory factor regulate host immunity to promote parasite persistence. *FASEB J*, 2016. **30**(6): p. 2249-65.
 48. Akhoundi, M., *et al.*, *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*, 2017. **57**: p. 1-29.
 49. Soong, L., C.A. Henard, y P.C. Melby, Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(6): p. 735-51.
 50. PAHO, *Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas*. Consultado en 2018: Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34858>.
 51. S.S., Prevención y control de las leishmaniasis 2013-2018. 2018, *Secretaria de Salud*. p. 68.
 52. De Pablos, L.M., T.R. Ferreira, y P.B. Walrad, Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Curr Opin Microbiol*, 2016. **34**: p. 82-89.
 53. Salei, N., *et al.*, Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells. *PLoS One*, 2017. **12**(2): p. e0171850.
 54. Rodriguez-Gonzalez, J., *et al.*, *Leishmania mexicana* promastigotes down regulate JNK and p-38 MAPK activation: Role in the inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol*, 2016. **163**: p. 57-67.
 55. Zamora-Chimal, J., *et al.*, NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology*, 2017. **222**(2): p. 454-462.
 56. Atayde, V.D., *et al.*, *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol*, 2016. **309**: p. 7-18.
 57. Regli, I.B., *et al.*, Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 1558.
 58. Richardson, J.M., *et al.*, Structures of *Leishmania major* orthologues of macrophage migration inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **380**(3): p. 442-8.
 59. de Jesus Fernandes Covas, C., *et al.*, Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. *Cytokine*, 2013. **61**(1): p. 168-72.
 60. Reyes, J.L., *et al.*, Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, 2006. **74**(6): p. 3170-9.
 61. Xu, D., *et al.*, Protective effect on *Leishmania major* infection of migration inhibitory factor, TNF-alpha, and IFN-gamma administered orally via attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunol*, 1998. **160**(3): p. 1285-9.
 62. Juttner, S., *et al.*, Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol*, 1998. **161**(5): p. 2383-90.
 63. McMorris, A., M., Leishmaniasis: A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite *Leishmania*. *Macalester Reviews in Biogeography*, 2009. **1**(2): p. 1-18.

64. Aguilar Torrentera, F., *et al.*, Parasitic load and histopathology of cutaneous lesions, lymph node, spleen, and liver from BALB/c and C57BL/6 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Am J Trop Med Hyg*, 2002. **66**(3): p. 273-9.
65. Calandra, T., *et al.*, The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*, 1994. **179**(6): p. 1895-902.
66. Maspi, N., A. Abdoli, y F. Ghaffarifar, Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*, 2016. **110**(6): p. 247-260.
67. Pereira Silva Bezerra, I., M. Amaral Abib, y B. Rossi-Bergmann, Intranasal but not subcutaneous vaccination with LaAg allows rapid expansion of protective immunity against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, 2018. **36**(18): p. 2480-2486.

10. ANEXO

■ Buffer de lisis (500ml)

- 50ml Tris HCl 1M; pH 8.5
- 5ml EDTA 0.5M
- 5ml SDS 20%
- 100ml NaCl 1M

Mezclar las soluciones y aforar a 500ml

■ Reacción en PCR

Reacción de una muestra kit KAPA 2G, estandarizado para Taq DNA Polimerasa EP0402 de ThermoScientific.

- 2 μ l Buffer KAPA
- 1.2 μ l MgCl
- 0.4 μ l dNTP
- 1 μ l Primer Forward *Mif*
- 1 μ l Primer Reverse *Mif*
- 1 μ l Primer Forward *Neo*
- 1 μ l Primer Reverse *Neo*
- 12.15 μ l Agua grado molecular
- 0.25 μ l Taq DNA Polimerasa
- 1 μ l DNA (muestra)

Cantidad total por reacción 21 μ l

■ Solución de TBE (10L)

- 108 g Tris base
- 55 g Ácido bórico
- 40 ml EDTA 0.5M

Mezclar soluciones y aforar a 10 litros.

■ **Cuantificación de proteínas por método de Lowry (modificado)**

Solución A

- 10 ml Sulfato de cobre al 1% en agua destilada
- 10 ml Tartrato de sodio y potasio al 2% en agua destilada

Mezclar soluciones.

Solución B

- 100 ml Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.01N

Tomar 2 ml de solución A y 98 ml de la solución B, homogenizar.

Cuadro 6. Preparación de tubos para método de Lowry modificado					
Tubo	Albúmina (ml) 1:50	Agua destilada (ml)	Solución AB (ml)	Folin (µl) 1:2	Solución problema (µl)
1	1000	0	3000	300	1:50
2	800	200	3000	300	1:100
3	600	400	3000	300	1:200
4	400	600	3000	300	1:400
5	200	800	3000	300	1:800
6	100	900	3000	300	
7	50	950	3000	300	
8	25	975	3000	300	
9	0	1000	3000	300	

En tubos problema tomar 20µl del *AgLmex* y diluir en 1ml, tomar este como referencia para las siguientes diluciones.

Agregar solución AB, incubar por 10 minutos y adicionar Folin

Homogenizar e incubar a obscuridad por 10 minutos

En placa de 96 pozos (Thermo-Fisher nunc; PolySorp), colocar 100µl de cada muestra, así como tubos correspondientes a la curva y leer en espectrofotómetro de placas (Epoch) a 580nm

Interpolar resultados

■ **Solución de PBS para ELISA (10L)**

- 80 g Cloruro de sodio
- 11.6 g Fosfato de sodio monobásico
- 2 g Fosfato de potasio monobásico
- 2.020 g Cloruro de potasio

Diluir en agua destilada y aforar a 10 litros.

■ **ELISA tipo sándwich**

Fase 1: En solución PBS (10ml) diluir el anticuerpo de captura (1.0µg/ml) y agregar 100µl en cada pozo de una placa de 96 pozos, Thermo-Fisher nunc; MaxiSorp. Incubar a 4°C en oscuridad toda la noche.

Fase 2: Remover el líquido y lavar con Solución Tween (Tween® 20; Sigma-Aldrich) al 0.05% en PBS (4 ciclos) y secar perfectamente.

Agregar 200µl de PBS-BSA (US Biological, C14072561) al 1% e incubar por dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Lavar con solución Tween al 0.05% y secar perfectamente.

Agregar las muestras (50µl de sobrenadante de cultivo celular o 30µl de suero) en cada pozo. Para curvas usar como concentración base 25000pg/ml del anticuerpo standard y hacer consecuentes diluciones (12500, 6250, 3125, 1562.5, 781.25, 390.625, 195.3125, 97.6562, 48.8281, 24.4140) en PBS-BSA, como control se usó un pozo con solo PBS-BSA.

Incubar a 4°C en oscuridad toda la noche.

Fase 3: Remover el líquido y lavar con Solución Tween (4 ciclos). Secar perfectamente y agregar el anticuerpo de detección (0.50µg/ml), 100µl/pozo. Incubar por dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Lavar con solución Tween al 0.05% y secar perfectamente. Adicionar 100µl/pozo de estrepto-avidina 1:2000 (Avidin-HRP Conjugate, PreproTech No.Cat.:900-K50). Incubar por 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Lavar nuevamente (4 ciclos).

Agregar 100µl/pozo de ABTS (10ml de ABTS + 100µl de Peróxido de hidrógeno) e incubar a oscuridad por 5 minutos.

Leer a 405nm en espectrofotómetro de placas (Epoch) e interpolar valores.